



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LIMNOLOGÍA

Escuticociliados en la oxiclina e hipolimnion del lago Alchichica:  
Morfoespecies *in situ*, cultivos clonales y ciclo de vida

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
XIMENA SÁNCHEZ MEDINA

Director de Tesis:  
Dr. Miroslav Macek  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Miembros del Comité Tutor:  
Dra. Rosaura Mayén Estrada, Dr. Alfonso Lugo Vázquez, Dra. Patricia Bonilla Lemus,  
Dra. Celia Bult Gámez  
Facultad de Ciencias, UNAM; Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM;  
Unidad Xochimilco, UAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México

Agosto 2016



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.



Posgrado en Ciencias del Mar y  
*Limnología*  
Universidad Nacional Autónoma de México



ESCUTICOCILIADOS EN LA OXICLINA E HIPOLIMNION DEL LAGO  
ALCHICHICA: MORFOESPECIES *IN SITU*, CULTIVOS CLONALES Y CICLO DE  
VIDA

**T E S I S**

que para obtener el grado académico de

**Maestra en Ciencias**

Limnología

p r e s e n t a

XIMENA SÁNCHEZ MEDINA

Director de Tesis: MIROSLAV MACEK

Comité Tutorial: ROSAURA MAYÉN ESTRADA

ALFONSO LUGO VÁZQUEZ

CELIA BULIT GÁMEZ

PATRICIA BONILLA LEMUS

## DEDICATORIA

### **A mi familia**

A mi madre Graciela, a mis tías Gloria y Virginia, y a mi pareja Salvador, por estar siempre a mi lado cuidándome y dándome ánimos.

A mi sobrino Jorge Alberto para ofrecerle un ejemplo de que la dedicación y la constancia son clave para alcanzar tus metas.

### **A mis amigos**

Diana, Andrés, Alfonso, Rodrigo, Samuel y Tomás por ser una fuente infinita de risas y buenos momentos que destruyen el estrés que siempre acompaña a la elaboración de una tesis.

### **A los “Biologuitos del 51” (mi grupo de licenciatura)**

Y biologuitos anexos. Sus logros y esfuerzos, así como nuestros buenos recuerdos alimentan esa motivación que a veces hace falta. Si algo tienen es que nunca se detienen y saben disfrutar de la vida.

### **A todos los próximos limnólogos y protistólogos**

Para motivarlos a continuar con sus estudios con gran empeño y pasión. Necesitamos a más como ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el Dr. Miroslav Macek por su paciencia, atención y apoyo; por compartir conmigo sus conocimientos, consejos y opiniones.

A mi comité tutorial, compuesto por los doctores Rosaura Mayén Estrada, Alfonso Lugo Vásquez, Celia Gámez Bulit y Patricia Bonilla Lemus; por su interés y profesionalismo.

A Miriam, por tu gentileza y por toda la ayuda que me ofreciste en el laboratorio, en especial al aislar a los ciliados.

A mis “hermanos de laboratorio” Fabiola y Fernando, por compartir conmigo sus vivencias, reflexiones y consejos, lo que me ha ayudado a madurar sobre lo que deseo hacer de mi vida académica.

A mis compañeros de laboratorio y de campo, por su apoyo, sus consejos, y sobre todo por su compañía, que hicieron tan amenas las actividades necesarias para la realización de esta tesis.

A todo el personal del PILT, por su trato siempre atento y cordial conmigo y con los demás, lo que dota de un ambiente muy agradable a este lugar.

A mis familiares y amigos, por su afecto y su apoyo incondicional.

Al CONACYT por el apoyo financiero para la exitosa realización de este proyecto.

## ABSTRACT

Scuticociliates are the most abundant group of bacterivorous ciliates near the oxic-anoxic boundary in stratified water bodies, as well as in anoxic strata. These nanozooplankton organisms are an important intermediate component in the microbial loop. In the case of the Alchichica crater lake, a warm monomictic tropical water body, scuticociliate abundance peaks have been detected during well-established and late stratification periods on the lower limit of the metalimnion and/or upper limit of the hypolimnion, as well as near the bottom. However, despite these ciliates' ecological importance, their taxonomic identification is most often inaccurate due to their high degree of morphological similarity combined with their polymorphic life cycle.

The present research comprised the study of the morphotypes of scuticociliates from the oxycline and hypolimnion of lake Alchihica, located between the states of Puebla and Veracruz, in order to identify them as either taxonomic species or stages in their life cycle. Five samplings were conducted during the 2013 stratification period from which mixed cultures were generated to produce a growth curve, as well as clonal cultures for study by DAPI, quantitative protargol impregnation (QPS), and Taxol protocols. It was corroborated that no obvious morphological differences were present regarding taxonomy that could help determine the species to which the morphotypes correspond. However, morphological differences corresponded with ontological differences. Two genera of scuticociliates were identified: *Cyclidium* sp. and *Cristigera* sp., both of which belong to the Cyclidiidae family, the life cycle of which could be described since most of the morphotypes corresponded with ontogenical phases.

Key words: Scuticociliates, Cyclidiidae, life cycle, *Cyclidium*, *Cristigera*, clonal culture, DAPI, QPS.

## RESUMEN

Los escuticociliados son el grupo de ciliados bacterívoros más abundante cerca del límite óxico-anóxico en cuerpos de agua estratificados, así como en los estratos anóxicos. Estos organismos del nanozooplankton son un importante componente intermedio en el circuito microbiano. En el caso del lago cráter Alchichica, cuerpo de agua tropical con un patrón monomictico cálido, se han detectado, durante la estratificación bien establecida y tardía, máximos de abundancia de escuticociliados en el piso del metalimnion y/o techo del hipolimnion, así como cerca del fondo. Sin embargo, a pesar de la importancia ecológica de estos ciliados, su identificación taxonómica suele ser imprecisa debido a la gran similitud morfológica que presentan, aunado a su ciclo de vida polimórfico.

Esta investigación comprendió el estudio de los morfotipos de escuticociliados provenientes de la oxiclina e hipolimnion del lago Alchihica, ubicado entre los estados de Puebla y Veracruz, con el fin de identificarlos como especies taxonómicas o como fases en su ciclo de vida. Se realizaron cinco muestreos durante el periodo de estratificación del año 2013 a partir de los cuales se generaron cultivos mixtos para elaborar una curva de crecimiento, así como cultivos clonales para estudiarlos mediante los protocolos de DAPI, impregnación de protargol cuantitativa (QPS) y Taxol. Se comprobó que los morfotipos no presentaron diferencias morfológicas obvias en cuanto a su taxonomía como para determinar la especie a la que corresponden. Sin embargo, las diferencias morfológicas que mostraron correspondieron a diferencias ontológicas. Se identificaron dos géneros de escuticociliados, *Cyclidium* sp. y *Cristigera* sp., ambos pertenecientes a la familia Cyclidiidae, de la cual se pudo describir su ciclo de vida ya que la mayor parte de los morfotipos coincidieron con fases ontogénicas.

Palabras claves: Escuticociliados, Cyclidiidae, ciclo de vida, *Cyclidium*, *Cristigera*, cultivo clonal, DAPI, QPS.

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ABSTRACT.....	III
RESUMEN.....	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	5
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....	6
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	6
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	6
CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
4.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	7
4.1.1. LAGO ALCHICHICA.....	7
4.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	9
4.3. TÉCNICAS UTILIZADAS.....	10
4.4. CULTIVOS.....	13
4.4.1. CURVA DE CRECIMIENTO.....	13
4.4.2. CULTIVOS MIXTOS DE ESCUTICOCILIADOS.....	12
4.4.3. CULTIVOS CLONALES DE ESCUTICOCILIADOS.....	13
4.5. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO.....	15
CAPÍTULO 5. RESULTADOS.....	15
5.1. AMBIENTALES.....	15
5.2. CURVA DE CRECIMIENTO.....	19



5.3. CULTIVOS.....	21
5.3.1. CULTIVOS DE CILIADOS MIXTOS.....	21
5.3.2. CULTIVOS CLONALES DE ESCUTICOCILIADOS.....	25
5.4. CICLO DE VIDA.....	28
5.5. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA.....	30
5.6. ESTADÍSTICA.....	33
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN.....	36
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
7.1. CONCLUSIÓN FINAL.....	46
7.2. RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	53
REGLA DE STURGES.....	52
NOTAS SOBRE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	53
TÉCNICAS DE IMPREGNACIÓN Y MARCAJE FLUORESCENTE.....	56
DAPI.....	56
TINCIÓN CUANTITATIVA DE PROTARGOL (QPS).....	56
TAXOL.....	57
TABLAS.....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Protocolos utilizados y algunas de sus características.	11
Tabla 2.	Resumen de las técnicas utilizadas para el conteo e identificación de ciliados.	12
Tabla 3.	Concentraciones utilizadas en el método de aislamiento por diluciones para generar cultivos de escuticociliados.	14
Tabla 4.	Muestras tomadas y sus características ambientales.	19
Tabla 5.	Abundancia ordinal de escuticociliados provenientes de distintas profundidades en distintos días de crecimiento y la motilidad observada. Resiembras de los cultivos del 24 de julio de 2013.	23
Tabla 6.	Morfotipos presentes en cultivos de escuticociliados y sus características nucleares. Marcaje con DAPI.	24
Tabla 7.	Morfotipos identificados que coinciden con fases obvias del ciclo de vida de los escuticociliados.	26
Tabla 8.	Detalles sobre los medios de cultivo utilizados durante el estudio.	54
Tabla 9.	Fechas y profundidades de los muestreos.	58
Tabla 10.	Sets de filtros de fluorescencia Leica equipados en el microscopio.	58
Tabla 11.	Datos de largo, ancho y carbono orgánico de los escuticociliados de cultivo.	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Perfiles de parámetros fisicoquímicos del lago Alchichica en 2013. a) 23 de julio, b) 21 de agosto, c) 15 de octubre, d) 12 de noviembre y e) 12 de diciembre.	17
Figura 2.	Perfiles de temperatura (izquierda) y de oxígeno disuelto (derecha) de los muestreos realizados.	18
Figura 3.	Crecimiento poblacional de los cultivos provenientes de distintas profundidades del muestreo del 12 de diciembre de 2013.	20
Figura 4.	Mediciones de largo por ancho de los escuticociliados del día 14 pero de distinta profundidad.	21
Figura 5.	Ciliados encontrado en el cultivo para la curva de crecimiento, originado de la profundidad de 34 m. a) y b) Euplótido. c) Esticotrico.	22
Figura 6.	Morfotipos presentes en cultivos jóvenes. Morfotipo 1, 2 y 10 (arriba). Morfotipo 1 y escuticociliados en división con características nucleares similares al morfotipo 1 (abajo).	27
Figura 7.	Morfotipos presentes en cultivos en fase estacionaria. Morfotipos 5 y 6. Presentan distintas delimitaciones de sus segmentos.	28
Figura 8.	Ciclo de vida propuesto para los escuticociliados de la familia Cyclidiidae del lago de Alchichica.	29
Figura 9.	Formas quísticas de los escuticociliados (Cyclidiidae) en los cultivos clonales provenientes del lago Alchichica. Marcaje con DAPI.	30
Figura 10.	Ciliados miembros de la familia Cyclidiidae. Punta de flecha=cilio caudal. Marcaje con DAPI.	32
Figura 11.	Distribución de largo, ancho y carbono orgánico de los escuticociliados del lago Alchichica.	35
Figura 12.	Valores mínimos y máximos de carbono orgánico de distintos cultivos clonales de escuticociliados. Cada círculo representa una célula individual.	36
Figura 13.	Perfiles fisicoquímicos del muestreo de diciembre de 2013. a) Profundidad total del lago. b) Detalle de los 32 m a los 40 m. Se señala con líneas punteadas los 36 m y 36.5 m.	40

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En un sistema acuático los microorganismos juegan un papel primordial para la ecología del mismo. Anteriormente se tomaba como una generalidad que los procesos importantes para el balance del flujo de carbono y de energía se llevaban a cabo únicamente en el epilimnion, sin embargo, bajo ciertas circunstancias se suele generar una mayor productividad secundaria en el metalimnion y/o hipolimnion que en el epilimnion. Tales circunstancias son la presencia de rutas metabólicas anaeróbicas por parte de los microorganismos ubicados en la zona de transición (termoclina, oxiclina), aunado a condiciones oligotróficas (Valiela, 1991).

