



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Variabilidad espacial de la biomasa y estructura
de las comunidades epífitas en las hojas de
Posidonia oceanica

Elisa Díaz García

Grado en Biología

Año académico 2014-15

DNI de l'alumne: 43462174V

Trabajo tutelado por Nona Sheila Agawin Romualdo
Departamento de Ecología



Se autoriza a la Universidad la inclusión de mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras claves del trabajo:

Posidonia oceanica, epífitos, fijación de nitrógeno, cianobacterias, epifluorescencia.

Índice

	<i>Páginas</i>
Resumen	4
Abreviaturas	4
Introducción	5-10
Objetivos	10
Material y métodos	11-13
Descripción de la zona	11
Técnica de reducción de acetileno	11-12
Longitud hojas y peso de epífitos	13
Microscopía	13
Análisis estadístico	14
Resultados	15-22
Longitud y biomasa de las hojas de <i>Posidonia oceanica</i>	15
Disposición de los epífitos en <i>Posidonia oceanica</i>	15-18
Tasa de fijación de nitrógeno	18-19
Microscopía	19-21
Fauna epífita	22
Discusión	23-26
Bibliografía	27-32

Abstract

The biological nitrogen fixation rate (BNF) of the epiphytes on the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves were determined in February 2013 and July 2013 in Alcanada (Majorca, Spain). Additionally, three other stations along the Majorcan coastline (Albufera, Arenal and Cala Nova) were sampled in July 2013. The acetylene reduction assay (ARA) technique was used to determine *in situ* N₂ fixation rates for whole shoots of *P. oceanica*. The biomass of the epiphytes on different leaf ages (or segments) and the the number of known cyanobacteria N₂ fixers on the leaf segments (Nostocales) were also determinate. Positive correlations between epiphyte biomass and BNF (R=0.93), and number of Nostocales colonies per shoot and BNF (R=0.95) were found in this study. Moreover, in the leaves from Alcanada, statistically significant difference (p<0.05) was observed in epiphyte biomass and number of colonies of Nostocales among segments along the leaf and among seasons. Notwithstanding, no significant differences were found in epiphyte biomass among the four stations in July.

Resumen

Las tasas de fijación biológica de nitrógeno (BNF; siglas del inglés Biological Nitrogen Fixation) de los epífitos de las hojas de la pradera de *Posidonia oceanica* (L.) Delile fueron determinadas en febrero 2013 y julio 2013 en Alcanada (Mallorca, España). Adicionalmente, otras tres estaciones a lo largo de la costa mallorquina (Albufera, Arenal y Cala Nova) fueron muestreadas en julio 2013. La técnica de reducción de acetileno (ARA; siglas del inglés Acetylene Reduction Assay) fue usada para determinar *in situ* la tasa de fijación de N₂ de los brotes enteros de *P. oceanica*. La biomasa de los epífitos de hojas de distinta edad (o segmento) y el número de cianobacterias fijadoras de N₂ conocidas (Nostocales) también fueron determinados. Se obtuvo una correlación positiva entre la carga epífita y la BNF (R=0.93), y entre el número de colonias de Nostocales por brote y la BNF (R=0.95). Además, en las hojas de Alcanada fueron observadas diferencias significativas (p<0.05) en la carga epífita y el número de colonias de Nostocales entre segmentos a lo largo de la hoja y entre estaciones. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la biomasa epífita existente en las cuatro estaciones en julio.

Abreviaturas

ARA: Acetylene reduction assay; BNF: Fijación biológica de nitrógeno; P: *Posidonia*; PA: *Posidonia* acetileno; PPN: Producción primaria neta.

Introducción

Las praderas de fanerógamas marinas se encuentran entre los ecosistemas marinos más importantes, contribuyendo de manera significativa a la productividad en las zonas costeras poco profundas tanto en aguas tropicales como templadas (Pergent et al., 1994; Cambridge & Hocking, 1997).

En el mar Mediterráneo la endémica *Posidonia oceanica* (L.) Delile es la fanerógama marina más extendida (Den Hartog, 1970), formando amplias y densas praderas que llegan a ocupar desde la superficie hasta los 45 m de profundidad (Procaccini et al., 2003). *P. oceanica* es una especie de vida larga, cuyos rizomas son estructuras que pueden alcanzar hasta los 20 años de edad (Marba et al., 2002) 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.

Este tipo de ecosistema es uno de los más productivos del globo (Boudouresque and Meinesz, 1982) y además cumple un papel ecológico esencial: estabiliza los sedimentos, abastece una gran red alimentaria y proporciona refugio a un significativo número de especies actuando como centro de biodiversidad (Borowitzka & Lethbridge, 1990; Orth et al., 2006).

No obstante, las fanerógamas marinas son particularmente sensibles a la eutrofización de las aguas (Orth et al., 2006), y en vista de la eutrofización actual su declive se ha convertido en un asunto global. Actualmente, las praderas de *P. oceanica* están protegidas a nivel europeo como hábitat prioritario (Dir. 92/42 CEE 21/05/92 and 97/62/CE 27/10/1997) y como especie (Convención de Berna, Anexo 1). Las praderas de *P. oceanica* también están protegidas a nivel nacional (RD 7/12/1995, BOE nº310).

Los factores antropogénicos que contribuyen al declive de las praderas de fanerógamas marinas incluyen perturbaciones biológicas debidas a la introducción de especies invasoras, enfermedades, entradas de nutrientes, blooms de algas, pesca comercial y acuicultura (Orth et al., 2006). Por ello, a nivel autonómico las estructuras de acuicultura sobre las praderas están prohibidas en Baleares desde 1993 de igual manera que el arrastre de fondo (Díaz-Almela & Duarte, 2008). Estas perturbaciones en un plano físico conllevan pérdidas y cambios en los sedimentos. Los factores anteriores junto con el calentamiento global son considerados los principales causantes de la disminución del área de las praderas (Orth et al., 2006).

Sin embargo, los epífitos de las hojas de las fanerógamas marinas reflejan mucho más rápido los cambios en las condiciones de disponibilidad de nutrientes. Tras las perturbaciones se observan incrementos en la biomasa epífita, cambios en la composición de especies y en su

heterogeneidad espacial (Borum, 1985; Short et al., 1995; Piazzì et al., 2004). Lo que los convierte en indicadores altamente sensibles a las perturbaciones naturales y antropogénicas (Ruiz et al., 2001, Richardson, 2006).

El que reaccionen más rápido que su hospedador al incremento de nutrientes se debe a que los componentes de la epiflora se encuentran más limitados nutricionalmente que la *P. oceanica* ya que tienen una mayor demanda de nutrientes, es decir una menor ratio C/N/P (Pedersen & Borum, 1997). A su vez también tienen menos posibilidades de hacer frente al agotamiento de nutrientes porque a diferencia de su hospedador, sólo tienen acceso a los nutrientes presentes en la columna de agua. Por último, las algas epífitas son demasiado finas para almacenar grandes reservas de nutrientes, y esas reservas son de uso limitado ya que el periodo de vida de los epífitos está limitado a 50-200 días por la renovación de las hojas de *P. oceanica* (Duarte & Chiscano, 1999).

Un aumento en la biomasa epífita puede tener consecuencias dramáticas para el hospedador porque reduce la cantidad de luz que llega a la planta (Short, 1987; Drake et al., 2003) y dificulta el intercambio de gas y nutrientes de las hojas del hospedador (Silberstein *et al.*, 1986). Por lo que, entender la respuesta de los epífitos a alteraciones ambientales es crucial para evitar impactos prácticamente irreversibles a nivel del ecosistema completo; ya que por lo general *P. oceanica* en zonas no alteradas por la influencia del hombre mantiene una compleja comunidad de epífitos que siguen un modelo de sucesión típico de colonización de la lámina de la hoja (Boudouresque et al., 2006). La biomasa epífita aumenta de la base hacia el ápice, zona más antigua de la hoja, y en general la biomasa epífita presenta los valores superiores en las hojas más viejas, es decir las láminas más externas (Cebrián et al., 1999).

El modelo de colonización secuencial observado en las hojas de *P. oceanica* mantiene una comunidad epífita multiestratificada (Van der Ben, 1971). La primera capa de macroepífitos la forman las algas incrustantes, tanto coralinas (Corallinaceae) como pardas: con *Myrionema orbiculare* J. Agardh como especie característica de la epiflora de *P. oceanica*. Esta capa se completa posteriormente con animales sésiles, como: monocapas del briozoo *Electra posidoniae* (Gautier) o hidrozoos como *Aglaophenia harpago* Schenck; es característico encontrar algas fotófilas marrones como *Cladosiphon* spp. y *Giraudya sphaclarioides* Derbès et Solier (Van der Ben, 1971). La comunidad epífita de verano representa el último estadio del desarrollo estacional y está dominado por algas coralinas incrustantes y especies de macroalgas oportunistas (Ballesteros, 1987; Romero, 1988). Generalmente a finales de verano aparecen algas rojas filamentosas pudiendo llegar a constituir el mayor número de especies en ese periodo; sin embargo, son muy finas y pequeñas y representan una proporción de biomasa y cobertura reducida (Van der Ben, 1971). Las diatomeas y otros microorganismos (foraminíferos,

cianobacterias) se presentan tanto como epífitos pioneros como secundarios (Mazzella & Russo, 1989).

