



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

## GUÍA PARA EL ESTUDIO DE LOS PROTISTAS DE VIDA LIBRE: PROTOZOOS

T E S I S A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

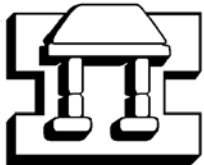
B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

CLAUDIA CORTÉS HERNÁNDEZ

DIRECTORA

Dra. Maria del Rosario Sánchez Rodríguez



IZTACALA

Los Reyes, Iztacala, Edo. de México. 2010.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos:**

- Principalmente agradezco a Dios por haberme permitido llegar hasta donde estoy.
- A la Doctora María del Rosario Sánchez (mi mamá académica) mil gracias por toda su dedicación, apoyo, paciencia y sobre todo por esos jalones de orejas que bien merecidos tenía. Por toda la confianza, consejos y enseñanzas, gracias maestra querida.
- A mi familia, el pilar y eje principal de mi vida. Mamita, gracias por toda la fuerza, consejos y amor. Hermanitas (Sandy, Adri, Alex y Liz), gracias por impulsarme y por no abandonar el camino durante la carrera, en la cual seguimos compitiendo. Todas hemos de llegar a la meta.
- A todos mis maestros que dejaron en mí una huella importante para toda la vida. Gracias.
- Gracias a mis amigos por compartir conocimientos, experiencias, alegrías y tristezas durante nuestra etapa de estudiantes y aún después de esta. Tere, gracias por estar siempre que te necesito amiga.
- Oscar, gracias por darme la mano, el apoyo, el amor e impulso para continuar y concretar esta etapa de mi vida, pero sobre todo por mostrarme que nada es imposible cuando existe un objetivo claro y mucha dedicación. Te amo.
- Finalmente, este proyecto se realizó con el apoyo del programa PAPIIT IN223008 de la UNAM: Regulación de la biomasa algal a través de la concentración y proporción de los nutrimentos en un lago hipertrófico. Gracias!

Al final del camino de la vida,  
No te preguntarán “¿Qué tienes?”,  
Sino “¿Quién eres?”  
¿Cuál será tu respuesta?  
**René Juan Trossero**

## Índice

Resumen .....	1
Abstract	
I. Introducción .....	3
1. definición	
2. taxonomía	
3. grupos principales.	
II. Justificación .....	7
III. Objetivos .....	8
IV. Metodología .....	9
V. Generalidades (amibas, flagelados y ciliados) .....	10
1. Alimentación	
2. Reproducción	
3. Locomoción	
4. Estructuras de importancia taxonómica por grupo.	
5. Filogenia de los protozoos	
VI. Muestreo, colecta y cultivos (Bitácora, un documento necesario) .....	30
1. Lagos, estanques, ríos	
2. Sedimento	
3. Sistemas de tratamiento	
VII. El microscopio .....	37
1. Campo claro	
2. Contraste de fases	
3. Microfotografía conocimientos básicos, características particulares y consejos útiles.	
VIII. Observación .....	43
1. In vivo	
2. Fijación	
3. Tinción	
IX. Papel de los protozoos en los ecosistemas acuáticos .....	56
1. Circuito microbiano (microbial loop)	
2. Relación entre los protozoos y los metazoos planctónicos	
3. Conceptos básicos	

X. Consideraciones finales .....	61
XI. Anexo .....	63
XII. Bibliografía .....	64

## **Resumen**

Debido a la gran riqueza biológica de los microorganismos y a su alto potencial como organismos indicadores de las condiciones físicas y químicas en diferentes ambientes, se propone una recopilación de material útil y práctico especialmente para aquellas personas que incursionan en el estudio de los protozoos.

Se pretende sea un documento de consulta para alumnos de licenciatura, en el que se presentan técnicas sencillas y accesibles. Se definen y actualizan conceptos básicos de los protozoos de vida libre (ciliados, flagelados y amibas); aspectos recientes de procesos fisiológicos, hábitat, origen, evolución. Se plantean métodos de recolecta, observación, fijación, conservación y cultivo para hacer más sencilla la tarea posterior de ubicarlos taxonómicamente. Al considerarse este trabajo como una herramienta, se presentan esquemas con las características morfológicas generales de los tres grupos para que el usuario pueda guiarse por las diferencias principales en forma, color y tamaño. Se explican los principios generales de la iluminación de campo claro y de contraste de fases en la microscopía. Tanto las técnicas como los materiales sugeridos son sencillos y de fácil consecución para hacer más interesante y agradable el estudio de estos protistas de vida libre.

Palabras clave: Protozoos de vida libre, guía de estudio.

## **Abstract**

Due to the broad biological richness of microorganisms, and to their high potential to be used as indicators for knowing physical and chemical conditions among different environments, we suggest a documental compilation of useful and practical material, which is mainly addressed to those students or people who is interested or gets involved in the protozoan study.

It is attempted to be a reference document, especially for university or college students, here we present and describe easy and accessible techniques. We also define and update some basic concepts about free-living protozoa (ciliates, flagellates and amebas); recent physiological processes, habitat, origin, and evolution.

In this document, we approach some collection, observation, fixation, conservation and culture methods, to make easier taxonomical analysis. At the time this document is considered a useful tool, we also include some figures and images that show the general morphological characteristics of our three main study groups; so that, the user can be guided by understanding and knowing principal differences in shape, color and size between groups. Here we also explain general principles of clear field illumination, as well as phase contrast in microscopy.

Techniques, might as well suggested materials in this document, are simple and easy to obtain in order to make nicer and more interesting the study about free - living protozoa.

Key words: free living protozoa, study guide

## Introducción

Los protozoos son organismos eucariontes unicelulares, que en su mayoría son microscópicos presentan múltiples formas y tamaños; además llevan a cabo muchas funciones biológicas y ecológicas realmente complejas e importantes (Anderson, 1987). Debido a la gran diversidad de organismos que conforman este grupo, es posible encontrarlos en casi todo tipo de sitios, muchos son parásitos del hombre y de otros organismos; aunque la mayoría son de vida libre, pues se encuentran en todos aquellos ambientes asociados con la humedad (Sánchez, 1994; Martínez, *et al.*, 2003).

Particularmente, los protozoos de vida libre desempeñan un papel de gran importancia ecológica dentro de los cuerpos de agua (dulce, salobre o salada), forman parte de la microfauna y reflejan el estado físico y químico de la región que habitan, realizan el reempacado trófico (ponen bacterias a disposición de niveles tróficos superiores); regeneran nutrientes (liberan nutrientes orgánicos e inorgánicos para la producción primaria: bacterias y materia orgánica) y los remineralizan, ya que se alimentan directamente de organismos y de materia orgánica particulada (Sleigh, 1979).

En la actualidad, los protozoos están incluidos dentro de la Protistología (Patterson, 1998), ciencia que estudia a los eucariontes unicelulares, es un grupo altamente diverso de organismos generalmente microscópicos, con distribución cosmopolita y provenientes de diferentes líneas evolutivas; incluye también a las algas y a los hongos –inferiores (Rothschild, 2004).

Desde que se tuvo conocimiento de su existencia por observaciones como las de Leeuwenhoek (Jahn y Jahn, 1979) y a lo largo de los años siguientes, se han conformado diferentes visiones la ubicación taxonómica de los organismos en árboles filogenéticos, árboles de la vida o árboles evolutivos (Bütschli, 1880-1889; Honigberg, 1964; Whitaker, 1978; Levine, 1980; Corliss, 1994; Cavalier-Smith, 1998; Corliss, 2004; Delgado, 2007). El estudio de estos organismos, aproximadamente 200, 000 (incluidas las ya extintas), ha ido cambiando drásticamente en muy diversos aspectos, mucho ya pertenece a la historia, ahora se considera importante que para describir a un organismo (procarionte o eucarionte) además de basarse en las experiencias de investigadores, es preciso saber sobre la ultraestructura, biología molecular, bioquímica, aspectos ecológicos, comportamiento, filogenética, entre otros (Baldauf, 2003; Martínez, *et al.*, 2003).

Como consecuencia de estas nuevas aportaciones y visiones de los protistólogos, se proponen nuevas clasificaciones para ubicar a los organismos dentro de árboles de la



vida (Cavalier-Smith, 1998; Baldauf, 2003; Corliss, 2004) cada vez más complejos hasta una de las últimas propuestas es la aportación de Adl y colaboradores (2005), cuyo consenso ha ido en aumento, es una publicación avalada por la Sociedad de Protistología y una clasificación que pretende ser más sencilla al ubicar a los organismos; sin dejar de considerar que deja abierta la posibilidad de seguir actualizándose conforme avance la ciencia y la tecnología.

Para dar una idea de esta nueva visión, se proponen entonces, seis grandes grupos dentro de los cuales están incluidos todos los eucariotas.

**Opisthokonta:** animales, hongos, coanoflagelados y mezomicetos.

**Amebozoa:** amibas tradicionales (testadas-desnudas), hongos, ameboflagelados y algunos organismos sin mitocondrias.

**Excavata:** oxymonadidos, parabasalidos, jacobinos, flagelados heterótrofos, euglenozoa y heteroloboseos.

**Rizaría:** foraminíferos, radiolarios, cercozoos, amebo-flagelados y algunas amibas testadas.

**Archeplastida:** glaucofitas, algas rojas, algas verdes y plantas en general

**Chromoalveolata:** alveolados, ciliados, dinoflagelados, apicomplexa; estramenofilos, algas cafés, diatomeas, hongos zoosporicos, opalinidos.

Es un sistema jerárquico (macroclasificación) sin una designación de rangos, clases o phyla, órdenes o familias; se basa en utilidad, menos problemática en la clasificación de los seres vivos, más flexible y fácil de modificar. Dados los cambios tan rápidos en la tecnología, la ciencia y la sistemática filogenética, y como se mencionó, aún inacabado (Adl *et al.*, 2005; Delgado, 2007).

Los Protozoarios han cambiado a ser nombrados protozoos, pues de acuerdo con Fernández-Galiano, el término correcto en castellano es protozoo (del griego protos: primeros y zoos: animales); según el mismo autor, la palabra protozoario es un galicismo (*protozoaire*), por lo tanto y hablando en correcto castellano-español, el nombre de estos organismos debe considerarse como **protozoos** (Fernández-Galiano *com pers.* y Margalef, 1983).

El papel principal de los protozoos de vida libre en los ecosistemas consiste en la regulación del crecimiento de las poblaciones de bacterias, que son el grupo más importante de desintegradores, ya que participan en el denominado “Circuito microbiano” (microbial loop) de los ecosistemas acuáticos. Se trata de un circuito cerrado de transmisión de energía y de nutrimentos entre las bacterias, las algas y los protozoos; especialmente el grupo de los flagelados y ciliados (Azam, 1983; Sánchez, 1994).

Así, la diversidad y abundancia de protozoos se encuentra relacionada con la actividad bacteriológica, las bacterias actúan entonces como una comunidad de descomponedores de detritos y los protozoos utilizan esta fuente mineralizada para desempeñar sus funciones ecológicas, el conocimiento de estas poblaciones, permite estimar de manera certera las condiciones del ambiente (Whiten y Pendergrass, 1980).

En el caso del aire, éste funciona únicamente como un medio de dispersión para los protozoos (dispersión anemócora), no como un hábitat (son muy raros los microorganismos metabólicamente activos); varios autores han sugerido que estos organismos pueden transportarse a través del aire, adheridos a partículas de polvo o bien, en animales (zoocora), viajar en formas de resistencia y de esa manera invadir otros ambientes (Rivera *et al.*, 1994). Sin embargo, muy poco es conocido acerca de la diversidad protozoológica en la atmósfera y de la influencia de los factores meteorológicos en la sobrevivencia de los protozoos aerotransportados; los primeros en señalar la dispersión de microorganismos por el aire fueron Pasteur y Pouchet en 1860 (Bonilla, 2000). En 1863, Charles Darwin publicó que una multitud de cuerpos eran transportados por el viento en forma de polvo y que el análisis de esos sedimentos modificaría las nociones acerca de la generación espontánea y mostraría una fuente fértil donde formas híbridas, no esperadas podrían surgir (Schlichting, 1961).

Por otra parte, los protozoos del suelo son organismos eucariontes, unicelulares, que habitan en el sustrato mineral y se encuentran asociados a la materia orgánica en la cual la vegetación terrestre forma raíces. Los protozoos del suelo respiran alrededor del 10% del carbono total dentro del sistema, por lo que forman una proporción significativa de energía en el ciclo del suelo. Para la estimación del número de especies de protozoos en el suelo se han recomendado varios métodos de estimación (Foissner, 1991).

Por ejemplo, el mejor método para amibas testadas es la inspección cuidadosa de suspensiones de suelo húmedo y la flotación de testas vacías por medio de burbujas de gas (Schönborn, 1977).

La estimación de la riqueza de especies en otros grupos de protozoos del suelo es mucho más difícil, debido a que estos no pueden ser extraídos con éxito del suelo directamente. Por lo que se ha sugerido la enumeración incluyendo varias técnicas de cultivo (Foissner, 1991). La aportación de estos organismos a la estructura de las comunidades, en cuanto al aporte de nutrientes o como consumidores es evidente así como su papel bioindicador (Pesson, 1979).

## **Justificación**

La razón de esta guía es principalmente, compilar en un documento información básica, suficiente y necesaria sobre los protozoos de vida libre en dos ambientes distintos: agua y suelo, utilizando a las amibas, los flagelados y los ciliados. Se pretende que sea un documento de consulta actualizado para alumnos de nivel licenciatura, que tengan cualquier tipo de interés sobre este grupo y pretendan utilizarlos como herramienta de estudio. Se propone sea una guía capaz de hacer mas agradable el estudio de éstos organismos. Asimismo, dar al documento una posibilidad de uso en las Metodologías Científicas o Diversidad Animal del plan curricular de la carrera de biología (FESI-UNAM) o para cualquier otro estudio que involucre a los protozoos.

Este trabajo también va dirigido a los interesados en enseñar o informar a otros sobre el tema aquí desarrollado, pensando que alguna parte pueda servir como apoyo didáctico. Ciertamente algunas cosas les serán muy conocidas, olvidándose quizá de las dificultades que tuvieron cuando empezaron con el mundo de los protistas y específicamente con los protozoos.

En este trabajo, se utilizan metodologías sencillas en cuanto a su obtención, seguimiento, observación y cultivo.

## **Objetivos**

General:

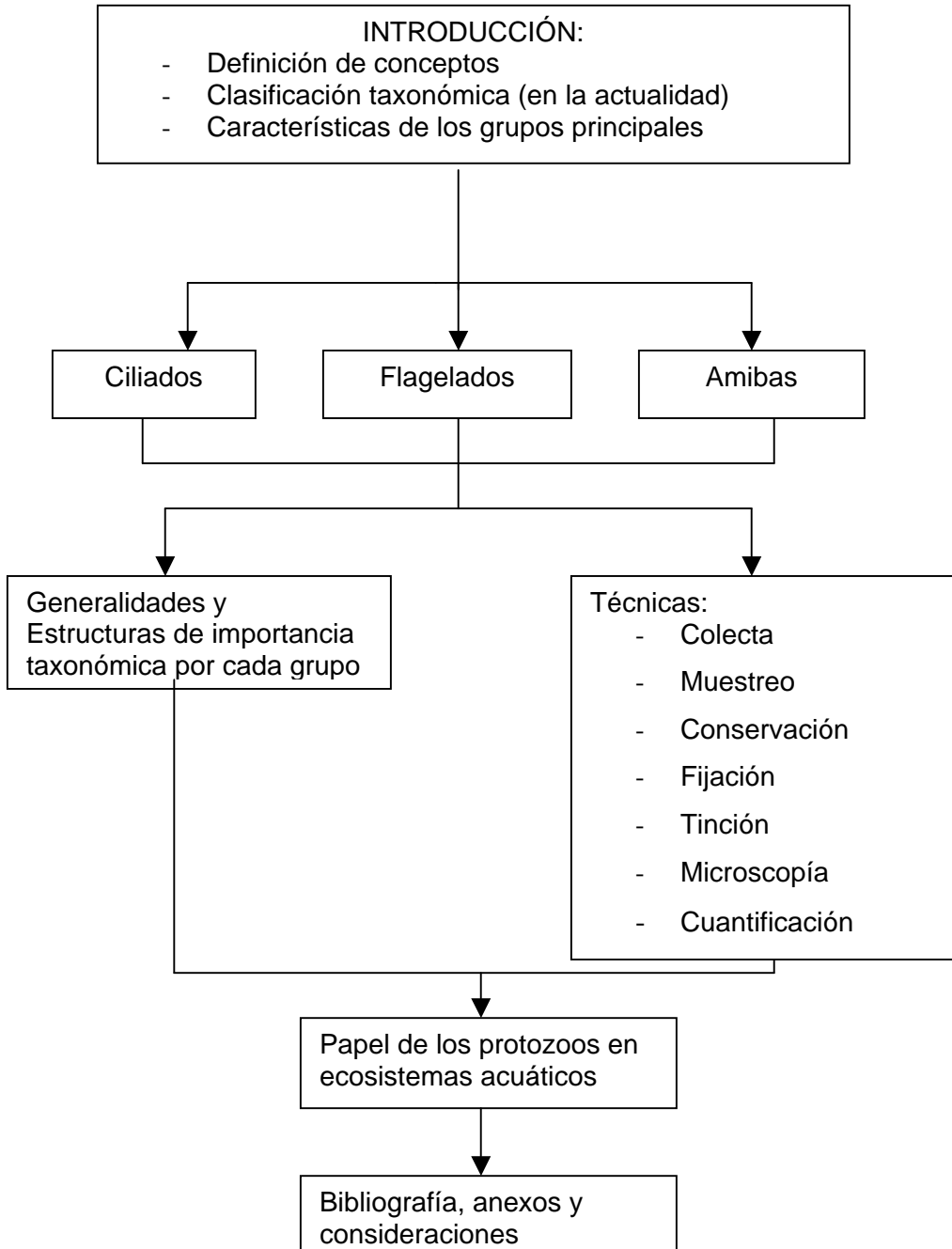
Ofrecer un documento actualizado de generalidades sobre los protozoos de vida libre en diferentes ambientes (agua dulce y suelo).

Particulares.

- Crear un documento sobre las generalidades de los protozoos de vida libre para alumnos de educación superior
- Describir algunas técnicas sencillas de fácil manejo para la colecta, observación tinción y cultivo de los protozoos.

## **Metodología**

A partir de bibliografía y experiencia sobre protistas de vida libre, se propuso la siguiente metodología:



## **Generalidades de los grupos de vida libre**

Todos los protozoos de vida libre son acuáticos, ya que por lo menos en algún estadio de su ciclo de vida, requieren de un medio acuoso. Esta necesidad es universal para todas las formas en su estado vegetativo o trófico. En su fase quística, en cambio, suelen presentar gran resistencia a la desecación. Las funciones vitales de las diversas especies son el resultado de sus interrelaciones con el medio. Se entiende por medio o ambiente todo aquello que los rodea, ya se trate de factores físicos o químicos de cualquier naturaleza o de otros organismos (López-Ochoterena, 1997).

De acuerdo con Dogiel (1965) y Cavalier-Smith (2006), se pueden distinguir tres tipos de protozoos acuáticos: los del plancton, que flotan libremente en el agua; los del bentos, que habitan sobre los fondos de los depósitos y los del neuston, que viven en la película superficial del agua.

Los protozoos de vida libre que viven en aguas dulces pueden encontrarse en lagos y lagunas, arroyos, ríos, aguas termales, manantiales, nieve o aguas glaciares, gotas de agua sobre la vegetación, agua de lluvia acumulada en cualquier sitio, por ejemplo el rocío sobre los musgos, agua potable, aguas negras (drenaje) y casi en cualquier lugar en donde exista humedad. Los depósitos de agua con poco movimiento, materia orgánica y vegetación sumergida proporcionan abundantes especies (López-Ochotorena, 1997).

