

# ANAEROLIMNOLOGÍA: PEQUEÑA GUÍA PARA EL MUESTREO EN AGUAS MICROAERÓBICAS Y ANÓXICAS EN LAGOS Y EMBALSES ESTRATIFICADOS

L. Jesús García-Gil<sup>1</sup> y Antonio Camacho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Ecologia Aquatica. Universitat de Girona. Campus de Montilivi. E-17071 Girona. España. e-mail: garciagil@morgat.udg.es. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Ecología e Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universitat de Valencia. E-46100 Burjassot. España. e-mail: antonio.camacho@uv.es

## RESUMEN

Los lagos y los embalses suelen presentar, durante el periodo de estratificación, zonas profundas pobres o incluso carentes de oxígeno disuelto. La línea que marca la anoxia suele representar también una frontera para el limnólogo, quien limita su estudio a las aguas que se encuentran por encima de dicha frontera. Sin embargo, en estas aguas se producen procesos físico-químicos y biológicos que tienen extraordinaria relevancia para el sistema completo. Procesos químicos determinados por la disponibilidad de sustancias oxidantes o reductoras, y procesos biológicos como la fotosíntesis oxigénica a muy bajas intensidades luminosas, la fotosíntesis anoxigénica, o la fijación autotrófica de carbono inorgánico por parte de bacterias quimiolitotrofas, que tienen lugar en estos ambientes. Puesto que el conocimiento completo de un sistema acuático debe englobar todas sus partes, y que los procesos que ocurren en aguas microaerobias y anóxicas pueden resultar determinantes para explicar el funcionamiento del sistema completo, el trabajo del limnólogo no puede ceñirse a las aguas ricas en oxígeno. Recogiendo la iniciativa surgida en las sesiones de trabajo del X Congreso Español de Limnología (II Ibérico) se aportan en este trabajo unas recomendaciones generales para poder incluir los ambientes anóxicos en el estudio de lagos y embalses.

Palabras clave: Ambientes anóxicos, interfaces

## ABSTRACT

*Deep microaerobic or totally anoxic waters are common in lakes and reservoirs. Usually oxygen extinction marks a borderline for most limnologists, who restrict their work to upper layers. However; physical, chemical and biological processes occurring in these anoxic waters are important for entire systems. Chemical processes determined by the availability of oxidised or reduced substances, as well as biological processes such as oxygenic photosynthesis by microorganisms adapted to low-light intensities, anoxygenic photosynthesis or chemolithotrophy, may occur in these environments. A complete knowledge of an aquatic ecosystem must include all components of the system and therefore. Limnology must not be restricted to oxic waters. Processes in anoxic waters may determine life and chemistry within the whole system. In the 10<sup>th</sup> Spanish Congress of Limnology (2<sup>nd</sup> Iberic), it was recommended that anoxic zones of our lakes and reservoirs should also be studied extensively. We include here several recommendations to better perform this work..*

*Keywords: Anoxic environments, interfaces.*

## INTRODUCCIÓN

La Limnología es una ciencia pluridisciplinar que ha sido tradicionalmente alimentada por la aportación de investigadores formados en campos diversos con un objetivo común, el estudio de las aguas epicontinentales. Desde hace tiempo los ecólogos microbianos nos hemos sentidos atraí-

dos por las comunidades microbianas acuáticas desde una óptica que integra a las bacterias y microorganismos en general con el medio en que se encuentran. En el X Congreso Nacional de Limnología (II Ibérico de Limnología), este interés se puso de manifiesto con la realización de sesiones de trabajo específicas sobre la limnología de ambientes anaeróbicos y de las zonas de

gradiente óxico-anóxico, concurridas no sólo por los especialistas, sino por otros limnólogos interesados en la temática. Una de las consecuencias de estas sesiones fue la iniciativa para la elaboración de una pequeña guía para el muestreo en las aguas microaeróbicas y anóxicas de lagos y embalses, cubriendo los aspectos básicos que deben ser atendidos. Queremos con estas líneas alentar a aquellos limnólogos que concluyan su muestreo a la profundidad a la que el oxímetro llegaba a 0.2 mg/l a seguir más abajo, y les aseguramos que descubrirán una gran variedad de procesos biológicos y químicos en cuya importancia quizá todavía no había reparado.

