

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**ESTANDARIZACIÓN DE CULTIVOS PARA LA DESCRIPCIÓN E  
IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOARIOS DE VIDA LIBRE EN  
ESTUDIOS ECOLÓGICOS.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Karen Elena Bracale de Freitas**, como requisito parcial para optar por el título de **Licenciada en Biología**.

Tutor: Dr. Roschman González

Caracas – Venezuela

**Diciembre - 2016**



### ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el consejo de la Escuela de Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Bachiller Karen Elena Bracale de Freitas, C.I. V-19.482.450, titulado "ESTANDARIZACIÓN DE CULTIVOS PARA LA DESCRIPCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOARIOS DE VIDA LIBRE EN ESTUDIOS ECOLÓGICOS", nos hemos reunido hoy 1 de Diciembre del 2016, en la sala "Jesús María Pacheco" del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de DIECINUEVE (19) puntos. Certificamos así que este Trabajo especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la universidad Central de Venezuela para optar para el título de Licenciada en Biología.

Ernesto González  
(Jurado)

Leidy Herrera  
(Jurado)

Roschman González  
(Tutor)

## **Dedicatoria**

---

A **Dios**, por ser mi roca, mi fe y mi fuerza.

A mis **Padres**, por creer y por confiar en mí.

Por darlo todo, por su paciencia y su apoyo.

Por ser el pilar fundamental de mi vida.

Porque a ustedes debo todos mis logros.

**LOS AMO.**

A mis **Familiares y Amigos**, por apoyarme.

Por siempre estar cuando más los necesito.

Por tanto amor y tanto cariño.

Al **Esfuerzo** y la **Constancia**.

**A la vida.**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A **Dios**, porque todo lo haces posible, por abrirme los caminos, por darme la voluntad de seguir adelante y la fuerza para iniciar y terminar esta extraordinaria etapa de mi vida.

A mis **Padres**. La verdad es que las palabras faltan y los motivos sobran. Ustedes son mi razón de ser, la fuerza para continuar y las ganas de seguir luchando. A ustedes debo mi vida y lo que soy. Gracias por apoyarme en cada etapa y por todo el amor que me han brindado. Gracias por haberme formado para ser una persona de bien, un ser de luz y de amor.

A mi **Familia**, mis raíces y mi pilar. Ustedes me han enseñado la belleza y el amor que se esconde detrás de la palabra Hogar. Desde que me fui, los he extrañado cada día de mi vida y no hay lugar en el mundo donde prefiera estar que con ustedes. Gracias por tanto apoyo, por su amor y por ser mi familia.

A mi **Tutor**, el Dr. Roschman Antonio Gonzalez. Gracias por enseñarme, tanto de ciencia como de la vida. Gracias porque más que un profesor eres un amigo invaluable. Gracias por preocuparte constantemente de mi formación, por darme alas y estar para sostenerme cuando caía. Gracias por el tiempo, la dedicación y el cariño que me has brindado a lo largo de todos estos años que llevamos trabajando juntos.

A mis **Jurados**. Al Dr. Ernesto González, gracias por tu ayuda, por tus consejos y por ser un profesor excepcional. A la Dr. Leidi Herrera, una sorpresa maravillosa que llego al final de mi formación para terminarme de pulir en los detalles, para brindarme comprensión y apoyo.

A la mejor de las compañías, **Mi Negro**. Porque estuviste siempre cuando más te necesitaba, me apoyaste y creíste en mí, aun cuando yo misma no lo hice.

A la Familia **Capitillo-Castro**, por abrirme las puertas de su casa y aceptar a esta intrusa como una más de la familia. Por tanto amor y por tanto cariño.

Y finalmente a mis **Amigos**, porque ustedes son la familia que Dios me permitió conocer y elegir. Porque son parte importante y fundamental de mi vida. Porque esta etapa se ha hecho más bonita y agradable es por su presencia. Gracias por SER y ESTAR.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

---

<b>Contenido</b>	<b>Paginas</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	31
3. OBJETIVOS.....	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.1. Selección y preparación de medios de cultivos.....	35
4.2. Evaluación de la Viabilidad Variando Condiciones Físicoquímicas.....	37
4.3. Descripción e identificación de microeucariotas de vida libre mediante el uso de técnicas de microscopía.....	40
4.4. Cultivos Estandarizados en Estudios de Comunidades de Sistemas Naturales Abiertos.....	41
4.5. Análisis Cuantitativo de los Datos.....	41
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Fase I. Selección de la Composición General del Medio.....	44
5.2. Fase II. Viabilidad del Medio bajo Condiciones Físicoquímicas Establecidas.....	49
5.3. Fase III. Identificación y Clasificación de Protozoarios de Vida Mediante el Uso de Técnicas de Microscopía.....	57
5.4. Fase IV. Cultivos Estandarizados en Estudios de Comunidades de Sistemas Naturales Abiertos.....	80
6. DISCUSIÓN.....	84
7. CONCLUSIÓN.....	106
8. BIBLIOGRAFÍA.....	108

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figuras</b>	<b>Descripción</b>
Figura 1	Árbol de la vida
Figura 2	Diferencias entre cilios y flagelos
Figura 3	Estructura general de un protozooario
Figura 4	Esquema de la secuencia experimental a seguir
Figura 5	Esquema de la composición de medios de cultivos. Fase experimental 1
Figura 6	Esquema de las condiciones fisicoquímicas de estudio de la fase experimental 2
Figura 7	Montaje de una muestra biológica para su observación directa por microscopía de luz.
Figura 8	Esquema de la secuencia de montaje de muestras biológicas para su observación por microscopia electrónica de barrido en condición de bajo vacío.
Figura 9	Concentración general de protozoarios de vida libre durante el tiempo de experimentación en los 6 medios de cultivos en la Fase Experimental 1.
Figura 10	Concentración por grupo morfológico de protozoarios durante el tiempo de experimentación en los 6 medios de cultivos experimentales de la Fase Experimental 1.
Figura 11	Variación promedio de los valores de pH en los 6 medios de cultivos experimentales de la Fase Experimental 1.
Figura 12	Concentración promedio al final del tiempo de experimentación, en los 6 medios de cultivos experimentales de la Fase Experimental 1.
Figura 13	Cinética general de crecimiento en el medio seleccionado bajo dos condiciones de áreas diferentes (cilindro – ortoedro)

- Figura 14 Cinética general del crecimiento de protozoarios de vida libre por grupo morfológico de acuerdo a las dos áreas de estudio (cilindro y ortoedro)
- Figura 15 Cinética general del crecimiento de protozoarios de vida libre en función de la relación pH –Temperatura.
- Figura 16 Cinética general del crecimiento de protozoarios de vida libre por grupo morfológico de acuerdo a las variables de estudios (pH y Temperatura).
- Figura 17 Índice de diversidad de Shannon Wiener aplicado por gremios de clasificación durante el las 4 semanas de experimentación
- Figura 18 Índice de Equidad de Pielou aplicado por gremios de clasificación durante el las 4 semanas de experimentación
- Figura 19 Índice de Riqueza de Margalef aplicado por gremios de clasificación durante el las 4 semanas de experimentación
- Figura 20 Fotografía del gremio Diatomeas Penadas.
- Figura 21 Fotografía de un grupo de biflagelados filtradores del gremio Cryptophyta.
- Figura 22 Fotografía de un grupo de biflagelados filtradores del gremio Bodonida.
- Figura 23 Fotografía de un grupo de biflagelados filtradores del gremio Euglenida.
- Figura 24 Fotografía de un grupo de ciliados aplanados del gremio Hypotrichia.
- Figura 25 Fotografía de un ciliado aplanado del gremio Stichotrichia.
- Figura 26 Fotografía de un ciliado con forma de barril del gremio Prostomatea.
- Figura 27 Fotografía de un ciliado con forma de campana del gremio Peritrichea.

- Figura 28 Fotografía de un ciliado del gremio Peniculidos.
- Figura 29 Fotografía de un ciliado pequeño del gremio Hymenostomados.
- Figura 30 Fotografía de un ciliado grande del gremio Heterotricheos.
- Figura 31 Fotografía de un grupo de amebas desnudas del gremio Lobopodia
- Figura 32 Fotografía de una ameba desnuda del gremio Filipodia.
- Figura 33 Fotografía de una ameba desnuda del gremio Actinopodia.
- Figura 34 Fotografía de un grupo de amebas testadas del gremio circular
- Figura 35 Fotografía de una ameba testada del gremio oval
- Figura 36 Micrografías de un grupo de diatomeas del gremio Penadas obtenidas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Figura 37 Micrografías de un grupo de diatomeas del gremio Centrales obtenidas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Figura 38 Micrografías de ciliados del gremio Heterotrichea obtenidas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Figura 39 Micrografías de ciliados del gremio Heterotrichea, detalles de los cilios orales y apicales, obtenidas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Figura 40 Micrografías de amebas desnudas del gremio Lobopodia obtenidas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Figura 41 Micrografías de amebas testadas del gremio Teca Circular obtenidas a partir de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Figura 42 Cinética general de concentración por grupo morfológico para el grupo control (A) y el grupo experimental (B), durante las cuatro semanas de experimentación en la fase experimental 4.
- Figura 43 Índice de diversidad de Shannon Wiener, realizado durante el las 4 semanas de experimentación en la fase experimental 4.
- Figura 44 Índice de Equidad de Pielou, realizado durante el las 4 semanas de experimentación en la fase experimental 4.
- Figura 45 Índice de Riqueza de Margalef, realizado durante el las 4 semanas de experimentación en la fase experimental 4.

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>
Tabla 1	Clasificación de los organismos eucariontes de acuerdo a la propuesta de Adl y col. (2005)
Tabla 2	Composición general de los diferentes grupos de medios de cultivo.
Tabla 3	Clasificación y agrupación de los protozoarios de vida libre en grupo morfológico , subgrupo, gremio y Morfotipo para la fase experimental 2.
Tabla 4	Clasificación y agrupación de los protozoarios de vida libre en grupo morfológico , subgrupo, gremio y Morfotipo para la fase experimental 4

## RESUMEN

La investigación y la caracterización de protozoarios de vida libre a menudo requieren un enfoque que difiere notablemente del aplicado en los estudios de metazoarios. De acuerdo con esto, para estudiar y cuantificar a estos microorganismos, se requiere redimensionar el uso de microtécnicas en función de los problemas técnicos y complicaciones que se producen en este tipo de investigaciones. En este sentido, la posibilidad de recrear estos microsistemas naturales en condiciones de laboratorio controladas, permitiría generar nuevos conocimientos que facilitarían la comprensión de estas microcomunidades y ayudaría a mejorar la descripción e identificación de protozoarios de vida libre a través del uso de técnicas de microscopía. Partiendo de las ideas expuestas anteriormente, este trabajo pretende estandarizar medios de cultivos que permitan el estudio eficiente de comunidades de protozoarios de vida libre a través de múltiples técnicas de microscopía. Para ello, se probaron 3 grupos de medios de cultivos de diferente composición: a. Medio con sales fosfatadas. b. Medio con sales fosfatadas enriquecidas con glucosa y c. Medio con sales inorgánicas. Cada uno de los medios fue sembrado con 2ml de agua proveniente de una fitotelmata de jardín (*Bromelia sp*). A partir de estos grupos experimentales de medios de cultivo, se monitoreo la abundancia de protozoarios con microscopía óptica y se determinó cuál de ellos proporcionaba la mayor abundancia de protozoarios de vida libre en condiciones de cultivo *in vitro*. Posteriormente, una vez establecido el medio de cultivo que promueve la mayor abundancia, se procedió a variar las condiciones fisicoquímicas del medio, tales como área, pH y temperatura. De igual forma que en el caso anterior, se monitoreo la abundancia de protozoarios con microscopía óptica, esto permitió determinar cuál de las condiciones de estudio proporcionaba la mayor abundancia de protozoarios de vida libre en condiciones de cultivo *in vitro*. Finalmente, fue tomado una muestra de 5µl del medio de cultivo con mayor abundancia de protozoarios previamente estandarizado y se fijó con 5µl de solución Karnovsky al 25% por 15 min y post-fijada con 5µl de solución Tetraóxido de Osmio al 1% por 15 min. Se tomó una muestra de 5µl de la mezcla, la cual se colocó en una rejilla de cobre cubierta con una película de nitrocelulosa y recubierta con

una película de carbono. Posteriormente se observó en un microscopio electrónico de barrido, marca FEI Quanta 250 FEG en modo de observación de vacío bajo. A partir de lo observado en esta investigación, se establece que los medios de cultivos que presentaron una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la abundancia de protozoarios de vida libre, fueron los medios de cultivo del grupo experimental de sales inorgánicas (C). De igual forma, las condiciones abióticas que favorecieron significativamente ( $P < 0.05$ ) el desarrollo de estos microorganismos fueron las de mayor superficie de intercambio gaseoso, temperatura ambiente y pH fisiológico. Por otra parte, el registro fotográfico y micrográfico obtenido de las observaciones a estos microorganismos, permitieron concluir que el uso de múltiples técnicas y disciplinas como los medios de cultivos y la microscopía óptica y electrónica, permitieron estudiar de forma eficiente los sistemas de comunidades naturales en condiciones de laboratorio, manteniendo las características y la estructura de la comunidad invariantes.

**PALABRAS CLAVES: PROTOZOARIOS, MICROBIOLOGÍA, CULTIVOS, MEDIOS.**

## INTRODUCCIÓN

El hombre, en su incesante desarrollo de conocimiento, estudió la diversidad biológica con la finalidad de comprender y dar sentido a su entorno, clasificándolo y agrupándolo de acuerdo a similitudes y diferencias (Navarro, 1988). Partiendo de esta idea, Aristóteles en el siglo IV A.C., fue uno de los primeros en dividir las múltiples formas de vida; plantas y animales, agrupando a estos últimos en organismos sanguíneos y no sanguíneos.

Posteriormente, con el desarrollo de nuevos instrumentos como el microscopio, la capacidad de observación de nuestro entorno fue redimensionada. Esto avances le permitieron a Antonius Van Leeuwenhoek en el siglo XVII, describir las primeras formas de vida en miniatura a las que llamó animáculos (Aladro, 2006). Un siglo más tarde, los aportes científicos sobre la diversidad biológica fueron enormes, los que condujeron a Carlos Linnaeus a proponer un sistema de organización y clasificación binomial en un área de conocimiento que denominó taxonomía, la cual le permitió identificar alrededor once mil especies (Lazo y col., 2008).

Todos los estudios subsiguientes que describieron la diversidad biológica del planeta, incluyeron de forma relevante el patrón de vida microscópico, lo que permitió inicialmente agrupar a los seres vivos en 3 reinos: Animales, Plantas y Protistas. Posteriormente, Robert Whittaker clasificó a los seres vivos en 5 reinos diferentes, conocidos como Monera, Protista, Fungi, Animalia y Plantae (Curtis y col., 2008).

La intrincada diversidad biológica inherente al mundo microscopio de los seres eucariotas, continuó siendo develada a la luz de los avances científicos y tecnológicos del

siglo XX, lo cual representó una notable contribución en el desarrollo y la aplicación de técnicas y herramientas, las cuales permitieron y favorecieron los estudios e investigaciones científicas de estos grupos (Tinaut y col., s/a).

En función de esto, los resultados que surgieron de la aplicación de estas nuevas técnicas y metodologías, permitieron que se plantearan nuevos postulados en los esquemas y las hipótesis de clasificación de la diversidad de eucariotas, ampliando la concepción de las relaciones ancestro descendientes y las nociones evolutivas, lo que generó cambios de paradigmas en los criterios taxonómicos (Aladro, 2006; Lazo y col., 2008).

De lo anteriormente expuesto, se desprende que la forma de entender las relaciones entre los seres vivos ha cambiado y por lo tanto los modelos de clasificación. Partiendo de esto, las nuevas clasificaciones permitieron una mejor comprensión de la biodiversidad, las cuales incluían categorías superiores a los reinos denominadas imperios, dentro de las cuales la clasificación e historia natural de microorganismos eucariotas fue objeto de múltiples controversias (Cavalier-Smith, 1993).

Sobre la base de las ideas expuestas, se ha venido cuestionando la idea de que los protozoarios sigan conformando un único grupo, poniendo en evidencia la necesidad de no seguir considerándolos como un grupo independiente o monofilético. En este sentido, la evidencia proveniente del uso de las nuevas técnicas (como la biología molecular) revela que a pesar de que comparten múltiples características, no comparten un único ancestro lo que reafirmó la propuesta de que puedan formar un grupo polifilético (Corliss, 1994). Sin embargo, esta hipótesis aún está en discusión, existiendo gran controversia al respecto (Cavalier-Smith, 1998, 2010; Adl y col., 2005, 2012).

Por otra parte, autores como Simpson y Roger (2004) postularon una nueva clasificación (Figura 1), la cual fue validada posteriormente por Keeling (2005) y Adl y col. (2005) lo que representó una idea consensuada de los grupos que se manejan en la actualidad.

A partir de estas nuevas evidencias, surgieron disciplinas como la Protistología Evolutiva, la cual se encarga del estudio de las relaciones de estos organismos, mediante el uso y desarrollo de nuevas técnicas como la biología molecular, la síntesis de proteínas, la secuenciación de ADN y la microscopía electrónica de transmisión, permitiendo esta última la observación en detalle de estos microorganismos a un nivel de resolución mucho mayor (Patterson, 1999).

En concordancia con los aportes expuestos hasta el momento Cavalier-Smith, (2013. p117), resume lo siguiente:

*Las últimas dos décadas han sido testigo de los grandes avances en la clasificación de los eucariotas unicelulares (protistas). Estas clasificaciones han aportado pruebas de las relaciones evolutivas de estos microorganismos y han estado basadas en diferencias ultraestructurales, en los componentes del citoesqueleto y en la secuencia de ADN.*

Finalmente, en la actualidad y por convencionalidad, se sigue utilizando el término “protozoario”; sin embargo, la importancia de reconocerlos como grupos evolutivamente independientes es imperante y se hace la recomendación de suplantarlo por microeucariota.

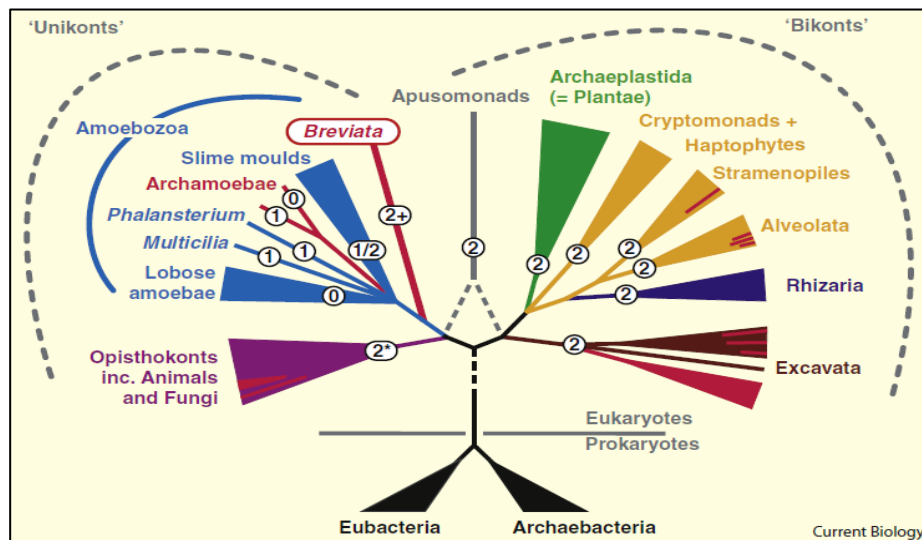


Figura 1. Esquema del árbol de la vida eucariota. Clasificación de los eucariotas delineando seis super grupos: Opisthokonts (morado), Amoebozoa (azul), Archaeplastida (verde), cromalveolados (amarillo), Rhizaria (purpura) y Excavata (marrón). El árbol se muestra de acuerdo con la hipótesis de Unikonta-Bikonta. Clasificación propuesta por Simpson y Roger en el 2004. Tomado de: Simpson y Roger (2008).

### Características Generales de los Protozoarios.

Los protozoarios son considerados un grupo amplio y heterogéneo de microorganismos unicelulares y eucariontes que pueden ser de vida libre o parásitos. Su nombre proviene de *Proto*: Primero y *Zoo*: Animal, por lo tanto, se consideran los primeros organismos en habitar la tierra (Álvarez, 2006).

Entre las principales características de estos microorganismos están:

**Morfología:** Pueden poseer formas muy diversas que dependiendo de la rigidez de la membrana celular que los limita, pueden ser ovaladas, alargadas, esféricas o amorfas, entre otras (Álvarez, 2006).

Pueden tener tamaños muy variados, midiendo desde unas pocas micras pasando por tamaños intermedios como 250-400 $\mu$ m y pudiendo llegar a crecer hasta 1 milímetro aproximadamente (Gallego, 2006).

**Locomoción:** Un aspecto que se encuentra estrechamente relacionado a la morfología de estos microorganismos es su forma de desplazamiento o locomoción. De acuerdo a esto, se pueden clasificar a estos microorganismos en cuatro grupos diferentes según la clasificación de Honigberg y col. (1964):

- **Rizópodos:** Protozoarios que presentan una forma de locomoción a través de pseudópodos los cuales son proyecciones o extensiones de la membrana celular que no solo intervienen en el movimiento sino en la forma de nutrición y alimentación de estos microorganismos (Hickman y col., 2006). Internamente, el citoplasma de las amebas está diferenciado en ectoplasma; el cual es hialino y de apariencia homogénea, y en endoplasma; el cual es fluido y de apariencia granulada que contiene los orgánulos celulares del microorganismo.

Por otra parte, a nivel morfológico, las amebas pueden dividirse en dos categorías, amebas desnudas o amebas testáceas (amebas que pueden estar recubiertas por una teca mineral que recubre la membrana plasmática) (Laybourn-Parry, 1984). De acuerdo a lo antes expuesto, la forma del pseudópodo (según su forma y estructura, el movimiento del microorganismo será diferente) y la presencia o ausencia de la membrana testácea conforman las principales características que se utilizan para la identificación y clasificación de los rizópodos (Anderson, 1988).

En función de esto, la forma de pseudópodos, que se encuentran con mayor frecuencia en la naturaleza, pueden dividirse en:

- Lobopodios: caracterizados por contener tanto ectoplasma como endoplasma, así como una proyección gruesa y roma de la superficie de la célula. Las amebas que

se caracterizan por contener este tipo de pseudópodos se agrupan dentro de la clasificación Lobosea (Anderson, 1988).

- Filopodios: formados únicamente por ectoplasma y se caracterizan por ser una proyección fina y delgada de la superficie de la célula (Gallego, 2006). Las amebas que se caracterizan por contener este tipo de pseudópodos se agrupan dentro de la clasificación Filosea (Anderson, 1988).

Por otra parte, existen otros tipos de pseudópodos menos comunes, como los son:

- Actinopodios o axopodios, los cuales son pseudópodos finos, largos y rígidos.
  - Los lamelipodios, que son prolongaciones anchas y laminares de la membrana celular.
  - Los subpseudópodos, que son pequeños pseudópodos que se originan en la superficie de un pseudópodo mayor, y finalmente, los acantopodios (Hickman y col., 2006).
- Flagelados: Grupo heterogéneo de microorganismos, cuyo mecanismo de locomoción es a través de flagelos, los cuales se presentan como prolongaciones o apéndices móviles alargados (Gallego, 2006). Se puede encontrar amplia diversidad en la forma y número de flagelos. No obstante, en los protozoarios de vida libre es común encontrar organismos uniflagelados y biflagelados.

De forma general, los flagelos tienen forma circular o elíptica con un diámetro de entre 0,15 y 0,3  $\mu\text{m}$  el cual es relativamente constante en su sección transversal. Internamente están constituidos por dos microtúbulos centrales rodeados por un grupo de 9 dupletes de microtúbulos que forman el Axonema (Figura 2.B), el cual se encuentra recubierto por la membrana plasmática. El cuerpo basal o cinetosoma se encuentra en la base del flagelo y forma el centro de organización de los microtúbulos flagelares (Laybourn-Parry, 1984). El patrón de movimiento que describen los organismos flagelados en helicoidal, como se puede observar en la Figura 2.C

- Cilióforos: Este es el grupo más grande y homogéneo de microorganismos descritos hasta la fecha (Corliss, 1979, citado por Laybourn-Parry, 1984). Su forma de locomoción está caracterizada por la presencia de cilios en toda la superficie del cuerpo, los cuales al igual que los flagelos, son prolongaciones o apéndices móviles. Sin embargo, estos son mucho más cortos y numerosos (Figura 2.A).

Tanto los cilios como los flagelo, comparten la misma estructura interna expuesta anteriormente del paquete 9/2 de microtúbulos presente en los flagelos (figura 2.B) (Hickman y col., 2006). No obstante, aun cuando la estructura interna de cilios y flagelos sea la misma, los cilios poseen patrones de movimiento muy diferentes a los flagelos como se observa en la figura 2.C. Estos presentan una secuencia coordinada de movimiento (hacia adelante y hacia atrás), la cual en la actualidad es ampliamente aceptada como el resultado de diferentes fuerzas que actúan sobre el latido autónomo o pulso hidrodinámico de cada cilio (Laybourn-Parry, 1984).

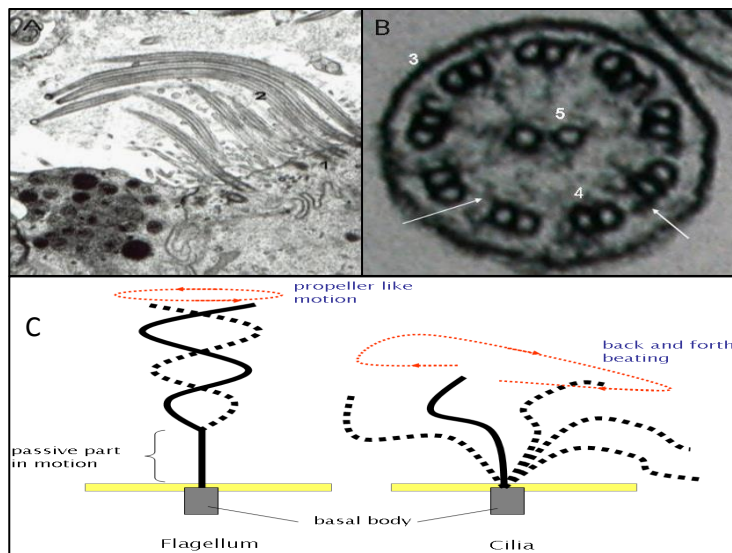


Figura 2. A Corte longitudinal de un grupo de cilios., B. Corte transversal de un flagelo donde se señala 1. Cuerpo basal, 2. axonema ciliar, 3. Membrana celular, 4. Nueve pares de microtúbulos periféricos, 5. Par de túbulos centrales., C. Diferencia en el patrón de movimiento entre flagelos y

cilios. El flagelo realiza un movimiento helicoidal mientras que el cilio realiza movimientos cíclicos y coordinados. Tomado de: 2.A y 2.B. Armengot y col., (2010). 2.C. Kohidai, (2008). Trabajo P.

- Apicomplexos y Esporozoos: Extenso grupo de microorganismos que son exclusivamente endoparásitos de organismos superiores y que a diferencia de todos los demás protozoarios, carecen de estructuras móviles anteriormente descritas, tales como flagelos, cilios o pseudópodos (Laybourn-Parry, 1984).

De forma general, los esporozoos o apicomplexos se caracterizan por presentar un complejo apical, el cual posee tres estructuras distintivas: un conjunto de microtúbulos dispuestos en espiral o conoide, un cuerpo secretor o roptrias y bandas de microtúbulos, también llamadas anillo polar. En conjunto, estas estructuras conforman una adaptación del organismo que le permite la entrada en la célula del huésped, combinando la acción perforadora del conoide con las secreciones químicas de las roptrias (Adl y col., 2012).

Por otra parte, este grupo posee una etapa infecciosa en la que forman quistes de paredes muy gruesas y resistentes, característica que se observa tanto en formas parásitas como de vida libre, lo que les permite soportar condiciones ambientales adversas (Corliss, 2001).

**Formas de Nutrición:** Los protozoarios necesitan una fuente de energía que les permita vivir y la forma en la que estos obtienen dicha energía es lo que permite agruparlos en tres categorías:

Fotoautótrofos; organismos que presentan cloroplastos y que requieren de la radiación solar para que por medio de los procesos de fotosíntesis, esta energía sea transformada en energía química, que se traduce en la producción de carbohidratos a partir de CO<sub>2</sub> y agua.

Fotoheterótrofos: son un grupo pequeño de protozoarios que combinan de forma variable la obtención de energía (fotoautótrofos y heterótrofos). Se considera que estos

protozoarios en presencia de luz obtienen su energía por medio de procesos fotosintéticos, es decir, como autótrofos, mientras que ausencia de luz obtienen su energía como heterótrofos (Laybourn-Parry, 1984).

Heterótrofos: la gran mayoría de los protozoarios de vida libre, son heterótrofos. Algunas especies se alimentan de bacterias, otras de algas unicelulares y finalmente de otros organismos, desde otros protozoarios más pequeños, hasta rotíferos y pequeños crustáceos (Laybourn-Parry, 1984).

En este mismo orden de ideas, los protozoarios utilizan múltiples estrategias o mecanismos que le permitan la asimilación de los alimentos (Anderson, 1988). Dependiendo del grupo la estrategia o los mecanismos de alimentación pueden variar, encontrando entre los principales:

- Absorción o filtración: Protozoarios que se alimentan por filtración de material particulado en suspensión o por absorción de sustancias disueltas, a través de la membrana celular (Anderson, 1988). La forma en la que estas pequeñas partículas y sustancias son absorbidas, es a través de procesos osmotróficos, como la pinocitosis. De igual forma, los procesos de transporte activo a través de la membrana, forman parte de los procesos de absorción de nutrientes (Alvarez, 2006).
- Digestión de partículas grandes: Protozoarios que se alimentan por captura de grandes partículas o de otros microorganismos como bacterias, algas u otros protozoarios, mediante procesos de fagocitosis o por medio de citostomas (Vaerewijck y Houf, 2015). De acuerdo a esto, el citostoma es un orgánulo que asemeja una estructura bucal donde se lleva a cabo la ingesta de alimentos. Posteriormente, el alimento pasa a la vacuola digestiva o fagosoma que al unirse a los lisosomas, se transforma en el fagolisosoma, donde se llevan a cabo los procesos digestivos (Figura 3). Finalmente la eliminación de los residuos o desechos celulares se da a través de un ano celular que recibe el nombre de citopigio o citoprocto (Hickman y col. 2006).