Respecto a la posición de los microorganismos en los sistemas acuáticos, el concepto de “cadena trófica” lineal fue reemplazado desde los años 80’s por el del circuito microbiano (*microbial loop*), en el que el flujo de materia y energía puede recircular dentro de cada nivel de la red trófica (Azam *et al.*, 1983), y es en el que ocurre un proceso conocido como re-empaquetamiento trófico, donde el zooplancton microscópico, en particular el nano- y microzooplancton (2 a 200  $\mu\text{m}$  y 20 a 200  $\mu\text{m}$  respectivamente), pueden convertir la materia orgánica en partículas de tamaño accesible para su consumo por niveles tróficos superiores, formando un nivel intermedio importante en las redes tróficas acuáticas (Fenchel, 1986; Sherr y Sherr, 1987, 1988; Gifford, 1988, 1991; Šimek *et al.*, 1995; Montagnes *et al.*, 2008).

Como ejemplo se tiene que la producción de la zona anaerobia puede llegar a ser la mayor fuente de carbono orgánico para la zona aerobia, esto mediado por la depredación de los distintos componentes del circuito microbiano (Azam *et al.*, 1983) hasta alcanzar el nivel trófico del metazooplancton e incluso del neston, el cual es característico del epilimnion. Cabe mencionar que la producción primaria en estas zonas se debe a bacterias fotosintetizadoras a muy bajas intensidades lumínicas, por bacterias que efectúan la fotosíntesis anoxigénica relacionada con el ciclo del azufre y las bacterias quimiolitótrofas (Fenchel y Bernard, 1996; Camacho y Vicente, 1998; Camacho *et al.*, 2001).

Entre los componentes del circuito microbiano se encuentran los eucariotas unicelulares tradicionalmente denominados protistas, ya que su tamaño pequeño y elevada tasa metabólica específica resulta en una rápida transferencia de energía y reciclado de nutrientes (Fenchel, 1987; Laybourn-Parry, 1992, 1994). Debido a su potencial de crecimiento pueden aprovechar

fluctuaciones pequeñas y rápidas en los niveles de recursos y su tamaño les permite explotar parches de recursos (Fenchel, 1987).

Uno de los taxa holozóicos de protistas son los ciliados, caracterizados por poseer dos tipos de núcleos, un micronúcleo (germinal) y un macronúcleo (somático). Son consumidores importantes de bacterias, llegando a consumir más del 70% del *standing stock* diario (consumen el equivalente a la densidad poblacional instantánea, esto es, el número de organismos disponibles en un momento dado) (Sherr y Sherr, 1987; Sherr *et al.*, 1988; Šimek *et al.*, 1995; Posch *et al.*, 2001; Martínez-Pérez *et al.*, 2004). Además, forman una parte significativa de la biomasa total, aunque, su distribución temporal y espacial no es homogénea, presentando su mayor actividad durante el periodo de estratificación, ubicándose en el piso del metalimnion o por debajo de éste (Laybourn-Parry *et al.*, 1990; Tiffany *et al.*, 2007; Mansano *et al.*, 2013). Sin embargo, al calcular la actividad depredadora de los microorganismos holozóicos a lo largo del ciclo anual, los flagelados heterotróficos se catalogaron como los más importantes en los cuerpos de agua (Patterson *et al.*, 1993; Šimek *et al.*, 1995).

En décadas anteriores se han llevado a cabo estudios sobre los ciliados en cuerpos de agua respecto a sus patrones temporales y espaciales, la función y la importancia que tienen en el sistema (mixótrofos, filtradores, raptorales, detritívoros, etc.), el tipo y tamaño de partículas y organismos que consumen, así como el tipo de dieta que llevan en distintos tipos de cuerpos de agua (Šimek *et al.*, 1995; Macek *et al.*, 1996, 2006; Macek, 2002).

Otro aspecto estudiado ha sido el de la taxonomía de los ciliados, sin embargo, a falta de claves completas de muchos grupos, la variación en rasgos morfológicos por cambios en factores ambientales o las condiciones del cultivo, la identificación ha sido errónea (Fenchel, 1990; Long y Zufall, 2010; Gao *et al.*, 2014).

Otra dificultad para su identificación reside en su ontogenia y por ende en sus etapas o fases ontogénicas. En los ciliados el ciclo ontogénico comprende desde la formación, crecimiento y desarrollo de un producto filial (el tomito) hasta el que alcanza una forma adulta como trofante o tomonte maduro, apto para otra fisión. El ciclo de vida típico de los ciliados incluye un ciclo asexual o vegetativo en el que ocurre el crecimiento y la división celular, un ciclo sexual con intercambio de material genético entre conjugantes, y un ciclo criptobiótico durante el que se forma un quiste de resistencia (Lynn, 2008; Fenchel, 1990; Pérez-Uz y Guinea, 2001; Long y Zufall, 2010).

Los ciliados también suelen presentar gran plasticidad morfológica englobada dentro del concepto de polimorfismo, el cual se refiere a la existencia de dos o más fenotipos claramente diferenciados (morfotipo, morfo o fase) en el mismo hábitat, al mismo tiempo y en una población panmíxica (una con apareamientos aleatorios) de la misma especie (Ford, 1965).

Con la introducción de métodos modernos de biología molecular se ha revisado recientemente el problema de la taxonomía de los protistas en general y de las especies pequeñas de ciliados en particular, donde la identificación presenta dificultades tales como la limitada información genética en muchos linajes de protistas, la diferencia entre las tasas de divergencia fenotípica y genotípica conduciendo a que un único marcador genético proporcione información taxonómica inconsistente, o los altos niveles de diversidad revelados por las técnicas moleculares pero que no están asociados con células conocidas, entre otras (Pan *et al.*, 2011; Boenigk *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012, 2014).

Entre los ciliados se encuentra la subclase Scuticociliatia (Small, 1967), con organismos de tamaño pequeño a mediano, ovoides, libre nadadores en su mayoría, con ciliatura somática holotrica y frecuentemente con uno o varios cilios caudales, así como con dicinétidas somáticas predominantes. Se caracterizan por una membrana paraoral derecha dividida en segmentos anterior, medio y posterior o “a”, “b” y “c”, y tres membranelas a la izquierda. Presentan estomatogénesis escuticobucocinetal, involucrando la proliferación de cinetosomas al menos del segmento “c” también llamado escutica o escuticovestigio. El nombre de escutica hace referencia a su apariencia de gancho o latigazo durante algunas etapas de la estomatogénesis, lo cual es la mayor sinapomorfia del grupo. Además, presentan típicamente un macronúcleo individual pero segmentado en algunas especies y uno o varios micronúcleos. Son comúnmente bacterívoros pero las especies parasíticas a menudo son histiófagas de crustáceos y peces. Presentan quistes por lo general y abundan en los hábitats marinos, algunos hábitats de agua dulce y terrestres, como formas de vida libre o en asociación simbiótica con los invertebrados principalmente, como moluscos, equinoideos y anélidos (Lynn, 2008). Las investigaciones recientes han demostrado que la diversidad de este grupo no ha sido bien documentada además de que a nivel molecular parecen ser polifiléticos (Fan *et al.*, 2011; Lobban *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013).

A pesar que los escuticociliados se encuentran en la mayoría de los hábitats naturales, los detalles del ciclo de vida de especies anaeróbicas de vida libre han sido raramente descritos (Fenchel y Finlay, 1991; Clarke *et al.*, 1993; Esteban y Finlay, 2003). Se les puede encontrar abundantemente cerca del límite óxico-anóxico en cuerpos de agua estratificados, así como en los estratos anóxicos. Varios autores han aislado escuticociliados de hábitats anóxicos como lo es *Cyclidium porcatum*, un escuticociliado anaerobio de agua dulce, que posee hidrogenosomas y contiene metanógenos

simbióticos (Clarke *et al.*, 1993). Otro caso es el del género *Cristigera* del que se han identificado especies anaeróbicas marinas (Fenchel *et al.*, 1990; Finlay *et al.*, 1991), de agua salobre (Esteban *et al.*, 2000) y de agua dulce (Olmo, 1998; Esteban y Olmo, 1997).

Debido a la gran importancia que presentan los escuticociliados en ambientes con bajos a nulos niveles de oxígeno, en esta tesis se estudia la composición de morfoespecies de escuticociliados presentes en la oxiclina e hipolimnion del lago de Alchichica.

## CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

### JUSTIFICACIÓN

En los cuerpos de agua con capas cuyos niveles de oxígeno son bajos, se presentan los escuticociliados (el grupo de ciliados bacterívoros más abundante en estas capas) como un componente importante intermedio en el circuito microbiano. Sin embargo, su estudio, especialmente el taxonómico resulta complicado debido a que su morfología es variable ya sea por cambios inducidos por factores ambientales o por un ciclo de vida polimórfico, además de que suelen presentar morfologías muy similares entre ellos. Por lo tanto, para identificarlos adecuadamente se requiere de un estudio desde distintas ramas de la biología. Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo conjunta aspectos ambientales y de laboratorio con el fin de obtener una caracterización más completa de los escuticociliados identificando las morfoespecies de escuticociliados presentes en la oxiclina y en el hipolimnion del lago Alchichica, Puebla.

### HIPÓTESIS

En la oxiclina y en el hipolimnion del lago Alchichica existen escuticociliados diferenciados morfológicamente (morfotipos), los cuales corresponden a especies taxonómicamente válidas (morfoespecies), o bien a fases distintas en el ciclo de vida de estos ciliados.



## CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Describir los morfotipos de escuticociliados en la oxiclina e hipolimnion del lago de Alchichica para identificar aquellos consistentes con morfoespecies o con fases en su ciclo de vida.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir las características ambientales de las profundidades muestreadas.
- Obtener la curva de crecimiento de los cultivos de escuticociliados de distintas profundidades.
- Caracterizar morfológicamente a los escuticociliados de cultivo.
- Identificar los morfotipos de escuticociliados presentes en los cultivos.
- Determinar cuáles morfotipos de escuticociliados corresponden a una fase del ciclo de vida.
- Determinar en cultivos clonales, cuales morfotipos de escuticociliados corresponden a una especie.
- Identificar a nivel de especie a los escuticociliados aislados y plantear un orden ontológico de las fases de su ciclo de vida.

## CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

La Cuenca Oriental (estados de Tlaxcala, Puebla, Veracruz), región perteneciente a la subprovincia orográfica de “Lagos y volcanes del Anáhuac”, dentro del Eje Neovolcánico Transversal se encuentra en el extremo SE del Altiplano Mexicano (18°56'51" a 19°43'25" N y 97°07'10" a 98°03'04" O) (Alcocer *et al.*, 2001) y está delimitada por cuatro de los volcanes más grandes de México: la Malinche hacia el oeste, el Nahcampaetépetl (Cofre de Perote), el Citlaltépetl (Pico de Orizaba) y el volcán Atlitzin (Sierra Negra) por el oeste (INEGI, 2011). Esta región se originó hace aproximadamente un millón de años durante el Cuaternario (Gasca, 1981). Es una cuenca endorreica ya que los escurrimientos de agua captada por precipitación no fluyen al mar ni a otra cuenca, sino que por un lado se acumulan en el manto freático y por otro se evaporan.

A pesar de encontrarse en una latitud tropical el clima de la región es seco y templado (temperatura media de 14.4°C) al atemperarse por su elevada altitud (altitud media de 2,312 m.s.n.m.). Tanto por su balance de precipitación y evaporación como por sus temperaturas, la zona puede ser considerada como un semidesierto frío (García, 2004).

En esta cuenca se encuentra un conjunto de seis cuerpos de agua conocidos localmente como “axalapazcos” (del náhuatl "vasija de barro con agua") (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983). De acuerdo con la U.S. Geological Survey (2008) estos cuerpos de agua son lagos cráter de tipo maar, definidos como lagos en un cráter volcánico profundo y ancho, producidos por una erupción volcánica o freática causada por el agua subterránea en contacto con lava caliente o magma.

#### 4.1.1. LAGO ALCHICHICA

Es el mayor de los lagos cráter que se localizan en la Cuenca Oriental (Arredondo *et al.*, 1984), pertenece a los estados de Puebla y Veracruz (19°24' N, 97°24' O, 2350 m.s.n.m.) y es uno de los lagos más profundos en México (con una profundidad máxima cercana a los 62 m y una profundidad media de 40.9 m); tiene forma circular con abruptas pendientes desde la orilla y un

diámetro de 1.8 km, un área de 2.3 km<sup>2</sup>, un volumen de 9.4×10<sup>7</sup> m<sup>3</sup> y un perímetro de 5.0 km; la zona litoral tiene un área aproximada del 1% del área superficial del lago (Filonov *et al.*, 2006).

Sus aguas provienen principalmente del manto freático (el aporte de la cuenca no está cuantificado) y en menor proporción de la escorrentía de lluvia hacia el agua superficial o subsuperficial. Alchichica presenta aguas hiposalinas (8.5 g L<sup>-1</sup>), un pH básico con cationes predominantes de sodio > magnesio y anión de cloruro > carbonato > hidrogenocarbonato > sulfato (Vilaclara *et al.*, 1993; Armienta *et al.*, 2008).

Este lago sigue el típico patrón estacional de un cuerpo monimíctico cálido (Lewis, 1983), mezclándose completamente a una temperatura entre 14.2°C y 15°C aproximadamente, a partir de finales de diciembre o principios de enero hasta marzo; la estratificación se extiende al resto del año (Alcocer *et al.*, 2000; Macek *et al.*, 2009).

Durante los periodos de estratificación el oxígeno disuelto (OD) en los primeros 20 m es bastante estable. La sobresaturación se alcanza durante la estratificación temprana. En la estratificación bien establecida, el OD disminuye rápidamente en la zona superior de la termoclina llegando a valores fisiológicamente nulos ( $\leq 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) a pocos metros por debajo de la metalimnion. El hipolimnion es completamente anóxico de mayo a diciembre (Macek *et al.*, 2009).

Este lago se clasifica como oligo-mesotrófico con concentraciones promedio de clorofila *a* en la columna de agua menores a 5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Las concentraciones excepcionales ( $> 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) se alcanzan en enero, coincidiendo con la mixis (Oliva *et al.*, 2001; Macek *et al.*, 2009). Sin embargo, según la concentración de fósforo debería clasificarse como eutrófico (Callieri *et al.*, 2013).

En el lago Alchichica se ha reportado la presencia de peritricos como los ciliados más abundantes (*Vorticella* complejo *octava* y/o *Vorticella* complejo *aquadulcis*, *Pelagovorticella natans*), además de escuticociliados (*Cyclidium glaucoma* y *Uronema* sp. entre otros) (Lugo, 2000; Peštová *et al.*, 2008). El ensamblaje de ciliados no es muy diverso y está dominado numéricamente por ciliados picoplanctívoros. De acuerdo con su biomasa, el ensamblaje del lago está dominado por gimnostomátidos (particularmente *Phialina* sp.) y al final de la estratificación por *Euplotes* sp. o *Euplotopsis* sp., posible mixótrofo (Bautista-Reyes y Macek, 2012). Además, aparecen regularmente los prostomátidos grandes (*Holophrya* sp.; Sánchez-Medina, 2013). Generalmente la abundancia máxima (numérica y de biomasa) se encuentra debajo del metalimnion, en el piso de la oxiclina y por arriba del fondo (Macek *et al.*, 2006, 2008; Peštová *et al.*, 2008; Bautista-Reyes y Macek, 2012; Sánchez-Medina *et al.*, 2016).

Durante el ciclo anual las mayores densidades de ciliados (p. ej. de peritricos) se encuentran en la superficie colonizando organismos del florecimiento del fitoplancton (a la cianobacteria filamentosa *Nodularia* sp. y a la diatomea *Cyclotella alchichicana*) y al final de la estratificación cerca de la oxiclina, debido a la concentración de posibles presas en esa zona. Los espirotricos pequeños (*Halteria grandinella*) y los haptóridos como *Belonophrya pelagica* llegan a dominar ocasionalmente el metalimnion. Los ciliados alcanzan un segundo máximo en la oxiclina y/o cerca del fondo, siendo los escuticociliados *Cyclidium glaucoma*, *Uronema nigricans* y los ciliados anaerobios *Isocyclidium globosum* y *Caenomorpha* sp. los que dominan numéricamente el hipolimnion (Macek *et al.*, 2006, 2008; Peštová *et al.*, 2008). Muchas de estas especies son consumidoras de partículas finas en suspensión (Sherr y Sherr, 1987; Šimek *et al.*, 1995; Foissner *et al.*, 1999) como los peritricos, escuticociliados y espirotricos. Existen depredadores en menor cantidad (ej. haptóridos) y pocas especies alguívoras (Peštová *et al.*, 2008).

#### 4.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se realizaron perfiles de temperatura y OD con un sistema de monitoreo de calidad de agua Hydrolab DS4/SVR y se registró la radiación fotosintéticamente activa (PAR) con un equipo LICOR 1400 equipado con un sensor Quantum LI-192. La fluorescencia de clorofila *a*, ficocianina y ficoeritrina se midió con un fluorómetro sumergible WET-LAB ECO-Triplet (USA).

Una vez ubicadas la termoclina y la oxiclina, además de la profundidad del máximo de pigmentos, se infirió la ubicación del máximo de picoplancton autotrófico (APP) y de bacterias para tomar las muestras en estas profundidades, donde probablemente se encontrarían los escuticociliados (Tabla 9). Se utilizó una botella de plancton IHE (República Checa) con capacidad de 2 L para tomar las muestras de agua, en botellas de polietileno de 160 mL y se fijaron con la solución concentrada de Bouin, adicionada al 7% (Lee *et al.*, 1985; Montagnes y Lynn, 1993; Sherr y Sherr, 1993). Estas muestras fueron procesadas posteriormente mediante impregnación de protargol cuantitativa (QPS).

Además, en campo se llenó una botella de PET de 450 mL hasta desbordarse (para evitar introducir burbujas de aire) y se conservó en agua fría con hielo para obtener cultivos a partir de estas muestras.

### 4.3. TÉCNICAS UTILIZADAS

Se utilizaron diversos métodos de acuerdo con el origen de las muestras (Tabla 1).

Tabla 1. Protocolos utilizados y algunas de sus características.

<b>Origen de los datos</b>	<b>In vivo</b>	<b>In vitro</b>	
<b>Tipo de estudio</b>	<b>Ambiental</b>	<b>Curva de crecimiento</b>	<b>Estudio de cultivos</b>
<b>Protocolos utilizados</b>	QPS	QPS	QPS DAPI Taxol
<b>Tipo de resultados obtenidos</b>	Tipo de escuticociliados en relación a los perfiles ambientales	Curva de crecimiento de los escuticociliados según su profundidad	Detalles morfológicos y ciclo de vida

Para el conteo rápido de los ciliados se utilizó el marcaje con DAPI, para esto se fijaron las muestras con formaldehído al 2%, se filtraron sobre membranas de policarbonato teñidas de negro (2  $\mu\text{m}$ ; Poretics) y se aplicó el protocolo de tinción con DAPI (Porter y Feig, 1980). Los filtros se observaron en el microscopio Leica (modelo DMLB; Alemania) con el juego de filtros A / UV (Tabla 10).

Para la identificación morfológica de los escuticociliados se siguieron dos protocolos:

La impregnación de protargol cuantitativa (QPS) en la que las muestras se fijaron con líquido de Bouin concentrado, adicionándole al 7% (Sherr y Sherr, 1993), se usaron filtros de membrana de ésteres de celulosa (tamaño de poro 1.2  $\mu\text{m}$ ; Millipore, Irlanda) y temperatura elevada (aproximadamente 62°C) según el protocolo modificado de Montagnes y Lynn (1987) y Skibbe (1994). Las preparaciones permanentes montadas en bálsamo de Canadá se observaron en el microscopio Leica DMBL con la posibilidad de aplicar la técnica de Nomarski (contraste diferencial de interferencia; DIC) utilizando los objetivos apocromáticos de inmersión 40 $\times$  y 100 $\times$ .

Se utilizó también el protocolo de Taxol (Serrano *et al.*, 2008) con el reactivo Paclitaxel (Invitrogen, USA). Las preparaciones se observaron in vivo en algunas ocasiones, y por lo general fijadas (posterior a su marcaje) con glutaraldehído. Para mayores detalles de los métodos para el

estudio morfológico, véase la sección de técnicas de impregnación y marcaje fluorescente en anexos.

Para documentar los resultados y para un estudio más detallado de la morfología en computadora se tomaron fotografías con una cámara Canon Power Shot S-45 conectada a una computadora Sony-Vaio.

La identificación de los organismos se realizó siguiendo la clasificación de Lynn (2008) para la determinación a nivel de familia y de artículos especializados (Clarke *et al.*, 1993, Esteban *et al.*, 1993, entre otros) para el nivel de género y especie. La validez de las especies identificadas se corroboró con la información reciente en la red, en particular de los servidores de las asociaciones protistológicas y los servidores de datos taxonómicos.

Tabla 2. Resumen de las técnicas utilizadas para el conteo e identificación de ciliados.