La Limnología pone en nuestras manos las herramientas necesarias para comprender mejor el medio. No obstante la literatura que en las últimas décadas nos ha introducido al conocimiento de una enorme variedad de sistemas leníticos nos revela a su vez que muchos de ellos se han estudiado parcialmente. Existen numerosos estudios de lagos, lagunas, o embalses estratificados, que soslayan todo lo que hay y ocurre debajo de la termoclina, especialmente cuando la pantalla de los oxímetros marca o se acerca al valor cero. En este sentido debemos convenir que nuestro conocimiento de los ecosistemas acuáticos es parcial, por limitado.

A través de la actividad de una gran variedad de grupos metabólicos bacterianos, así como de comportamientos químicos no suficientemente recalcados en los manuales, los ambientes anaeróbicos juegan un destacado papel en procesos clave de la dinámica de los sistemas acuáticos; la descomposición de la materia orgánica o el ciclo de los nutrientes, son dos ejemplos. Las bacterias son capaces de mineralizar la materia orgánica y de contribuir a la producción primaria a través de la fotosíntesis y la quimiosíntesis. La actividad de estos productores primarios puede dar lugar a tasas de fijación de carbono inorgánico superiores a las de muchos sistemas eutróficos (Camacho & Vicente, 1998), que tienen lugar en un rango estrecho de profundidades en las cuales las bacterias autótrofas concentran sus poblaciones en función de los gradientes físico-químicos (Guerrero *et al.*, 1985; García-Gil *et al.*, 1999; Camacho *et al.*, 2000a). Aunque habitualmente la

fijación de carbono en las interfases oxico-anóxicas ha sido considerada como poco relevante como aporte de materia orgánica para los lagos, últimamente van apareciendo ejemplos en los que la producción profunda (fotolitoautotrofica y quimiolitoautotrofica) pueden ser la fuente mayoritaria de carbono para el zooplancton de la zona aerobia (Camacho *et al.*, 2001a). Tampoco debemos olvidar que numerosos tipos de organismos que normalmente habitan las aguas bien oxigenadas se aventuran, temporal o definitivamente, a pasar parte de su vida en las aguas anóxicas. Así, desde cianobacterias (Cohen *et al.*, 1977; Camacho *et al.*, 1996, 2000b), algas criptofíceas (Pedró-Alió *et al.*, 1987; Gasol *et al.*, 1992; García-Gil *et al.*, 1993; Camacho *et al.*, 2001b), crustáceos y rotíferos (Miracle *et al.*, 1992; Salonen & Lehtovaara, 1992; Massana *et al.*, 1994; Miracle & Armengol-Díaz, 1995), larvas de insectos como *Chaoborus* sp. (Baker *et al.*, 1985), y el caso extremo de los ciliados estrictamente anaerobios (Finlay *et al.*, 1991; Esteban *et al.*, 1993; Massana *et al.*, 1996), todos ellos encuentran acomodo más o menos permanente en las aguas anóxicas de nuestros lagos y embalses cuando sus aguas se estratifican verticalmente. Por otro lado, los equilibrios químicos que tienen que ver con la solubilidad de compuestos, así como la especiación redox recogidos en los manuales son válidos solamente en condiciones estándar (25 °C y ambiente oxidante) lejos de las prevalentes en las zonas anóxicas.

