



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

**Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

# Respuesta de *Posidonia oceanica* a la fertilización experimental de hierro y fósforo en Ses Salines, Mallorca

Aurora Rayo Aguilar

**Grado de Biología**

Año académico 2017-18

Trabajo tutelado por Agawin Romualdo, Nona Sheila  
\*Departamento de Biología

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave del trabajo:

*Posidonia oceanica*, crecimiento, producción, clorofila, hierro, fósforo.



## AGRADECIMIENTOS.

Agradecer a los técnicos del departamento de Ecología Marina de la Universidad de las Islas Baleares, Aida Frank y Regino, por su trabajo disponibilidad y ayuda a la hora de ejecutar el experimento *in situ* y, consejos y ayuda a la hora de trabajar en el mar como buzo. Al técnico Víctor Fernández en el procedimiento de laboratorio. A María del Mar Bibiloni, por su aportación en el análisis estadístico. A mi familia por aguantarme y darme consejos en especial a mi hermana y mi madre. Finalmente, a mi tutora la Dra. Nona S. R. Agawin.

## ÍNDICE.

Abstract. ....	5
Resumen. ....	5
Abreviaturas. ....	5
1. Introducción. ....	6
2. Objetivo. ....	8
3. Metodología. ....	8
3.1. Zonas de estudio. ....	8
3.2. Diseño experimental <i>in situ</i> . ....	9
3.3. Fertilización <i>in situ</i> . ....	11
3.4. Respuesta de <i>Posidonia oceanica</i> . ....	11
3.4.1. Marcaje <i>in situ</i> , crecimiento y contenido en hierro y fósforo de las hojas. ....	11
3.4.2. Determinación de la producción primaria y clorofilas a y b. ....	13
3.5. Tratamiento de los datos. ....	17
3.5.1. Análisis estadístico. ....	17
3.5.2. Representación gráfica y valores. ....	17
4. Resultados. ....	18
4.1. Crecimiento de las hojas y contenido en hierro y fósforo. ....	18
4.2. Producción primaria y clorofilas a y b. ....	22
5. Discusión. ....	26
5.1. Crecimiento de las hojas y contenido en hierro y fósforo. ....	26
5.2. Producción primaria y clorofilas a y b. ....	27
6. Conclusión. ....	28
Bibliografía. ....	30

## ABSTRACT.

The meadows of *Posidonia oceanica* are considered one of the most important marine ecosystems in the Mediterranean Sea due to the numerous ecological services they offer, including their fundamental role in coastal protection and support for a great diversity of marine organisms.

Latest studies report that the meadows are decreasing due to natural causes and anthropogenic pressures.

To understand better the dynamics of growth and production of *P. oceanica*, it is important to investigate how factors such as iron (Fe) and phosphorus (P) which are believed to limit *P. oceanica*, control them. After performing the experimental addition of Fe and P in the sediments of *P. oceanica* meadows in Ses Salines, Mallorca, results show that these nutrients are not limited to growth and production of *P. oceanica*. Unlike a result, where the addition of P decreases the growth of *P. oceanica*, so an excess of phosphorus has a negative effect on the phanerogam.

Keywords: *Posidonia oceanica*, growth, production, chlorophyll, iron, phosphorus.

## RESUMEN.

Los prados de *Posidonia oceanica* se consideran uno de los ecosistemas marinos más importantes en el Mar Mediterráneo, debido a los numerosos servicios ecológicos que ofrecen, incluido su papel fundamental en la protección costera y el apoyo a una gran diversidad de organismos marinos.

Los últimos estudios realizados, informan que los prados están disminuyendo debido a causas naturales y presiones antropogénicas.

Para comprender mejor la dinámica del crecimiento y la producción de *P. oceanica*, es importante investigar cómo factores tales como el hierro (Fe) y el fósforo (P), los cuales se cree que limitan a *P. oceanica*, los controlan. Después de realizar la adición experimental de Fe y P en los sedimentos de las praderas de *P. oceanica* en Ses Salines, Mallorca, los resultados muestran que estos nutrientes no son limitantes para el crecimiento y la producción de *P. oceanica*. A diferencia de un resultado, donde la adición de P disminuye el crecimiento de *P. oceanica*, por lo que un exceso de fósforo tiene un efecto negativo en la fanerógama.

Palabras clave: *Posidonia oceanica*, crecimiento, producción, clorofila, hierro, fósforo.

## ABREVIATURAS.

C: parcelas control, Chl a: clorofila a, Chl b: clorofila b, Fe: parcelas con hierro, Fe + P: parcelas con la combinación de hierro y fósforo, g dw: peso seco en gramos (del inglés dry weight), g ww: peso fresco en gramos (del inglés wet weight), P: parcelas con fósforo, PPB: Producción primaria bruta, PPN: Producción primaria neta, R: Respiración, t<sub>1</sub>: primer tiempo de estudio, t<sub>2</sub>: segundo tiempo de estudio, t<sub>3</sub>: tercer tiempo de estudio, WB: botellas Winkler oscuras (respiración), WW: botellas Winkler claras (fotosíntesis).

## 1. INTRODUCCIÓN.

*Posidonia oceanica* (L. ) Delile es una fanerógama marina (Imagen 1), endémica del Mar Mediterráneo y perteneciente a la familia Posidoniaceae, que forma praderas submarinas de notable importancia ecológica. Es la fanerógama marina más extendida (Den Hartog, 1970), formando amplias y densas praderas que ocupan hasta 50.000 km<sup>2</sup> del área marina (Béthoux & Copin-Montégut, 1986), encontrándose desde la superficie hasta los 45 m de profundidad (Procaccini *et al.*, 2003).



Imagen 1. *Posidonia oceanica* en el Mar Mediterráneo. <sup>[1]</sup>

Es una especie de vida larga, cuyos rizomas son estructuras que pueden alcanzar hasta los 20 años (Marbà *et al.*, 2002a). Sin embargo, sus hojas, de incluso 1 m de longitud, son caducas y alcanzan una edad máxima de 300 días (Duarte, 1991), ya que están sujetas al ciclo anual de crecimiento-senescencia-renovación. La tasa de formación de hojas, rizomas y raíces y, por lo tanto, la propagación del clon, dependen de la actividad de los meristemas, los cuáles son las áreas donde la división celular es constante. *P. oceanica*, al ser una especie con hojas grandes, produce hojas nuevas lentamente (50,68 días), a diferencia de otras especies con un crecimiento más rápido como *Zoostera noltii* (13,71 días), debido al pequeño tamaño de sus hojas (Marbà *et al.*, 2004).

*P. oceanica* constituye la comunidad clímax y ejerce un papel estructural y funcional clave en los ecosistemas costeros (Montefalcone, 2009), tratándose de uno de los ecosistemas más importantes del Mar Mediterráneo. Por ello, ha sido clasificada como “hábitat prioritario” en el Anexo I de la Directiva Hábitat 92/43/CEE, que recoge todos los Lugares de Importancia Comunitaria (LIC) que necesitan ser protegidos.

La elevada importancia ecológica de las praderas de *P. oceanica*, reside en la producción primaria, ya que esta se exhibe a unos altos niveles y, es considerada una de las poblaciones de pastos marinos más productivos del mundo (Hemminga & Duarte, 2000), llegando a aportar hasta 20 litros de oxígeno por metro cuadrado de pradera por día. Además, estas praderas actúan como hábitat de gran variedad de organismos, tanto vegetales como animales, debido a que aportan alimento, protección y zonas para la reproducción.

En la actualidad, las praderas de *P. oceanica* se encuentran en regresión (Pérès, 1984), fenómeno que ha aumentado en los últimos años con el incremento de la presión antrópica sobre el litoral, como la eutrofización de las aguas en las que viven. Esta regresión, supone un efecto negativo tanto sobre las propias praderas de *P. oceanica*, como sobre otros ecosistemas vecinos, por ejemplo, las playas, las cuales pierden varios metros de arena con tan solo la desaparición de un metro lineal de pradera (Casola *et al.*, 1987); además, también suponen la pérdida de biodiversidad y el deterioro de la calidad del agua. Los principales motivos de esta problemática vienen dados por: la pesca de arrastre (Ardizzone & Pelusi, 1983), los fondeos, la contaminación por hidrocarburos, detergentes, pinturas o aguas residuales, que aumentan la turbidez del agua y dificultan la realización de la fotosíntesis (Balestri *et al.*, 2004; Burkholder *et al.*, 2007). También debe tenerse en cuenta, la amenaza que supone la presencia de algas tropicales invasoras, liberadas accidentalmente como *Caulerpa taxifolia* y *Caulerpa racemosa* (Ceccherelli *et al.*, 2000), cuyo crecimiento es muy acelerado y, ejercen una fuerte presión competitiva con la que están suplantando poco a poco a *P. oceanica*. Así como, el calentamiento global, enfermedades, blooms de algas, la acuicultura y las entradas de nutrientes (Orth *et al.*, 2006; Díaz-Almela & Duarte, 2008).

La dinámica de nutrientes en aguas costeras difiere considerablemente de la del medio oceánico (Vidal, 1988). Las zonas someras se caracterizan por una elevada tasa de sedimentación (Parsons *et al.*, 2013; Hargrave, 1980). En cualquier caso, las fanerógamas deben desempeñar algún papel clave en el ciclo de los nutrientes en aguas costeras, bien sea bombeando nutrientes del sedimento, y/o modificando las características fisicoquímicas del mismo.

La concentración de nutrientes en el agua determina a menudo su transparencia, ya que una concentración baja limita la producción primaria de los organismos fotosintéticos (Díaz & Marbà, 2009), donde sus menores requerimientos en N y P, así como su mayor capacidad de extracción, almacenamiento y reciclaje de nutrientes, les da una ventaja competitiva frente al plancton y las algas macrófitas y epífitas (Hemminga & Duarte, 2000).

El Mar Mediterráneo se suministra abundantemente con hierro, gracias a la tierra circundante y el polvo saharauis transportado por el viento. A pesar de esto, la falta estacional de hierro se ha observado en primavera, cuando la concentración de éste es baja y el fitoplancton está floreciendo en aguas oceánicas. Se estima que las áreas costeras dominadas por *P. oceanica* reciben sedimentos regularmente con altas concentraciones de hierro que estimularía su crecimiento (Marbà *et al.*, 2008). A pesar de este aporte de hierro exterior que estimularía el crecimiento, la mayoría de las praderas de *P. oceanica* del Mediterráneo crecen sobre sedimentos calcáreos, los cuales son muy pobres en hierro (Berner, 1984). Con tasas de sedimentación menores de 43 mg/m<sup>2</sup> por día, las tasas de crecimiento neto de las praderas se hacen negativas, lo cual indica que las praderas que reciben una cantidad de hierro menor son susceptibles a declinar (Marbà *et al.*, 2008). De esta manera, se ha demostrado que la adición experimental de hierro es efectiva para revertir el declive de *P. oceanica* (Marbà *et al.*, 2007).

La productividad primaria de las praderas de pastos marinos en ambientes tropicales se ha considerado generalmente limitada por la disponibilidad de nutrientes (Powell *et al.*, 1989; Short *et al.*, 1990; Powell *et al.*, 1991; Agawin *et al.*, 1996), e indican que el fósforo puede limitar la productividad. Sin embargo, esta visión ha sido falsificada en ciertos lugares (Erftemeijer, 1994). En estudios realizados por Vidal (1988), en ambientes templados como el Mar Mediterráneo, pudieron concluir que tanto la producción primaria como el crecimiento de las fanerógamas estudiadas no estaban limitadas por la disponibilidad de fósforo. Cuando el sedimento supera los 50 mg/m<sup>2</sup> por día, el declive de las praderas se incrementa fuertemente (Díaz-Almela *et al.*, 2008).

En la actualidad, hay pocos estudios experimentales que estudian simultáneamente el papel de hierro y fósforo en limitar o controlar el crecimiento y la producción primaria de *P. oceanica*. Dentro del marco del proyecto de CTM2016-75457-P, de la Universidad de las Islas Baleares (UIB) en el área de Ecología Marina, se están realizando estudios sobre, cómo estos factores limitan o controlan el crecimiento y la producción primaria de la pradera de *P. oceanica* que se encuentra en la costa del Cap de Ses Salines, Mallorca (Imagen 2). De esta manera, el trabajo de final de grado llevado a cabo, se centra en la respuesta de *Posidonia oceanica* a la fertilización experimental de Fe y P en Ses Salines, Mallorca.

