



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Control de la disponibilidad de hierro y fósforo a los fijadores de N₂ asociados a *Posidonia oceanica* en experimentos en acuaria

Alejandro Segura Alfaro

Grau de Biologia

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Nona Sheila Agawin Romualdo

Departament de Biologia, Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Física, Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Posidonia oceanica, fijación de nitrógeno, epífitos, Nitrogenasa, nutrientes.

Abstract

Nitrogen fixation ratio and primary production was determined from the associated epiphytic community, and chlorophyll concentration from *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaf on summer and winter 2018. It was fertilized with iron (Fe) and phosphorous (P) on 40L aquarium with water from Cala Nova (39°33'02.6"N 2°36'01.6"E). The aim of the study was to determine how Fe and P affect on the N-fixing community of *P. oceanica*. It was observed that high loads of P and Fe in the water column can reduce leaf primary production of *P. oceanica* just after two weeks and the addition of Fe has lower effects than P. The nitrogen fixation response was different depending on the part of the plant. It wasn't found stationarity variations on any parameter, only between treatments. The effect of this treatments was different between the N-fixing community and plant leaf (in terms of primary production and chlorophyll content). Regarding leaf chlorophylls a and b, Fe promotes production and P reduces it slightly. Nonetheless, the Fe+P addition is lightly beneficial for the chlorophyll production in comparison with control treatment.

Resumen

Se determinó la tasa de fijación de nitrógeno y la producción primaria de la comunidad epífita asociada, y la concentración de clorofila en hoja de *Posidonia oceanica* (L.) Delile en verano e invierno de 2018. Se fertilizó con hierro (Fe) y fósforo (P) en acuarios de 40 L con agua de Cala Nova (39°33'02.6"N 2°36'01.6"E). El objetivo del estudio era determinar cómo influía el Fe y P en las comunidades fijadoras de *P. oceanica*. Se observó que grandes concentraciones de P y Fe en la columna de agua pueden reducir la producción primaria de la hoja de *P. oceanica* en solo 2 semanas y que la adición de Fe tiene un efecto menor que el P. La respuesta en la fijación de nitrógeno es diferente dependiendo de la parte de la planta. No se ha encontrado variación estacional en ninguno de los parámetros, únicamente entre tratamientos. El efecto de los tratamientos es diferente para las comunidades de fijadores que para la planta (en términos de producción y contenido en clorofila). Respecto a clorofilas a y b de la hoja, el Fe promueve la producción y P la hace decrecer levemente. A pesar de eso, la adición de Fe+P es ligeramente beneficiosa para la producción de clorofilas en comparación con el tratamiento control.

Introducción

Posidonia oceanica (L.) Delile 1813, es una planta fanerógama angiosperma marina de la familia Posidoniaceae. Es una especie amenazada y endémica extendida por todo el mar Mediterráneo. Vive enraizada al sustrato marino, hasta los 40 m de profundidad, formando auténticas praderas de gran densidad (Núria Marbà et al. 2002). Tiene un lento crecimiento en área mediante rizomas cubiertos por fibras, bajo el sedimento marino. De estos, crecen agrupaciones de hojas largas en forma de cintas que pueden llegar a 1m de largo, márgenes paralelos y ápices redondeados, las cuales son caducas y alcanzan una edad máxima de 300 días (Duarte 1991) debido al proceso de renovación anual. Para reducir la pérdida de materia orgánica, la planta es capaz de movilizar los nutrientes entre hoja y rizoma (Alcoverro, Manzanera, y Romero 2001) y de hojas más viejas a las más jóvenes (Pedersen, Duarte, y Cebrián 1997).

Las praderas de *P. oceanica*, según el anexo 1 de la Directiva 92/43/CEE del Consejo de las comunidades europeas, del 21 de mayo de 1992, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres, constituyen un hábitat natural de interés comunitario y para su conservación es necesario designar zonas especiales de conservación. También está protegida como especie a nivel nacional, según el BOE nº310, del 7 de diciembre de 1995.

Las praderas de *P. oceanica* son de suma importancia para los ecosistemas marinos, ya que respaldan una gran biodiversidad, donde viven invertebrados y algas epifitando sus hojas, refugio de pequeños individuos como moluscos y vertebrados marinos (M. A. Borowitzka, Lethbridge, y Charlton 1990; Orth et al. 2006). Estos epífitos tienen un periodo de vida limitado a 50-200 días debido a la senescencia y renovación de las hojas (Duarte y Chiscano 1999). Las comunidades asociadas epífitas pueden influir sobre estas praderas ya que pueden representar más del 50% de la biomasa (M. Borowitzka, Lavery, y Kuelen 2006) y junto con la cobertura dominante de las algas marinas tienen un papel muy importante en la producción primaria costera (Pergent et al. 1994; Duarte y Chiscano 1999), almacenamiento de carbono reteniendo CO₂ atmosférico y reduciendo el cambio climático (Duarte et al. 2010), y en el ciclo de nutrientes (Cornelisen y Thomas 2002; Romero et al. 2006). Además, estas praderas disminuyen la energía cinética de las olas reduciendo la erosión en las playas reteniendo los sedimentos en suspensión del agua (Gacia y Duarte 2001). Se la considera un excelente bioindicador de la calidad de las aguas marinas costeras (Montefalcone 2009).

A pesar de la importancia ecológica de los lechos de *P. oceanica*, se conoce que la disminución que están sufriendo estas praderas, a razón de un 7% anual, es preocupante (Waycott et al. 2009). Esta disminución se debe a varios motivos: tanto al impacto antrópico inherente del crecimiento y desarrollo costero como al cambio climático global y la degradación del ecosistema (Orth et al. 2006; Duffy 2006). La eutrofización y los vertidos en el ecosistema marino costero, derivados de la actividad humana deterioran la calidad del agua (por ejemplo, disminuyendo la transparencia, aumentando la tasa de respiración) y los sedimentos, provocando la regresión de las praderas de *P. oceanica* (Delgado et al. 1999; Duarte 2002; Orth et al. 2006). Esta pérdida de praderas no se puede solucionar a corto plazo, debido a que es una planta de crecimiento muy lento ($2 \text{ cm} \cdot \text{año}^{-1}$, Marbà y Duarte 1998) y a su ineficiente reproducción sexual (Molenaar, Meinesz, y Caye 1993; Buia y Mazzella 1991). Otra causa del deterioro en zonas costeras es el fondeo de barcos de recreo, produciendo un daño mecánico directo en las comunidades de esta fanerógama (Milazzo et al. 2004).

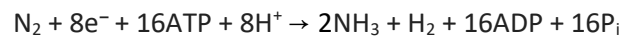
También hay que tener en cuenta el cambio climático que provoca la acidificación de los océanos, es decir, una bajada de pH marino causado por el aumento de las concentraciones de CO_2 disuelto en el agua (Hassoun et al. 2015). Una de las capacidades que tiene *P. oceanica* es su acción tamponadora o “buffering” de la acidificación de las aguas mediante su actividad fotosintética (Hendriks et al. 2014).