<b>Técnica</b>	<b>Propósito</b>	<b>Membranas</b>	<b>Diámetro de poro</b>	<b>Fijador</b>	<b>Colorante</b>
DAPI	Conteo rápido	Policarbonato	2 $\mu\text{m}$	Formaldehído al 2%	DAPI al 0.01 $\mu\text{g/mL}$
QPS	Identificación cuantitativa	Ésteres de celulosa	1.2 $\mu\text{m}$ o 3 $\mu\text{m}$	Bouin al 7%	Proteinato de plata (Protargol)
Taxol	Identificación	Sin membranas	No aplica	Sin fijador	Taxol 1 $\mu\text{M}$ (Flutax, Verde de Oregon)

#### 4.4. CULTIVOS

##### 4.4.1. CURVA DE CRECIMIENTO

Cada muestra tomada en diciembre del año 2013 se conservó en hielo hasta llegar al laboratorio, momento en el que se le adicionó un grano de trigo (Tabla 8). Este sería considerado el día 0 de la observación. Durante 14 días consecutivos se tomó y fijó una alícuota de 2 mL diariamente, para procesarse posteriormente mediante la impregnación de protargol cuantitativa (QPS) con el fin de graficar una curva de crecimiento poblacional para cada profundidad muestreada y observar características morfológicas de los escuticociliados.

##### 4.4.2. CULTIVOS MIXTOS DE ESCUTICOCILIADOS

Estos cultivos se compusieron por escuticociliados de una o más especies en un mismo cultivo.

Se generaron a partir de las muestras tomadas en campo y se utilizó el medio de trigo 1 y 2 para generarlos y mantenerlos. Además, para conservarlos en condiciones que favorecieran su crecimiento, permanecieron con luz indirecta y se sometieron a dos tratamientos que emulaban los bajos niveles de OD propios de su hábitat:

- Tratamiento 1: En botellas para cultivo de tejidos con las tapas enroscadas casi por completo (sólo hasta el tope, sin apretarlas).
- Tratamiento 2: Se utilizó una técnica para el cultivo de protistas microaerofílicos, parásitos de sangre. Este método resulta adecuado ya que pesar de su bajo costo simula las condiciones del hipolimnion anóxico. Consiste en colocar los cultivos (las botellas con las tapas sobrepuestas) en un desecador junto con una vela que al consumirse hace que la fase gaseosa ahí confinada contenga entre el 5% y 10% de oxígeno y entre 2% y 5% de dióxido de carbono (Trigg, 1985).

Para separar a los escuticociliados de otro tipo de ciliados se utilizó el método de dilución, en el que se cuantificó el número de células (DAPI) en una muestra de cultivo. Con esta información se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 0.1 hasta obtener una concentración entre 1 y 9 células por mililitro. A partir de esta concentración se realizaron tres concentraciones, como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 3. Concentraciones utilizadas en el método de aislamiento por diluciones para generar cultivos de escuticociliados.

Concentraciones	Probabilidad de que contenga:		
	Más de una célula	Una célula	Menos de una célula
Concentración A	↑	↓	↓
Concentración B	↓	↑	↓
Concentración C	↓	↓	↑

Estas concentraciones se cultivaron en placas de cultivo de tejidos con tapa y estériles, con 24 pozos de fondo plano, cada uno de 3 mL. Algunos de estos cultivos fueron clonales, pero en su mayoría fueron mixtos.

El propósito de estos cultivos fue la identificación de distintos morfotipos, por lo que se registró la forma, ubicación y segmentación y/o número de macronúcleos de los escuticociliados (DAPI).

#### 4.4.3. CULTIVOS CLONALES DE ESCUTICOCILIADOS

Estos cultivos se compusieron de escuticociliados originados de una sola célula, la cual fue aislada de los cultivos mencionados en el apartado anterior. Para esto se adelgazó la punta de una pipeta Pasteur al estirarla en un mechero de Bunsen y doblarla un poco. Con la pipeta se captó una sola célula utilizando un microscopio invertido y se les cultivó en el mismo tipo de placas que el método de dilución.

Los cultivos se sometieron a los mismos dos tratamientos de simulación de bajos niveles de OD y se procesaron mediante el marcaje con DAPI para estudiar los morfotipos propuestos, y mediante la impregnación QPS y el marcaje con Taxol para la identificación taxonómica morfológica.



#### 4.5. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO

A partir de las fotografías de 257 organismos (DAPI), pertenecientes a cultivos tanto de la curva de crecimiento y los cultivos clonales de escuticociliados obtenidos mediante dilución, se calcularon los datos de largo y ancho, a partir de los cuales se estimó su valor de carbono orgánico mediante las siguientes fórmulas (siendo V = Volumen, a = Largo y b = Ancho).

$$\text{Esferoide prolato} \quad V = \frac{\pi}{6} \times a \times b^2 = 0.523598776 \times a \times b^2 \quad (1)$$

$$\text{Volumen en vivo} = V \times 1.4 \quad (2)$$

$$\text{Carbono orgánico} = \text{Volumen vivo} \times 0.148 \quad (3)$$

Cabe señalar que en la fórmula de volumen vivo (2), el factor de conversión de 1.4 refleja cómo se encoge una célula viva en el fijador y en la fórmula de carbono orgánico (3) el factor 0.148 [pg carbono/ $\mu\text{m}^3$ ] refleja el contenido específico de carbón orgánico (Jerome *et al.* 1993).

Dado que la media aritmética del largo, ancho y carbono orgánico de los escuticociliados presentó una alta desviación estándar, se optó por agruparles en clases para observar su tendencia. Para esto se usó la regla de Sturges, la cual es una regla práctica utilizada en estadística descriptiva que indica el número de clases que deben considerarse al elaborar un histograma de frecuencias. Este número viene dado por la siguiente expresión:  $k = 1 + 3.322(\log_{10} n)$ , donde k es el número de intervalos de clase y n es el número de valores en el conjunto de datos en observación (Daniel, 2007). Un ejemplo del uso de esta regla se encuentra en la sección de anexos.

## CAPÍTULO 5. RESULTADOS

### 5.1. AMBIENTALES

En este apartado se omitió la descripción del muestro de julio del año 2012 (pero se incluyen sus datos en la Tabla 4) debido a que la función de este sólo fue la de estandarizar métodos, por lo que no cuenta con otros datos con los cuales relacionarle.

En las fechas muestreadas, el lago Alchichica presentó en julio y agosto una estratificación estable mientras que en octubre, noviembre y diciembre mostró una estratificación tardía. Lo anterior corresponde con el patrón estacional monimíctico cálido (Lewis, 1983) que caracteriza a este lago (Alcocer *et al.*, 2000; Macek *et al.*, 2009).

Durante la estratificación bien establecida la temperatura varió entre los 19°C y los 15°C mientras que en el periodo de estratificación tardía el rango de variación fue menor, con el límite inferior igualmente en 15°C, pero el superior fue disminuyendo mes con mes (19°C en octubre, 17°C en noviembre y 16°C en diciembre de 2013), acercándose a la mixis que suele ocurrir a finales de diciembre o principios de enero (Macek *et al.*, 2009).

En todos los muestreos, en los primeros 20 m el oxígeno disuelto permaneció bastante estable, a excepción del muestreo de julio en el que la estabilidad permaneció en los primeros 18 m. En todos los muestreos se presentó un hipolimnion anóxico, coincidiendo con observaciones anteriores en donde el hipolimnion es anóxico de mayo a diciembre (Macek *et al.*, 2009).

Conforme transcurrió el periodo de estratificación, la termoclina y la oxiclina se presentaron a mayores profundidades (pasando de los 20 m a los 35 m, aproximadamente), pudiendo estar desacopladas y presentándose la oxiclina unos metros por debajo de la termoclina.

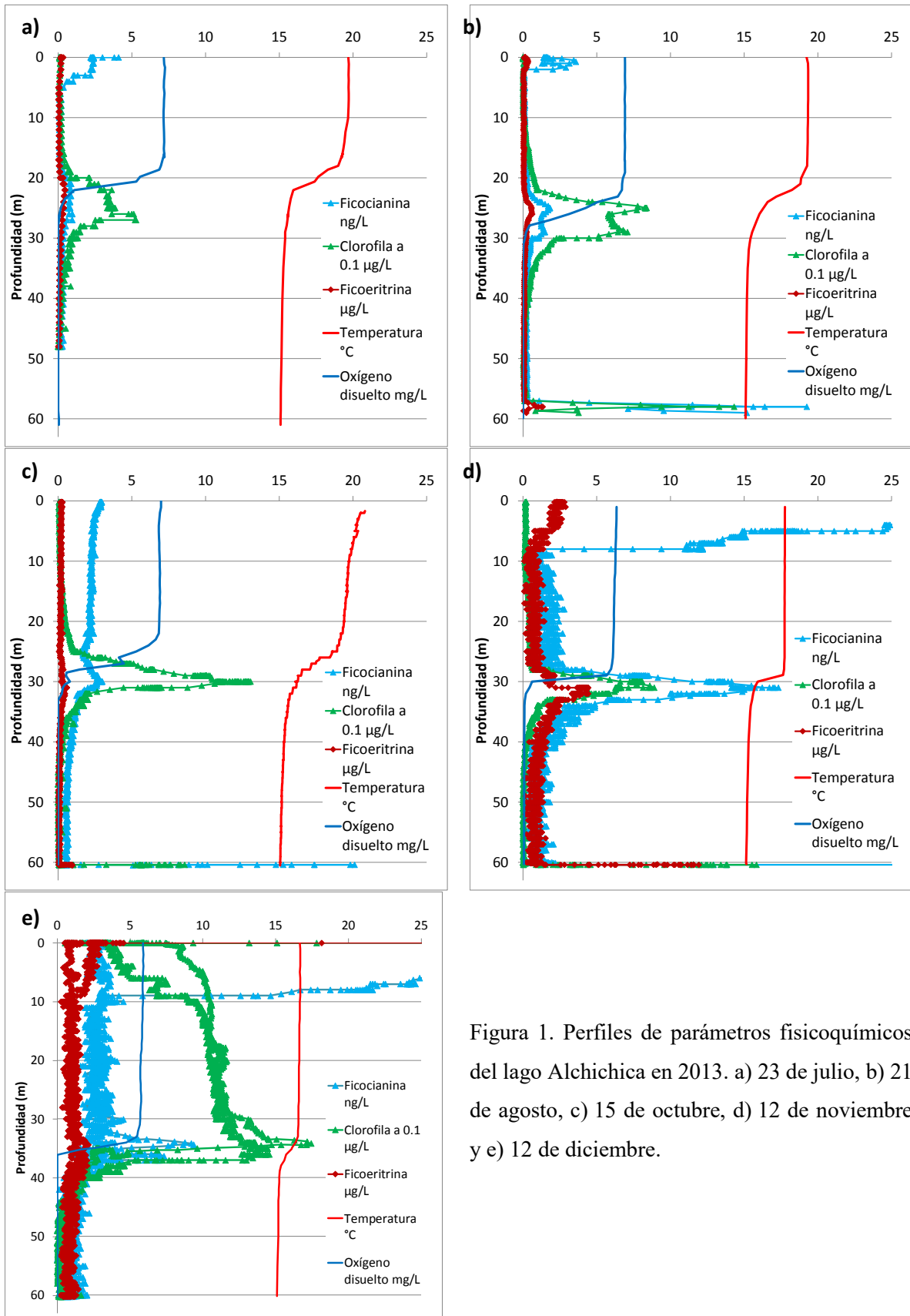


Figura 1. Perfiles de parámetros fisicoquímicos del lago Alchichica en 2013. a) 23 de julio, b) 21 de agosto, c) 15 de octubre, d) 12 de noviembre y e) 12 de diciembre.