En la ya larga trayectoria de participación de los ecólogos microbianos (que en nuestro país ejercen orgullosamente de limnólogos) en las distintas actividades de la Asociación, nos hemos dado cuenta, especialmente a través de los congresos, de la existencia de ese vacío de conocimientos. Este se pone de manifiesto en un buen número de sistemas leníticos que, por la latitud en que se encuentran y por la profundidad de sus aguas, probablemente presentan episodios de anoxia durante una buena parte de su periodo de estratificación. En ningún caso se pretende con estas líneas convencer a todos los limnólogos ibéricos para que centren sus estudios en los ambientes que nos ocupan, pero sí animarles a la obten-

ción de algunos datos de estas zonas de los sistemas estratificados, y a la inclusión de estos datos dentro de la descripción más amplia del sistema completo que se realizará como consecuencia de sus trabajos. La disponibilidad de esa información, por pequeña que sea, ayudará sin duda a esclarecer el funcionamiento del ecosistema acuático estudiado. Creemos que sería necesario que un limnólogo que se enfrenta a un hipolimnion anaeróbico tuviese en cuenta una serie de aspectos que, aún observados sin excesivo detalle, pueden significar, en definitiva, el punto de partida para un mejor conocimiento de todo el sistema. Es por ello que en los siguientes apartados se realizan una serie de consideraciones que pueden orientar al limnólogo a la hora de “atacar” esas aguas en las que hasta ahora no se aventuraba.

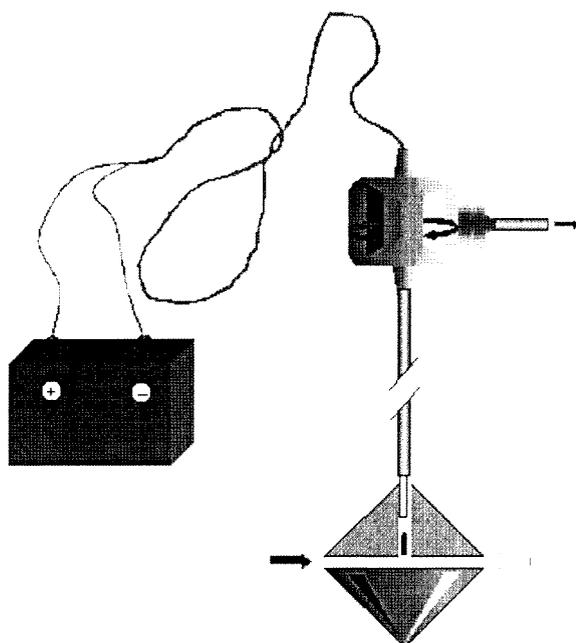
### VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS

Las zonas anaeróbicas, y concretamente las capas profundas de los lagos y lagunas, presentan unas propiedades físico-químicas completamente distintas a las de las aguas más superficiales. En Limnología se acostumbra —con razón— a dar una gran relevancia al oxígeno disuelto como parámetro integrador e indicador de procesos biológicos importantes que generalmente se relacionan con su consumo (respiración) o con su producción (fotosíntesis). Hutchinson (1957) ya comentó que “...a skillful limnologist can learn more from a single O<sub>2</sub> measurement than from any other parameter”. Las variaciones temporales de O<sub>2</sub>, proporcionan también información interesante acerca del “metabolismo” de los lagos, reflejando, y a menudo anunciando, desequilibrios tróficos y otros desarreglos relacionados con la carga orgánica. Todo ello, junto con la facilidad que ofrecen los electrodos selectivos para determinar su concentración, han convertido al oxígeno en el faro que guía el conocimiento físico-químico y biológico de un ecosistema acuático. Pero, ¿qué ocurre cuando el oxígeno se agota? ¿Qué interés para los organismos vivos de un lago tiene un ambiente si éste carece de oxígeno, de luz y está repleto de sustancias tóxicas?