### Procesos fisiológicos

Entre los protozoos de vida libre se encuentran tres grandes grupos: ciliados, flagelados y amibas.

### Alimentación

Los protozoos han desarrollado un amplio rango de mecanismos de alimentación, tal vez en respuesta a los diversos ambientes que habitan y la gran cantidad de alimento disponible en sus tan variados hábitats. De acuerdo al tipo de alimentación que llevan, los protozoos se pueden clasificar como heterótrofos, autótrofos, mixótrofos, osmótrofos, saprozoicos y depredadores. A continuación se presenta una breve explicación de los diferentes tipos de alimentación entre estos organismos (Sanders, 1991).

Autotrofia: uso exclusivo de compuestos inorgánicos para el metabolismo, crecimiento y la reproducción. Sinónimos: fotoautótrofo y fotótrofo.

En la autotrofia la fotosíntesis es la principal fuente de energía de las funciones celulares, sin embargo se requieren algunos compuestos orgánicos externos (vitaminas o factores de crecimiento)

Heterotrofia: el uso de compuesto orgánicos externos para el metabolismo, el crecimiento y la reproducción.

Mixotrofia: la combinación de nutrición autótrofa y heterótrofa en un mismo individuo. Algunas veces se usa en el sentido restringido de la combinación de autotrofia y fagotrofia.

Osmotrofia o saprotrofia: alimentación por absorción de nutrimentos disueltos (pinocitosis o transporte pasivo o activo)

Fagotrofia: alimentación por la formación de vacuolas digestivas alrededor de materia nutritiva particulada (Anderson, 1987; Martínez, 2003).

Todas estas formas de alimentación hacen de los protistas un recurso apetecible para los metazoos del siguiente nivel trófico (Gifford, 1991).

### Reproducción

La documentación sobre la reproducción y ciclos de vida de los protozoos, fue uno de los primeros intereses de los biólogos. Durante la primera etapa del siglo XIX se logró un progreso sustancial en la clarificación de los patrones reproductivos y la correlación entre los eventos citológicos y los ciclos reproductivos.

Algunas especies de protozoos pueden reproducirse tanto sexual como la asexualmente, mientras que otras presentan sólo uno de los dos procesos reproductivos. En el caso de ciertas amibas, por ejemplo, se reproducen únicamente de manera asexual (Page y Siemensma 1991). Algunos foraminíferos se reproducen sólo de forma sexual, o bien, presentan fases alternadas de reproducción sexual y asexual durante sus ciclos de vida. La complicación viene con algunas especies, debido a la separación de procesos sexuales y reproducción, como es el caso de algunos ciliados que intercambian núcleos gaméticos durante la conjugación entre dos células madre, que producen núcleos cigóticos y comparten material genético. Sin embargo, la separación de los conjugantes no conlleva de manera inmediata a la fisión reproductiva. La fisión binaria, por lo regular, ocurre tiempo después. Es por ello que en estas especies, los procesos sexuales no coinciden con la reproducción organísmica (Anderson, 1987).

### Reproducción sexual

En la mayoría de lo casos, los protozoos producen gametos mediante el proceso de fisión múltiple de tipo meiótico (gamogonia). Los gametos producidos pueden ser de tipo isogamético o anisogamético (células haploides).



Isogametos: células físicamente iguales.

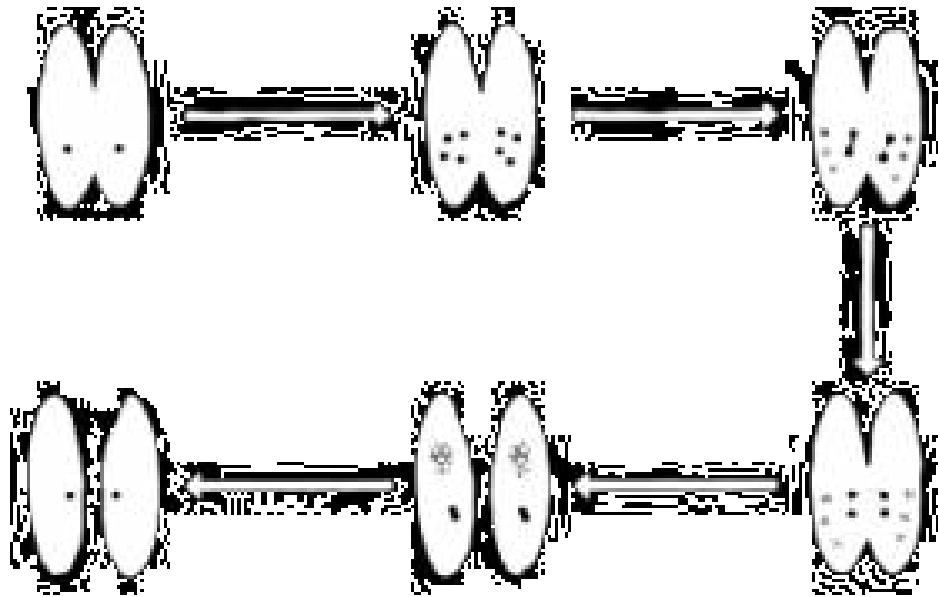
Anisogametos: células física y fisiológicamente diferentes. La célula masculina (positiva "+") se caracteriza por ser pequeña, sumamente móvil y presentar uno o varios flagelos que le sirven para el desplazamiento; también se le conoce como "microgameto". La célula femenina (negativa "-") es de mayor tamaño, inmóvil y generalmente posee una forma esférica; también denominada "macrogameto".

De la fusión de un microgameto con un macrogameto (anisogamia) o dos isogametos (isogamia) se forma una célula hija diploide o cigoto.

### Conjugación

Esta es una variante de la reproducción sexual, consiste en la unión temporal de dos individuos de la misma especie, con el objeto de intercambiar parte de su material nuclear (proceso característico y exclusivo de los ciliados). El proceso se describe a continuación (*Paramecium aurelia*):

1. Dos individuos similares (conjugantes) se unen por medio de su superficie oral, fusionando sus membranas externas.
2. El o los macronúcleos se reabsorben.
3. El micronúcleo se divide dos veces mediante meiosis, formando cuatro micronúcleos en cada conjugante.
4. Tres de los cuatro micronúcleos que se formaron, degeneran y son reabsorbidos.
5. El micronúcleo remanente se divide una vez más por mitosis y da origen a un pronúcleo errante y a un estacionario.
6. El pronúcleo errante entra en el otro individuo y se fusiona con su pronúcleo estacionario.
7. Al separarse los dos conjugantes se les denomina ex-conjugantes.
8. En cada exconjugante, el núcleo que quedó (sincarión) se divide tres veces sucesivas, dando origen a ocho núcleos, cuatro micronúcleos y cuatro macronúcleos.
9. Cada individuo se divide citoplasmáticamente, produciendo dos nuevos individuos con cuatro núcleos cada uno.
10. Por último, estos dos nuevos individuos se dividen a su vez, quedando finalmente cuatro individuos más pequeños, cada uno con un micronúcleo y un macronúcleo (Figura 1) (Martínez, 2003).



**Figura 1.** Proceso de conjugación

#### Autogamia

En algunos protozoos se fusionan dos núcleos que se originan de una sola célula madre. Por este medio no existe intercambio nuclear, éste tipo de reproducción es favorable cuando las condiciones ambientales son estables y los individuos se encuentran bien adaptados al medio. Bajo condiciones ambientales impredecibles, o en las que haya una fuerte selección por presión ambiental y los individuos no estén óptimamente adaptados al medio, los métodos de mayor ventaja serían la gametogamia o la gamontogamia. En el caso de la autogamia, debido a que las células hijas se derivan de una sola célula madre, las células resultantes reciben el nombre de clones (Anderson, 1987; Martínez, 2003).

#### Reproducción asexual

La reproducción asexual resulta de la división de células vegetativas, dentro las que se llevan a cabo múltiples divisiones. Dentro de la célula madre, el núcleo se divide numerosas veces, lo cual resulta en la liberación de plasma y la separación simultánea de las células hijas, esto ocurre algunos momentos después. En la división binaria, seguido de la división del núcleo de la célula madre, va la obtención inmediata de dos células hijas. También existe la reproducción por gemación, la cual puede ser simple o compuesta (Anderson, 1987, Jahn *et al.* 1979, Kudo, 1982, Martínez, 2003).

### Fisión binaria

Ésta puede ser longitudinal, la división corre a lo largo del eje anteroposterior del organismo, dando origen a dos individuos casi iguales; este tipo de reproducción es característico de la mayoría de los flagelados.

En algunos cilióforos y flagelados, el plano de división es transversal; en este plano puede darse el caso de que uno de los individuos hijos se invierta, de tal manera que el extremo posterior del organismo progenitor se convierte en el extremo anterior del individuo hijo (*Brusariag*). En otros protozoos la polaridad se conserva.

### Fisión múltiple

El cuerpo del protozoo se divide en un gran número de células hijas, las cuales pueden o no presentar masas citoplásmicas residuales del cuerpo del progenitor. Este proceso reproductivo, puede efectuarse de dos maneras, el núcleo sufre una fisión múltiple simultánea, o bien, una fisión binaria repetida, seguida de la citocinesis.

Este tipo de reproducción es típica de muchos protozoos parásitos, así como algunos de vida libre. Por lo regular, la fisión múltiple se lleva a cabo después de haberse realizado la reproducción sexual.

### Gemación

Consiste en la formación de uno o más individuos mucho más pequeños, o morfológicamente diferentes, que la célula progenitora. La gemación puede ser endógena (la formación de las células hijas se lleva a cabo dentro del individuo parental), o bien, exógena (formación de yemas jóvenes en la superficie del cuerpo de la célula madre).

### Plasmotomía

Es la división de un protozoo multinucleado en dos o más pequeñas células multinucleadas, en éste caso, la división citoplasmática es independiente de la nuclear (Martínez, 2003).

### Locomoción y movimiento

Es necesario considerar que la mayoría de los protozoos presentan movimientos que pueden ser rápidos o lentos, pero en un momento determinado se detendrán para ingerir alimento de un acúmulo de materia orgánica, o cerca de una burbuja de aire, o en las orillas del cubreobjetos. Se observarán entonces sus estructuras internas con más detalle (es

importante hacer notar que el área con mayor movimiento es la bucal-ciliados) (Foissner *et al.*, 1990).

Entre los ciliados se pueden encontrar (y observar) tres tipos principales de acuerdo a su movilidad (Lee *et al.*, 2000)

Libres nadadores. Generalmente rápidos ( *Paramecium* spp.)

Reptantes. Velocidad moderada (*Aspidisca* spp., algunos flagelados)

Fijos. Poco movimiento ( *Vorticella* spp., amibas, organismos sedentarios)

Los flagelados también tendrán movimientos rápidos, generalmente son más pequeños que los ciliados y pueden emplearse inmovilizadores para observarlos más de cerca (40X). Es importante considerar el número y tamaño de los flagelos, éstos se relacionan con el tamaño del cuerpo (i. e. dos veces la longitud del cuerpo).

Movimiento flagelar: La mayoría de los flagelos se mueven de modo ondulante, el cual puede ser en uno o varios planos, el resultado de estos movimientos es un batimiento helicoidal. Es frecuente que las ondas de movimiento se originen en la base del flagelo y se desplacen hacia el extremo o viceversa.

Batimiento ciliar: El movimiento ciliar se produce aproximadamente en un solo plano y se compone por dos fases: 1) el cilio se mueve hacia un lado curvándose en su porción basal; 2) la flexión se va desplazando hacia el extremo del cilio mientras éste recupera su antigua posición. A la segunda fase se le denomina, movimiento de recuperación.

El movimiento coordinado entre los cilios se llama coordinación metacrónica y al parecer se logra por medio de un acoplamiento viscoso-mecánico entre los cilios activos adyacentes, cuya interacción mutua mantiene una diferencia de fase entre los cilios en la dirección de la propagación de la onda, de acuerdo con la asimetría del batimiento ciliar (Mackinnon y Hawes, 1961; Martínez, 2003).

Las amibas son lentas y se desplazan por medio de los **seudópodos**, es importante notar la forma de éstos ya que es un carácter taxonómico (Figura 6).

## Estructuras de importancia taxonómica.

### Ciliados.

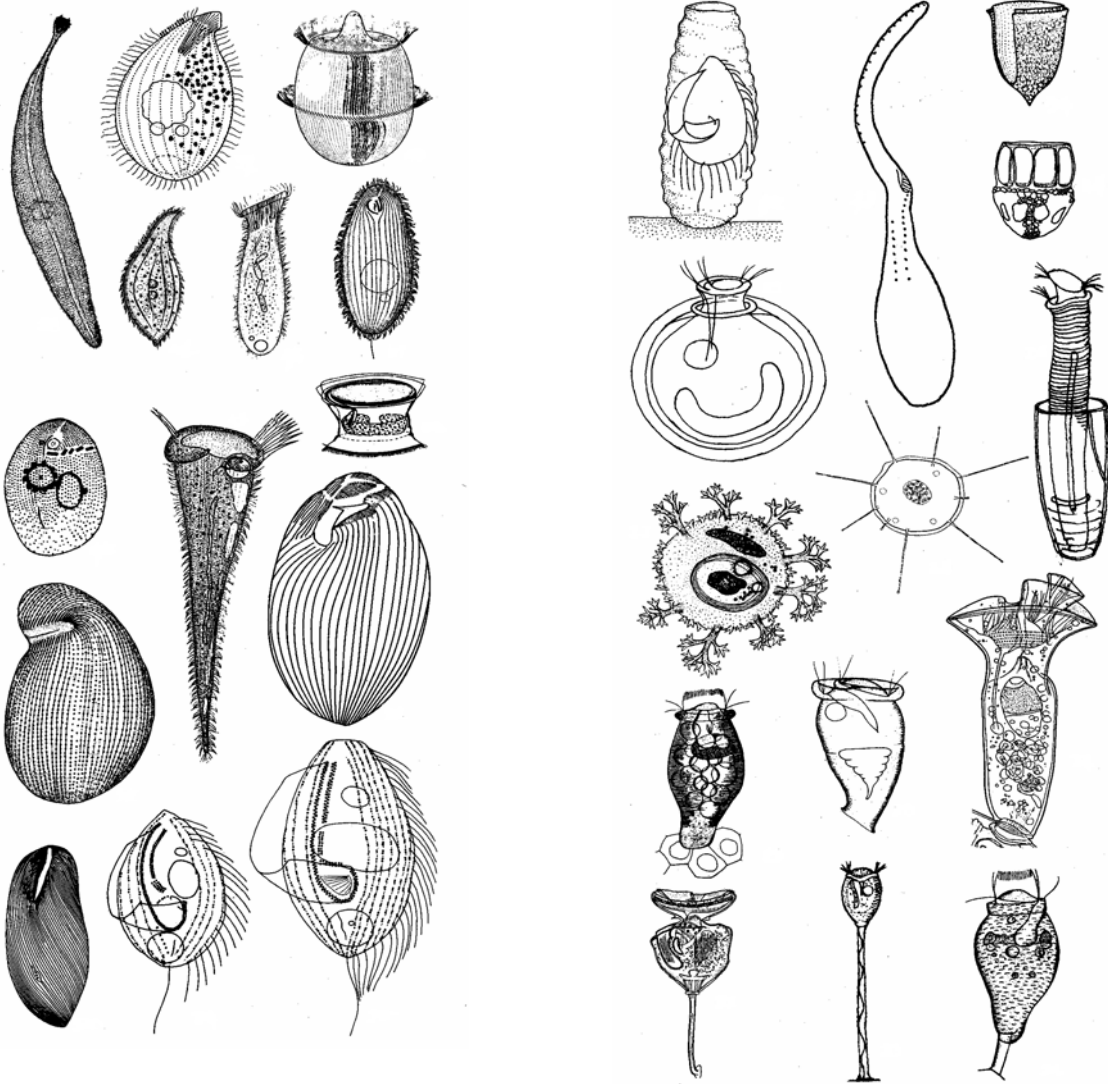
La capacidad para controlar la movilidad en finos gradientes y nadar con complejos patrones es definitivamente una gran ventaja para los organismos acuáticos, especialmente para aquellos que invaden espacios intrincados en busca de comida o alguna presa móvil. Los ciliados poseen una marcada variedad de sistemas de motilidad basados en el movimiento ciliar. Por ello, estos organismos son capaces de moverse a través del ambiente en busca de presas regularmente con remarcable agilidad y suavidad, en el caso de aquellos que son sedentarios, crean corrientes de agua mediante las cuales arrastran su alimento hacia ellos (De Puytorac y Mignot, 1987; Anderson, 1987).

La distribución de los ciliados en el agua dulce en relación con los factores ambientales está preferentemente relacionada con la temperatura, pH, así como con la abundancia de los nutrientes. En estos organismos, la composición comunitaria y las relaciones estructurales entre los miembros de las especies se encuentran determinadas en parte por interacciones complejas entre los patrones de fuentes de alimentación, variaciones en factores climáticos, estrategias en sus ciclos de vida, y la oportunidad para migrar y colonizar microhábitats, especialmente cuando este recurso es común (Olmo-Rísquez, 2003).



**Figura 2** Formas de ciliados (Lynn y Small, 2000)

Para diferenciar a los **ciliados** se debe considerar la disposición de los cilios (pelillos) y cirros (estructuras parecidas a espinas), éstos son un conjunto de cilios que funcionan como una unidad y pueden ser de forma aguzada o plumosa que sirven principalmente para desplazarse (Figuras. 2 y 3) (Aladro *et al.*, 1990). Algunos organismos presentan estructuras con apariencia de fleco, que está compuesto por hileras de cilios ordenados de forma normalmente rectangular, que sirven principalmente para conseguir alimento, se llaman membranelas. Presentan una gran variedad de formas, algunos de estos organismos pueden tener aplanadas o truncadas algunas de sus partes (Delgado 2007).