**Osmorregulación y excreción:** Al encontrarse en ambientes acuáticos, los procesos de osmorregulación son esenciales para el mantenimiento de las concentraciones osmóticas intracelulares y por tanto la vida de estos microorganismos (Anderson, 1988). En este sentido, las vacuolas contráctiles son orgánulos osmorreguladores del citoplasma que se encargan de mantener las condiciones isotónicas entre el medio interno y el externo (Gallego, 2006). Estas vacuolas poseen un poro excretor por donde se produce el intercambio de agua con el exterior del cual se observa en detalle en la figura 3 (Hickman y col., 2006).

El ciclo de expansión y contracción de la vacuola requiere de energía y es inversamente proporcional a la fuerza iónica del medio acuoso circundante, es decir, un aumento de la concentración de solutos del medio externo, traerá como consecuencia que la vacuola contráctil sea menos activa, lo que se traduce en menos agua absorbida por la célula.

Adicionalmente, existe una creciente evidencia de que la membrana que rodea a la vacuola también puede utilizar el transporte activo para ajustar la composición iónica de los fluidos en la vacuola (Anderson, 1988).

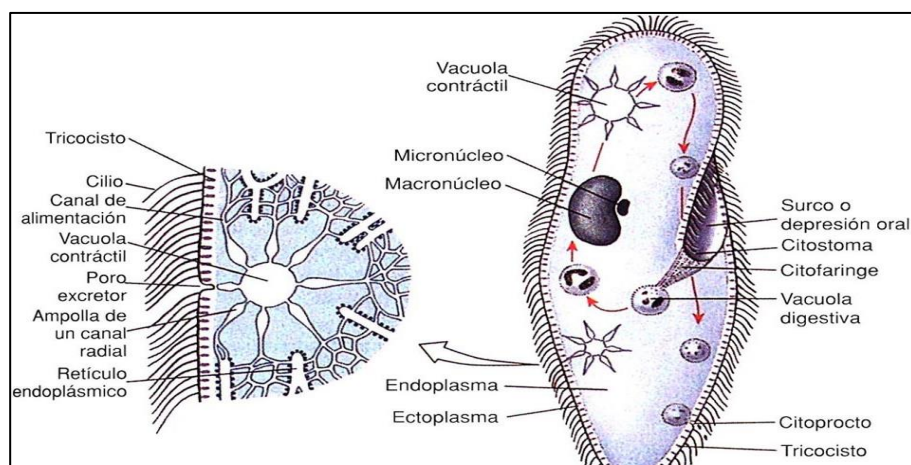


Figura 3: Estructura general de un protozoo donde se observan los principales orgánulos que intervienen en los procesos digestivos y con detalle en el orgánulo osmorregulador en la parte izquierda. Tomado de (Hickman y col., 2006. p. 252).

**Formas de reproducción:** El crecimiento de estas poblaciones de microorganismos va a depender en gran medida de las condiciones del medio en el que se encuentran (Laybourn-Parry, 1984). De forma general, los ciclos de vida en estos microorganismos pueden ser asexuales o sexuales. Dentro del ciclo de vida asexual, existen dos formas principales de reproducción, que son la fisión binaria y la fisión múltiple.

La fisión o escisión binaria, es el tipo de reproducción más común en esta clase de microorganismos y consiste en la autoduplicación por mitosis, con la producción final de dos células hijas idénticas (Hickman y col., 2006). La reproducción por fisión binaria puede variar según el grupo de protozoarios que se esté estudiando; por ejemplo, en los flagelados la fisión binaria es en el plano longitudinal. Sin embargo, en los ciliados la fisión binaria es en un plano transversal (Laybourn-Parry, 1984).

Por otra parte, la fisión o escisión múltiple puede comprender varias escisiones binarias sucesivas que tienen lugar en el interior de una cubierta, como en los esporozoarios o consistir en divisiones repetidas del núcleo, seguidas de la división del citoplasma en tantas partes como núcleos existan, como en el protozoario palúdico.

El otro ciclo de vida presente en estos microorganismos, es el sexual, el cual es muy raro y se puede observar comúnmente en formas parásitas, las cuales alternan sus ciclos de vida con fases asexuales. Las formas de reproducción sexual que se observan en estos microorganismos, se dividen en dos principalmente, que son: La singamia y la conjugación.

La singamia es un tipo de reproducción sexual que implica la fusión de dos gametos. Este tipo de reproducción, a su vez se subdivide en isogamia (gametos iguales) y anisogamia (gametos diferentes) (Laybourn-Parry, 1984). Por otra parte, la conjugación, consiste en la unión momentánea entre individuos, lo que permite el intercambio del material genético (Hickman y col., 2006).

En base a esto, Laybourn-Parry (1984), asegura que las diferentes formas de reproducción sexual presentes en protozoarios, son esencialmente una forma de organización genética que no necesariamente resulta en un aumento de la población.

### **Clasificación de los Eucariotas**

Con el propósito de validar las hipótesis inicialmente planteadas, Cavalier-Smith (2002) realizó nuevas propuestas en torno al origen de los eucariotas, en la que los agrupó en dos grupos de clasificación superior; los Unikontas y los Bikontas. Estos nombres fueron cambiados posteriormente, proponiendo el nombre Amorphea para los Unikontas y Diaphoretickes para los Bikontas.

Por otra parte, Adl y col. (2005, 2012) plantearon una clasificación de los eucariotas bajo la concepción de 6 súper grupos de clasificación, a los cuales llamaron: Archaeplastidos, Cromalveolados, Rhizaria, Excavata, Amebozoa y Opisthokonta, en los cuales se encuentran la gran variedad de organismos eucariontes existentes.

La siguiente clasificación (Tabla 1), está considerada para los altos rangos de clasificación de los eucariotas y está basada a la propuesta de Cavalier-Smith (2002) y Adl y col. (2005).

Tabla 1: Clasificación de los Eucariota desde la concepción de los 6 Súper Grupos (S.G)

Súper Grupos		Subgrupos	Ejemplos
Diaphoretickes	Archaeplastidae	<b>Glaucophyta:</b> Presentan plastos primitivos denominados Cianelas. Las formas móviles presentan dos flagelos.	<i>Glaucozystis</i> , <i>Cyanoptycha</i> , <i>Cianophora</i>
		<b>Rhodophyceae</b> (Algas Rojas): son inmóviles por la carencia o pérdida evolutiva de flagelos. Son fotosintéticas y su pigmento principal son los rodoplastos.	<i>Rhodellophyceae</i> , <i>Florideophyceae</i> .
		<b>Chloroplastida</b> (Algas Verdes): forman dos clados o grupos: Chlorophytas (algas verdes) y Streptophytas (plantas terrestres ó embriophytas).	<i>Charophyta</i> , <i>Chlorophyceae</i> , <i>Mesostigma</i> , <i>Prasinophytae</i>
	Chromalveolados	<b>Cryptophyceae:</b> Algas unicelulares biflageladas, autótrofos o heterótrofos. Presentan invaginación ventral en forma de cripta (lo que les da su nombre).	Cryptomonadales, Goniomonadales
		<b>Haptophyta:</b> Algas unicelulares, biflageladas y fotosintéticas. Poseen orgánulo denominado “Haptonema”, del cual reciben su nombre.	Pavlovophyceae, Prymnesiophyceae
		<b>Heterokontophyta:</b> organismos unicelulares y pluricelulares fotosintéticos, fagotrófos u osmotrófos. Presentan dos flagelos desiguales o heterocontos.	Ochrophyta Pseudofungi Bigyra
		<b>Alveolata:</b> Se caracterizan por presentar alveolos corticales. Pueden ser parásitos, fotosintéticos o heterótrofos de vida libre. La procedencia de los plastos es controversial por su procedencia.	Apicomplexa, Ciliophora, Colpodellida Dinoflagellata Perkinsozoa
	Rhizaria	<b>Cercozoa:</b> grupo diverso que incluye ameboideas y flagelados. Mayoritariamente heterótrofos.	<i>Cercomonadida</i> , <i>Nucleohelea</i> , <i>Phytomyxea</i>
		<b>Foraminifera:</b> formas ameboideas caracterizados por poseer esqueleto o concha que los recubre.	(Subdivisión incierta)
		<b>Radiolaria:</b> formas ameboideas, caracterizados por poseer un esqueleto mineral y presentar axopodios. Principalmente heterótrofos depredadores.	<i>Acantharia</i> , <i>Polycystinea</i> , <i>Sticholonche</i>
	Excavata	<b>Fornicata:</b> flagelados que carecen de mitocondrias. Comensales o parásitos. Presentan surco ventral.	(Carpediemonas, Eopharyngia)
		<b>Malawimonas:</b> biflagelado fagotrófos de vida libre que presentan surco ventral	(Subdivisión incierta)
<b>Jakobida:</b> biflagelado heterótrofo de vida libre que presentan surco ventral.		Histonidae, Jakobidae	
<b>Parabasalia:</b> se caracterizan por poseer		(Cristamonadida,	

<b>Amorphea</b>		excavado, lo que le da el nombre al grupo. Incluye organismos de vida libre, simbioses y parásitos. La mayoría son heterótrofos, sin embargo se conocen formas parasitas y fotosintéticas con presencia de cloroplastos adquiridos por endosimbiosis secundaria de un alga verde, según hipótesis.	un aparato para-basal, lo que les da su nombre. Flagelados, anaerobios y carentes de mitocondrias. No poseen surco ventral <b>Preaxostyla:</b> organismos tetra flagelares, simbioses ó parásitos de animales. Caracterizados por la presencia de Preaxostilo. Carentes de mitocondrias. <b>Heterolobosea:</b> organismos heterótrofos de vida, endobiontes o parásitos. Sin pigmentación. Pueden pasar de formas flagelares, ameboideas y quistes. <b>Euglenozoa:</b> organismos flagelados que mayormente fotosintéticos o fagotróficos de vida libre, con pocos grupos parásitos.	Spirotrichonymphida, Trichomonadida, Trichonymphida, Oxymonadida, Trimastix Acrasidae, Gruberellidae, Vahlkampfiidae Euglenida, Diplonemea, Kinetoplastea
	<b>Amebozoa</b>	Organismos mayoritariamente unicelulares de forma ameboidea que presentan pseudópodos de forma roma, denominados lobopodios. Heterótrofos que se alimentan por fagocitosis, otros pueden ser simbioses o patógenos.	<b>Tubulinea:</b> presentan pseudópodos cilíndricos. Forman la mayoría de amebas que producen testas. Pueden ser desnudas <b>Flabellinea:</b> no presentan testas. Durante su desplazamiento se aplanan tomando forma de disco, moviéndose como un todo <b>Acanthamoebidae:</b> poseen acantopodios, los que le dan su nombre. Potencial parásito de humanos y animales. <b>Entamoebida:</b> carentes de mitocondrias, (según hipótesis) las perdieron por adaptaciones a medios carentes de O <sub>2</sub> . Organismos principalmente endoparásitos. <b>Eumycetozoa:</b> organismos heterótrofos unicelulares que pueden adoptar tres formas diferentes durante su desarrollo.	Leptomyxida, Testacealobosia, Tubulinida Cochliopodium, Thecamoebida, Vanellida - - Dictyostelia, Myxogastria, Protostelia
	<b>Opisthokonta</b>	Organismos unicelulares (coanozoos) y pluricelulares (hongos y animales). Presencia de un único flagelo, en la parte posterior, lo que le da su nombre. En su totalidad heterótrofos (fagotróficos) o parásitos. No se conocen formas fotosintéticas.	<b>Fungi:</b> presentan paredes celulares de quitina. Por lo general de hábitat terrestre. Participan en procesos de descomposición. <b>Mesomycetozoa:</b> pequeño grupo en su mayoría parásitos. Formas de esferas que contienen esporas que posteriormente germinan en formas flageladas o ciliadas. <b>Metazoa:</b> organismos pluricelulares y tisulares en su totalidad. Característicos por la capacidad de locomoción, ausencia de clorofila y desarrollo embrionario.	Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota Aphelidea, Choanomonada Acanthoecidae, Monosigidae, Porifera, Trichoplax, Mesozoa, Animalia

## **Técnicas para el Estudio de Comunidades de Protozoarios.**

La investigación y la caracterización de protozoarios de vida libre a menudo requieren un enfoque que difiere notablemente del aplicado en los estudios de metazoarios. Para poder estudiar y cuantificar a estos microorganismos, se requiere redimensionar el uso de microtécnicas en función de los problemas técnicos y complicaciones que se producen en este tipo de investigaciones (Laybourn-Parry, 1984). Adicionalmente, realizar un estudio de microcomunidades en un sistema natural, representa una gran inversión de recursos.

En el caso de los protozoarios de vida libre, su estudio y observación en sistemas acuáticos o ambientes astáticos a través de un microscopio óptico, muchas veces no llegan a ser suficientes para una buena descripción, identificación y caracterización del sistema. Además, la abundancia de microorganismos tiende a ser baja en estos microambientes (Littleford, 1960), lo que dificulta aún más el estudio.

En este sentido, la aplicación de técnicas y métodos que faciliten el estudio de estos microorganismos de forma eficiente, se hace cada vez más relevante (Ramírez y col., 2000). En función de esto, la posibilidad de recrear estos microsistemas naturales en condiciones de laboratorio controladas, permitirá generar nuevos conocimientos que faciliten la comprensión de estas microcomunidades a un menor costo.

En efecto, la aplicación de técnicas de cultivos, que permitan mantener y conservar las características de microorganismos bacterianos, es ampliamente descrita (Stanbury y col., 1995; en Zamora, 2003; Madigan, Martinko y Parker, 2004). Sin embargo, en el caso de los protozoarios de vida libre, el uso de técnicas de cultivo que permitan su estudio de forma eficiente, es mucho más restringido (Ley de Coss y col., 2011). Es por esto, que las líneas de investigación que se encargan de estudiar el rol de estos microorganismos,

permitieron desarrollar técnicas que faciliten el cultivo de protozoarios en condiciones de laboratorio, fuera de su ambiente natural.

En este sentido, Ley de Coss y col., (2011) reportaron que “es posible mantener una población de protozoarios viables superior a  $10^3$  durante 72 h en un medio de cultivo anaeróbico con diversas fuentes de energía, como harina, arroz, paja, gluten y heno”. De allí pues, que Dehority (1998; en Ley de Coss y col., 2011) expresó en torno a los avances en el uso de técnicas de cultivos que estas “han permitido obtener información de interés respecto a las necesidades nutricionales, los tiempos de desarrollo y crecimiento de estos microorganismos”.

De acuerdo a esto, es pertinente resaltar los aportes de Littleford (1960) quien presentó un método sencillo para el mantenimiento de cultivos de protozoarios de vida libre en aulas de clases. Esta guía presenta las condiciones mínimas en las cuales un investigador puede mantener cultivos de estos microorganismos durante periodos de tiempo relativamente largos.

Para estos efectos, Littleford presentó una serie de condiciones generales que deben considerarse a la hora de montar prácticas de laboratorio en los salones de clases. Dichas condiciones generales son:

1. La temperatura: La cual es un factor muy importante, ya que casi todos los protozoos de vida libre se pueden mantener de forma satisfactoria a temperatura ambiente (entre 18.3-24.7 °C). Variaciones por debajo o por encima de estas temperaturas generaran desviaciones en los promedio de observación.
2. La luz: Esta no es necesaria para la mayoría de los protozoos. Sin embargo, para aquellos organismos fotosintéticos, será indispensable. Por tanto, este es un criterio que puede variar mucho, de acuerdo a los individuos.
3. El pH: Debe acercarse a la neutralidad.

4. La fuente de agua: Como se manipulan las fuentes de agua, si son previamente hervidas o su procedencia.
5. Esterilización del material de vidrio y equipos: Proceso esencial para evitar la contaminación.
6. Tamaño y tipo del material de vidrio: puede ser de varios tipos y fácilmente manipulable. Estos pueden cubrirse con una placa de vidrio para evitar la contaminación.
7. Alimentación: En todos los casos se debe mantener una fuente de alimento para el organismo en cultivo.

De igual forma, múltiples autores (Littleford, 1960; Scorza, 1997; Ling Tan y col., 2005; Ley de Coss y col., 2011) proponen métodos para desarrollar medios de cultivos que permiten el crecimiento de protozoarios de vida libre en condiciones *in vitro*. Estas condiciones, varían según las características de la zona, el clima, y de los microorganismos que se pretendan cultivar.

Es importante destacar la naturaleza de los sistemas de estudios (Marengo, 2000). Partiendo de esto, los medios de cultivo para protozoarios de vida libre forman parte de un sistema, que en su concepto más amplio se entiende como *un conjunto de elementos con una cierta organización, y que interactúan entre sí para cumplir una determinada función.*

Teniendo esto en consideración y sabiendo que al igual que en el medio natural los medios de cultivo de protozoarios intercambian energía con el ambiente, estos pueden ser ubicados dentro de la categoría de sistemas abiertos, lo cual los diferencia de los medios de cultivos convencionales para el crecimiento de microorganismos procariontes y de aquí que no se les puede dar el mismo tratamiento.

Por otra parte, el estudio de comunidades de estos microorganismos requiere un abordaje multidisciplinario, por lo que aplicar el uso de técnicas de microscopía, óptica o electrónica, permitirían la descripción y posterior identificación de protozoarios de vida libre, dando información relevante y de interés que facilite la comprensión de estos microorganismos y la forma en que interactúan con su entorno.

En función de esto, los microscopios de luz y electrónico son análogos, tanto uno como otro permiten amplificar aquellos objetos que son indistinguibles a nuestro ojo. Sin embargo, la diferencia fundamental entre los dos es que en el caso del microscopio electrónico la formación de la imagen se produce por la dispersión de los electrones, los cuales permite obtener una mayor resolución (Prin y col., 2010), mientras que en el óptico la imagen se produce por absorción de los fotones (Ubero, 2008).

En este sentido, el microscopio electrónico de barrido (SEM) permite examinar las superficies de los objetos cuyo tamaño varía desde un virus hasta la cabeza de un animal (Karp, 2009). La imagen que se forma en un SEM, lo hace a partir de los electrones que se reflejan desde la muestra (se dispersan de regreso) o con los electrones secundarios que la muestra emite después de ser golpeada por el rayo electrónico primario (Prin y col., 2010).

Es importante señalar, que el SEM proporciona una profundidad de enfoque notable y que esta propiedad da a las imágenes del microscopio de barrido su calidad tridimensional (Karp, 2009), lo cual es ideal para los estudios de morfo-funcionalidad e identificación de microorganismos presentes en estas microcomunidades. De igual forma, a nivel celular, el SEM permite al observador, apreciar la estructura de la superficie externa de las células y todos los procesos, extensiones y materiales extracelulares diversos que interactúan con el ambiente (Karp, 2009).

En función de la importancia de estos microorganismos en la dinámica de los sistemas naturales y establecidos los cultivos viables de protozoarios de vida libre que recreen las condiciones de sus microambientes naturales, los cuales permiten su eficiente desarrollo, descripción e identificación, se desprende la siguiente hipótesis de trabajo:

**Si** la composición y las variaciones en las condiciones del medio de cultivo modulan el crecimiento y desarrollo viable de protozoarios de vida libre, **entonces** existirá un medio de cultivo cuya composición y condiciones fisicoquímicas serán óptimas para el efectivo desarrollo y crecimiento de estos microorganismos.

## ANTECEDENTES

Los microeucariotas de vida libre, su diversidad biológica y su importancia en los sistemas ecológicos han sido ampliamente estudiados en las últimas décadas. Gracias a estos estudios se ha descrito el importante papel que desempeñan en el funcionamiento de los ecosistemas, en el ciclaje de los nutrientes y en las tramas energéticas.

Uno de los primeros estudios en la descripción de las comunidades de microeucariotas, lo presentó Petz (1997), el cual identificó la microfauna activa (protozoos, metazoos) en el suelo de Wilkes, Antártida Oriental. Petz reportó 26 especies de ciliados y cinco especies testáceas, de los cuales tres fueron registros nuevos. Sus resultados le permitieron presumir que el agua y el contenido de materia orgánica presente en ella, eran parámetros importantes en sus resultados y que otros factores fisicoquímicos como la temperatura del aire y el pH del agua, tuvieron efectos indirectos en la presencia de estos microorganismos.

González y col. (2009) realizaron una evaluación de la contaminación de la presa “Ejército Rebelde”, Ciudad de la Habana, Cuba, mediante el empleo de protozoos como bioindicadores. Para la evaluación de la contaminación en la presa, utilizaron el sistema saprobiótico y a los protozoos como bioindicadores de contaminación por materia orgánica. Se identificó un total de 59 especies de protozoos, donde los ciliados representaron el 74,5 % del total de especies. El índice de saprobiedad ubicó a la presa en la categoría amesosapróbica del sistema saprobiótico, lo que indica una elevada contaminación por materia orgánica.

Un estudio en América del Sur, realizado por Quinino y col. (2013), permitió observar microeucariotas de vida libre en ambientes acuáticos en una región semiárida en Brasil. Para lograrlo, muestrearon ambientes lóticos y lénticos y lograron registrar 65 taxones de protozoarios de los cuales solo 29 fueron identificados hasta el nivel de especie. Los autores sugirieron que la disponibilidad de nutrientes, la influencia de los sistemas

loticos y lénticos y la presencia de macrófitas acuáticas pudo haber influenciado en la dinámica poblacional de los protozoos dentro del sistema.

En Venezuela, se viene investigando desde hace varias décadas el importante papel de estos microorganismos en los sistemas naturales, tal es el caso de los estudios realizados por Scorza (1997), quien fue uno de los primeros en estudiar las comunidades de microeucariotas de vida libre en el territorio nacional. Estudió a nivel microscópico los ambientes astáticos, encontrando gran diversidad de microeucariotas. Sus estudios le permitieron introducir una guía para la identificación de microeucariotas acuáticos.

Cabrera y col. (2000), estudiaron los protozoarios en ambientes astáticos adyacentes a la Facultad de Ciencias de la Universidad del Zulia – Maracaibo. Entre sus resultados reportan la presencia de 3 phyla (16 géneros de ciliados, 4 de dinoflagelados y 3 de rizópodos) asociados a cuerpos de agua.

Por otra parte, Lozano (2008), estudió y agrupó microeucariotas de vida libre estudiados en brácteas de 3 diferentes especies de *Heliconia* sp del Parque Nacional “Henry Pittier”. Lozano reportó 20 diferentes morfotipos de microeucariotas. De igual forma, determinó la composición de la comunidad de estos organismos y la variación espacio - temporal en la comunidad.

Ahora bien, el estudio de estos microorganismos pronto demandó el uso de técnicas *in vitro*, que permitieran mantener y desarrollar estos microeucariotas de vida libre en condiciones de laboratorio, para lo cual se han descrito métodos de cultivo en microeucariotas de vida libre que faciliten su desarrollo en condiciones de laboratorio.

Efectivamente, Littleford (1960) presentó un método de cultivo simple para protozoarios, orientado a mejorar la calidad de las prácticas de laboratorio en los salones de clases. Littleford estudio las condiciones bajo las cuales se desarrollan múltiples grupos de

protozoarios, utilizando medios de cultivo de composición y condiciones fisicoquímicas variables. Este estudio le permitió proponer 7 condiciones generales para el óptimo desarrollo de protozoarios de vida libre en condiciones de laboratorio.

Por su parte, Esteban y Téllez (1990), describieron un método de aislamiento de protozoarios ciliados de su ecosistema original, así como un método de cultivo y un bioensayo de toxicidad.

Posteriormente, Ling Tan y col. (2005) evaluaron métodos de cultivo en masa para el crecimiento de amebas inorgánicas simples como *Caos carolinense*, las cuales alimentaban con *Paramecium multimicronucleatum*, el cual es la fuente de alimento más conveniente para esta especie. Este método les permitió obtener un cultivo continuo el cual fue adaptado para alcanzar el crecimiento celular óptimo requerido para este estudio.

Ley de Coss y col. (2011), evaluaron la efectividad de un medio de cultivo anaerobio enriquecido con extracto soluble de *Avena sativa* para mantener viables protozoarios ciliados provenientes del rumen, con la finalidad de evaluar *in vitro* su capacidad desfaunante en plantas. Los autores encontraron que es posible mantener una población de protozoarios viables durante 72 h en un medio de cultivo anaerobio.

En virtud de que los protozoarios de vida libre son un importante grupo de microorganismos de los sistemas naturales y que para estudiarlos a mayor profundidad (en aspectos biológicos y ecológicos) se necesita el uso de herramientas y un enfoque multidisciplinar que permita y facilite estos estudios, se plantean los siguientes objetivos de investigación:

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### General

Estandarizar medios de cultivos para la descripción e identificación de protozoarios de vida libre en estudios ecológicos.

### Específicos

- Ensayar diferentes medios de cultivo, variando su composición general para favorecer la abundancia y desarrollo de protozoarios de vida libre.
- Evaluar las condiciones fisicoquímicas que favorezcan la abundancia y desarrollo de protozoarios de vida libre.
- Describir e identificar protozoarios de vida libre mediante el uso de diferentes técnicas de microscopía.
- Establecer la estructura de la comunidad de protozoarios de vida libre de *Heliconia sp*, bajo las condiciones de los medios de cultivos previamente seleccionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se modelaron experimentos que permitieron establecer cuáles serán las mejores condiciones para el eficiente crecimiento y desarrollo de protozoarios de vida libre en condiciones *in vitro*. Para ello se presenta la siguiente marcha experimental:

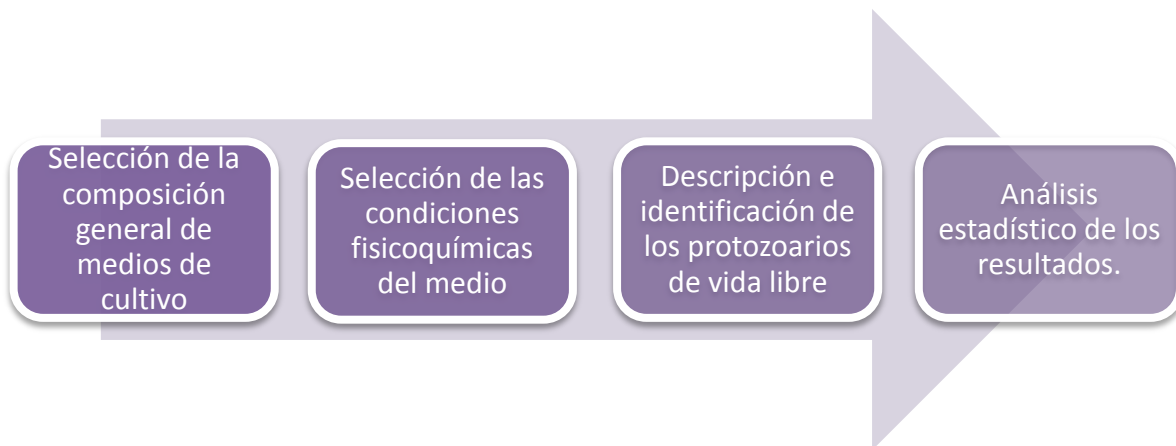


Figura 4: Esquema general de la secuencia experimental

### 1. Selección de la Composición General del Medio de Cultivo.

La selección de medios de cultivo de protozoarios de vida libre se realizó de acuerdo a consultas bibliográficas previas.

Se tomó en consideración un elemento que no generara variaciones en la variable de estudio para el experimento control. Para ello se utilizaron 3 frascos de vidrio (triplicado) con 40 ml de agua destilada a los cuales se les sembraron 2 ml de agua de un pool de muestras provenientes de una fitotelmata de jardín (*Bromelia* sp).

En este sentido, los medios de cultivos utilizados fueron:

- A. Medios con sales fosfatadas.
- B. Medios con sales fosfatadas enriquecidos con glucosa.
- C. Medios con sales inorgánicas.

Por cada grupo experimental, se prepararon 2 medios de cultivo de composición específica, obteniendo en total 6 medios de cultivo (Tabla 2, Figura 5).

Cada frasco con 40 ml de medio de cultivo fresco fue sembrado con 2 ml de agua proveniente de un pool de muestras provenientes de la zona central de fitotelmata de jardín (*Bromelia* sp) y recubiertos en la boca con una malla de tul. Este procedimiento se realizó por triplicado, obteniendo un total de 6 frascos de medio de cultivo por grupo experimental (Figura 5).

Posteriormente, se monitoreó la abundancia de microorganismos presentes con un microscopio óptico, colectando 5  $\mu$ l/medio, con una frecuencia de observación de 2 días por semana, durante un periodo de 4 semanas continuas. Finalmente, los datos obtenidos de la observación directa fueron reportados en concentración de organismos/ml



Figura 5. Esquema de preparación de soluciones para la preparación de los medios de cultivo basado en soluciones salinas amortiguadoras, fosfatadas y fosfatadas suplementadas con glucosa.

**NOTA:** Al término de esta fase experimental, se seleccionó como medio de cultivo óptimo, aquél que promovió el máximo desarrollo y abundancia de protozoarios de vida libre.

Tabla 2. Composición general de los diferentes grupos de medios de cultivo.

Tipo de Solución	Nombre	Composición
<b>Soluciones Fosfatadas</b>	Medio 1: Solución PBS	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Anhidro) (1,34g/100ml de agua destilada) + $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ (0,078 g/ 0,1 L de agua destilada) + NaCl (0,425 g/ 0,1 L de agua destilada).
	Medio 2: Medio Inorgánico	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ (3 g/ 0,5 L de agua destilada) + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0,5 g/ 0,5 L de agua destilada) + $\text{MgSO}_4$ (0,5 g/ 0,5 L de agua destilada).
<b>Soluciones Fosfatadas Suplementadas con Glucosa</b>	Medio 3: Buffer Fosfato Milloning	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ (2,83 g/ 0,1 L de agua) + NaOH (2,3 g / 0,1 L de agua) + Glucosa (0,5 g/ 0,1 L de agua).
	Medio 4: Buffer PBSG	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Anhidro) (1,34 g/ 0,1 L de agua destilada) + $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ (0,078 g / 0,1 L de agua destilada) + NaCl (0,425 g / 0,1 L de agua destilada) + Glucosa (1 g / 0,1 L de agua).
<b>Soluciones Salinas</b>	Medio 5: Solución de Chalkley	$\text{CaCl}_2$ (0,03 g / 0,5 L de agua destilada) + NaCl (0,5 g / 0,5 L de agua destilada) + KCl (0,02 g / 0,5 L de agua destilada).
	Medio 6: Medio Scorsa	$\text{KNO}_3$ (0.5 g / 1 L de agua destilada) + $\text{MgSO}_4$ (0.5 g / 1 L de agua destilada) + $\text{K}_2\text{CO}_3$ (0.7 g / 1L de agua destilada).