¿Para qué adentrarse en un ambiente más ácido, frío y reductor? ¿Qué parámetro sustituirá al oxígeno disuelto, cuando éste se acaba? ¿Qué sustancia nos proporcionará tanta información a cambio de tan poco? Ante tantas preguntas sin respuesta, quizá lo mejor es mirar hacia otro lado. Hacia arriba otra vez. Desgraciadamente, son pocos los estudios limnológicos que intentan responder a estas preguntas. Por esta razón, debemos reconocer que los limnólogos somos científicos del agua con un marcado carácter aéreo y aeróbico: los sistemas acuáticos son vistos desde encima de la superficie hacia abajo, hasta que “la normalidad”, es decir, el oxígeno, se acaba. Es cierto que para mirar a un sistema de “abajo a arriba” ya están los “anaerolimnólogos”. No obstante, nos preocupa que a menudo los trabajos “arriba-abajo” y “abajo-arriba” no vayan suficientemente coordinados.

Muchos lagos, lagunas y embalses poseen zonas de interés potencial que se quedan sin muestrear y, por tanto, sin descubrir. Aunque suene a utópico, la situación ideal sería el estudio específico de los subsistemas anaeróbicos como consecuencia de haber sido puestos de manifiesto o “revelados” previamente por limnólogos que se aventuraron por debajo de la termoclina. Si así fuera, con sólo un poco más de esfuerzo se tendrían las claves para conocer mejor nuestros lagos y embalses. Para responder a estas consideraciones se recomienda:

- a. Análisis *in situ* de las propiedades físico-químicas del agua más allá del punto en que desaparece el oxígeno disuelto.
- b. Preparación de métodos para la conservación de muestras y el análisis de compuestos reducidos como el amonio, el ión ferroso o el sulfhídrico.
- c. Tipificación de parámetros. Buscar indicadores de los sistemas anaeróbicos que, además, puedan servir para evaluar el grado de anoxia de los mismos.
  - potencial de oxido-reducción (redox).
  - amonio, nitrito (Golterman et al., 1978)
  - pH epilimnion – pH hipolimnion
  - sulfhídrico (Cline, 1969)



**Figura 1.** Sistema de doble cono y bomba para el muestreo fino de gradientes o sistemas microestratificados. *Double cone for fine layer sampling in gradients or microstratified systems.*

## GRADIENTES

La existencia de dos masas de agua, epilimnion e hipolimnion, que se hallan en contacto implica necesariamente una zona de transición entre las condiciones de una y otra capa de agua. Que la biosfera es un sistema que se empeña en mantener los compartimentos separados y que la vida aprovecha las interfases entre esos compartimentos para florecer son puntos comunes en Ecología. Por lo tanto debemos intensificar el muestreo en esas zonas. Si, por ejemplo, decidimos tomar medidas o muestras cada 1 o 2 metros de profundidad, en los gradientes deberíamos hacerlo con un grado de precisión de al menos un orden de magnitud superior. Así, en la zona de cambio deberíamos observar qué ocurre cada 20 cm como mínimo, dependiendo de la intensidad del gradiente.

Para conseguir este tipo de muestreo microestratificado se necesita un dispositivo especial

consistente en dos conos macizos de PVC o metacrilato, opuestos por sus bases y separados por 1 cm, conectados a un tubo de goma por sistemas tipo “gardena”. El agua es aspirada una vez se ha bajado el doble cono a la profundidad deseada por una bomba impulsora que a su vez se conecta a una batería de 12 V (Fig. 1) El agua entra repartida por todo el perímetro del cono, minimizando las turbulencias. El dispositivo es realmente barato y fácil de construir. Las bombas de achicar agua que se instalan en las embarcaciones de recreo pueden servir como impulsoras.

El muestreo “fino” de las zonas de gradiente puede reportar resultados inesperados, teniendo en cuenta que ahí no solo se acumulan bacterias, sino también un buen número de eucariotas. En este apartado las recomendaciones principales se resumen en las siguientes:

- Intensificación del muestreo o de la frecuencia de lectura de parámetros físico-químicos en los gradientes.
- Construir un muestreador de doble cono como el de la figura 1 y “echarlo a la mochila” (¡nunca se sabe!).
- Observación al microscopio de los organismos que se acumulan a ese nivel.