El mar Mediterráneo, único lugar donde podemos encontrar *P. oceanica*, es un mar oligotrófico y con una salinidad por encima de la media mundial (38 PSU o $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, variando de 36-39 PSU o $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ aumentando de oeste a este, Bethoux 1980). La evaporación supera en grandes cantidades al aporte fluvial y a las precipitaciones, factor importante para entender la circulación en este mar. En el Mediterráneo este se pueden encontrar las mayores concentraciones halinas. El gradiente de presión induce la entrada de aguas superficiales desde el Atlántico, aumentando su salinidad a medida que viaja hacia el este y volviendo al estrecho de Gibraltar en forma de aguas profundas. Por tanto, hay también una salida de nutrientes hacia el Atlántico (Millot 1999). Esta circulación es de vital importancia biológica porque aseguran la renovación de nutrientes y oxigenación de las aguas. Las temperaturas también tienen un papel muy importante en el Mediterráneo, ya que, junto con la salinidad, forman climas que son claves para esta circulación. En verano, los nutrientes están agotados debido a una gran producción fitoplanctónica y son repuestos por las capas más profundas durante la mezcla de aguas en invierno. El P tiene una tendencia general de ser el limitante de la producción del fitoplancton en verano y el N en invierno (Marty et al. 2002).

P. oceanica tiene una gran demanda de nutrientes debida a su gran producción, en cambio, la encontramos en ambientes prístinos y oligotróficos. Esto es debido a su enorme habilidad para reciclar gran cantidad de nutrientes, como por ejemplo N, satisfaciendo un porcentaje considerable de sus

necesidades (Mateo y Romero 1997; Herbert 1999). Cabe recalcar la importante actividad de la comunidad microbiana fijadora en este aporte de N, ya que solo con la entrada de N al sistema no daría abasto para la planta (Agawin et al. 2017). Esa capacidad de los microorganismos fijadores asociados es fundamental para el crecimiento de *P. oceanica*, sobre todo en condiciones de escasez de nutrientes (Pirc 1985).

La fijación de N por microorganismos es el proceso en el cual el N₂ molecular es transformado en NH₃. Únicamente utilizan este proceso los procariontes cuando otras fuentes de N son escasas, proporcionando ventajas en ciertos ambientes. Esta reacción es catalizada por Nitrogenasa, un complejo catalítico multiproteico dos componentes: la proteína MoFe (también llamado dinitrogenasa o componente I) y la proteína Fe (también llamado dinitrogenasa reductasa o componente II). La proteína MoFe es un dímero formado por dos subunidades, una contiene el cofactor Fe-molibdeno (FeMo-co) que proporciona el centro activo para la unión del sustrato y su reducción, y el P cluster, formado por un cofactor Fe, involucrado en la transferencia de electrones de la proteína Fe al FeMo-co. La proteína Fe es un monómero con un cofactor Fe. Además de agentes reductores, es necesaria la hidrólisis de ATP para que se lleve a cabo la reacción. El complejo catalítico redox se ve inhibido por la presencia de O₂. Debido a la estabilidad del enlace triple del N₂, el proceso exige una demanda teórica de 16 moles de ATP por cada mol de N₂ (Hoffman et al. 2014).



Existe poca especificidad enzimática en Nitrogenasa, pudiendo realizar gran cantidad de reacciones, reduciendo compuestos análogos con triples enlaces. Aprovechándose de estos conocimientos, y sabiendo que Nitrogenasa es más específica por acetileno (C₂H₂) que por N₂, se desarrolló la técnica de ARA (Acetylene Reduction Assay, Hardy et al. 1968), utilizada en este experimento para determinar la tasa de fijación.

En *P. oceanica* el proceso de fijación lo llevan diferentes taxones como Cyanobacteria, α -, β -, δ - y γ -Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes/Chlorobi y Archaea en diferentes proporciones (M. Hamisi et al. 2013; M. I. Hamisi, Lyimo, y Muruke 2004; Uku et al. 2007; Agawin et al. 2016). Algunas cianobacterias filamentosas utilizan heterocistos, unas células vegetativas especializadas con doble pared celular para asegurar un ambiente anaeróbico. De esta forma, son más eficientes fijando N₂ que el resto de cianobacterias (Brown y Rutenberg 2012).

También existen diferentes tasas de fijación entre las diferentes partes de la planta con patrones de variación temporal (Garcias-Bonet et al. 2016; Celdrán et al. 2012; Vohník et al. 2015; Agawin et al.

2016). Esto puede deberse a una sensibilidad por factores ambientales, biológicos y a alteraciones antropogénicas del medio que afectan al crecimiento y la tasa de fijación.

Actualmente se sugiere que el hierro y el fósforo son los dos nutrientes limitantes más importantes para la producción primaria en fanerógamas (Fourqurean, Zieman, y Powell 1992), sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre cómo estos factores limitan o controlan la fijación de nitrógeno en el Mar Mediterráneo y más aún en los fijadores de nitrógeno asociados a *P. oceanica*.

Se conoce la acción del P como elemento potencialmente limitante en la producción de las praderas de *P. oceanica* (Marbà et al. 2006) y la producción primaria del este del mar Mediterráneo (Krom et al. 1991; Thingstad, Zweifel, y Rassoulzadegan 1998). También encontramos esas necesidades en los fijadores de N asociados. Para ver cómo afecta la disponibilidad de nutrientes en los ecosistemas marinos de esta fanerógama, en este estudio se toma como referencia *P. oceanica* y sus asociados fijadores de N. Por tanto, el objetivo principal de este estudio es conocer cómo influye el P y el Fe, dos de los oligoelementos más importantes en las funciones fotosintéticas de las plantas vasculares y, por tanto, posibles limitantes del crecimiento.

Por último, este experimento quiere avanzar en el estudio de la adición de nutrientes en la columna de agua, a diferencia de la gran cantidad de bibliografía realizada sobre limitación de nutrientes que son con adición de nutrientes en el sustrato (en la rizosfera), lo cual añade algo de interés e innovación al estudio. Además, es uno de los primeros en utilizar la adición de Fe y P en la columna de agua.

Metodología

Diseño experimental

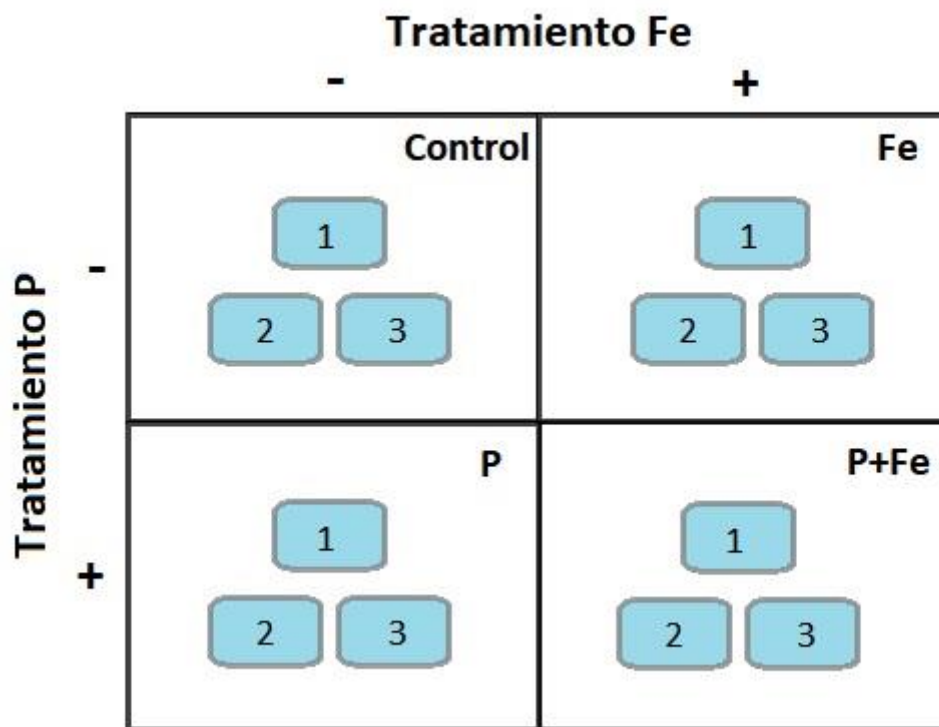


Figura 1. Representación gráfica del diseño experimental de un tiempo.