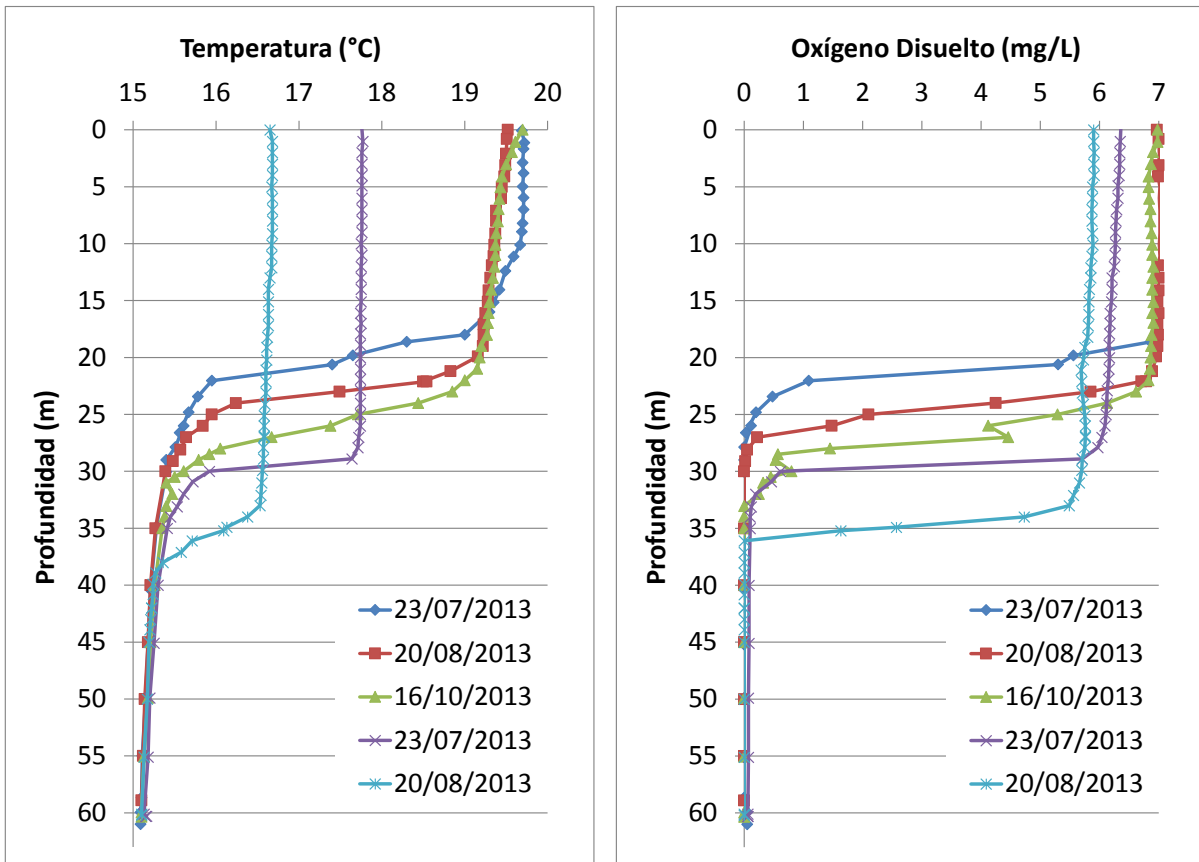


Figura 2. Perfiles de temperatura (izquierda) y de oxígeno disuelto (derecha) de los muestreos realizados.

En cuanto a los pigmentos, su máximo se ubicó en el piso del metalimnion o techo del hipolimnion, a excepción de agosto cuando se presentó unos metros debajo de la base del metalimnion (Figura 2).

Tabla 4. Muestras tomadas y sus características ambientales.

Fecha	Z (m)	T (°C)	OD (mg L <sup>-1</sup> )	Clorofila <i>a</i> <i>in situ</i> (µg L <sup>-1</sup> )	Ficoeritrina <i>in situ</i> (µg L <sup>-1</sup> )	Ficocianina <i>in situ</i> (ngL <sup>-1</sup> )	Total de muestras
25/07/2012	17	18.5	6.65	#N/A	#N/A	#N/A	6
	24	15.5	0.22	#N/A	#N/A	#N/A	
	25	15.3	0.13	#N/A	#N/A	#N/A	
	27	15.2	0.04	#N/A	#N/A	#N/A	
	28	15.2	0.01	#N/A	#N/A	#N/A	
	29	15.1	0.00	#N/A	#N/A	#N/A	
24/07/2013	24	15.8	0.48	3.40	0.37	0.78	4
	26	15.6	0.2	4.99	0.26	0.95	
	27	15.6	0.03	3.66	0.30	0.71	
	28	15.5	0.00	1.59	0.21	0.37	
21/08/2013	21	18.8	6.72	1.11	0.06	0.32	13
	22	18.2	6.71	2.22	0.14	0.54	
	23	17.2	6.43	4.76	0.28	1.17	
	24	16.6	5.06	6.20	0.38	1.39	
	25	16.3	4.25	6.24	0.61	1.39	
	26	16.0	3.14	4.64	0.51	1.05	
	27	15.9	1.83	6.10	0.27	1.17	
	28	15.7	0.44	3.28	0.21	0.78	
	29	15.5	0.21	11.46	0.23	1.98	
	30	15.4	0.12	5.00	0.21	1.02	
	31	15.4	0.03	2.35	0.21	0.61	
16/10/2013	23	18.9	6.62	0.81	0.18	2.20	9
	25	17.7	5.29	1.27	0.16	1.65	
	26	17.4	4.12	2.96	0.15	1.79	
	27	16.7	4.00	3.84	0.24	2.11	
	28	16.1	1.45	6.4	0.32	2.25	
	29	15.8	0.80	10.08	0.26	2.58	
	30	15.6	0.53	13.44	0.28	2.85	
	31	15.5	0.32	6.71	0.57	2.23	
13/11/2013	28	17.7	5.97	0.53	0.10	0.41	10
	29	17.6	5.71	0.59	0.09	0.37	
	30	15.9	0.61	4.50	0.19	1.04	
	31	15.7	0.46	5.51	0.17	1.16	
	32	15.6	0.19	13.06	0.25	2.59	
	33	15.5	0.12	7.74	0.39	1.85	
	34	15.5	0.10	4.42	0.39	1.34	
	35	15.4	0.10	2.01	0.28	0.83	
	36	15.4	0.10	0.99	0.21	0.61	
	37	15.4	0.10	0.60	0.21	0.48	
12/12/2013	34	16.4	4.73	1.36	0.15	0.26	10
	34.5	16.3	3.49	1.33	0.10	0.28	
	35	16.1	2.26	1.43	0.09	0.32	
	35.5	15.9	1.22	1.41	0.17	0.40	
	36	15.8	0.18	1.28	0.15	0.70	
	36.5	15.7	0.09	1.30	0.20	0.69	
	37	15.6	0.00	0.67	0.18	0.32	
	37.5	15.5	0.00	0.42	0.16	0.29	
	38	15.4	0.00	0.35	0.11	0.16	
	38.5	15.3	0.00	0.35	0.17	0.23	

## 5.2. CURVA DE CRECIMIENTO

Estos cultivos pertenecen al muestreo de diciembre de 2013, se observaron distintos tipos de escuticociliados y al cuantificar (QPS) el número de organismos a través del tiempo se observó que las profundidades se distinguieron en sus comportamientos de crecimiento. Los cultivos con mayor crecimiento provinieron de 36 m y 36.5 m de profundidad (días 10 y 14) y pueden observarse las fases exponencial y estacionaria en la Figura 3.

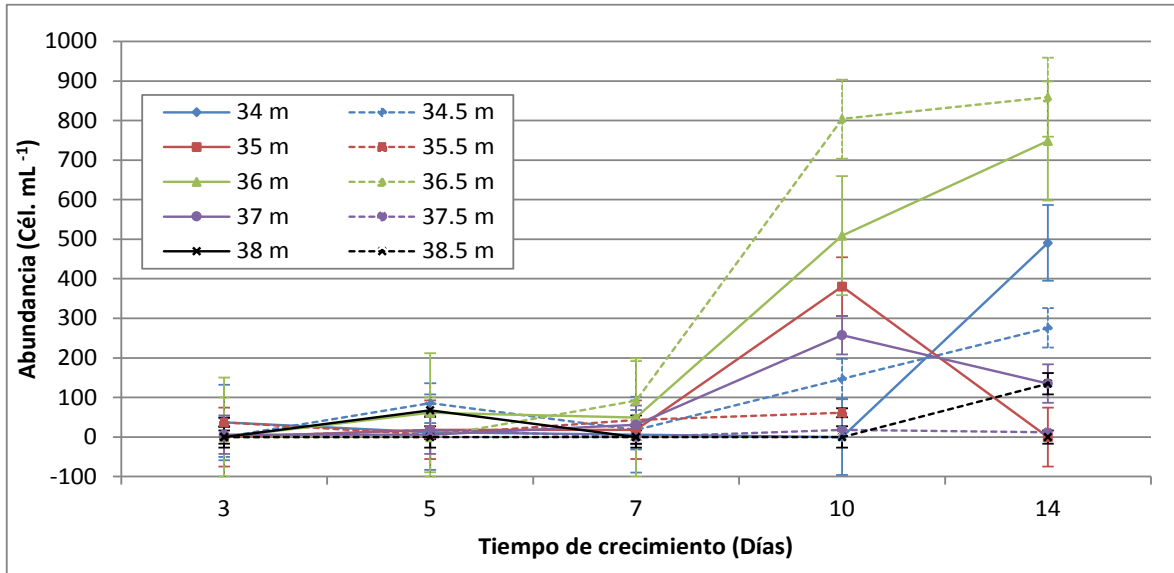


Figura 3. Crecimiento poblacional de los cultivos provenientes de distintas profundidades del muestreo del 12 de diciembre de 2013.

También se midió el largo y ancho de los escuticociliados en las preparaciones de QPS, y se observaron distintas tendencias respecto al tamaño en función de la profundidad de un mismo día (Figura 4).