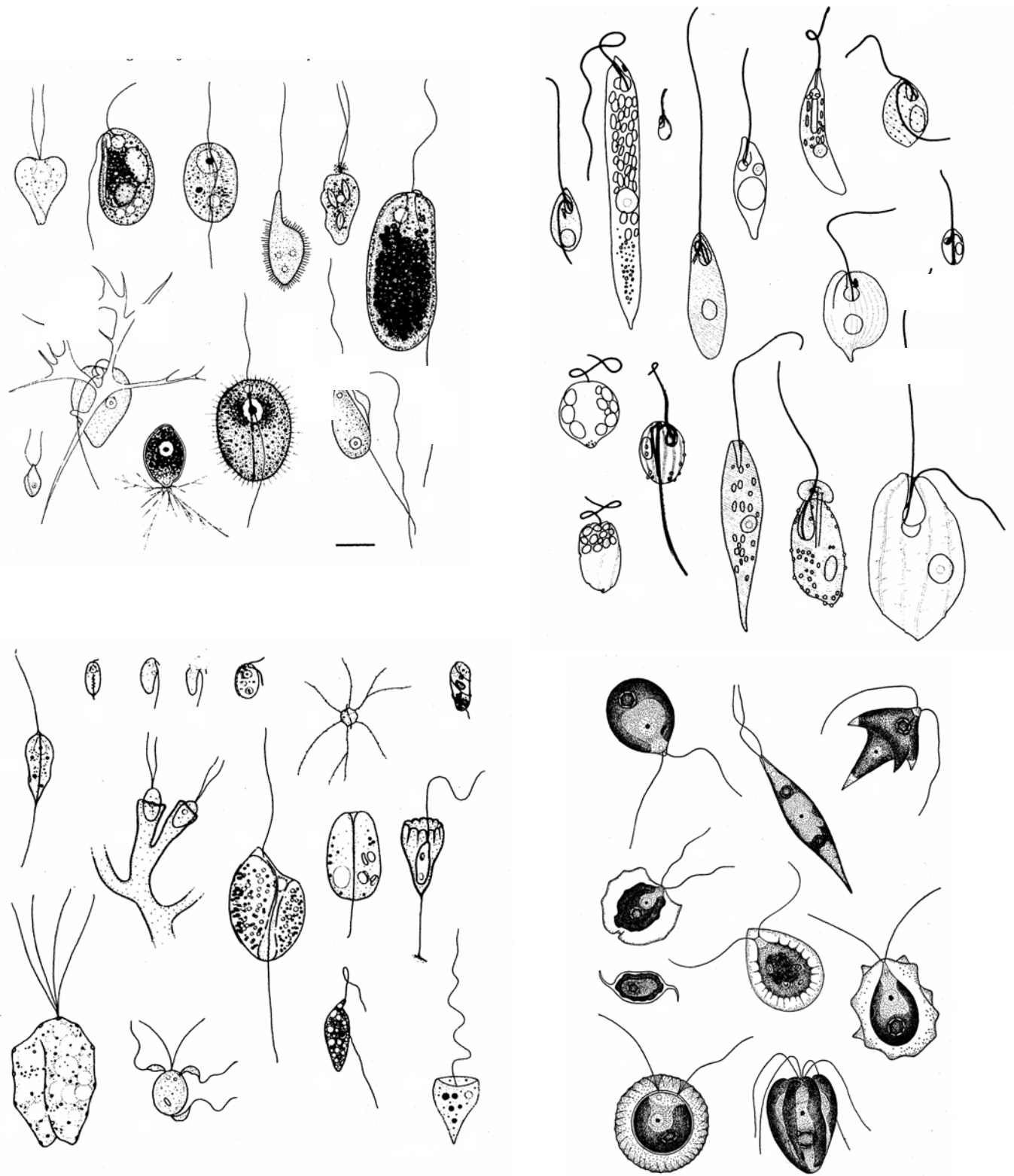
**Figura 3** Cilios, cirros y membranelas de los ciliados (Lynn y Small, 2000)

## Flagelados

Son de formas redondeadas, ovoides, alargadas, pueden presentar de uno a varios flagelos que varían de tamaño e inclusive de grosor, como se ha mencionado se debe diferenciar la longitud de éstos con respecto al cuerpo del organismo (Patterson y Larsen, 1991).

Los protozoos flagelados o mastigóforos están provistos de uno o varios flagelos que les permiten moverse. Se reproducen por división longitudinal (a lo largo). En la clase de los flagelados se incluyen los fitoflagelados o dinoflagelados. La dirección hacia donde están dirigidos los flagelos, el número y la inserción de éstos son muy importantes; en general están referidos a la longitud del cuerpo del organismo (i.e. flagelo oral dos veces el tamaño del cuerpo). El color para los heterótrofos es gris, verde para los autótrofos (Figura 4).





**Figura 4** Flagelados: cantidad, posición y dirección de los flagelos (Patterson y Larsen, 1991).

## Amibas

Los movimientos por extensiones citoplasmáticas es una efectiva forma de locomoción para aquellas células que reptan de manera ameboide o que se mueven al estar en contacto con el sustrato por medio de pseudópodos en forma de dedos, los cuales se extienden para conseguir alimento. Los miembros de este grupo son heterótrofos y no contiene autótrofos. Estos organismos no producen esporas o cuerpos fructíferos, aunque muchos miembros del grupo producen quistes de resistencia. Algunas especies recolectan partículas minerales y las organizan en forma de conchas o testas consistentes; algunas otras especies seleccionan partículas de un mismo tamaño y composición. Cada partícula es transportada a la concha y arreglada con patrones específicos (Anderson, 1987; Page, 1988) (Figura5).

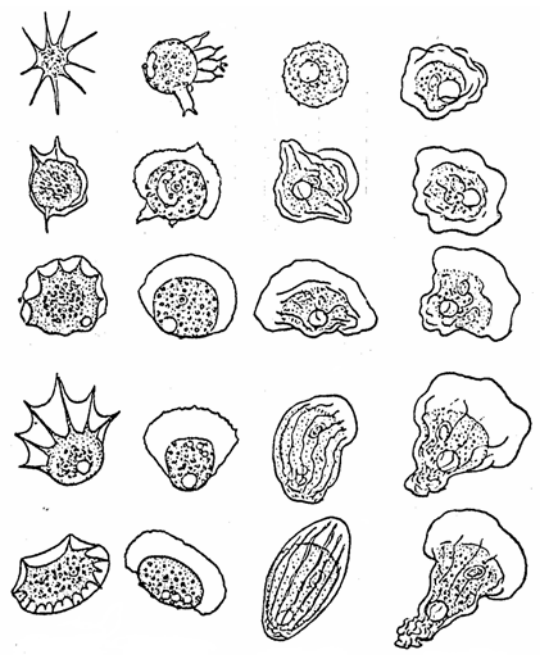
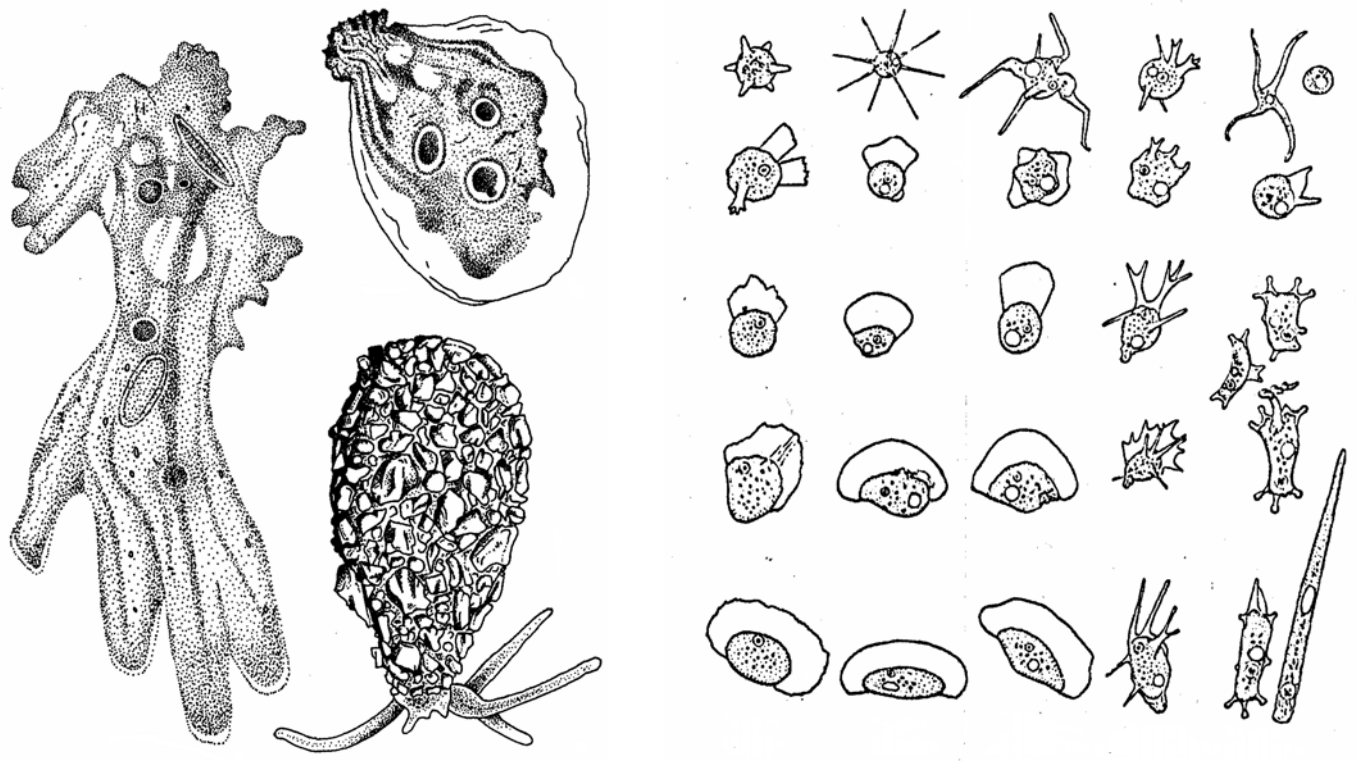
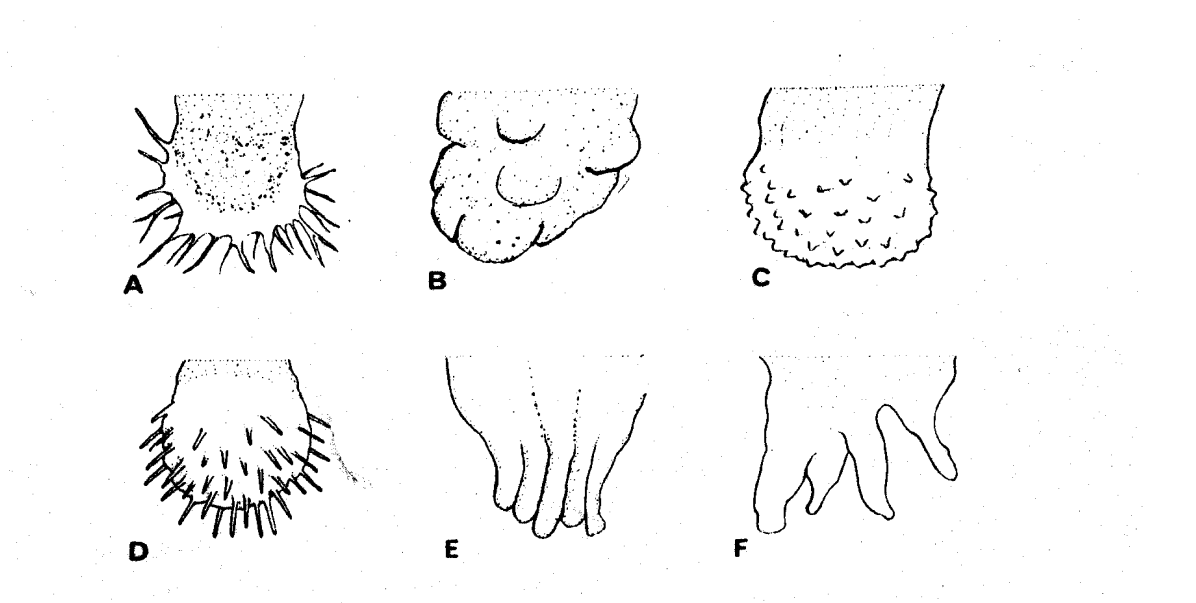


Figura 5 Amebas: formas y tipos (Patterson y Larsen, 1991).

Dentro de este grupo de organismos se pueden distinguir amibas desnudas y amibas testadas.

Las amibas desnudas son identificadas por la forma de su cuerpo, forma de pseudópodos y modo de locomoción. Los pseudópodos pueden variar en cuanto a tamaño, formación de gránulos y tipo de movimientos; estos son unas estructuras que por lo regular presentan forma de dedos o bien proyecciones lobulares achatadas que se originan en la parte anterior de la célula. El número y arreglo de pseudópodos así como la forma de locomoción permiten distinguir entre especies (Figura 6). Generalmente la parte que desplazan es hialina.

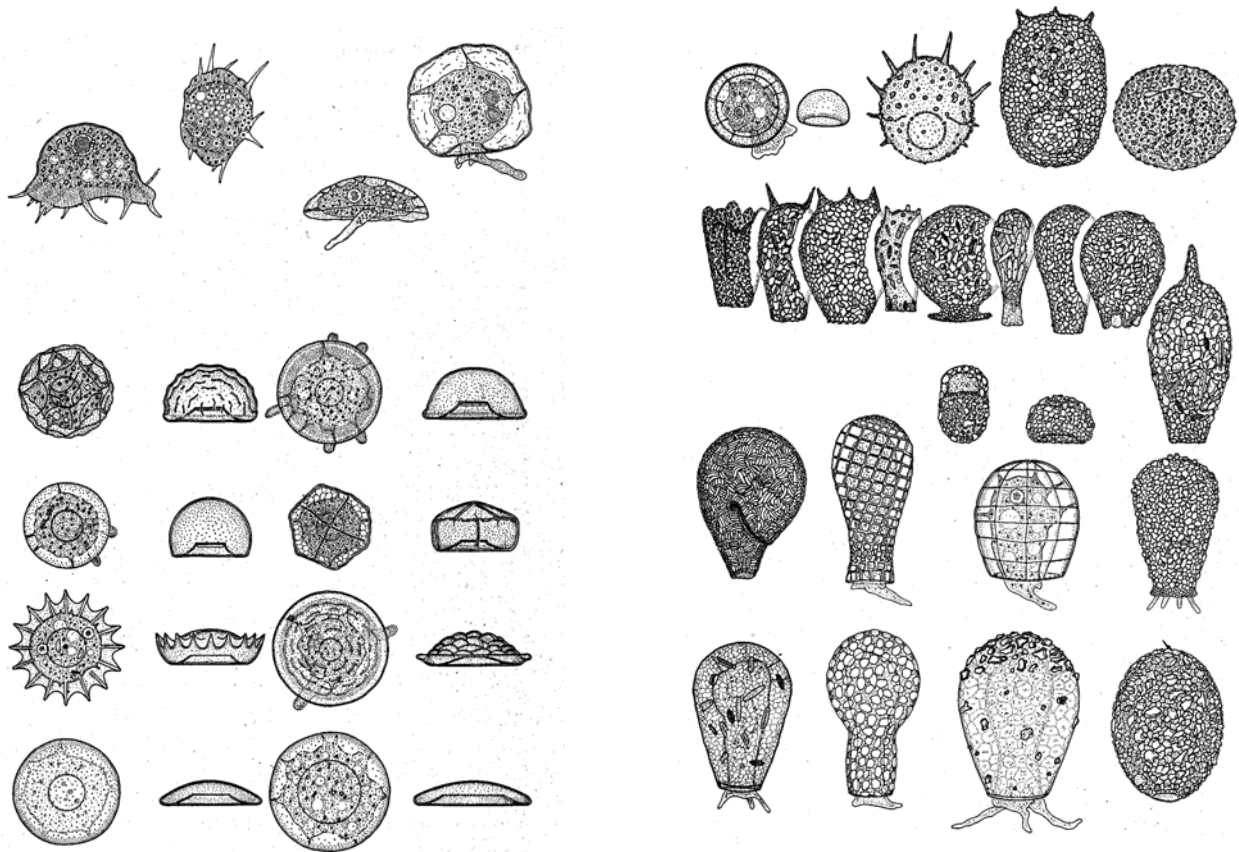


**Figura. 6** Amebas: Clases de uroides. A. colopodio o masa de filamentos adhesivos producidos para la adhesión de la parte terminal posterior al sustrato. B. morulados; C. papilado; D. piloso; E. plegado y F. uroides fasciculados (Page, 1988).

Para la identificación morfológica de las amibas deben tomarse en cuenta las características siguientes:

Tamaño del organismo, número de núcleos (uni o multinucleadas), presencia de uno más pseudópodos (uni o multipodiales), velocidad del movimiento. También debe considerarse la forma del uroide y la presencia o ausencia en el citoplasma de gránulos, cristales u otros elementos.

En el caso de las **amebas testadas**, las especies pueden distinguirse mediante su forma y composición de su concha o testa, la cual puede ser de cuatro tipos: 1) Proteica; 2) Aglutinante; 3) De silicatos; o bien 4) Calcárea. El citoplasma puede llenar completa o parcialmente la concha o testa; la morfología de la concha lo que incluye forma, composición y plano geométrico de la abertura (pseudostoma) son criterios taxonómicos de gran importancia (Figura 7).



**Figura 7** Amebas testadas: Formas y ornamentación de la testa (Streble y Krauter, 1985)

## **FILOGENIA DE LOS PROTOZOOS**

Filogenia, sistemática, clasificación y nomenclatura

La **filogenia** se ocupa de estudiar el origen y desarrollo de los organismos, es un arreglo esquemático que permite ver quienes fueron los antepasados, un ejemplo es el árbol genealógico del hombre. La **sistemática** es un intento para entender las interrelaciones evolutivas de las cosas vivientes, plantas y animales; tratando de interpretar la forma en que la vida se diversificó y los cambios sufridos en los organismos al paso del tiempo (*i. e.* la evolución del hombre). La **clasificación** es el agrupamiento de los organismos en clases basado en los atributos que estos poseen en común y/o sus relaciones (Crisci y López, 1983). Finalmente, la **nomenclatura** es un sistema preciso y sencillo que tiene que ver, por un lado, con los términos que denotan los rangos de grupos taxonómicos, y por otro, con los nombres científicos que se aplican a los grupos taxonómicos individuales.

A veces, la clasificación se esquematiza en forma de árboles filogenéticos (Baldauaf, 2003).

Como resultado del interés en la diversidad del mundo microscópico, a partir del siglo XIX se comenzó a acomodar a los microorganismos en grupos parecidos. Al mismo tiempo que se perfeccionaban las lentes para los microscopios, entonces rudimentarios, así como las metodologías de observación. Estos científicos encontraron organismos que tenían una sola célula, que tenían color o bien carecían de él, se alimentaban y reproducían como seres vivos más grandes. Entonces se comenzó a darles nombres (determinar), de acuerdo principalmente a cómo los naturalistas, -sus primeros descriptores-, los veían (por ejemplo *Tetrahymena pyriformis* = organismo con 4 membranelas y con forma de pera), como se movían y hasta que tipo de alimento era su preferido (Corliss, 1994).

Los protozoos están agrupados con los **Protistas**, que además de ellos se incluye a los hongos inferiores y a las algas; todos ellos eucariontes, altamente diversos y generalmente microscópicos (Adl *et al.*, 2005).

La primera clasificación formal fue concebida por Bütschli (1880-1882), el Phylum protozoa se dividió en cuatro grandes clases: Flagelados (mastigofora), amibas

(sarcodina), ciliados (ciliofora o infusorios) y esporozoa. Al paso del tiempo, se fueron conociendo más y mejor a los organismos, a la vez que los instrumentos de observación seguían mejorando; para los años 60's (Honigberg *et al.*, 1964) se propusieron un nuevo esquema en el que aparecen subphyla, subclases; la lista de protozoos iba en aumento. Para 1980 (Levine *et al.*) en una reunión de la sociedad de protozoólogos, decidieron elevar al estatus de reino a los protozoos con el consecuente ordenamiento en los nombres de las ramas gruesas de ese árbol; sin embargo, no hubo cambios significativos, ni aportaron mayor conocimiento sobre el grupo.

Al paso del tiempo, se observó que en muchos Protistas (dinoflagelados, euglenidos y criptomonadinos, especialmente), que tenían diferentes estrategias nutricionales que no se ubicaban en plantas (autótrofos) o animales (heterótrofos). En la actualidad se ubican tanto en un esquema como en el otro (Lewis y McCourt, 2004).