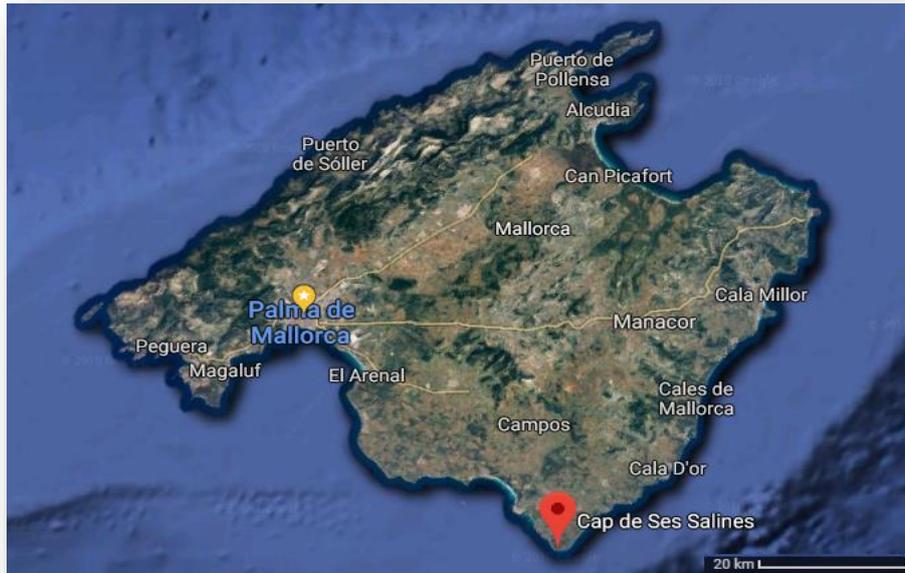


Imagen 2. Localización del lugar de estudio *in situ*, el Cap de Ses Salines en la zona más meridional de la isla de Mallorca (Islas Baleares). [2]

## 2. OBJETIVO.

El objetivo de este estudio fue comprobar cómo interactúan y afectan la adición de hierro y fósforo en los sedimentos de *P. oceanica*. Para ello, se procedió a estudiar la respuesta de *P. oceanica* en cuanto al crecimiento y la producción de aquella pradera sometida a concentraciones definidas de estos nutrientes. Adicionalmente, se analizó el contenido de clorofila a y b, en las hojas de nuevo crecimiento y, el contenido en hierro y fósforo.

## 3. METODOLOGÍA.

### 3.1. Zonas de estudio.

El estudio requirió dos lugares de trabajo, por un lado, la zona donde se hallaba la pradera de *P. oceanica* en la que se ejecutó el experimento *in situ* y, por otro lado, un laboratorio donde se procedió al analizar las muestras obtenidas.

La realización del experimento *in situ* se realizó en el punto más meridional de la isla de Mallorca, a 151,22 m de la costa del Faro del Cap de Ses Salines, en las coordenadas (DMS): 39° 15' 51,9"N 3° 02' 59,7"E (Imagen 3). Las condiciones del lugar de estudio, al ser mar abierto y con unas profundidades de entre siete y nueve metros, variaban según la época del año, dificultando así, el trabajo de los buzos a la hora realizar las inmersiones necesarias para la preparación y la recogida de las muestras.

El análisis de las muestras, previamente recogidas *in situ*, se llevaron a cabo en el laboratorio del área de Ecología Marina de la Universidad de las Islas Baleares (UIB). Adicionalmente, el análisis de contenido en hierro y fósforo se realizó en un laboratorio externo a la UIB.



Imagen 3. Imagen satélite de la zona de estudio, el Cap de Ses Salines. En el recuadro rojo se observa el lugar de la realización del experimento *in situ* (DSM: 39° 15' 51,9"N 3° 02' 59,7"E). Escala 50,41 m. [3]

### 3.2. Diseño experimental *in situ*.

Los tratamientos a los que se sometieron los haces de *P. oceanica* en el sedimento de la pradera que se encontraba en el lugar de estudio fueron tres; fósforo inorgánico (P), aquellos haces que se sometieron únicamente al aporte de fósforo inorgánico en el sedimento. Hierro (Fe), aquellos haces que se sometieron únicamente al aporte de hierro en el sedimento. Y, por último, aquellos haces que se sometieron a la combinación de ambos nutrientes, hierro y fósforo (Fe + P). Además, el estudio se ejecutó con un control (C), los haces del cual no contenían ninguno de los nutrientes en su sedimento.

El experimento *in situ* empezó con la colocación aleatoria de tres parcelas por tratamiento y control, obteniéndose un total de 12 parcelas. Estas parcelas se delimitaron con varios bloques de hormigón y cuerdas en el fondo del mar. Cada parcela tenía unas dimensiones de 2 x 2 metros de superficie. Cada tratamiento se separó cuatro metros uno del otro (para evitar contaminaciones entre tratamientos) y cada réplica del tratamiento se separó dos metros entre ellos (Imagen 4). El lugar de colocación de las parcelas presentaba una pendiente, de tal forma que las parcelas quedaron colocadas de menor a mayor profundidad con siete metros de profundidad para C, seguido de P, Fe + P y Fe con la profundidad máxima del estudio a ocho metros y medio.

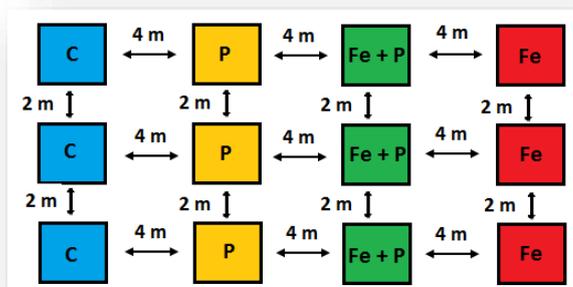


Imagen 4. Representación gráfica de la distribución de las parcelas *in situ*.

Los datos obtenidos para este trabajo de final de grado se dividieron en tres etapas, donde se realizaron en cada una de ellas, una previa fertilización de los nutrientes, una preparación de las muestras y, posteriormente, una recogida de estas para ser analizadas en el laboratorio. El período de tiempo transcurrido entre cada etapa de estudio se puede observar en la Tabla 1, compuesta por el primer tiempo ( $t_1$ ), el segundo ( $t_2$ ), y el tercero ( $t_3$ ).

Tabla 1. Fechas de realización de fertilización, marcaje y recogida in situ.

Tiempos de estudio	Fertilización	Marcaje	Recogida	Tiempo transcurrido entre marcaje y recogida.
$t_1$	7 y 8/06/2017 (P y Fe + P)	20/05/2017 (Fe + P y Fe)	12/10/2017	115 días (Fe y Fe + P)
	16 y 20/05/2017 (Fe)	22/05/2017 (P y C)		113 días (P y C)
$t_2$	6/09/2017 (P y Fe + P)	12/10/2017 (P, Fe, y Fe + P)	7/02/2018	119 días (P, Fe y Fe + P)
	8/09/2017 (Fe)	13/10/2017 (C)		118 días (C)
$t_3$	10/05/2018	21/05/2018	19/07/2018	60 días

Finalmente, se colocaron dos medidores de temperatura e intensidad de luz llamados, HOBOS (Imagen 5), los cuales recogían información cada dos horas. Se colocaron, el primero a una profundidad de siete metros al lado de las parcelas C, y el segundo, a ocho metros y medio al lado de las parcelas de Fe (Tabla 2).



Imagen 5. UA-002 Registrador HOBO Pendant sumergible para Temperatura/Luz utilizado para el estudio in situ. [4]

Tabla 2. Media  $\pm$  desviación estándar de la Temperatura ( $^{\circ}$ C) y la Intensidad de luz (Lux) para el HOBOS a 7 m de profundidad en una parcela C, y el HOBOS a 8,5 m de profundidad en una parcela Fe.

Tiempo	HOBOS a 7 m de profundidad (C)		HOBOS a 8,5 m de profundidad (Fe)	
	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Intensidad de Luz (Lux)	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Intensidad de Luz (Lux)
$t_1$	26,5 $\pm$ 1,3	1.012,5 $\pm$ 1.726,0	26,5 $\pm$ 1,3	1.609,6 $\pm$ 3.683,7
$t_2$	22,5 $\pm$ 3,2	621,7 $\pm$ 1.501,1	22,5 $\pm$ 3,2	406,74 $\pm$ 1.479,7
$t_3$	20,9 $\pm$ 3,9	117,9 $\pm$ 2.133,7	21,1 $\pm$ 4,0	45,7 $\pm$ 142,9

### 3.3. Fertilización *in situ*.

La fertilización la realizaron una pareja de buzos, los cuales llevaban una malla con bolsas zip, que contenían los nutrientes y, una barra metálica. Con ayuda de la barra, los buzos introdujeron el contenido de las bolsas zip en el sedimento, desde el centro de la parcela hasta los extremos, formando una espiral y con una separación de 15 cm entre cada bolsa.

Los fertilizantes seleccionados para el estudio fueron el ABONO CE (Fertilizantes de Baleares S.A.) SUPERFOSFTAO SIMPLE 18 % (granulado) para el fósforo inorgánico, y Osmocote Iron (17,8 Fe) para el hierro (Imagen 6).



Imagen 6. Fertilizantes utilizados *in situ*. A la izquierda hierro y a la derecha fósforo inorgánico. [5]

A cada parcela se le introdujo un total de 108 bolsas zip, cada una de las cuales contenía, en el caso de Fe: 17,2 g de hierro, para P: 20 g de fósforo inorgánico, y para Fe + P; la suma de 17,2 g de hierro más 20 g de fósforo inorgánico. La cantidad de hierro y fósforo inorgánico para cada parcela por su superficie y días de estudio se calculó según la tasa de sedimentación favorable para cada nutriente, las cuales se ven establecidas en los artículos de Marbà *et al.*, 2008 y Díaz-Almela *et al.*, 2008, tal y como se menciona en la introducción.

### 3.4. Respuesta de *Posidonia oceanica*.

#### 3.4.1. Marcaje *in situ*, crecimiento y contenido en hierro y fósforo de las hojas.

##### - Crecimiento:

El crecimiento de las hojas de *P. oceanica* se realiza desde la parte central y una vez producida la hoja, mediante el meristemo, se alarga desde su parte basal hasta la longitud característica de la especie e impuesto por las condiciones del hábitat (Marbà *et al.*, 2004). De esta manera, la realización del estudio del crecimiento de las hojas de *P. oceanica* dependiendo del tratamiento, se realizó con un marcaje aleatorio de los haces en la parte basal de las hojas. Para este marcaje, se efectuaron dos finas perforaciones, con una aguja hipodérmica, por encima de la lígula (parte basal), desde la hoja más externa de un lateral, perforando todo el conjunto de hojas, hasta la hoja más externa del otro lateral.

En cada parcela se marcaron 20 haces para asegurar la recuperación de entre siete y diez de ellos. Los haces se señalaron individualmente con una etiqueta de alambre y plástico que se situaba rodeando al rizoma correspondiente (Imagen 7). Este método de marcaje se realizó en un pequeño cuadro de 0,5 x 0,5 m en el centro de la parcela, para una buena localización posterior de los haces (Sánchez-Lizaso, 1993).