En este experimento se realizaron dos tipos de tratamientos (Fe, P) con dos niveles cada uno (ausencia y presencia) con interacción, de forma que en total existen cuatro niveles de tratamiento diferentes (Control, Fe, P, Fe+P) como muestra en la figura 1. El experimento se realizó en dos tiempos (verano e invierno). Cada nivel tiene tres unidades de tratamiento (1, 2, 3), de forma que en total se utilizaron doce acuarios con 40 L de agua marina filtrada con poro de 10 μm recogida de Cala Nova. Se montaron en disposición aleatoria dentro de una piscina de plástico (200x400x100 cm) con el agua necesaria para que el nivel se mantuviera igual que dentro de los acuarios con la finalidad de mantener una temperatura equilibrada en todos ellos. Se tapó la piscina con una tela en la cual traspasa parcialmente la radiación, con la idea de simular las profundidades a las que encontramos *P. oceanica*. Para la realización del experimento en verano se utilizó un refrigerador para simular la temperatura real del ecosistema submarino. Los tratamientos (0.97 mM P y 0.96 mM Fe, fertilizantes comerciales granulados) se iniciaron una vez ya se tenían alojados los ocho haces de *P. oceanica* correspondientes para cada acuario, previamente recogidos de Cala Nova (39°33'02.6"N 2°36'01.6"E) mediante buceo con botella a una profundidad de 5-6 m. Se intentó recoger todos los haces de un tamaño similar. Los

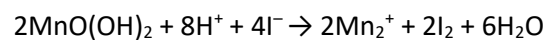
rizomas fueron sellados con pegamento para corales para evitar fugas de gases u otras sustancias, por tanto, no se utilizó ningún tipo de sustrato para las plantas. Todo el material de laboratorio y los acuarios utilizado en este experimento fue previamente lavado con ácido.

Determinación de oxígeno disuelto y producción primaria

Para la determinación en el laboratorio de oxígeno disuelto en el agua se siguió el método Winkler (Winkler 1888) con medición en espectrofotómetro (Labasque et al. 2004). El método Winkler consiste en retener el oxígeno disuelto en el agua mediante unos reactivos de forma que posteriormente pueda ser medido mediante una valoración. Concretamente, se añade 80 µL de una solución de cloruro de manganeso (MnCl₂ (3N), reactivo 1) a una muestra de agua de volumen conocido e inmediatamente se añade 80 µL una solución alcalina de hidróxido de sodio-yoduro de sodio (NaOH (8N) /NaI (4N), reactivo 2). Al añadirlo, hará que precipite hidróxido de manganeso (Mn(OH)₂) que reaccionará con el oxígeno disuelto en el agua reteniéndolo en la forma hidratada de óxido de manganeso (MnO(OH)₂).



Al añadir 80 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ (10N), reactivo 3), los grupos hidroxilos se disuelven. En este momento, el manganeso de MnO(OH)₂ pasa a actuar como agente oxidante y libera yodo (I₂) a partir de los iones de yodo (I⁻). Después, se medirá la absorbancia de la muestra.



Para la obtención de las muestras, se recogió agua mediante la bomba de filtrado sin producir ninguna burbuja. Se despreció tres veces el volumen de la botella Winkler con tal de eliminar cualquier posible burbuja y homogeneizar muestra de agua. Se rellenaron dos tubos Exetainer (12 mL) de cada acuario para determinar el oxígeno disuelto inicial, se aplicó el reactivo 1 y 2 para fijar inmediatamente el oxígeno. Se rellenaron cuatro botellas Winkler (125 mL), dos translúcidas y dos opacas, por cada acuario. Las botellas Winkler se incubaron durante tres horas en la piscina con un fragmento de 5 cm de la segunda hoja más joven dentro. Al acabar la incubación, se trasladó el contenido de cada botella a dos tubos Exetainer (12 mL) y se aplicaron los reactivos 1 y 2. Posteriormente, los fragmentos de hoja se pesaron (peso fresco) y se guardaron en el congelador para la determinación de clorofila en la hoja. Al día siguiente de la aplicación de los reactivos, se añadió el reactivo 3 agitando el tubo antes y después, y se midió seguidamente en el espectrofotómetro, obteniendo una medida de absorbancia de la muestra.

Para la determinación de oxígeno disuelto total de la filosfera, se seleccionaron todas las hojas de un mismo haz cortando el rizoma y se introdujeron en una botella de 1L. Se rellenaron dos tubos Exetainer (12 mL) de cada acuario para determinar el oxígeno disuelto inicial, se aplicó el reactivo 1 y 2 para fijar inmediatamente el oxígeno. Se repitió el proceso para los doce acuarios. Las botellas se incubaron durante tres horas en la piscina. Al terminar la incubación, se rellenaron dos tubos Exetainer (12 mL) de cada botella para determinar el oxígeno disuelto final aplicando los reactivos 1 y 2. Para la lectura se añadió el reactivo 3 como anteriormente se explicó.

Para relacionar la lectura del espectrofotómetro con concentraciones de oxígeno disuelto se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas mediante valoración volumétrica de IO_3^- (Winkler 1888). Una vez tenemos todos los datos, tanto de concentración de oxígeno disuelto como el peso del fragmento de hoja, podemos obtener la producción primaria neta (PPN), producción primaria bruta (PPB) y respiración (R) de la siguiente manera:

$$\text{PPN} = \text{g Oxígeno botella Winkler translúcida} - \text{g Oxígeno inicial}$$

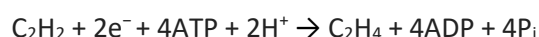
$$\text{R} = \text{g Oxígeno inicial} - \text{g Oxígeno botella Winkler opaca}$$

$$\text{PPB} = \text{PPN} + \text{R} = \text{g Oxígeno botella Winkler translúcida} - \text{g Oxígeno Winkler opaca}$$

Estas fórmulas no tienen en cuenta el tiempo de incubación, el volumen de la botella Winkler ni el peso de la hoja. Se tiene en cuenta a la hora de normalizar los datos.

Tasa de fijación de N por partes de la planta y filosfera entera

Para determinar la tasa de fijación de N de la comunidad microbiana se siguió el método ARA, Acetylene Reduction Assay (Hardy et al. 1968). Este método consiste en introducir una cantidad concreta de acetileno (C_2H_2) en viales (parte vieja de la hoja) o tubos Falcon de 50 ml (rizoma) y, después de la incubación, medir la cantidad de etileno (C_2H_4) que se ha generado en el vial mediante cromatografía de gas.