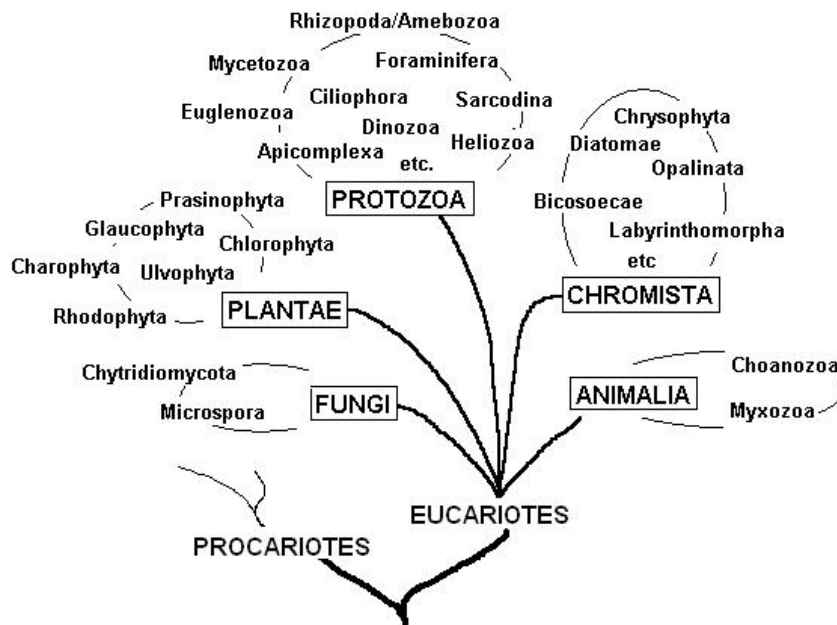
Durante los últimos 35 años este déficit de información se ha estado corrigiendo, estudios sobre la ultraestructura han revelado que la mayoría de los grupos pueden ser distinguidos por la organización de los organelos dentro de la célula, lo que provee de una identidad propia a los protozoos (Paterrson, 1991).

Diferentes autores han propuesto árboles, esquemas o diagramas que muestran las relaciones y afinidades entre diferentes grupos (Cavalier –Smith, 1998; Corliss, 1998; Lipscomb *et al.*, 1998; Margulis, 1998). Los primeros árboles o esquemas sobre protozoos se hicieron analizando sus proteínas, después utilizando el ARN ribosomal – que es un gene universalmente distribuido-; en los últimos años el uso de técnicas moleculares han vertido mucha información para entender la evolución de los eucariotas. Esta información es un medio a través del cual se pueden establecer relaciones entre grupos de organismos ya que: a) ciertos genes son universales; b) los datos son objetivos, verificables y reproducibles; y c) se pueden comparar las secuencias de bases en genes específicos (Pace, 2006). En la época actual se emplean análisis matemáticos, con la información derivada de éstos y otros datos es posible conocer el origen y las relaciones entre y con los protozoos (Dendogramas por ejemplo) (Lee *et al.*, 2000).

Ejemplo de árboles que a lo largo de la historia se han elaborado tratando de organizar los orígenes de los protozoos son los que realizó Delgado (2007).

Corliss (2004), conservando los nombres tradicionales, presenta un esquema de clasificación versátil, en el sentido que unifica a la clasificación clásica con las nuevas propuestas con un sentido cladista. Con esta versión se permite – según el autor- un

beneficio para el entendimiento de los interesados con especial énfasis en los alumnos, en la ubicación de los organismos eucariotas.



Propuesta de Corliss en el 2004

Ald *et al.* 2005, proponen una reorganización del esquema de clasificación, en la que por estudios moleculares y filogenéticos, se encuentran seis grupos incluidos en el grupo de los eucariotes: Opistoconta, Excavata, Amebozoa, Rizaria, Archaeplastida y Cromalveolata; y distribuidos en 5 de estos, se sitúan los protozoos.

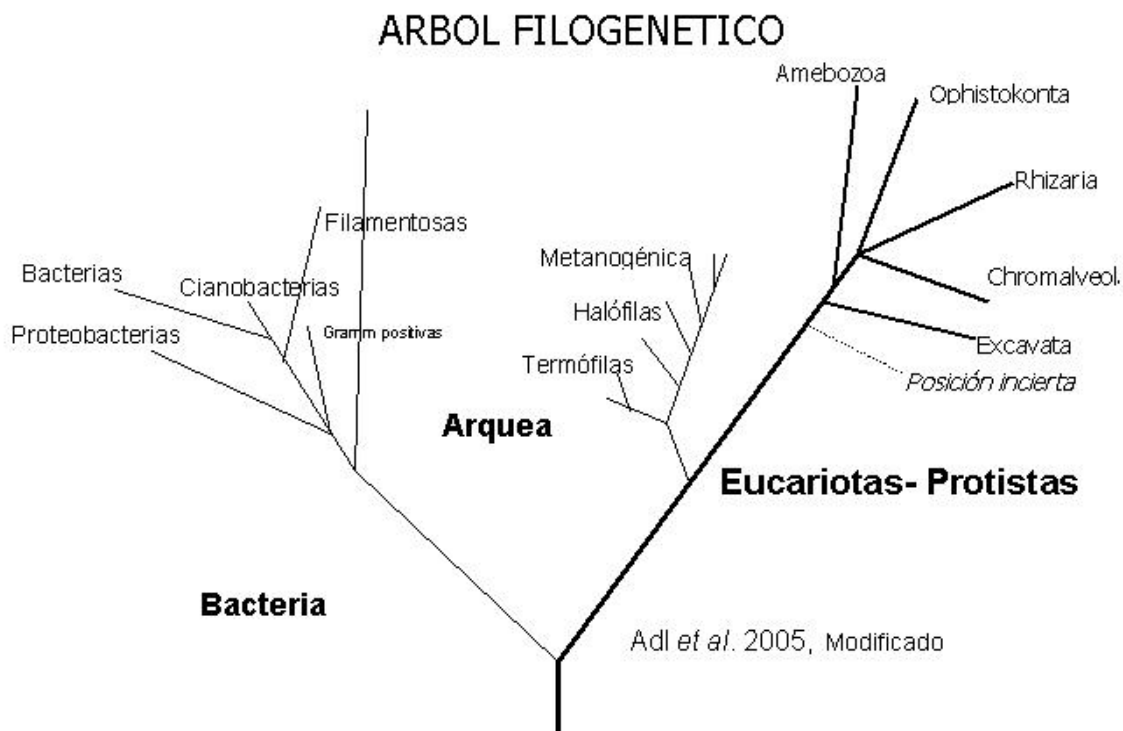
Dichos autores adoptan un sistema jerárquico, sin una posición formal designada, como “clase”, “subclase”... que consideran más sencilla y como una manera de evitar una cascada de cambios en el sistema ya establecido. La forma en que jerarquizan es por medio de sangrías en los párrafos, para hacerla mas flexible (más sangrías, más detalles de la división de cada grupo).

El cambio más significativo que consideran, es la identificación de algunos linajes monofiléticos dentro de los protistas, y comentan que es difícil acomodar el sistema de clasificación tradicional y el moderno (cladista), sin tener “reinos dentro de reinos”.

Esta revisión de la clasificación protista es aprobada por la Sociedad Internacional de Protistología, es el trabajo de un comité en el que se colabora con especialistas de



muchas disciplinas y sociedades. Se incluyen datos estructurales y moleculares; la terminología hasta ahora usada, es técnicamente confusa y necesita esclarecerse, se sugiere mejorar la redacción en esos nombres, así como se observa la necesidad de reconocer la ambivalencia en algunos protozoos (por ejemplo en la alimentación – mixótrofos- plantas o animales?, presencia de plastos en heterótrofos). Finalmente, es una clasificación que fue recomendada como la base para futuras revisiones y/o adecuaciones, susceptible de ser modificada bajo un contexto científico (Aladro, 2006; Delgado, 2007).



Dado pues el dinamismo actual sobre el conocimiento de la evolución en los microorganismos – especialmente los protistas-, la revisión de temas relacionados resulta fundamental, se están generando muchos datos que precisan de organización para construir un megasistema de los protistas (Aladro, 2006); pues existen aportaciones acerca de funciones (simbiosis, estudios de ultraestructura y moleculares, ecológicos y de comportamiento), las cuales deben compararse con las de otras especies de los mismos taxa. En cuanto a su distribución, esta debe ser considerada en un sentido más amplio,

entre los diferentes ensambles que se están construyendo, ya que deben reflejar sus relaciones evolutivas, debe mostrar mayor grado de consistencia y ser estabilizada al paso del tiempo (Corliss, 1998). Tal es el estado en que se encuentran los protistas, que no hay todavía un texto que recoja las más recientes aportaciones de las investigaciones; en general están en publicaciones recientes de revistas especializadas que no siempre están al alcance de muchos usuarios (alumnos) (Delgado, 2007).

## MUESTREO, COLECTA Y CULTIVOS

La información biológica, física y química sobre los cuerpos de agua, siempre ha sido de interés en principio para las instituciones relacionadas con el deterioro ambiental, específicamente sobre el recurso agua. Las investigaciones y estudios realizados por investigadores y profesores así como sus estudiantes que se dedican a problemas de contaminación de agua, son también parte de un registro indirecto de los organismos (Streble y Krauter, 1985). De ahí que por mínimo que sea el aporte de datos sobre un cierto cuerpo de agua, será importante para conocer sobre el estado en que se encuentra este vital recurso y en un momento dado hasta proponer ciertas medidas de recuperación, regular su uso o inclusive planear actividades en torno al manejo y conservación del agua.

En cualquier estudio es de vital importancia, no perder de vista el objetivo planeado, éste y los particulares, deben ser planteados de manera clara y concisa, lo cual permite realizar dentro de ciertos parámetros el resto del trabajo, se deben conseguir datos e información sobre el sitio de interés y considerar además lo siguiente:

Sitio o localidad de estudio, presupuesto, metodología (materiales y equipo necesarios), variables biológicas físicas y químicas, periodicidad de la recolecta...información sobre trabajos previos, similares; antecedentes de la zona de estudio.

Es importante considerar una **salida prospectiva** que sirva para conocer la factibilidad del estudio, ¿es accesible, segura, representativa?, ubicar los sitios de muestreo en un mapa, tiempo de recorrido, tiempo de muestreo e inclusive aspectos financieros.

### LA COLECTA

Lodo o fondos o aguas de cuerpos de agua, o corrientes rápidas no son muy buenos sitios para buscar riqueza biológica, aunque se pueden encontrar organismos muy interesantes y específicos de ese tipo de hábitats.

La experiencia en colecta y observación se va adquiriendo, los micro habitantes del agua son más difíciles de observar, es todo un reto, pues mientras que en la Naturaleza es fácil distinguir un pájaro de una flor; en una gota de agua diferenciar un ciliado de un flagelado se torna más complejo; más aun, un Paramecio con algas simbióticas dentro y un alga esférica que se mueva rápidamente... ¿quien es quien? (APHA, 1995). El uso de claves para dilucidar estas preguntas es muy variado, desde formas, colores y tamaños para personas no entrenadas hasta aquellas complejas y específicas de ciertos grupos:

en la actualidad existen para prácticamente todos los grupos de microorganismos (Delgado, 2007), aunque no siempre disponibles para no especialistas.

En este sentido, debe considerarse que para la colecta de protozoos, se seleccionan aquellos sitios en donde exista humedad y un poco de materia orgánica: hojas, algas, animales, plantas acuáticas, objetos en descomposición, lama biológica sobre o debajo de las piedras, sobre vegetación –musgos, líquenes-, aguas negras); lugares susceptibles para la observación de muchos protozoos.

Antes de iniciar el trabajo de campo, es deseable hacer un experimento sencillo en el laboratorio para familiarizarse con la estructura de una comunidad protozoológica y el uso del microscopio, pueden ser estas dos opciones:

- a) Prácticamente, es mejor dejar a los organismos recolectados en su frasco y sacar muestras de éste y agregar granos de trigo para el caso de los ciliados, al parecer a los flagelados y a las amibas les gusta más el arroz. Algunas veces se les agrega saborizante de leche sabor fresa (ciliados) y vainilla (flagelados-amibas) – ver más adelante- para mayor crecimiento bacteriano y cultivos más rápidos (Sánchez, com, pers); sin embargo, el recambio de granos debe hacerse más seguido
- b) También, hacer una infusión ligera de alfalfa, paja o heno, colarla y vaciarla a un frasco de boca ancha a  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad - permitiendo que esta solución se enfríe-. Inocular los organismos que se deseen observar / estudiar y permitir el crecimiento aproximadamente 24 horas después del inóculo, es importante dejar el frasco en un lugar iluminado (no directamente a la luz del sol) y observar periódicamente los cambios que ocurren en la población. Estos cambios pueden ser rápidos o lentos dependiendo de la cantidad de alimento (bacterias, algas u otros protozoos), de la temperatura o tipo de protozoos originalmente presentes (Jahn *et al.*, 1979; Kudo, 1982; Bamforth, 1985). Algunas veces es útil agregar granos (trigo, arroz) cuando se hace la infusión, como en el caso de los cultivos – ver más adelante-.

Se ha visto en muestras mantenidas en el laboratorio, que algunos organismos tienen preferencias espaciales, por ejemplo: el fondo, el lado iluminado o el menisco del recipiente, la parte media; por esto es importante homogeneizar la muestra antes de revisarla para que sea representativa de la comunidad (Cairns, 1974). Con este experimento se puede

aprender a diferenciar unos organismos de otros, facilitando en gran medida el trabajo que se realizará posteriormente.

Si se tienen **diferentes sitios de muestreo**, deben aplicarse esfuerzos y métodos de recolección similares, a fin de tener mayor confiabilidad en la comparación de resultados (Cairns, 1968).

La **frecuencia** de toma de muestras depende también de la intención, de los objetivos del estudio, así como del intervalo de fluctuaciones estacionales, las condiciones meteorológicas, adecuación del estudio y disponibilidad del personal (APHA, 1995). Siempre es deseable tomar muestras frecuentes debido a la variabilidad temporal, migraciones (por variaciones de luz, depredadores) de las comunidades, corrientes aleatorias producidas por los vientos, mareas. Lo ideal es tomar muestras lo más seguido posible (diarias- a distintas horas del día-, semanales, quincenales...), si esto no es posible, los datos serán útiles de cualquier manera.

Una vez determinadas las condiciones de muestreo, se procede a colocar etiquetas a los envases con los siguientes datos: fecha, estación, sitio de colecta, profundidad y colocarlos en cajas plásticas que faciliten su transporte de un lado a otro y evitar que se maltraten.

Envases plásticos (de agua, por ejemplo) o frascos de boca ancha (el vidrio, siempre es más riesgoso), se introducen en el cuerpo de agua, más o menos a una profundidad de 20 cm consideradas muestras superficiales; se debe permitir la entrada de materiales que se encuentren en el sitio, y llenarlos a la mitad o  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad, si es para observaciones *in vivo*. Las muestras pueden ser filtradas (ver más adelante) en el sitio para no transportar grandes volúmenes de agua y facilitar el trabajo de laboratorio; un gotero grande o pipeta de 50 mL (Noland, 1925) siguen siendo excelentes muestreadores o bien usar redes con tamaño de poro específico para el tamaño de organismos que se desee coleccionar. La colocación de **sustratos artificiales** -tanto para las diferentes estaciones como fechas de colecta- se podrán “sembrar” en el cuerpo de agua para permitir su colonización, deben ser fijados en el sitio (con piedras, boyas), amarrados para evitar ser llevados por la corriente o robados (Cairns, 1982). Por sustratos artificiales se entiende todo aquel material que sea inocuo para los organismos y que sea susceptible de ser colonizado: espuma de poliuretano, portaobjetos, bolsas hechas tiras, hojas, piedras, organismos – caracoles -protozoos fijos, rotíferos-, plantas – como el lirio acuático, pasada una semana se recolectan y observan al microscopio.

Estudios de sucesión, colonización, inmigración extinción, estrategias r y K y respuesta a diferentes factores y mucho más pueden llevarse a cabo exponiendo una serie de sustratos en el sitio que se desee y recolectarlos cada cierto tiempo para observar como va cambiando una población de organismos por otra (Cairns, 1982). Algunos autores mencionan que exponer portaobjetos (Deroux y Tuffrau, 1965) de entre 6 y 8 horas en el medio acuático, se desarrollan asociaciones interesantes de protozoos, cajas de Petri (Spoon y Burbank, 1967) colocadas de manera invertida, permite la colonización de ciliados fijos y amibas principalmente; además de que es posible observarlos directamente bajo un estereomicroscopio y hacer evaluaciones rápidas de calidad de agua (organismos indicadores) (Foissner, 1992).

Los parámetros ambientales tienen envases, tiempos de determinación, fijadores y conservantes específicos, también deben considerarse y prepararse con antelación.

El **número y volúmenes** de las muestras depende del tipo y número de determinaciones a realizar, el número de duplicados o testigos dependerá también del diseño estadístico seleccionado para discutir e interpretar los datos (Wetzel y Likens, 1979)

La variedad de **tamaños y formas** en una muestra supone problemas de conteo y exceso de organismos en una observación microscópica. Dependiendo de las necesidades concretas del estudio se podrán separar a los diferentes organismos utilizando mallas o redes que permiten seleccionar tamaños. Este trabajo también es deseable hacerlo en el campo pues los volúmenes a transportar se reducen considerablemente.

Se pueden elaborar pequeños tamices o coladores con telas usadas – generalmente de nylon- para la serigrafía, son muy útiles aunque caras, pero el rendimiento es excelente. Para conocer el tamaño de abertura, es deseable colocar un pedacito bajo el microscopio óptico- en el que se conozca el diámetro de campo en micrómetros - o calcularlo-. Habrá que buscar el tamaño de malla suficientemente pequeño para retener a los organismos deseado y bastante grande para evitar problemas de obturación (APHA, 1995).

El **transporte** de material vivo debe hacer lo más pronto posible, si las muestras se van a **conservar** inmediatamente después de obtenerla, añadir los conservantes a los envases antes de tomarlas (APHA ver tabla en anexo). El acetato de lugol (Wetzel y Likens, 1979), tiñe a los organismos y es un conservador muy bueno para los protozoos pues aun cuando disminuye su tamaño – como con el uso de otros reactivos (Foissner, 1999)- se conservan mejor las formas. Los protozoos alcanzan una coloración café claro, pero debe tenerse cuidado y no confundirlos con organismos autótrofos pues cuando tienen

algas dentro, se tornan más oscuros, aunque es posible discernir cual es cual porque se conserva parte de la ciliatura (ver apartado de observación de los organismos).

La **bitácora** es imprescindible en un trabajo de campo y de laboratorio. En el campo deberán registrarse la localidad, fecha, hora, sitio de la muestra, datos ambientales (físicos, químicos, meteorológicos, fauna y flora circundantes) y todas aquellas observaciones que se crean significativas. Las libretas usadas por los ingenieros – se les conoce como “libretas de tránsito” son excelentes-, de pasta dura e impermeables – inclusive las hojas lo son. Usar lápiz o bolígrafos de tinta indeleble para evitar que se borre lo escrito. Estos datos son muy valiosos cuando se interpretan los resultados analíticos y a menudo contribuyen a interpretar los cambios inusuales en el medio acuático.

#### CULTIVOS Y MANTENIMIENTO

Los **medios de cultivo**, son aquellos sustratos que favorecen el crecimiento y reproducción de los organismos, agua más sales más materia orgánica, que sea factible de descomponerse y generar alimento para otros organismos (bacterias y nutrientes). Hay medios que pueden adquirirse en empresas especializadas para protozoos de vida libre, parásitos y organismos asociados (Needham, 1959).

Todo el material a utilizar debe estar limpio, evitar trazas de sustancia químicas, jabón u otras sustancias que puedan ser toxicas para los protozoos; algunos medios es recomendable esterilizarlos antes de hacer algún inóculo.

Generalmente se precisa guardar una muestra de los sitios de muestreo para ser cultivados, la mejor opción, es que se ponga una cantidad del agua original -en un frasco chico o caja de Petri, llenada  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad- y agrega un grano de trigo o de arroz (ver más abajo) o materiales (hojas, un poco de tierra, piedrecillas) del lugar de colecta. Las especies crecerán y muy seguramente serán reemplazadas en un lapso corto de tiempo por otras; de ahí que si se pretende observar a los organismos originales de ese tiempo y lugar, debe hacerse la observación en un lapso no mayor de 48 horas. Se debe procurar no poner demasiado alimento; si el agua se evapora, agregar un poco de agua bidestilada (el agua de la llave es un veneno para muchos organismos).