## 2. Evaluación de la Viabilidad Variando Condiciones Físicoquímicas.

Una vez seleccionado el medio de cultivo óptimo, se evaluó la abundancia de protozoarios de vida libre al variar 3 variables físicoquímicas como el área, el pH y la temperatura, las cuales fueron evaluadas por separado (Variable área y variables pH y temperatura).

Además, la observación y el conteo de protozoarios de vida libre a través de la microscopía óptica, se realizó con el mayor nivel de detalle para la identificación, el

morfotipo, siendo estos a su vez agrupados para los análisis estadísticos y resultados (según fuera el caso) en otras categorías de clasificación, según se observa en la tabla 3.

**2.A. Variable Área:** Para evaluar el efecto de la variable área sobre la abundancia de protozoarios se tomó en consideración dos tipos de frasco de área variable, área 1: cilindro y área 2: ortoedro, sin hacer modificaciones de las otras variables fisicoquímicas. Cada frasco tenía 40 ml de medio de cultivo fresco al cual se le sembraron 2 ml de medio proveniente del medio de cultivo establecido previamente en la fase experimental 1 y recubiertos en la boca con una malla de tul.

De igual forma, se monitoreó la abundancia con un microscopio óptico, colectando 5 µl/medio, con una frecuencia de observación de 2 días por semana, durante un periodo de 4 semanas continuas. Estos datos de abundancia, fueron reportados en concentración de organismos/ml.

Finalmente, esta fase experimental, se realizó por duplicado y al finalizar la misma se seleccionó como área óptima aquella que permitió la máxima abundancia de protozoarios de vida libre.

**2.B. Variable Temperatura y pH:** Una vez seleccionada el área óptima, se procedió a evaluar el efecto que tienen las variables pH y temperatura sobre la abundancia de protozoarios de vida libre. Para ello se modificaron de forma simultánea ambas variables, considerando dos variaciones de temperatura, T1: temperatura ambiente y T2: temperatura constante de 30°C. Para mantener la temperatura de los medios de cultivo constante se colocaron en una estufa con puerta de vidrio para mantener un régimen lumínico constante.

De igual forma se consideraron tres variaciones de pH, pH1: 5,5, pH2: 7 y pH3: 8,5. Estos valores fueron verificados semanalmente para mantener las condiciones constantes a

lo largo del tiempo de experimentación. El diseño experimental de esta fase, puede ser claramente observado en la figura 6. Cada frasco contenía 40 ml de medio de cultivo fresco y a cada uno de ellos se le sembraron 2 ml de medio proveniente del medio de cultivo establecido previamente en la fase experimental 1 y fueron recubiertos en la boca con una malla de tul.

De igual forma, se monitoreó la abundancia con un microscopio óptico, colectando 5  $\mu$ l/medio, con una frecuencia de observación de 2 días por semana, durante un periodo de 4 semanas continuas. Estos datos de abundancia, fueron reportados en concentración de organismos/ml.

Finalmente, esta fase experimental, se realizó por duplicado y al finalizar la misma se seleccionó como área optima aquella que permitió la máxima abundancia de protozoarios de vida libre.

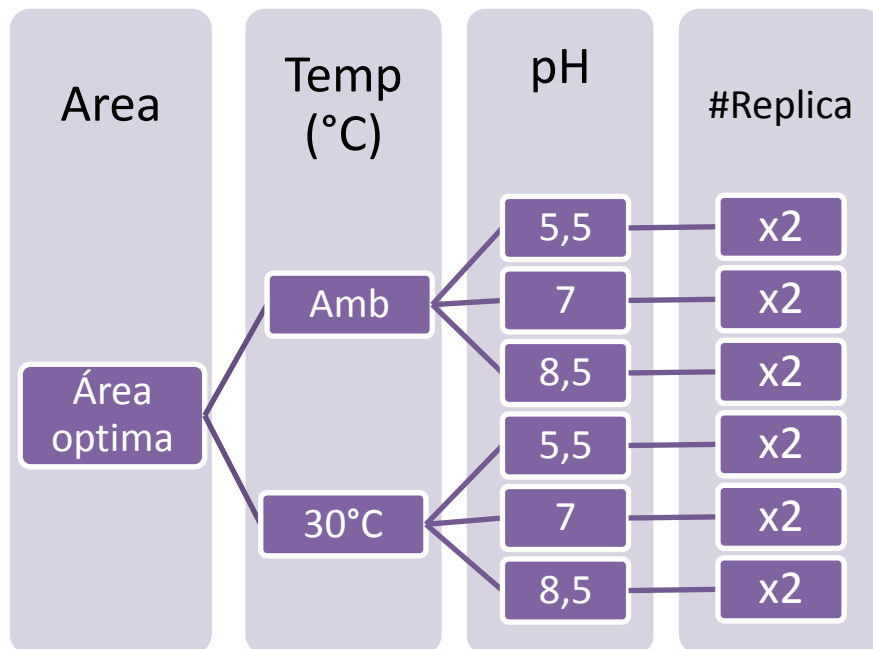


Figura 6. Esquema de las condiciones fisicoquímicas a estudiar basado en las variaciones a realizar de 2 variables fisicoquímicas: temperatura y pH.

### 3. Descripción e Identificación de Protozoarios Mediante Técnicas de Microscopía.

#### 3.A. Microscopía de Luz.

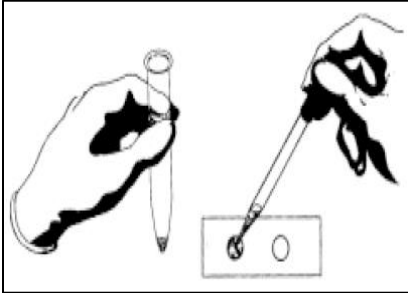


Figura 7. Esquema del montaje de muestras para su observación por el Microscopio de Luz.

El análisis de las muestras a través del microscopio de luz se realizó de forma directa, como se observa en la figura 7.

Cada muestra consistió en la toma de 5  $\mu$ l de medio, los cuales fueron colocados en un portaobjetos de vidrio y cubiertos con un cubreobjetos de vidrio de 2x2.

Las muestras fueron posteriormente observadas de forma directa al microscopio, realizando el conteo de organismos vivos por campo observado, realizando un barrido total de 100 campos por muestra.

Para la descripción de la comunidad a través de la obtención de un registro fotográfico, los protozoarios fueron agrupados por grupos funcionales, gremios y morfotipos (Tabla 3).

#### 3.B. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

El microscopio electrónico de barrido o SEM en su modalidad de bajo vacío, permitió el análisis de muestras biológicas, poco conductoras y sin tratamiento previo, ya que permite controlar la humedad relativa de la cámara y la temperatura de la muestra para evitar daños durante el tiempo de observación.

Se realizó una estandarización de las condiciones de fijación de muestras biológicas de acuerdo al procesamiento de muestras estándar por SEM. Para esto, se probó con la fijación de la muestra a través de fijadores de rutina como el glutaraldehído al 25%, formaldehído al 37% y el tetraóxido de osmio al 1%, como se muestra en la figura 8, con

la finalidad de proteger la membrana de los microorganismos del barrido de los electrones y así evitar la destrucción de la célula, observando eficientemente las estructuras diagnósticas de los microorganismos de estudio.

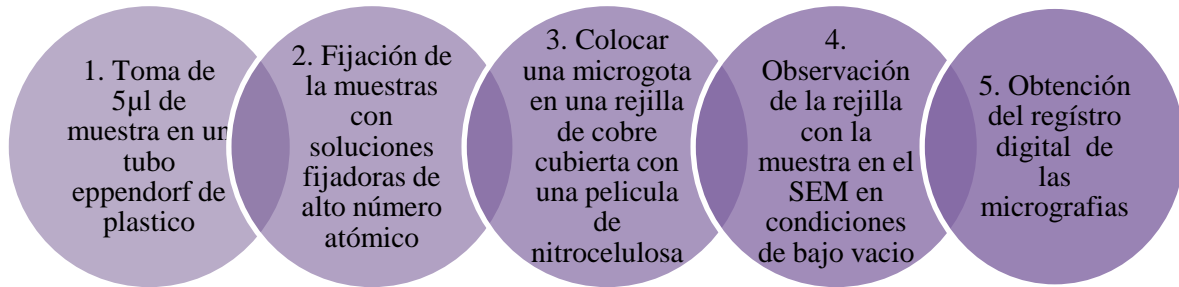


Figura 8. Esquema de los pasos a seguir para la observación de muestras biológicas por el microscopio electrónico de barrido en condiciones de bajo vacío.

El microscopio de barrido utilizado fue un FEI Quanta 250 FEG.

#### **4. Cultivos Estandarizados en Estudios de Comunidades de Sistemas Naturales Abiertos.**

Una vez establecida la composición general óptima del cultivo y las condiciones fisicoquímicas adecuadas que favorecieran la máxima abundancia y crecimiento de protozoarios de vida libre, se procedió a probar su eficiencia y viabilidad a partir de una muestra (inóculo inicial) de un sistema natural diferente al utilizado inicialmente para la experimentación.

En función de esto, el experimento control se realizó tomando en consideración un elemento que no generara variaciones en la variable de estudio. Para ello se utilizaron 3 frasco de vidrio (triplicado) con 40 ml de agua destilada a los cuales se les sembraron 2

ml de agua proveniente de un pool de muestras provenientes de una fitotelmata de jardín (*Heliconia sp.*).

De igual forma, para la experimentación se tomaron 2 ml de muestra proveniente de fitotelmatas de jardín (bráctea # 3 de *Heliconia sp.*), los cuales fueron sembrados en frascos con 40 ml de medio de cultivo fresco con las condiciones fisicoquímicas estandarizadas previamente. De igual forma, cada frasco fue recubierto en la tapa con una malla de tul y se monitoreó la abundancia de estos microorganismos con una frecuencia de observación de 2 días por semana, durante un periodo de 4 semanas continuas. Esta fase experimental se llevó a cabo por triplicado.

## **5. Análisis Cuantitativo de los Datos**

Se cuantificó la abundancia en concentración (# microorganismos/ml) de protozoarios, agrupándolos en categorías gremiales de acuerdo al uso de la clave taxonómica utilizada por Lozano (2008). Finalmente, se calcularán índices de diversidad gremial.

**5.1. Análisis Estadístico:** Para la fase experimental 1 y 2, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para determinar las posibles diferencias significativas existentes entre las variables de estudio. Dicho ANOVA se realizó previa comprobación de los supuestos para su aplicación.

Estos análisis fueron realizados con el paquete estadístico STATISTICA 8.0.

**5.2. Índices de Diversidad Biológica (IDB):** Los IDB permitirán el estudio de la abundancia y diversidad de microorganismos, basados en la información colectada previamente en las fases experimentales 2 y 4.

Se utilizaron índices de riqueza y diversidad, para evaluar la estructura de la comunidad, siguiendo los índices descritos por Whittaker (1969).

- Riqueza:

$$\text{Índice de Margalef: } D(mg) = \frac{S-1}{\ln N}$$

Donde S representa el número de especies y N el número de individuos

- Diversidad:

$$\text{Índice de Shannon-Wiener: } H' = -\sum P_i \cdot \ln P_i$$

Donde  $P_i$  es la proporción de individuos encontrados de la especie  $i$

$$\text{Índice de equidad de Pielou: } J = \frac{H'}{H'_{max}}$$

Estos análisis fueron realizados con el paquete estadístico MVSP versión 3.22 y STATISTICA 8.0.

## **RESULTADOS**

### **I. Selección de la Composición General del Medio.**

Con la finalidad de evaluar la abundancia de protozoarios de vida libre provenientes de un sistema natural abierto, se ensayaron medios de cultivo de composición variable, obteniendo diferencias en la abundancia de estos microorganismos (Figura 9). De acuerdo a esto, los microorganismos de estudio fueron agrupados en tres categorías según su forma y movilidad: flagelados, ciliados y ameboideos (Figura 10). Por otra parte, se registró semanalmente el pH en cada medio de cultivo, el cual se encuentra representado gráficamente en la figura 11.

Finalmente, se seleccionó como óptimo el medio de cultivo cuya composición general permitió obtener la mayor abundancia promedio de protozoarios de vida libre. Para evaluar esto, se realizó un análisis de varianza que permitió observar las diferencias entre los medios de cultivos experimentales, encontrando que los valores más bajos de abundancia fueron registrados en el medio de cultivo número 4. Por otra parte, en el medio número 5 se registró la abundancia más alta, lo cual se aprecia en la figura 12, con una significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

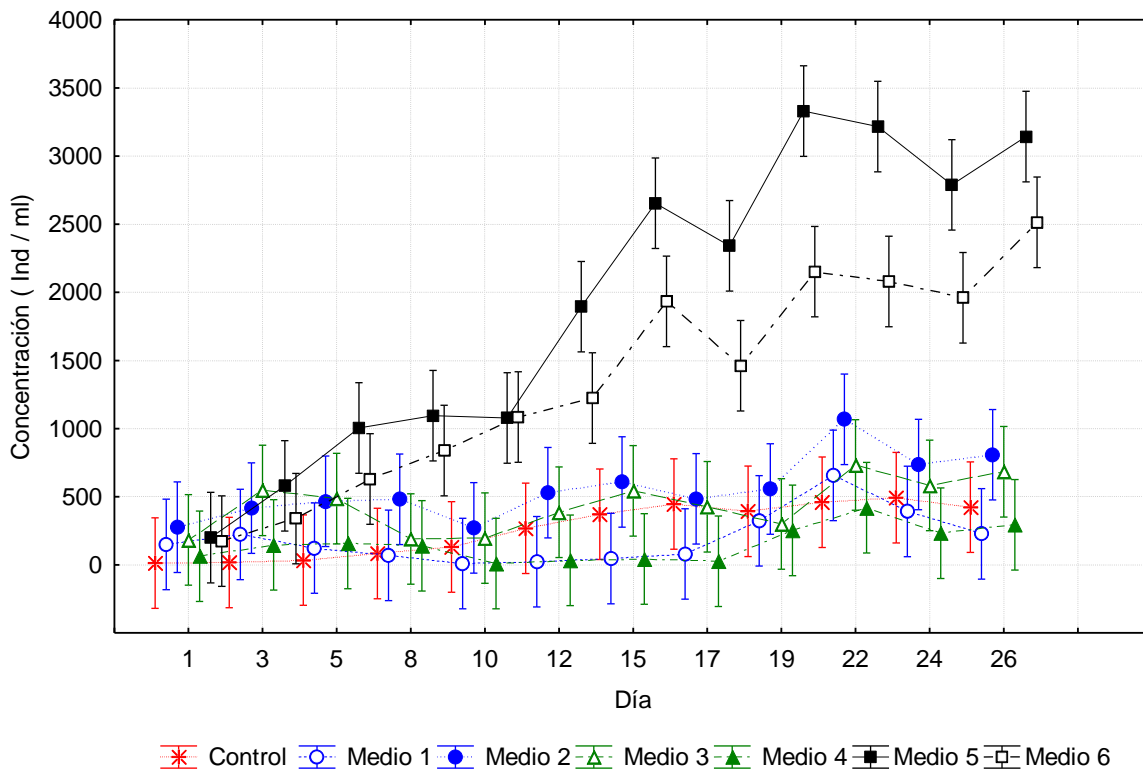


Figura 9: Cinética general de crecimiento de los protozoarios de vida libre en los 6 medios de cultivos experimentales. Se observó la cinética del grupo control (círculo) y de los grupos experimentales de cultivo siendo estos el medio 1 (círculo cerrado), el medio 2 (círculo abierto, el medio 3 (triángulo abierto), el medio 4 (triángulo cerrado), el medio 5 (cuadrado cerrado) y el medio 6 (cuadrado abierto).

La cinética de crecimiento, muestra el curso promedio de la concentración diaria general de protozoarios en cada uno de los grupos experimentales de cultivo, siendo los medios 5 y 6 los que presentaron los mayores valores de abundancia promedio. Las barras indican el error estándar de 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos factores ( $\alpha=0.05$ ) sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de los medios de cultivo (Factor 1:  $F=12,95$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de los días (Factor 2:  $F=80,25$ ;  $P=0,00$ ). (Interacción  $F=2,57$ ;  $P=0,00$ )

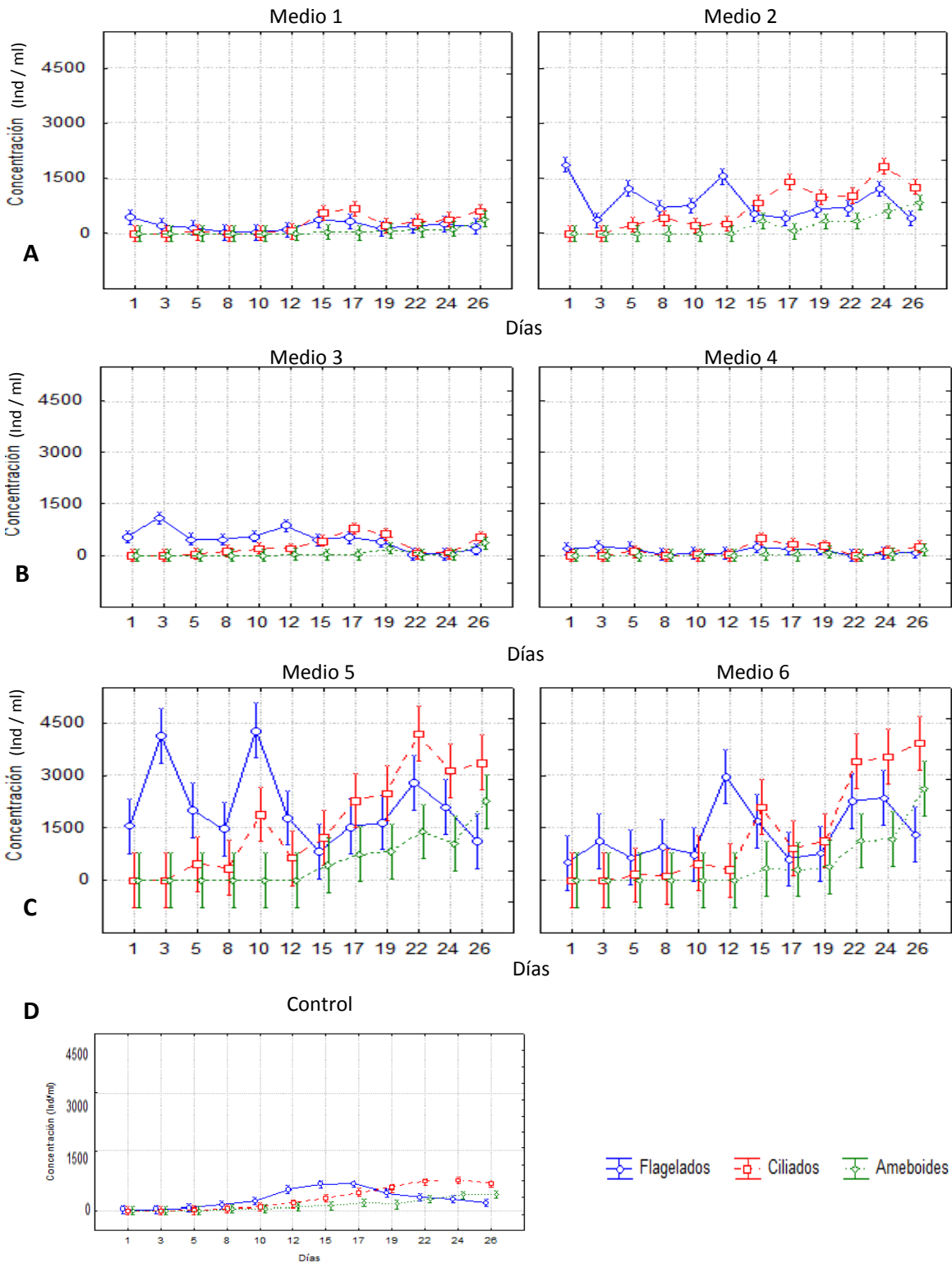


Figura 10: Cinética general de abundancia por grupo morfológico presente en los 6 medios de cultivo a lo largo del tiempo de experimentación. Se observa la cinética obtenida para cada grupo de medio de cultivo de acuerdo a su composición química: A. Fosfatado (medio 1 y 2). B. Fosfatados + Glucosa (medio 3 y 4). C. Sales Inorgánicas (medios 5 y 6). De igual forma la sección (D) presenta el grupo control, el cual se encuentra en una escala diferente que la presentada en cada grupo experimental.

La cinética de crecimiento muestran el curso promedio de la concentración diaria por grupo morfológico, los círculos azules de línea continua, representa a los organismos flagelados, los cuadrados rojos de línea discontinua, representa a los organismos ciliados y los rombos verdes de línea punteada, representa a los organismos ameboides. Por otra parte, las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos factores ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de los medios de cultivo (Factor 1:  $F=192,53$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de las semanas (Factor 2:  $F=45,492$ ;  $P=0,00$ )

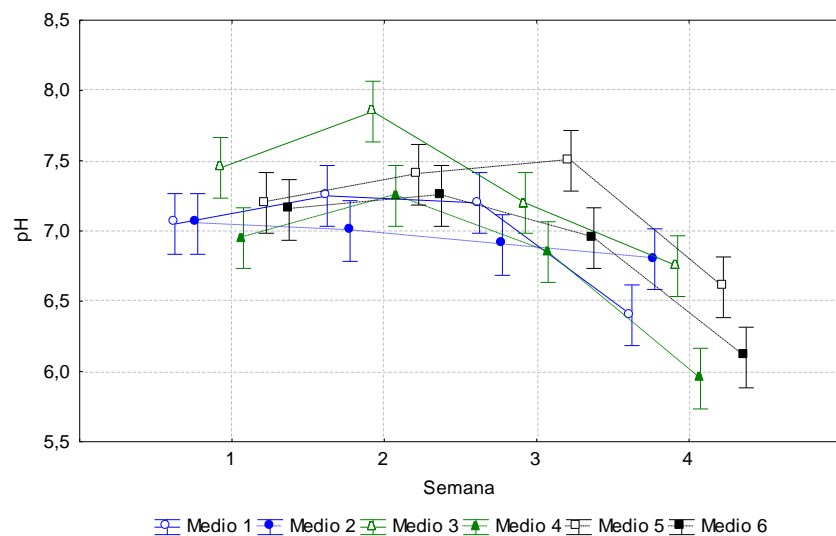


Figura 11: Variación promedio de los valores de pH a lo largo de las cuatro semanas de experimentación en cada uno de los medios de cultivo. Se observa el valor promedio de pH en cada uno de los grupos experimentales de cultivo siendo estos el medio 1(círculo azul abierto), el medio 2 (círculo azul cerrado), el medio 3 (triángulo verde abierto), el medio 4 (triángulo verde cerrado), el medio 5 (cuadrado negro abierto) y el medio 6 (cuadrado negro cerrado).

Las secuencias de líneas muestran el curso promedio de la variación de pH por semana en cada uno de los medios de cultivos experimentales. Las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos factores ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto entre los medios de cultivo (Factor 1:  $P=0,00$ ) y en el efecto de las semanas (Factor 2:  $P=0,00$ )

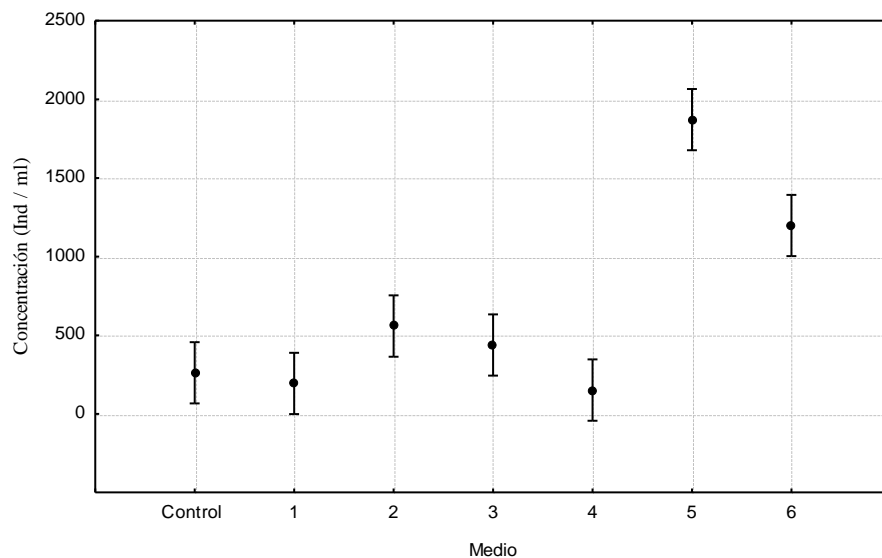


Figura 12: Concentración promedio total al final del tiempo de experimentación. Los puntos muestran el valor de concentración promedio al final del tiempo de experimentación para cada medio de cultivo experimental y control.

Los puntos muestran el valor promedio al final del tiempo de experimentación, en donde se observa que el medio de cultivo número 4 presentó el valor más bajo de abundancia, mientras que el medio de cultivo número 5 reportó los valores más altos. Las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto sobre medios de cultivo (Factor 1:  $P=0,00$ )

## **II. Viabilidad del Medio bajo Condiciones Físicoquímicas Establecidas.**

Una vez seleccionado el medio de cultivo con las condiciones generales adecuadas para el desarrollo de los protozoarios de vida libre, se procedió a evaluar la viabilidad del mismo bajo variaciones de las condiciones físicoquímicas del medio.

En función de esto, en la figura 13 se aprecia la cinética general de crecimiento utilizando frascos de área cilíndrica y ortoédrica en el medio de cultivo, esto con la finalidad de evaluar el efecto del área de la superficie de intercambio gaseoso sobre la abundancia de los protozoarios. De igual forma, se evaluó la cinética general de crecimiento por grupo morfológico de protozoarios (flagelados, ciliados y ameboides), con la finalidad de observar si alguno de estos se ve favorecido bajo estas condiciones (figura 14), estableciendo finalmente que a mayores áreas que permitan una mayor superficie de intercambio gaseoso la abundancia total de protozoarios al final del tiempo de experimentación será mayor, lo cual se sustenta estadísticamente con ( $p < 0.05$ ) para todas las variables de estudio.

Por otra parte, se obtuvo la relación pH-Temperatura a lo largo del tiempo de experimentación (figura 15) en la cual se aprecia que los valores de abundancia promedio obtenidos a temperatura ambiente y pH 7 fueron mayores que el resto. De igual forma, en la figura 16 se aprecia la cinética general de crecimiento por grupo morfológico de protozoarios (flagelados, ciliados y ameboides), en cada una de las condiciones de pH y temperatura experimentales, con la finalidad de observar si estas condiciones favorecen o no el crecimiento de algún grupo en particular.

Finalmente, para conocer la dinámica de la comunidad existentes bajo estas condiciones, se calcularon índices de diversidad gremial (figura 17), índices de equidad (figura 18) y riqueza gremial (figura 19) a lo largo del tiempo de experimentación y bajo cada una de las condiciones de pH y temperatura experimentales.

La observación y conteo de microorganismos a través de microscopía de luz, se realizó con el mayor nivel de detalle posible para la identificación, el morfotipo, siendo éste a su vez agrupado para los resultados y análisis estadísticos (según fuera el caso) en grupos funcionales o gremio (tabla 3). En total fueron contabilizados 32 morfotipos.

Tabla 3. Clasificación y agrupación de los protozoarios de vida libre en este estudio.

<b>Grupo morfológico</b>	<b>Subgrupo</b>	<b>Gremio</b>	<b>Morfotipos</b>
<b>Flagelados</b>	Diatomeas	Penadas	Morfotipo 1
			Morfotipo 2
			Morfotipo 3
			Morfotipo 4
			Morfotipo 5
		Centrales	Morfotipo 6
	Biflagelados	Cryptophytas	Morfotipo 7
			Morfotipo 8
			Morfotipo 9
		Bodonida	Morfotipo 10
			Morfotipo 11
		Euglenidos	Morfotipo 12
			Morfotipo 13
<b>Ciliados</b>	Spirotrichea	Hypotrichia	Morfotipo 14
			Morfotipo 15
	Stichotrichia	Morfotipo 16	
		Prostomatea	Morfotipo 17
	Oligo*	Peritricheo	Morfotipo 18
		Peniculados	Morfotipo 19
		Hymenostomado	Morfotipo 20
	Litostomatea	Litostomatea	Morfotipo 21
Heterotrichea	Heterotrichea	Morfotipo 22	
<b>Ameboideos</b>	Desnudas	Lobopodios	Morfotipo 23
			Morfotipo 24
			Morfotipo 25
			Morfotipo 26
			Morfotipo 27
		Filopodios	Morfotipo 28
		Actinopodios	Morfotipo 29
	Testadas	Teca circular	Morfotipo 30
			Morfotipo 31
		Teca oval	Morfotipo 32

(Oligo\*): Oligohymenophorea

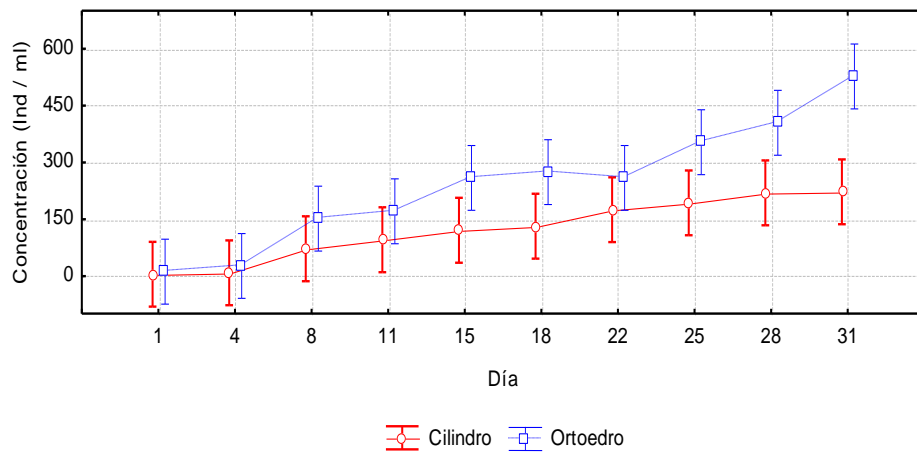


Figura 13: Cinética general de crecimiento de los protozoarios de vida libre en el medio de cultivo seleccionado con dos condiciones de área diferente, el cilindro (círculo verde de línea continua) y el ortoedro (cuadrado azul de línea punteada).

Las líneas muestran el curso promedio de la concentración diaria, mientras que las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de 2 factores ( $\alpha=0.05$ ) realizado sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto del área (Factor 1:  $F=16.85$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de los días (Factor 2:  $F=6.410$ ;  $P=0,00$ ).