En la epiflora, la luz juega un papel importante restringiendo la dispersión en el espacio y tiempo de las algas pardas epífitas, pues por su carácter fotófilo el rango de profundidades a las que puede vivir es más limitado que el de las algas incrustantes coralinas (Van der Ben, 1971; Dalla Via et al. 1998), éstas al ser rodofíceas presentan un rango de absorción mayor y pueden colonizar casi la totalidad de la hoja de *P. oceanica* a cualquier profundidad de la pradera (Dalla Via et al., 1998; Cebrián et al., 1999). En cambio, las algas epífitas pardas normalmente se encuentran en el ápice de las hojas de *P. oceanica* o en hojas expuestas a suficiente luz (Dalla Via et al., 1998). En esas zonas las algas pardas pueden sobrepasar en crecimiento a los animales y algas incrustantes coralinas ya que su tasa de crecimiento es de alrededor de un orden de magnitud mayor (Cebrián et al., 1999).

La comunidad epífita animal se suele disponer en la sección media y basal de la lámina, esto se debe a que está influida por el rápido crecimiento de las algas en el sustrato, siendo los briozoos e hidrozoos menos capaces de competir por el espacio; el movimiento de las hojas por las corrientes también es un factor fundamental (Trautman & Borowitzka, 1999). En el caso de los briozoos su distribución se ve influida por la flexibilidad del sustrato, lo que depende de la posición a lo largo de la hoja (mayor flexibilidad en el ápice) y de la rigidez de los zoarios. Especies poco flexibles, con zooides calcáreos típicamente incrustantes, como *Fenestrulina joannae* (Calvet) se dispondrán en zonas menos flexibles de la hoja que especies con zooides ligeramente calcificados como *Electra posidoniae* (Casola et al.; 1987).

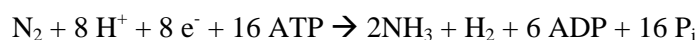
La estructura de la comunidad epífita de *P. oceanica* variará en función de la profundidad, zona de la pradera y segmento del brote en sí (Van der Ben, 1971). En resumen, la comunidad epífita se encuentra compuesta tanto por organismos autótrofos como heterótrofos, cada uno con diferentes requisitos ambientales por lo que se desarrollan en zonas distintas de la hoja y la cobertura difiere a lo largo del ciclo anual de *P. oceanica* (Casola et al., 1987).

De media, las algas incrustantes rojas son las que mayor proporción de biomasa epífita representan, seguidas de las algas pardas. Mucho menos abundantes (< 3%) son los briozoos e hidrozoos (Ballesteros, 1987; Cebrián, 1999). Aunque las cianobacterias no representen una proporción significativa del total de biomasa epífita, son imprescindibles para *P. oceanica* por su capacidad de fijar nitrógeno.

A diferencia de sus antecesores terrestres, las angiospermas marinas presentan estrategias de conservación de sus nutrientes pobremente desarrolladas y sólo una ínfima parte de los nutrientes presentes en las hojas senescentes son reabsorbidos antes de la abscisión (Stapel &

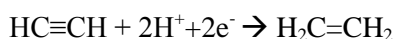
Hemminga, 1997). Debido a ello, la fijación de nitrógeno llevada a cabo por las cianobacterias epífitas, tanto de los rizomas como de las hojas, es de suma importancia dentro de las praderas marinas, pudiendo contribuir hasta al 50% de los requerimientos de nitrógeno de las fanerógamas marinas (Herbert, 1999).

La habilidad de fijar nitrógeno molecular es exclusiva de los procariotas. La base para la fijación de nitrógeno es la nitrogenasa, un complejo de dos enzimas, la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa, las dos enzimas contienen hierro y la dinitrogenasa reductasa también contiene molibdeno. Este complejo catalítico redox se ve inhibido por la presencia de O₂. La nitrogenasa reduce nitrógeno molecular a amonio, con la simultánea reducción de protones a hidrógeno. El triple enlace es extremadamente estable y tiene una elevada energía de activación, haciendo que la fijación de nitrógeno sea un proceso caro con una demanda teórica de 16 moles de ATP por mol de N₂ fijado (Postgate, 1987).



La nitrogenasa es poco específica por lo que también reduce compuestos análogos con triples enlaces (Capone, 1988). Por ejemplo, la nitrogenasa tiene una afinidad mayor por el acetileno que por el N₂, pero en la naturaleza la proporción de nitrógeno es mucho mayor que la de acetileno, gas que se encuentra en cantidades traza (Whithy et al., 1978).

Esta no-especificidad ha sido explotada para desarrollar la técnica de reducción de acetileno (ARA; siglas del inglés Acetylene Reduction Assay), usada de manera rutinaria para determinar las tasas de fijación de nitrógeno. La técnica ARA consiste en inyectar acetileno en un área aislada dónde haya indicios de organismos fijadores de nitrógeno; éstos empiezan a producir etileno, calculándose posteriormente la eficacia de la actividad nitrogenasa (Hardy et al, 1968).



La técnica es ampliamente utilizada para medir la fijación de N₂ en muchos tipos de ecosistemas, entre ellos las praderas de fanerógamas marinas (Capone, 1983). Se han descubierto asociadas a las hojas de las praderas marinas una gran variedad de bacterias fijadoras de nitrógeno como las filamentosas con heterocistes (*Anabaena* spp., *Nodularia* spp., *Calothrix* spp.), filamentosas sin heterocistes (*Lyngbya* spp. y *Oscillatoria* spp.) y algunas unicelulares (*Gloeocapsa* spp.) (Hamisi et al., 2004; Uku et al., 2007).

Las cianobacterias con heterocistes, como *Nodularia* spp., son hasta tres veces más eficientes en la fijación de N₂ que las bacterias sin heterocistes (Charpy et al, 2007); además son las más evolucionadas apareciendo a finales del Precámbrico (Golubic & Seong-Joo, 1999). Una de las

funciones del heterociste es evitar que el O₂, altamente tóxico debido a su carácter oxidoreductor, entre en contacto directo con la nitrogenasa, por lo que mantienen siempre una presión parcial de O₂ muy baja en su interior (Haselkorn, 1978).

Como mecanismo para mantener una concentración de O₂ suficientemente baja, los heterocistes, células vegetativas modificadas, tienen una pared reforzada con doble capa, una exterior homogénea y otra interior laminada (Haselkorn, 1978). También se ayudan consumiendo O₂ y obteniendo energía de la oxidación de azúcares provenientes de células adyacentes a través de microplasmodesmos (Winkenbach & Wolk, 1973). En cambio, la fijación de N₂ para las cianobacterias sin heterocistes requiere de una separación temporal respecto a la fotosíntesis, dándose de noche. También son necesarios mecanismos que eviten la acumulación de O₂ en la célula, lo cual requiere un gasto extra de energía (Stal & Krunbein, 1987).

Por último, las cianobacterias presentan una pigmentación característica, usada para determinar su presencia en las hojas (Bryant et al, 1979). Contienen, aparte de clorofila a, tres tipos de ficobiliproteínas, heteroproteínas con grupos protéticos tetrapirrólicos lineares, asociadas al fotosistema II de su aparato fotosintético en la membrana tilacoidal (Wehrmeyer, 1983). Poseer pigmentos accesorios les confiere beneficios ecológicos, permitiendo que ocupen nichos ecológicos no frecuentados por otros organismos (Grossman et al, 1993).

Las ficobiliproteínas presentes en las cianobacterias son: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina. La ficocianina y la aloficocianina son características, casi exclusivamente, de las cianobacterias en ecosistemas acuáticos marinos (Bryant et al, 1979). En cambio, la ficoeritrina es también característica de las algas rojas (Cole & Sheath, 1990). Las rodofíceas y las cianofíceas son organismos presentes en las hojas de *Posidonia oceanica*, pero las cianobacterias se caracterizan por tener mayor proporción de ficocianina y aloficocianina que de ficoeritrina (Rivas, 2012). Por el contrario las rodofíceas tienen mayor proporción de ficoeritrina y difieren en otros aspectos en cuanto a la composición de pigmentos (Cole & Sheath, 1990).

Debido a su distinta autofluorescencia, al excitar la muestra durante la microscopía de epifluorescencia se pueden identificar y diferenciar ambos organismos. La aloficocianina, ficobiliproteína más simple, absorbe a la longitud de onda menos energética de las tres con un pico de intensidad a 650 nm (Cole & Sheath, 1990). La ficocianina tiene dos picos de absorción uno a 550 nm y otro de mayor intensidad a 615 nm. La ficoeritrina es la ficobiliproteína más compleja y tiene dos picos de absorción, uno de 560-570 nm y otro de 495-500 nm (Cole & Sheath, 1990), este último pico es el de mayor intensidad.