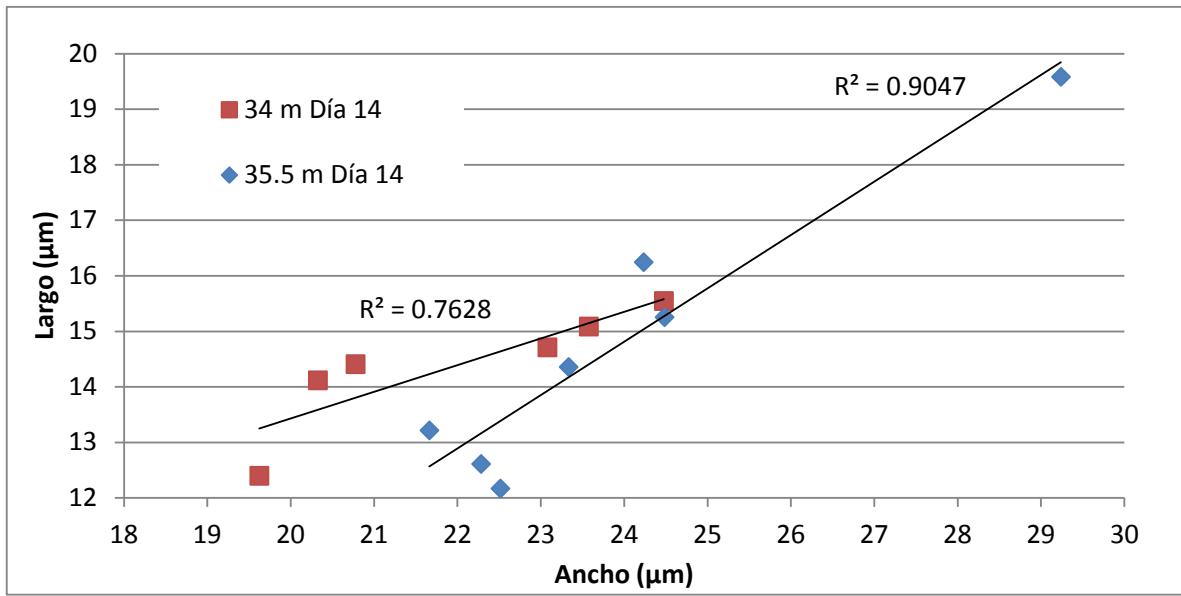


Figura 4. Mediciones de largo por ancho de los escuticociliados del día 14 pero de distinta profundidad.

### 5.3. CULTIVOS

#### 5.3.1. CULTIVOS DE CILIADOS MIXTOS

En estos cultivos se encontró otro tipo de ciliados además de los escuticociliados, como euplótidos, esticotricos (probablemente del orden Urostylida), entre otros.

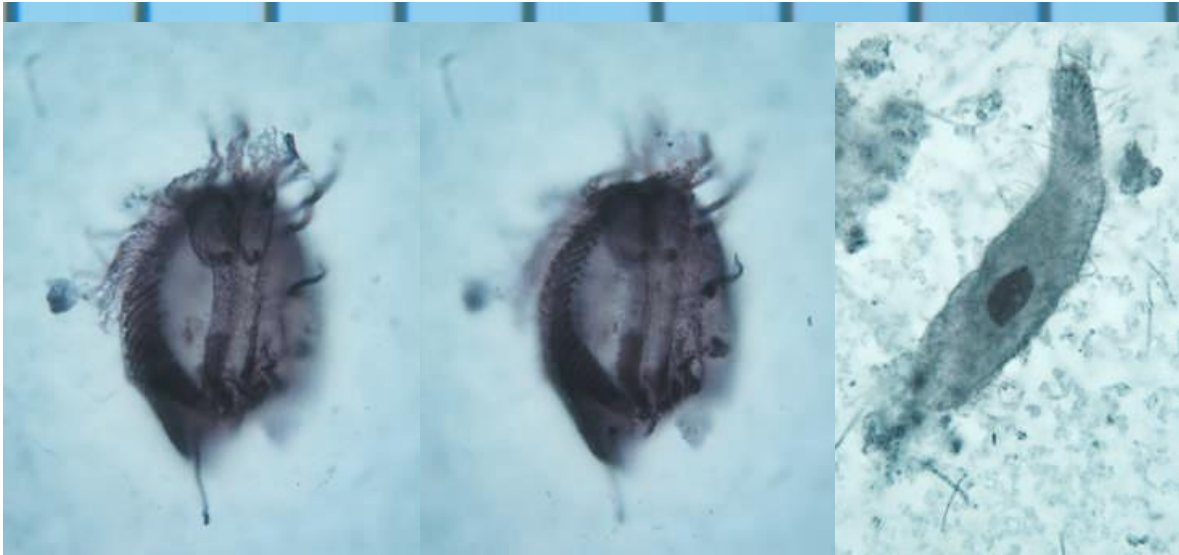


Figura 5. Ciliados encontrado en el cultivo para la curva de crecimiento, originado de la profundidad de 34 m. a) y b) Euplótido. c) Esticotrico.

Respecto a los dos tratamientos que se utilizaron para emular los bajos niveles de OD propios del hábitat de los escuticociliados, se observó que el tratamiento 2 (en el desecador) mostró un crecimiento poblacional más rápido, un mayor número de organismos y permitió la permanencia de euplótidos a diferencia del tratamiento 1 donde se perdían después de un par de resiembras. De hecho, en combinación con el medio de trigo 2, demostró ser el más eficiente para las resiembras ya que se mantuvieron cultivos de ciliados diversos después de 10 meses del muestreo del que se originaron.





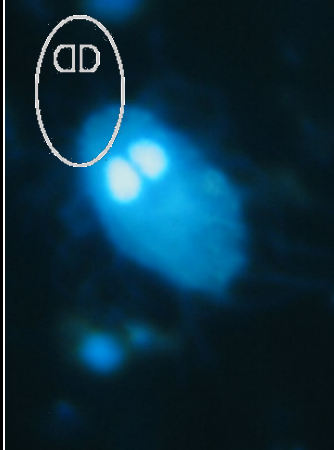

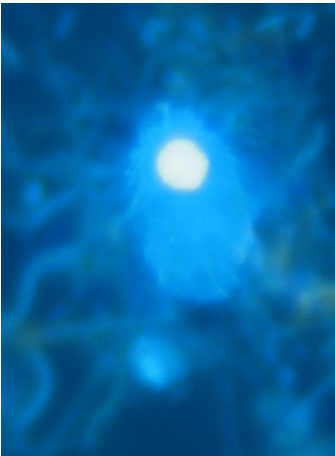





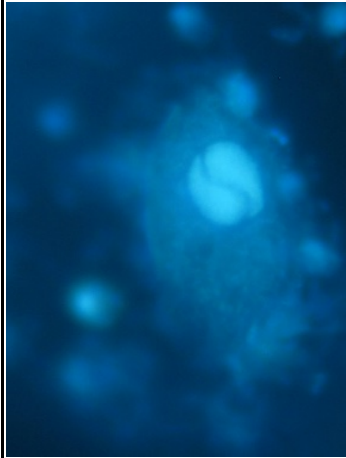

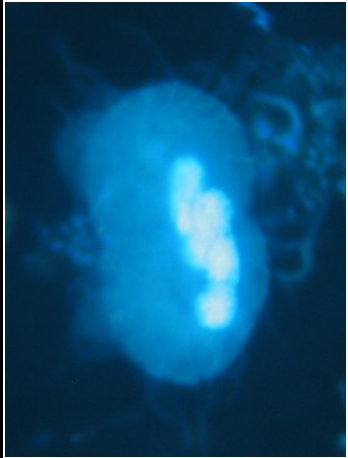
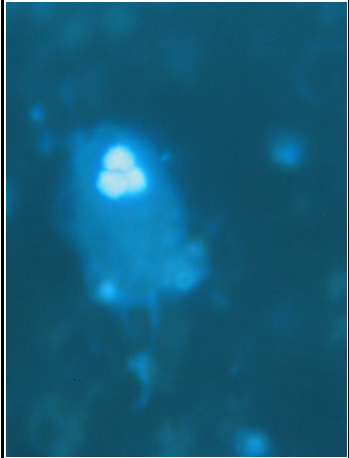



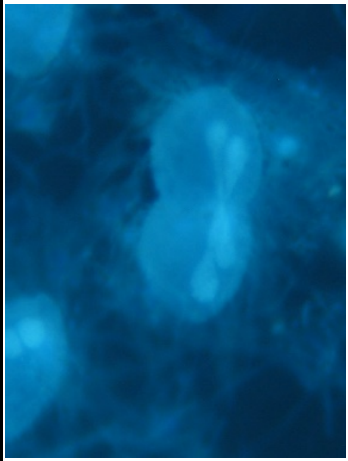
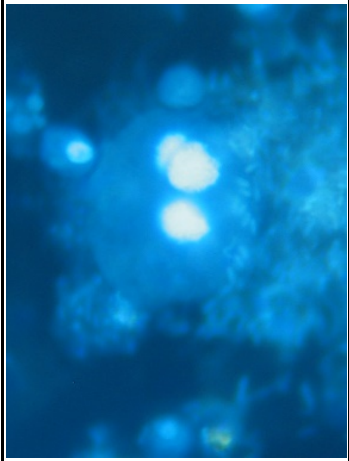
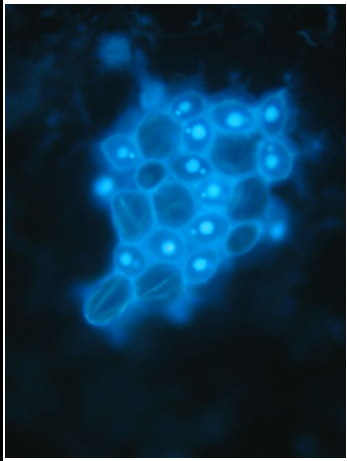
Tabla 5. Abundancia ordinal de escuticociliados provenientes de distintas profundidades en distintos días de crecimiento y la motilidad observada. Resiembras de los cultivos del 24 de julio de 2013. CA = Cultivo anterior que se usó para inocular los nuevos cultivos. • = Escasos, •• = Pocos, ••• = Varios, •••• = Muy abundantes.

Cultivo de origen		Días			Motilidad
		4	6	8	
24 m	•	•	•	••	Menor
	•	••	••	•••	
	•	•	•	•••	
	•	••	•	•••	
	•	••	•	•••	
26 m	•	•	•	••	Menor
	•	•	•	•	
	•	••	•	•	
	•	•	•	•	
	•	••	•	••	
27 m	•••	•••	••	••••	Mayor
	•••	••	••••	••••	
	•••	•••	••••	•••	
	•••	•••	••••	••••	
	•••	•••	••••	••••	
30 m	••	••	••	•••	Mayor
	••	••	••	••	
	••	••	•	••	
	••	••	•	•	
	••	••	•	•••	

Estos cultivos se marcaron con DAPI para registrar las características de los núcleos de las células, con lo que se determinaron diez morfotipos (Tabla 6).

Tabla 6. Morfotipos presentes en cultivos de escuticociliados y sus características nucleares. Marcaje con DAPI.

Morfotipo 1 Un macro- y un micronúcleo	Morfotipo 2 Único macronúcleo	Morfotipo 3 Dos macronúcleos separados	Morfotipo 4 Dos macronúcleos solapados	Morfotipo 5 Dos macronúcleos segmentados
				
				

Morfotipo 6 Dos macronúcleos segmentados	Morfotipo 7 Dos macronúcleos alargados	Morfotipo 8 Escuticociliado en división	Morfotipo 9 Tres macronúcleos	Morfotipo 10 Quistes
				
				

### 5.3.2. CULTIVOS CLONALES DE ESCUTICOCILIADOS

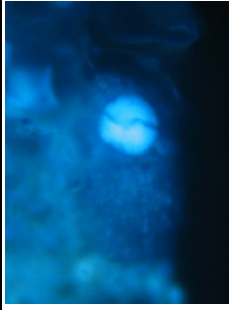

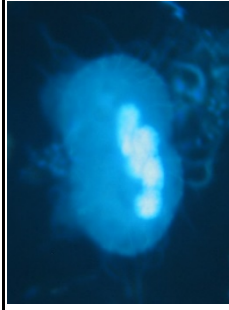
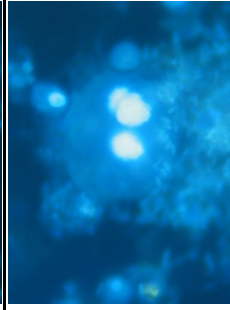

Para la obtención de cultivos clonales de escuticociliados se utilizaron dos técnicas, el método de dilución y el aislamiento de una célula individual.