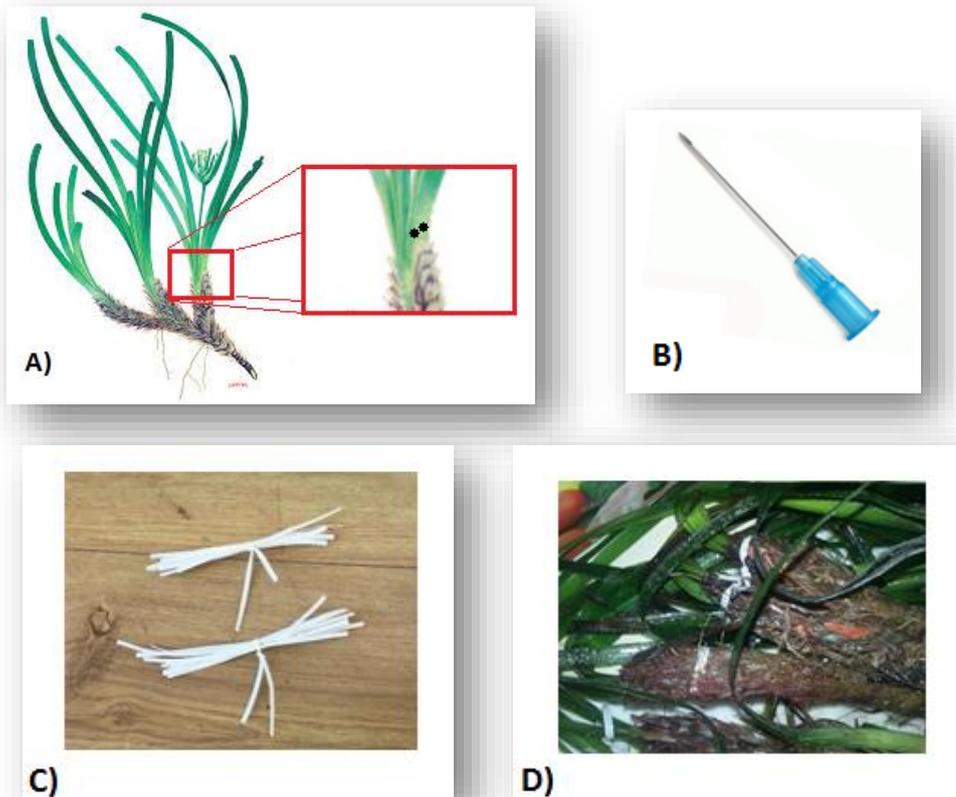


Imagen 7. A) Representación de la zona de perforación de los haces. B) Aguja hipodérmica utilizada para la perforación de las hojas de *P. oceanica*. C) Etiquetas de alambre y plástico utilizados para rodear los haces de *P. oceanica*. D) Haces rodeados por etiquetas de alambre y plástico una vez recogidas las muestras *in situ*. [6].

Se intentó que, en la medida de lo posible, el tiempo transcurrido entre la fertilización, marcaje y recogida, coincidiesen con todas las parcelas en cada uno de los tres tiempos, pero debido a las condiciones meteorológicas y físicas del lugar, no siempre pudo ser así, por lo que los cálculos de los datos se fueron modificando según estas fechas. Esto se pudo observar con los días que transcurrieron desde que se marcaron las hojas hasta que fueron recogidas, permitiendo dar un valor de crecimiento por día (Tabla 1).

Una vez que se transportaron los haces al laboratorio, se prosiguió a medir las hojas de cada haz con una regla recta graduada al milímetro. Las medidas que se realizaron a todas las hojas fueron, la longitud (cm) y la anchura (cm) para finalmente, obtener los datos en superficie (cm<sup>2</sup>) por día y haz.

A la hora de medir el nuevo crecimiento, se diferenció entre las hojas que carecían de perforaciones y aquellas que sí tenían. Las hojas sin perforaciones se consideraron como hojas nuevas (crecimiento nuevo), las cuales se encuentran en el centro del haz. En las hojas con perforaciones se diferenciaron entre la parte inferior de estas perforaciones, el cual es considerado crecimiento nuevo (Imagen 8), y de la parte superior, el cual es considerado hoja preexistente. De esta forma, se obtuvieron las medidas del nuevo crecimiento (hojas nuevas más crecimiento inferior de hojas ya preexistentes) para comparar el crecimiento nuevo de cada parcela. Además, se midió la longitud total de las hojas, para tener la biomasa de *P. oceanica* por haz.

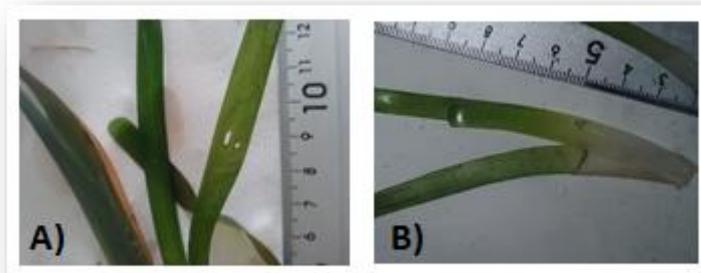


Imagen 8. A) Hoja de *P. oceanica* con dos perforaciones una vez recogidas de *in situ*. B) Hoja de nuevo crecimiento sin perforaciones una vez marcadas y recogidas de *in situ*. [5]

- *Contenido en hierro y fósforo:*

Adicionalmente al crecimiento de las hojas de *P. oceanica*, se llevó a cabo el análisis de contenido en hierro y fósforo de las hojas nuevas y los fragmentos de hoja con nuevo crecimiento.

El análisis se realizó una vez se consiguió el peso seco constante de las muestras. Para obtener dichas muestras, se limpiaron las hojas con el fin de eliminar los epífitos y, se introdujeron, una vez libre de epífitos, en una estufa durante 48 h a 70 °C que, en condiciones normales se considera un tiempo suficiente para que las muestras alcancen peso constante (Francour, 1990). Una vez conseguido el peso seco (g dw), se mandaron 0,5 g dw de cada hoja por tratamiento, a un laboratorio externo especializado en análisis de nutrientes.

Finalmente, se recibió el contenido en hierro ( $\mu\text{g Fe/g}$ ) y el contenido en fósforo ( $\mu\text{g P/g}$ ) únicamente de las muestras de los tiempos de estudio  $t_1$  y  $t_2$ .

### 3.4.2. Determinación de la producción primaria y clorofilas a y b.

- *Producción primaria:*

La producción primaria neta (PPN) es la energía fijada por fotosíntesis menos la energía utilizada en la respiración (R). La producción primaria bruta (PPB), en este estudio, es la energía total fijada por fotosíntesis de las hojas de *P. oceanica*, es decir, la producción primaria neta (PPN) más la respiración (R), tal y como se observa en la Ec. 1.

$$PPB = PPN + R \quad (1)$$

A fin de obtener la PPB de *P. oceanica* en cada unidad experimental, se realizó la determinación de la cantidad de oxígeno disuelto, mediante la versión modificada del método de Winkler, descrito por Carpenter (1965), con especial atención a las concentraciones de los reactivos.

El reactivo uno (R1) fue la solución de cloruro de manganeso ( $3 \text{ ml L}^{-1}$ ). El reactivo dos (R2) fue la solución de yoduro alcalino ( $\text{NaOH } 8 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{NaI } 4 \text{ mol L}^{-1}$ ). El reactivo tres (R3) fue la solución de ácido sulfúrico ( $10 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Para obtener los datos se recogieron dos haces de cada parcela aleatoriamente (diferentes a los haces perforados para el crecimiento) y 20 litros de agua de la zona de estudio (*in situ*). Al llegar al laboratorio

se filtró el agua recogida con una bomba peristáltica<sup>1</sup> y, mediante un tubo de silicona metido casi hasta el fondo de las botellas Winkler (botellas de tapón de vidrio molido de boca estrecha, volumen 125 ml  $\pm$  1 ml), se introdujo el agua filtrada a un total de 24 botellas claras (WW) y 24 oscuras (WB) previamente etiquetadas. Para evitar la formación de burbujas, las cuales pueden provocar alteraciones en los resultados, se llenaron las botellas Winkler y se desbordaron al menos un volumen de la botella (Imagen 9). Además, se llenaron cuatro viales de vidrio de la misma forma, obteniendo así la cantidad de oxígeno disuelto en una muestra de agua filtrada para llevar a cabo la respectiva corrección.

Los viales iniciales fueron fijados inmediatamente con los dos primeros reactivos (80  $\mu$ l R1 y 80  $\mu$ l R2). A cada botella Winkler se añadieron 5 cm de la hoja más joven y limpia de epífitos de cada tratamiento (Agawin *et al.*, 1996). Se obtuvieron duplicados para las botellas WW (donde sólo ocurre fotosíntesis) y duplicados para WB (donde sólo ocurre respiración) por parcela. Se colocaron los Winklers en una caja con agua para mantener una temperatura similar a la de la zona experimental, y en una zona con iluminación solar, para llevar a cabo una incubación de entre más o menos 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, 3,750 h para  $t_2$  y 3,317 h para  $t_3$ , cuidadosamente y sin formar burbujas, se traspasó el agua de cada Winkler a dos viales diferentes y se fijaron con los reactivos (80  $\mu$ l R1 y 80  $\mu$ l R2).

Los fragmentos de hoja del interior de los Winklers se congelaron en papel de aluminio debidamente etiquetadas para su posterior medida de clorofilas.



Imagen 9. A) Bomba peristáltica portátil de la Universidad de las Islas Baleares (UIB). B) Botella Winkler oscura (WB) a la izquierda y blanca (WW) a la derecha. C) Fotografía del momento de llenado de las botellas Winkler para no formar burbujas. <sup>[5]</sup>

Se determinó el oxígeno disuelto de las muestras, tanto iniciales como finales (después de la incubación). Para ello, se utilizó un espectrofotómetro de la Marca VARIAN y modelo CARY 50 Conc UV-Visible spectrophotometer, a una absorbancia de 466 nm (Imagen 10)<sup>2</sup>.

Para realizar la lectura se introdujo el tercer reactivo (80  $\mu$ l R3), se colocó 3 ml de la alícuota dentro de una cubeta y se leyó con el espectrofotómetro.

---

<sup>1</sup> El filtro utilizado fue un supanor con un tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m, para tener un agua libre de bacterias y fitoplancton que podrían consumir o producir oxígeno.

<sup>2</sup> Debido a la obertura de tres botellas Winkler oscuras (WB) durante el período de incubación de  $t_3$ , no se obtuvieron los datos de la absorbancia a 466 nm de los tratamientos P2.2, Fe3.2 y Fe + P1.2 (Tratamiento.Réplica.Duplicado).



Imagen 10. Espectrofotómetro utilizado para la lectura de absorbancias perteneciente a la Universidad de las Islas Baleares (UIB) Marca VARIAN y modelo CARY 50 Conc UV-Visible spectrophotometer. [5]

Finalmente, se realizaron los cálculos oportunos para convertir los valores de absorbancia a  $\text{mg O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . En ambos tiempos se restaron la media de los valores de producción de los iniciales (agua filtrada sin muestra de hoja)<sup>3</sup>. En la Imagen 11 se observa la ecuación utilizada para realizarla conversión de absorbancia 466 nm a  $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ .

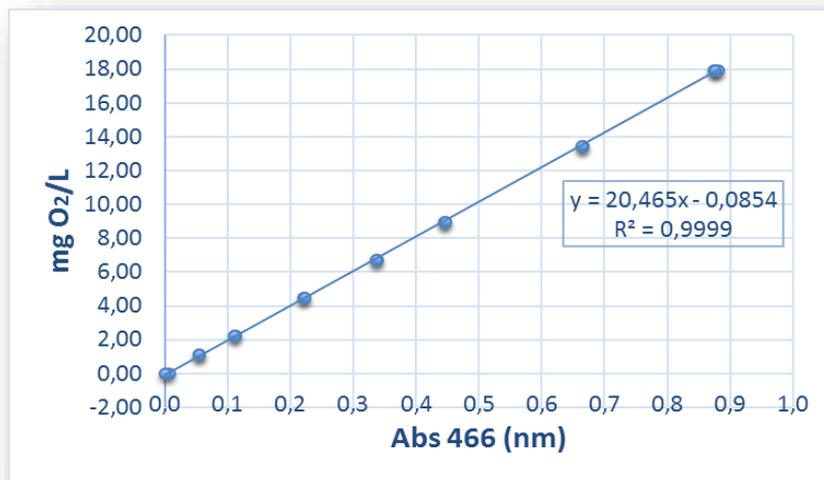


Imagen 11. Curva de calibrado para la conversión de Abs 466 nm a contenido de oxígeno disuelto ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ).  $R^2=0,9999$ . [7]

- *Clorofilas a y b:*

Las clorofilas son una familia de pigmentos de color verde que se encuentran en los cloroplastos de las células, en este caso de las células de *P. oceanica*, y pueden detectarse fácilmente gracias a su comportamiento frente la luz. En este estudio se realizó la extracción de las clorofilas a (Chl a) y b (Chl b).