Objetivos

El objetivo de este estudio fue comprobar en Alcanada la disposición de la biomasa epífita de *Posidonia oceanica* a lo largo de sus hojas y determinar si se presentan las diferencias previamente explicadas a lo largo de la hoja y entre estaciones (invierno, verano). El estudio posterior se centró en la disposición de las colonias de cianobacterias, a lo largo de las hojas más antiguas, durante las dos estaciones; con la observación de las muestras obtenidas bajo el microscopio de epifluorescencia. El estudio se centró en la disposición de las cianobacterias puesto que es un tema novedoso; siendo Hamasi et al. (2004) los primeros en informar de la existencia de una composición y abundancia estacional en las especies de cianobacterias, dentro de las praderas de fanerógamas marinas, sujetas a diferentes condiciones ambientales en la costa de Tanzania. Los recuentos obtenidos fueron relacionados con la fijación de nitrógeno calculada *in situ* antes de la recolección de las muestras con el fin de observar si existía una correlación. Además, se procedió a analizar las diferencias en longitud y biomasa de hojas y biomasa de epífitos entre distintos puntos de la costa mallorquina, con el objetivo de entender y comparar la evolución de las praderas de *Posidonia oceanica* en territorios cercanos geográficamente.

Materiales y Métodos

Descripción de la zona

Durante la realización del experimento se analizaron hojas de *Posidonia oceanica* de cuatro zonas de la costa mallorquina (Albufera, Alcanada, Arenal y Cala Nova), centrándose en la zona de Alcanada. La recolección de las muestras se llevó a cabo durante julio del 2013 y en la zona de Alcanada también en febrero 2013.

El agua de la zona de Alcanada (latitud: 39° 50' 04.9''N, longitud: 3° 09' 56.4''E) presentó en febrero y julio las siguientes condiciones: temperatura mínima 12°C y 22.7°C respectivamente, y temperatura máxima 14°C y 24.3°C respectivamente. Otros parámetros medidos (Tabla 1) en ambos meses fueron el oxígeno y cantidad de nutrientes disueltos, la salinidad y la productividad primaria neta (NPP).

	Salinidad (g·L ⁻¹)	O ₂ (mg·L ⁻¹)	NH ₄ (μM)	NO ₃ (μM)	N _{total} (μM)	P _{total} (μM)	NPP (mmole·cm ⁻² ·d ⁻¹)
Febrero	35.939	8.536	0.986	0.49	9.54	0.83	44.12314386
Julio	38	4.87	<0.66	<0,44	8.39	<0.76	120.6393715

Tabla 1. Comparación de diversos parámetros medidos en el momento de la realización del experimento en la zona de estudio de Alcanada.

El agua de la zona de la Albufera (latitud: 39° 49' 57.2''N, longitud: 3° 08' 35.4''E) presentó en julio las siguientes condiciones: temperatura mínima 23.4°C y temperatura máxima 24.2°C. Otros parámetros medidos fueron la salinidad: 38 g/L y la concentración de oxígeno disuelto 4.88 mg/L. El agua de la zona del Arenal (latitud: 39° 29' 55.2''N, longitud: 2° 44' 45.5''E) presentó en julio las siguientes condiciones: temperatura mínima 26.9°C, y temperatura máxima 28.3°C. Otros parámetros medidos fueron la salinidad: 37.7 g/L y la concentración de oxígeno disuelto 1.99 mg/L. El agua de la zona de Cala Nova (latitud: 39° 33' 02.1''N, longitud: 2° 36' 03.3''E) presentó en julio las siguientes condiciones: temperatura mínima 26.9°C, y temperatura máxima 28.3°C. Otros parámetros medidos fueron la salinidad: 37.7 g/L y la concentración de oxígeno disuelto 1.94 mg/L.

Técnica de reducción de acetileno (in situ)

La técnica ARA (Acetylene Reduction Assay) *in situ* consistió en situar en el fondo marino de la pradera de *Posidonia oceanica* cámaras de metacrilato durante 24h para medir el funcionamiento de la nitrogenasa a través de la producción de etileno por las plantas. Se

situaron tres cámaras (PA; *Posidonia acetileno*) a las que se les aplicó el tratamiento ARA (PA1, PA2 y PA3) y dos cámaras (P; *Posidonia*) control (P1, P2). Dichas cámaras constan de dos partes:

1. Un cilindro transparente de metacrilato de 14.4 cm de diámetro y 49 cm de altura, el volumen que contienen es de 7.89 L. Todas las cámaras constan de dos agujeros sellados con goma uno en la parte superior del cilindro de metacrilato (en la tapa) y que presenta unas varillas de metal que sirven para remover suavemente el agua y repartir uniformemente el acetileno inyectado al comienzo de cada experimento. Y otro en un lateral del cilindro al que se aplica un tubo de goma con una pinza para tomar la muestra de etileno con jeringas de plástico de 50 ml.
2. La base, con forma de anillo y de plástico PVC (siglas del inglés Polyvinyl chloride), se insertó en el sustrato de la pradera acotando varios brotes de *Posidonia oceanica*. Su función fue estabilizar la campana en el fondo marino y prevenir la difusión del gas a través de la capa superior del sedimento.

Al principio del experimento ≈ 1.6 L de acetileno saturado FSW (agua de mar filtrada), fueron inyectados en las cámaras a través del agujero para conseguir una concentración final de $\approx 20\%$ (v/v) de acetileno en el agua de mar contenida, el agua se removió con las varillas durante dos minutos para equilibrar la concentración de gas en la cámara. Las muestras se recogieron cada 3h. Durante cada periodo de muestreo el agua se removió durante 2 min antes de recoger 20 mL de muestra usando una jeringa de 50mL. En tierra, 10 mL de muestra de cada cámara fueron transferidos a tubos de Hungate que contenían 1.25 mL de solución TCA 20% (ácido tricloroacético) con el fin de parar la actividad bacteriana e inmediatamente fueron sellados con pegamento adhesivo termofusible (SALKI, ref. 0430308). Los tubos se incubaron 24h a 35°C, para equilibrar la concentración de gas en dos fases dentro del tubo (gas y líquido). Se tomaron muestras de gas (2.5 mL) usando una jeringa estanca a los gases del espacio de cabeza “headspace” de los tubos experimentales para la determinación de etileno y acetileno.

La cantidad de etileno y acetileno fue determinada en el laboratorio usando un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies, model HP-5890) equipado con un detector de ionización de llama (FID).

Después de las 24 h de incubación, los brotes de *P. oceanica* del interior de las cámara (P1, P2, PA1, PA2, PA3) fueron separados de la planta y guardados en el laboratorio a 4°C hasta su siguiente manipulación.

Longitud hojas y peso de epífitos

La longitud y anchura de todas las hojas de las cámaras ARA (PA1, PA2, PA3) y de las cámaras de control (P1, P2) de las cuatro zonas para julio más las cámaras de febrero en Alcanada (ntotal=1505) fue medida. Posteriormente, las hojas de los brotes de las cámaras ARA de todas las zonas, excepto 3 brotes de Alcanada, fueron raspadas con un bisturí para obtener el peso seco de los epífitos y de las hojas. Ambas partes se introdujeron en la estufa a aproximadamente 60°C hasta conseguir un peso constante.

Tres brotes de cada una de las cámaras ARA de Alcanada (febrero y julio) fueron seleccionados para dividir sus hojas en segmentos de 5 cm. De dos de los brotes, cada segmento fue raspado individualmente, la masa de epífitos extraída de cada segmento fue depositada en un eppendorf diferente e introducida en la estufa a 60°C hasta peso constante.

Las dos hojas más externas del tercer brote (febrero y julio) fueron divididas también en segmentos de 5cm, cada uno de ellos raspado individualmente. La masa resultante de cada segmento se dividió en dos eppendorfs; la mitad de los eppendorfs fueron introducidos en la estufa a 60°C hasta peso constante. La otra mitad después de la introducción de 1 mL del agente fijador formaldehído 4% se guardó en oscuridad a 4°C a la espera de realizar la observación al microscopio (n=75).

Microscopía

En la observación de cada una de las muestras (n=75) bajo el microscopio óptico de epifluorescencia (Leica DM 2500M) 80µl de la muestra guardada en formaldehído 4% fueron pipeteados en un portaobjetos de cristal. Durante la toma de fotografías y recuento de Nostocales se usaron dos filtros del microscopio óptico de epifluorescencia: los filtros I3 (excitación a 450-490nm) y Y3 (excitación a 505-590nm) para la visualización de la autofluorescencia de los pigmentos propios de las cianobacterias (clorofila a y ficobilinas). Infrecuentemente las muestras fueron observadas con luz normal de microscopía óptica. Los aumentos usados para la visualización de la muestra y obtención de las fotografías fueron x400, x630 y en menor medida x1000. La identificación morfológica se realizó conforme a la base de datos de Komárek, J. & Hauer T (2004).

Análisis estadístico

Todos los datos presentados en este trabajo están sujetos a análisis de normalidad e igualdad de varianza (Shapiro-Wilk y Barlett, respectivamente). Si se cumplieron los supuestos anteriores se comparó los resultados entre tratamientos con un test paramétrico (t de Student, ANOVA una vía), de lo contrario se usó un test no paramétrico (U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis). Si hubo diferencias significativas ($p < 0.05$), los tratamientos fueron separados por pares y analizados usando el test de Duncan ($p < 0.05$). El programa utilizado para el análisis estadístico y representación gráfica fue GraphPad 6.

Resultados

Longitud y biomasa de las hojas de Posidonia oceanica.

Tras medir la longitud de las hojas de *Posidonia oceanica* de los distintos cores (P1, P2, PA1, PA2, PA3) se observa una mayor longitud de las hojas ($p < 0.05$) en verano ($n=284$) que en invierno ($n=372$) en la zona de Alcanada (Tabla 2). Con el estudio en julio de brotes procedentes de cámaras “cores” de diversas zonas de la costa mallorquina (Tabla 2) se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre la longitud de las hojas de Alcanada y las de la Albufera ($n=237$) y Cala Nova ($n=316$), pero no con las del Arenal ($n=296$).