## REDOX

El potencial de óxido-reducción es un parámetro integrador que nos indica la abundancia de electrones en nuestro sistema, así como la tendencia de éste a cederlos o a captarlos. Este parámetro determina la especiación química de elementos tan importantes como el hierro (Fig. 2), el nitrógeno o el azufre. Junto al pH, el potencial de oxidación-reducción es fundamental para poder interpretar adecuadamente la química del agua. Los diagramas pH/pe ofrecen el “mapa” de especiación química de los elementos que intervienen en los equilibrios redox, lo que nos informa sobre aspectos tan importantes de un compuesto como la solubilidad. Junto al redox, otro factor relacionado con la profundidad como por ejemplo la

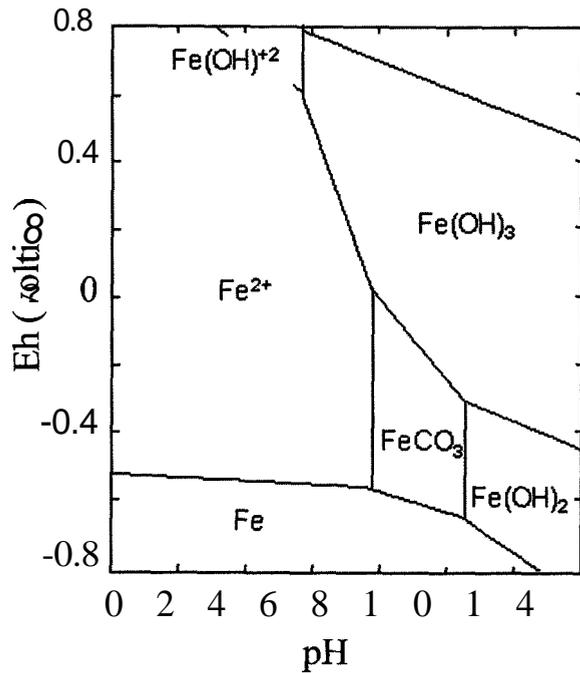


Figura 2. Diagrama pH/Eh para las especies del hierro (redibujado de Stumm & Morgan, 1981). *pH/Eh diagram for iron species (redrawn from Stumm & Morgan, 1981).*

presión hidrostática puede alterar de forma notable los equilibrios químicos esperados en función de las constantes que aparecen en los manuales.

Los gradientes de redox (redoxclina) se producen de forma muy brusca y rara vez coinciden con la termoclina, donde suele hallarse la oxiclina. Ello es debido a que los aumentos bruscos de potencial (valores electronegativos) no son debidos al agotamiento del oxígeno, sino a la aparición de sustancias reductoras como el sulfhídrico ( $H_2S$ ). La capa de agua situada entre la oxiclina y la redoxclina se denomina zona de transición y se caracteriza por un “vacío químico” donde no hay sustancias oxidantes como el oxígeno ni tampoco sustancias reductoras. Esta zona de transición puede extenderse apenas unos centímetros o por decenas de centímetros. Las recomendaciones que atañen a este apartado son:

- Determinar el valor del potencial de óxido-reducción de la muestra *in situ* o inmediata-

mente después de ser recogida (evitando la aireación de la muestra). Se recomienda empezar por las muestras más próximas a la superficie (de mayor potencial de oxidoreducción) ya que tras sumergir el electrodo en una solución reductora su regeneración para poder medir de nuevo potenciales positivos requiere mucho tiempo

- Representar en un gráfico, conjuntamente, los perfiles verticales de redox y de oxígeno. Determinar la zona de transición entre la oxiclina y la redoxclina y considerar ésta como zona de influencia de la parte “aeróbica” de la columna de agua.
- Tener a mano los diagramas pH-pe de los principales elementos (nitrógeno, fósforo, azufre, hierro...)

## PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

El análisis de pigmentos fotosintéticos ofrece una valiosa información acerca de los productores primarios en un ecosistema acuático. En muchos trabajos se usa la concentración de Clorofila *a* como indicador de la biomasa algal, aunque la correspondencia entre ambos parámetros es variable en función no solamente de las especies algales presentes, sino también del estado fisiológico de las mismas. En cualquier caso, como ocurre con la concentración de oxígeno, la concentración de Clorofila *a* ofrece mucha información a cambio de relativamente poco esfuerzo

Los máximos de absorción a 432 y 663 nm en acetona no son exclusivos de la Clorofila *a*, pues las bacterioclorofilas de las bacterias verdes del azufre, relativamente frecuentes en los gradientes  $O_2/H_2S$ , presentan propiedades espectroscópicas muy parecidas. De hecho existe un buen número de trabajos publicados donde picos profundos de pigmentos bacterianos son presentados como Clorofila *a*. Para otros, la solución a estos errores está simplemente en no muestrear esas zonas de gradientes. En este caso, a menudo se soslayan importantes poblaciones de algas adaptadas a bajas intensidades de luz y que proliferan en la oxiclina tratando de aprovecharse de los nutrien-

tes que provienen del hipolímnion. A menudo estas algas suelen teñir los filtros de marrón lo que puede acabar por disuadir del todo al limnólogo ante la duda de si debe o no procesarse la muestra. A partir de los espectros de absorción, tanto en extracto como *in vivo* los pigmentos presentes en una muestra determinada pueden revelar la presencia de determinados grupos de productores primarios algales o bacterianos. En este sentido se recomienda:

- a. Cuando sea posible realizar la separación y cuantificación de pigmentos por técnicas cromatográficas, preferentemente HPLC (Borrego & García-Gil, 1994; Jeffrey *et al.*, 1997)
- b. Muchos espectrofotómetros en los que se realiza la medida del espectro de absorción de los pigmentos tienen la posibilidad de obtener las derivadas de la curva de absorción. Mediante la segunda derivada se pueden discernir los picos de absorción de los pigmentos individuales cuyos espectros se imbricaban en la determinación directa.
- c. Guardar los datos crudos de los espectros de absorción en ficheros de texto plano (ASCII). En la actualidad los espectrofotómetros gestionados por "software" externo (conectado a un PC, por ejemplo) ofrecen esta posibilidad. Los ficheros así obtenidos pueden ser tratados por programas específicos para el análisis y separación no lineal de picos, como por ejemplo el "Peakfit" (SPSS Science). Esta posibilidad es ahora mismo la mejor alternativa a la HPLC para la determinación precisa de pigmentos.

## LUZ

La medida de la extinción de la luz, en especial en ecosistemas lacustres y embalses, es fundamental para conocer los límites de la fotosíntesis y a la vez, a través del cálculo de los coeficientes de extinción, recabar información sobre las propiedades ópticas del agua. Estas nos informan de las capas o subcapas en las que se divide nuestra

columna de agua y en ocasiones nos revelan compartimentos no observables a partir de los parámetros físicos y químicos convencionales.

Parece comúnmente aceptado el valor del 1% de la luz incidente en la superficie como límite fisiológico para la fotosíntesis y, por tanto, para la producción primaria en algas. No obstante, la luz se extingue exponencialmente por lo que valores inferiores a ese valor se hallan a menudo no mucho más abajo en la columna de agua. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en los gradientes, y debido a la acumulación de partículas que en ellos tiene lugar, la luz experimenta una extinción mucho más fuerte. Ahí, no obstante, suelen hallarse grupos de organismos fotosintéticos adaptados a condiciones de luz tenue. Criptomonadales y cianobacterias suelen acumularse cerca la picnoclina, a intensidades de luz por debajo del 1%, siendo en muchos casos los únicos responsables de la producción primaria. En otros casos son las bacterias fototróficas que habitan los ambientes anaeróbicos iluminados las que constituyen una comunidad fotosintética, funcionalmente activa, a intensidades que incluso pueden ir por debajo del 0.1% de la luz incidente en la superficie (Vila *et al.*, 1996). En consecuencia se recomienda:

- a. Adoptar el 0.1% y no el 1% el límite fisiológico inferior (punto de compensación) para la fotosíntesis.
- b. Calcular los coeficientes de extinción de la luz de las distintas subcapas ópticas. Éstas son fácilmente visibles sobre un gráfico semi-logarítmico de extinción de la luz con la profundidad.