---

<sup>3</sup> En el caso de la producción de  $t_2$  hubo dos medias de iniciales, debido a que se realizaron las incubaciones en dos días diferentes.

Para la obtención de Chl a y Chl b de cada parcela, se cogieron los fragmentos de hojas de los tiempos  $t_2$  y  $t_3$  utilizados para la realización de los cálculos de la producción primaria que se habían congelado previamente.

La extracción de clorofila de 48 muestras se llevó a cabo mediante la metodología realizada en Agawin *et al.*, (1996) (con alguna modificación). Se descongelaron las hojas y se pesó el peso fresco (g ww). Seguidamente se prepararon viales de 13 ml con un volumen de 10 ml de extractor (etanol al 96 %)⁴ donde se introdujo 0,3 g ww de las muestras⁵.

Para facilitar la extracción se trocearon las hojas de cada muestra, por separado, dentro de un mortero de cerámica y se machacaron con el extractor. Se introdujo la muestra en el vial de 13 ml y se guardaron durante 12 horas en oscuridad. Transcurridas las 12 horas se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 5.000 revoluciones por minuto (rpm). Finalmente, se llevó a cabo dos lecturas en el espectrofotómetro (Imagen 10) a 649 nm y 665 nm de cada muestra (Imagen 11).

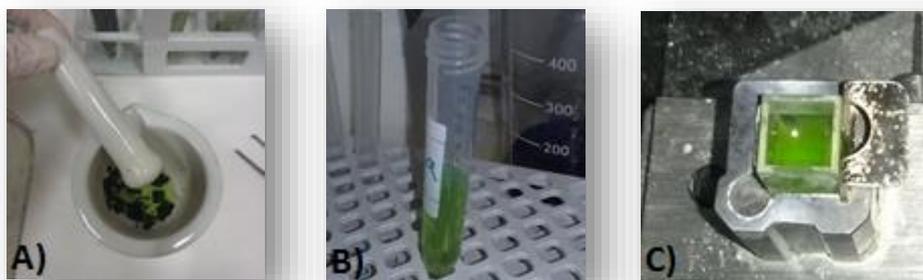


Imagen 12. A) Mortero de cerámica con fragmentos de hoja de *P. oceanica* para la extracción de clorofilas. B) Vial de 13 ml con la clorofila extraída por el etanol al 96 %. C) Cubeta con la alícuota de clorofila colocada en espectrofotómetro para su posterior lectura de absorbancia. [5]

Se restó el blanco (etanol al 96 %, producto utilizado para la extracción de la clorofila) de cada absorbancia (649 y 665 nm) a las medidas de las muestras⁶ y ⁷.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia se llevó a cabo la determinación de concentración de las clorofilas mediante la fórmula Wintermans and De Mots (1965):

Para obtener las concentraciones de Chl a y de Chl b para las muestras, se utilizó las Ec. 2 y 3, respectivamente. Y para obtener la concentración de clorofilas de cada fragmento de hoja analizado se utilizó la Ec. 4.

$$Chl a = 13,70 \times A_{665} - 5,76 \times A_{649} \quad (2)$$

$$Chl b = 25,80 \times A_{649} - 7,60 \times A_{665} \quad (3)$$

---

⁴ En este caso se preparó un extractor con 9,6 ml de etanol absoluto y 0,4 ml de mili-Q para tener el etanol al 96 % en cada muestra, por falta de este en el laboratorio.

⁵ De las hojas que pesaban menos se apuntó el peso y se cogió toda la hoja para la extracción de clorofilas.

⁶ En el caso de las clorofilas de  $t_2$  se obtuvieron dos blancos, debido a realizar la extracción en dos días diferentes.

⁷ Debido a la obertura de tres botellas Winkler oscuras durante el período de incubación de  $t_3$ . No se obtuvieron los datos de absorbancia 649 nm, ni 665 nm de los tratamientos P2.2, Fe3.2 y Fe + P1.2 (Tratamiento. Réplica. Duplicado).

$$\text{Concentración en planta} = \frac{\text{concentración en la cubeta} \times \text{volumen de extracción}}{\text{peso de la muestra de la hoja}} \quad (4)$$

### 3.5. Tratamiento de los datos.

#### 3.5.1. Análisis estadísticos.

Las respuestas de crecimiento, producción y el contenido en hierro y fósforo, a la adición de nutrientes (Fe y P), se compararon los resultados entre tratamientos y control para cada tiempo mediante la realización de diferentes test estadísticos, utilizando el programa R, versión 1.1.383 – © 2009-2017 RStudio, Inc.

Todos los datos fueron sometidos al análisis de normalidad y homogeneidad (Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente), además de varios test según los resultados que se iban obteniendo:

##### Crecimiento:

- i. Para  $t_1$  no se cumplieron los supuestos de normalidad ni homogeneidad, por lo que se realizó el respectivo test no paramétrico de ANOVA de un factor, el test Kruskal-Wallis.
- ii. Para  $t_2$  se realizó el test Kruskal-Wallis por el mismo motivo que  $t_1$ . El resultado estadístico del test fue rechazar que los tratamientos fueran iguales, por lo que se realizó el post-hoc Dunn con la corrección de Bonferroni, para averiguar qué tratamientos eran estadísticamente diferentes. Al rechazar con test Dunn que dos parejas de tratamientos fueran iguales, se prosiguió a realizar un test de la t de Students para la comparación de dos medias para cada pareja de tratamientos.
- iii. Para  $t_3$  se realizó el test Kruskal-Wallis por el mismo motivo que  $t_1$  y  $t_2$ . También se realizó el test Dunn, por rechazar que los tratamientos fueran iguales. No se realizó ningún test t de Students, debido a que finalmente el test Dunn no pudo rechazar que sí fueran iguales.

##### Contenido en hierro y fósforo:

- i. Tanto  $t_2$  como para  $t_3$  se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad por lo que se realizó el test ANOVA de un factor en ambos casos.
- ii. Se realizó una ANOVA de dos factores con interacción para los tratamientos en los dos tiempos,  $t_2$  y  $t_3$ .

##### Producción:

- i. Para  $t_2$  se realizó el test ANOVA para un factor al cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad.
- ii. Para  $t_3$  no se cumplieron los supuestos de normalidad ni homogeneidad por lo que se realizó el test Kruskal-Wallis.

#### 3.5.2. Representación gráfica y valores.

Todos los datos obtenidos de las respuestas de *P. oceanica*, crecimiento, contenido en hierro y fósforo producción y clorofilas, fueron manipulados por el programa Microsoft® Excel 2016 versión Office 365 para obtener los valores utilizados para el estudio estadístico y realización de gráficas.

## 4. RESULTADOS.

### 4.1. Crecimiento de las hojas y contenido en hierro y fósforo.

- *Crecimiento:*

Tras medir la longitud (cm) y la anchura (cm) de las hojas con nuevo crecimiento de *P. oceanica* ( $\text{cm}^2 \text{ dia}^{-1} \text{ haz}^{-1}$ ) no se ha podido descartar estadísticamente que sí sean iguales las medias en  $t_1$  para los distintos tratamientos (P, Fe, y Fe + P) y el control ( $p > 0,05$ ;  $n = 84$ ), al igual que  $t_3$  ( $p > 0,05$ ,  $n = 120$ ), (Tabla 3).

En el caso de  $t_2$  se ha podido rechazar que las medias sean iguales entre tratamientos ( $p < 0,05$ ,  $n = 96$ ), rechazando que las medias de P y C sean iguales ( $p < 0,05$ ,  $n = 48$ ) y entre P y Fe ( $p < 0,05$ ,  $n = 48$ ). Al estudiar, mediante el test t de Students, si las medias de P eran iguales o inferiores a C o Fe, o si C y/o Fe era mayor o igual a P como hipótesis alternativa, se ha rechazado que P sea mayor o igual que C y Fe, por tanto, estadísticamente P es menor que C y Fe. En la gráfica de barras (Imagen 13) se visualiza mediante las letras a, b y c, como no se puede descartar que sean iguales C con Fe y Fe + P, y P con Fe + P, pero sí P con Fe y C al tener letras distintas obtenidas estadísticamente (Tabla 3).

Se ha estudiado la interacción entre los tres tiempos donde se observa, en la Imagen 14, que no hay crecimiento igual entre tiempos, aunque estadísticamente no se puede decir que no exista interacción entre los tiempos. Además, se puede observar tanto en las gráficas de la Imagen 13 como en la Tabla 4 con los valores, que el crecimiento ha sido mayor en  $t_3$  seguido por  $t_2$  y  $t_1$  respectivamente.

En la Tabla 4, también se obtienen los datos de biomasa (hojas nuevas, hojas viejas y nuevo crecimiento) ( $\text{cm}^2 \text{ haz}^{-1}$ ). Se ha observado que la biomasa es mayor  $t_3$  en comparación con  $t_1$  y  $t_2$ , aunque no se tiene significación estadística.

Tabla 3. Valores estadísticos, grados de libertad y p – valores, con un nivel de significación de 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ) y un nivel de confianza de 0,95 de los test estadísticos para el crecimiento de *P. oceanica*.

Crecimiento	Test	$\chi^2$ o W	df	p - valor	
<b><math>t_1</math>; n = 84</b>	Kruskal-Wallis	2,559	3	0,4647	
<b><math>t_2</math>; n = 96</b>	Kruskal-Wallis	19,723	3	<b>0,0001937</b>	
	Dunn, método Bonferroni		19,7228	3	<b>0</b>
		P y C			0,0229*
		P y Fe			0,0000*
	Wilcoxon-Mann-Whitney; n = 48	P y C	398,5		0,02331*
P y Fe		497		$1,712 \times e^{-5}$ *	
<b><math>t_3</math>; n = 120</b>	Kruskal-Wallis	8,5056	3	<b>0,03664</b>	
	Dunn, método Bonferroni	8,5056	3	0,04**	

$p > 0,05$ ; No se puede descartar que sean iguales.  
 $p < 0,05$ ; Se rechaza que sean iguales, por tanto, se asume que son diferentes.  
 \*Se rechaza que P sea mayor o igual que C y Fe, por tanto, P es menor que C y Fe.