Colocar los cultivos en el laboratorio de manera que no les de la luz directa del sol.

Algunos protozoos reaccionan bien a los cultivos, otros mueren o se ven disminuidos en número; así mismo, cambios repentinos de temperatura, de oxígeno, o bien, movimiento excesivo causa alteraciones en ellos. Las cajas de Petri de 7 mm, son una excelente opción para conservarlos en espacios pequeños – ya que se pueden apilar-, ventilados y frescos, siempre llenados a  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad para permitir que respiren. Algunas combinaciones que han funcionado son (Sánchez com. pers.):

AMIBAS.- 1 a 2 granos de trigo por cajita o mezcla de trigo y avena, 2 o 3 granos de arroz.

FLAGELADOS.- 1 a 2 granos de arroz por cajita (de petri de 7 mm), una pizca de Quick de vainilla (saborizante de leche Nestlé ®), o una pizca de leche en polvo. Para los autótrofos, luz artificial es adecuado.

CILIADOS.- 1 a 2 granos de trigo, paja, Quick de fresa (saborizante de leche Nestlé ®).

Hacer **subcultivos** mejora la calidad de los organismos, con máximos de poblaciones. Considerar luz moderada que no le de la luz del sol, pH de neutros a ligeramente alcalinos, temperaturas de 20 a 22° C, dado que los organismos son muy susceptibles. Quitar los granos de trigo o arroz en descomposición, limpiar los bordes de los contenedores y agregar o medio de cultivo Chlakley (Kudo, 1982) – ver más abajo- o agua bi destilada o agua del sitio de muestreo limpia).

Los cultivos **pueden ser:**

Mixtos: contienen una gran riqueza de especies. Axénico: Es aquel donde se desarrolla una sola especie, sin ningún otro organismo; puede mantenerse si se impide la acumulación de toxinas y se subcultiva periódicamente. Monoaxénico: Una sola especie es mantenida con otras especies (generalmente bacterias) como alimento.

**Infusiones:** agua hervida previamente y fría, destilada; hervida con un nutriente (trigo, arroz, alfalfa, lechuga seca, cereales, paja, leche en polvo, chícharo o pasto seco, musgo, hojarasca) y dejar reposar 24 h para posteriormente hacer el inóculo. Evitar el crecimiento bacteriano excesivo. Colocares en envases de boca ancha y ligeramente tapados o ponerles un pedazo de papel celofán que permita el intercambio gaseoso pero no la entrada de polvo excesivo (López y Serrano, 1997).

Existen en bibliografía una gran variedad de medios de cultivo para permitir el crecimiento de organismos en general o para organismos muy específicos (Foissner, 1992; Lee *et al.*, 2000)



El medio Chalkley, funciona muy bien, usar agua destilada o pasteurizada con granos de trigo o arroz según sean los organismos a cultivar (ciliados y flagelados en el primer caso y el arroz para las amibas), se esterilizan a 15° C por 15 minutos, o bien hervirlos por un tiempo igual; una vez fríos, se pueden inocular los organismos\* de preferencia en una campana de extracción o cerca de un mechero para evitar la contaminación por otros organismos. Se recomienda también dejar estabilizar el medio nuevo.

Para una mejor observación, conviene dejarlos sedimentar por 5 a 10 minutos y proporcionarles el alimento adecuado. Observarlos con el estéreo microscopio para seguir su crecimiento. Por ejemplo, los paramecios se congregaran alrededor de la comida, las vorticelas y las amibas, estarán adheridas a un sustrato en el fondo o bien en la superficie, *Coleps*, *Cyclidium* serán especies muy abundantes; también algunos *Stentor* se podrán encontrar en las partes menos iluminadas de la cajita y fijos al fondo de ésta, los flagelados estarán nadando activamente, por lo que sin mover mucho el recipiente donde se tenga el cultivo se debe verificar las diferentes profundidades de éste.

\*Se pueden alargar las puntas de las pipetas Pasteur –con un mechero- para tratar de “pescar” a los organismos para inocularlos y en un momento dado hacer cultivos monoaxénicos.

Para **protozoos enquistados**: Hervir paja en agua destilada o pasteurizada por 5 a 10 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente, añadir un cantidad pequeña de la muestra y después de 24 horas observar el crecimiento.

**Los protozoos del suelo** y alrededor de las plantas (perifiton) se recogen con un sifón o una pipeta gigante con una perilla de goma (algunas veces las jeringas de cocina funcionan excelentemente), una pipeta graduada de 25 o 50 mL de capacidad. Un aparato para enemas –comprado en la farmacia- funciona tapando el orificio más grande. Se pueden dejar sustratos artificiales susceptibles de ser colonizados (Cairns, 1982).

## **Microscopio y técnicas microscópicas para la identificación de protistas**

Se considera que la estructura básica del microscopio fue inventada por Galileo entre los años 1590 y 1610, aunque también se le adjudica a los holandeses Hans y Zacharias Jensen, quienes combinaron dos lentes convergentes dentro de un tubo (Singer, 1962).

El vocablo microscopio significa “ver lo pequeño” (micros-pequeño, scope- ver), este término fue acuñado por Giovanni Faber de la “Academia de Lincei”, una de las primeras sociedades científicas de Italia y Europa (Clay y Court, 1932; Corliss, 1975).

Existen diversos tipos de microscopios y estos permiten hacer observaciones de tipo general o bien más específico como es el caso de estructuras de importancia taxonómica en algunos organismos, lo cual se logra con el uso adicional de ciertas soluciones reveladoras. Entre los tipos de microscopios que existen se pueden encontrar: estereoscópico, ópticos para lograr iluminación de campo claro (Köhler), campo oscuro, de contraste de fases, epifluorescencia, microscopios de luz polarizada, de contraste diferencial de interferencia (Nomarski), microscopios electrónicos de barrido (MEB), microscopios electrónicos de transmisión (MET) (Barrera y Cárdenas, 1997) con muchas innovaciones en la óptica y aditamentos como cámaras y software para una mejor visión de lo microscópico ([www.zeiss.com.mx](http://www.zeiss.com.mx)). Para una visión general, didáctica y amigable sobre microscopía el texto de Barrera y colaboradores (2007) es excelente.

Principios básicos.

Para los fines de este trabajo se describirán las generalidades de dos tipos de microscopios llamados fotónicos porque utilizan luz producida por fotones: el de disección o estero microscopio (estereoscópico) y el óptico, de observación o biológico.

El microscopio estereoscópico, da una imagen en tres dimensiones y al mismo tiempo se puede hacer disección de organismos. Este tipo de microscopio fue desarrollado por Greenough en 1897 (Clay y Court, 1932).

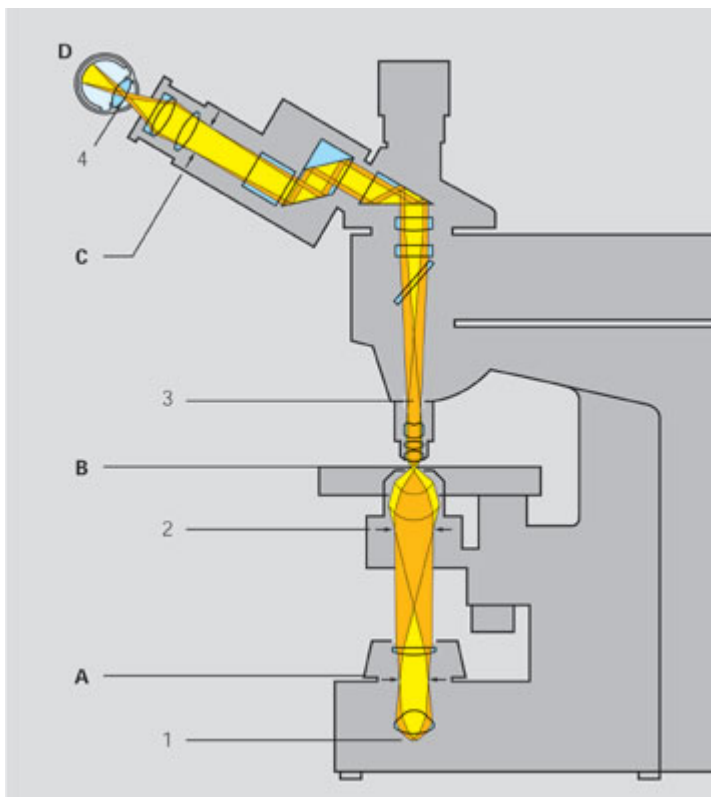
La formación de una imagen tridimensional se debe a que este equipo tiene dos sistemas microscópicos unidos, uno para cada ojo en forma independiente. Tienen un prisma que

invierte los rayos luminosos para dar una imagen recta y estereoscópica, la iluminación es directa y se precisa de mover el objeto para optimizar la visión (Cárdenas y Barrera, 1997).

El microscopio óptico en la actualidad se ha transformado en un instrumento de uso común en los estudios biológicos, dichos microscopios son llamados compuestos, ya que están estructurados por un sistema óptico que consta de dos lentes principales: una cercana a la preparación llamada **objetivo** y otra cercana al ojo del observador llamada **ocular**; estas lentes pueden ampliar, en conjunto, hasta 2000 veces una imagen.

En un microscopio pueden distinguirse tres sistemas que, integrados permiten una buena observación:

- 1) Sistema óptico: sus lentes permiten agrandar la imagen
- 2) Sistema mecánico: permite realizar el movimiento y cambio de las lentes así como el enfoque de la preparación
- 3) Sistema de iluminación: aquí se encuentra la fuente de luz y aditamentos para iluminar eficientemente la preparación (Cárdenas y Barrera, 1997).



El microscopio contiene dos diferentes grupos de planos ópticos, los cuales se complementan.

El primer grupo consiste en:

- 1) filamento de la lámpara
- 2) diafragma de apertura
- 3) objetivo pupilar
- 4) pupila del observador

Este grupo define la ruta de luz de las pupilas y determina la resolución del microscopio.

El otro grupo contiene:

- A) campo luminoso del diafragma
- B) plano del espécimen
- C) imagen intermedia en el ocular
- D) retina del observador

No es exageración decir, que casi todo el arte de la microscopía –sin tomar en cuenta la preparación del espécimen- consiste en el uso correcto del campo de iluminación y la apertura de los diafragmas, afortunadamente, existen reglas simples para esto ([www.zeiss.com.mx](http://www.zeiss.com.mx)). Aunque no hay que olvidar la limpieza de las lentes, sobre este aspecto, es importante considerar que las partes internas no deben ser tocadas por los usuarios; se deben limpiar las superficies exteriores de las lentes de los objetivos y oculares, las lentes del condensador (sobre todo en los microscopios invertidos), lentes del diafragma iris y/o de la fuente de luz. El uso de una perilla y brocha de pelo suave para quitar el polvo y luego hisopos hechos con algodón Chapultepec® humedecidos con Windex® (azul) sobre superficies y lentes. Vaho sobre las lentes y limpiar con papel para lentes o para artículos ópticos (Whatman 105) en forma de espiral.

**Para la medición de tamaños al microscopio, ver apartado Observación Pág. 55.**

## Campo claro o iluminación de Köhler ([www.zeiss.com.mx](http://www.zeiss.com.mx))

Esta es la técnica de iluminación más utilizada, en la que se pretende iluminar de manera uniforme el campo con la luz reflejada por un espejo o por luz transmitida a través de los objetivos (epi-iluminación), sirve para examinar superficies de objetos no transparentes. Con esta iluminación se puede ver la forma, coloración y refringencia de las diferentes partes de los especímenes. Si se lleva a cabo esta técnica, el campo visual se verá uniformemente iluminado, con una imagen brillante, sin reflejos o deslumbramientos y proporcionando protección a la preparación. Las condiciones previas son las siguientes: condensador centrable y desplazable verticalmente y con diafragma de iris.

Lámpara con colector y diafragma de campo.

1. Subir completamente el condensador con la lente frontal introducida.
2. Enfocar la preparación con el objetivo de 10X o menor aumento.
3. Observar y cerrar el diafragma dispuesto en el pie del microscopio.
4. Bajar un poco el condensador, hasta obtener máxima nitidez de la imagen de diafragma (polígono)
5. Centrar el diafragma del campo luminoso en el campo visual, recurriendo a los dos tornillos del condensador.
6. Abrir el diafragma del campo luminoso casi hasta el borde del campo visual, centrarlo con exactitud y abrirlo hasta que desaparezca detrás del borde del campo visual.
7. Regular el contraste de la imagen con la ayuda del diafragma del condensador.
8. Insertar el filtro azul (opcional, recomendable). Regular la intensidad de la luz con el control de voltaje o bien con ayuda de los filtros neutros.
9. A cada cambio de objetivo: a) enfocar con el micrométrico; b) contrastar con el diafragma del condensador.

Contraste de fases ([www.zeiss.com.mx](http://www.zeiss.com.mx))

El microscopio con contraste de fases es un aditamento extra -objetivos con la notación Ph- que tienen algunos microscopios, que permite realizar observaciones de preparaciones sin la necesidad de teñir las células, fue desarrollado por F. Zernike en 1935. Su principio está basado en que se logran retrasar algunos de los haces luminosos que penetran al objeto respecto a otros que siguen una trayectoria normal por medio de un disco o placa de fase que está colocado en la parte de abajo de la platina. Con esta iluminación, a diferencia del de campo claro, se logra ver objetos casi transparentes, debido a que en este caso no existen cambios de amplitud de onda (color) pero sí existen cambios de fase entre los haces directos y los difractados debido a los cambios en los índices de refracción de los diversos componentes celulares con respecto a las diferencias de su medio (Barrera *et al.*, 2007). Una vez realizada la iluminación de campo claro, se selecciona en la placa de abajo de la platina el mismo número que acompaña a la notación Ph del objetivo; con la ayuda de un ocular especial “microscopio auxiliar”, se introduce en uno de los oculares, -éste se mueve a manera de telescopio- hasta observar dos anillos, uno luminoso y otro oscuro. Con la ayuda de dos tornillos (diferentes a los del condensador) que están normalmente al frente en la platina- o a los lados-, se mueven hasta lograr que queden empalmados, se quita este microscopio auxiliar y se pone nuevamente el ocular. Una vez realizada esta operación, el contraste de fases, queda hecho.

### Microfotografías

Las primeras microfotografías se realizaron a mediados del siglo XVIII, por Reade (Clay y Court, 1932), observando como hasta estos tiempos, la posibilidad de estudiar en detalle a los organismos y sus estructuras. Las microfotografías son excelentes pruebas documentadas, antecedentes de respaldo, evidencias. Las cámaras digitales con adaptadores a oculares (Martín Microscope, Inc.) de microscopios son altamente utilizadas en el presente – son tan diversos como las cámaras que se montan en ellos-; la observación, así como la toma directa de fotografías a través de computadoras, son las últimas novedades que permiten tener un seguimiento sobre el comportamiento de los organismos utilizando las muy variadas técnicas de observación con las que se cuenta hoy en día (Cárdenas y Barrera, 1997). Es muy importante considerar que al hacer

observaciones con una cámara digital o videocámara se aumenta el objeto para mirarlo mejor, en general se toma la foto y se olvida muy frecuentemente cuantos aumentos hay además de los objetivos y oculares.

### Videomicroscopía

Hace aproximadamente 30 años, los investigadores intentaron reemplazar las pesadas, y ligeramente ruidosas videocámaras de 16 mm, por cámaras de televisión –hasta entonces igual de pesadas. El movimiento de pequeños organismos, pudo entonces ser mostrado en vivo ante varios espectadores. Fotografías con movimiento, podían ser grabadas en una cinta magnética, la cual facilitó el manejo de documentos fotográficos. Únicamente el llamado “C-adaptador” ha permanecido vigente desde aquellos días de las cámaras de cine. Las primeras cámaras de televisión tenían una cosa en común con las cámaras de cine: Los tubos de soporte, tenían un diámetro externo de una pulgada, pero un objetivo activo para la grabación de la imagen con una diagonal de imagen de 16 mm – idénticas a aquellas cámaras de cine. Es por ello que las cámaras de televisión podían ser adaptadas al microscopio, mediante el mismo adaptador que las cámaras de cine, a lo cual se le llamaba “Via C-adaptador” ([www.zeiss.com.mx](http://www.zeiss.com.mx)). Actualmente las videocámaras son ligeras, pequeñas, se pueden manipular fácilmente y dirigir en diferentes ángulos, al igual que con las cámaras, se colocan en el tubo de los oculares mediante adaptadores que permiten la videograbación.

Toda esta información guardada en pequeñas tarjetas de memoria puede pasarse a una PC, para darles el uso requerido y retoques si es necesario.

### Postura del observador.

Los mandos, controles, objetivos, oculares deben tratarse con cuidado y suavemente, el microscopio es un instrumento delicado de precisión y de costo elevado. Huelga decir que debe enchufarse y enchufarse tomando la clavija e insertándolo en el contacto eléctrico.

La intensidad luminosa debe bajarse cuando el microscopio no está en uso por un tiempo, si deja de observarse es mejor apagarlo. Las lámparas tienen una vida media y se gastan más si se sube y baja la intensidad o se apaga y prende constantemente. Además son caras.

### **OBSERVACION (*in vivo*): fijación, tinción y cuenta de protozoos de vida libre.**

Es necesario considerar que la mayoría de los protozoos presentan movimientos que pueden ser rápidos o lentos, pero en un momento determinado se detendrán para ingerir alimento de un acumulo de materia orgánica, o cerca de una burbuja de aire, o en las orillas del cubreobjetos. Se observarán entonces sus estructuras internas con más detalle (en los ciliados es importante hacer notar que el área con mayor movimiento es la bucal, generalmente).

Se pueden encontrar (y observar) tres tipos principales de acuerdo a su movilidad:

Generalmente rápidos.- libre nadadores (*V.gr. Paramecium sp., Euglena sp*)

Velocidad moderada.- reptantes (*V. gr. Aspidisca sp.,*)

Fijos o poco movimiento (*V. gr. Vorticella sp, la mayoría de las amibas*)

Los flagelados también tendrán movimientos rápidos, generalmente son más pequeños que los ciliados y pueden emplearse inmovilizadores para observarlos más de cerca (40X). Es importante considerar el número y tamaño de los flagelos, éstos se relacionan con el tamaño del cuerpo (*i. e.* dos veces la longitud del cuerpo).

Las amibas son lentas y van desplazando los pseudópodos, es importante notar la forma de éstos (ver figura en Generalidades) ya que es un carácter taxonómico (Page, 1988).

Así también, existirán especies que dependiendo de los factores ambientales (físicos y químicos) y biológicos (depredadores, por ejemplo) que regulen el ambiente se ausenten y vuelvan a aparecer o mueran, a fin de alcanzar un cierto equilibrio en que la variedad (diversidad) de especies y el número (abundancia) no cambien fuertemente.

#### Material y equipo necesario

Para el estudio de los protozoos es necesario contar con el equipo básico: microscopio fotónico (óptico) estándar con objetivos de 10 a 100 aumentos (10X, 40X y 100X) con fuente luminosa; porta y cubreobjetos estándar, papel seda para lentes de microscopía; frascos de colecta de boca ancha, pipetas Pasteur.



Se debe asegurar la correcta iluminación de la preparación según las especificaciones del instructivo para el uso de microscopios (Iluminación de Köhler- campo claro y si se tiene contraste de fases).

Usar siempre una pipeta limpia para cada cultivo o muestra disminuye la contaminación por otros organismos; no conservarlas en refrigeración, una temperatura adecuada está entre 20 y 22° C (generalmente a temperatura ambiente no hay problema).

Después de la colecta, permitir que los organismos se estabilicen en el frasco (15 a 20 minutos) o portaobjetos (2 minutos) y hacer una observación general con un estereo microscopio (Whitten y Pendergrass, 1980).