## CONCLUSIONES

El estudio de los sistemas leníticos (lagos y embalses) debe incluir las zonas anóxicas, puesto que constituyen un aspecto común de dichos sistemas. Las distintas condiciones físico-químicas de estas aguas requieren el uso de técnicas que aseguren que las poblaciones de organismos que en ellas viven y los compuestos químicos disuel-

tos no se vean alterados con el muestreo. Por esa razón se debe evitar en lo posible el contacto de las muestras con el oxígeno, al menos hasta que no se hayan añadido los conservantes o reactivos adecuados para evitar dichas alteraciones. Puesto que los cambios físico-químicos y en la comunidad biológica se pueden producir en apenas unos centímetros de profundidad, las técnicas de muestreo deberán ser suficientemente precisas para representar fielmente la extrema heterogeneidad vertical que se puede llegar a encontrar. Dicha heterogeneidad se refleja tanto en la composición química del agua y sus características físicas, como en la comunidad biológica. Su conocimiento se puede conseguir, ya sea adaptando las técnicas habitualmente utilizadas en Limnología o bien ideando nuevas técnicas que se adapten a las necesidades del estudio. Ante todo, nuestra recomendación es que cuando llegues al agotamiento de oxígeno “no pares, sigue sigue”.

## REFERENCIAS

- BAKER, A. L., K. K. BAKER & P. A. TYLER. 1985. Close interval sampling of migrating *Chaoborus* larvae across the chemocline of meromictic Lake Fidler, Tasmania. *Arch. Hydrobiol.*, 103: 51-59.
- BORREGO, C. M. & L. J. GARCÍA-GIL. 1994. Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLC. *Photosynth. Res.*, 41: 157-163.
- CAMACHO, A., F. GARCIA-PICHEL, E. VICENTE & R. W. CASTENHOLZ. 1996. Adaptation to sulfide and to the underwater light field in three cyanobacterial isolates from Lake Arcas. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 21: 293-301.
- CAMACHO, A. & E. VICENTE. 1998. Carbon photoassimilation by sharply stratified phototrophic communities at the chemocline of Lake Arcas (Spain). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 25: 11-22.
- CAMACHO, A., E. VICENTE & M. R. MIRACLE. 2000a. Spatio-temporal distribution and growth dynamics of phototrophic sulfur bacteria populations in a sulphide-rich lake (Lake Arcas, Spain). *Aquat. Sci.*, 62: 334-349.
- CAMACHO, A., E. VICENTE & M. R. MIRACLE. 2000b. Ecology of a deep-living *Oscillatoria* (= *Planktothrix*) population in the sulphide-rich waters of a Spanish karstic lake. *Arch. Hydrobiol.*, 148: 333-355.
- CAMACHO, A., J. EREZ, A. CHICOTE, M. FLORÍN, M. M. SQUIRES, C. LEHMANN & R. BACHOFEN. 2001a. Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web. *Aquat. Sci.*, 63: 91-106.
- CAMACHO, A., E. VICENTE & M. R. MIRACLE. 2001b. On the ecology of *Cryptomonas* at the chemocline of a karstic sulphate-rich lake. *Freshwater Res.*, 52: 805-815.
- CLINE, J. D., 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, 14: 454-458.
- COHEN, Y., W. KRUMBEIN & M. SHILO. 1977. Solar Lake (Sinai). 2. Distribution of photosynthetic microorganisms and primary production. *Limnol. Oceanogr.*, 22: 609-620.
- ESTEBAN, G., B. J. FINLAY & T. M. EMBLEY. 1993. New species double the diversity of anaerobic ciliates in a Spanish lake. *FEMS Microbiol. Lett.*, 109: 93-100.
- FINLAY, B. J., K. J. CLARKE, E. VICENTE & M. R. MIRACLE. 1991. Anaerobic ciliates from a sulphide-rich solution lake in Spain. *Eur. J. Protistol.*, 27: 148-159.
- GARCÍA-GIL, L. J., E. VICENTE, A. CAMACHO, C. M. BORREGO, X. VILA, X. P. CRISTINA & J. RODRIGUEZ-GONZÁLEZ. 1999. Vertical distribution of photosynthetic sulphur bacteria linked to saline gradients in Lake El Tobar (Cuenca, Spain). *Aquat. Microb. Ecol.*, 20: 299-303.
- GARCÍA-GIL, L. J., C. M. BORREGO, L. BAÑERAS & C. A. ABELLA. 1993. Dynamics of phototrophic microbial populations in the chemocline of a meromictic basin of lake Banyoles. *Int. Rev. gesamten Hydrobiol.*, 78: 283-293.
- GASOL, J.M., R GUERRERO & C. PEDRÓS-ALIÓ. 1992. Spatial and temporal dynamics of a metalimnetic *Cryptomonas* peak. *J. Plankton Res.*, 14, 1565-1580.
- GUERRERO, R., E. MONTESINOS, C. PEDRÓS-ALIÓ, I. ESTEVE, J. MAS, H. VAN GEMERDEN, P. A. HOFMAN & J. F. BAKER. 1985. Phototrophic sulfur bacteria in two Spanish lakes: vertical distribution and limiting factors. *Limnol. Oceanogr.*, 30: 919-931.
- GOLTERMAN, H. L., R. S. CLYMO & M. A. M. OHNSTAD, 1978. *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*. IBP Handbook no. 8. Blackwell Sci. Pub., Oxford, U. K.