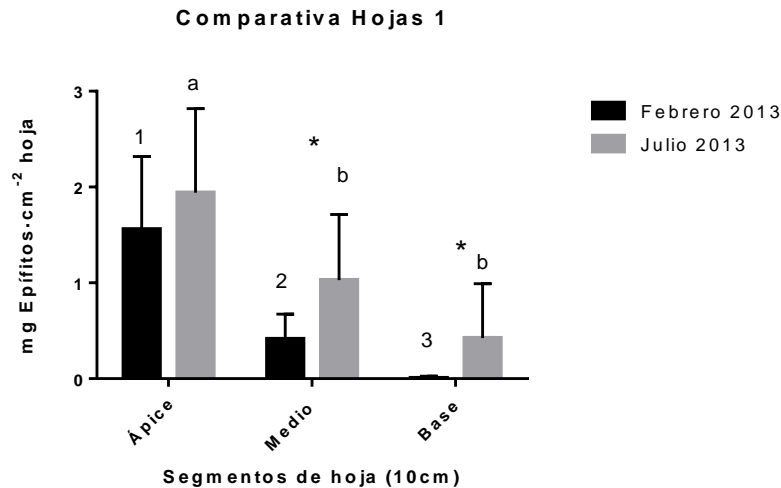
En febrero se obtuvo una biomasa de hojas total de $51.25 \pm 4.68 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ hojas y en julio de $130.94 \pm 51.52 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ hojas al calcular el contenido de las cámaras ($n=3$). Sin obtenerse diferencias significativas entre los meses ($p > 0.05$).

	Longitud de las hojas (cm)	Carga epífita (mg epífitos·cm ⁻² hoja)	Tasa de fijación de N ₂ (μmol N ₂ ·m ⁻² ·dia ⁻¹)
Febrero			
Alcanada	20.94 ± 16.2 (**)	0.3922 ± 0.179 (**)	2.096 ± 2.226 a
Julio			
Alcanada	25.12 ± 12.47a (**)	0.9755 ± 0.500 a (**)	14.55 ± 7.787 a
Albufera	30.06 ± 16.77b	0.664 ± 0.602 a	5.97 ± 3.447 a
Cala Nova	34.16 ± 26b	0.7229 ± 0.064 a	4.12 ± 0.936 a
Arenal	23.4 ± 15.06 a	0.4331 ± 0.072 a	9.230 ± 4.121 a

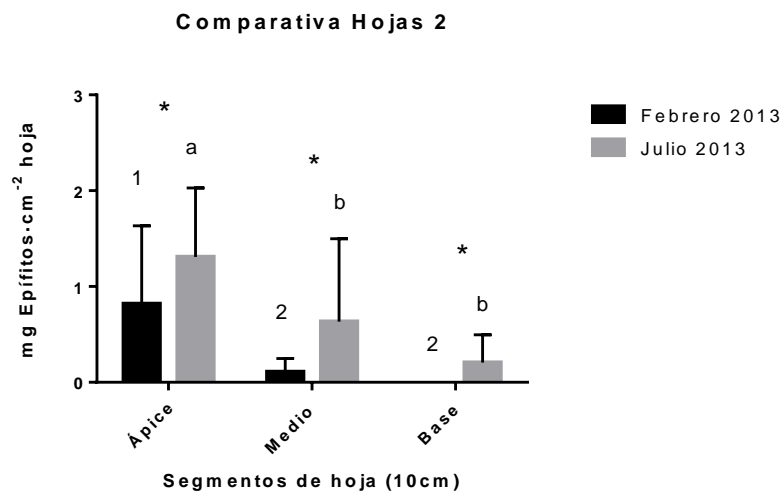
Tabla 2. Comparación de varios parámetros relacionados con las hojas de *Posidonia oceanica* en cuatro lugares de muestreo a lo largo de la costa de Mallorca (media ± SD). (**) Existencia de diferencias significativas entre meses ($P < 0.05$) en Alcanada. Las distintas letras representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre zonas.

Disposición de los epífitos en Posidonia oceanica.

En referencia a la biomasa de epífitos (mg epífitos·cm⁻² hoja), se observa una mayor concentración de masa epífita en el ápice de la hoja al dividir las hojas en segmentos de 10cm, la concentración se va reduciendo al aproximarse a la base. Este hecho ocurre tanto en febrero (Graf. 1 y 2, $n=18$) como en julio (Graf. 1 y 2, $n=16$ en el ápice y medio y $n=12$ en la base).



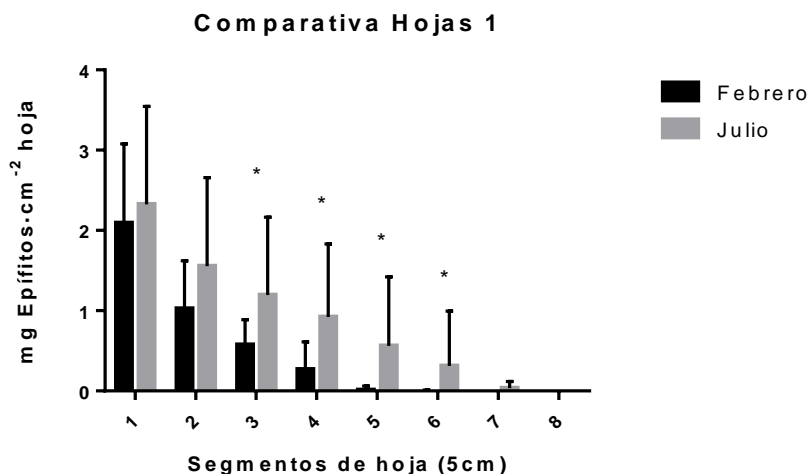
Gráfica 1. Alcanada, comparación en hojas más externas de la carga epífita entre segmentos (10cm) en un mismo mes de muestreo y entre segmentos procedentes de la misma zona de la hoja (ápice, medio, base) en los dos meses de muestreo. Los distintos números (febrero) y letras (julio) representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre segmentos. “*” Representa la existencia de diferencias significativas entre meses en el segmento medio ($p = 0.0013$) y base ($p < 0.0001$).



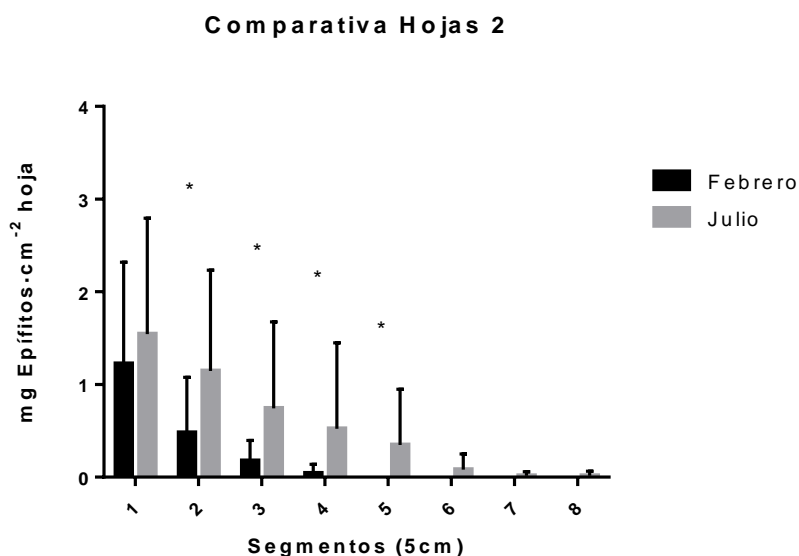
Gráfica 2. Alcanada, comparación en segundas hojas más externas de la carga epífita entre segmentos (10cm) en un mismo mes de muestreo y entre segmentos procedentes de la misma zona de la hoja (ápice, medio, base) en los dos meses de muestreo. Los distintos números (febrero) y letras (julio) representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre segmentos. “*” Representa la existencia de diferencias significativas entre meses en el ápice ($p = 0.318$), medio ($p = 0.0336$) y base ($p = 0.0006$).

Entre invierno y verano también se observan diferencias significativas en la carga epífita, siendo en mayor en los meses de julio que en los de febrero, tanto en hojas más externas (Graf. 1) como en las segundas hojas más externas (Graf. 2).

Al realizar el análisis dividiendo las hojas en segmentos de 5 cm (Graf. 3 y 4) se observa que dicho patrón se conserva con excepción de los segmentos del ápice donde no existen diferencias significativas entre febrero y julio y en la zona de la base donde en ambos casos la carga epífita es muy reducida; en julio inferior a 0.04 mg (segmento 7) en la hoja más externas e inferior a 0.085 mg (segmento 6) en la segunda hoja más externa.