También puede optarse por hacer una observación general homogeneizando la muestra, vaciando en una cajita de Petri o de sedimentación (para mayor volumen).

Debe de considerarse previo al estudio y con los objetivos muy claros, cuantas muestras serán procesadas mediante fijadores, inmovilizadores, tinciones y cuales se usarán para tenerlas listas al momento de hacer las observaciones y no perder tiempo en preparar al momento (ver más adelante).

Se debe considerar que los organismos se deforman o rompen y su tamaño disminuye hasta un 20 del original cuando se les agrega un fijador o conservador (Foissner, 1999), de ahí su importancia de observarlos *in vivo*, el Acetato de lugol es menos agresivo. Es conveniente hacer un pequeño experimento en el que se ponga a una muestra que se esta observando al microscopio una mini gota (con un palillo o la punta de una aguja) el conservador y mirar como se transforma el organismo (Sánchez *com. pers*). Esto ayuda a definir “quién es quien” cuando las muestras fijadas van a ser contadas en cámaras de cuenta (Sedwick-Rafter, Uthermol, Palmer Maloney) (APHA, 1995), Método de la gota de Lackey (Wetzel y Likens, 2001). También se puede acudir a bibliografía o colecciones de referencia o colaboradores experimentados, en donde se especifiquen los tamaños originales.

Fijación.

Conservadores y fijadores:

El objetivo de este procedimiento es conservar las estructuras características de un organismos o parte de él en una situación lo más próxima posible al estado normal vivo. Los fijadores provocan la insolubilización de los componentes celulares, el endurecimiento

del material, aumento en los índices de refracción para obtener una mejor diferenciación óptica, entre otras cosas (López y Serrano, 1997).

Físicos: por desecación y calor

Químicos: sustancias líquidas, combinaciones de elementos y vapores, dentro de estos existen los que coagulan el citoplasma (etanol, metanol, ac. pícrico, ác. crómico, trióxido de cromo) y los que no lo coagulan (formaldehído, tetróxido de osmio, dicromato de potasio, ac. acético). Cada una tiene características propias y específicas para determinadas estructuras celulares (Wetzel y Likens, 1979; Lee *et al.*, 2000).

#### Schaudinn

HgCl<sub>2</sub> ( al 6 o 7%) 66 mL, etanol al 95% 13 mL

#### Acetato de lugol.

Ioduro de potasio 20g, Iodo sublimado 11g diluir en 100 mL de agua destilada y agregar 20 mL de ac. Acético glacial. Guardar en un frasco color ámbar.

#### Champy

Ac. Crómico al 1% 70 mL, dicromato de potasio al 3% 8mL y Ac. Acético glacial 1 mL.

#### Flemming

Ac. Crómico al 1% 30 mL, tetróxido de osmio al 2% 8 mL y Ac. Acético glacial 2 mL.

Formol (que viene del 37 o 40% de fábrica) al 2% para protozoos; poner 5 mL de formol para cada 100 mL de muestra de agua.

Glutaraldehído al 1 o 2 %.

Algunos cumplen la doble función de teñir y conservar:

Esto es: Acetato de lugol – ver receta arriba- Carmín acético (0.5 g de carmín en 100 mL de ácido acético al 45%)

NOTA: Para los colorantes puede ponerse una gota sobre el portaobjetos (limpio) extenderla y dejarla secar, posteriormente colocar una gota de la muestra (de 0.3 a 0.5 ml) y si se desea fijador, para después colocar encima el cubreobjetos. Algunas veces antes de poner el cubreobjetos, es deseable mirar si los organismos quedaron bien conservados, fijados o teñidos, si no es así... vale más repetir la muestra (Sánchez, com. pers)

Tinciones.

Algunos protozoos presentan **coloración** debido a sus propios pigmentos citoplasmáticos, al alimento ingerido, a sustancias de reserva o algas simbióticas (de color verde) (Aladro *et al.*1990). Los ciliados, flagelados y las amibas tienden a ser grisáceos, se les nota claramente a 40X la (s) vacuolas y algunas veces el núcleo, de color gris más intenso que el resto del citoplasma, la boca como una estructura que presenta mayor movimiento.

Cuando las estructuras de un organismo no son muy visibles, se opta por teñirlas o colorearlas. La tinción es el método por el cual los organismos son teñidos o coloreados (tintura, pigmento, colorante, laca... sinónimos); se le adiciona color a un material incoloro.

Factores que intervienen en la coloración: pureza y concentración, pH de la solución y temperatura ambiente.

Los colorantes pueden ser: anilinas, tinturas de naturaleza orgánica (carmín, hematoxilina, safranina), inorgánicos que generalmente precipitan como metales en presencia de ciertas sustancias, pues existen Factores que intervienen en la coloración: pureza y concentración, pH de la solución y temperatura ambiente.

Asimismo, se puede teñir a los organismos (sin olvidar su color original) para destacar su presencia u organelos en una muestra. Se usan preferentemente colorantes que no maten a los organismos (llamados vitales, que si pueden deformar a los ciliados después de un tiempo de preparada la muestra)

Los colorantes pueden ser: anilinas, tinturas de naturaleza orgánica (carmín, hematoxilina, safranina), inorgánicos que generalmente precipitan como metales en presencia de ciertas sustancias.

Tipos de coloración:

Progresiva.- Cuando se dejan los organismos en el colorante hasta que se considera debidamente teñido.

Regresiva.- Cuando se ha coloreado el organismo y después se elimina el exceso de color con el lavado

Pancromática.- es cuando un colorante aporta diferentes tonalidades en los componentes del organismo

Sustantiva o directa.- Cuando el organismo se tiñe directamente con una solución colorante

Adjetiva o indirecta.- Es cuando la preparación se colorea después de haber experimentado la acción de otra sustancia (usualmente “mordente” que prepara al organismo para su coloración- metálicos, oxidantes alumbres, taninos).

La utilización de un colorante debe estar asociada con un determinado fijador, pues sería inútil tener organismos destruidos y posteriormente colorearlos.

Se preparan los colorantes en soluciones acuosas o alcohólicas, los frascos deben estar bien cerrados e inclusive sellados por “Parafilm”. Es recomendable algunas veces filtrar los colorantes antes de aplicarlos ya que con el tiempo se forman precipitados. Se puede añadir, formol o alcanfor o timol para evitar que el colorante se descomponga.

Para evitar que se deterioren los organismos pero que si se tiñan, se sugiere poner una gota pequeña del colorante, extenderla (como un frotis o extenderlo con el dedo) sobre el portaobjetos y dejar secar. Enseguida, poner una gota de la muestra (sin colocar aún el cubreobjetos, observar si se tiñeron bien los organismos y si es el caso) colocar el cubre. Tomados de Kudo 1982; López y Serrano 1997; Jahn *et al.* 1979 y Hyman, 1925; Wetzel y Likens 1979; por ejemplo:

+Rojo neutro: 1:3000

+Azul de metileno: 1:1000, granos citoplasmáticos, núcleos.

+Tinta china: 1:1000

+Lugol Flagelos, cilios, glicógeno, quistes de parásitos (color castaño rojizo).

Yodo 1 g , yoduro de potasio 2 g y 100 mL de agua destilada

+Carmín acético Colorante y fijador de núcleos

0.5 g de carmín acético en 100 mL de ácido acético al 45 %

Hematoxilina de Regaud

Hematoxilina 1 g

Glicerina 10 mL

Etanol absoluto 10 mL

Agua destilada 80 mL

Rojo Congo. Vacuolas digestivas, se torna azul en presencia de ácidos débiles

Rojo congo 1 g en 1000mL de agua destilada

Sudan III o IV Lípidos, grasas neutras de tornan rojas

Sudan 2 g

Etanol al 70 % 50 mL

Acetona 50 mL

Verde Jano. Mitocondrias

Verde Jano 0.1 g en 1000mL de agua destilada

Verde de metilo acidulado. Núcleos, mitocondrias

Verde de metilo 1 g

Ac. Acético glacial 1 mL

Agua destilada 99 mL

Nigrosina. Diseños membranosos de flagelados y ciliados

Nigrosina 10 g

Agua destilada 100 MI

Método seco con nitrato de plata. Tinción sencilla para resaltar cilios/ flagelos

(Klein, 1958; Gelei 1935)

Para observar: cinetosomas, cinetias, poros de vacuolas, citostoma, citoprocto

1. Colocar una gota de cultivo sobre un portaobjetos, hacer un frotis.
2. Secar al aire
3. Añadir solución de nitrato de plata al 2%
4. Exponer a la luz del sol sobre un fondo blanco, hasta que se tiña de café rojizo
5. Lavar con agua destilada
6. Dejar secar al aire
7. Observar si se tiñeron los organismos, si es así:
8. Montar en bálsamo de Canadá

Para conservar la muestra en el portaobjetos por algunas horas (2 ó 3) puede ponerse en las orillas del cubreobjetos petrolato o vaselina para prevenir la desecación. Para facilitar este procedimiento, se pone una capa ligera -de petrolato- extendida sobre un dedo o la palma de la mano y pasando las orillas del cubreobjetos, para después colocarlo sobre la muestra en el portaobjetos y presionarlo suavemente (es el momento de tomar fotografías y/o hacer dibujos).

Algunas veces los organismos son más grandes o están colonias y se atorán entre porta y cubreobjetos

Una burbuja de aire entre porta y cubre permitirá proveer de oxígeno a los protozoos

Inmovilización.

Existen técnicas alternativas para inmovilizar a los organismos que afectan poco su forma y que deben ser puestas directamente sobre la muestra a observar:

1. Metilcelulosa (methocel): 10 g de metil celulosa en 90 ml de agua caliente (Jahn *et al.* 1979) muy barato y accesible.
2. Cloruro mercúrico saturado: poner una gota pequeña en el portaobjetos con la muestra (Kudo, 1982).
3. Solución de lugol: 1.5 g de yoduro de potasio, 25 ml de agua destilada y 1 g de yodo. Para teñir cilios (Kudo, 1982).
4. Sulfato de níquel: 5 mg/L (Jahn *et al.*, 1979).
5. Colocando pequeños fragmentos de tabaco entre el porta y cubreobjetos.
6. Protoslo: marca comercial (Carolina Biological Supply Co. Burlington, NC 88-5141).

7. Clara de huevo, mezclada con agua caliente- no hirviendo- a que tome una consistencia de miel diluida [1:1].

8. Saliva: Una pequeña gota puede inmovilizar a los organismos.

Se pueden intentar formas de inmovilización y tinción (jugos de frutas, vegetales colorantes naturales).

Adhesivos para organismos. Estas sustancias sirven para impedir fijar la muestra sobre el portaobjetos, en general mantiene vivos a los organismos, sin movimiento y lo más importante sin que se seque la muestra del todo, puede colocarse la muestra teñida o inclusive fijada para su observación, grabación y realizar esquemas.

Gelatina

Gelatina 2 g

0.005 g de cloruro de sodio

20 mL de aguas destilada

Mezclar componentes y poner en baño maría, disolver completamente y vaciar en envase esterilizado (preferentemente de vidrio para evitar crecimiento de organismos indeseados)

De Haupt (Lee *et al.*, 1985)

1 g de grenetina disuelta en 10 mL de aguas destilada calentada aprox. 30° C, cuando se haya disuelto, agregar 2 g de cristales de fenol y 15 mL de glicerina pura, homogeneizar y filtrar dos veces.

Poner una gota de adhesivo sobre la porta para formar una capa delgada y homogénea, secar a 40° C en estufa o parrilla. Agregar una gota de los organismos y dejar secar (pueden ponerse dos gotas a los largo del porta y observar si se adhirieron o están completos). Observar la preparación y si lo amerita, puede montarse en bálsamo de Canadá.

Albúmina de Mayer (López y Serrano, 1997)

1mL de glicerina, 1 ml de clara de huevo, mezclar perfectamente. Aplicar sobre el portaobjetos con la yema del dedo y dejar secar (aunque debe quedar un poco pegajosa) de 1 a 5 min. Colocar la muestra y observar al microscopio sin cubre para cerciorarse que los organismos quedaron adheridos y sin deformarse.

Recomendaciones importantes:

- + Ningún tratamiento subsecuente puede reparar defectos de fijación
- + Los organismos deben estar sanos para iniciar la fijación
- + La fijación debe ser rápida para determinado propósito
- + Portaobjetos limpios, libres de grasa y polvo.
- + Los fijadores a base de ácido acético dan buenos resultados para propósitos generales, pero disuelven algunas estructuras (mitocondrias por ejemplo), distorsionan otras.
- + Para muestras transparentes y naturales Champy y Flemming
- + Para algunos protozoos, los mejores fijadores solo pueden ser determinados por la experiencia continua
- + La mayoría de los fijadores usados en citología e histología pueden usarse en los protozoos.
- + Los métodos de fijación y coloración son válidos para poner en evidencia detalles poco visibles en estado fresco.
- + Muchos fijadores son inestables y deben prepararse antes de su uso (López y Serrano, 1997).

Recuento

El sistema más fácil es el de la unidad o acumulo natural (APHA, 1995; Wetzel y Likens, 1999). Si la distribución de los organismos es aleatoria y la población se ajusta a una distribución de Poisson, se puede calcular el error de recuento. Por ejemplo, el límite de confianza de 95%, como porcentaje del número de unidades contadas, es igual a  $2/\sqrt{N}$  (100%). Así, si se cuentan 100 unidades\*, el límite de confianza de 95% se aproxima  $\pm$  al 20%. Para un recuento de 400 organismos, el límite está alrededor del 10%.

Método de la gota de Lackey (APHA 1998)

Para facilitar la cuenta de protozoos presentes en la muestra de manera rápida, se toma un volumen de 0.1 mL de muestra de agua, contando la totalidad de protozoos presentes



en el área bajo el cubreobjetos de 20 X 20 mm. Se recomienda poner en las orillas una ligera capa de Vasenol® o petrolato para evitar la evaporación de la muestra (procurar que quede una burbuja para que no se agote tan rápido el oxígeno de la muestra y los organismos resistan más). Lo anterior permite conocer el número de microorganismos presentes por unidad de volumen. En este caso se obtuvo la relación de microorganismos por mililitro de la siguiente forma:

$$\text{Microorganismos} = C (F) / \text{mL}$$

Donde:

C = número de organismos de interés contados en 0.1 mL

F = factor de conversión a mL, en este caso vale 10, dado que:

$$1 \text{ mL} = F (0.1 \text{ mL}), F = 1\text{mL} / 0.1 \text{ ml}, F = 10$$

La cámara de Sedwick –Rafter (SR) (Wetzel y Likens, 2001).

es un dispositivo para recuento usado comúnmente para plancton, se manipula fácilmente y los datos son reproducibles cuando se usa un microscopio calibrado y se conoce el diámetro de campo al menos (ver abajo). Un inconveniente es que no se pueden utilizar objetivos de gran aumento, por los que no se usa para células pequeñas como el nanoplancton. La cámara consta de un recuadro de vidrio o acero inoxidable que mide 50 mm de largo por 20 mm de ancho y 1 mm de profundidad; el área total de fondo son 1mL o 1 mm<sup>3</sup>, todo este recuadro está sobre un portaobjetos. Si se fabrican deben verificarse las medidas (longitudes y volumen), micrómetro, Vernier – pie de rey- , micropipeta, respectivamente. La cámaras se cubre con un portaobjetos que abarque un poco más de los 50 mm del recuadro (existen en el mercado portaobjetos de 60 X24 mm). El llenado de la cámara se realiza colocando en diagonal el cubre y llenar por una esquina con la muestra fijada y homogeneizada, al prácticamente terminar el llenado, el cubre se deslizará por sí solo. Evitar que queden burbujas de aire. Algunas veces poner un poco de agua destilada sella las dos partes. Contar en transectos, por campos en zig zag o diagonal\*.

La ecuación de la cámara de SR para calcular organismos por mililitro es la siguiente:

$$\text{Org/mL} = C \times 1000\text{mm}^3 \quad L \times D \times W \times S, \text{ en donde}$$

C = es el número de organismos contados,

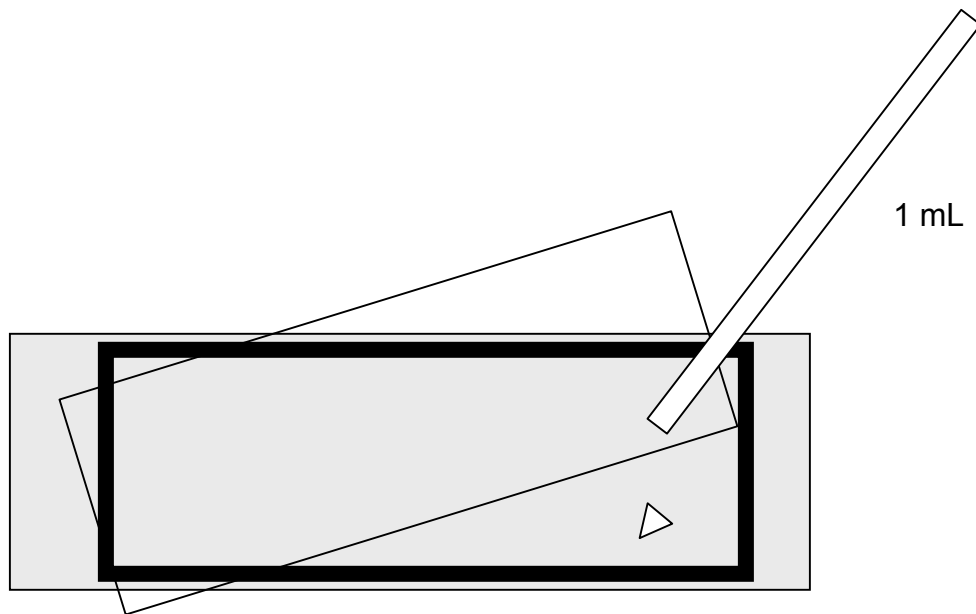
L = longitud de la cámara (50 mm)

D = profundidad de la cámara ( $1 \text{ mm}^3$ )

W = ancho de la cámara (20 mm) y

S = número de campos contados.

Se debe multiplicar o dividir el número de organismos por mililitro por un factor de corrección para ajustar la dilución o concentración de la muestra (respectivamente).



Cámara de cuenta Sedwick-Rafter, método de llenado (Wetzel y Likens, 2001).

Tamaños.

Los protozoos tienen muchos y diversos tamaños, casi como el de una bacteria hasta aquellos que son visibles con un ojo no entrenado por tener un tamaño equivalente al de algunos metazoos (3 a 4 mm, generalmente coloniales). Para determinar el tamaño de los ciliados, deben hacerse las observaciones en el microscopio y considerarse al micrómetro " $\mu\text{m}$ " (que es la millonésima parte de un metro o la milésima parte de un milímetro) como la unidad de medición para determinar el diámetro de campo.