Se utiliza acetileno debido a que la enzima Nitrogenasa tiene mucha menos especificidad por N_2 que por este gas. Basándose en la estequiometría de las reacciones, por cada 4 moles de C_2H_4 que genere la enzima Nitrogenasa equivaldrían a 1 mol de NH_3 .

En fijación de N por partes, se estudió el extremo de la hoja y el rizoma. Para la preparación de los viales con hoja, primero se seleccionaron dos fragmentos de 5 cm de la parte vieja de la segunda hoja más vieja del haz, uno por vial. Se añadieron 0.5 mL de agua de mar filtrada y autoclavada con pipeta Pasteur para evitar la desecación de la hoja. Para la preparación de los tubos Falcon, se seleccionaron dos fragmentos 5 cm de rizoma sin coger la base del haz de hojas, uno por cada tubo Falcon. También se añadieron 2.5 mL de agua de mar autoclavada. Estos dos procesos se repitieron para cada acuario. Una vez preparados, se sellaron herméticamente y se añadió 2 mL de acetileno a los viales y 10 mL a los tubos Falcon con jeringuilla Hamilton. Al no utilizar sustrato, no es necesario enjuagar con He el tubo Falcon ya que las comunidades anóxicas muy probablemente hayan desaparecido. El proceso de incubación tiene lugar en la piscina durante unas tres horas. Después, se extrajeron 10 mL de gas con la jeringuilla Hamilton y se inyectaron en tubos Hungate preevacuados al vacío. A estos tubos se les extrajo una muestra para la cromatografía de gases. Los fragmentos de hoja y rizoma se pesaron (Peso fresco) y se introdujeron en la estufa durante tres días. Finalmente, se volvieron a pesar (Peso seco).

En fijación de N de la filosfera entera, se cortó el rizoma para obtener toda la filosfera de un haz y se introdujo en una botella de 1L con agua de mar filtrada saturada de acetileno, repitiendo el proceso para cada acuario. A continuación, se incubó durante 3 h. Se extrajeron 10 mL y se introdujeron en tubos Hungate con 1.25 mL de TCA 20%. Se repitió el proceso con los 12 acuarios. Se introdujeron los tubos Hungate en baño termostático durante 12 h. Se extrajo el gas con la jeringuilla Hamilton y se leyó en la cromatografía de gases.

Determinación del contenido de clorofila a y b

La extracción se realizó a partir de los fragmentos de hoja de 5 cm utilizados en la determinación de oxígeno disuelto, tanto invierno como verano. Para la extracción de clorofilas a y b, se trituró el fragmento de hoja en un mortero y se introdujo en un tubo Falcon de 15 mL con 10 mL de etanol 96%. Se dejó extrayendo durante 24 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Una vez extraído, se centrifuga a 5000 rpm durante diez minutos, se traspasaron 3,3 mL a una cubeta y se midió la absorbancia a 665 y 649 nm con el espectrofotómetro. Las clorofilas fueron determinadas con la fórmula de (Wintermans y De Mots 1965):

$$\text{Chl a} = 13.70 * A_{665} - 5.76 * A_{649}$$

$$\text{Chl b} = 25.80 * A_{649} - 7.60 * A_{665}$$

$$\text{Chl en la planta} = (\text{Chl en cubeta} * V \text{ extracción}) / \text{g fragmento de hoja}$$

Análisis estadístico

Se realizó el test de Shapiro-wilk para comprobar si las muestras seguían una distribución normal. De ser así, se continuó con el test de Bartlett para comprobar la homogeneidad de las varianzas. De no ser así, se realizó el test de Lavene, el análogo a Bartlett para muestras que no siguen una distribución normal. Realizando estos tests podemos saber si se debe utilizar un test paramétrico o uno no paramétrico.

Cuando se comprobó que la muestra era paramétrica, se utilizó el test ANOVA de un factor con selección post-hoc mediante el test de Bonferroni. Si la muestra no era paramétrica, se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

Resultados

Tasa de fijación de nitrógeno

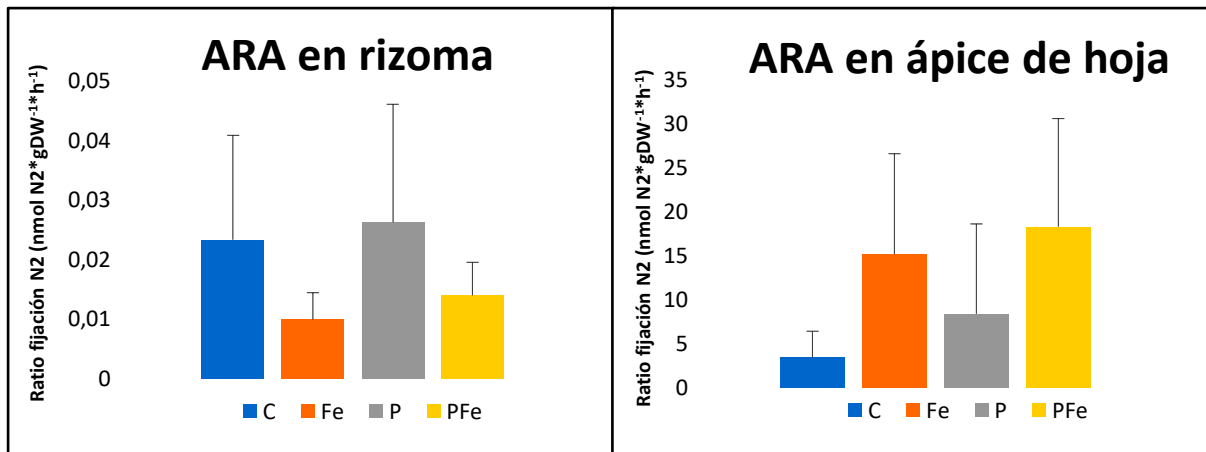


Figura 1. Gráficas de tasa de fijación de N₂ de las comunidades microbianas asociadas a *P.oceanica* en 5 cm de rizoma (izquierda) y fragmentos de 5 cm de hoja (derecha) en invierno del 2018 (nmol N₂*gDW⁻¹*h⁻¹). DW= Peso seco.

No hay diferencias significativas (p -valor > 0.05) de fijación de N₂ entre diferentes tratamientos (Fig.1). En cambio, sí existen diferencias significativas entre la fijación de N₂ entre las diferentes partes de la planta (p -valor = 2,97E-05).

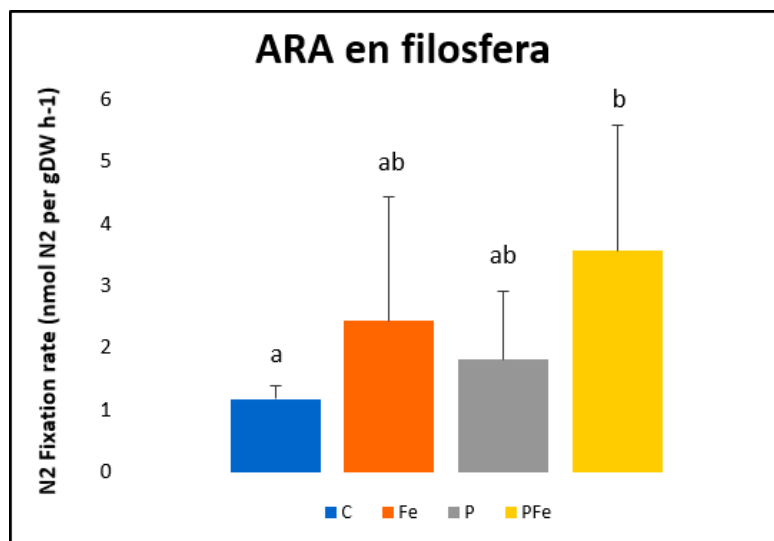


Figura 2. Gráfica de fijación de N₂ de comunidad microbiana asociada a la filosfera entera en invierno del 2018 (nmol N₂*gDW⁻¹*h⁻¹).