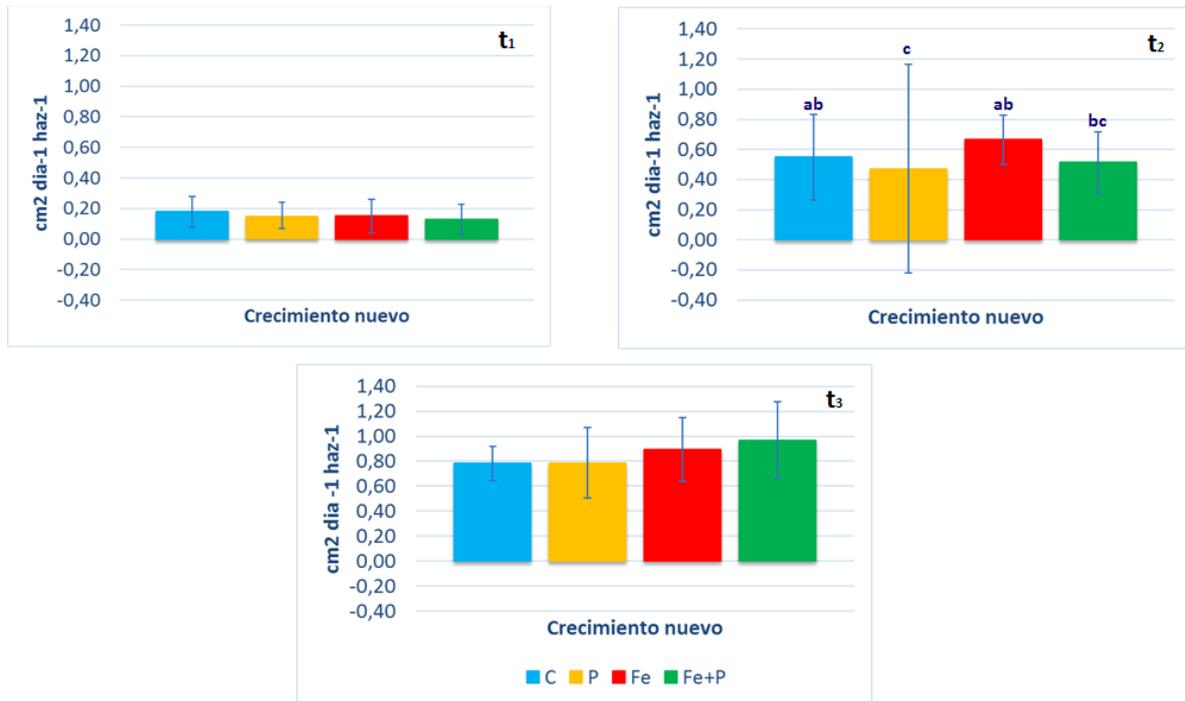


Imagen 13. Crecimiento nuevo de las hojas de *P. oceanica* expresados en superficie de la hoja por día y haz ( $\text{cm}^2 \text{ día}^{-1} \text{ haz}^{-1}$ ) para cada unidad experimental (las parcelas) y tiempo de estudio. Las barras representan las medias y desviación estándar de 21 réplicas para t<sub>1</sub>, 24 réplicas para t<sub>2</sub> y 30 réplicas para t<sub>3</sub>.

a, b y c Diferencias de las medias para t<sub>2</sub> calculadas estadísticamente;  $p < 0,05$ ,  $n = 96$ . [8]

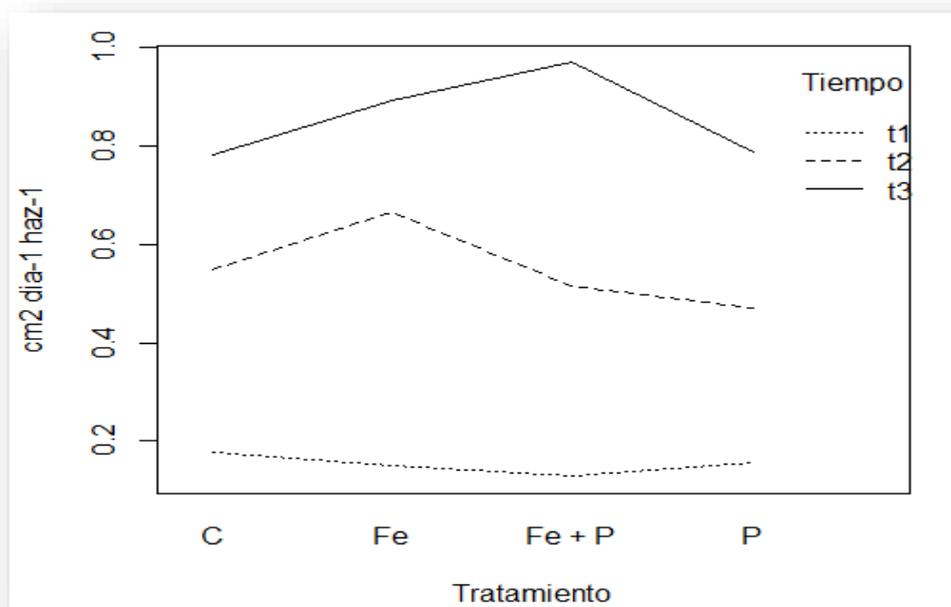


Imagen 14. Representación de la interacción del nuevo crecimiento de las hojas de *P. oceanica* ( $\text{cm}^2 \text{ día}^{-1} \text{ haz}^{-1}$ ) para cada tiempo de estudio. Estadísticamente no se obtuvo el p-valor, por lo que no se puede confirmar la interacción para los tiempos con  $n = 84$  para t<sub>1</sub>,  $n = 96$  para t<sub>2</sub> y  $n = 120$  para t<sub>3</sub>. [9]

Tabla 4. Media  $\pm$  desviación estándar del nuevo crecimiento de las hojas de *P. oceanica* ( $\text{cm}^2 \text{ día}^{-1} \text{ haz}^{-1}$ ) y la biomasa total de las hojas ( $\text{cm}^2 \text{ haz}^{-1}$ ) para cada unidad experimental y tiempo de estudio.

	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>
<b>Nuevo crecimiento de las hojas (<math>\text{cm}^2 \text{ día}^{-1} \text{ haz}^{-1}</math>)</b>			
<b>C</b>	0,18 $\pm$ 0,10	0,55 $\pm$ 0,29 ab	0,78 $\pm$ 0,13
<b>P</b>	0,15 $\pm$ 0,09	0,47 $\pm$ 0,69 c	0,79 $\pm$ 0,28
<b>Fe</b>	0,15 $\pm$ 0,11	0,67 $\pm$ 0,16 ab	0,89 $\pm$ 0,26
<b>Fe + P</b>	0,13 $\pm$ 0,10	0,51 $\pm$ 0,20 bc	0,97 $\pm$ 0,31
<b>Biomasa de las hojas (<math>\text{cm}^2 \text{ haz}^{-1}</math>)</b>			
<b>C</b>	155,8 $\pm$ 45,6	161,8 $\pm$ 60,1	202,9 $\pm$ 33,1
<b>P</b>	133,3 $\pm$ 72,0	154,9 $\pm$ 48,1	214,7 $\pm$ 114,8
<b>Fe</b>	129,8 $\pm$ 49,6	215,7 $\pm$ 34,6	231,6 $\pm$ 70,3
<b>Fe + P</b>	100,5 $\pm$ 49,6	152,8 $\pm$ 92,7	265,3 $\pm$ 73,7

<sup>a, b y c</sup> Diferencias de las medias para t<sub>2</sub> calculadas estadísticamente; p < 0,05, n = 96

- *Contenido en hierro y fósforo:*

Por un lado, en el contenido en hierro, para t<sub>2</sub> se rechaza estadísticamente que las concentraciones de Fe ( $\mu\text{g Fe} / \text{g dw}$ ) sean iguales, por lo tanto, se asume que son diferentes para varios tratamientos, en concreto para los tratamientos Fe + P con C y P con C ( $p < 0,05$ ,  $n = 12$ ). En el caso de t<sub>1</sub>, estadísticamente se descarta que sean diferentes para los tratamientos ( $p > 0,05$ ,  $n = 12$ ) (Tabla 5). En la interacción de ambos tiempos, no se puede descartar estadísticamente que no haya interacción, por lo que no se puede decir si el factor tratamiento depende o no del tiempo.

Tanto en las gráficas de la Imagen 15 como en los datos de la Tabla 6 se puede observar cómo hay un mayor contenido de hierro en t<sub>2</sub> que en t<sub>1</sub>, aunque estadísticamente no se ha confirmado.

Por otro lado, en relación con el contenido de fósforo ( $\mu\text{g P/g dw}$ ), estadísticamente para ambos tiempos (t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub>) no se puede descartar que los tratamientos sí sean iguales ( $p > 0,05$ ,  $n = 24$ ). En el estudio de la interacción entre tratamientos y tiempo no se puede descartar que no haya interacción, por lo que estadísticamente las medias de los tratamientos no dependen del tiempo ( $p > 0,05$ ,  $n = 48$ ) (Tabla 5).

Finalmente, se puede observar tanto en las gráficas de la Imagen 15 como en los datos de la Tabla 6, cómo la concentración de fósforo es semejante para ambos tiempos (t<sub>1</sub> y t<sub>2</sub>). Además, estadísticamente en la ANOVA de dos vías con interacción no se puede rechazar que sí sean iguales entre tiempos (Tabla 5).

Tabla 5. Valores estadísticos, grados de libertad y p – valores, con un nivel de significación de 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ) y un nivel de confianza de 0,95 de los test estadísticos para el contenido en hierro y fósforo de *P. oceanica*.

	Test	$\chi^2$ o W	df	SS	SM	F - valor	p - valor
<b>Contenido en Fe</b>							
<b>t<sub>1</sub>; n = 24</b>	ANOVA de 1 factor		3	338,3	112,76	0,429	0,7346
<b>t<sub>2</sub>; n = 24</b>	Kruskal-Wallis	13,927	3				<b>0,0030</b>
	Dunn, método	13,927	3				0
	Bonferroni	P y C					<b>0,0010</b>
		C y Fe + P					<b>0,0239</b>
<b>Contenido en P</b>							
<b>t<sub>1</sub>; n = 24</b>	ANOVA de 1 factor		3	4124404	1374801	2,2486	0,1157
<b>t<sub>2</sub>; n = 24</b>	ANOVA de 1 factor		3	2040440	680313	1,1591	0,3499
<b>Interacción entre contenido y tiempos</b>		Tratamiento	3	5492600	1830867	3,0573	<b>0,0395</b>
	ANOVA de 2 factores	Tiempo	1	296801	296801	0,4956	0,4856
		Interacción	3	620671	206890	0,3455	0,7926 *

p > 0,05; No se puede descartar que sean iguales.  
p < **0,05**; Se rechaza que sean iguales, por tanto, se asume que son diferentes.  
\*No se puede descartar que no hay interacción.

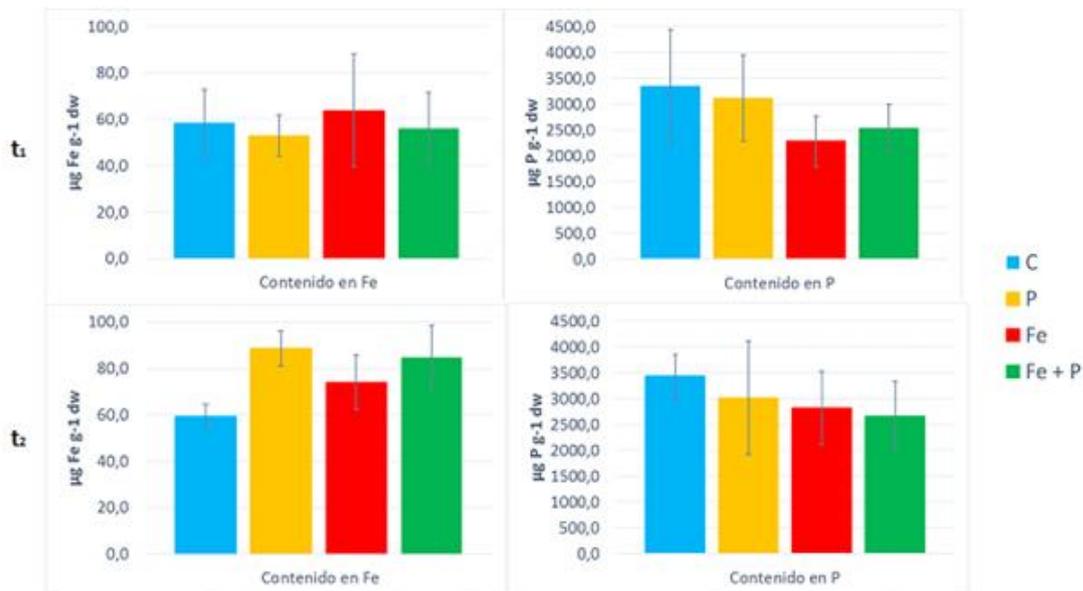


Imagen 15. Contenido en hierro ( $\mu\text{g Fe g}^{-1} \text{ dw}$ ) y contenido en fósforo ( $\mu\text{g P g}^{-1} \text{ dw}$ ) de fragmentos de *P. oceanica* en peso seco para cada unidad experimental y tiempo de estudio. Las barras representan las medias  $\pm$  desviación estándar de 6 réplicas para cada tiempo. [8]

Tabla 6. Media  $\pm$  desviación estándar del contenido en hierro ( $\mu\text{g Fe g}^{-1}$  dw) y contenido en fósforo ( $\mu\text{g P g}^{-1}$  dw) de fragmentos de *P. oceanica* en peso seco para cada unidad experimental y tiempo de estudio.