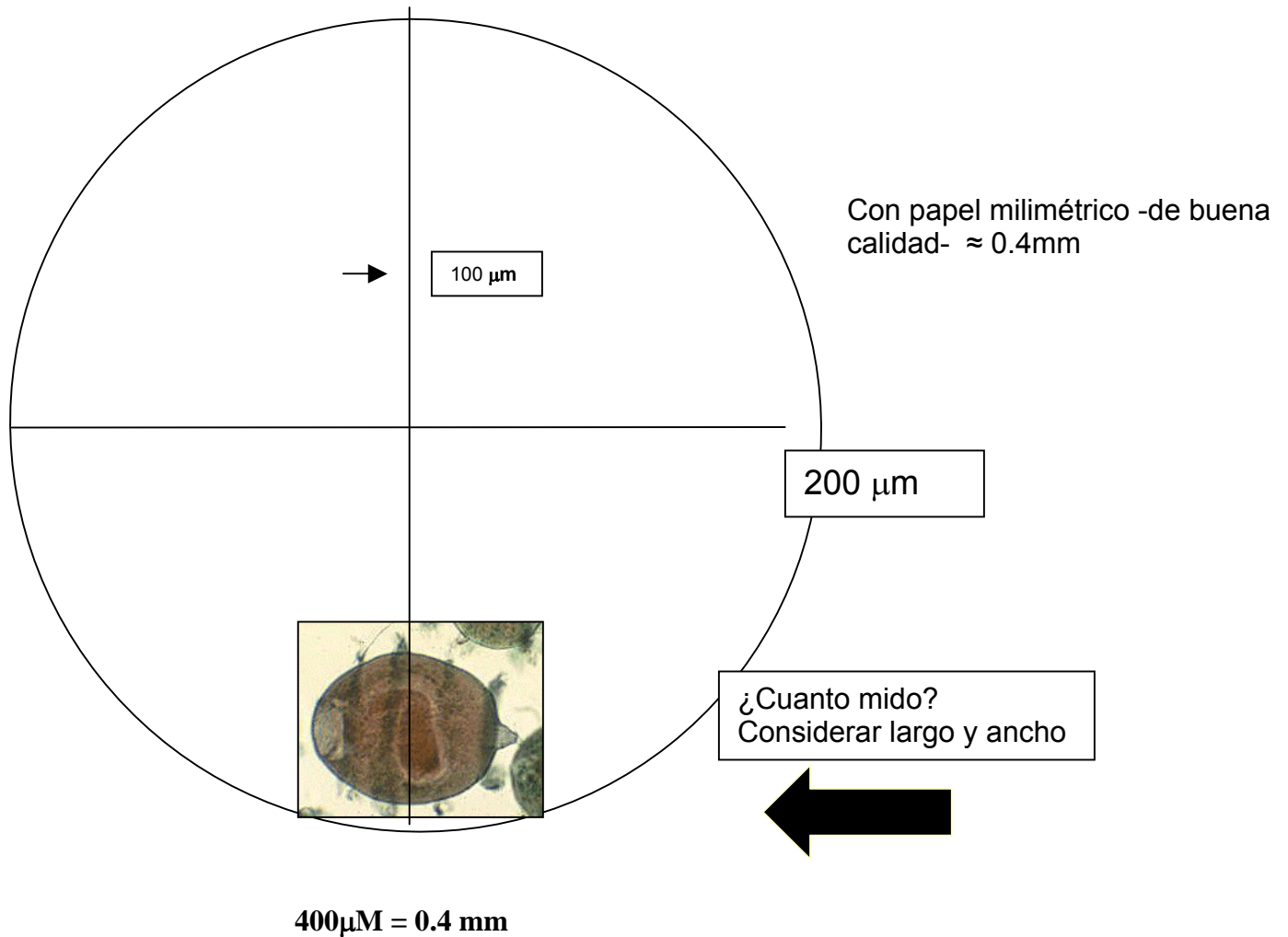
Cada objetivo tiene un diámetro de campo; para obtener la medida adecuada, se puede usar un portaobjetos graduado o papel milimétrico (de buena calidad) con una precisión del 10 % (Jahn *et al.*, 1979).

Para el objetivo de 10X que tiene habitualmente un diámetro de 1500 a 1600 micrómetros se obtiene midiendo con un ocular dividido en 100 partes. Si el diámetro de campo a este aumento es de 1600, cada división tendrá un valor de 16 micrómetros (Jahn *et al.*, 1979). Si un ciliado mide un tercio de ese campo, su tamaño será de 520 micrómetros aproximadamente o la mitad del campo, será de 800 micrómetros, etc.; lo mismo podrá hacerse para el objetivo de 40X que tiene un diámetro de campo de entre 375 a 400 micrómetros, cada división equivaldrá entonces de 3.75 ó 4.0 micrómetros.

En el caso del papel milimétrico, se obtiene un diámetro de 1.6 milímetros o 1600 micrómetros para el objetivo de 10X y para el de 40X, sería 1600 entre 40, dando un área de campo de 400 micrómetros aproximadamente (Sánchez, 1994).

## Área de campo, ¿cómo se mide a los protozoos?

Ejemplo: Ocular de 10X y objetivo de 40X ~ 400 $\mu$ m



Por lo tanto, es importante considerar el tamaño de los protozoos para su ubicación en las claves taxonómicas y como referencia en los estudios que se lleven a cabo.

Las formas de los protozoos son muy variadas (ver apartado de generalidades, págs. 17 – 24).

## **Papel de los protozoos en los ecosistemas acuáticos.**

Según Gifford (1991) el término circuito microbiano (también nombrado con los términos rizo o bucle microbiano) describe la función ecológica de algunos microorganismos en las tramas de alimentos pelágicas. Weisse (1990) afirma que actualmente es ampliamente aceptada la existencia del circuito microbiano, altamente dinámico, y se considera que los grupos que lo forman son las bacterias heterótrofas pelágicas (bacterioplancton), pico y nanoplancton autótrofo, nanoflagelados heterótrofos y microciliados. Rassoulzadegan (1993), en cambio, opina que el circuito microbiano consiste exclusivamente de las vías de energía y materiales que relacionan a las bacterias heterótrofas con los flagelados bacterívoros y la materia orgánica disuelta y debe ser diferenciado del término "redes tróficas microbianas" (microbial food webs) que incluye a las relaciones tróficas de todas las comunidades de microorganismos menores de 100  $\mu\text{m}$  de tamaño y la producción primaria de los organismos de tamaño menor o igual a 10  $\mu\text{m}$ .

Sherr y Sherr (1988) sugieren que el circuito microbiano debe ser considerado como componente y parte integral de una red trófica microbiana mayor que incluye a todos los organismos unicelulares, tanto procariontes como eucariontes, y tanto autótrofos como heterótrofos. Más recientemente, Sommer *et al.* (2002) mencionan que el término de circuito microbiano es actualmente manejado bajo la denominación de red trófica microbiana.

La inclusión del circuito microbiano en las cadenas tróficas planctónicas supone fundamentalmente la existencia de un mayor número de niveles tróficos de los que se pensaba existían, representados principalmente por organismos microscópicos fagótrofos. Lo anterior implica que una fracción considerable del carbono orgánico puede ser mineralizada antes de alcanzar los niveles tróficos superiores, como los copépodos o los peces. Si lo anterior es cierto, la existencia del circuito microbiano indica que existió una subestimación de la productividad primaria del plancton (Fenchel, 1987).

Aunque se considera que el circuito microbiano está compuesto y funciona de forma similar en el ambiente marino y en el dulceacuícola, existen algunas diferencias que deben ser resaltadas. Estas diferencias se presentan principalmente en las relaciones tróficas del circuito microbiano con otros grupos planctónicos. En el ambiente marino los protozoos son los principales consumidores de bacterias; en cambio, en los ambientes epicontinentales el sistema pelágico es más complejo debido a la posibilidad de que varios grupos de metazoos consuman bacterias. Los cladóceros, crustáceos típicos de las

aguas dulces, contienen especies capaces de consumir bacterias (Riemann, 1985; Sanders, 1989; Vaqué, 1992).

Algunos rotíferos, los cuales son un grupo también predominantemente de agua dulce, resultan igualmente capaces de consumir partículas del tamaño de las bacterias (Allan, 1976; Mazumder, 1990; Sanders, 1991). En el caso de las aguas epicontinentales se considera que el circuito microbiano es realmente una serie de niveles tróficos adicionales en una trama de alimentos compleja en donde los metazoos y los protozoos mixótrofos y heterótrofos compiten por los mismos recursos alimenticios: las bacterias (Sanders, 1991).

#### Importancia de los protozoos en el circuito microbiano.

La importancia de los protozoos como componentes de la comunidad planctónica en los ambientes marinos empezó a emerger durante los años setentas (Gifford, 1991). Sin embargo, en el caso de los ambientes de agua dulce su importancia no fue reconocida hasta recientemente debido a varios factores: 1) su pequeño tamaño dificultó durante mucho tiempo su observación y cuantificación y motivó que se les considerara como componentes secundarios de la comunidad; 2) no existían métodos adecuados para su observación y cuantificación y 3) se consideró que otros organismos mayores eran los que tenían la importancia principal (Pace y Orcutt, 1981). Aunque algunos trabajos pioneros (Bamforth, 1958; Bragg, 1960) indicaron la posibilidad de un papel relevante de los protozoos en los sistemas dulceacuícolas fue hasta la década de los 80's cuando se realizaron los primeros trabajos (Pace y Orcutt, 1981; Beaver y Crisman, 1982) que confirmaron la importancia de los protozoos planctónicos. Hasta ahora, los grupos de protozoos cuya participación dentro del circuito microbiano es unánimemente aceptada son los flagelados y los microciliados.

Los flagelados, antiguamente agrupados (Levine, 1980) dentro de las Clases Phytomastigophorea y Zoomastigophorea del subphylum Sarcomastigophora son actualmente uno de los grupos de protistas cuya taxonomía está experimentando algunos de los cambios más dramáticos (Cavalier-Smith, 1993<sup>a</sup>; Cavalier-Smith, 1993<sup>b</sup>); Adl, 2005. Con fines prácticos, y sin connotaciones taxonómicas, se les ha agrupado en dos grandes grupos: flagelados autótrofos y flagelados heterótrofos, de acuerdo con una generalización muy burda de su forma de nutrición. Sin embargo, la diversidad de modalidades de alimentación de los flagelados es mayor, ya que dentro del grupo de los flagelados autótrofos se incluyen especies autótrofas, autótroficas, mixótroficas y algunas osmótroficas. Estos flagelados son generalmente los eucariontes más abundantes en el

plancton de los sistemas marinos y dulceacuícolas y se considera que contribuyen con una fracción importante de la producción primaria (Sanders *et al.*, 1988).

En el grupo de los flagelados heterótrofos se encuentran básicamente especies fagótrofas y osmótrofas. La complejidad de los tipos de alimentación de los flagelados es un factor que impide su fácil asignación a un compartimiento dentro de las tramas tróficas planctónicas. Por tanto, el hablar de flagelados autótrofos y heterótrofos representa una simplificación que puede enmascarar relaciones tróficas complejas (Patterson, 1993).

El otro grupo de protozoos involucrado en el circuito microbiano es el de los ciliados. La mayoría de los ciliados son fagótrofos y su alimento más importante son las bacterias (Fenchel, 1987). En el caso de los microciliados, especialmente aquellos de tamaño cercano a los 20  $\mu\text{m}$ , también se considera que su principal fuente de alimento son las bacterias, pero en realidad su alimentación puede ser muy variada e incluir flagelados autótrofos, heterótrofos y pico y nanofitoplancton (Simek *et al.*, 1996; Vargas y González, 2004).

Las especies de flagelados y ciliados capaces de alimentarse de pico y de nanofitoplancton pueden constituir un circuito microbiano más corto formado por fitoplancton y protozoos alguívoros y en el cual se recicla carbono, pero también nutrientes limitantes como el nitrógeno y el fósforo (Straskrabová y Simek, 1993).

Uno de los papeles de mayor importancia de los protozoos dentro del plancton está relacionado con el consumo que realizan de organismos de tamaño muy pequeño y consiste en lo que se ha denominado "reempacado trófico" (trophic repackaging). A causa de su pequeño tamaño, las presas de los protozoos (bacterias, pico y nanoplancton) no están disponibles para muchos metazoos; los protozoos planctónicos reempacan a sus presas en partículas de tamaño accesible para los niveles tróficos superiores (Gifford, 1991; Sherr y Sherr, 1988).

Otro de los papeles de importancia que se le han asignado a los protozoos dentro de las comunidades planctónicas es la regeneración de nutrientes. Esta consiste en la liberación de nutrientes orgánicos e inorgánicos, necesarios para la producción primaria, a partir de la materia orgánica muerta (Laybourn, 1984). Durante mucho tiempo se consideró que en los ambientes acuáticos el papel principal de las bacterias heterótrofas era el de ser remineralizadoras del carbono orgánico y de los nutrientes. Como descomponedores, las bacterias respiran el material orgánico disuelto y particulado no vivo y liberan su contenido de carbono y nutrientes (Caron, 1991). Los estudios cuantitativos relativamente recientes de la descomposición y regeneración de nutrientes

en los ambientes acuáticos indican que las bacterias no son el único grupo importante involucrado. En realidad, mucho del fósforo y el nitrógeno incorporados dentro de la producción acuática primaria y secundaria pueden ser regenerados por procesos diferentes a la acción bacteriana (Johannes, 1968).

Dentro del nuevo paradigma del circuito microbiano se considera que éste en su conjunto puede llegar a desempeñar una función muy importante dentro de la regeneración de los nutrientes en los ambientes acuáticos, generalmente presentando tasas elevadas de reciclado de nutrientes. Algunos estudios han mostrado que la función del circuito microbiano en la regeneración de nutrientes en los ecosistemas acuáticos puede fluctuar de manera importante según la época del año (DeLorenzo, 2001).

#### Relación entre los protozoos y los metazoos planctónicos

La función de reempacado trófico que realizan los protozoos planctónicos implica su consumo por parte del metazooplancton. Como ya se mencionó, en el caso de los ambientes de agua dulce los protozoos y los metazoos planctónicos pueden competir por una misma fuente de alimento: las bacterias (Sanders, 1991). En este caso las ventajas que tiene el protozooplancton respecto del metazooplancton son: 1) la capacidad de crecimiento rápido y por lo tanto una veloz adaptación a la variación de los recursos alimenticios; 2) la habilidad para sobrevivir a una elevada presión de depredación de los peces planctívoros y 3) la presencia de especies resistentes o adaptadas a condiciones ambientales adversas. Estas ventajas permiten el predominio del protozooplancton en casos en los que existe un súbito aumento del alimento (como el crecimiento del fitoplancton después de un período de circulación en los lagos) o cuando los recursos son pocos y heterogéneos (como en el período de invierno en los lagos templados) (Straskrabová y Simek, 1993).

Sin embargo, los protozoos también son consumidos de manera importante por los rotíferos, los cladóceros y los copépodos (Jurgens y Jeppesen, 2000; Kothé y Benndrof, 1994; Lair *et al.*, 1994) y de esta forma se produce una integración del circuito microbiano dentro de la cadena tradicional planctónica. La depredación de los protozoos por parte del metazooplancton puede ser uno de los factores más importantes que determinan la abundancia del protozooplancton. Cuando en un cuerpo de agua son abundantes los peces zooplanctívoros, el metazooplancton disminuye y se favorece el protozooplancton. La abundancia de metazooplancton, especialmente si hay un predominio de especies del



género filtrador Daphnia, implica que existan números muy bajos de protozoos. Lo anterior demuestra la intensa relación que existe entre los componentes del circuito microbiano y el resto de las cadenas tróficas planctónicas. Ambos componentes pueden influenciarse y modificarse dando origen a composiciones específicas muy variables de la comunidad planctónica (Landry, 1994).

Así también, existirán especies que dependiendo de los factores que regulen el ambiente se ausenten y vuelvan a aparecer o mueran, a fin de alcanzar un cierto equilibrio en que la variedad (diversidad) de especies y el número (abundancia) no cambien fuertemente (Page, 1988).

Además, cada vez existen más evidencias de que otros organismos mayores, como las larvas de algunos peces, pueden también consumir a los protozoos.

Resumiendo, el PAPEL DE LOS PROTOZOOS EN LOS ECOSISTEMAS ACUATICOS puede identificarse con las “4 R’s” a continuación:

1. **Regulan** el crecimiento de las poblaciones bacterianas
2. Producen el **reempacado** trófico.- ponen a disposición bacterias a niveles tróficos superiores.
3. **Regeneran** nutrientes.- liberan nutrientes orgánicos e inorgánicos para la producción 1a. (bacterias + m. Orgánica muerta).
4. **Remineralizan** nutrientes en el ambiente marino alimentándose directamente de organismos y materia orgánica particulada

## **Consideraciones finales:**

### Microscopio

- Si se utiliza el microscopio en el campo, procurar que sea bajo un lugar sombreado y sin viento a fin de que las observaciones sean más nítidas, ya que el exceso de luz interfiere.
- El poder de resolución es mejor cuando el diafragma del condensador está abierto.
- Para la limpieza de las lentes es importante usar papel diseñado para esto, el algodón fino (como el Chapultepec ®) lo utilizan mucho los fabricantes de microscopios (i.e Zeiss), humedecido con limpia vidrios Windex®, si no se tienen a la mano, entonces es posible usar saliva y limpiar con un paño suave de algodón.
- El agua salada corroe las partes metálicas, se deben limpiar con agua dulce y secar lo más pronto posible.
- El exceso de agua en una preparación se puede eliminar poniendo papel o absorberlo con una pipeta entre porta y cubre, o esperar a que se evapore un poco.

### Muestras

- Las redes de colecta deben lavarse y dejar secar a la sombra, el sol las estropea y se tornan quebradizas, si se guardan húmedas, se enmohecen, huelen mal y se echan a perder.
- Considerar parámetros ambientales del sitio de origen: pH, temperatura, luz, tipo y cantidad de alimento, oxígeno -aireación -.
- No olvidar marcar las cuerdas si se van a obtener muestras de profundidades diferentes.
- Varias muestras de la misma localidad pero diferente sitio de muestreo, deben mantenerse en diferentes recipientes (de preferencia de vidrio, si no es así, en recipientes muy limpios).

## Cultivos

- No es conveniente sembrar a los organismos recién recolectados en el medio de cultivo, es preferible hacerlo gradualmente o mejor aún, poner un poco de la muestra original con unos granos de trigo o arroz
- Para obtener la multiplicación de diversas especies, se puede repartir la muestra y agregar diferentes fracciones del medio de cultivo en diferentes recipientes o en diferentes medios para determinar cual es el óptimo para una especie dada.
- En cultivos mixtos asegurarse tener cuidado de la velocidad con la cual se descompone el sustrato
- Se pueden hacer subcultivos cuando en el medio alcanzan el crecimiento máximo, tomando una pequeña cantidad del medio original con medio limpio (estéril si es el caso).
- En términos generales, es preferible mantenerlos hambrientos a sobrealimentados.