Existen diferencias significativas entre los tratamientos "Control" y "P+Fe" (p -valor = 6,48E-04, Fig.2).

Oxígeno disuelto en el agua

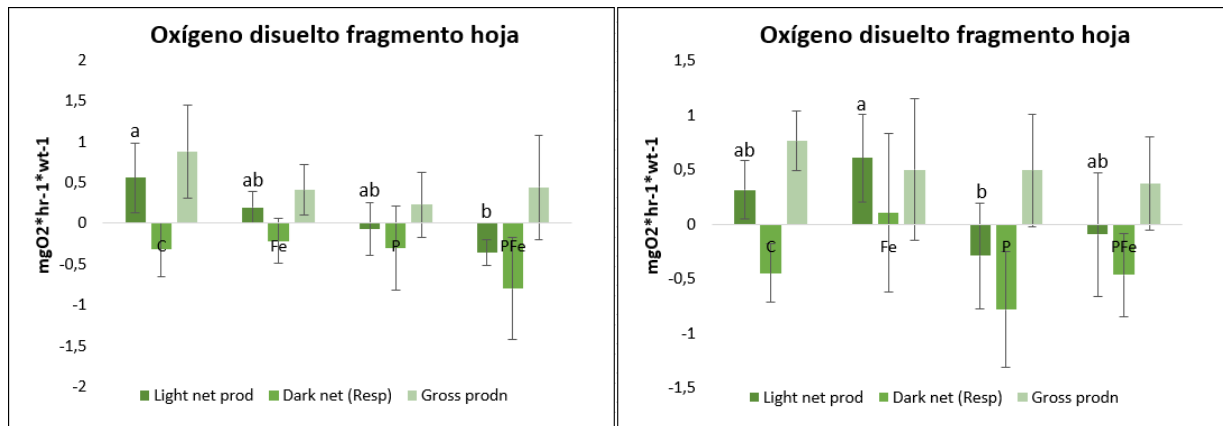


Figura 3. Gráfica de producción primaria neta, respiración y producción primaria bruta a partir de la determinación de oxígeno disuelto en el agua en invierno 2018 (izquierda) y verano 2018 (derecha) en mgO₂*h⁻¹*gWT⁻¹. (WT=Peso fresco)

Se observan diferencias significativas entre los tratamientos "Control" y "P+Fe" en invierno (p-valor = 2,68E-03, Fig.3). También hay diferencias entre los tratamientos "Fe" y "P" en verano (p-valor = 0.029, Fig.3). No hay evidencias de diferencias significativas entre las diferentes estaciones del año (p-valor > 0.05).

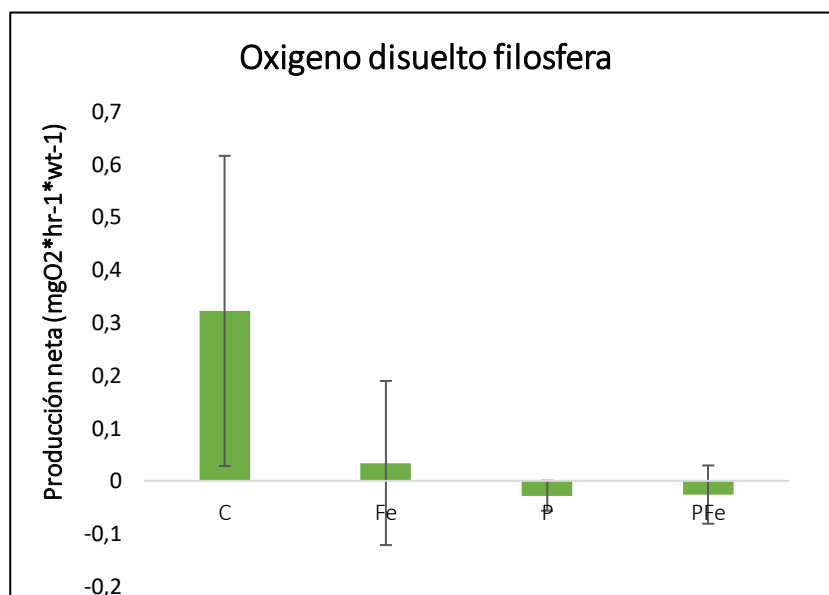


Figura 4. Gráfica de la producción neta de la filosfera entera a partir de oxígeno disuelto en el agua en verano en mgO₂*h⁻¹*gWT⁻¹.

No hay diferencias significativas entre la producción primaria neta entre diferentes tratamientos (p-valor > 0.05, Fig.4)

Determinación de clorofila a y b

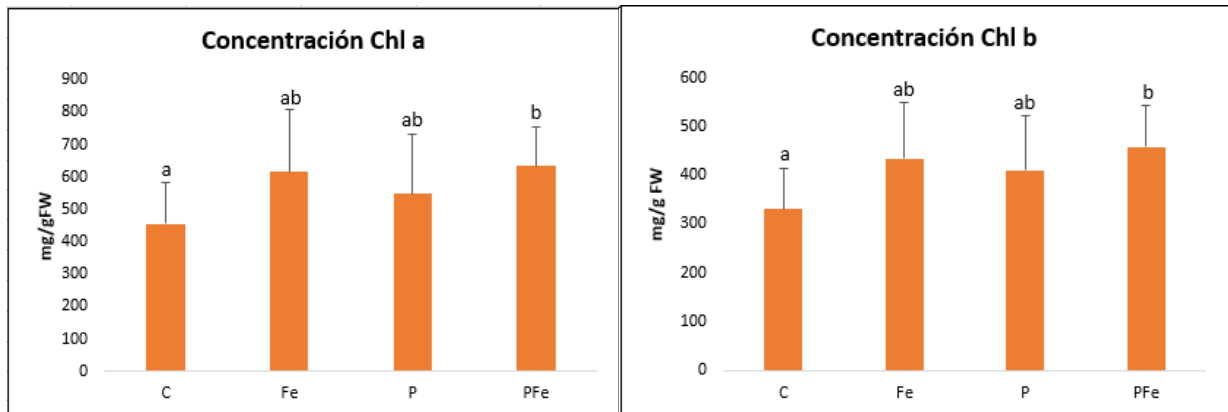


Figura 5. Gráficas de la concentración de clorofila a (izquierda) y b (derecha) de la hoja en invierno del 2018 ($\text{mgChl} \cdot \text{gFW}^{-1}$). Se aprecian diferencias significativas entre las concentraciones de clorofila a y b dependiendo del tratamiento. Concretamente entre tratamiento Control y P+Fe (p -valor = 0.0457 en clorofila a y p -valor = 0.0184 en clorofila b).