	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>
<b>Contenido en Fe (<math>\mu\text{g Fe/g dw}</math>)</b>		
C	58,1 $\pm$ 14,6	59,4 $\pm$ 5,0
P	52,9 $\pm$ 8,7	88,6 $\pm$ 7,5
Fe	63,8 $\pm$ 24,2	74,0 $\pm$ 11,8
Fe + P	56,0 $\pm$ 15,5	84,9 $\pm$ 13,8
<b>Contenido en P (<math>\mu\text{g Fe/g dw}</math>)</b>		
C	3.343,4 $\pm$ 1.102,5	3.443,3 $\pm$ 421,0
P	3.118,1 $\pm$ 832,0	3.014,8 $\pm$ 1.099,7
Fe	2.278,8 $\pm$ 488,8	2.821,6 $\pm$ 703,7
Fe + P	2.533,0 $\pm$ 457,3	2.664,8 $\pm$ 682,6

## 4.2. Producción primaria y clorofilas a y b.

### - Producción primaria:

En el caso de la producción bruta ( $\text{mg O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) en ambos tiempos (t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>) no podemos rechazar estadísticamente que si sean iguales ( $p > 0,05$ ,  $n = 24$ ), por lo que no podemos ver que hay diferencias entre las medias de cada tratamiento (Tabla 7).

En la Imagen 16 y juntamente con la Tabla 8, se puede ver los valores medios y desviaciones estándar de PPB, PPN y R para cada tiempo y tratamiento, observando como la cantidad de  $\text{mg O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$  es mayor en t<sub>3</sub> que en t<sub>2</sub> para PPB, PPN y R. También se observa que en t<sub>3</sub> los valores de  $\text{mg O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , tanto en PPB, PPN como en R son mayores en P, pero estadísticamente no se puede aceptar que sean diferentes.

En la Imagen 17 se puede observar que no hay interacción entre los tiempos t<sub>2</sub> y t<sub>3</sub>, aunque no se puede afirmar con valores estadísticos. Y t<sub>3</sub> tiene una mayor producción que t<sub>2</sub>, lo cual se puede observar en las gráficas de la Imagen 16 y, en valor numérico en la Tabla 8.

Tabla 7. Valores estadísticos, grados de libertad y p – valores, con un nivel de significación de 0,05 ( $\alpha = 0,05$ ) y un nivel de confianza de 0,95 de los test estadísticos para la producción de *P. oceanica*.

Producción primaria bruta (PPB)	Test	$\chi^2$ o W	df	SS	SM	F - valor	p - valor
t <sub>2</sub> ; n = 24	ANOVA de 1 factor		3	0,00092583	0,00030861	2,5248	0,08671
t <sub>3</sub> ; n = 24	Kruskal-Wallis	2,3481	3				0,5034

p > 0,05; No se puede descartar que sean iguales.

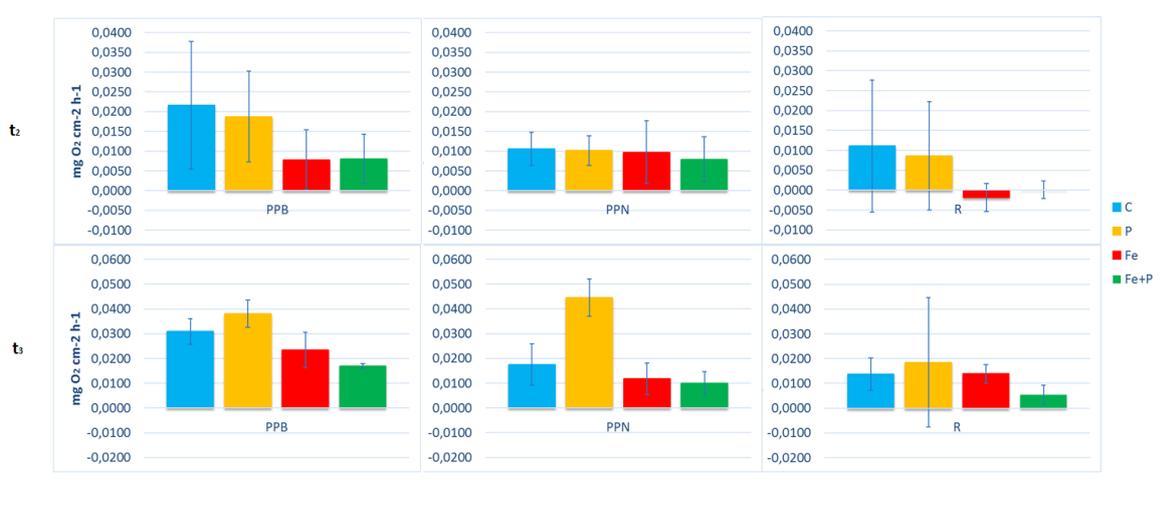


Imagen 16. Producción primaria bruta (PPB), producción primaria neta (PPN) y respiración (R) de fragmentos de *P. oceanica* (mg O<sub>2</sub> cm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) para cada unidad experimental y tiempo de estudio. Las barras representan las medias  $\pm$  desviación estándar de 6 réplicas para cada tiempo. [8]

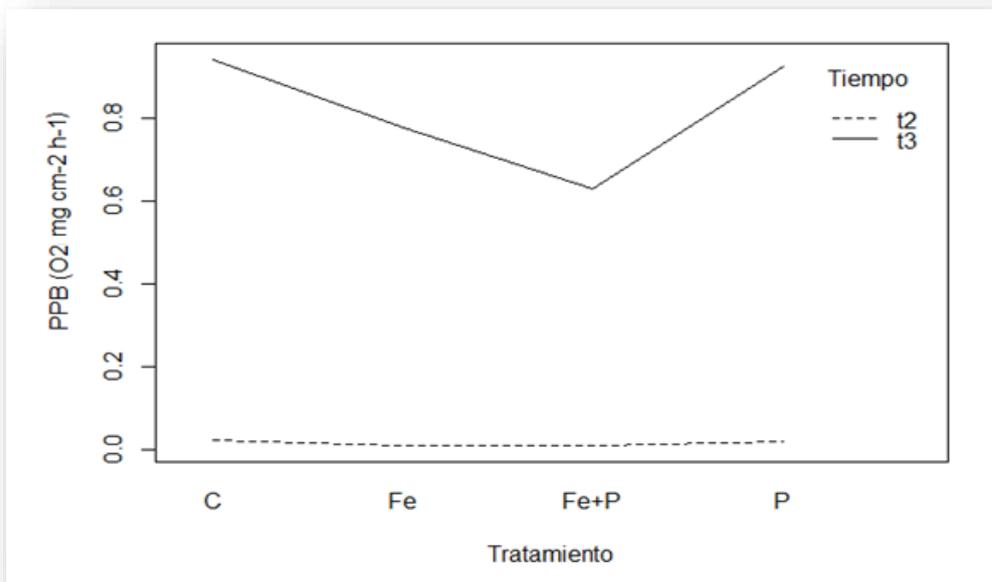


Imagen 17. Representación de la interacción de la producción primaria bruta (mg O<sub>2</sub> cm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) de fragmentos de *P. oceanica* para cada tiempo de estudio. Estadísticamente no se obtuvo el p - valor, por lo que no se puede confirmar la interacción para los tiempos con n = 84 para  $t_1$ , n = 96 para  $t_2$  y n = 120. [9]

Tabla 8. Media  $\pm$  desviación estándar de la producción primaria bruta, neta y respiración de *P. oceanica* ( $\text{mg O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) para cada unidad experimental y tiempo de estudio.

	$t_2$	$t_3$
<b>Producción primaria bruta (<math>\text{mg O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}</math>)</b>		
C	$0,0216 \pm 0,0161$	$0,0309 \pm 0,0052$
P	$0,0188 \pm 0,0115$	$0,0381 \pm 0,0054$
Fe	$0,0078 \pm 0,0076$	$0,0235 \pm 0,0071$
Fe + P	$0,0080 \pm 0,0063$	$0,0170 \pm 0,0011$
<b>Producción primaria neta (<math>\text{mg O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}</math>)</b>		
C	$0,0106 \pm 0,0042$	$0,0176 \pm 0,0084$
P	$0,0101 \pm 0,0037$	$0,0445 \pm 0,0076$
Fe	$0,0097 \pm 0,0079$	$0,0117 \pm 0,0064$
Fe + P	$0,0079 \pm 0,0057$	$0,0101 \pm 0,0045$
<b>Respiración (<math>\text{mg O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}</math>)</b>		
C	$0,0111 \pm 0,0166$	$0,0138 \pm 0,0065$
P	$0,0086 \pm 0,0136$	$0,0184 \pm 0,0261$
Fe	$-0,0019 \pm 0,0035$	$0,0139 \pm 0,0038$
Fe + P	$0,0001 \pm 0,0022$	$0,0054 \pm 0,0039$

- *Clorofilas a y b:*

En el caso de la concentración de clorofilas, se puede observar, tanto en las gráficas visualmente (Imagen 18), como numéricamente en la Tabla 9, como hay una mayor concentración de Chl a que de Chl b ( $\text{mg Chl g}^{-1} \text{ ww}$ ) en  $t_2$ . A diferencia de  $t_2$ ,  $t_3$  contiene semejantes concentraciones en ambas clorofilas. Igualmente, estos resultados no tienen una significación estadística.

La concentración de clorofilas, tanto Chl a como Chl b son semejantes en ambos casos, fotosíntesis WW y respiración WB para ambos tiempos ( $t_2$  y  $t_3$ ).

También se puede observar como en  $t_2$ , la concentración de Chl a, tanto en WW como en WB es mayor en P que en el resto de los tratamientos. Para el resto de conjunto de datos, P es el que obtiene el valor más bajo de concentración de ambas clorofilas, aunque estadísticamente no se puede confirmar (Imagen 18).

Finalmente, se puede observar que la concentración de ambas clorofilas es mayor en  $t_2$  que en  $t_3$ , aunque no hay significación estadística (Imagen 18).