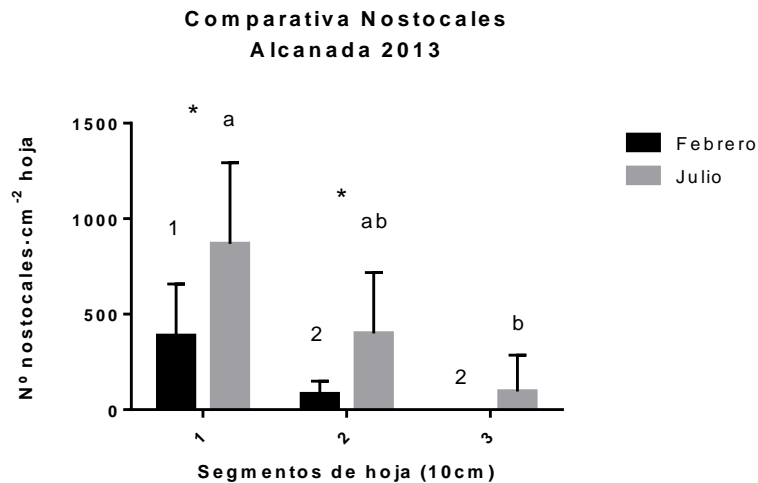


Gráfica 3. Alcanada, comparación en hojas más externas de la carga epífita entre segmentos (5cm) procedentes de la misma zona de la hoja (1 ápice a 8 base) en los dos meses de muestreo. “*” Representa la existencia de diferencias significativas entre meses en los segmentos 3 ($p=0.0251$), 4 ($p=0.021$), 5 ($p=0.0012$), 6 ($p=0.0379$).



Gráfica 4. Alcanada, comparación en las segundas hojas más externas de la carga epífita entre segmentos (5cm) procedentes de la misma zona de la hoja (1 ápice a 8 base) en los dos meses de muestreo. “*” Representa la existencia de diferencias significativas entre meses en los segmentos 2 ($p=0.0441$), 3 ($p=0.0204$), 4 ($p=0.0417$), 5 ($p=0.0278$).

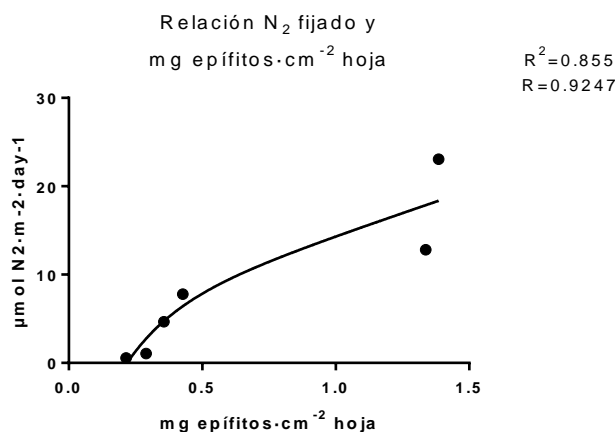
La microscopía de epifluorescencia reveló la existencia de un gradiente en la ubicación en el espacio de los Nostocales (fijadores de nitrógeno) determinados a lo largo de la superficie de la hoja de *P. oceanica* (Graf. 5). Además de la existencia de diferencias significativas en el segmento medio y en el ápice (10cm) entre invierno y verano, habiendo más Nostocales en el mes de Julio (Graf. 7).



Gráfica 5. Alcanada, comparación en hojas más externas del número de colonias de Nostocales entre segmentos (10cm) en un mismo mes de muestreo y entre segmentos procedentes de la misma zona de la hoja (1 ápice, 2 medio, 3 base) en los dos meses de muestreo. Los distintos números (febrero) y letras (julio) representan las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre segmentos. “*” Representa la existencia de diferencias significativas entre meses en el ápice ($p = 0.0417$), medio ($p = 0.026$)

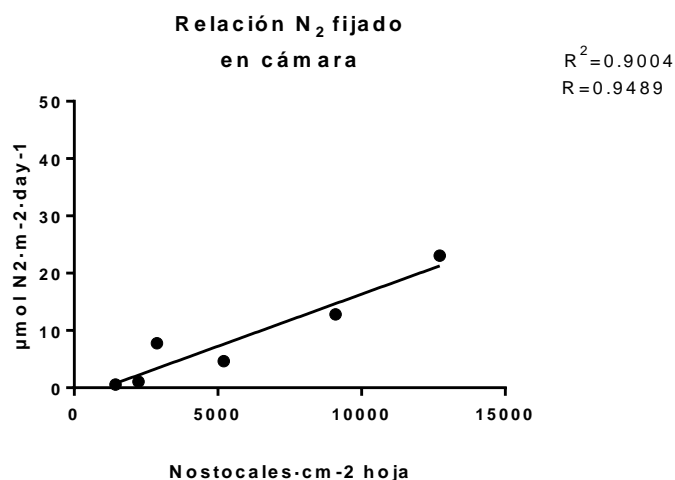
Tasa de fijación de nitrógeno

En base a los datos obtenidos gracias a las cámaras ARA (PA1, PA2, PA3), de febrero y julio en Alcanada, se aprecia una relación exponencial positiva ($R = 0.9247$) entre el peso seco de los epífitos y la fijación de nitrógeno diaria (Graf. 6).



Gráfica 6. Detalle de la regresión no-lineal de la fijación de nitrógeno respecto a la masa de epífitos por área de hoja, se trata de un modelo de asociación exponencial en dos fases). Datos de febrero y julio 2013, Alcanada (PA1, PA2, PA3).

También observamos una relación lineal ($R=0.9489$) entre las cianobacterias Nostocales observadas al microscopio de fluorescencia y fijación de nitrógeno (Graf. 7).



Gráfica 7. Detalle de la regresión lineal de la fijación de nitrógeno en función del recuento de cianobacterias Nostocales realizado. Datos de febrero y julio 2013, Alcanada (PA1, PA2, PA3).

Sin embargo, debido a la reducida muestra de datos ($n=3$) de las cámaras ARA para cada mes no se hallan diferencias significativas ($P=0.0562$) entre febrero y julio en la tasa de fijación de nitrógeno (Tabla 2).

Microscopía

Durante el proceso de observación de las muestras ($n=75$) los filtros de epifluorescencia I3, Y3 y el uso de luz normal de microscopía óptica fueron probados para la determinación de las cianobacterias, obteniendo mejores resultados para la visualización con el filtro Y3 (Imágenes 1-3). Fue usual encontrar agrupaciones de un gran número de colonias en la misma zona (Imagen 2), la mayor parte de las cianobacterias detectadas se descubrieron entre otros epífitos, especialmente sobre rodofíceas incrustantes.

Las cianobacterias del orden de los Nostocales de las que se llevo a cabo del recuento presentaban las siguientes características ($n=10$): Eran colonias de aproximadamente 21.59 ± 4 µm, con entre 11 y 18 células, de un diámetro de 1.9 ± 0.2 µm.

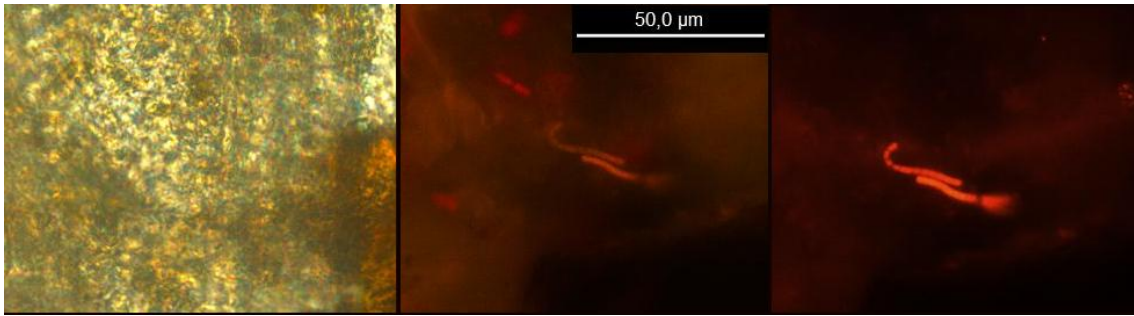


Imagen 1. Mismo campo de la preparación; de izquierda a derecha: a) Luz normal de microscopía óptica. b) Filtro I3. c) Filtro Y3. Se observan dos colonias de aproximadamente $25.5\mu\text{m}$, con 16 células de entre $1.6\text{-}2.1\mu\text{m}$. Muestra del segmento medio de una hoja de julio, Alcanada.