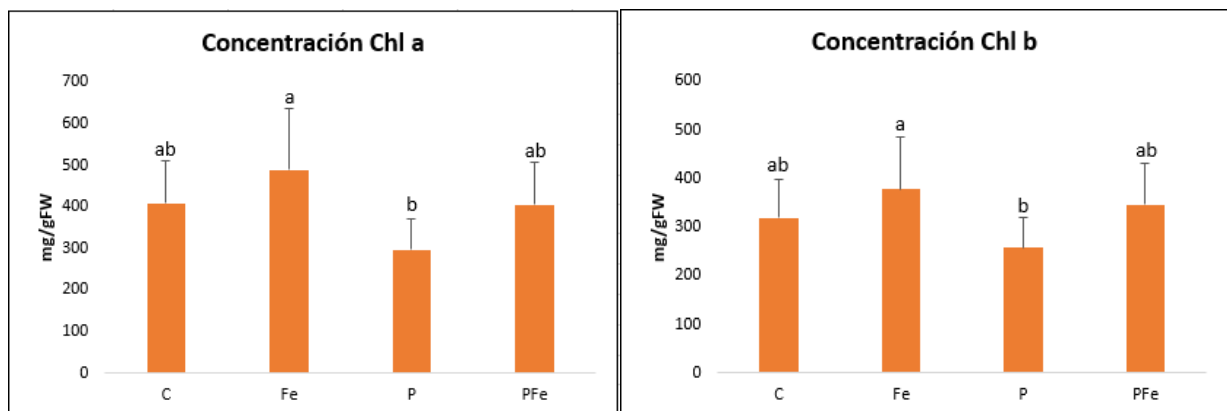


Figura 6. Gráficas de la concentración de clorofila a (izquierda) y b (derecha) de la hoja en verano del 2018 ($\text{mgChl} \cdot \text{gFW}^{-1}$). Se aprecian diferencias significativas entre las concentraciones de clorofila a y b dependiendo del tratamiento. Concretamente entre tratamiento Fe y P (p -valor = $2,25\text{E-}03$ en clorofila a y p -valor = $1,03\text{E-}02$ en clorofila b).

Discusión

Fijación de nitrógeno

Solamente se analizaron los resultados de fijación de nitrógeno de invierno para este TFG. Las diferencias entre tasas de fijación dependiendo de la parte de la planta son significativas (p -valor = $2.97E-05$). El modelo de la gráfica de tasa de fijación de nitrógeno en rizoma es totalmente inverso a la gráfica de la parte más vieja de la hoja (ápice)(Fig.1). Mientras que en rizoma la tasa de fijación en los tratamientos "Control" y "P" tiene los niveles más elevados, en el ápice de la hoja resultan ser los más bajos. Pasa lo contrario en niveles de fijación en los tratamientos "Fe" y "P+Fe". Esto podría deberse a que las comunidades microbianas asociadas sean diferentes dependiendo de la parte de la planta (Agawin et al. 2017) o que se hayan adaptado mediante mecanismos diferentes al aporte de nutrientes. A pesar de eso, los valores de fijación de nitrógeno por gramo de peso seco en la planta son mayores en hoja ($3.399-18.273 \text{ nmols N}_2 \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) que en rizoma ($0.009-0.023 \text{ nmols N}_2 \cdot \text{gDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Por tanto, es posible que el aporte de nitrógeno sea mayor desde la hoja.

No podemos decir que haya algún tipo de efecto en la tasa de fijación debido a los tratamientos, ya que el p -valor > 0.05 . En cambio, la tasa de fijación en la filosfera entera tiene diferencias significativas respecto a los tratamientos (p -valor = 0.00147). Podemos decir que el efecto de aplicar P+Fe podría beneficiar en cierto modo a la comunidad fijadora asociada respecto a no añadir ningún nutriente (p -valor = $6,48E-04$). A pesar de que la tasa de fijación en la parte del ápice de la hoja no tuviera diferencias significativas entre tratamientos, el patrón de la gráfica se asemejaba a la gráfica de la filosfera (Fig.2). Las diferencias entre los tratamientos "Control" y "P+Fe" podrían deberse a que son dos oligoelementos necesarios para la vida de los fijadores de nitrógeno. El Fe es un elemento que se utiliza en la formación de centros activos del complejo enzimático Nitrogenasa (Hoffman et al. 2014). El P también podría estar implicado en la actividad de Nitrogenasa como ocurre con *Pseudocycphellaria crocata* (Benner et al. 2007). Otros artículos defienden que el P tiene un papel importante en la nodulación y crecimiento de este, estructura estrechamente relacionada con la Nitrogenasa (Israel 1987). Por último, se publicó un caso de P y Fe como co-limitantes de la fijación de nitrógeno, como podría ocurrir en este experimento (Mills et al. 2004).

Producción primaria

No se encontraron diferencias significativas respecto a respiración y producción bruta debido al efecto de los tratamientos (p -valor > 0.05) (Fig.3), ni tampoco debido a las diferentes estaciones del año como podría haberse esperado debido a la diferencia de radiación incidente.

Respecto a la producción primaria neta, sí se observan diferencias significativas debido a los tratamientos tanto en invierno como en verano. En invierno, se pueden encontrar diferencias entre los tratamientos "Control" y "P+Fe" (p -valor = $2,68E-03$) (Fig.3), relacionando negativamente la presencia de ambos nutrientes con la producción neta. La adición de grandes cantidades de Fe y P podría afectar a la producción primaria de *P.oceanica*. Esto podría deberse al efecto quelante del P sobre los metales como el Fe, secuestrándolo mediante enlace iónico y no permitiendo utilizarlo en la producción primaria (Beyer y Walter 1987).

En verano, se observan también diferencias significativas debido a los tratamientos, pero en este caso, entre "Fe" y "P" (p -valor = 0.029) (Fig.3). Es posible que el Fe no tenga un efecto tan negativo y que la causa principal del deterioro en la producción sea el P. Es posible que, a pesar de no haber diferencias significativas en respiración, el P aumente ligeramente la respiración, lo que explicaría por qué encontramos la producción primaria neta negativa en ambas estaciones.

Respecto a oxígeno disuelto en la filofera entera, no se aprecian diferencias estadísticas significativas (p -valor > 0.05 , Fig.4). A pesar de eso, la tendencia es que en el tratamiento "Control" se aprecian los valores más altos de producción primaria neta. Esto último concuerda con los datos de oxígeno disuelto en fragmento de hoja (Fig.3): a mayor adición de nutrientes, menor es la producción primaria neta, aún teniendo en cuenta que las diferencias no son significativas en este caso.