Independientemente de la técnica utilizada para su aislamiento, los cultivos se sometieron a los mismos dos tratamientos que se utilizaron para emular los bajos niveles de OD propios del hábitat de los escuticociliados, se observaron resultados similares a los de los cultivos de escuticociliados y cultivos de ciliados diversos (apartados anteriores).

Los cultivos clonales de escuticociliados que se obtuvieron mediante el método de dilución, se marcaron con DAPI y se observó lo siguiente:

Los morfotipos del 6 al 10 representaron fases obvias en el ciclo de vida de los escuticociliados (Tabla 7).

Tabla 7. Morfotipos identificados que coinciden con fases obvias del ciclo de vida de los escuticociliados.

Morfotipo 6	Morfotipo 7	Morfotipo 8	Morfotipo 9	Morfotipo 10
Dos macronúcleos segmentados	Dos macronúcleos alargados	Escuticociliado en división	Tres macronúcleos	Quistes
				

Mientras que el morfotipo 1 (con un macro- y un micronúcleo) y morfotipo 2 (un único macronúcleo) se encontraron en los cultivos con menor número de escuticociliados y con presencia de quistes (morfotipo 10), los morfotipos con núcleo segmentado (5 y 6) no se presentaron en esta misma observación, por lo que podrían pertenecer a fases de desarrollo posteriores (Figuras 6 y 7).

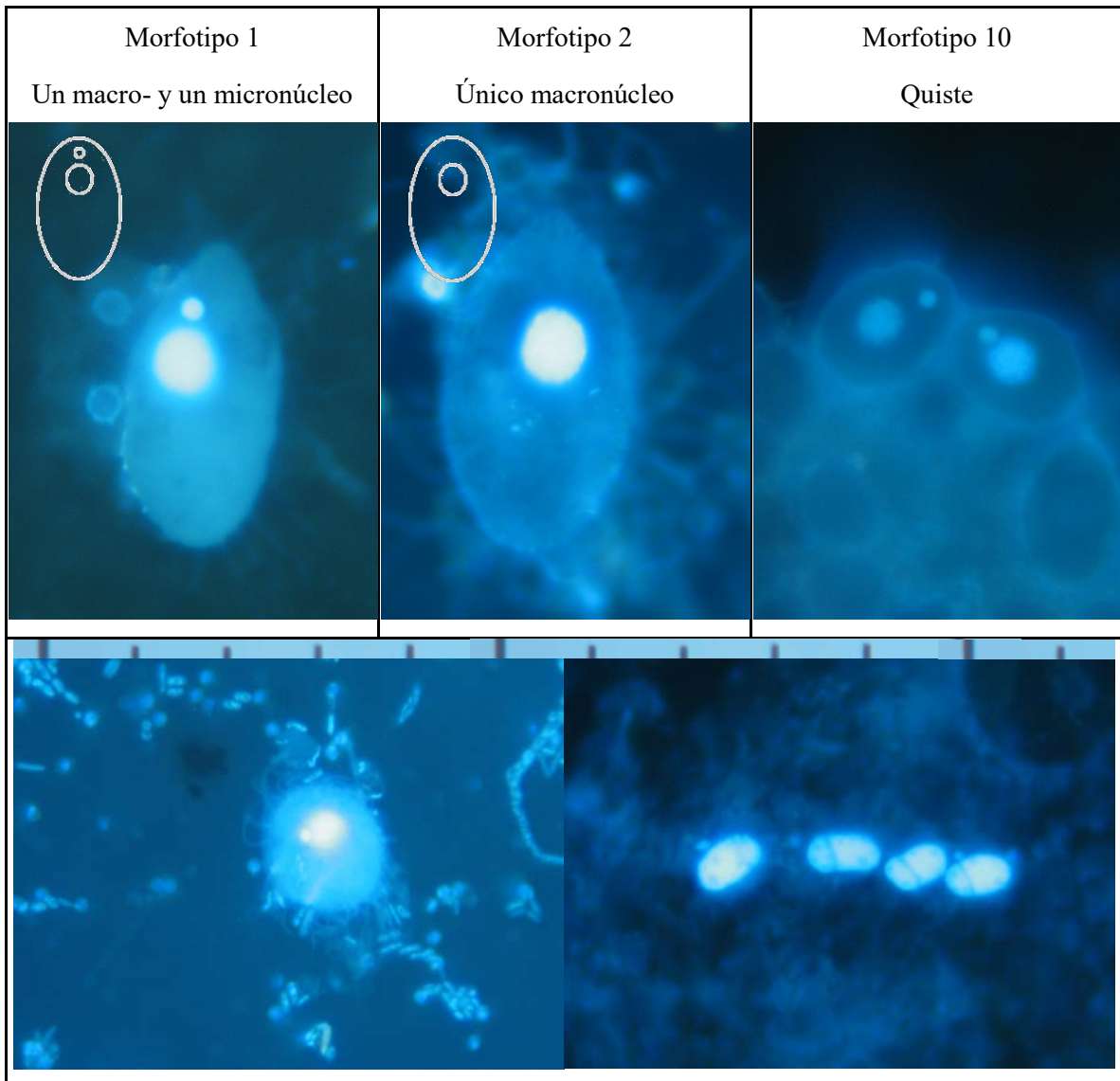


Figura 6. Morfotipos presentes en cultivos jóvenes. Morfotipo 1, 2 y 10 (arriba). Morfotipo 1 y escuticociliados en división con características nucleares similares al morfotipo 1 (abajo).

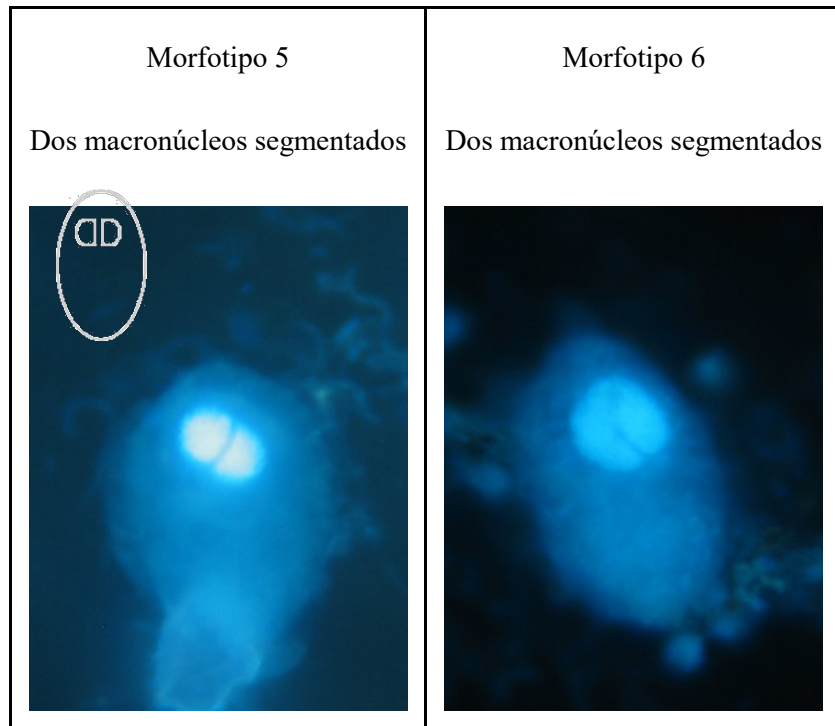


Figura 7. Morfotipos presentes en cultivos en fase estacionaria. Morfotipos 5 y 6. Presentan distintas delimitaciones de sus segmentos.

Tomando en cuenta que los cultivos se generaron a partir de una sola célula y de lo expuesto anteriormente, se infirió que los morfotipos parecen reflejar fases del ciclo de vida y no una especie. Dada esta evidencia, se propuso el siguiente ciclo de vida (Figura 8).

#### 5.4. CICLO DE VIDA DE LOS ESCUTICOCILIADOS DE LA FAMILIA CYCLIDIIDAE

Este ciclo de vida aplica para la familia Cyclidiidae, ya que los organismos observados comparten las características de esta familia (para mayor información ver el siguiente apartado). Se divide en tres fases principales (Figura 8).

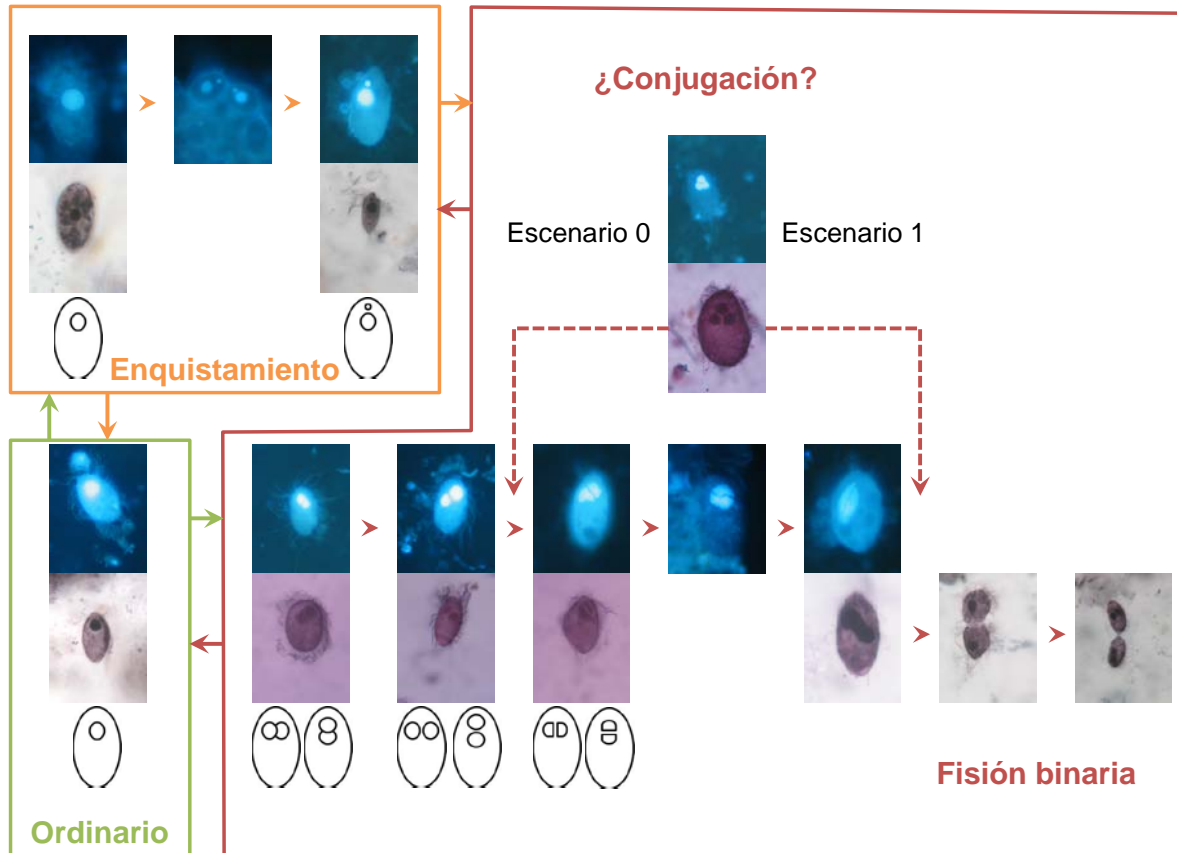


Figura 8. Ciclo de vida propuesto para los escuticociliados de la familia Cyclidiidae del lago de Alchichica.