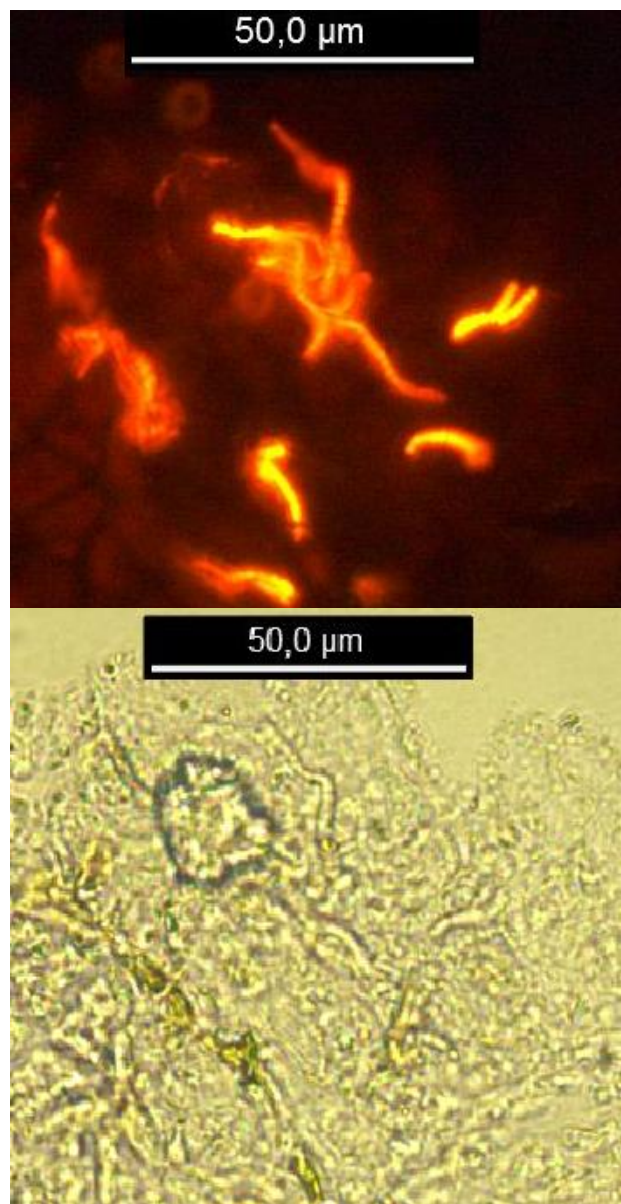


Imagen 2. Mismo campo de la muestra; de arriba a abajo: a) Filtro Y3. b) Luz normal de microscopía óptica. Detalle de la gran carga de cianobacterias epífitas presente en el ápice de las hojas de *P. oceanica* durante el mes de julio, Alcanada.

Además de las cianobacterias tipo collar de perlas de orden de los Nostocales escogidas para el estudio se observaron algunas Nostocales del género *Calothrix* spp. y otras cianobacterias no determinadas (Imagen 3). Todas ellas se observaron en los segmentos del ápice de las muestras de Julio 2013.

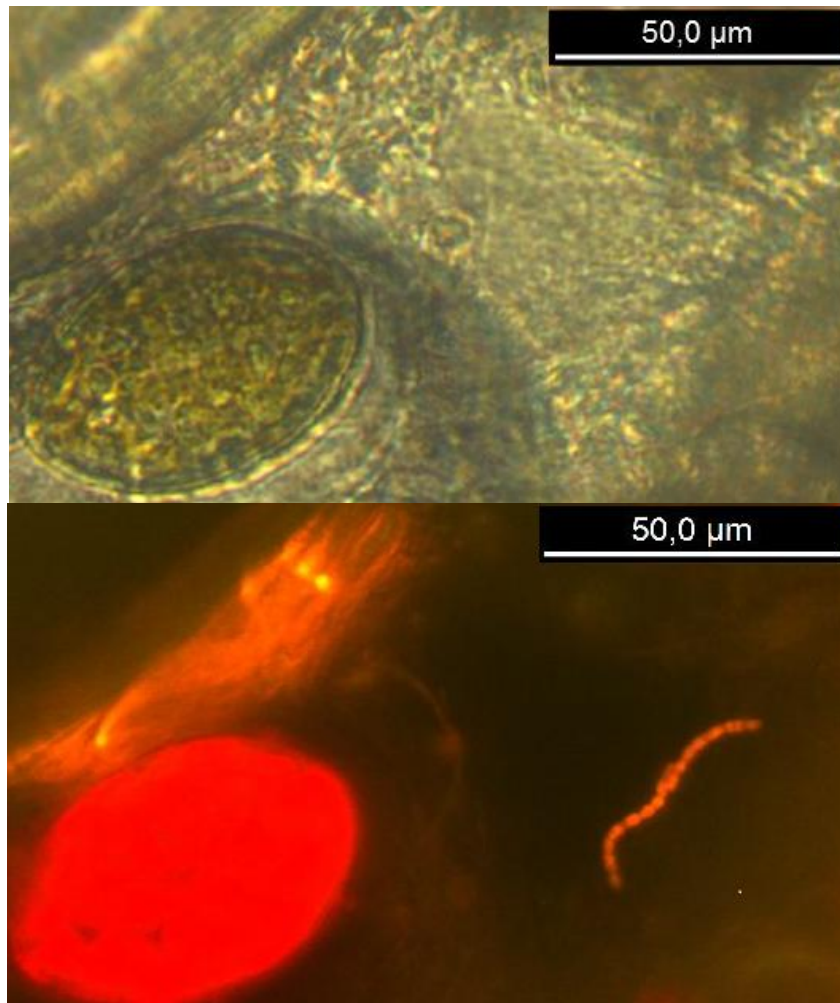


Imagen 3. Mismo campo de la muestra; de arriba a abajo: a) Luz normal de microscopía óptica. b) Filtro I3. A la derecha se observan dos colonias de Nostocales de aproximadamente 24.5 µm y 19 µm de longitud respectivamente. Cada célula mide entre 1.85-2.1 µm. Arriba a la izquierda se observan más cianobacterias de un orden diferente. Muestra del ápice de una hoja de *P. oceanica* de julio, Alcanada.

Fauna epífita

Otro dato interesante, sobre la disposición de los epífitos en las hojas de *P. oceanica*, fue la observación durante el proceso de raspado de una mayor cobertura de zooepífitos (Imagen 4) en la zona basal y media, se observaron briozoos (*Electra posidoniae*), hidrozoos (*Sertularia perpusilla*) y pequeños gasterópodos, estos últimos mayoritariamente en la zona basal y dos poliplacóforos (*Chiton* sp.) también en la zona basal.



Imagen 4. Fotografías realizadas durante la preparación de las muestras para microscopía y peso seco. a) *Chiton* sp. en el segmento basal. b) *Sertularia perpusilla* en el segmento medio. c) *Sertularia perpusilla* en el segmento basal. d) Pequeños gasterópodos en un segmento de 5cm.

Discusión

En el estudio se observa una menor longitud en las hojas de invierno respecto al verano (Tabla 2, $p < 0.05$, $n > 280$). Esto se debe a que durante el invierno se produce el nacimiento de las nuevas hojas de *P. oceanica*, además las tasas de crecimiento en las praderas de fanerógamas exhiben tendencias estacionales, se produce un incremento del crecimiento durante la primavera y el verano; disminuyendo en otoño e invierno (Orth and Moore, 1986; Lee & Dunton, 1996). La temperatura es considerada el factor primario que controla este crecimiento estacional (Lee & Dunton, 1996).

Estudios previos (Ballesteros, 1987) muestran que la biomasa de las hojas es menor en invierno; cabe la posibilidad de que si las hojas hubiesen sido pesadas individualmente se hubiese observado una menor biomasa en hojas en febrero, sin embargo al pesarse por cámara los datos fueron insuficientes ($n=3$) para distinguir una diferencia significativa.

El ciclo anual de las hojas de *P. oceanica* influye en la carga epífita ($\text{mg epífitos} \cdot \text{cm}^{-2}$ hoja) de las hojas (Prado et al., 2007). Se observa (Tabla 2) una carga epífita de más del doble en verano ($0.98 \pm 0.5 \text{ mg DW} \cdot \text{cm}^{-2}$) que en invierno ($0.39 \pm 0.18 \text{ mg DW} \cdot \text{cm}^{-2}$) debido a la renovación de las hojas en esa estación; en cambio en verano la colonización de la hoja lleva meses produciéndose. Asimismo, en invierno las condiciones para la colonización del nuevo sustrato no son favorables debido a las bajas temperaturas, escasa luz e hidrodinámica caracterizada por fuertes corrientes (Short, 1987; Borowitzka & Lethbridge, 1990; Pedersen & Borum, 1996). Por el contrario, en verano las condiciones de luz favorecen crecimiento de la epiflora (Pedersen & Borum, 1996), y según Prado et al. (2007) suele existir menor herbivoría debido a un incremento de los depredadores de *Sarpa salpa* (L.), mayor depredador de los epífitos de *P. oceanica*.

Los valores entre estaciones (Tabla 2) y los valores de la carga epífita al segmentar las hojas (Graf. 1-4) concuerdan con estudios previos (Borum, 1987; Romero, 1988; Cebrián, 1999; El Kalay, 2003). No se observan diferencias en la carga epífita y fijación de nitrógeno entre muestreos de otras zonas de la costa de Mallorca ($n=3$; Tabla 2), sí existen diferencias en el tamaño de las hojas (Tabla 2), los parámetros medidos durante los muestreos (temperatura, oxígeno disuelto y salinidad) no ofrecen suficiente información para permitir la valoración de las causas de las diferencias entre zonas.

P. oceanica presenta una mayor abundancia de epífitos en las hojas más antiguas (más externas), y dentro de una misma hoja en la sección más antigua, el ápice (Van der Ben, 1971; Borum, 1987). En el estudio se observa que en los ápices la colonización es elevada tanto en febrero como en julio, sin la existencia de diferencias significativas, posiblemente por ser la

zona más antigua, primera en colonizarse, y por la existencia de concentraciones de nutrientes más elevadas en febrero que en julio (Tabla 1) durante el estudio. Además, al comparar la hoja más externa y la segunda más externa (Graf 1-2), el patrón de diferenciación por carga epífita a escala de la hoja entera está mejor definido en la hoja más externas (más antigua) que en la segunda hoja más externa.