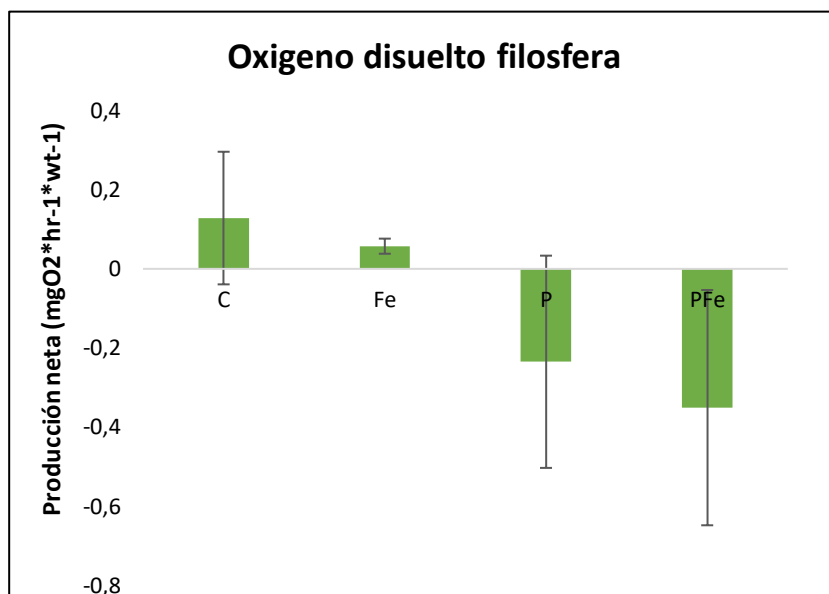


Fig. 7. Gráfica de la producción neta de la filofera entera a partir de oxígeno disuelto en el agua en verano 2017 en $\text{mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gWT}^{-1}$. Fuente: Departamento de Ecología, UIB.

Los datos obtenidos en verano de 2017 aportados por la UIB (Fig.7) y los resultados en verano de 2018 (Fig. 4) coinciden en que, a pesar de no haber diferencias significativas, el tratamiento “Control” es el que presenta mayor producción primaria y los tratamientos “P” y “P+Fe” presentan una producción primaria negativa.

Concentraciones de clorofilas a y b

Respecto a las concentraciones de clorofila en la hoja, se aprecian diferencias en ambos tiempos respecto al efecto de los tratamientos. Concretamente, el efecto de los tratamientos “Control” y “P+Fe” parecen tener diferencias significativas (p -valor = 0.0457) en clorofila a y (p -valor = 0.0184) en clorofila b en invierno (Fig.5). La producción de clorofilas a y b podría estar relacionada con la adición de Fe, ya que es un elemento necesario para su producción (Thornber 1975). Parece que el efecto quelante del P no impide que la planta obtenga los nutrientes necesarios para la producción de clorofila. Tan solo ese efecto se vería en la producción primaria de los fijadores en invierno (Fig.3 y 4).

El efecto de los tratamientos “Fe” y “P” también parecen tener diferencias significativas (p -valor = $2.25 \cdot 10^{-3}$) en clorofila a y (p -valor = $1.03 \cdot 10^{-2}$) en clorofila b en verano (Fig.6). Esto también podría deberse a la necesidad de Fe para producir clorofila. Cabe mencionar el efecto negativo que tenía el P en la producción primaria en verano (Fig.3). Se puede ver en este caso que la concentración de clorofila está relacionada con la producción primaria.

Como se puede observar, el efecto de añadir nutrientes es diferente para las comunidades de fijadores que para la planta (en términos de producción y contenido en clorofila).

Bibliografía

- Agawin, N. S. R., P. Ferriol, E. Sintes, y G. Moyà. 2017. «Temporal and spatial variability of in situ nitrogen fixation activities associated with the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* meadows». *Limnology and Oceanography* 62 (6): 2575-92.
- Agawin, N. S. R., P. Ferriol, C. Cryer, E. Alcon, A. Busquets, E. Sintes, C. Vidal, y G. Moyà. 2016. «Significant nitrogen fixation activity associated with the phyllosphere of Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: first report». *Marine Ecology Progress Series* 551 (junio): 53-62.
- Alcoverro, T., M. Manzanera, y J. Romero. 2001. «Annual metabolic carbon balance of the seagrass *Posidonia oceanica*: the importance of carbohydrate reserves». *Marine Ecology Progress Series* 211: 105-6.
- Benner, J. W., S. Conroy, C. K. Lunch, N. Toyoda, y P. M. Vitousek. 2007. «Phosphorus Fertilization Increases the Abundance and Nitrogenase Activity of the Cyanolichen *Pseudocyphellaria crocata* in Hawaiian Montane Forests». *Biotropica* 39 (3): 400-405.
- Bethoux, J P. 1980. «Mean water fluxes across sections in the Mediterranean Sea, evaluation on the basis of water and salt budgets and of observed salinities».
- Beyer, H., y W. Walter. 1987. *Manual de química orgánica*. Reverté.
- Borowitzka, M. A., R. C. Lethbridge, y L. Charlton. 1990. «Species richness, spatial distribution and colonisation pattern of algal and invertebrate epiphytes on the seagrass *Amphibolis griffithii*». *Marine Ecology Progress Series* 64: 281-91.
- Borowitzka, M. A., P. Lavery, y M. Van Kuelen. 2006. *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. ECU Publications Pre. 2011. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Brown, A. I., y A. D. Rutenberg. 2012. «Heterocyst placement strategies to maximize the growth of cyanobacterial filaments». *Physical Biology* 9 (4): 046002.
- Buia, M. C., y L. Mazzella. 1991. «Reproductive phenology of the Mediterranean seagrasses *Posidonia oceanica* (L.) Delile, *Cymodocea nodosa* (Ucria) Aschers., and *Zostera noltii* Hornem.» *Aquatic Botany* 40 (4): 343-62.
- Celdrán, D., E. Espinosa, A. Sánchez-Amat, y A. Marín. 2012. «Effects of epibiotic bacteria on leaf growth and epiphytes of the seagrass *Posidonia oceanica*». *Marine Ecology Progress Series* 456:

21-27.

- Cornelisen, C. D., y F. I. M. Thomas. 2002. «Ammonium uptake by seagrass epiphytes: Isolation of the effects of water velocity using an isotope label». *Limnology and Oceanography* 47 (4): 1223-29.
- Delgado, O., J. Ruiz, M. Pérez, J. Romero, y E. Ballesteros. 1999. «Effects of fish farming on seagrass (*Posidonia oceanica*) in a Mediterranean bay: seagrass decline after organic loading cessation». *Oceanologica Acta* 22 (1): 109-17.
- Duarte, C. M. 2002. «The future of seagrass meadows». *Environmental Conservation* 29 (02): 192-206.
- Duarte, C. M., y C. L. Chiscano. 1999. «Seagrass biomass and production: a reassessment». *Aquatic Botany* 65 (1-4): 159-74.
- Duarte, C. M., N. Marbà, E. Gacia, J.W. Fourqurean, J. Beggins, C. Barrón, y E. T. Apostolaki. 2010. «Seagrass community metabolism: Assessing the carbon sink capacity of seagrass meadows». *Global Biogeochemical Cycles* 24 (4).
- Duarte, C. M. 1991. «Allometric scaling of seagrass form and productivity». *Marine Ecology Progress Series Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 77.
- Duffy, JE. 2006. «Biodiversity and the functioning of seagrass ecosystems». *Marine Ecology Progress Series* 311 (abril): 233-50.
- Fourqurean, J. W., J. C. Zieman, y G. V. N. Powell. 1992. «Phosphorus limitation of primary production in Florida Bay: Evidence from C:N:P ratios of the dominant seagrass *Thalassia testudinum*». *Limnology and Oceanography* 37 (1): 162-71.
- Gacia, E., y C. M. Duarte. 2001. «Sediment Retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* Meadow: The Balance between Deposition and Resuspension». *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52 (4): 505-14.
- Garcias-Bonet, N., J. M. Arrieta, C. M. Duarte, y N. Marbà. 2016. «Nitrogen-fixing bacteria in Mediterranean seagrass (*Posidonia oceanica*) roots». *Aquatic Botany* 131 (mayo): 57-60.
- Hamisi, M. I., T. J. Lyimo, y M. H. Muroke. 2004. «Cyanobacterial Occurrence and Diversity in Seagrass Meadows in Coastal Tanzania». *Western Indian Ocean Journal of Marine Science* 3 (2): 113-22.
- Hamisi, M., B. Díez, T. Lyimo, K. Ininbergs, y B. Bergman. 2013. «Epiphytic cyanobacteria of the seagrass *Cymodocea rotundata*: diversity, diel nifH expression and nitrogenase activity».