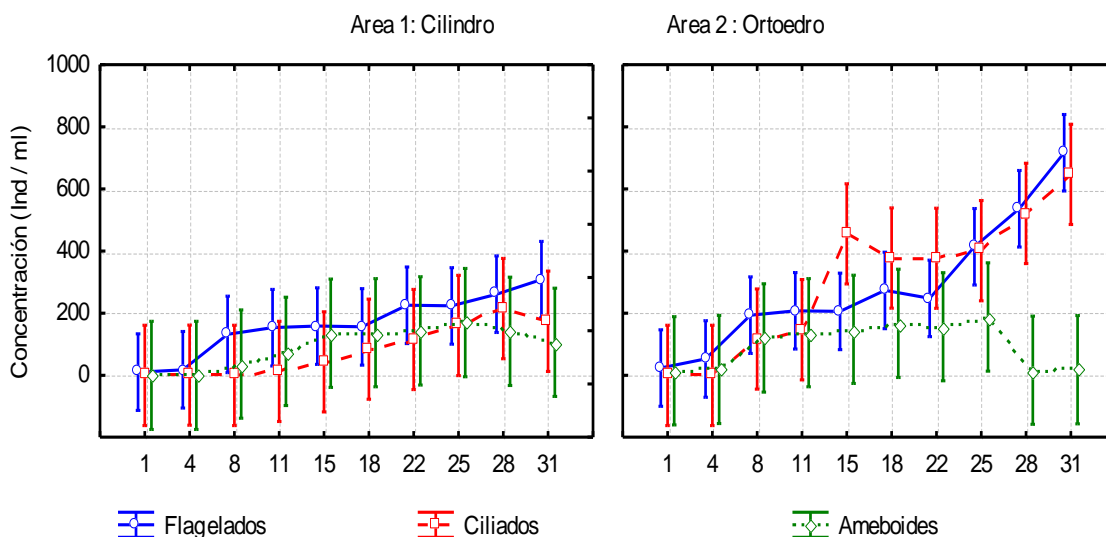


Figura 14: Cinética general del crecimiento de protozoarios de vida libre por grupo morfológico

presente a lo largo del tiempo de experimentación, de acuerdo a las dos áreas de estudio. Las líneas muestran la cinética promedio por área experimental, los círculos azules de línea continua, representa a los organismos flagelados, los cuadrados rojos de línea discontinua, representa a los organismos ciliados y los rombos verdes de línea punteada, representa a los organismos ameboides.

Las líneas muestran la cinética promedio de la abundancia por área experimental. Cada gráfica corresponde a un área específica; área1 (izquierda)-cilindro y área2 (derecha)-ortopedro. Las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de 2 factores ( $\alpha=0.05$ ) realizado sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias en el efecto del áreas (Factor 1:  $P=0,00$ ) y en el efecto de los días (Factor 2:  $P=0,00$ )

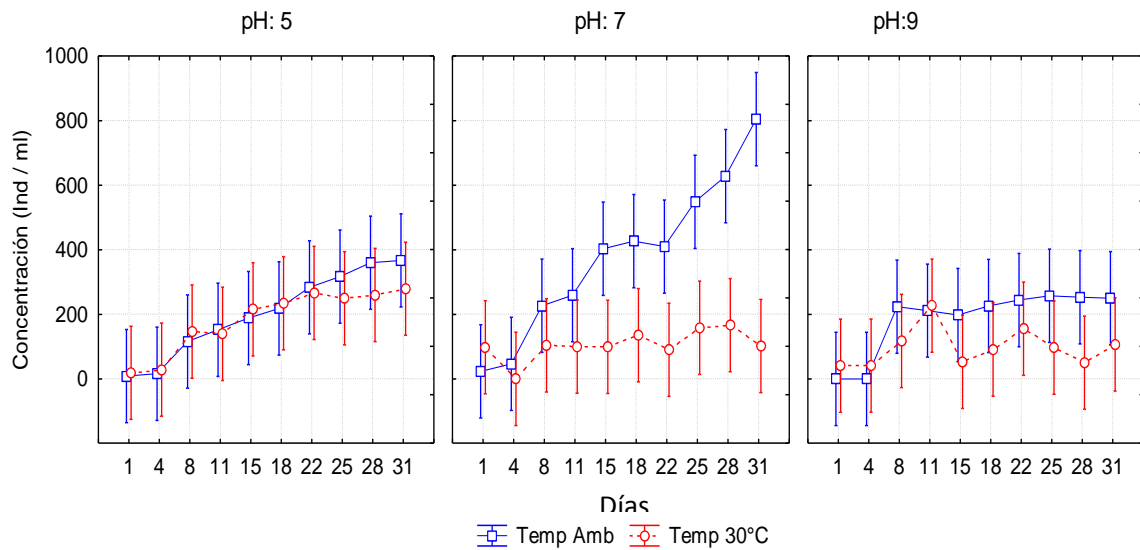
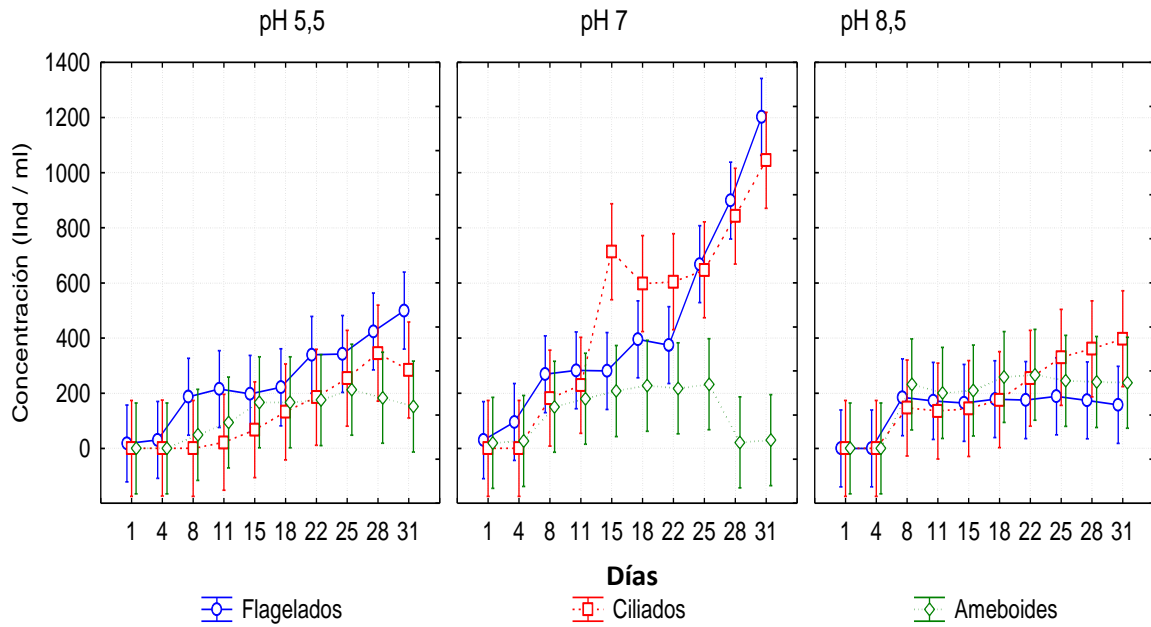


Figura 15: Cinética general del crecimiento de protozoarios de vida libre en función de la relación pH –Temperatura. Cada grafica corresponde a un valor de pH en donde los círculos verdes de línea punteada representan la cinética de concentración a T. 30 °C, mientras que los cuadrados azules de línea continua representan la cinética de concentración a T. ambiente.

Las líneas muestran la cinética promedio de la abundancia por cada área experimental. Cada grafica corresponde a un valor de pH 5.5 (izquierda), pH 7 (centro) y pH 8.5 (derecha), en donde se observa que la gráfica del centro a pH 7, presentó los mayores valores de abundancia. Las barras (bigotes) indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de tres factores ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis

estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de las temperaturas (Factor 1:  $F=49,94$ ;  $P=0,00$ ), en el efecto del pH (Factor 2:  $F=11,19$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de los días (Factor 3:  $F=11,35$ ;  $P=0,00$ )

**A. Temperatura 1: Ambiente**



**B. Temperatura 2: 30°C**

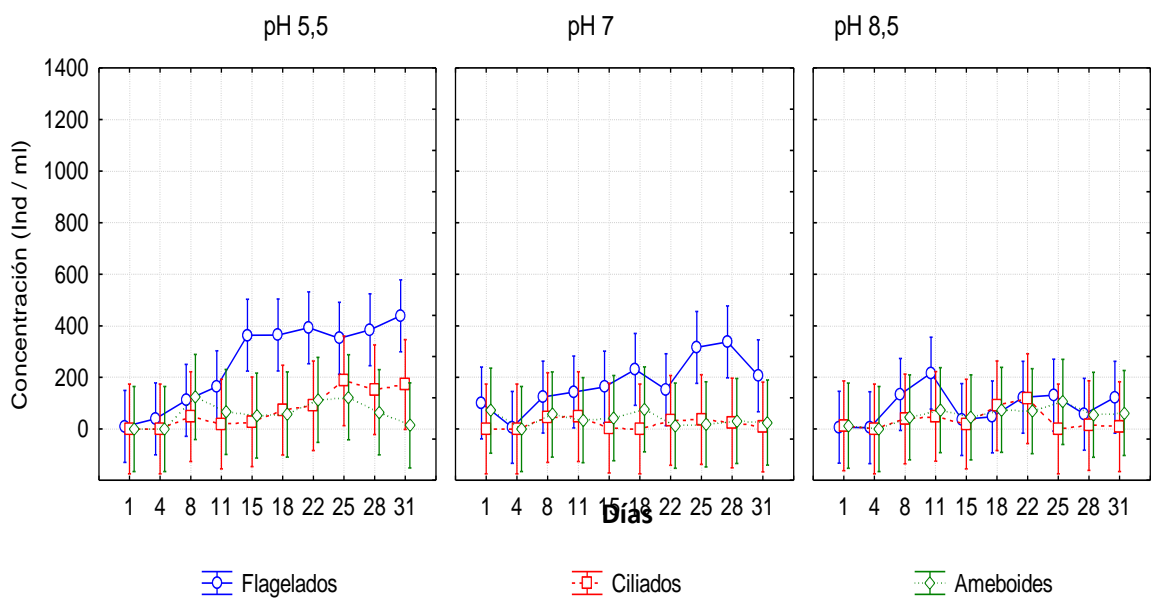


Figura 16: Cinética general del crecimiento de protozoarios de vida libre por grupo morfológico presente a lo largo del tiempo de experimentación, de acuerdo a las variables de estudios. Las graficas de la parte superior (A) representan cada uno de los pH experimentales a una temperatura T1 Ambiente. Por otra parte las gráficas de la parte inferior (B) representan cada uno de los pH experimentales a una temperatura T2 de 30°C. Las líneas muestran con círculos azules de línea continua, representan a los organismos flagelados, los cuadrados rojos de línea discontinua, representa a los organismos ciliados y los rombos verdes de línea punteada, representa a los organismos ameboides.

Las graficas representan cada uno de los pH experimentales, pH 5.5 (izquierda), pH 7 (centro) y pH 8.5 (derecha) a dos temperaturas diferentes (A) temperatura Ambiente y (B) temperatura de 30°C. Las barras (bigotes) indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de tres factores ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de los pH (Factor 1:  $F=6,53$ ;  $P=0,00$ ), en el efecto de los (Factor 2:  $F=2,58$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de grupos funcionales (Factor 3:  $F=27,54$ ;  $P=0,00$ )

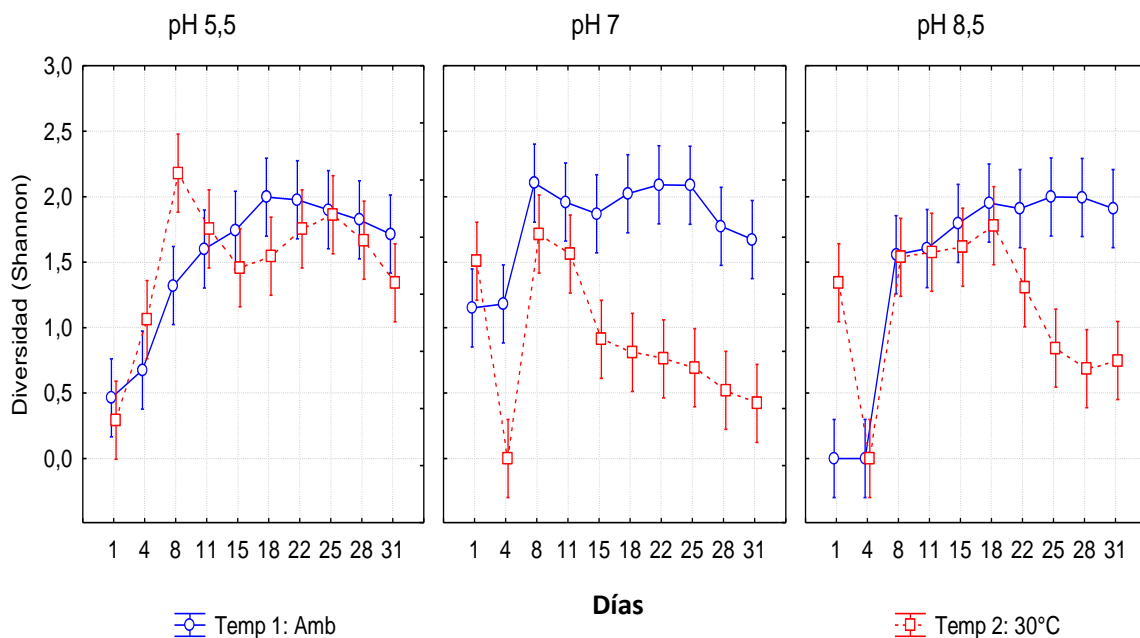


Figura 17: Cinética de variación del Índice de diversidad de Shannon Wiener aplicado durante el las 4 semanas de experimentación. Se observan tres graficas las cuales representan cada uno de los pH

experimentales, en donde el círculo azul de línea continua, presenta los valores a una T1: Ambiente, mientras que el cuadrado roja de línea discontinua, presenta los valores a un T2: 30°C.

Las líneas muestran los valores promedios de diversidad por día, en cada uno de los pH experimentales, pH 5.5 (izquierda), pH 7 (centro) y pH 8.5 (derecha) y a cada una de las temperaturas experimentales. Las barras (bigotes) indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de tres factores ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de las temperaturas (Factor 1:  $F=49,91$ ;  $P=0,00$ ), en el efecto del pH (Factor 2:  $F=4,29$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de los días (Factor 3:  $F=20,01$ ;  $P=0,00$ )

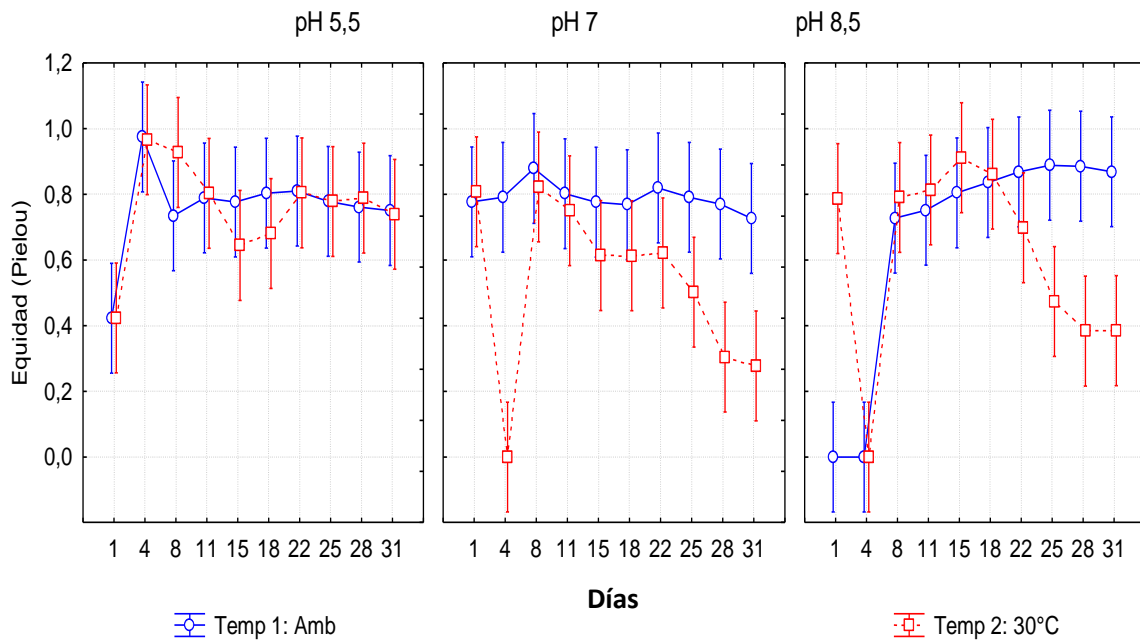


Figura 18: Índice de Equidad de Pielou aplicado durante el las 4 semanas de experimentación. Se observan tres graficas las cuales representan cada uno de los pH experimentales en donde los círculos azules de línea continua, presenta los valores a una T1: Ambiente, mientras que los cuadrados rojos de línea discontinua, presenta los valores a un T2: 30°C.

Las líneas muestran los valores promedios del índice de equidad por día, en cada uno de los pH experimentales, pH 5.5 (izquierda), pH 7 (centro) y pH 8.5 (derecha) y a cada

una de las temperaturas experimentales. Las barras (bigotes) indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de tres factores ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de las temperaturas (Factor 1:  $F=9,99$ ;  $P=0,00$ ), en el efecto del pH (Factor 2:  $F=4,93$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de los días (Factor 3:  $F=4,97$ ;  $P=0,00$ ).

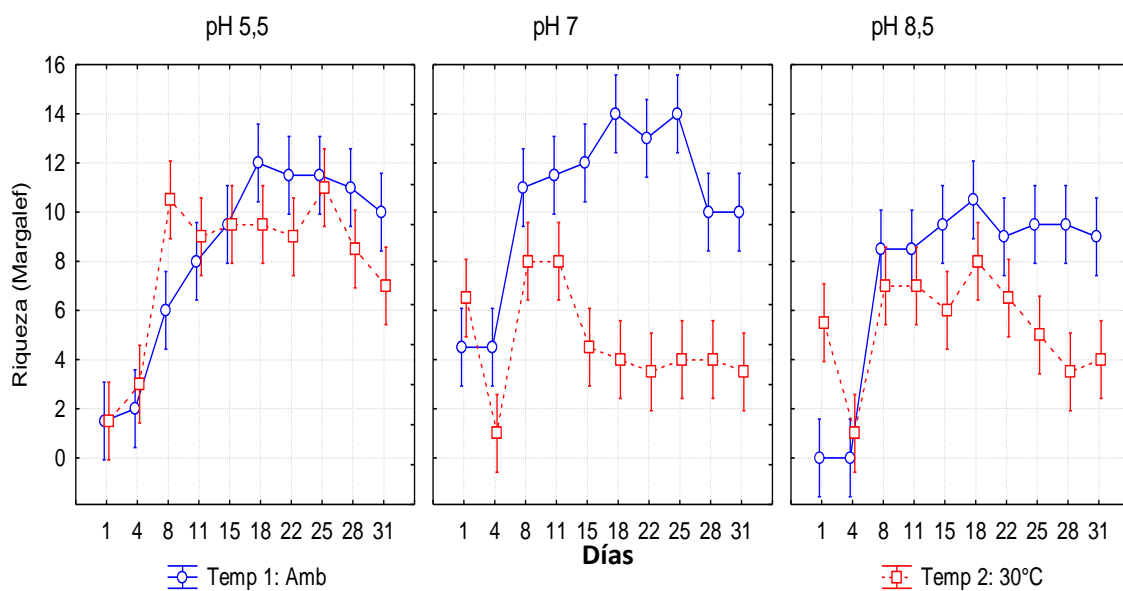


Figura 19: Índice de Riqueza de Margalef aplicado por gremios de clasificación durante el las 4 semanas de experimentación. Se observan tres graficas las cuales representan cada uno de los pH experimentales y a cada temperatura. Observando que el círculo azul de línea continua, presenta los valores a una T1: Ambiente, mientras que la el cuadrado roja de línea discontinua, presenta los valores a un T2: 30°C.

Las líneas muestran los valores promedios de la riqueza por día, en cada uno de los pH experimentales, pH 5.5 (izquierda), pH 7(centro) y pH 8.5 (derecha) y a cada una de las temperaturas experimentales. Las barras (bigotes) indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de tres factores ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de las temperaturas (Factor 1:  $F=76,26$ ;  $P=0,00$ ), en el efecto del pH (Factor 2:  $F=10,26$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de los días (Factor 3:  $F=27,56$ ;  $P=0,00$ ).

### **III. Identificación y Clasificación de Protozoarios de Vida Mediante el Uso de Técnicas de Microscopía.**

Las técnicas de microscopía permitieron no solo hacer visible los objetos de estudio (que por su pequeño tamaño están fuera del rango de resolución del ojo humano), sino que permitieron obtener un registro (fotográfico y micrográfico) de estos microorganismos, lo cual permitirá generar aportes de relevancia en el campo de la identificación y clasificación de estos microorganismos.

Los resultados registrados en esta fase, se derivan de la observación de estos microorganismos a través del microscopio óptico y el microscopio electrónico de barrido. Dichas observaciones, permitieron agrupar los microorganismos de acuerdo a características comunes o gremios como se observa en las tablas 3, 4 y 5.

A continuación, se presenta el registro fotográfico (III.A) obtenido, de acuerdo a los criterios de ordenación establecidos en esta investigación. Posteriormente, se presentará el registro micrográfico (III.B) obtenido a lo largo del tiempo de experimentación.

**III.A. Microscopía de Luz:** Se realizó un reconocimiento general de los microorganismos estudiados lo que permitió registrar un total de 32 morfotipos diferentes de protozoarios, los cuales fueron agrupados en 18 gremios de acuerdo a características morfológicas.

- 1. Flagelados:** grupo heterogéneo de protozoarios cuyo cuerpo celular suele ser de forma definida. Estos se encuentran caracterizados por la presencia de uno o más flagelos largos, los cuales además de permitir la locomoción, intervienen en la captura del alimento. De acuerdo a su movimiento, se pueden distinguir dos tipos de flagelados, los acrocontos, que nadan con su flagelo(s) por delante del cuerpo y los opistocontos, en los que el cuerpo celular avanza por delante del flagelo.

Los flagelados presentaron un total de 13 morfotipos diferentes, los cuales fueron agrupados en cinco gremios, en donde dos pertenecen al grupo de las diatomeas y tres pertenecen al grupo de los biflagelados. Estos resultados, se muestran en la tabla 3.

1.1. Diatomeas: forman parte de un amplio y diverso subgrupo de microalgas. Estas se encuentran formadas por una cubierta de sílice denominada frústulo, la cual consta de dos partes simétricas: la epiteca (superior) y la hipoteca (inferior). Pueden encontrarse de forma libre o agregadas y morfológicamente se dividen en dos gremios según su simetría: las pennadas (simetría bilateral - presentan rafe) y las céntricas, con simetría radial (Illana, 2008).



Figura 20: Diatomeas penadas. Caracterizadas por presentar una fisura longitudinal denominada rafe (flecha negra), la cual conecta el nódulo central con los nódulos polares. **20.a.** morfotipo 3. **20.b.** morfotipo 5. **20.c.** morfotipo 2. Aumento 400X

1.2. Biflagelados: Son un subgrupo de microorganismos que presentan dos flagelos, los cuales se caracterizan por su orientación, uno en dirección anterior y otro posterior recurrente. Adicionalmente, se caracterizan por presentar un movimiento asincrónico ya que cada flagelo se origina de forma independiente en el axonema (García-Cortés, 2004)

1.2.1. Gremio - Cryptophytas: Son miembros importantes del fitoplancton. En general, las cryptophytas son mixótrofas, es decir, son capaces tanto de hacer fotosíntesis (presentan cloroplastos o leucoplastos) como de ingerir alimento a través de vacuolas contráctiles. Este gremio, presenta una cubierta rígida y una invaginación ventral, la cual le da el nombre al gremio (*crypto* - oculto) de la que salen dos flagelos (Adl y col., 2005).

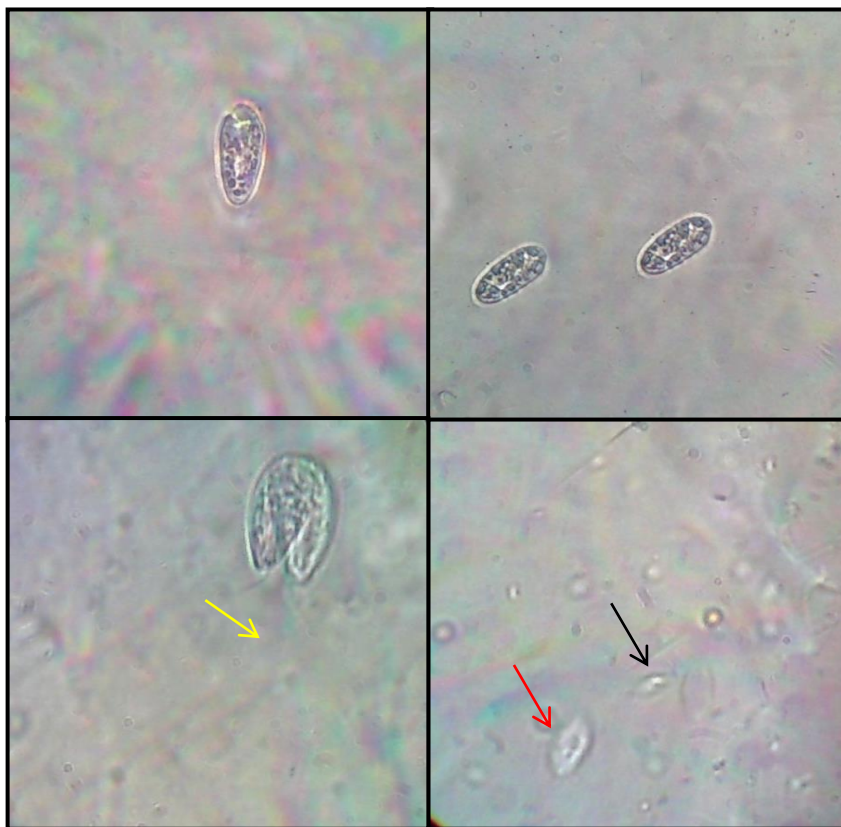


Figura 21: Biflagelados filtradores del gremio Cryptophyta. **21.a.b.** Morfotipo 7. Aumento 400X. **21.c.** morfotipo 7 en fase final de división por fisión binaria. Flagelo posterior recurrente (flecha amarilla). Aumento 1000X. **21.d.** Morfotipo 8 (flecha roja) y morfotipo 9 (flecha negra) pertenecientes al gremio de las Cryptophytas. Aumento 1000X

1.2.2. Gremio –Bodonida: Principalmente heterotrofos. Presentan dos flagelos, uno anterior y uno posterior acronematio. El gremio bodonido, presenta citostoma en la zona ventral y pueden presentar una o varias vacuolas contráctiles. De forma general, se pueden encontrar tanto bodonidos parásitos como de vida libre, estos últimos, se alimentan principalmente de bacterias. (Anderson, 1987).

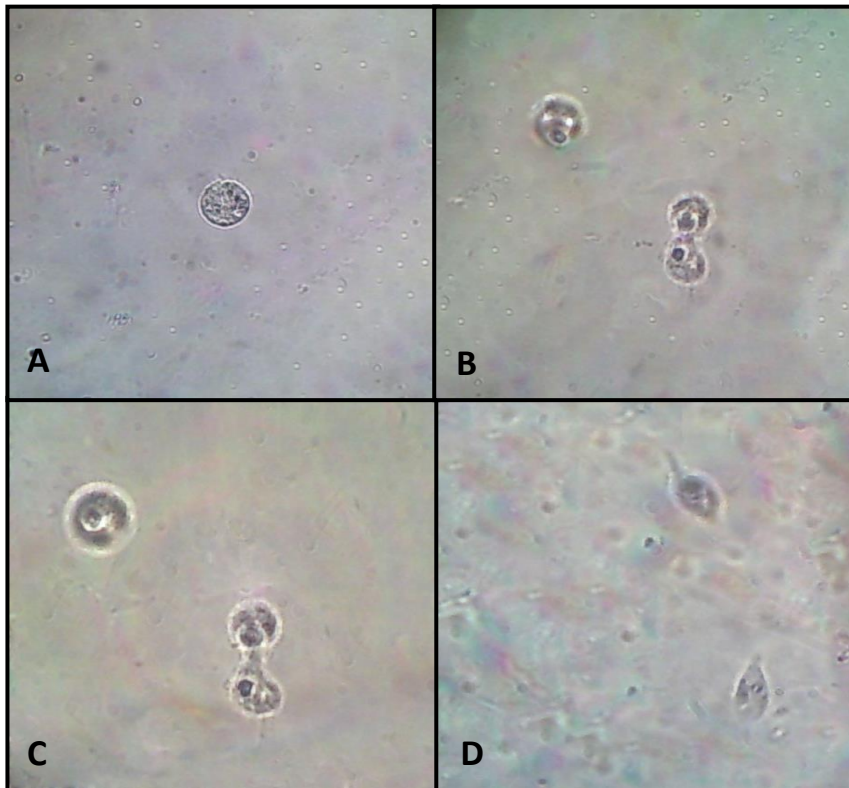


Figura 22: Biflagelados filtradores del gremio Bodonida. **22.a.** Morfotipo 10. Aumento 400X. **22.b.** Morfotipo 10 en proceso de división por fisión binaria. Aumento 400X. **22.c.** Morfotipo 10. Detalle en fase final de división por fisión binaria (flecha negra). Aumento 1000X. **22.d.** Morfotipo 11. Aumento 1000X.

1.2.3. Gremio – Euglénida: grupo ampliamente diverso, en donde aproximadamente un tercio son microorganismos fotosintéticos, sin embargo, la mayoría son heterótrofos obligados. Los euglenidos, presentan una invaginación apical o subapical la cual no interviene en la ingestión de alimentos. Sin embargo, las formas heterótrofas presentan un citostoma, próximo e independiente de la

invaginación anterior. Por lo general, los euglénidos presentan dos flagelos, con la salvedad de que en algunas especies uno de los flagelos es tan corto que no llega a emerger de la invaginación. De forma general, el flagelo emergente es mastigonemado (Adl y col., 2005).