Este gradiente según la edad se debe claramente a una distribución en el espacio de los organismos epífitos no aleatoria (Cambridge & Hocking, 1997). La competencia por la luz juega un papel importante en la estructuración de la comunidad epífita (Borum, 1987), existen evidencias de que la luz es un factor primario que influencia la colonización por algas y su crecimiento (Borowitzka et al., 1990). Además, el intercambio de nutrientes se ve favorecido en el ápice por el movimiento de las hojas (Harlin, 1975; Fonseca & Kenworthy, 1987; Borowitzka et al., 1990). Esto puede explicar el porqué las algas carnosas son más comunes en las regiones apicales y medias de la hoja, pero raras en la base.

En el estudio se observa menor biomasa epífita en la zona basal que en el ápice (Graf. 1-4); concordando con la consideración de que la fauna epífita, que suele disponerse en la sección basal (Imagen 4), ocupa una proporción menor que las algas en la biomasa total (mg DW.cm^{-2} hoja) de epífitos (Ballesteros, 1987; Cebrián, 1999). La zona basal ofrece a los epífitos invertebrados mayor protección, sobre todo la cara interna. En cambio, la zona superior presenta mayor predación (Mazzella & Russo, 1989) y movimientos tipo latigazos entre las hojas de la *P. oceanica* que pueden ocasionar el desprendimiento de los invertebrados, grupo más laxamente adherido entre los epífitos de las hojas (Trautman & Borowitzka, 1999).

El recuento de cianobacterias señaló diferencias (ápice y segmento medio) en número de cianobacterias Nostocales entre invierno y verano, siendo mayor en verano (Graf. 5). La colonización de la hoja por las cianobacterias se considera un proceso dinámico y secuencial a lo largo del ciclo de la hoja (Uku et al., 2007), en el que las hojas más antiguas (verano) soportan una mayor fijación de nitrógeno (Hamisi et al., 2009). Los datos concuerdan con las tasas de fijación de nitrógeno (Graf. 7), observándose una mayor fijación de nitrógeno en las cámaras ARA en las que se posteriormente mayor número de cianobacterias fue determinado. Las tasas de fijación de nitrógeno calculadas en Alcanada son comparables a las tasas de otras praderas de fanerógamas marinas y cultivos asociados a fijadores de nitrógeno (Moriarty & O'Donohue, 1993).

Respecto a la cantidad de nutrientes en Alcanada, durante el mes de febrero existió una mayor cantidad de nutrientes que en julio (Tabla 1). En otras comparaciones de praderas de fanerógamas marinas se ha detectado que, en aquellas que presentan niveles de nutrientes inorgánicos más elevados, particularmente compuestos de nitrógeno, se documentan menor

número de cianobacterias (Hamisi et al., 2004; Hamisi et al., 2009); estos incrementos en nutrientes pueden disminuir o inhibir la actividad nitrogenasa (fijación de N₂) y la competitividad entre los diazótrofos (Hamisi et al., 2004; Uku et al., 2007; Hamisi et al., 2009), pudiendo ser éste otro factor causante de un menor número de cianobacterias durante el mes de febrero.

Las temperaturas más altas, propias del verano, se relacionan con mayor fijación de nitrógeno por parte de las cianobacterias (Hamisi et al., 2009). Además, las cianobacterias fijadoras de nitrógeno (tanto con heterocistos como sin heterocistos) necesitan luz incidente elevada para mantener el alto coste de la fijación de nitrógeno (Gallon & Stal, 1992), esta condición también es más favorable durante el verano. En la escala espacial de una única hoja, la incidencia de la luz también es mayor en la parte superior de la hoja, lo que concuerda con la mayor detección de Nostocales en la zona del ápice que en la basal en los dos meses de estudio (Graf. 5).

Las imágenes tomadas (Imágenes 1-3) muestran una gran diferencia entre la observación de las muestras con epifluorescencia o con microscopía óptica de campo claro. La microscopía de epifluorescencia es usada con éxito para la detección de cianobacterias en hojas de fanerógamas marinas (Uku, 2007; Hamisi 2013) debido a la autofluorescencia que presentan tanto la clorofila A como las ficobilinas, principalmente ficocianina (y ficoeritrina en menor grado), ubicadas en el interior de las cianobacterias. Las algas rodofíceas son otros epífitos que presentan tanto clorofila A como ficoeritrina. En ocasiones, ello complica la visualización de la muestra con el filtro I3 a causa de su rango de excitación (excitación a 450-490nm). En muchas ocasiones las cianobacterias se encontraron sobre dichas algas dificultando aún más su recuento. De todos modos, la visualización con epifluorescencia se revela como un mejor método para el recuento y observación de las cianobacterias en este estudio.

Aunque durante los últimos años se han realizado estudios acerca de los distintos géneros de cianobacterias que habitan las hojas de fanerógamas marinas, es necesario continuar investigando acerca de las comunidades de cianobacterias que habitan las praderas de *P. oceanica* y otras fanerógamas marinas (como *Zostera marina*, *Cymodocea nodosa* o *Thalassia testudinum*). Con el fin de conocer su dinámica poblacional, a lo largo del ciclo de vida de la hoja, sería conveniente realizar muestreos periódicos (estacionales o mensuales) y combinar la microscopía con el uso de técnicas moleculares.

Como bioindicadores de contaminación, las variaciones en la comunidad de cianobacterias debido a la eutrofización de las aguas y el cambio climático son otros factores a tener en cuenta, ya que las tasas de fijación de nitrógeno podrían verse afectadas a lo largo del tiempo. Por último, sería interesante comprender mejor los patrones de disposición de las cianobacterias en

función de los demás epífitos de las hojas y la propia interacción con *P. oceanica* y así cuantificar con mayor exactitud el flujo de materia y energía que integran al ecosistema marino.

Bibliografia

- Ballesteros, E.** 1987. Estructura i dinàmica del poblament algal de les fulles de *Posidonia oceanica* (L.) Delile als herbeis de Tossa de Mar (Girona). *Butll. Inst. Cat. Hist. Nat.* **54** (Sec. Botànica, 6): 19-30.
- Borowitzka MA, Lethbridge RC, Charlton L.** 1990. Species richness, spatial distribution and colonisation pattern of algal and invertebrate epiphytes on the seagrass *Arnphibobs griffithii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **64**:281-291.
- Borum, J.** 1985. Development of epiphytic communities on eelgrass (*Zostera marina*) along a nutrient gradient in a Danish estuary. *Marine Biology* **87**: 211–218.
- Borum, J.** 1987. Dynamics of epiphyton on eelgrass (*Zostera marina* L.) leaves: Relative roles of algal growth, herbivory, and substratum turnover. *Limnol. Oceanogr.* **32**: 986-992.
- Boudouresque, C.F., Meinesz, A.,** 1982. Decouverte de l'hervier de Posidonie. *Cah. Parc Natl. Port-Cros* **4**: 1–79.
- Boudouresque, C.F., Bernard, G., Bonhomme, P., Charbonnel, E., Diviacco, G., Meinesz, A., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Ruitton, S., Tunesi, L.,** 2006. Préservation et conservation des herbiers à *Posidonia oceanica*, *RaMoGe*. Monaco.
- Bryant, D. A.** 2008. Biogenesis of Phycobiliproteins I. cpcS-I AND cpcU Mutants of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. pcc 7002 define a heterodimeric phycocyanobilin lyase specific for β -phycocyanin and allophycocyanin subunits. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(12), 7503-7512.
- Cambridge M.L., Hocking P.J.** 1997. Annual primary production and nutrient dynamics of the seagrasses *Posidonia sinuosa* and *Posidonia australis* in south-western Australia. *Aquatic Botany* **59**: 277–295.
- Capone, D.G.** 1983. N₂ fixation in seagrass communities. *Mar. Tech. Soc.* **17**:32-37.
- Capone, D. G.** 1988. Benthic nitrogen fixation. Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environment ed, T. H Blackburn & J.Sorensen. John Wiley, Chichester. 88-123.

- Casola, E., M. Scardi, L. Mazzella and E. Fresi.** 1987. Structure of the epiphytic community of *Posidonia oceanica* leaves in a shallow meadow. *P. S. Z.N.I.Mar. Ecol.* **8**: 285-296.
- Cebrián, J., Enríquez, S., Fortes, M., Agawin, N., Vermaat, J. E. & Duarte, C. M.** 1999. Epiphytes accrual on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves: implications for light absorption. *Bot. Mar.* **42**:123–8.
- Charpy, L., Palinska, K. A., Casareto, B., Langlade, M. J., Suzuki, Y., Abed, R. M., & Golubic, S.** 2010. Dinitrogen-fixing cyanobacteria in microbial mats of two shallow coral reef ecosystems. *Microbial ecology*, **59** (1): 174-186.
- Cole, K. M., & Sheath, R. G.** (Eds.). 1990. Biology of the red algae. *Cambridge University Press* 517.
- Dalla Via, J., Sturmbauer, C., Schönweger, G., Sötz, E., Mathekowitsch, S., Stifter, M. & Rieger, R.** 1998. Light gradients and meadow structure in *Posidonia oceanica*: ecomorphological and functional correlates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **163**: 267–278.
- Den Hartog, C.** 1970. The Seagrasses of the World. North Holland Publ., Amsterdam. 275 pp.
- Drake, L. A., Dobbs, F. C. & Zimmerman, R. C.** 2003. Effects of epiphyte load on optical properties and photosynthetic potential of the seagrasses *Thalassia testudinum* Banks ex König and *Zostera marina* L. *Limnol. Oceanogr.* **48**: 456–63.
- Duarte, C.** 1991. Allometric scaling of seagrass form and productivity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **77**: 289-300.
- Duarte, C. M. & Chiscano, C. L.** 1999. Seagrass biomass and production: a reassessment. *Aquat. Bot.* **65**: 159-174.
- Díaz-Almela E., Duarte C.M.** 2008. Management of Natura 2000 habitats. 1120 **Posidonia* beds (Posidonion oceanicae).European Commission.
- El Kalay, K., Frangoulis, C., Goffart, A., Gobert, S., Lepoint, G., Hecq, J.H.** 2003. A model of seasonal dynamics of biomass and production of the seagrass *Posidonia oceanica* in the Bay of Calvi (Northwestern Mediterranean). *Ecol. Modell.* **167**: 1-18.