- HUTCHINSON, G. E. 1957. *A treatise of Limnology*. Wiley New York pp. 691-726.
- JEFFREY, S. W., R. F. C. MANTOURA & S. W. WRIGHT. 1997. *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods*. Unesco, Paris. 661 pp.
- MASSANA, R., J. M. GASOL, K. JÜRGENS & C. PEDRÓS-ALIÓ. 1994. Impact of *Daphnia pulex* on a metalimnetic microbial community. *J. Plankton Res.*, 16: 1379-1399.
- MASSANA R., J. GARCIA-CANTIZANO & C. PEDRÓS-ALIÓ. 1996. Components, structure and fluxes of the microbial food web in a small, stratified lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 11: 279-288.
- MIRACLE, M. R. & X. ARMENGOL-DÍAZ. 1995. Population dynamics of oxyclinal species in lake Arcas-2 (Spain). *Hydrobiologia*, 313/3 14: 291-301.
- MIRACLE, M. R., E. VICENTE & C. PEDRÓS-ALIÓ. 1992. Biological studies of Spanish meromictic and stratified lakes. *Limnetica*, 8: 59-77.
- PEDRÓS-ALIÓ, C., J. M. GASOL & R. GUERREIRO. 1987. On the ecology of a *Cryptomonas phaseolus* population forming a metalimnetic bloom in lake Cisó, Spain: Annual distribution and loss factors. *Limnol. Oceanogr.*, 32: 285-298.
- SALONEN, K. & A. LEHTOVAARA. 1992. Migrations of haemoglobin-rich *Daphnia longispina* in a small, steeply stratified, humic lake with an anoxic hypolimnion. *Hydrobiologia*, 229: 271-288.
- STUMM, W. & J. J. MORGAN. 1981. *Aquatic chemistry*. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons. New York.
- VILA, X., M. DOKULIL, L. J. GARCÍA-GIL, C. A. ABELLA, C. M. BORREGO & L. BAÑERAS. 1996. Composition and distribution of phototrophic bacterioplankton in the deep communities of several central European lakes: the role of light quality. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergehn. Limnol.*, 48: 183-196.