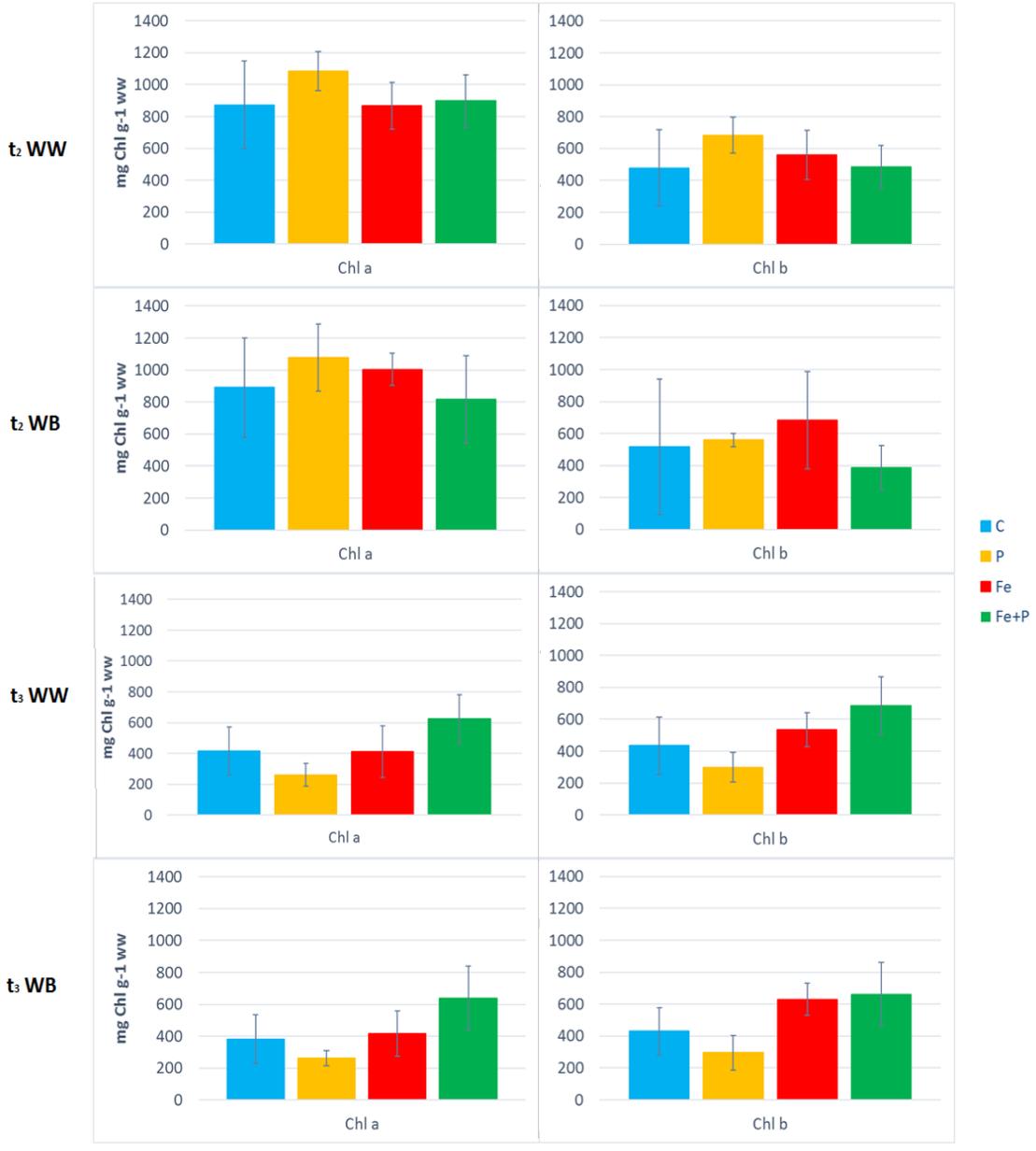


Imagen 18. Concentración de clorofilas a (Chl a) y b (Chl b) (mg Chl g<sup>-1</sup> ww) para cada unidad experimental, tiempo de estudio y realización de fotosíntesis (WW) o respiración (WB) de cada fragmento de hoja de *P. oceanica*.<sup>[8]</sup>

Tabla 9. Media  $\pm$  desviación estándar de la concentración de clorofilas a (Chl a) y b (Chl b) (mg Chl g<sup>-1</sup> ww) para cada unidad experimental, tiempo de estudio y realización de fotosíntesis (WW) o respiración (WB) de cada fragmento de hoja de *P. oceanica*.

	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>
<b>Condiciones de luz (WW)</b>		
<b>Concentración Chl a (mg Chl g<sup>-1</sup> ww)</b>		
C	871,787 $\pm$ 274,994	414,346 $\pm$ 155,587
P	1.085,282 $\pm$ 121,959	260,432 $\pm$ 73,454
Fe	866,836 $\pm$ 144,677	412,585 $\pm$ 167,010
Fe + P	896,795 $\pm$ 165,361	624,196 $\pm$ 157,447
<b>Concentración Chl b (mg Chl g<sup>-1</sup> ww)</b>		
C	477,434 $\pm$ 238,846	434,300 $\pm$ 179,812
P	683,433 $\pm$ 113,030	297,472 $\pm$ 93,015
Fe	560,169 $\pm$ 155,299	534,177 $\pm$ 106,897
Fe + P	483,195 $\pm$ 136,456	684,025 $\pm$ 181,698
<b>Condiciones de oscuridad (WB)</b>		
<b>Concentración Chl a (mg Chl g<sup>-1</sup> ww)</b>		
C	890,742 $\pm$ 310,184	382,716 $\pm$ 151,501
P	1.078,266 $\pm$ 209,504	262,693 $\pm$ 48,154
Fe	1.003,311 $\pm$ 101,533	415,328 $\pm$ 142,327
Fe + P	817,875 $\pm$ 272,452	638,631 $\pm$ 199,265
<b>Concentración Chl b (mg Chl g<sup>-1</sup> ww)</b>		
C	518,102 $\pm$ 423,403	429,269 $\pm$ 148,063
P	558,954 $\pm$ 39,963	294,972 $\pm$ 107,500
Fe	682,629 $\pm$ 304,319	630,325 $\pm$ 102,025
Fe + P	387,305 $\pm$ 139,052	661,753 $\pm$ 198,901

## 5. DISCUSIÓN.

### 5.1. Crecimiento de las hojas y contenido en hierro y fósforo.

- *Crecimiento:*

Se diferenciaron los tiempos de estudio en estaciones astronómicas, de manera que, el período de tiempo transcurrido en t<sub>1</sub> es considerado verano, t<sub>2</sub> invierno/otoño, y t<sub>3</sub> primavera (Tabla 1). De esta forma, el crecimiento de las hojas sigue una marcada tendencia estacional, donde hay un mayor crecimiento en t<sub>3</sub> seguido de t<sub>2</sub> y t<sub>1</sub> respectivamente (Tabla 3). Esto se corrobora con el característico crecimiento de *P. oceanica*. En primavera no se producen hojas nuevas, pero las existentes experimentan un crecimiento muy acentuado (Sánchez-Lizaso, 1993). A partir de septiembre (otoño) comienzan a aparecer hojas nuevas, mientras que las hojas más longevas, envejecidas y cargadas de epífitos, se desprenden masivamente formando un auténtico manto de hojarasca, tras haber retranslocado parte de sus nutrientes hacia las hojas nuevas (Lepoint *et al.*, 2000; Marbà *et al.*, 2002b), obteniendo así un crecimiento nuevo. Estos hechos explican la diferencia entre t<sub>3</sub> y t<sub>2</sub> tanto en crecimiento como en la respuesta de biomasa. Además, se sabe que partir de junio las hojas han alcanzado su máxima longitud y su crecimiento se reduce al mínimo (Alcoverro *et al.*, 1995), por lo que t<sub>1</sub>, al pertenecer a esta época del año, tiene el menor crecimiento.

En el estudio, también se observa estadísticamente que el crecimiento de las hojas en  $t_1$  y  $t_3$  son iguales en todos los tratamientos (Tabla 3). Por un lado, esto se debe a que una tasa de sedimentación de 43 mg/m<sup>2</sup> por día de hierro (dada en el estudio) no son susceptibles a declinar su crecimiento (Marbà *et al.*, 2008). Y, por otro lado, que una tasa de sedimentación de 50 mg/m<sup>2</sup> día de fósforo tampoco provoca un declive en el crecimiento (Díaz-Almela *et al.*, 2008), no siendo el hierro y el fósforo limitantes en *P. oceanica* en estos casos.

Sin embargo, en el caso de  $t_2$ , donde el crecimiento de las hojas en C y Fe son mayores que en P, se puede corroborar estadísticamente que el tratamiento P tiene una respuesta negativa (en comparación con C y Fe), inhibiendo el crecimiento. Por lo que una adición antropogénica de P en invierno/otoño puede tener efectos negativos para la fanerógama.

Aunque estadísticamente no se puede aceptar que no hay interacción entre los tiempos, el cual sería interesante corroborar estadísticamente, este resultado evidencia los estudios realizados anteriormente nombrados.

#### - *Contenido en hierro y fósforo:*

Los resultados obtenidos en el contenido de hierro y fósforo nos indica que la concentración de ambos nutrientes (Fe y P) es mayor en las hojas pertenecientes a  $t_2$  que a  $t_1$ . Esto se explica gracias a que a partir de otoño, la columna de agua se mezcla y la disponibilidad de nutrientes aumenta (Sánchez-Lizaso, 1993), por lo que, las hojas que han crecido durante otoño,  $t_2$ , tienen mayor probabilidad de captar nutrientes que en verano,  $t_1$  (Tabla 5).

En el caso del fósforo, no se aprecia que un aporte extra de dicho nutriente implique una incorporación de este en las hojas, ya que las parcelas C contienen más P que el resto de las parcelas. Sin embargo, para el caso del hierro en  $t_1$ , las hojas de las parcelas Fe contienen más hierro que el resto, y en el caso de  $t_2$ , las parcelas Fe y Fe + P contiene más hierro que C y P. De esta manera, una adición de hierro puede implicar una incorporación de este en las hojas.

Relacionado con el crecimiento, tal y como se ha dicho anteriormente, este es mayor en  $t_2$  que en  $t_1$ , por lo que en este caso una mayor cantidad de nutrientes en la hoja indica un mayor crecimiento. Aun así, se podría realizar un estudio estadístico para comprobar si el crecimiento depende la cantidad de nutrientes que contiene la hoja, mediante una ANOVA de dos factores con interacción.

## **5.2. Producción primaria y clorofilas a y b.**

#### - *Producción primaria:*

La producción de estas plantas tiene un carácter marcadamente estacional, que se aprecia principalmente en la producción y morfología de las hojas (Alcoverro *et al.*, 1995), así como en el crecimiento, tal y como se menciona en el apartado anterior.

Con los resultados obtenidos estadísticamente en el caso de la producción primaria bruta (Tabla 7) no podemos decir que los nutrientes (hierro y fósforo) sean limitantes para *P. oceanica*, debido a que no podemos rechazar estadísticamente que sí sean iguales. Por lo que, se reproduce el resultado de los estudios realizados por Vidal (1988), donde se concluyó que la producción primaria de las fanerógamas no estaba limitada por la disponibilidad de fósforo.

Por otro lado, la no interacción entre los tiempos  $t_2$  y  $t_3$  (Imagen 17), la cual sería interesante poder confirmarlo estadísticamente, nos indica que las respuestas de *P. oceanica* en el caso de producción es mayor en primavera ( $t_3$ ) que en invierno/otoño ( $t_2$ ), de nuevo confirmando el crecimiento estacional

que posee *P. oceanica* y que nos explican Sánchez-Lizaso (1993) en su tesis y , Lepoint *et al.* (2002), Marbà *et al.*(2002b) y Alcoverro *et al.* (1995), en sus respectivos artículos.

Finalmente, sería interesante realizar más estudios para ver si realmente existe diferencias o no, por estaciones. Además, tal y como se observa en la Tabla 8, las desviaciones estándares de  $t_2$  son muy altas teniendo un margen de error mucho mayor que en  $t_3$ . De esta manera, se podrían realizar más experimentos con un mayor número de muestras para una significación estadística.

- *Clorofilas a y b:*

La cantidad de clorofila por unidad de superficie de las hojas constituye uno de los indicadores de la capacidad fotosintética de las plantas, ya que representa una medida de las dimensiones del sistema fotosintético y de su eficiencia (Huang *et al.*, 2004 y García *et al.*, 2005).

En estudios realizados por Agawin en 1996, obtuvieron un aumento en el crecimiento de los pastos marinos con el aumento de la disponibilidad de nutrientes, siendo respaldado por la actividad fotosintética mejorada, que a su vez se asoció con mayores concentraciones de clorofila y nutrientes en los tejidos fotosintéticos. En el caso de este estudio no podemos corroborar el aumento de crecimiento de *P. oceanica* con el aumento de disponibilidad de nutrientes, debido a que estadísticamente no se encuentran diferencias de crecimiento entre los diferentes tratamientos para cada tiempo estudiado, únicamente se encuentra un crecimiento mayor en  $t_2$  con el caso del hierro y no del fósforo (Imagen 18 y Tabla 9).

Sin embargo, por el otro lado, sí se ha visto una mejora en la actividad fotosintética asociada a mayores concentraciones de clorofila y nutrientes en el tejido foliar de *P. ocaenica*. El contenido en fósforo y hierro es mayor en  $t_2$  que en  $t_3$ , de la misma forma la concentración de clorofilas es mayor en  $t_2$  que en  $t_3$ . Así pues, se puede respaldar, la mejora fotosintética de *P. oceanica* en relación con el aumento de clorofilas y nutrientes por las hojas. Pero, no se puede confirmar que un aumento en las concentraciones de clorofila y nutrientes implique un aumento en su crecimiento foliar (Imágenes 13, 15 y 18; Tablas 4, 6 y 9).