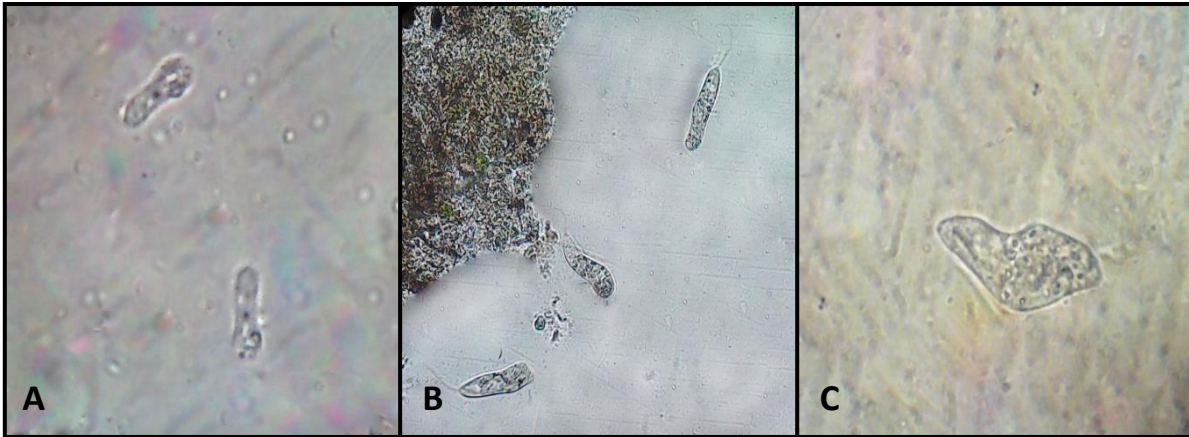


Figura 23: Biflagelados filtradores del gremio Euglenida. **23.a.** Morfotipo 13. Aumento 1000X. **23.b.** tres representantes del Morfotipo 12 en los alrededores de una zona con detrito. Aumento 100X. **23.c.** En detalle, un flagelado del gremio de los euglenidos. Morfotipo 12. Aumento 400X.

**2. Ciliados:** Son un diverso grupo de microorganismos, los cuales presentan formas relativamente grandes, con una estructura interna compleja. A nivel de su superficie, se caracterizan por presentar cilios, los cuales le permiten movilizarse de forma activa y veloz. Por otra parte, los ciliados son en su mayoría heterótrofos, presentando un citostoma a través del cual se alimentan. La forma y estructura del aparato ciliar, es una de las principales características que permiten la clasificación de estos microorganismos.

Los ciliados presentaron un total de nueve morfotipos diferentes, los cuales fueron agrupados en ocho gremios de acuerdo a características morfológicas y la distribución de sus cilios. Estos resultados, se muestran en la tabla 3.

2.1.Spirotrichea: Subgrupo extenso y particular dentro de los ciliados ya que tienden a ser aplanados, con los cilios confinados a la superficie ventral los cuales tienen diversos usos, como el desplazamiento y la captura del alimento. En este grupo, los cilios se presentan típicamente prominentes cerca de la zona oral, sin embargo, en algunos casos pueden estar ausentes (Anderson, 1987). Son un grupo que puede ser encontrado asociado a las zonas con detrito o sustrato ya que la ubicación de sus cilios les da la apariencia de estar caminando.

2.1.1. Gremio – Hypotrichia: La mayoría de estos microorganismos son de forma oval, con un pellicle rígido que soporta la membrana celular. Los cilios se presentan distribuidos en penachos aislados por la superficie ventral de la célula y algunos presentan cilios dorsales que funcionan como cerdas sensoriales (Adl y col., 2005).

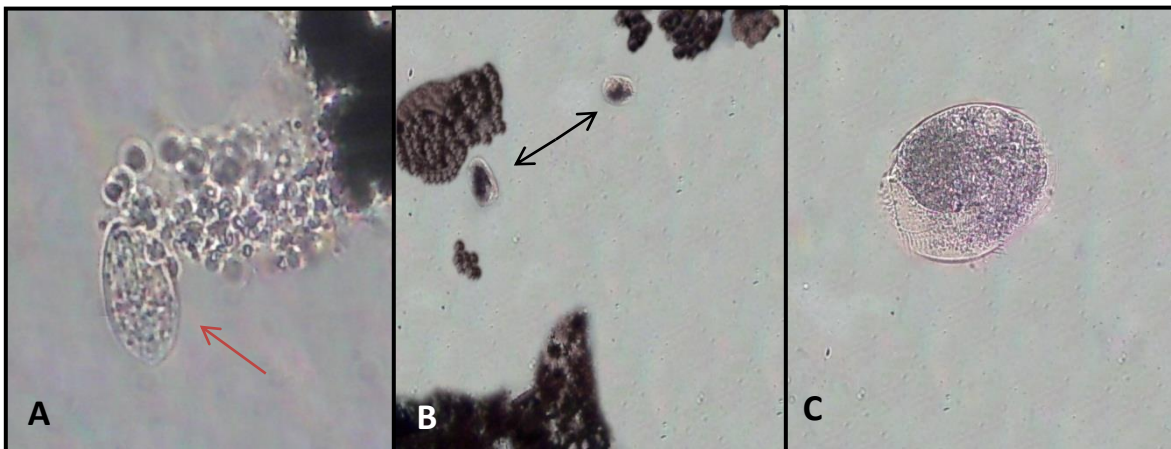


Figura 24: Ciliados aplanados del gremio Hypotrichia. **24.a.** Morfotipo 15. Ciliado del genero *Aspidisca* (flecha roja). Aumento 1000X. **24.b.** Morfotipo 14. Ciliados del genero *Euplotes* (flecha negra). Aumento 25X. **24.c.** Detalle del morfotipo 14. Aumento 400X.

2.1.2. Gremio – Stichotrichia: Protozoarios ciliados que en su mayoría son aplanados. Este gremio presenta cilios fusionados (cirros) localizados principalmente en filas sobre la superficie ventral y los bordes de la célula (Adl y col., 2005).



Figura 25: Ciliado de forma aplanada y oval del gremio Stichotrichia. **25.a.** Morfotipo 16. Ciliado del género *Stylonychia* (flecha negra). Aumento 100X. **25.b.** Detalle de los cirros que bordean la célula (flecha roja) del morfotipo 16. Ciliado del género *Stylonychia*. Aumento 400X.

2.2. Prostomatea: Subgrupo de microorganismos que incluye tanto especies de vida libre como parásitas las cuales se caracterizan por presentar un citostoma en posición anterior, lo que les da el nombre al grupo (Anderson, 1987). Adicionalmente, la mayoría de los miembros de prostomatea, presentan una forma oval o “forma de barril” que es característica del grupo. Por otra parte, algunos integrantes del grupo pueden presentar escamas o placas calcáreas que endurecen el cuerpo y lo hacen poco flexible, como es el caso del género *Coleps* sp., (Lemloh y col., 2013).

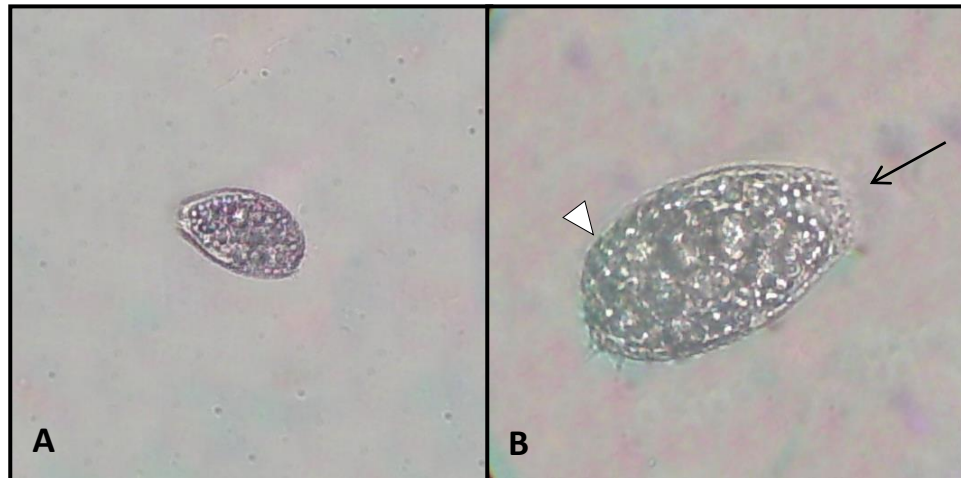


Figura 26: Ciliado con forma de barril del gremio prostomatea. **26.a.** Morfotipo 17. Ciliado del genero Coleps. Aumento 100X. **26.b.** Detalle de la abertura del citostoma del morfotipo 17, el cual se presenta en posición anterior (flecha negra). De igual forma se observan las placas calcareas que recubren a este microorganismo (punta de flecha). Aumento 400X.

2.3. Oligohymenophorea: Subgrupo bastante diverso el cual presenta típicamente un surco ventral en donde se ubica el citostoma y unos cilios orales distintivos, los cuales incluyen una membrana paroral a la derecha de la boca y unas membranelas a la izquierda. Por otra parte, los cilios corporales son uniformes y densos (Adl y col., 2005). Sin embargo, en algunos casos puede ser al contrario la disposición de cilios. Los miembros de este grupo son en su mayoría microorganismos de vida libre, mientras que otros se presentan como simbioses.

2.3.1. Gremio – Peritrichea: protozoarios ciliados en forma de campana o disco que se caracteriza por presentar una cavidad oral apical y en forma de embudo la cual presenta un peristoma el cual posee una serie de membranelas y cilios que lo bordean. Por otra parte, la mayoría de los protozoarios que pertenecen a este grupo han modificado la zona posterior al cinetosoma, presentando un tallo contráctil denominado telotroch, el cual puede contraerse (Adl y col., 2005)

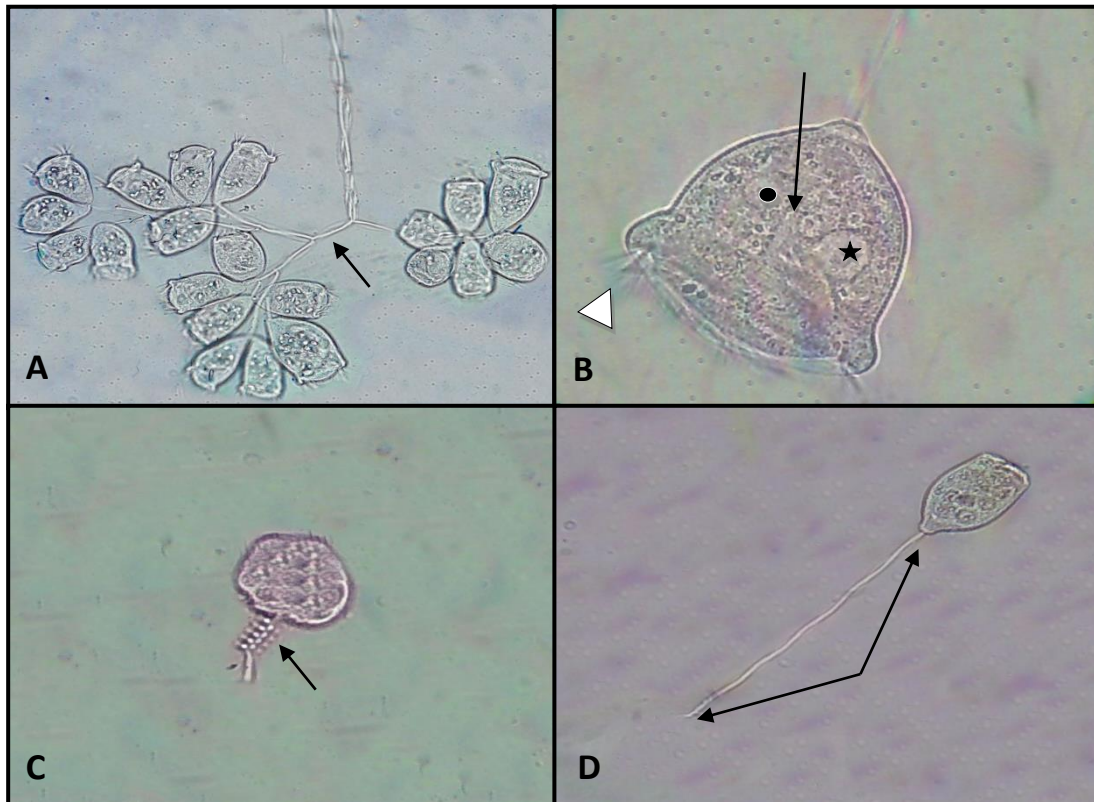


Figura 27: Ciliados con forma de campana del gremio Peritrichea. **27.a.** colonia ramificada del Morfotipo 18. Cada uno de ellos presenta su tallo contractil o telotroch (flecha). Aumento 100X. **27.b.** Un representante del Morfotipo 18 el cual presenta cilios apicales que bordean el peristoma (punta de flecha). De igual forma se aprecia la vacuola contráctil (estrella). También se aprecia el macronúcleo (flecha) y algunas vacuolas digestivas (punto). Aumento 1000X. **27.c.** Detalle del tallo contractil o telotroch contraído del Morfotipo 18 (flecha). Aumento 400X. **27.d.** Tallo contractil o telotroch elongado del Morfotipo 18 (flecha). Aumento 100X.

2.3.2. Gremio – Peniculia: ciliados de formas relativamente grandes que se alimentan de organismos más pequeños que son atraídos hacia el citostoma mediante cilios orales y membranelas denominadas peniculi, las cuales se disponen en la cavidad bucal de forma paralela a la boca (Anderson, 1987). Por otra parte, los cilios corporales se presentan densos y uniformes.

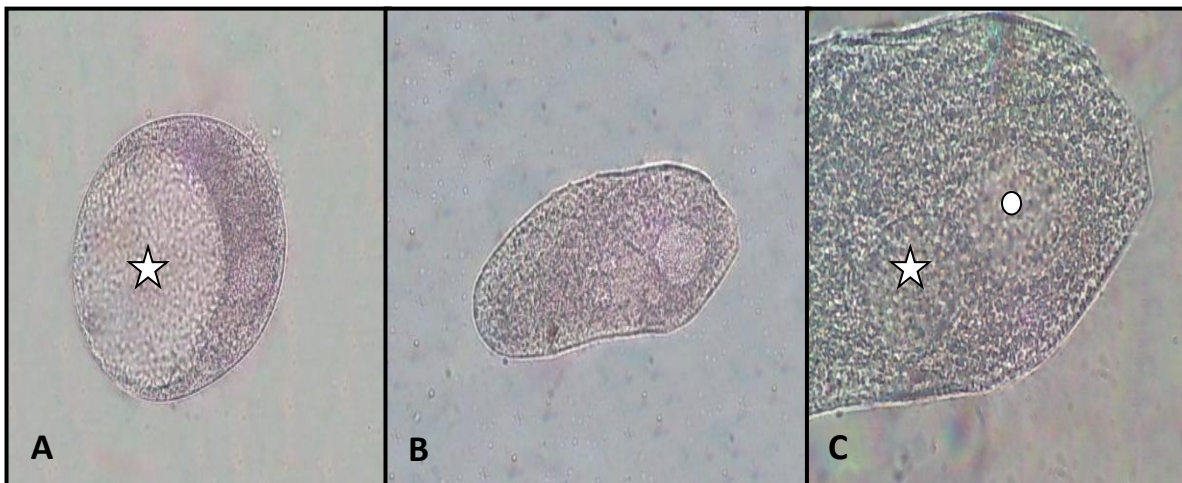


Figura 28: Ciliado de gran tamaño del gremio de los Peniculidos. **28.a.** Ciliado del Morfotipo 19 con la vacuola contractil expandida (estrella). Aumento 100X . **28.b.** Individuo mostrado anteriormente del morfotipo 19 con la vacuola contractil retraída. Aumento 100X. **28.c.** Detalle de la vacuola contractil (estrella) y el macronúcleo (círculo) del morfotipo 19. Aumento 400X.

2.3.3. Gremio – Hymenostomatia: protozoarios cuyos cilios corporales son en su mayoría uniformes y abundantes. En ocasiones los cilios caudales se presentan más largos, al igual que los cilios orales los cuales son tetrahymenales, es decir, con tres membranelas y una membrana paroral (Adl y col., 2005).



Figura 29: Ciliado de pequeño tamaño del gremio de los Hymenostomados. **29.a.** Morfotipo 20 al que se le observa el macronúcleo de forma prominente (flecha). Aumento 400X . **29.b.c.** Individuo del morfotipo 20 nadando entre detrito del medio. Aumento 400X.

2.4.Litostomatea: subgrupo de ciliados de formas diversas que en su mayoría son depredadores, aunque un pequeño grupo son endosimbiontes. Presentan la depresión oral en la región apical o subapical. Por otra parte, los cilios están dispuestos en penachos o bandas y pueden estar agrupados con una apariencia similar a las membranelas o cirros de los Spirotrichea. Este grupo de ciliados, se encuentra dividido en dos sub grupos o gremios: los Haptoridos, los cuales son en su mayoría de vida libre y de gran tamaño, ya que son depredadores fuertes, y los Trichostomatidos, los cuales son endosimbiontes del tracto digestivo de algunos vertebrados (Adl y col., 2005).

El morfotipo 21, No presenta representación gráfica.

2.5.Heterotrichea: subgrupo de ciliados relativamente grandes, de forma comprimida o cónica, los cuales se caracterizan por presentar cilios prominentes hacia la zona adoral que bordea la depresión oral, los cuales usan en la locomoción y la alimentación. En el resto del cuerpo los cilios son más mucho más cortos (Lynn, 2003). Otra característica distintiva de este grupo son las diferencias en la división celular, en las que participan el macronúcleo y el micronúcleo. (Adl y col., 2005).



Figura 30: Ciliado de gran tamaño perteneciente al gremio de los Heterotricheos. **30.a.** Grupo de ciliados del Morfotipo 22. Aumento 400X. **30.b.** Macrociliado del morfotipo 22. Aumento 400X. **30.c.** Ciliado del morfotipo 22 en fase final de division por fisión binaria (punta de flecha). Adicionalmente, se observan de forma clara los macronucleos recién formados en cada individuo (flechas). Aumento 400X. **30.d.** Grupo de ciliados del morfotipo 20. Aumento 25X.

### 3. Ameboides:

Grupo diverso de microorganismos caracterizado por su forma cambiante y su desplazamiento a través de proyecciones citoplasmáticas o pseudópodos. Son organismos que pueden estar desnudos o cubiertos por una testa y que presentan una nutrición

heterótrofa, por lo que se alimentan por fagocitosis de bacterias, protozoos o materia orgánica muerta (Chapman, 2009).

Los ameboideos presentaron un total de diez morfotipos diferentes, los cuales fueron agrupados en cinco gremios de acuerdo a características morfológicas. Estos resultados, se muestran en la tabla 3.

3.1. Amebas desnudas: se les denomina así a todas aquellas amebas que presentan un ectoplasma expuesto y no protegido por algún tipo de sustancia o compuesto químico producido por la misma célula. Los gremios de este grupo de microorganismos están considerados a partir de la morfología de sus pseudópodos.

3.1.1. Gremio - Lobopodios: Son amebas que presentan prolongaciones citoplasmáticas que presentan una forma corta y con extremos redondeados.

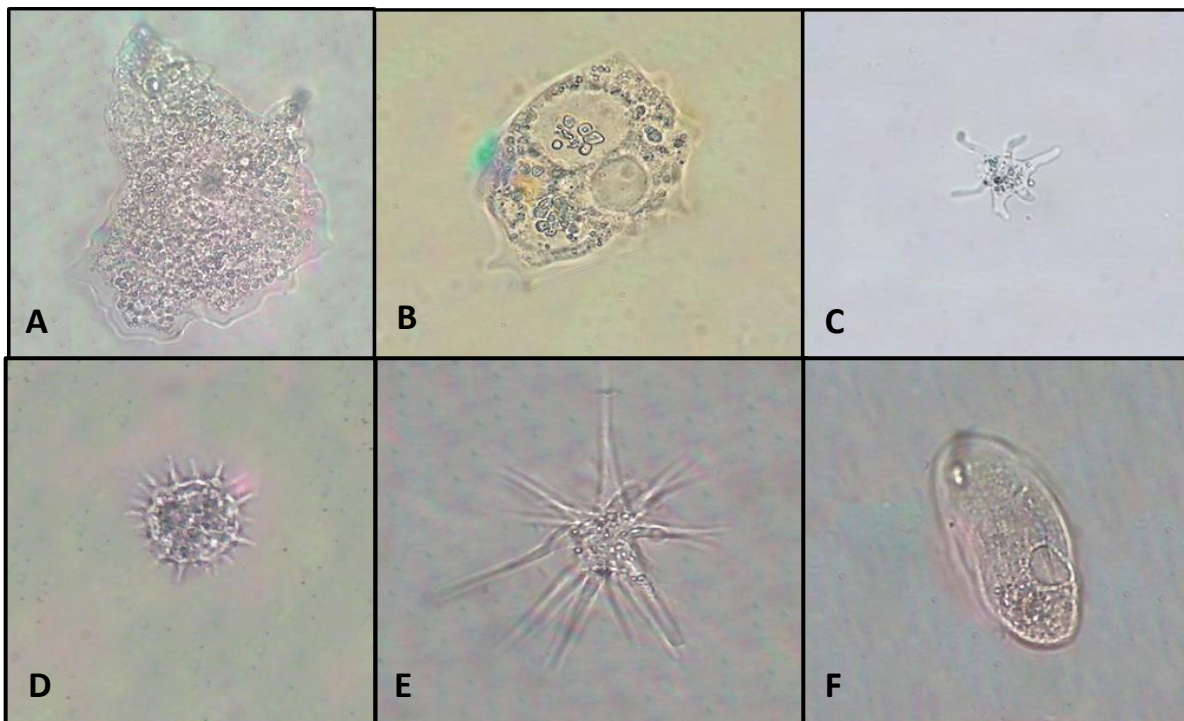


Figura 31: Amebas desnudas de variado tamaño pertenecientes al gremio Lobopodio. **31.a.b.** amebas multinucleadas pertenecientes al morfotipo 23, a la cual se le observa su vacuola contráctil

(flecha) y su núcleo (punta de flecha). De igual forma se observan sus proyecciones citoplasmáticas o pseudópodos del tipo lobopodio (flecha gruesa). Aumento 400X. **31.c.** Morfotipo 24. Ameba de pseudópodos alargados y romos (flecha gruesa). Aumento 400X. **31.d.** Morfotipo 25. Ameba redondeada de pseudópodos cortos y romos (flecha gruesa). Aumento 1000X. **31.e.** Ameba de pseudópodos largos, finos y romos (flecha gruesa). Morfotipo 26. Aumento 1000X. **31.f.** ameba del genero *Thecamoeba* a cual se observa su vacuola contractil (flecha) y sus pseudópodos romos (flecha gruesa). Morfotipo 27. Aumento 400X.

3.1.2. Gremio - Filopodios: Son amebas que presentan prolongaciones citoplasmáticas más finas y con los extremos terminados en punta, los cuales están constituidos principalmente por ectoplasma (Adl y col., 2012).

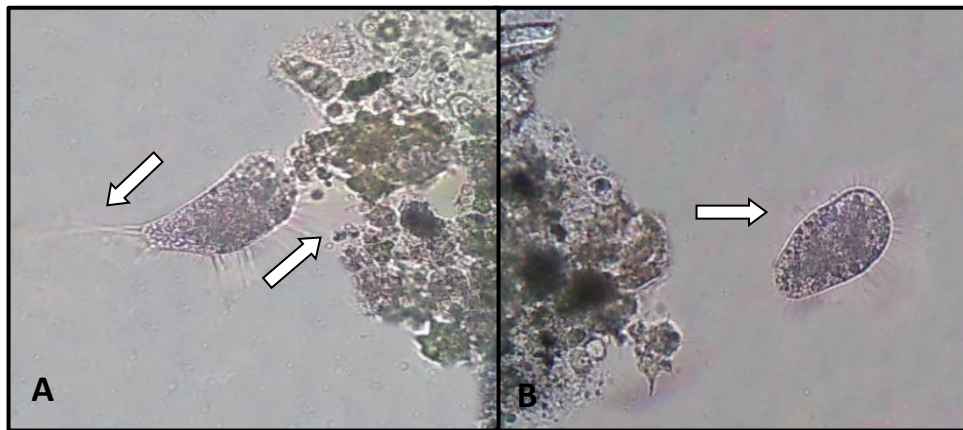


Figura 32: Amebas de la familia Nucleariidae del gremio Filipodio. **32.a.b** Morfotipo 28. Amebas desnudas las cuales presentan pseudópodos largos y delgados denominados filiformes (flecha). Aumento 400X.

3.1.3. Gremio - Actinopodios: Los actinópodos o amebas con axopodios comprenden los dos grandes grupos, los Radiolaria y los heliozoos. Los radiolarios incluyen protistas marinos con esqueletos internos complejos. Por su parte, los heliozoos incluyen especies de agua dulce y marinas que utilizan sus axopodios para capturar pequeñas presas, y presentan solamente escamas o espinas simples como elementos esqueléticos.

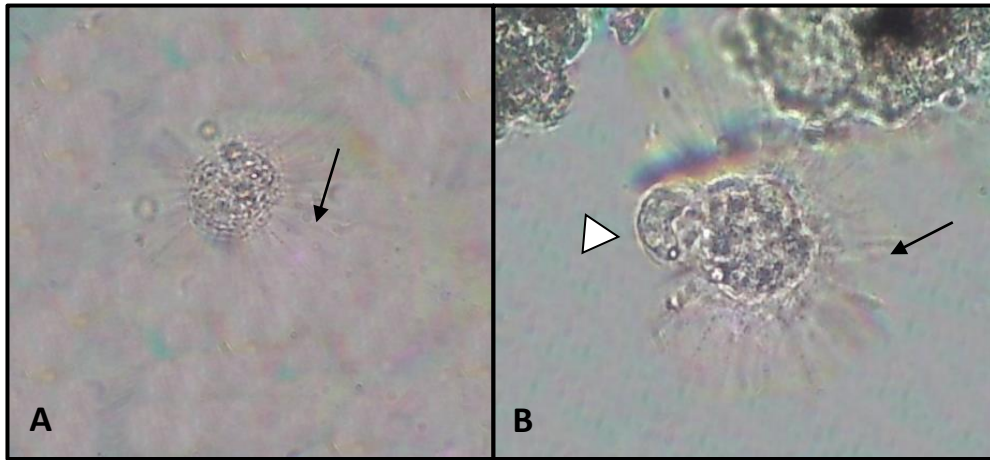


Figura 33: Amebas de la grupo de los radiolarios los cuales presentan actinopodios. **33.a.** Morfotipo 29. Amebas desnudas las cuales presentan actinopodios (flecha). Aumento 400X. **33.b.** Morfotipo 29. Amebas con actinopodios (flecha) capturando a un pequeño ciliado (punta de flecha). Aumento 1000X.

3.2. Amebas testadas: Subgrupo de protozoarios que presentan una teca rígida la cual recubre a la célula. La teca, constituida de material secretado por el mismo microorganismos, puede presentar de sílice, granos de polen, hifas de los hongos y otros detritus orgánicos (Charman, Hendon y Woodland, 2000).

3.2.1. Gremio - Teca circular: Amebas cuya teca presenta forma circular. Además, es fina y resistente, hecha de una sola pieza y con toda la superficie labrada en finísimas punteaduras como poros, que le dan el aspecto malla.

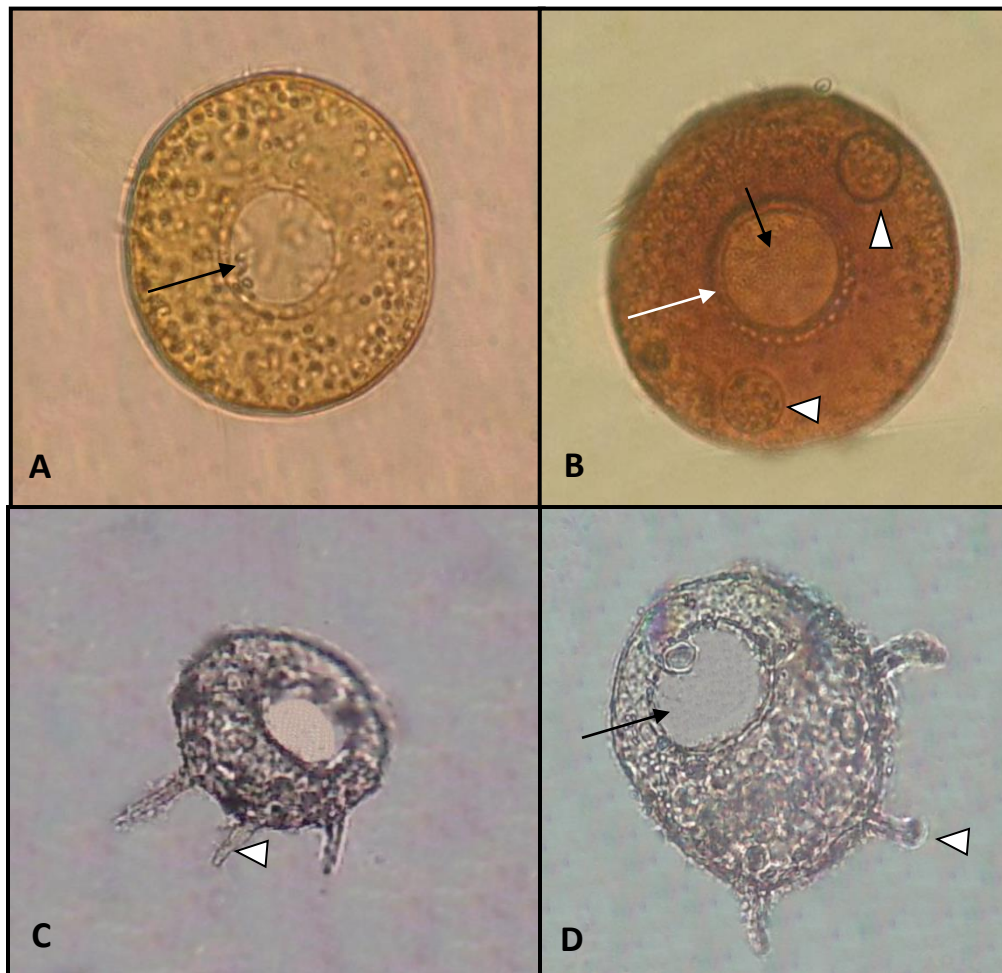


Figura 34: Amebas testadas del gremio testa circular. **34.a.** Ameba testada del género Arcella, la cual presenta un pseudostoma (flecha) Morfotipo 30. Aumento 400X. **34.b.** Ameba testada del genero Arcella, la cual presenta el pseudostoma (flecha), dos núcleos (punta de flecha) y la la membrana que recubre al pseudostoma con sus poros (flecha blanca) Morfotipo 30. Aumento 400X. **34.c.d.** Ameba testada que presenta pseudostoma (flecha) en la parte anterior y proyecciones o espinas (punta de flecha) en la zona posterior de la testa. Morfotipo 31. Aumento: 33.c. 100X. 33.d. 400X.