- Fonseca M.S., Kenworthy W.J.** 1987. Effect of current on photosynthesis and distribution of seagrasses. *Aquat. Bot.* **27**: 59-78.
- Gallon, J. & Stal, L.** 1992. N₂ fixation in non-heterocystous cyanobacteria: an overview. In Carpenter, E. [Ed.] *Marine Pelagic Cyanobacteria: Trichodesmium and Other Diazotrophs*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. 115-139.
- Golubic, S., & Seong-Joo, L.** 1999. Early cyanobacteria fossil record: preservation, palaeoenvironments and identification. *European Journal of Phycology* cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, **70** (2): 153-226.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G., & Collier, J. L.** 1993. Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *Journal of bacteriology*, **175**(3): 575.
- Hamisi M.I., Lyimo T.J., Muruke M.H.S.** 2004. Cyanobacterial occurrence and diversity in seagrass meadows in coastal Tanzania. Western Indian Ocean *J Mar Sci* **3**: 113–122.
- Hamisi, M.I., Lyimo, T.J., Muruke, M.H.S., and Bergman, B.** 2009. Nitrogen fixation by epiphytic and epibenthic diazotrophs associated with seagrass meadows along the Tanzanian coast, Western Indian Ocean. *Aquat Microb Ecol* **57**: 33-42.
- Hamisi M, Díez B, Lyimo T, Ininbergs K, Bergman B.** 2013. Epiphytic cyanobacteria of the seagrass *Cymodocea rotundata*: Diversity, diel nifH expression and nitrogenase activity. *Environ Microbiol Rep* **5** (3): 367-376.
- Hardy, R.W.F. Holsten, R.D. & Jackson, E.K.** 1968. The Acetylene-Ethylene Assay for N₂ fixation: Laboratory and Field Evaluation. *Plant Physiol.* **43**: 1185-1207.
- Harlin M.M.** 1975. Epiphyte-host relations in seagrass communities. *Aquat. Bot.* **1**:125-131.
- Haselkorn, R.** 1978. Heterocysts. *Annual Review of Plant Physiology*, **29** (1): 319-344.
- Herbert, R.** 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 563–90.

- Komárek, J. & Hauer T.** 2004. *CyanoDB. CZ—on-line database of cyanobacterial genera*: <http://www.cyanodb.cz>.
- Lee, K.-S., Dunton, K.H.** 1996. Production and carbon reserve dynamics of the seagrass *Thalassia testudinum* in Corpus Christi Bay, Texas, USA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **143**: 201–210.
- Marba, N., Duarte, C.M., Holmer, M., Martínez, R., Basterretxea, G., Orfila, A., Jordi, A., Tintore, J.** 2002. Effectiveness of protection of seagrass (*Posidonia oceanica*) populations in Cabrera National Park. *Environ. Conserv.* **29**: 509-518.
- Mazzella, L., Russo, G.F.** 1989. Grazing effect of two gibbula species (mollusca, archaeogastropoda) on the epiphytic community of *Posidonia oceanica* leaves. *Aquat. Bot.* **35**: 357-373.
- Moriarty, D. & O'Donohue, M.** 1993. Nitrogen fixation in seagrass communities during summer in the Gulf of Carpentaria, Australia. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* **44**: 117–25.
- Orth, R.J., Moore, K.A.** 1986. Seasonal and year-to-year variations in the growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) in the lower Chesapeake Bay. *Aquat. Bot.* **24**: 335-341.
- Orth, R.J., T.J.B. Carruthers, W.C. Dennison, C.M. Duarte, J.W. Fourqurean, K.L. Heck, A.R. Hughes, G.A. Kendrick, W.J. Kenworthy, S. Olyarnik, F.T. Short, M. Waycott and S.L. Williams.** 2006. A global crisis for seagrass ecosystems. *Biosci.* **56**: 987-996.
- Pedersen M.F., Borum J.** 1996. Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **142**: 261-272.
- Pedersen, M. F. & Borum, J.** 1997. Nutrient control of estuarine macroalgae: growth strategy and the balance between nitrogen requirements and uptake. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **161**: 155-63.
- Pergent G., Romero J., Pergent-Martini C., Mateo M.A., Boudouresque C.F.** 1994. Primary production, stocks and fluxes in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. Marine Ecology Progress Series, 106, 139–146.

- Piazzì, L., Balata, D., Cinelli, F., Benedetti-Cecchi, L.** 2004. Patterns of spatial variability in epiphytes of *Posidonia oceanica*. Differences between a disturbed and two references locations. *Aquatic Botany* **79**: 345-356.
- Postgate, J. R.** 1987. Nitrogen fixation. Studies in Biology. Edward Arnold, London.
- Prado, P., Alcoverro, T., Martínez-Crego, B.A., Vergés, A., Pérez-Llorens, J.L., Romero, J.** 2007. Macrograzers strongly influence patterns of epiphytic assemblages in seagrass meadows. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **350**: 130-143.
- Procaccini, G., Buia, M.C., Gambi, M.C., Perez, M., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Romero, J.** 2003. The seagrasses of the western Mediterranean. In: Green, E.P., Short, F. (Eds.), Word Atlas of the Seagrasses, UNEP World Conservation monitoring Centre. University of California Press, Berkeley, USA, pp. 48–58.
- Richardson, S.L.** 2006. Response of epiphytic foraminiferal communities to natural eutrophication in seagrass habitats of Man O'War Cay, Belize. *Mar. Ecol.* **27**: 404-416.
- Rivas, L. M.** 2012. Purificación y estudio de la estabilidad termodinámica de la proteína antena ficocianina. *Laboratorios de Biomateriales y Enzimología: Facultad de Ciencias, UdelaR* 52.
- Romero, J.** 1988. Epífitos de las hojas de *Posidonia oceanica*: variaciones estacionales y batimétricas de biomasa en la pradera de las islas Medes (Girona). *Oecol. Aquat.* **9**: 19-25.
- Ruiz, J.M., Pérez, M., Romero, J.** 2001. Effects of fish farm loadings on seagrass (*Posidonia oceanica*) distribution, growth and photosynthesis. *Mar. Pollut. Bull.* **49**: 749-760.
- Short F.T.** 1987. Introduction to 'Environmental impacts on seagrass' *Aquat. Bot.* **27**: 1-2.
- Short, F.T., Burdick, D.M., Kaldy, J.E.** 1995. Mesocosm experiments quantify the effects of eutrophication on eelgrass, *Zostera marina*. *Limnology and Oceanography* **40**: 740-749.

- Silberstein, K., A.W. Chiffings and A. J. McComb.** 1986. The loss of seagrass in Cockburn Sound, Western Australia. III The effect of epiphytes on productivity of *P. australis* Hook. F. *Aquat. Bot.* **24**: 355-371.
- Stal, L. J., & Krumbein, W. E.** 1987. Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous, non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria sp.* *Archives of microbiology*, **149** (1): 76-80.
- Stapel, J. & Hemminga, M. A.** 1997. Nutrient resorption from seagrass leaves. *Mar. Biol.* **128**: 197-206.
- Trautman, D.A., Borowitzka, M.A.** 1999. The distribution of the epiphytic organisms on *Posidonia australis* and *P. sinuosa*, two seagrasses with differing leaf morphology. *Marine Ecology Progress Series* **179**: 215-229
- Uku J, Björk M, Bergman B, Díez B.** 2007. Characterization and comparison of prokaryotic epiphytes associated with three East African seagrasses. *J Phycol* **43**: 768–779
- Van der Ben, D.** 1971. Les épiphytes des feuilles de *Posidonia oceanica* Delile sur les côtes françaises de la Méditerranée. Mémoire de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique **168**: 16–85.
- Wehrmeyer, W.** 1983. Phycobiliproteins and phycobiliprotein organization in the photosynthetic apparatus of cyanobacteria, red algae, and cryptophytes. In *Proteins and Nucleic Acids in Plant Systematics* 143-167. Springer Berlin Heidelberg.
- Whithy, R.A. & Altwicker, E.R.** 1978. Acetylene in the atmosphere: Source, representative ambient concentration and ratio to other hydrocarbons. *Atmospheric Environment*, **12**: 1289-1296.
- Winkenbach, F., & Wolk, C. P.** (1973). Activities of enzymes of the oxidative and the reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga. *Plant physiology*, **52** (5): 480-483