Adicionalmente, en el estudio se observa diferencias entre las concentraciones de Chl a y Chl b para ambos tiempos,  $t_2$  y  $t_3$  (Imagen 18). Esto puede darse debido a que una diferencia en la intensidad de luz en las fanerógamas puede provocar respuestas fotoadaptativas tales como, cambios en la relación clorofila ab cuando la intensidad de luz es inferior a la requerida (Abal *et al.*, 1994; Czerny & Dunton, 1995; van Lent *et al.*, 1995; Lee & Dunton, 1997). De esta manera, en  $t_2$ , donde la intensidad de luz es mayor (Tabla 2), la relación entre concentraciones de clorofilas es normal, ya que se espera que Chl a esté en mayor concentración que Chl b, la cual es una clorofila accesoria. En cambio, en  $t_3$ , donde la intensidad de luz es inferior, están en semejantes concentraciones, tal y como cabría esperar en el comportamiento de las clorofilas (Imagen 18 y Tabla 9).

Finalmente, en este apartado sería interesante realizar un estudio estadístico con los datos obtenidos, para poder confirmar estadísticamente si son diferentes o no las medias. Además, poder hacer un estudio complementario, para observar la diferencia de concentraciones de clorofila entre estaciones (la interacción entre tiempos) y estudiar la relación con la temperatura y la cantidad de luz.

## 6. CONCLUSIÓN.

La adición de fósforo y hierro en el sustrato de las praderas de *P. oceanica* en Ses Salines, Mallorca, han resultado no ser limitantes para su crecimiento y producción. A excepción de un resultado, donde el hierro puede ser limitante y el fósforo provocar un declive en el crecimiento.

Por otra parte, se ha visto que hay una diferencia estacional en el crecimiento, con un mayor crecimiento en primavera, seguido de invierno/otoño y verano, por lo que sería interesante realizar estudios que continuaran con la misma línea para establecer la posible relación entre estación del año y el crecimiento de la pradera a la adición de estos nutrientes.

Finalmente, tal y como se ha ido mencionando en cada subapartado de la discusión, este trabajo es una ínfima parte de lo que se puede realizar, por lo que se deja la puerta abierta a desempeñar más estudios estadísticos y prácticos para seguir investigando la respuesta de estos nutrientes (hierro y fósforo) en *P. oceanica*.

## BIBLIOGRAFÍA.

### Referencias:

**Abal, E. G., Loneragan, N., Bowen, P., Perry, C. J., Udy, J. W., & Dennison, W. C.** (1994). Physiological and morphological responses of the seagrass *Zostera capricorni* Aschers, to light intensity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 178(1), 113-129.

**Agawin, N. S., Duarte, C. M., & Fortes, M. D.** (1996). Nutrient limitation of Philippine seagrasses (Cape Bolinao, NW Philippines): in situ experimental evidence. *Marine Ecology Progress Series*, 138, 233-243.

**Alcoverro, T., Duarte, C. M., & Romero, J.** (1995). Annual growth of *Posidonia oceanica*: contribution of large-scale versus local factors to seasonality.

**Ardizzone, G. D., & Pelusi, P.** (1983). REGRESSION OF A TYRRHENIAN *Posidonia oceanica* PRAIRIE EXPOSED TO NEARSHORE TRAWLING.

**Balestri, E., Benedetti-Cecchi, L., & Lardicci, C.** (2004). Variability in patterns of growth and morphology of *Posidonia oceanica* exposed to urban and industrial wastes: contrasts with two reference locations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 308(1), 1-21.

**Berner, R. A.** (1984). Sedimentary pyrite formation: an update. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(4), 605-615.

**Béthoux, J. P., & Copin-Montégut, G.** (1986). Biological fixation of atmospheric nitrogen in the Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 31(6), 1353-1358.

**Burkholder, J. M., Tomasko, D. A., & Touchette, B. W.** (2007). Seagrasses and eutrophication. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350(1-2), 46-72.

**Carpenter, J. H.** (1965). The Chesapeake Bay Institute technique for the Winkler dissolved oxygen method. *Limnology and Oceanography*, 10(1), 141-143.

**Casola, E., Scardi, M., Mazzella, L., & Fresi, E.** (1987). Structure of the epiphytic community of *Posidonia oceanica* leaves in a shallow meadow. *Marine Ecology*, 8(4), 285-296.

**Ceccherelli, G., Piazzini, L., & Cinelli, F.** (2000). Response of the non-indigenous *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh to the native seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile: effect of density of shoots and orientation of edges of meadows. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 243(2), 227-240.

**Czerny, A. B., & Dunton, K. H.** (1995). The effects of in situ light reduction on the growth of two subtropical seagrasses, *Thalassia testudinum* and *Halodule wrightii*. *Estuaries*, 18(2), 418-427.

**Den Hartog, C.** (1970). The sea-grasses of the world. *North-Holland, Amsterdam*. 275 pp.

**Díaz-Almela, E., & Duarte, C. M.** (2008). Management of Natura 2000 habitats. 1120\* *Posidonia* beds (*Posidonion oceanicae*). *European Commission*.

**Díaz-Almela, E., Marbà, N., Álvarez, E., Santiago, R., Holmer, M., Grau, A., ... & Karakassis, I.** (2008). Benthic input rates predict seagrass (*Posidonia oceanica*) fish farm-induced decline. *Marine Pollution Bulletin*, 56(7), 1332-1342.

**Díaz, E., & Marbà, N.** (2009). 1120 *Posidonion oceanicae*. Praderas de *Posidonia oceanica* (\*). VV. AAAA., *Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de hábitat de interés comunitario en España*. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino.

- Duarte, C. M.** (1991). Allometric scaling of seagrass form and productivity. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 77(2), 289-300.
- Erftemeijer, P. L.** (1994). Differences in nutrient concentrations and resources between seagrass communities on carbonate and terrigenous sediments in South Sulawesi, Indonesia. *Bulletin of Marine Science*, 54(2), 403-419.
- Francour, P.** (1990). Dynamique de l'écosystème à *Posidonia oceanica* dans le parc national de Port-Cros: analyse des compartiments matie, litière, faune vagile, échinodermes et poissons (Doctoral dissertation, Paris 6).
- García-Valenzuela, X., García-Moya, E., Rascón-Cruz, Q., Herrera-Estrella, L., & Aguado-Santacruz, G. A.** (2005). Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of plant physiology*, 162(6), 650-661.
- Hargrave, B. T.** (1980). Factors affecting the flux of organic matter to sediments in a marine bay. *Marine benthic dynamics*, 11, 243-263.
- Hemminga, M. A., & Duarte, C. M.** (2000). *Seagrass ecology*. Cambridge University Press. ISBN 0-521-66184-6.
- Huang, X. D., El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R., & Greenberg, B. M.** (2004). Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution*, 130(3), 453-463.
- Lee, K. S., & Dunton, K. H.** (1997). Effect of in situ light reduction on the maintenance, growth and partitioning of carbon resources in *Thalassia testudinum* banks ex König. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 210(1), 53-73.
- Lepoint, G., Nyssen, F., Gobert, S., Dauby, P., & Bouqueneau, J. M.** (2000). Relative impact of a seagrass bed and its adjacent epilithic algal community in consumer diets. *Marine Biology*, 136(3), 513-518.
- Marbà, N., Calleja, M. L., Duarte, C. M., Álvarez, E., Díaz-Almela, E., & Holmer, M.** (2007). Iron additions reduce sulfide intrusion and reverse seagrass (*Posidonia oceanica*) decline in carbonate sediments. *Ecosystems*, 10(5), 745-756.
- Marbà, N., Duarte, C. M., Alexandra, A., & Cabaço, S.** (2004). How do seagrasses grow and spread? *European seagrasses: an introduction to monitoring and management*, 11.
- Marbà, N., Duarte, C. M., Holmer, M., Calleja, M. L., Álvarez, E., Díaz-Almela, E., & Garcias-Bonet, N.** (2008). Sedimentary iron inputs stimulate seagrass (*Posidonia oceanica*) population growth in carbonate sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76(3), 710-713.
- Marbà, N., Duarte, C. M., Holmer, M., Martínez, R., Basterretxea, G., Orfila, A., ... & Tintoré, J.** (2002a). Effectiveness of protection of seagrass (*Posidonia oceanica*) populations in Cabrera National Park (Spain). *Environmental Conservation*, 29(4), 509-518.
- Marbà, N., Hemminga, M. A., Mateo, M. A., Duarte, C. M., Mass, Y. E., Terrados, J., & Gacia, E.** (2002b). Carbon and nitrogen translocation between seagrass ramets. *Marine Ecology Progress Series*, 226, 287-300.
- Montefalcone, M.** (2009). Ecosystem health assessment using the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: a review. *Ecological indicators*, 9(4), 595-604.
- Orth, R. J., Carruthers, T. J., Dennison, W. C., Duarte, C. M., Fourqurean, J. W., Heck, K. L., ... & Short, F. T.** (2006). A global crisis for seagrass ecosystems. *Bioscience*, 56(12), 987-996.

- Parsons, T. R., Takahashi, M., & Hargrave, B.** (2013). *Biological oceanographic processes*. Elsevier.
- Pérès, J. M.** (1984). La régression des herbiers à *Posidonia oceanica*. In *International Workshop on Posidonia oceanica beds*(Vol. 1, pp. 445-454). GIS Posidonie Marseille.
- Powell, G. V., Fourqurean, J. W., Kenworthy, W. J., & Zieman, J. C.** (1991). Bird colonies cause seagrass enrichment in a subtropical estuary: observational and experimental evidence. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 32(6), 567-579.
- Powell, G. V., Kenworthy, J. W., & Fourqurean, J. W.** (1989). Experimental evidence for nutrient limitation of seagrass growth in a tropical estuary with restricted circulation. *Bulletin of Marine Science*, 44(1), 324-340.
- Procaccini, G., Buia, M. C., Gambi, M. C., Perez, M., Pergent, G., Pergent-Martini, C., & Romero, J.** (2003). The Western Mediterranean. *World atlas of seagrasses*, 48-58.
- Sánchez-Lizaso, J. L.** (1993). Estudio de la pradera de *Posidonia oceanica* (L.) Delile de la Reserva Marina de Tabarca (Alicante): Fenología y producción primaria.
- Short, F. T., Dennison, W. C., & Capone, D. G.** (1990). Phosphorus-limited growth of the tropical seagrass *Syringodium filiforme* in carbonate sediments. *Marine Ecology Progress Series*, 169-174.
- van Lent, F., Verschuure, J. M., & van Veghel, M. L.** (1995). COMPARATIVE STUDY ON POPULATIONS OF *ZOSTERA MARINA* L.(EELGRASS): IN SITU NITROGEN ENRICHMENT AND LIGHT MAMPULATION. INTRASPECIFIC VARIABILITY OF *ZOSTERA MARINA* L. IN THE SOUTHWESTERN^ NETHERLANDS, 107.
- Vidal, M.** (1988). Contenido y dinámica del fósforo en el sedimento de praderas de fanerógamas marinas. *Oecologia aquatica*, 9(9), 41-59.
- Wintermans, J. F. G. M., & De Mots, A. S.** (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis*, 109(2), 448-453.

### Imágenes:

- <sup>[1]</sup> Fotografía de Carlos Minguell, Ocean.
- <sup>[2]</sup> Imagen obtenida en: Imagen ©2018 Data SIO, NOAA, U.S. Navy, NGA, GEBCO, Landsat/ Copernicus, Datos del mapa ©2018 Google. Inst. Geogr. Nacional España. A escala 20 km.
- <sup>[3]</sup> Imagen obtenida en: Imágenes ©2018 Google, DigitalGlobe, Datos del mapa ©2018 Google, Inst. Geogr. Nacional España. Escala de 50m.
- <sup>[4]</sup> Imagen obtenida en: <http://www.directindustry.es>.
- <sup>[5]</sup> Fotografías de Aurora Rayo Aguilar.
- <sup>[6]</sup> A) Imagen obtenida en: El Mar a Fons, CSIC; B) Imagen obtenida en: <https://proemer.cl>; C) Fotografía de la Dra. Nona S.R. Agawin; D) Fotografía Aurora Rayo Aguilar.
- <sup>[7]</sup> Gráfico adquirido en la Universidad de las Islas Baleares por la Dra. Nona R. S. Agawin.
- <sup>[8]</sup> Gráficas realizadas con el programa Microsoft® Excel 2016 versión Office 365.
- <sup>[9]</sup> Gráficas realizadas con el programa R, versión 1.1.383 – © 2009-2017 RStudio, Inc.