3.2.2. Gremio - Teca Oval: Amebas cuya teca presenta forma ovalada o abombada y alargada. Esta teca presenta un agujero ventral por el que se emiten los pseudópodos para su desplazamiento y alimentación.



Figura 35: Amebas testadas del gremio testa oval. **35.a..b.** Ameba testada de forma oval que presenta un pseudostoma (flecha) en la region apical y una teca alargada que recubre a la célula (punta de flecha). Morfotipo 32. Aumento 400X.

**III.B. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):** Una vez alcanzado los puntos de máxima abundancia en los medios de cultivo, se realizó un reconocimiento detallado de los microorganismos estudiados. Para esto, fueron procesados y posteriormente observados en un Microscopio Electrónico de Barrido, lo que permitió registrar características morfológicas de los microorganismos de estudio, en un nivel de resolución mucho mayor. Los resultados obtenidos de esta fase, son presentados a continuación.

**Grupo morfológico : Flagelados – Subgrupo: Diatomeas – Gremio: Diatomeas Pennadas.**

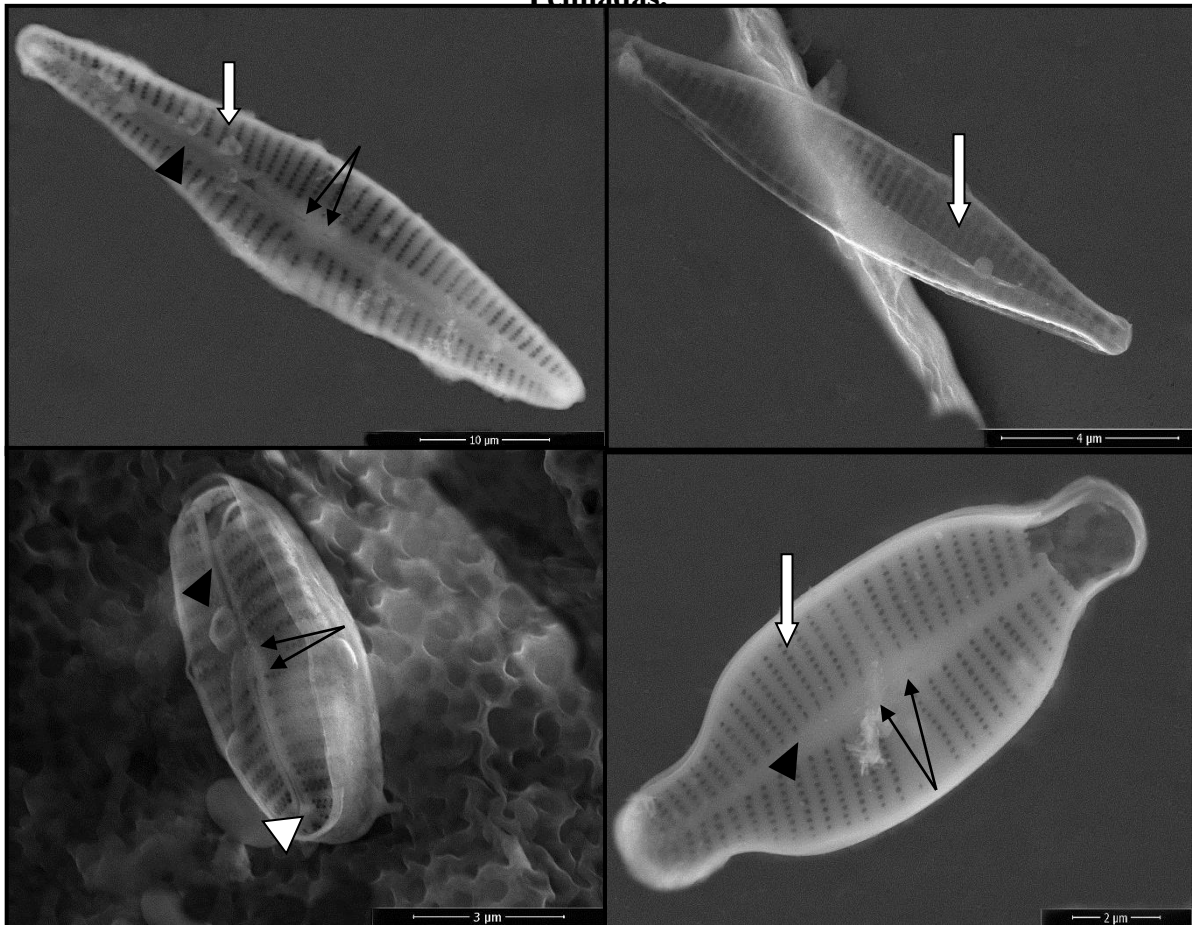


Figura 36: Múltiples formas de diatomeas penadas en las cual son claramente observables aspectos distintivos como el rafe (punta de flecha negra), los nódulos centrales (flachas negras) y los nodulos polares (punta de flecha blanca) que se encuentran a cada extremo del individuo. De igual forma se aprecian los poros o estrías (flecha blanca), los cuales van perpendiculares al plano del rafe. 36.A. Morfotipo 1. 36.B Morfotipo 1\*. 36.C. Morfotipo 5. 36.D. Morfotipo 4.

**Grupo morfológico: Flagelados – Subgrupo: Diatomeas – Gremio: Diatomeas Centrales.**

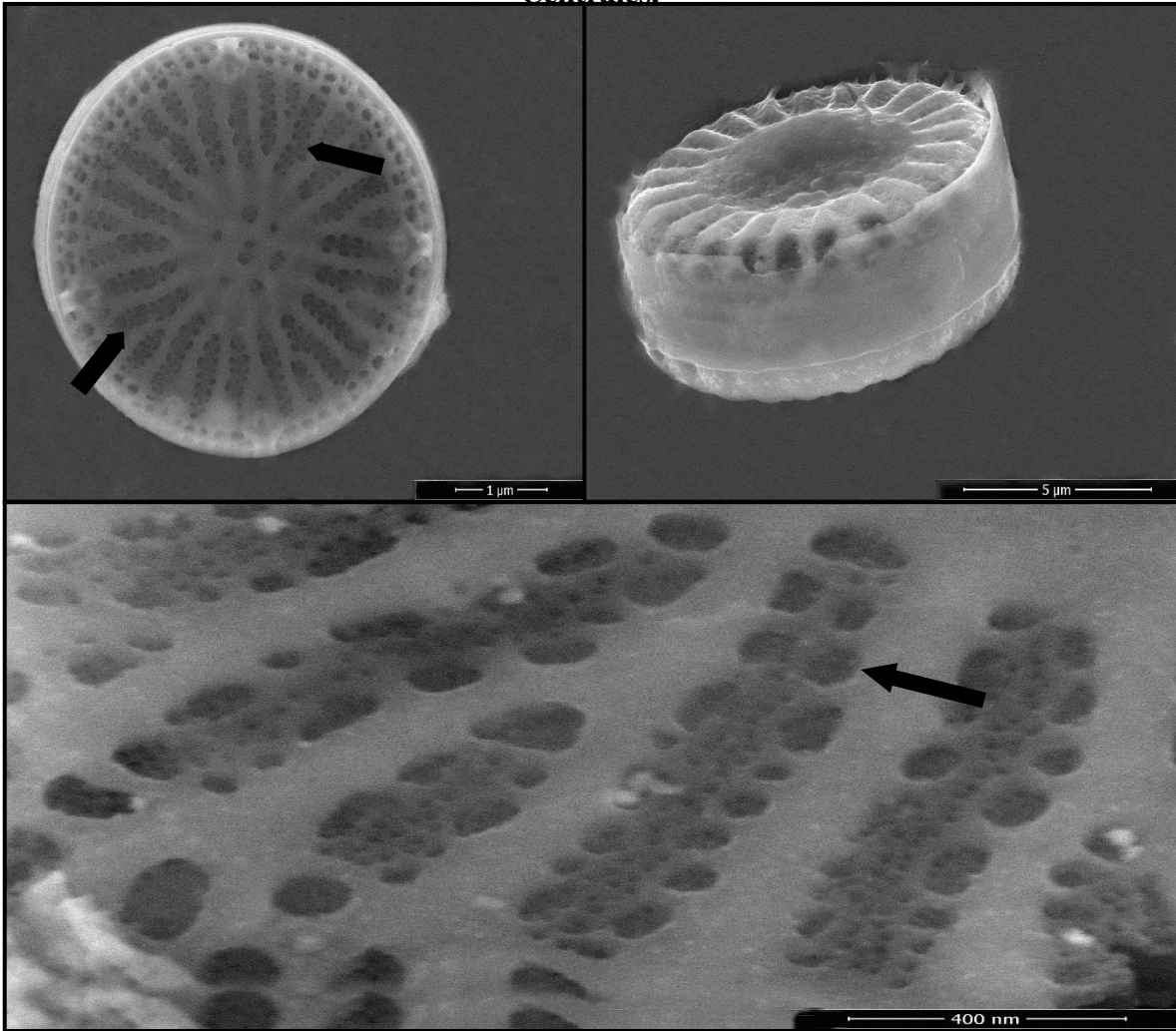


Figura 37: Diatomeas centrales las cuales son distintivamente de forma circular o elipsoide. Estas diatomeas presentan areolas (flecha negra) los cuales son poros o camaras en la superficie de la capsula. 37.A. Morfotipo 6. 37.B Morfotipo 6\*. 37.C. Morfotipo 6.

**Grupo morfológico : Ciliados –Subgrupo - Gremio: Heterotrichea**

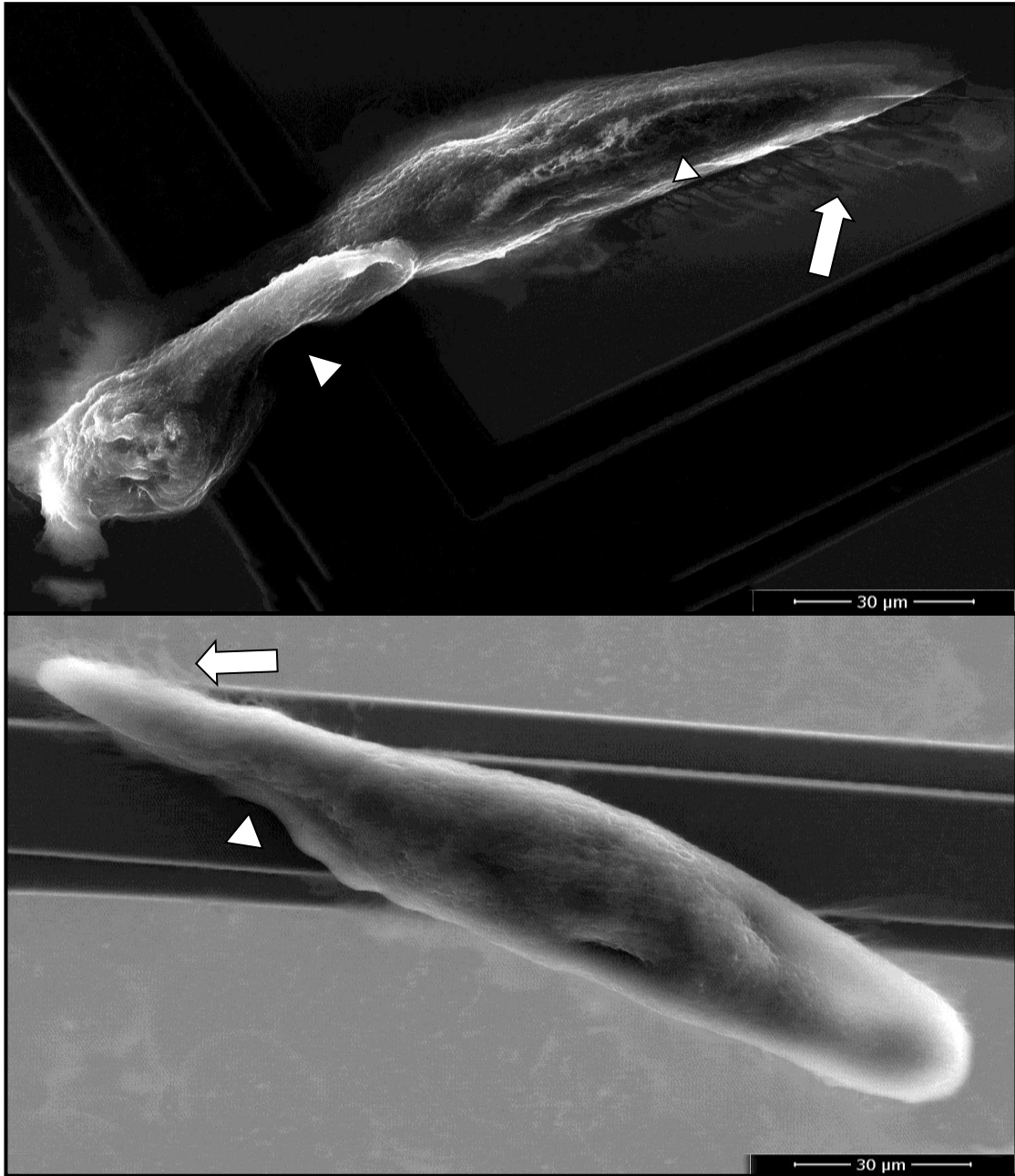


Figura 38: Ciliados del gremio heterotrichea. Ciliados alargados de gran tamaño a los que se le observan el citostoma (punta de flecha) y las cilios corporales (flecha). Figura 38. A.B. Morfotipo 22.

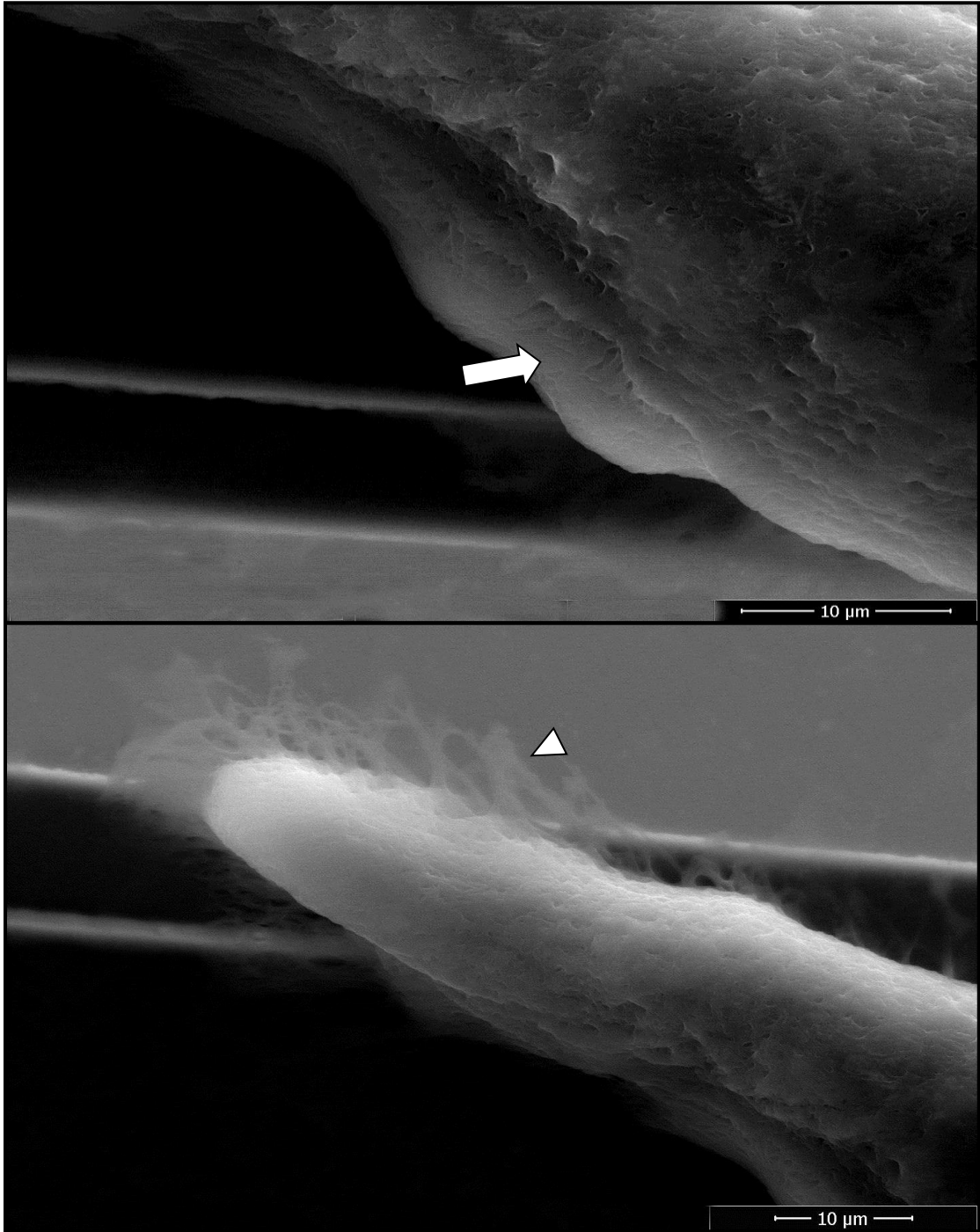


Figura 39: Ciliados del gremio heterotrichea. 39.A. detalle de los cilios de la region oral que bordean el citostoma (flecha). 39.B. Detalle de los cilios (punta de flecha) de la region apical del ciliado. Morfotipo 22.

**Grupo morfológico : Ameboides – Subgrupo: Desnudas – Gremio: Lobopodia**

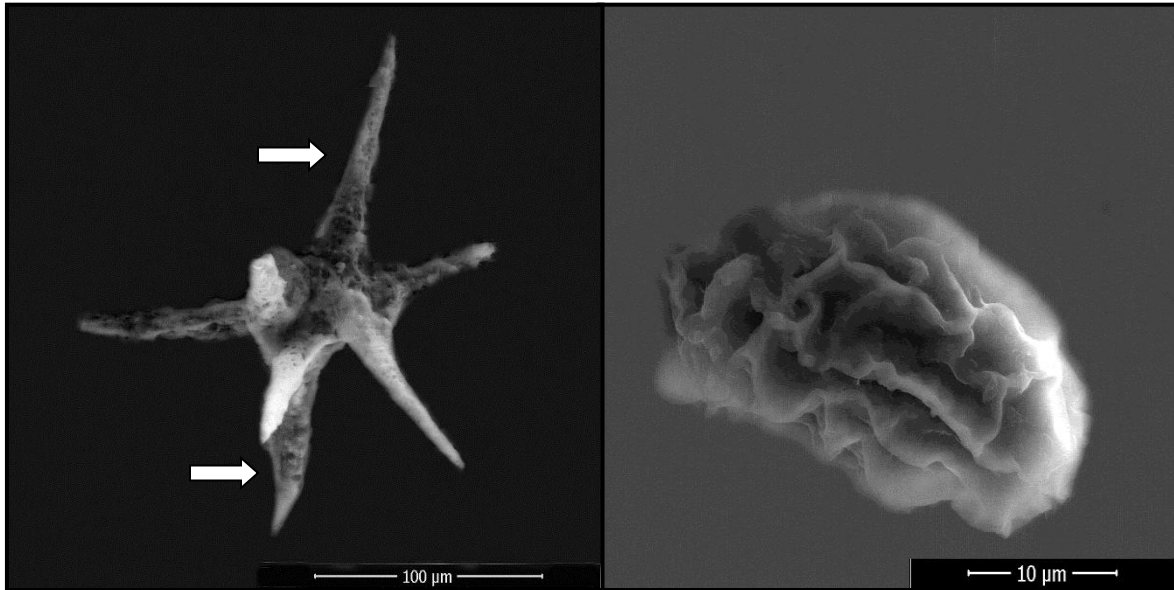


Figura 40: Amebas desnudas del gremio lobopodia. 40.A. Morfotipo 26 el cual presenta pseudopodos (flecha) alargados que terminan de forma roma. 40.B. Estructura general del ectoplasma de una ameba desnuda. Morfotipo 23.

**Grupo morfológico : Ameboides – Subgrupo: Testadas – Gremio: Teca Circular.**

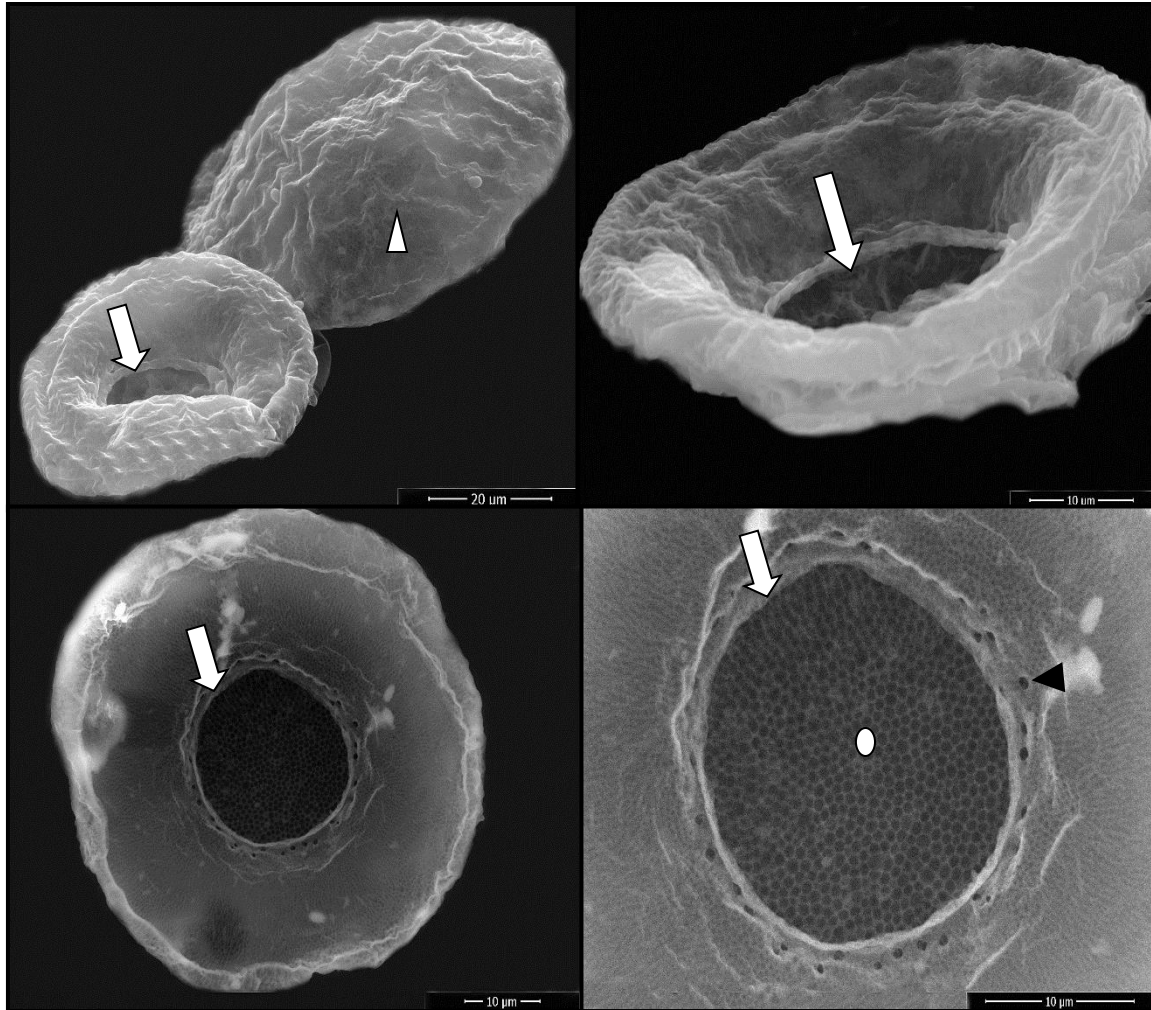


Figura 41: Amebas testadas del gremio Teca circular. 41.A. Individuos del Morfotipo 30 los cuales se encuentran: uno en posición anterior, el cual presenta la abertura del pseudostoma (flecha) y otro en posición posterior, en el cual se observa la membrana del ectoplasma (punta de flecha) de la célula. 41.B.C. Morfotipo 30 al cual se le observa la abertura del pseudostoma (flecha) y la teca redonda que recubre a la célula. 41.D. Acercamiento de la zona oral que bordea al pseudostoma (flecha). De igual manera, se observa una red de celdas (punto) que recubre el pseudostoma y los poros (punta de flecha negra) que se encuentran alrededor de la membrana de la abertura oral.

#### IV. Cultivos Estandarizados en Estudios de Comunidades de Sistemas Naturales Abiertos

La observación y conteo de microorganismos a través de microscopía de luz, se realizó en el mayor nivel de detalle para la identificación, el morfotipo, siendo este a su vez agrupado para los resultados y análisis estadísticos (según fuera el caso) en grupos funcionales o gremio según se observa en la tabla 4. En total fueron contabilizados 20 morfotipos.

Tabla 4. Clasificación y agrupación de los protozoarios de vida libre en este estudio

Grupo morfológico	Sub Grupo	Gremio	Morfotipo
Flagelados	Biflagelados	Cryptophyta	Morfotipo 1
			Morfotipo 2
		Bodonidae	Morfotipo 3
		Euglenido	Morfotipo 5
		-	Morfotipo 6
			Morfotipo 7
Ciliados	Spirotrichea	Hypotrichia	Morfotipo 8
			Morfotipo 9
		Stichotrichia	Morfotipo 10
	-	-	Morfotipo 11
	Oligo*	-	Morfotipo 13
Hymenostomatia		Morfotipo 14	
Ameboides	Desnudas	Lobopodios	Morfotipo 15
			Morfotipo 16
		Actinopodios	Morfotipo 17
	testadas	Teca $\alpha$	Morfotipo 18
			Morfotipo 19
	Teca $\beta$	Morfotipo 20	

(Oligo\*): Oligohymenophorea

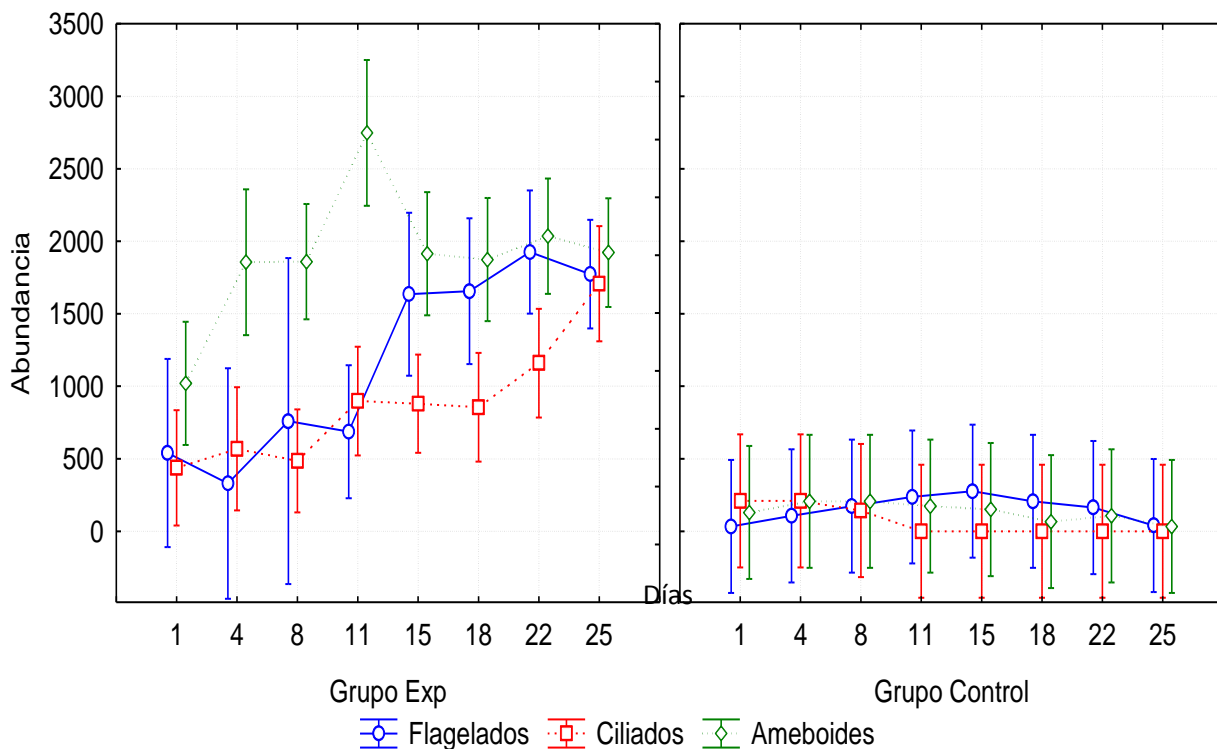


Figura 42: Cinética general de concentración por grupo morfológico para el grupo experimental (A) y el grupo control (B), durante las cuatro semanas de experimentación. Los círculos azules de línea continua, representa a los organismos flagelados, los cuadrados rojos de línea discontinua, representa a los organismos ciliados y los rombos verdes de línea punteada, representa a los organismos ameboides.

Las líneas muestran el curso promedio de la concentración diaria por grupo morfológico en el grupo control y el grupo experimental. Por otra parte, las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos factores ( $\alpha=0.05$ ) realizado sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de los días (Factor 1:  $F=15,89$ ;  $P=0,00$ ) y en el efecto de los grupos experimentales (Factor 2:  $F=11,35$ ;  $P=0,00$ ).

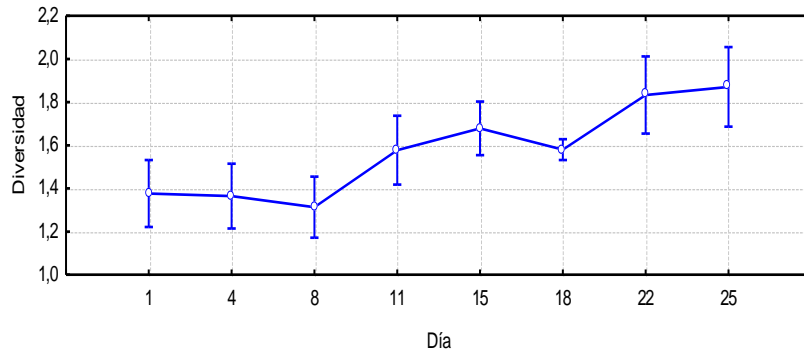


Figura 43: Índice de diversidad de Shannon Wiener aplicado durante el las 4 semanas de experimentación. El círculo azul de línea continua, representa la diversidad por día.