**Anexo. RESUMEN DE REQUERIMIENTOS ESPECIALES DE MUESTREO Y CONSERVACIÓN  
(APHA, 1985). Traducido por A.Lugo.**

P = plástico, V = vidrio, V(B) = vidrio borosilicato, V(A) = vidrio, p (A) = a plástico

VARIABLE	Tipo de recipiente	Tamaño mínimo de muestra (ml)	CONSERVACIÓN	Tiempo de almacenamiento
Acidez	P, V(B)	100	Refrigerar	24h/14 d
Alcalinidad	P, V	200	Refrigerar	24h/14 d
DBO <sub>5</sub>	P, V	1000	Refrigerar	6 h/48 h
Boro	P	100	No se requiere	28 d/28 d
Bromuros	P, V		No se requiere	28 d/28 d
Carbono orgánico total		100	Analizar inmediatamente o refrigere y agregue H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> hasta pH<2	7 d/28 d
Bióxido de carbono	P, V	100	Analizar inmediatamente	
Demanda Química de Oxígeno	P, V	100	Analizar lo antes posible o refrigere y agregue H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> hasta pH<2	7 d/28 d
Cloro residual	P, V	500	Analizar inmediatamente	0.5 h/2 h
Clorofila	P, V	500	Oscuridad. Refrigerar o congelar	30 d/ -
Conductividad	P, V	500	Refrigerar	28 d/28 d
Dureza	P, V	100	Añadir HNO <sub>3</sub> hasta pH<2	6 m/6 m
Metales	P(A), V(A)	200	Para metales disueltos filtre inmediatamente. Agregue HNO <sub>3</sub> hasta pH<2	6 m/6 m
Nitrógeno				
Amonio	P, V	500	Analizar lo antes posible o refrigere y agregue H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> hasta pH<2	7 d/ 28 d
Nitratos	P, V	100	Analizar lo antes posible o refrigere.; o congele a -20 °C	48 h/48 h
Nitratos + nitritos	P, V	200	Agregue H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a pH<2, o refrigere	28 d
Nitritos	P, V	100	Analizar lo antes posible o refrigere y agregue H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> hasta pH<2	28 d
Nitrógeno orgánico	P, V	500	Refrigerar	7 d/ 28 d
Plaguicidas		500	Refrigerar; añada 100 mg/L de Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> si hay cloro residual	
Fenoles	P, V	500	Refrigere; añada H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a pH>2	
Oxígeno disuelto	V, DBO	300		
Electrodo			Analizar inmediatamente	0.5 h/0.5 h
Método Winkler			La titulación se puede demorar 8 h	8 h/8 h
pH	P, V		Analizar inmediatamente	2 h/2 h
Fosfatos	V(A)	100	Para fosfatos disueltos, filtre inmediatamente; refrigere o congele a -10 °C	48 h/48 h
Salinidad	V, cera	250	Analizar inmediatamente o usar sello de cera	6 meses
Sílice	P	100	Refrigerar; NO CONGELAR	28 d/28 d
Sólidos	P, V	300	Refrigerar	7 d/14 d
Sulfatos	P, V	100	Refrigerar	28 d/28 d
Sulfuros	P, V	100	Refrigerar; añadir 4 gotas de acetato de zinc 2N por cada 100 ml	28 d/28 d
Temperatura	P, V		Analizar inmediatamente	

## **Bibliografía**

- Aladro, L. A., Martínez, M. E. y Mayén, E. R. 1990. Manual de ciliados psamófilos marinos y salobres de México. Cuadernos de Biología 9. Instituto de Biología, U. N. A. M. México. 174 pp.
- Aladro L. M. A. 2006. Principales calcificaciones de los Protozoos. Facultad de Ciencias UNAM.
- Allan, J.D. 1976. Life history patterns in zooplankton. Am. Nat. 110: 165-180
- Ald S. M, Simpson A. G. B., Farmer M. A., Andersen R. A., Anderson O. R., Barta J. R., Bowser S. S., Brugerolle G., Fensome R. A., Fredericq S., James T. Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C. E., Lewis L. A., Lodge J., Lynn D. H., Mann D. G., Mccourt R. M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S. E., Nerad T. A., Shearer C. A., Smirnov A. V., Spiegel F. W. and Taylor M. F. J. R. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52 (5): 399-451.
- Anderson, R. 1987. Comparative Protozoology. Springer-Verlag. 1<sup>st</sup> ed. Berlín. 438pp.
- APHA, AWWA Y WPCF. 1995. Standard methods (for the examination of water and wastewater). Edit. American Public Health Association, Washington, D.C. 1315 pp.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, R. A. & Thingstad, F. 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Baldauf S. I. 2003. The deep repots of eukaryotes. *Science*. 300. N°. 5626.
- Bamforth, S. S. 1958. Ecological studies on the planktonic protozoa of small artificial pond. *Limnol. Oceanogr.* 3: 398-412.
- Bamforth, S.S. 1985. Ecology of Protozoa. **En:** Lee, J. J., Hutner, S. H. y Bovee, E. C. (eds.). An Illustrated Guide to the protozoa. Society of Protozoologists, Kansas. pp. 7-12.
- Barrera, E.H. y Cárdenas, R.R. 1997. El microscopio óptico. Plaza y Valdés Eds. México. 86 pp.
- Barrera, E. H., Meyrán C. J. A., Ruiz, P. P. y Chazaro, O. S. 2007. Manual de microscopía óptica y fotografía digitalizada. UNAM-FES Iztacala Edo. De México. 105 pp.

- Beaver, J.R. & Crisman, T.L. 1982. The trophic response of ciliated protozoans in freshwater lakes. *Limnol. Oceanogr.* 27: 246-253.
- Beaver, J. R. & Crisman, T. L., 1989. The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. *Microb. Ecol.*, 17: 111-136.
- Bonilla, L.P. 2000. Heterogeneidad de las amibas de vida libre con potencial patógeno aisladas de la atmósfera de la ciudad de Mexico. Tesis de Doctorado (Biología) Facultad de Ciencias, UNAM, México. 106 pp.
- Bragg, A.N. 1960. An ecological study of the protozoa of Crystal Lake, Norman, Oklahoma. *Wassmann J. Biol.* 18: 37-85.
- Bütschli, O. 1880-1889. Protozoa. Abt.I. Sarkodina and Sporozoa, Abt.II. Mastigophora, Abt. III. Infusoria und Systema der Radiolaria. En: Bronn H. G. (eds.) *Klassen UN Ordnung des their's-Reichs, C. F. Winter, Leipzig*. 1: 1-2035.
- Cairns, J. Jr. 1962. The environmental requirements of fresh water protozoa. Biological problems in water pollution. 3Th. Seminar P. H. S. Publ. No. 999-WP-25.
- Cairns, J. Jr., Albaugh, D. W., Busey, F. & Chaney, M. D. 1968. The sequential comparison index – a simplified method for non biologist to estimate relative differences in biological diversity in stream pollution studies -. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.* **40** (9): 1607-1613.
- Cairns, J. Jr. 1974. Protozoans (Protozoa). En: Hart, C. W. y Fuller, S. L. H. (eds.) Pollution Ecology of Freshwater Invertebrates. Acad. Press, Nueva York. pp. 1-28.
- Cairns, J. Jr. y Henebry, M.S. 1982. Interactive and noninteractive protozoan colonization porcesses. En: Cairns, J. (Ed). Artificial substrates. Ann. Arbor. Science. Ann Arbor. Michigan. 23-70.
- Caron, D.A. in Protozoa and their Role in Marine Processes (Reid, P.C., Turley, C.M. & Burkill, P.H.). 387-416 (Springer-Verlag & NATO Scientific Affairs Division, Berlin, 1991)
- Cavalier-Smith, T. 1993a. Evolution and Diversity of Zooflagellates. *J. Euk. Microbiol.* 40:603-605.
- Cavalier-Smith, T. 1993b. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *Microbiol. Rev.* 57: 953-994.
- Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 73: 203-266.
- Clay, R. y Court, T.M. 1932. The history of the microscope. Ch. Griffin & Co. 266 pp.

- Corliss, J.O. 1975. Three centuries of protozoology: a brief tribute to its founding father: A Van Leeuwehoek of Delft. *J. Protozool.* 27: 3-7
- Corliss J. O. 1994. An interim utilitarian ("user friendly") hierarchical classification and characterisation of the protists. *Acta protozool.* 33:1-51.
- Corliss, J. O. 1998. Classification of protozoa and protists: the current status. **En:** Coombs G. H., Vickerman, K., Sleight, M. A. and Warren, A. (eds.) *Evolutionary relationships among Protozoa*, Kluwer, Dordrecht. 409-447.
- Corliss, J. O. 2004. Why the world needs protist. *J. Eucaryotic Microbiol.* 51(1): 8-22.
- Crisci J. V. y López. M. F. A. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la Taxonomía numérica. Serie Biología. No 26. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. EU.
- DeLorenzo, M.E., Lewitus, A.J., Scott, G.I. y Ross, P.E. 2001. Use of metabolic inhibitors to characterize ecological interactions in an estuarine microbial food web. *Microb. Ecol.* 43: 317-327.
- De Puytorac, P., Mignot J. G. y Mignot J. P. 1987. Précis de Protistologie. Soc. Nouvelle des Editions Boubée, Fond. Singer-Polignac. Paris. 581 pp.
- Delgado M. C. 2007. Protozoos y la nueva visión evolutiva con la traducción de claves para la determinación de algunos grupos. Los Reyes Iztacala, Edo. de México. 105 pp.
- Deroux G. y Tuffrau, M. 1965. Aspidisca orthopogon n. sp. Revision de certains mécanismes de la morphogenese a l'aide d'une modification de la technique au protargol. *Can. Biol. Mar* 6: 293-310.
- Dogiel, V. A. 1965. General protozoology. 2ª. Ed. Claredon Press. Oxford. 747. pp.
- Fenchel, T. Ecology of Protozoa. 1987. The Biology of Free-Living Phagotrophic Protists. Science Tech Publishers & Springer-Verlag, Michigan.
- Foissner, W. Oleksiv, I y Muller, H. 1990. Morphologie und infraciliatur einiger ciliaten (Protozoa: Ciliophota) aus stagnierenden Gewässern. *Arch. Protistenkd.* 138: 191-206.
- Foissner, W., Blatterer, H., Berger, H. y Kohmann, F. 1991. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems. Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. *Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft*, Munich, 1/91. 478 pp.
- Foissner W., Berger H. y Kohamann F. 1992. Taxonomische un ökologische revision der ciliaten des saprobiensystems Band II: Peritrichia, Heterotrichida,

Odontostomatida. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für wasserwirtschaft.5/92.

- Foissner W., Berger H. y Schaumburg J. 1999. Identification and Ecology of Limnetic Plankton Ciliates. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für wasserwirtschaft, Heft.3/99.
- Gelei, J. Von. 1935. Eine neue Abänderung der Klein'schen trockenen Silbermethode und das Silberliniensystem von *Glaucoma scintillans*. *Arch. Protistenk.* 84:446-455.
- Gifford, D. J. 1991. The protozoan-metazoan trophic link in pelagic ecosystems. *J. Protozool.* 38: 81-86.
- Honigberg B. M., Balamuth W., Bovee E. C., Corliss J. O., Gojdic M., Hall R. P., Kudo R. R., Levine N. D., Loeblich Jr. A. R., Weiser J. y Wenrich D. H. 1964. A revised classification of the Phylum Protozoa. *J. Protozool.* 11: 7-20.
- Hyman, L.H. 1925 Methods of securing and cultivating protozoa. I. General statements and methods. *Trans. Amer. Micr. Soc.* 44: 216-221.
- Jahn, T. L., Bovee, E. C. y Jahn, F. F. 1979. How to know the protozoa. William Co. Publisher, Iowa. 279 pp.
- Johannes, R.E. in *Advances in Microbiology of the Sea* (Droop, M.R. y Wood, E.J.F) 203-213 (Academic Press, Orlando, 1968).
- Jurgens, K. y Jeppesen, E. 2000. The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake. *J. Plankt. Res.* 22: 1047-1070.
- Klein, B.M. 1958. The dry silver method and its proper use. *J. Protozool.* 5: 99-103.
- Kothé, A. & Benndorf, J. 1994. Top-down impact of *Daphnia galeata* on pelagic heterotrophic flagellates in a whole-lake biomanipulation experiment. *Mar. Microb. Food Webs* 8: 325-335.
- Kudo, R.R. 1982. Protozoología. CECSA, México. 905 pp.
- Lair, N., Leveille, J. C., Reyes-Marchant, P. & Taleb, H. 1994. The feeding of a larval fish, *Lebistes reticulatus* on ciliates and rotifers. *Mar. Microb. Food Webs* 8: 337-346.
- Landry, M. R. 1994. Methods and controls for measuring the grazing impact of planktonic protists. *Mar. Microb. Food Webs* 8: 37-57.
- Laybourn- Parry, J. 1984. A Functional Biology of Free-Living Protozoa. (University of California Press, Berkeley & Los Angeles, 1984).



- Lee, J.J., Hutner, S.H. y Bovee, E.C. 1985. An illustrated guide to the protozoa. Society of Protozoologist. Kansas, E.U.A. 629 pp.
- Lee, W.J. y Patterson, D.J. 1998. Diversity and geographic distribution of free-living heterotrophic flagellates-analyses by PRIMER. *Protist* 149:229-243.
- Lee, J. J., Leedale, O. F. y Bredbury, P. 2000. An illustrated guide to the protozoa. 2ª ed. Society of protozoologists Laurence K. USA. 689 pp.
- Leidy, J. 1879 (**Copyright, 2006**) Fresh-Water Rhizopods of North America. Report of the United States Geological Survey of the Territories. Volume XII. Washington. 319 pp.
- Levine N.D., Corliss J. O., Cox F. E. G., Deroux G., Grain, J., Honigberg B. M., Leedale G. F., Lom, J., Lynn D., Merinild E. G., Page E. C., Polansky G, Sprague V., Vaura J. y Wallace F. G. 1980. A Newly Revised Classification of the Portozoa. *J. Protozool.* 27: 37-58.
- Lewis, L. A. y McCourt, R.M. 2004. Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91: 1535-1556
- Lipscomb D. L. Farris, J. S. Källersjö, M. y Tehler, A. 1998. Support, ribosomal sequences and the phylogeny of the eukaryotes. *Cladistics*, 14: 303 338.
- López, Ochoterena. E. y Serrano, L. G. 1997. Manual de técnicas Protozoológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Sociedad Mexicana de Historia Natural. Mexico. 272 pp.
- Lynn, D. H. y Small, E. B. 2000. Phylum Ciliophora (Doflein 1901); Delgado 2997). **En:** Lee, J. J., Leedale, O. F. y Bredbury, P. 2000. An illustrated guide to the protozoa. 2ª ed. Society of protozoologists Laurence K. USA. 689 pp.
- Mackinnon, D. L. y Hawes, R. S. J. 1961. An introduction to the study of protozoa. Clarendon Pres. Oxford 506 pp.
- Margalef, R. 1983. Limnología. Omega. Barcelona. 1010 pp.
- Margulis L y Schwartz K. V. 1998. Five Kingndoms: An illustrated guide to the phyla of life earth. 3º ed. W. H. Freeman. EU.
- Martínez-Pérez, J. A., Gutiérrez, M. E., Varona Granel, D. E. 2003. Protozoología: Aspectos Morfofuncionales. FES-Iztacala, UNAM. Edo. de México. 244 pp.
- Mazumder, A., McQueen, D. J., Taylor, W. D., Lean, D.R.S. & Dickman, M. D. 1990. Micro and mesozooplankton grazing on natural pico- and nanoplankton in contrasting plankton communities produced by planktivores manipulation and fertilization. *Arch. Hydrobiol.*118: 257-262.

- Needham, J. G., Galtsoff, P. S. Lutz, F. E y Welch P. S. 1959. Culture methods for invertebrates. Dover Publications. Inc. Nueva York. 592 pp.
- Noland, L. E. 1925. Factors influencing the distribution of fresh-eater ciliates. *Ecology*. 6: 437-425.
- Olmo Rísquez, J. L. 2003. Diversidad local y global de los protozoos ciliados de hábitats de agua dulce. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Pace, M. L. & Orcutt, J. D. Jr. 1981. The relative importance of protozoans, rotifers and crustaceans in a freshwater zooplankton community. *Limnol. Oceanogr.*26: 822-830.
- Pace N. R. 2006. Time for a change. *Nature*. 441: 289s.
- Page, F.C. 1988. Freshwater and soil gymnamoebae, with instructions for culture, Freshwater Biological Association. The Ferry House. Amblesids, Cumbria. 122pp.
- Page, F. C. y Siemensma, F. J. 1991. Nackte Rhizopoda und Heliozoa. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart. Nueva York. 235 pp.
- Patterson, D. J., y Larsen, J. 1991. The biology of free-living heterotrophic flagellates. Clarendon Press, Oxford. pp. 505 pp.
- Patterson, D.J. 1993. The Current Status of the Free-Living Heterotrophic Flagellates. *J. Euk. Microbiol.* 40: 606-609.
- Patterson D.J. 1998. Free-Living Freshwater Protozoa: A colour Guide. Australia. 223 pp.
- Patterson D.J. 1998. Free-Living Freshwater Protozoa: A colour Guide. Australia. 223 pp.
- Pesson, P. 1979. La contaminación de las aguas continentales. Mundi-prensa. España. 334pp.
- Rassoulzadegan. F. 1993. Trends in Microbial Ecology (Guerrero, R. Y Pedrós-Alió, C.) 435-439 Sociedad Española de Microbiología, Barcelona.
- Riemann, B. 1985. Potential importance of fish predation and zooplankton grazing on natural population of freshwater bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 187-193.
- Rivera, F. Bonilla, P., Ramírez, O., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortíz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil pollution*. 74: 65-87.
- Rothschild, L. J. 2004. Introductory remarks: protozoology protistology) at the dawn of the 21<sup>st</sup>. *J. Eucaryotic Microbiol.* 51(1): 3-7.

- Sánchez, R. Ma. del R. 1994. Colonización de sustratos artificiales por protozoos ciliados como un método de evaluación de la eficiencia de depuración de estanques de estabilización. Tesis de doctorado. Fac. de Ciencias, UNAM. México. 126 pp.
- Sanders, R. W. & Porter, K. G. 1988. Advances in Microbial Ecology (Marshall, K.C.) 10:167-191 (Plenum Press, New York).
- Sanders, R.W., Porter, K.G. & Bennett, S.G. 1989. Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates rotifers and Cladocera in a freshwater planktonic community. Limnol. Oceanogr. 34: 673-687.
- Sanders, R. W. 1991 in Patterson, D. J. y Larsen, J Eds. The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates. Clarendon Press, Oxford. 21-38.
- Schlichting, H.E. Jr. 1961. Viable species of algae and protozoa in the atmosphere. Lloydia. 24(2): 81-88.
- Sherr, E. & Sherr, B. 1988. Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. Limnol. Oceanogr. 33: 1225-1227.
- Schonborn, W. 1977. Production studies on Protozoa. Oecologia. 27:171-184.
- Simek, K., Macek, M., Pernthaler, J. & Straskrabová, V. Can freshwater planktonic ciliates survive on a diet of picoplankton? J. Plank. Res. 18: 597-613 (1996).
- Singer, C. 1962. History of biology. 3a. ed. Abelard-Schuman. Londres. 580 pp.
- Sleight, R., 1979 Biología de los Protozoos. H. Blume. Madrid. 399pp.
- Sleight, R. 1995. Biología de los protozoos. Blume. Madrid. 402 pp.
- Sommer, U., Stibor, H., Katechakis, A., Sommer, F. y Hansen, T. 2002. Pelagic food web configurations at different levels of nutrients richness and their implications for the ratio fish production: primary production. Hydrobiologia 484: 11-20.
- Spoon, D.M. y Burbanck, W.D. 1967. A new method for collecting sessile ciliates in plastic petri dishes with tight-fitting lids. J. protozol. 14: 735-739.
- Straskrabová, V. & Simek, K. 1993. Microbial loop in lakes and reservoirs related to trophy and metazooplankton development. Vehr. Internat. Verein. Limnol. 25: 1183-1186.
- Streble, H. y Krauter, D. 1985. Das leben in wassertropfen. Cosmos-Naturführer. Stuttgart. 350pp.
- Vaqué, D. & Pace, M. L. 1992. Grazing on bacteria by flagellates and cladocerans in lakes of contrasting food web structure. J. Plankton. Res. 14: 307-321.

- Vargas, C.A. y González, H.E. Plankton community structure and carbon cycling in a coastal upwelling system. II Microheterotrophic pathway. *Aquat. Microb. Ecol.* 34:165-180 (2004).
- Wiese, T. 1990. Trophic interactions among heterotrophic microplankton, nanoplankton and bacteria in Lake Constance. *Hydrobiologia* 191: 111-122.
- Wetzel, R.G. y Likens, G.E. 1979. Limnological analyses. Saunders, Philadelphia. 357. pp.
- Wetzel, R.G. y Likens, G.E. 2001. Limnological analyses. Saunders. Philadelphia. 357. pp.
- Whiten, R.H. y Pendergrass, W.R. 1980. Carolina protozoa and invertebrates manual. Carolina Biol. Supply. Burlington, N.C. USA. 33 pp.
- Whittaker R. H. y Margulis L. 1978. Protist classification and the kingdoms of organisms. *BioSystems*. 10: 3-18.
- [www.zeiss.com.mx](http://www.zeiss.com.mx), 2007