Environmental Microbiology Reports 5 (3): 367-76.

- Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson, y R. C. Burns. 1968. «The Acetylene-Ethylene Assay for N₂ Fixation: Laboratory and Field Evaluation». *Plant Physiology* 43 (8): 1185-1207.
- Hassoun, A. E. R., E. Gemayel, E. Krasakopoulou, C. Goyet, M. A. Saab, V. Guglielmi, F. Touratier, y C. Falco. 2015. «Acidification of the Mediterranean Sea from anthropogenic carbon penetration». *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 102 (agosto): 1-15.
- Hendriks, I. E., Y. S. Olsen, L. Ramajo, L. Basso, T. S. Moore, J. Howard, C. M. Duarte, y A. Steckbauer. 2014. «Photosynthetic activity buffers ocean acidification in seagrass meadows». *Biogeosciences* 11: 333-46.
- Herbert, R. A. 1999. «Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems». *FEMS Microbiology Reviews* 23 (5): 563-90.
- Hoffman, B. M., D. Lukoyanov, Z. Yang, D. R. Dean, y L. C. Seefeldt. 2014. «Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage». *Chemical Reviews* 114 (8): 4041-62.
- Israel, D. W. 1987. «Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation.» *Plant physiology* 84 (3): 835-40.
- Krom, M. D., N. Kress, S. Brenner, y L. I. Gordon. 1991. «Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea». *Limnology and Oceanography* 36 (3): 424-32.
- Labasque, T., C. Chaumery, A. Aminot, y G. Kergoat. 2004. «Spectrophotometric Winkler determination of dissolved oxygen: re-examination of critical factors and reliability». *Marine Chemistry* 88 (1-2): 53-60.
- Marbà, N., y C.M. Duarte. 1998. «Rhizome elongation and seagrass clonal growth». *Marine Ecology Progress Series* 174 (noviembre): 269-80.
- Marbà, N., C. M. Duarte, M. Holmer, R. Martínez, G. Basterretxea, A. Orfila, A. Jordi, y J.Tintoré. 2002. «Effectiveness of protection of seagrass (*Posidonia oceanica*) populations in Cabrera National Park (Spain)». *Environmental Conservation* 29 (04).
- Marbà, N., C. M. Duarte, S. Agustí, M. L. Calleja, E. Díaz-Almela, R. Santiago, y Y. R. Martínez. 2006. «Progresión de prederas de *Posidonia oceanica* y calidad ambiental en el parque nacional del archipiélago de Cabrera: Causas y magnitud».
- Marty, J. C., J. Chiavérini, M. D. Pizay, y B. Avril. 2002. «Seasonal and interannual dynamics of nutrients and phytoplankton pigments in the western Mediterranean Sea at the DYFAMED

- time-series station (1991–1999)». *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 49 (11): 1965-85.
- Mateo, M. A., y J. Romero. 1997. «Detritus dynamics in the seagrass *Posidonia oceanica*: elements for an ecosystem carbon and nutrient budget». *Marine Ecology Progress Series Mar Ecol Prog Ser*. Vol. 151.
- Milazzo, M., F. Badalamenti, G. Ceccherelli, y R. Chemello. 2004. «Boat anchoring on *Posidonia oceanica* beds in a marine protected area (Italy, western Mediterranean): effect of anchor types in different anchoring stages». *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, n.º 299: 51-62.
- Millot, C. 1999. «Circulation in the Western Mediterranean Sea». *Journal of Marine Systems* 20 (1-4): 423-42.
- Mills, M. M., C. Ridame, M. Davey, J. La Roche, y R. J. Geider. 2004. «Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic». *Nature* 429 (6989): 292-94.
- Molenaar, H., A. Meinesz, y G. Caye. 1993. «Vegetative Reproduction in *Posidonia oceanica*. Survival and Development in Different Morphological Types of Transplanted Cuttings». *Botanica Marina* 36 (6): 481-88.
- Montefalcone, M. 2009. «Ecosystem health assessment using the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: A review». *Ecological Indicators* 9 (4): 595-604.
- Orth, R. J., T. J. B. Carruthers, W. C. Dennison, C. M. Duarte, J. W. Fourqurean, K. L. Heck, A. R. Hughes, et al. 2006. «A Global Crisis for Seagrass Ecosystems». *BioScience* 56 (12): 987-96.
- Pedersen, M. F., C. M. Duarte, y J. Cebrián. 1997. «Rate of changes in organic matter and nutrient stocks during seagrass *Cymodocea nodosa* colonization and stand development». *Marine Ecology Progress Series* 159 (noviembre): 29-36.
- Pergent, G., J. Romero, C. Pergent-Martini, M. A. Mateo, y C. F. Boudouresque. 1994. «Primary production, stocks and fluxes in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*». *Marine Ecology Progress Series*. Inter-Research Science Center.
- Pirc, H. 1985. «Growth Dynamics in *Posidonia oceanica* (L.) Delile.» *Marine Ecology* 6 (2): 141-65.
- Romero, J., K. S. Lee, M. Pérez, y M. A. Mateo. 2006. *Nutrient dynamics in seagrass ecosystems*. Springer.
- Thingstad, T. F., U. L. Zweifel, y F. Rassoulzadegan. 1998. «P limitation of heterotrophic bacteria and

- phytoplankton in the northwest Mediterranean». *Limnology and Oceanography* 43 (1): 88-94.
- Thornber, J. P. 1975. «Chlorophyll-Proteins: Light-Harvesting and Reaction Center Components of Plants». *Annual Review of Plant Physiology* 26 (1): 127-58.
- Uku, J., M. Björk, B. Bergman, y B. Díez. 2007. «Characterization and comparison of prokaryotic epiphytes associated with three east african seagrasses». *Journal of Phycology* 43 (4): 768-79.
- Vohník, M., O. Borovec, I. Župan, D. Vondrášek, M. Petrtýl, y R. Sudová. 2015. «Anatomically and morphologically unique dark septate endophytic association in the roots of the Mediterranean endemic seagrass *Posidonia oceanica*». *Mycorrhiza* 25 (8): 663-72.
- Waycott, M., C. M. Duarte, T. J. B. Carruthers, R. J. Orth, W. C. Dennison, S. Olyarnik, A. Calladine, et al. 2009. «Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (30):
- Winkler, L. W. 1888. «Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes». *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 21 (2): 2843-54.
- Wintermans, J. F. G. M., y A. De Mots. 1965. «Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics including Photosynthesis* 109 (2): 448-53.