La secuencia muestra los valores promedios del índice de diversidad por cada día de experimentación. Las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de los días (Factor 1:  $F=5,29$ ;  $P=0,002$ ).

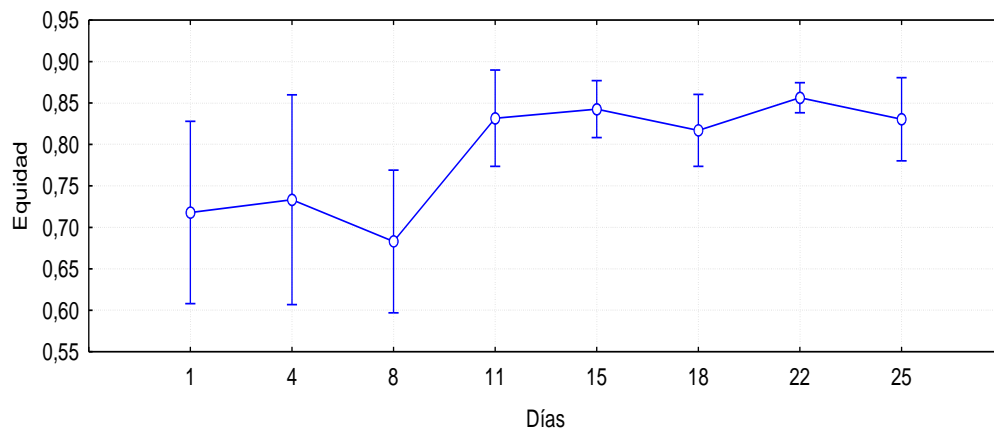


Figura 44: Índice de Equidad de Pielou aplicado durante el las 4 semanas de experimentación. El círculo azul de línea continua, muestra el valor promedio del índice de equidad por día.

La secuencia muestra los valores promedios del índice de equidad por cada día de experimentación. Las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico NO mostró diferencias significativas con  $P > 0.05$  en el efecto de los días (Factor 1).

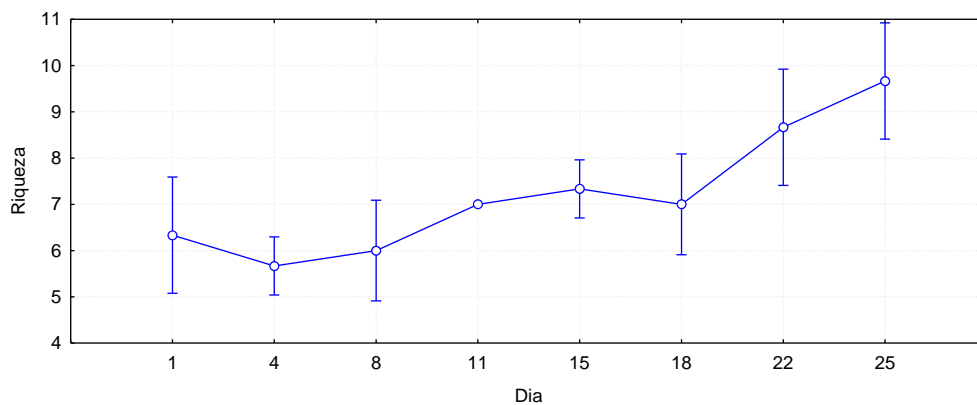


Figura 45: Índice de Riqueza de Margalef aplicado durante el las 4 semanas de experimentación. El círculo azul de línea continua, muestra el valor promedios de la riqueza diaria.

La secuencia muestra los valores promedios del índice de riqueza por cada día de experimentación. Las barras indican el error estándar al 95% de confianza asociado a la media aritmética, cálculo derivado de un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor ( $\alpha=0.05$ ) que se realizó sobre el set de datos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el efecto de los días (Factor 1:  $F=3,48$ ;  $P=0,00$ ).

## DISCUSIÓN

Los protozoarios de vida libre son considerados la base de la evolución de los eucariontes (Álvarez, 2006). Adicionalmente, muestran una amplia variedad de formas y estructuras especializadas lo cual les permite adaptarse a múltiples condiciones por lo que pueden encontrarse en casi cualquier lugar del mundo (Scorza, 1997). Estas cualidades han despertado el interés en estos microorganismos, lo que ha fortalecido el estudio de estos microeucariotas en las últimas décadas.

No obstante, determinar la estructura y composición, así como la dinámica y distribución de las comunidades de protozoarios de vida libre, no ha sido fácil (Curds, 1992; Muylaert y col., 2000). Múltiples estudios han intentado relacionar la estructura de las comunidades de estos microorganismos con las características abióticas del sistema en el que se encuentran (Scorza, 1997; Mayorga y col., 2007; Lozano, 2008). Sin embargo, estudiar estas comunidades requiere de múltiples técnicas y disciplinas que permitan obtener información de interés de la comunidad y de las condiciones físicas del sistema en el que se encuentran.

En este sentido, la aplicación de técnicas y métodos que permitan y faciliten el estudio de microorganismos de forma eficiente, se hace cada vez más relevante (Ramírez y col., 2000). La posibilidad de recrear las condiciones de los sistemas naturales en los que se encuentran estos microorganismos, bajo condiciones de laboratorio (*in vitro*), permitirá ampliar los conocimientos en torno a la enorme diversidad de estos microorganismos y su controversial taxonomía, generando aportes en las líneas de investigación que se encargan de estudiar el rol funcional de estos microorganismos en los sistemas naturales, los ciclos de nutrientes y la transformación y descomposición de la materia orgánica, entre otros (Vaerewijck, 2015).

Por otra parte, permitirá generar notables contribuciones en el ámbito educativo, en la aplicación de múltiples prácticas de laboratorio (Piedrahita, 2013), y ecológico, como

indicadores biológicos de contaminación en cuerpos de agua, así como indicadores de las condiciones del suelo (Petz, 1997). Además, permitirá generar importantes aportes en el sector ganadero (Ley de Coss, 2011), y económico, en la nutrición de las primeras fases de vida de la mayoría de las crías de peces y camarones.

### **I. Selección de la Composición General del Medio.**

Obtener una muestra de protozoarios de vida libre es relativamente sencillo, ya que pueden ser colectados en casi cualquier hábitat como estanques, arroyos, cuerpos transitorios de agua o ambientes astáticos. No obstante, los protozoarios que allí se encuentren solo permanecerán un corto periodo de tiempo fuera de su ambiente natural, además de que presentarán una baja abundancia, lo que puede dificultar su estudio (Littlerford, 1980).

Partiendo de esto, el objetivo de este trabajo consistió en obtener un medio de cultivo cuya composición permitiera obtener la máxima abundancia de especies mixtas de protozoarios de vida libre, los cuales fueron recogidos a partir de un sistema natural abierto y llevados al laboratorio para su estudio.

En función de esto y partiendo de que diferentes tipos de organismos necesitan diferentes tipos de nutrientes, fueron seleccionados tres grupos experimentales de composición variable (ver tabla 2), para evaluar la abundancia y el desarrollo de estos microorganismos en cada uno de ellos. Para la selección de estos grupos de medios de cultivo fueron considerados los requerimientos nutricionales que le suministren energía a los microorganismos para sus procesos de biosíntesis.

De acuerdo con esto, el fósforo (P) junto con el nitrógeno (N) son macronutrientes esenciales para el desarrollo de todos los microorganismos, los cuales intervienen en

diferentes procesos enzimáticos y en la fermentación de los carbohidratos estructurales (Durand y col., 1983; Komisarczuk y Durand, 1991). De igual manera, forman parte del material celular, como ácidos nucleicos, ATP y fosfolípidos de la membrana celular (Madigan y col., 2004). Estos aspectos, fundamentan la selección del grupo de medios de cultivo experimental 1, el cual presenta en su composición estos macronutrientes esenciales.

Por su parte, el carbono (C) es el principal elemento de todas las clases de macromoléculas y representa el 50% del peso seco de una célula típica (Madigan y col., 2004). La glucosa es un monómero carbonado la cual es considerada como la principal fuente de energía de la mayoría de los organismos, lo cual la convierte en uno de los componentes principales del grupo de medios de cultivo experimental 2.

Por otra parte, el tercer grupo de cultivo experimental presenta macronutrientes como el calcio (Ca), potasio (K) y sodio (Na), los cuales son a grosso modo, esenciales para el desarrollo de cualquier tipo de organismos y tienen participación en procesos metabólicos, síntesis de proteínas y transporte de nutrientes (Madigan y col., 2004).

Los resultados obtenidos en este experimento son claramente observados en la figura 9, en la cual se aprecia que los medios de cultivo de los grupos experimentales 1 (fosfatados) y 2 (fosfatados + glucosa) presentaron las abundancias de protozoarios de vida libre más baja.

En este sentido, los resultados observados en la figura 9, pueden ser explicados a partir de la disponibilidad de los nutrientes en estos medios de cultivo y la forma en la que los microorganismos presentes en ellos los aprovechan. Es importante señalar que al tratarse de sistemas abiertos, en estos medios de cultivo coexisten múltiples formas de microorganismos, las cuales incluyen, protozoarios, bacterias, rotíferos, etc.

Partiendo de esto, el metabolismo microbiano es el conjunto de procesos por los cuales un microorganismo obtiene la energía que necesita para vivir (Madigan y col., 2004). En este sentido, podemos definir la nutrición microbiana como el proceso en el que se le suministra a las células los compuestos químicos que necesitan para transformarlos en monómeros, siendo la glucosa el más común de ellos (Alberts y col., 2008). Por lo tanto, al encontrarse en el medio de forma libre puede ser aprovechada de forma directa por células como las bacterianas sin esfuerzos ni limitaciones.

Las bacterias pueden asimilar compuestos orgánicos carbonados y nitrogenados, los cuales se encuentran presentes en forma de aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y ácidos nucleicos, entre otros, los cuales son necesarios para su existencia. Además los compuestos orgánicos carbonados y nitrogenados representan el 50% y 12%, respectivamente del peso seco de una célula bacteriana (Madigan y col., 2004). Todos estos aspectos, impulsaron el crecimiento bacteriano de forma exponencial sobre el crecimiento de los protozoarios de vida libre, los cuales se presume fueron desplazados de estos medios de cultivo, señalando que los tiempos de generación bacterianos son mayores que los que presentan los protozoarios en estudio (Madigan y col., 2004; Denton y col., 2014), lo que pudo favorecer aún más el crecimiento de los procariontes y no de los protozoarios.

Una forma de sustentar estos resultados es a través de la turbidez de los medios de cultivo, la cual fue monitoreada semanalmente de forma cualitativa. Esta nos permite tener una aproximación de los cambios en la turbidez por semana de experimentación y en cada medio de cultivo, los cuales de acuerdo con Madigan y col. (2004) representa “un método rápido y útil de obtener una estimación del número de células presentes en una solución”. Además, la observación directa a través de microscopía de luz confirmó la presencia de las células bacterianas en estos medios de cultivo.

En contraste con esto, un estudio reciente señala que existen protozoarios que tienen la capacidad de integrar y asimilar reservas de carbono, incluso en mayor cantidad que las

bacterias (Denton y col., 2014). Este uso del sustrato (hidratos de carbono) de reserva puede explicar cómo pueden persistir varios grupos de protozoarios que crecen en condiciones abióticas adversas.

Sumado a lo expuesto, es importante señalar que la alta producción de células bacterianas en los sistemas naturales, promueve el desarrollo de protozoarios depredadores de bacterias, como los biflagelados o pequeños grupos de ciliados (Lozano, 2008). Sin embargo, la producción de células bacterianas en estos grupos de medios de cultivo, resultó ser excesiva lo cual condujo a un posible desplazamiento por competencia de recursos por parte de las bacterias hacia los protozoarios.

Por otra parte, se observa un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la abundancia de protozoarios de vida libre en los medios de cultivo del grupo experimental 3 (ver figura 9). Estos medios presentaban macronutrientes como el sodio (Na), el calcio (Ca) y el potasio (K), que se encuentran relacionados con la síntesis de proteínas y el transporte de nutrientes (Madigan y col., 2004), lo cual puede ser favorable para procesos como el de pinocitosis en algunos microorganismos.

Al igual que en el caso anterior, fueron reportadas poblaciones bacterianas, que se observaron a través de microscopia de luz y los cambios observados de forma cualitativa en la turbidez. Sin embargo y a pesar de tener una densidad poblacional alta, su crecimiento no resultó ser exponencial como en el caso anterior, lo que permitió que la población bacteriana, se mantuviera regulada de forma natural por la comunidad de protozoarios heterótrofos presentes en el medio de cultivo, lo cual es congruente con el trabajo de Lozano (2008).

En este punto, es importante señalar que la presencia de organismos procariontes como las bacterias, favorece la producción de una alta cantidad de materia orgánica o detritus, lo cual favorece la reproducción de diversos protozoarios heterótrofos como los flagelados,

que de acuerdo a trabajos recientes (Muylaert y col., 2000; Lozano, 2008) son los primeros en colonizar cuerpos de agua dulce con condiciones fisicoquímicas óptimas. Posteriormente, aparecen otros depredadores, como los ciliados y otros flagelados de mayor talla, mientras que los ameboides pueden presentar una distribución más heterogénea y poco constante (Anderson, 2002; Bischoff, 2002).

Este proceso de aparición progresiva de organismos, gremios o grupos funcionales en hábitats particulares, se fundamenta en el concepto de sucesión (Begon, 1999). Esto fue corroborado en los resultados presentados en la figura 10.C, en donde se observa una sucesión temporal de los microorganismos presentes en la comunidad de protozoarios de vida libre, los cuales fueron agrupados en forma flageladas, ciliadas y ameboideas, como se aprecia en la tabla 3.

Finalmente, todos estos resultados y consideraciones permitieron concluir que el grupo experimental de medios de cultivos donde se obtuvo la mayor abundancia de protozoarios de vida libre fue el grupo experimental 3. Estos resultados, se sustentan gracias a diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dentro de los grupos (ver figura 12), en donde se aprecia que el medio de cultivo 5, fue el que permitió el desarrollo de protozoarios de vida libre de forma óptima, favoreciendo la abundancia y manteniendo de forma constante los patrones sucesionales observados en la naturaleza.

Es importante destacar, que existen factores fisicoquímicos como el pH y la temperatura, los cuales deben ser considerados a la hora de realizar estandarizaciones en medios de cultivos como estos ya que los mismos podrían afectar de forma significativa la comunidad de microorganismos presentes en estos sistemas (Donald y col., 2007). De acuerdo con esto, se realizaron mediciones de la variable pH a lo largo del tiempo de experimentación y en cada uno de los medios de cultivo, las cuales se aprecian en la figura 11. Estos resultados, presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las semanas de

observación y los grupos experimentales de cada medio de cultivo. Por otra parte, es importante acotar, que todos los medios de cultivo se mantuvieron a temperatura ambiente constante, la cual fluctuó entre los 20-26 °C durante el tiempo de experimentación. Estos aspectos serán ampliamente discutidos en el próximo capítulo.

## **II. Viabilidad del Medio bajo Condiciones Físicoquímicas Establecidas.**

Múltiples han sido los estudios que a lo largo de las últimas décadas, han intentado relacionar la estructura de la comunidad de protozoarios de vida libre en sistemas naturales con las características físicoquímicas del sistema en el que se encuentran (Maguire, 1971; Petz, 1997; Mayorga y col., 2007; Weisse, 2008; Ávila y col., 2009). Estos han permitido establecer las condiciones físicoquímicas estables que permiten el crecimiento de protozoarios de vida libre en condiciones de cultivos (Littleford, 1960; Ling Tan y col., 2005; Ley de Coss y col., 2011; Piedrahita, 2013).

Partiendo de estas observaciones, el objetivo de este ensayo consistió en establecer las condiciones de los parámetros físicoquímicos como el área, el pH y la temperatura, tales que permitieran obtener la máxima abundancia de especies mixtas de protozoarios de vida libre en medios de cultivo de composición conocida.

En virtud de esto, es relevante considerar que durante el crecimiento y desarrollo de protozoarios de vida libre, el metabolismo energético es casi linealmente proporcional a la de velocidad de crecimiento (Fenchel, 1983). En este sentido, los procesos de respiración celular en estos microorganismos se realizan por medio de la difusión pasiva de gases u otras sustancias a través de la membrana plasmática, dependiendo de si son aerobios o anaerobios.

Sobre la base de las ideas expuestas, se planteó iniciar este ensayo realizando modificaciones en la variable área, ya que al considerar frascos de áreas y formas diferentes se modifica la superficie de intercambio aire-agua, lo que podría sugerir cambios en la composición de la comunidad de protozoarios de vida libre al modificar dicho parámetro.

En efecto, los resultados mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las variables de estudio (ver figura 13), encontrando que los frascos con áreas mayores, presentaron los valores de abundancia total de protozoarios de vida libre más altos. Estos resultados son similares a los reportados por Andrade-Fernandez y col. (2009) quienes reportaron diferencias significativas en cuanto a la abundancia total y la riqueza de microeucariotas de vida libre al realizar variaciones del área de estudio. Adicionalmente demostraron que el material utilizado para la experimentación no afecta de forma significativa las variables estudiadas.

De igual forma, estos resultados son consistentes con lo observado en la naturaleza, ya que Lozano (2008) describe resultados similares en un sistema de fitotelmata natural en brácteas de *Heliconia sp* reportando mayor abundancia y diversidad de protozoarios de vida libre en las brácteas que presentaban mayor área y profundidad. De igual forma, Lozano (2008), reporta diferencias en la composición de estos microorganismos dependiendo de su ubicación en la columna de agua presente en los sistemas de brácteas.

Además, los microorganismos presentes en los frascos con mayores áreas, presentaron aparición progresiva o sucesión (proceso explicado recientemente en el capítulo anterior), presentando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las áreas de estudio (ver figura 14).

Todos estos resultados sustentan la selección de los frascos con mayores áreas, lo cual favorece la hipótesis de que a mayores áreas se favorece una mayor superficie de

intercambio gaseoso con el medio, lo que favorecerá una mayor abundancia de protozoarios de vida libre.

Otras de las variables fisicoquímicas consideradas en este estudio, fueron el pH y la temperatura, las cuales son consideradas como factores abióticos importantes ya que podrían afectar la a la comunidad de protozoarios de vida libre (Donald y col., 2007).

De acuerdo con esto, es importante señalar que la temperatura es un factor abiótico que regula la mayoría de los procesos vitales en todos los organismos vivos, así como las propiedades de otros factores abióticos en un ecosistema (Fuentes y Massol-Deyá, 2002). En este sentido, es evidente que la temperatura es uno de los principales factores que controlan el metabolismo de los protozoarios de vida libre, lo cual puede ser evidenciado en factores como la abundancia de estos microorganismos entre otros. Así, se reflejan en los resultados que los mayores valores de abundancia fueron reportados a temperatura ambiente, mientras que a temperatura de 30°C constante se reportaron las abundancias más bajas (ver figura 15). Estos resultados son cónsonos con lo postulado por Littlerford (1960) quien asegura que se pueden mantener protozoarios de vida libre en el intervalo promedio de la temperatura ambiente (entre 18.3 – 24.4 °C). Sin embargo, a temperaturas inferiores a los 11.6 °C y superiores a los 30°C, el crecimiento cesa y la comunidad declina

Por otra parte, en su concepción más amplia entendemos el término pH como la concentración del ion hidronio en una solución. A niveles ecofisiológicos, el pH es un factor abiótico que regula procesos mediados por enzimas, la disponibilidad de nutrientes esenciales que limitan el crecimiento microbiano en muchos ecosistemas y la función de macromoléculas y orgánulos (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

Partiendo de esto, observamos los efectos de la variable pH, en los resultados de experimentación, donde se reportan mayores valores de abundancia de protozoarios de vida

libre a pH neutro (ver figura 15), lo cual es consistente con lo propuesto por Littlerford (1960) y Lozano (2008), quienes aseguran que los valores más altos de abundancia de protozoarios de vida libre, por lo general se observan cercano a la neutralidad (pH 6.8 – 7.2).

Estos resultados pueden ser estudiados de forma más amplia en la figura 16, en la cual se desglosa la cinética de crecimiento de estos organismos por grupo morfológico, lo cual nos permite entender la dinámica de esta comunidad al realizar modificaciones en las variables abióticas señaladas.

Para comprender mejor estos efectos, es importante señalar que estos resultados son consecuencia de la acción conjunta de las variables. Es decir, no es una sola variable actuando en los medios de cultivo de forma aislada, sino que por el contrario, las mismas interactúan y estas estrechamente relacionadas, lo que permite que los microorganismos respondan a las variaciones y/o modificaciones de las mismas, como ocurre en un sistema natural. En este sentido, los cambios en la temperatura afectarán directamente a la constante de disociación del agua, por lo tanto, los cambios en la variable temperatura repercutirán de forma directa, en cambios en las concentraciones relativas de los iones hidronio e hidroxilo, es decir, en el pH (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

De igual forma, es importante destacar que el pH es una variable moduladora de la dinámica poblacional de estos microorganismos ya que genera cambios en el sistema que repercuten en todo el microhábitat circundante (Muylaert y col., 2000; Donald y col., 2007). Estos cambios favorecen los procesos de sucesión explicados anteriormente, lo que permite que la comunidad cambie en el tiempo.

Estos cambios, no solo se reflejan en la composición de la comunidad, sino que conlleva a cambios en los parámetros fisicoquímicos como el pH, la turbidez, la salinidad y la temperatura en un sistema natural (Lozano, 2008). Por lo tanto, condiciones

fisicoquímicas establecidas producirán respuestas sucesionales diferentes, lo cual es cónsono con lo expuesto anteriormente por Muylaert y col., (2000).

Por su parte, Krivtsov y col., (2003) reportaron mayores valores de abundancia de los microorganismos flagelados tanto autótrofos como heterotróficos en las primeras etapas de la sucesión, caracterizada por presentar valores de pH ácidos. Este es un patrón claramente observado en la figura 16.A, en donde a pH 5.5 y temperatura ambiente, se mantiene dominante la comunidad de organismos flagelados, lo cual se favorece ya que a pH ácido se promueve la producción de materia orgánica y células bacterianas, las cuales promueven el crecimiento de los flagelados (Muylaert y col., 2000). No obstante, al incrementar los valores de pH a 7 y 8.5 observamos que la respuesta sucesional cambia, siendo ésta similar a la reportada por Lozano (2008).

Por otra parte, es importante señalar que valores extremos de temperatura pueden traer consecuencias en el metabolismo, la nutrición y la reproducción de los microorganismos, lo cual se puede traducir en una reducción de la abundancia de protozoarios y el posterior declive de la comunidad (Littlerford, 1960). Este es un patrón que se observa de forma clara en la figura 16.B. en donde se observa una disminución proporcional de la abundancia de microorganismos con relación a la temperatura ambiente independientemente del valor de pH.

No obstante, se hace notar que a pH 5.5 la comunidad muestra indicios de mantener el patrón sucesional descrito anteriormente, observando protozoarios flagelados en las primeras etapas de la sucesión (Krivtsov y col., 2003), los cuales pudieran estar relacionados a poblaciones de microorganismos resistentes o termófilas que pueden sobrevivir en condiciones primitivas. Sin embargo, esta tendencia se ve mermada por causa de las altas temperaturas, lo cual produce una notable disminución de la abundancia de protozoarios de vida libre.

Finalmente y hasta los momentos hemos venido estudiando los efectos que tiene las variables fisicoquímicas como el área de la superficie de intercambio aire-agua, el pH y la temperatura, sobre la comunidad de protozoarios de vida libre en los medios de cultivo, a través de la abundancia total de protozoarios, la cual en su concepto más amplio se entiende como la cantidad de individuos presentes en una dimensión espacio-temporal definida (Rico y Fernandez, 2010). Sin embargo, existen otras formas de estudiar la estructura de una comunidad, como por ejemplo, la diversidad, la equidad y la riqueza de especies, las cuales son parámetros ecológicos que nos dan una idea sobre cómo se encuentra estructurada la comunidad en estudio (Moreno, 2001).

Partiendo de lo antes expuesto, entendemos la diversidad de especies como una propiedad intrínseca de las comunidades bióticas, la cual se relaciona con la variabilidad dentro de ellas. Este atributo, se basa en la expresión de dos componentes principales, el primero es el número de especies presentes en la comunidad, el cual se denomina riqueza de especies. El segundo es la equidad, la cual describe la distribución de la abundancia entre las especies que conforman la comunidad (Pla, 2006).

De allí pues, que se calcularon índices de diversidad, equidad y riqueza (ver figuras 17, 18 y 19) las cuales muestran patrones similares entre sí, ya que son medidas que se encuentran relacionadas.

### **III. Identificación y Clasificación de Protozoarios de Vida Mediante el Uso de Técnicas de Microscopía.**

El estudio e investigación de microcomunidades por lo general requieren un abordaje multidisciplinario que difiere del aplicado en los estudios de organismos superiores. En este sentido, es imperante el uso de múltiples técnicas y disciplinas que

permitan y faciliten la comprensión del estudio de estos microorganismos y el micromundo que conforman (Laybourn-Parry, 1984).

Partiendo de esta idea, la estandarización de las condiciones de un medio de cultivo que permitieran obtener la máxima abundancia de especies mixtas de protozoarios de vida libre, fue realizada con la finalidad de poder profundizar en la identificación de estos microorganismos, estudiando su morfología y ultraestructura a través del uso de técnicas de microscopía y de esta manera generar aportes y conocimientos pertinentes que ayuden a llenar los grandes vacíos de información existentes en torno a estos grupos.

En este sentido, resulta claro que al tratarse de protozoarios de vida libre, el uso de microscopía óptica se hace indispensable, la cual actúa como herramienta en la descripción e identificación de estos microorganismos. Sin embargo, en algunos casos es necesario el uso de técnicas de microscopía electrónica, las cuales brindan un poder de resolución mayor y permiten profundizar en aspectos morfológicos y estructurales que pueden ser determinantes en la identificación de un microorganismo (García y col., 1993).

Partiendo de lo expuesto, la microscopía electrónica de barrido (MEB) proporciona una profundidad de enfoque notable, confiriendo tridimensionalidad en la percepción de las imágenes, lo cual la convierte en un excelente complemento en la descripción morfológica e identificación de estos microorganismos (Karp, 2009).

Como se puede inferir, los resultados registrados en este capítulo, se derivan de la observación de estos microorganismos a través del microscopio óptico (figuras 20-35) y el microscopio electrónico de barrido (figuras 36-41) y a partir de la información obtenida de las observaciones realizadas de estos organismos; los mismos fueron agrupados de acuerdo a grupos morfológicos: como los flagelados, los ciliados y los ameboides, y en gremios, de acuerdo a características en común dentro del grupo (tabla 3).

En este sentido, la idea de clasificar funcionalmente a los organismos de una comunidad se remonta a los años 372-287 a. C. (Gitay y Noble, 1997). Sin embargo, el concepto de grupo morfológico fue desarrollado mucho después, como una forma de contribución a los estudios de comunidades vegetales, permitiendo clasificar a los organismos de acuerdo a factores que determinan la vegetación (Lavorel y col., 1997; Smith y col., 1997).

Posteriormente, los ecólogos introdujeron el uso de los grupos funcionales como forma de agrupar los organismos dentro de las comunidades de estudio, esto con la intención de simplificar la complejidad de los sistemas ecológicos (Steffen y col., 1992). Además, el uso de los grupos funcionales como forma de agrupar a los organismos trasciende los límites taxonómicos y responden de manera predictiva ante factores ambientales (Andersen 2000).

No obstante, la identificación de los grupos funcionales debe estar basada en un buen conocimiento de la historia natural de cada uno de sus componentes sin desligarnos totalmente del linaje evolutivo y la morfología (Chapin III y col., 2002; Cardona, 2014).

Por otra parte, también se puede conocer la organización de las comunidades animales dividiendo sus niveles tróficos en gremios, que de acuerdo con Root (1967) se define como "un grupo de especies que explotan por igual los mismos recursos ambientales o bien las especies que se solapan significativamente en los requerimientos de su nicho".

En este punto, es importante señalar que el concepto de grupo morfológico es flexible y en la actualidad no existe una clasificación funcional de las especies que sea universal (Gitay y Noble, 1997). No obstante, las categorías de grupos funcionales y gremios (tabla 3) utilizados en esta investigación, no solo constituyeron una forma sencilla y didáctica de agrupar a los microorganismos, sino que la mayoría de ellos presentó una

estrecha relación con los trabajos sobre linaje evolutivo expuestos en los trabajos de Simpson y Roger (2004) y Adl y col. (2005).

Inicialmente los microorganismos en estudio fueron agrupados bajo la categoría de grupos funcionales, como los flagelados, los ciliados y los ameboides. Posteriormente, el estudio detallado de las características diagnósticas de estos microorganismos (a través del uso de microscopía óptica y electrónica), permitió observar pequeñas diferencias dentro de cada grupo morfológico, lo cual promovió el reagrupamiento de estos microorganismos en sub categorías más específicas, como los subgrupos funcionales y los gremios.

En este sentido, la presencia de un flagelo que interviene en los procesos de alimentación y locomoción de los organismos flagelados, representó la principal característica que permitió agrupar a estos microorganismos y conformar el primer grupo morfológico de esta investigación. Posteriormente, los flagelados se subdividen en dos subgrupos funcionales que son las diatomeas y los biflagelados.

Por una parte, las diatomeas son algas microscópicas cuya principal característica es la presencia de dos valvas de sílice o frústula (Illana, 2008), las cuales pueden presentar patrones simétricos de líneas transversales o estrías cuando se observan al microscopio óptico (Round y Crawford, 1990), como fue el caso de la figura 20. Sin embargo, al observar con mayor detalle la morfología de estos microorganismos a través de la microscopía electrónica de barrido, se lograron apreciar claras diferencias en la forma del frústulo, pudiendo ser alargado/pennado, las cuales presentan en su mayoría una fisura a lo largo del eje longitudinal de la valva denominada rafe, o pueden ser circulares/centrales, los cuales presentan una forma redondeada y no presentan rafe en su morfología.

Estas características cada vez más distintivas y específicas para el subgrupo de las diatomeas, permitieron ubicar a los morfotipos 1, 2, 3, 4 y 5 dentro del gremio de las

diatomeas penadas, mientras que el Morfotipo 6, se agrupó dentro del gremio de las diatomeas centrales (tabla 3).

Por otra parte, los biflagelados son protozoarios cuya característica principal es que presentan dos flagelos, uno anterior y otro recurrente (Patterson, 1999). Por lo general, uno de estos flagelos suele ser mastigomenado, es decir, que posee mastigomenas o fibrillas que salen del flagelo cuya función es asistir u orientar el movimiento, incrementando el área del flagelo (Hoek y col., 1995). No obstante, existen otras características como la rigidez de la membrana celular y la forma de los biflagelados las cuales pueden ser determinantes en la identificación de estos microorganismos.

En este sentido, se logró dividir a los biflagelados en tres gremios de clasificación, como fueron las Criptofitas, que son un pequeño gremio de algas unicelulares biflagelares, las cuales presentan un flagelo mastigomenado, una membrana celular rígida y una invaginación ventral distintiva de donde proviene su nombre (Adl y col., 2005). Por su parte, los Bodonides, son un gremio aún más pequeño, característicos por su forma redondeada, además de presentar cercanía evolutiva con el género *Trypanosoma sp.* Finalmente, los Euglénidos son considerados biflagelados fotosintéticos que presentan un bolsillo apical o subapical en donde se insertan un flagelo emergente mastigomenado y un flagelo corto, que por lo general no llega a salir del bolsillo apical (Adl y col., 2012).

Todas estas características diagnósticas presentes en cada uno de los subgrupos funcionales, permitieron agrupar a los morfotipos 7, 8 y 9 dentro del gremio de los biflagelados criptofitas. De igual forma los morfotipos 10 y 11 se encuentran dentro del gremio de los biflagelados bodonidos y finalmente los morfotipos 12 y 13 se ubican dentro del gremio de los biflagelados euglenidos (tabla 3).

Por otra parte, los ciliados son un grupo homogéneo de protozoarios, los cuales se caracterizan por presentar una superficie cubierta de cilios (Aladro, 2006), la cual puede ser uniforme o no. De igual forma, presentan un citostoma el cual asemeja una estructura bucal (Patterson, 1994). Estas son las principales características consideradas para agrupar a los ciliados dentro de la categoría de grupo morfológico. Partiendo de esto, los ciliados fueron subagrupados en 5 grupos de acuerdo a las características morfológicas del grupo y la distribución de sus cilios a lo largo de cuerpo.

Siguiendo estas ideas, los Spirotrichea son un subgrupo de ciliados de pequeño - mediano tamaño cuya forma aplanada y su distribución de cilios irregulares hacia la zona ventral, los coloca dentro de una misma categoría. Por otra parte, los protostomatea son células con forma de barril, las cuales se caracterizan por presentar un citostoma en posición anterior, de donde proviene su nombre (Anderson, 1987). Los Oligohymenophorea son ciliados de gran tamaño y de cilios uniformes al igual que los Heterotrichea, los cuales presentan cilios prominentes hacia la zona adoral que bordea la depresión del citostoma (Adl y col., 2005). Finalmente, los Litostomatea son ciliados de gran tamaño y amplia distribución de sus cilios (Adl y col., 2005).

Estas características permitieron agrupar 9 morfotipos de ciliados dentro de 8 categorías de gremio existentes a partir de los subgrupos funcionales ya establecidos como sigue a continuación: Morfotipos 14 y 15 dentro de la categoría de Hypotrichia y luego los morfotipos 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22 dentro de los gremios Stichotrichia, Prostomatea, Peritricheo, Peniculados, Hymenostomado, Litostomatea y Heterotrichea, respectivamente (tabla 3).

Finalmente, los ameboideos están caracterizados por su forma cambiante y desplazamiento a través de proyecciones citoplasmáticas o pseudópodos (Patterson, 1999); conforman el último grupo morfológico de esta investigación. Otra de las características distintivas de este grupo puede ser la presencia o ausencia de una teca mineral rígida que

recubre la membrana plasmática de la célula (Laybourn-Parry, 1984), la cual representó la característica diagnóstica que permitió subagrupar a estos microorganismos en dos subgrupos funcionales, las cuales son amebas y amebas testadas o con teca.

Como ya se mencionó anteriormente, estos microorganismos se desplazan a través de pseudópodos; los mismos pueden presentar ciertas características en su forma, las cuales determinan el patrón de movimiento observado en cada célula. De acuerdo con esto, se subagruparon en 3 gremios las amebas que desnudas o que no presentaban una teca mineral rígida.

Los lobopodios representan los pseudópodos de forma roma y gruesa, característicos de los grandes grupos de amebas, tanto de vida libre como patógenas (Adl y col., 2005). Por otra parte, los filopodios representan proyecciones citoplasmáticas delgadas y alargadas que se encuentran formadas únicamente por ectoplasma de la célula. Los actinopodos por su parte, presentan proyecciones finas, alargadas y endurecidas lo cual les restringe un poco el movimiento (Gallego, 2006).

Estas son las características que permitieron agrupar a 7 morfotipos de amebas dentro de la clasificación de amebas desnudas o sin teca, en la cual los morfotipos 23, 24, 25, 26 y 27 pertenecen al gremio de amebas desnudas con lobopodios y los morfotipos 28 y 29 pertenecen a los gremios amebas desnudas con filopodios y con actinopodios, respectivamente (tabla 3).

Por otra parte, las amebas que presentan una teca rígida para proteger la célula pueden presentar formas diferentes, dependiendo del tamaño de la célula y los componentes con los que se encuentran formadas la misma. Partiendo de esta idea, los morfotipos ameboides que presentaban teca fueron subagrupadas en dos gremios, los de tecas circulares y los de tecas ovales.

En este sentido, se incluyeron 3 morfotipos dentro de la clasificación de subgrupo morfológico de amebas testadas, de los cuales los morfotipos 30 y 31 se encuentran dentro del gremio de amebas testadas circulares, mientras que el morfotipo 32 se encuentra adosado al gremio de amebas testadas de forma ovalada (tabla 3).

Es importante señalar que la microscopía electrónica de barrido representó un punto importante en la diferenciación e identificación de estos microorganismos, ya que permitió obtener un mayor poder de resolución y detalle en las características morfológicas que a simple vista no se observaban por microscopía de luz. De esta manera, el uso de esta técnica permitió observar, medir y detallar a individuos del morfotipo 33, pertenecientes al gremio de las amebas testadas de teca circular, lo que permitió identificarlos hasta el nivel de especie como *Arcella discoidea*.

Ahora bien, partiendo de la alta diversidad de microorganismos presentes en una comunidad y de que las especies que la conforman difieren no solo en sus atributos fisiológicos y morfológicos, sino también en sus respuestas a los cambios que ocurren en el ambiente y por ende en el papel que tienen en los ecosistemas (Martínez, 2008), es fácil comprender la relación en el uso de las categorías de clasificación como los grupos funcionales en este tipo de estudio.

No obstante, es importante destacar el manejo de un conocimiento previo sobre las características que regulan a la comunidad, así como de las especies de estudio mismas (Reich y col., 1997). Esto nos va a permitir agrupar a los organismos presentes de forma correcta ayudándonos a percibir de forma más sencilla la complejidad existente en torno a los sistemas y la estructura de las comunidades bióticas (Martínez, 2008).

#### **IV. Cultivos Estandarizados en Estudios de Comunidades de Sistemas Naturales Abiertos.**

Hasta este punto, ha quedado claro que realizar un estudio en un sistema de comunidades naturales no es tarea sencilla, ya que las mismas funcionan como una unidad relativamente independiente, la cual incluye todas las poblaciones de organismos de un área y un tiempo determinado. Por otra parte, estos microorganismos presentan diferencias en su morfología que están estrechamente relacionados con la función que cumplen dentro de la comunidad y su distribución en la misma.

Partiendo de esto, es fácil comprender que una comunidad es un sistema absolutamente dinámico y que por lo tanto, se encuentra en constante cambio (Ware, 1963). Esta capacidad de cambio dependerá de las condiciones fisicoquímicas del sistema, las cuales pueden favorecer en los organismos la capacidad de desarrollar adaptaciones que les permitirán competir con otros organismos y aprovechar los recursos disponibles en el medio de forma más eficiente (Muylaert y col., 2000; Donald y col., 2007).

Partiendo de estas ideas, este proyecto de investigación pretendió estudiar las condiciones fisicoquímicas que permitieran el desarrollo eficiente de protozoarios de vida libre de un sistema natural en un sistema artificial controlado, recreando dichas condiciones abióticas en un medio de cultivo que favoreciera el crecimiento de las poblaciones de microorganismos de una comunidad de estudio determinada.

Así, al lograr estandarizar las condiciones de cultivo fueron descritos a través de microscopía óptica 20 morfotipos de protozoarios de vida libre, los cuales fueron agrupados dentro de las categorías de clasificación de grupos funcionales, subgrupos funcionales y gremios (tabla 4). Estos resultados son consistentes con lo reportado por Lozano (2008) quien describió 20 tipos de protozoarios de vida libre (10 ciliados, 7

flagelados y 3 ameboides) en un sistema de comunidad natural de fitotelmata (*Heliconia sp.*).

De igual forma, se logró obtener la cinética de concentración general de microorganismos presentes en una comunidad natural (*Heliconia sp.*) a partir de la observación directa por microscopía óptica (Figura 42).

Por otra parte, al estudiar la estructura de la comunidad a través de los índices de diversidad biológica, se aprecia un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de la diversidad (figura 43), la equidad (figura 44) y la riqueza (figura 45) a lo largo del tiempo de experimentación. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Lozano (2008) y por Márquez y col. (2009) y con lo encontrado en los resultados de la fase experimental dos.

Ahora bien, resulta claro al comparar la composición de la comunidad de microorganismos del experimento 2 (tabla 3) y la composición de la comunidad de microorganismos presentes en el experimento 4 (tabla 4), que existen diferencias entre los morfotipos presentes en cada uno. Es evidente que estas diferencias están estrechamente relacionadas a las condiciones fisicoquímicas de cada sistema, la disponibilidad de materia orgánica y la historia natural de cada comunidad (Paterson, 1999; Muylaert y col., 2000 y Krivtsov y col., 2003).

Por lo tanto, las condiciones fisicoquímicas establecidas en el medio de cultivo favorecen el crecimiento de aquellos protozoarios que se encuentren mejor adaptados a dichas condiciones en su sistema natural o visto de otra forma, se favorece un crecimiento selectivo de los microorganismos adaptados a estas condiciones dentro de la comunidad.

Estos resultados, son consistentes con lo reportado por Mayorga y col., (2007), Dos Ramos y col., (2007) y Lozano (2008), quienes estudiaron sistemas astáticos naturales

como *Bromelia sp* y *Heliconia sp* en la estación biológica Rancho Grande del Parque Nacional Henry Pittier (Edo. Aragua), en los cuales reportaron una gran diversidad de protozoarios de vida libre en cada sistema natural, así como diferencias entre las comunidades. Es importante señalar que si bien estamos comparando sistemas de fitotelmatas similares, los organismos presentes en cada uno, inclusive la estructura de la comunidad misma, es diferente.

## CONCLUSIONES

- ◆ De los tres grupos de medios de cultivos ensayados (medios fosfatados, medios fosfatados suplementados con glucosa y medios salinos), los que favorecieron los mayores valores de abundancia de protozoarios de vida libre fueron los medios de cultivos salinos.
- ◆ Los frascos con medios de cultivos que presentaron los mayores valores de abundancia, fueron los que presentaban mayor área de superficie, lo cual favoreció el óptimo crecimiento y desarrollo de protozoarios de vida libre.
- ◆ Las condiciones fisicoquímicas que favorecieron la mayor abundancia de protozoarios de vida libre y su óptimo desarrollo fueron el pH fisiológico (pH 7) y la temperatura ambiente.
- ◆ El nivel de resolución aportado por la técnica de microscopía electrónica en la identificación de características morfo-funcionales (diagnostica), permitió incluso la clasificación taxonómica de uno de los microorganismos hasta el nivel de especie (*Arcella discoides*).
- ◆ La comunidad de protozoarios de vida libre presentes en los medios de cultivos responde de forma diferente en sus patrones sucesionales al variar las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura.

- ◆ Por medio de la estandarización de los medios de cultivos se lograron identificar 20 morfotipos diferentes de protozoarios de vida libre en un sistema astático natural como *Heliconia sp*, los cuales fueron agrupados en 13 gremios de clasificación
  
- ◆ El estudio de la estructura de una comunidad de protozoarios de vida libre de un sistema natural astático se ve favorecido gracias al uso de los medios de cultivo y las técnicas de microscopía.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James. T., Karpov, S., Kugrens, P., Krug. J., Lane. C., Lewis, L., Lodge, L., Lynn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, Øj., Mozley-Stanridge, S., Nerad. T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F., Taylor, M. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes With Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot Microbiol.* 52(5): 399–451.
2. Adl, S., Simpson, A., Lane, C., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S., Brown, M., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L., Lynn, D., Mcmanus, H., Mitchell, E., Mozley-Stanridge, S., Parfrey, L., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C., Smirnov, A., Spieget, F. 2012. The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot Microbiol.* 59(5): 429–493
3. Aladro, A. 2006. Principales clasificaciones de los Protozoarios. Editorial las Prensas de Ciencias. Primera Edición. UNAM –México.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, O., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. 5ta edition. New York.
5. Álvarez, A. 2006. Los protozoos; Características generales y su rol como agentes patógenos. *Cien Vet.* 8(1): 1515-1883.
6. Anderson, O. 1988. *Comparative Protozoology*. Spriger-Verlag. New York - USA
7. Andersen, A.N. 2000. A Global Ecology of Rainforest Ants: Functional Groups in Relation to Environmental Stress and Disturbance. Chapter 3. In: Agosti, D., Majer, J.D., Alonso, L., Schultz, R. *Standard Methods for Measuring and Monitoring Biodiversity*. Smithsonian Institution Press. Washington. 25-34pp

8. Anderson, O.R. 2002. Laboratory and field-based studies of abundances, small-scale patchiness and diversity of gymnamoebae in soil of varying porosity and organic content: evidence of microbiocoenoses. *Journal Eukaryotic Microbiology*. 49(1): 17-23
9. Andrade- Fernández, R., Ávila, E., Núñez, R., González, R., Tejero, F. 2009. “Aplicación de la Teoría de Biogeografía de islas en poblaciones de microeucariotas de vida libre del Parque Nacional Henri Pittier” VIII Congreso Venezolano de Ecología. Coro – Edo. Falcón. Venezuela.
10. Armengot, M., Mata, M., Milara, X., Cortijo, J. 2010. Primary ciliary dyskinesia. Ciliopathies. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 61(2):149–159.
11. Ávila, E., Andrade, R., Sanabria, A., González, R. 2009. “Concentración de Oxígeno disuelto en el agua de las brácteas de *Heliconia aurea* como indicadores de abundancia de Microeucariotas Autótrofos” VIII Congreso Venezolano de Ecología. Coro – Edo. Falcón. Venezuela.
12. Begon, M., Harper, J., Townsend, C. 1999. *Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades*. Ediciones Omega. Tercera Edición. Barcelona – España.
13. Bischoff, P.J. 2002. An analysis of the abundance, diversity and patchiness of terrestrial gymnamoebae in relation to soil depth and precipitation events following a drought in Southeastern USA. *Acta protozoologica*. 41(1): 183 – 189.
14. Brenner, S., Horne, W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem et Biophys Act*. 34(1): 103-110
15. Cabrera, L., Ramos, E., Sánchez, W. 2000. Protozoarios en ambientes astáticos adyacentes a la Facultad de Ciencias de LUZ. *Act Cient Vnzl*. 51 : 221.
16. Cardona, L. 2014. Grupos Funcionales, la Importancia de la Historia Natural para su Definición. *Investigación y ciencia*. Edición española de Scientific American.

Disponible en line: <http://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/16/posts/grupos-funcionales-la-importancia-de-la-historia-natural-para-su-definicion-12769>

17. Cavalier-Smith, T. 1981. Eukaryote kingdoms, seven or nine? *Bio Systems* 14(1): 461–481.
18. Cavalier-Smith, T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla; *Microbiology Reviews*, 57(1): 953–994.
19. Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society (Cambridge University Press)* 73(1): 203-266.
20. Cavalier-Smith, T. 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbio.* 52(2): 297-354.
21. Cavalier-Smith, T. 2006. Research. Rooting the tree of life by transition analyses. *Biolog Direct*. Licensee Biomed Central Ltd. 1-83. Doi: 10.1186/1745-6150-1-19.
22. Cavalier-Smith, T. 2010. Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Phil. Tans. R. Soc B.* 111-132.
23. Cavalier-Smith, T. 2013. Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. *European Journal of Protistology.* 49(2): 115–178.
24. Chapin III, F., Matson, P.A., Mooney, H. 2002. *Principles of terrestrial ecosystem ecology.* Springer-Verlag, Nueva York.
25. Chapman, A. D. 2009. *Numbers of living species in Australia and the world.* 2da edition. Department of the Environment, water, heritage and the Arts. Australian Government. Australia.

26. Charman, D.J., Hendon, D., Woodland, W. 2000. La identificación de tecamebas (Protozoa: Rhizopoda) en turbas. Guía Técnica de la Asociación de Investigación del Cuaternario. Asociación de Investigación del Cuaternario. Londres - Inglaterra
27. Chavatte, N., Lambrecht, E., Van Damme, I., Sabbe, K., Houf, K. 2015. Abundance, diversity and community composition of free-living protozoa on vegetable sprouts, Food Microbiology. doi: 10.1016/j.fm.2015.11.013.
28. Corliss, J. 1994. An interim utilitarian (“user-friendly”) hiererchical classification and characterization of the protists. Act Protozoology. 33(1): 1-51.
29. Corliss. J. 2001. “Protozoan cysts and spores”. In Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley and Sons. 1 – 8.
30. Curds, C. 1992. Protozoa in the Water Industry. Cambridge University
31. Curtis. H., Barnes. N., Schnek. A., Massarini. A. 2008. Biología. Editorial Panamericana. Séptima edición. Buenos Aires – Argentina.
32. Denton, B., Diese, L., Firkins, J., Hackmann, T. 2014. Accumulation of Reserve Carbohydrate by Rumen Protozoa and Bacteria in Competition for Glucose. Journals. Asm.Org. American Society For Microbiology. Vol. 81(5) 1832-1838
33. Donald, A., Juliano, S. 2007. Abundance matters: a Weld experiment testing the more individuals hypothesis for richness-productivity relationships. Oecologia. 153(1): 153-162.
34. Dos Ramos, F., Betancourt, D., Lozano V., Roschman-González, A., Tejero, F. 2007. Identificación de Mcroeucariotas de Vida Libre Asociados a Bromelias del Parque Nacional Henri Pittier. VII Congreso Venezolano de Ecología. Ciudad Guayana – Venezuela.

35. Durand, M., Beaumatin, P., Dumay, C. 1983. Estimation in vitro à l'aide du phosphore radioactif des besoins en phosphore des microorganismes du rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 23(1): 727-739
36. Esteban, G., Tellez, C. 1990. Método de aislamiento, cultivo y bioensayo de toxicidad con protozoos ciliados. *Microbiología.* 6 (2): 100-103.
37. Fenchel, T., Finlay, B.J. 1983. Respiration Rates in Heterotrophic, Free-living Protozoa. *Microb Ecol.* 9(1): 99-122.
38. Fuentes, F., Massol-Deyá, A. 2002. Manual de Laboratorios. Ecología de Microorganismos. Universidad de Puerto Rico. Disponible en línea: <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p1-intro.pdf>.
39. Gallego, J. 2006. Manual De Parasitología: Morfología y Biología de los Parásitos de Interés Sanitario. I Edicions de la Universitat de Barcelona. España.
40. Garcia-Cortes, V. 2004. Introducción a la Microbiología. Editorial: EUNED. Segunda Edición. Costa Rica.
41. Garcia, R., Gallegos, F., Sanches, M.A. 1993. Aportación al conocimiento de las diatomeas bentónicas de las aguas corrientes salmantinas. *Acta Botánica Malacitana.* 18(1): 5-29
42. Gitay, H., Noble, I.R. 1997. What are functional types and how should we seek them? In: Smith TM, Shugart HH, Woodward FI (eds) *Plant functional types their relevance to ecosystem properties and global change.* Cambridge University Press, Cambridge. 3-19 pp
43. Hickman, C., Roberts. L., Larson. L., Anson. H., Eisenhour. D. 2006. *Principios Integrales de Zoología.* McGraw-Hill Interamericana. Decimotercera Edición. Madrid – España.

44. Hoek, C., Mann, D., Jahns, H. 1995. *Algae: An introduction to phycology*, Cambridge University Press, UK.
45. Honigberg, B., Balamuth, W., Bovee, E., Corliss, J., Gojdics, M., Hall, R., Kudo, R., Levine, N., Loeblich, A., Weiser, J., Wenrich, D. 1964. «A Revised Classification of the Phylum Protozoa». *J Protozool.* 11(1): 7–20
46. Illana, C. 2008. Usos Industriales de las Algas Diatomeas. *Quercus.* 26(7): 32-36
47. Kang, W., Echarri, J., Llorente, C. 2013. Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis del LIMF. Departamento de Mecánica. Facultad de Ingeniería. La plata. Buenos Aires - Argentina.
48. Karp, G. 2009. *Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos.* McGraw-HILL Interamericana. 5ta edición.
49. Keeling, P. 2005. The tree of eukaryotes. *Trends Ecol Evol.* 20(1): 670–676.
50. Kohidai, L. 2008. Trabajo propio. Disponible en: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flagellum-beating.png>
51. Komisarczuk, S., Durand, M. 199. Nutrient requirement of rumen microbes. *Proc. 3rd Int. Symp. on Nutrition of Herbivores.* Penang, Malasia. 133-141 pp.
52. Krivtsov, V., Liddell, K., Bezginova, T., Salmond, R., Garside, A., Thompson, J., Palfreyman, J., Staines, H., Watling, R., Brendler, A., Griffiths, B. 2003. Ecological Interaction of Heterotrophic Flagellates, ciliates and naked amoebae in forest litter of the Dawyck Cryptogamic Sanctuary (Scotland, UK). *European Journal Protistology.* 39(1):183-198.

53. Lavorel, S., McIntyre, S., Landsberg, J., Forbes, T. 1997. Plant functional classifications: from general groups to specific groups based on response to disturbance. *12(1): 474-478*
54. Laybourn-Parry., J. 1984. *A functional Biology of Free-Living Protozoa*. Berkeley and Los Angeles, California. University of California.
55. Lazo, I., Ginocchio, R., Cofré, H., Vilina, Y., Iriarte, A. 2008. Nuestra Diversidad Biológica. En Rovira, J, Ugalde, J, Stutzin, M. *Biodiversidad de Chile. Patrimonio y desafíos*. Segunda edición. Conama. Santiago de Chile. 49 -55.
56. Lemloh, M.L., Marin, F., Herbst, F., Plasseraud, L., Schweikert, M., Baier, J., Bill, J., Brümmer, F. 2013. Genesis of amorphous calcium carbonate containing alveolar plates in the ciliate *Coleps hirtus* (Ciliophora, Prostomatea). *Journal of Structural Biology* 181(1): 155–161
57. Ley De Coss, A., Cobos, M., Hernández, D., Guerra, E. 2011. Formulación de un Medio de Cultivo Anaerobio para Protozoarios Ruminales y Evaluación In Vitro en la Capacidad Desfaunante del Extracto de Plantas. *Revista-Científica, FCV-LUZ*. 21(1): 43-49
58. Ling Tan, O., Moh-Almsherqi., Z y Deng, Y. 2005. A simple mass culture of the amoeba *Chaos carolinense*: revisit. *Protistol*. 4(2): 185-190
59. Littleford, R.A. 1960. Culture of Protozoa in the Classroom. *The American Biology Teacher*. 22(9): 551-559.
60. Lozano, V. 2008. Microeucariotas de vida libre asociados a *Heliconia* sp. en la Estación Biológica Rancho Grande del P.N. “Henri Pittier” (TEG). Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

61. Lux, A. Manual de Microscopía Electrónica, Ultraestructura y Citología Vegetal. Vol 1. Universidad de Bratislava. Checoslovaquia. Disponible en: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1020111630/1020111630.PDF>.
62. Lynn, D. H. 2003. Morphology or molecules: how do we identify the major lineages of ciliates (Phylum Ciliophora). *European Journal of Protistology*, 39(4), 356-364.
63. Maguire, J. 1971. Phytotelmata: Biota and Community Structure Determination in Plant-Held Waters. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2(1):439-464.
64. Márquez, I., Andrade, R., Ávila, E., Tejero, F., González, R. 2009. Aplicación y comparación de índices de diversidad en comunidades de microeucariotas asociadas a *Heliconia sp.* En el Parque Nacional Henri Pittier. VIII Congreso Venezolano de Ecología. Coro – Falcón -Venezuela.
65. Martínez, M. 2008. Grupos funcionales, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio. México. 1(1): 365-412.
66. Mayorga, E., Sierra, S., Recchimuzzi, G., Betancourt, D. González, R., Tejero, F. 2007. “Identificación de Microeucariotas de Vida Libre Asociados a Reservorios de Agua en el P.N. “Henri Pittier”. VII Congreso Venezolano de Ecología. Ciudad Guayana -Venezuela
67. Mercer, E., Birbeck. M. 1979. Manual de Microscopia Electrónica para Biólogos. H. Blume ediciones. Segunda edición. Rosario-Madrid. 58-60
68. Moreno, C. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T–Manuales y Tesis SEA. 1: 84.
69. Muylaert, K., Mieghem, R., Sabbe, K., Tackx, M., Vyverman, W. 2000. Dynamics and trophic roles of heterotrophic protists in the plankton of a freshwater tidal estuary. *Hydrobiologia*, 43(2): 25–36.

70. Navarro, A. 1988. Filogenia y clasificación de aves. rev cult científ. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
71. Paradise, C. 2004. Relationship of water and leaf litter variability to insect inhabiting teeholes. Journal North am Benth Soc. 23(1):793-805.
72. Patterson, D., Hedley, S. 1994. Free-Living Freshwater Protozoa: A Colour Guide. Wolfe Publishing: London.
73. Patterson, D. 1999. The Diversity of Eukaryotes. The American Naturalist, 65: 97-124.
74. Petz, W. 1997. Ecology of the active soil microfauna (Protozoa, Metazoa) of Wilkes land, East Antarctica. Polar Biol. 18(1): 33-44
75. Piedrahita, M. 2013. Implementación y Reproducción del Protozoario *Paramecium sp.* en Laboratorios de Ciencias Naturales de Educación Secundaria. (Tesis Magister). Medellín. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
76. Pla, I. 2006. Biodiversidad: inferencia basada en el índice de shannon y la riqueza. Interciencia, 31(8): 583-590
77. Prin, J., Hernández, G., Rojas, B. 2010. Operando el Microscopio Electrónico como Herramienta para el Estudio de los Polímeros y otros Materiales. Revista Iberoamericana de Polímeros. 11(1).
78. Quinino, M., Araújo, M., Sodré-Neto. L., Amorim, A. 2013. Spatial and temporal distribution of free-living protozoa in aquatic environments of a Brazilian semi-arid region. Ambi-Agua, Taubat , 8(2): 46-56.
79. Ramírez, A., Chiou, W., Faber, K. 2000. Estudio Comparativo de Técnicas de Preparación de Muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión de

- Recubrimientos Cerámicos Proyectados por Plasma. Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio, 39(6): 735-740.
80. Reich, P., Walters, M., Ellsworth, D. 1997. From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. Proceedings of the National Academic of Sciences 94(1) : 13730-13734
81. Ricklefs, R, Miller, G. 2000. Ecology. 4edic. W.H. Freeman & Company, New York.
82. Rico, C., Fernandez, N. 2010. Estructura y Función de Comunidades Ecológicas. Universidad de Pamplona. Colombia. Disponible en Línea: [https://www.academia.edu/1666740/Estructura\\_y\\_Funci%C3%B3n\\_de\\_Comunidades\\_Ecol%C3%B3gicas?auto=download](https://www.academia.edu/1666740/Estructura_y_Funci%C3%B3n_de_Comunidades_Ecol%C3%B3gicas?auto=download)
83. Root, R.B. 1967. The niche exploitation pattern of the blue-gray gnatcatcher. Ecological Monographs 37(1): 17-350.
84. Round, F., Crawford, R. 1990. *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*, Cambridge University Press, UK.
85. Scorza, J. 1997. Introducción al conocimiento microscópico de ambientes astáticos. Centro “José W Torrealba”. Núcleo Universitario “Rafael Rangel” Trujillo – Venezuela.
86. Simpson, A., Roger, A. 2004. The real Kingdoms of eukaryotes. Curr Biol 14(1): 693–696.
87. Simpson, A, Roger, A. 2008. Evolution: Revisiting the Root of the Eukaryote Tree. Current Biology. 19(4): 165-167.
88. Smith, T.M, Shugart, H., Woodward, F. 1997. Plant functional types their relevance to ecosystem properties and global change. Cambridge University Press, Cambridge

89. Steffen, W., Walker, B.H., Ingram, J., Koch, G. 1992. Global Change and Terrestrial Ecosystems: the Operational Plan. IGBP-ICSU. Estocolm.
90. Tinaut, A., Ruano. F. Biodiversidad, Clasificación y Filogenia. Departamento de Biología Animal y Ecología. Departamento de Agroecología. Universidad De Granada. España.
91. Ubero, N. 2008. Técnicas de microscopía aplicadas a las ciencias forenses. Dpto. de Zoología y Antropología Física. Universidad de Merida. Mexico.
92. Vaerewijck, M., Houf, K. 2015. El papel de los protozoarios de vida libre transmitidos como patógenos en alimentos. Elsevier Ltd. Universidad de Gante. Bélgica.
93. Ware, C. 1963. Estudio de la comunidad. Editorial HVMANITAS. Cuarta edición. Buenos Aires. Argentina.
94. Weisse, T. 2008. Distribution and Diversity of Aquatic Protists: an evolutionary and ecological perspective. *Biodiversity Conservation*. 17(1): 243-259.
95. Weitere, M., Arndt, H. 2003. Structure of the heterotrophic flagellate community in the water column of the River Rhine (Germany). *European Journal Protistology*. 39(1):287-300.
96. Whittaker, R. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by traditional two kingdoms. *Science*, 16(3): 150-160.
97. Zamora, L. 2003. Aislamiento, Identificación y Conservación de Medios de Cultivo de Bacterias Lácticas Antagonistas de Microbiota Contaminante de Sangre de Matadero. (Tesis Doctoral). Instituto de Tecnología Agroalimentaria. Universidad de Girona.