**ORDINARIO:** Posible trofante (morfofoto 2), con un solo macronúcleo. Puede formar quistes o dividirse por fisión binaria.

**ENQUISTAMIENTO:** El posible trofante (morfofoto 2) permanece con un solo macronúcleo, pero aumenta el número de vacuolas en la célula (fotos del lado izquierdo en el recuadro naranja).

Posteriormente se forman quistes, con un tamaño similar al del trofante (morfofoto 2) y con una pared gruesa (observada mediante DAPI y QPS) y granulada (QPS). Sus núcleos se orientaron generalmente hacia el polo anterior. En raras ocasiones cerca del centro del organismo. Esta misma

conformación de los núcleos se presentó en los escuticociliados (morfortipo 1) resultantes de los quistes.

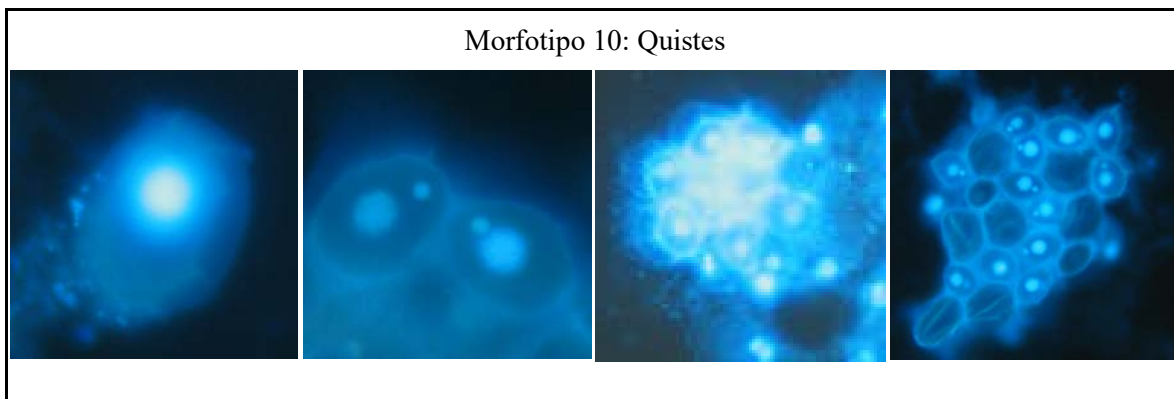


Figura 9. Formas quísticas de los escuticociliados (Cyclidiidae) en los cultivos clonales provenientes del lago Alchichica. Marcaje con DAPI.

**FISIÓN BINARIA:** El posible trofante (morfortipo 2) desarrolla dos macronúcleos solapados (morfortipo 4), los que se separarán (morfortipo 3) y segmentarán (morfortipos 5 y 6) y se prepararán para dividirse, alargándose y duplicándose para dar lugar a un posible tomonte que generará un proter y un opisto.

**MORFOTIPO 9:** Se encontraron organismos con tres o cuatro macronúcleos (morfortipo 9), posiblemente en alguna fase de la conjugación o de la fisión. Se sugieren los siguientes escenarios:

- Escenario 0: El escuticociliado con dos macronúcleos definidos (morfortipo 3) pasa a tener tres (morfortipo 9) o cuatro (en algunas observaciones), los cuales dan lugar a dos macronúcleos más grandes pero segmentados y alargados (morfortipos 5 y 6). En este escenario la célula no cambia de tamaño y concuerda con el proceso de conjugación.
- Escenario 1: El escuticociliado pasa de tener dos macronúcleos grandes y alargados (morfortipo 7) a tener tres (morfortipo 9) o cuatro (en algunas observaciones), que al dividirse pasarán dos a cada nueva célula hija (morfortipo 8). En este escenario la célula aumenta de tamaño y concuerda con el proceso de la fisión binaria. Este es el escenario más probable.

Los cultivos clonales de escuticociliados también se procesaron mediante la impregnación QPS y el marcaje con Taxol para la identificación taxonómica morfológica. En el siguiente apartado se trata a detalle este tema.



## 5.5. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Para la realización de este apartado se utilizaron las fotografías y observaciones realizadas a partir de los tres protocolos para la caracterización morfológica (DAPI, QPS y Taxol) en combinación con todos los tipos de cultivos usados (cultivos de escuticociliados para la curva de crecimiento, cultivos de ciliados diversos, cultivos de escuticociliados y cultivos clonales de escuticociliados). Se siguió la clasificación de Lynn (2008).

Los ciliados estudiados corresponden satisfactoriamente con los siguientes niveles taxonómicos. Las casillas vacías representan aquellas características que no se observaron en el presente trabajo.

Clase Oligohymenophorea Puytorac, P. de, Batisse, A., Bohatier, J., Corliss, J. O., Deroux, G., Didier, P., Dragesco, J., Fryd-Versavel, G., Grain, J., Grolière, C. A., Hovasse, R., Iftode, F., Laval, M., Roque, M., Savoie, A. y Tuffrau, M. 1974.

- Aparato oral con una distintiva membrana paroral derecha de dicinétidas (p. ej. esticodiadas) y típicamente tres policinétidas orales izquierdas.

Subclase Scuticociliatia Small, 1967.

- Región oral muy variable en forma y extensión, con la paroral derecha como una fila de dicinétidas dividida en segmentos a, b y c, especialmente conspicuos durante la estomatogénesis y típicamente tres policinétidas orales frecuentemente como membranoides, a la izquierda.
- Estomatogénesis escuticobucocinetal, involucrando la proliferación de cinetosomas al menos del segmento c o escutica o escuticovestigio, posterior o paralelo a los segmentos parorales, a y c.

Orden Pleuronematida Fauré-Fremiet en Corliss, 1956.

- Región oral, frecuentemente expansiva, con una paroral a menudo prominente con cilios largos, formando una cortina o velo cuando el organismo se alimenta.
- Infraciliatura paroral con base en un corto segmento a y un largo segmento b y con un segmento c como una permanente escutica o escuticovestigio.
- Pared “acanalada” conspicua, puede estar en dos campos.
- Estomatogénesis de estructuras opisto orales, derivadas de la paroral del proter y escutica.

Familia Cyclidiidae Ehrenberg, 1838.

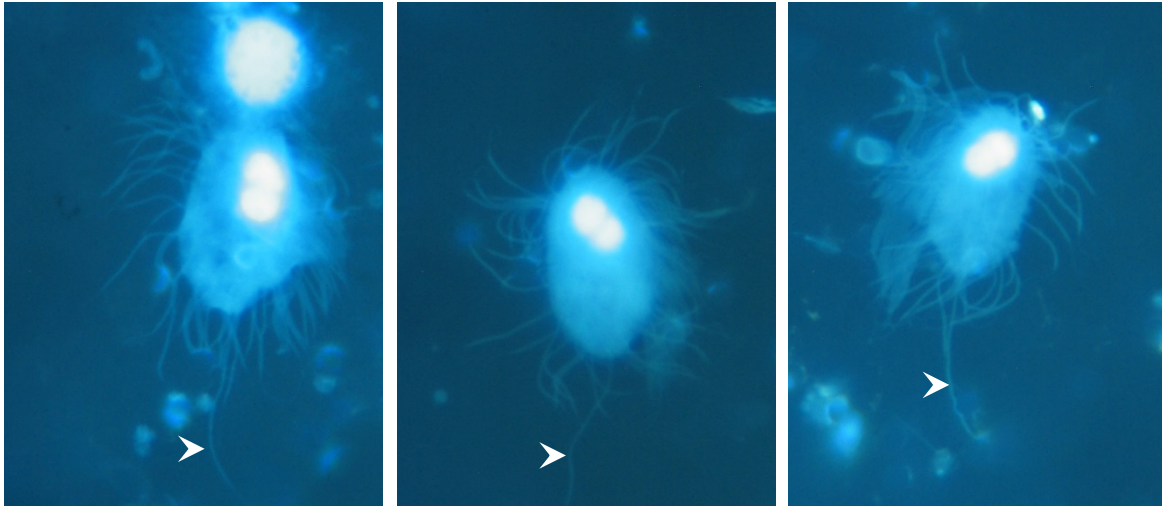


Figura 10. Ciliados miembros de la familia Cyclidiidae. Punta de flecha=cilio caudal. Marcaje con DAPI.

- Ciliatura somática, holotrica, escasa, pero más densa en la mitad anterior del cuerpo en algunos géneros.
- Cilio caudal, de uno a varios, distintivo.
- Dicinétida paroral, frecuentemente inconspicua, típicamente con su curva postcitostomal que no se extiende anterior ni a la izquierda del citostoma.
- De tamaño pequeño a muy pequeño.
- Forma ovoide a ovoide-elongada, frecuentemente con zonas anterior y posterior glabras.
- Libre-nadadores.
- Región oral no prominente, con citostoma variable en posición y ciliatura oral no conspicua.
- Policinétidas orales, frecuentemente fragmentadas.
- Macronúcleo globular a elipsoide.

- Micronúcleo grande, frecuentemente localizado en el tercio anterior del cuerpo.
- Vacuola contráctil presente.
- Citoprocto presente.
- Bacterívoros.
- En hábitats marinos, salobres, de agua dulce y terrestres, ampliamente distribuidos con especies intersticiales, anaeróbicas y coprozóicas.

#### Géneros

- Género *Cristigera*
- Género *Cyclidium*

## 5.6. ESTADÍSTICA

Como parte del estudio de los cultivos para la curva de crecimiento y de los cultivos clonales de escuticociliados, se tomaron fotografías a las preparaciones para medir el largo, ancho y con ello calcular el carbono orgánico de los escuticociliados. Los datos completos de los valores se pueden consultar en la sección de anexos.

A estos datos se les ordenó por clases y se observó que el largo de los escuticociliados presentó una clase menos (9 clases) en comparación al ancho y carbono orgánico (10 clases). También se observó un comportamiento similar de largo y ancho, encontrándose la mayoría de los organismos entre 21  $\mu\text{m}$  y 27  $\mu\text{m}$  de largo, y 15  $\mu\text{m}$  y 22  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 11).

En cuanto al carbono orgánico, la distribución presentó una clase vacía, entre 2,600 y 2,900  $\text{pg c\acute{e}l.}^{-1}$ . Cabe señalar que los valores correspondientes a las dos últimas clases (entre 2,900 y 3,700  $\text{pg c\acute{e}l.}^{-1}$ ) pertenecen al cultivo clonal de escuticociliados 35 m A1 (A1 corresponde al código del pozo de la placa que le dio origen).

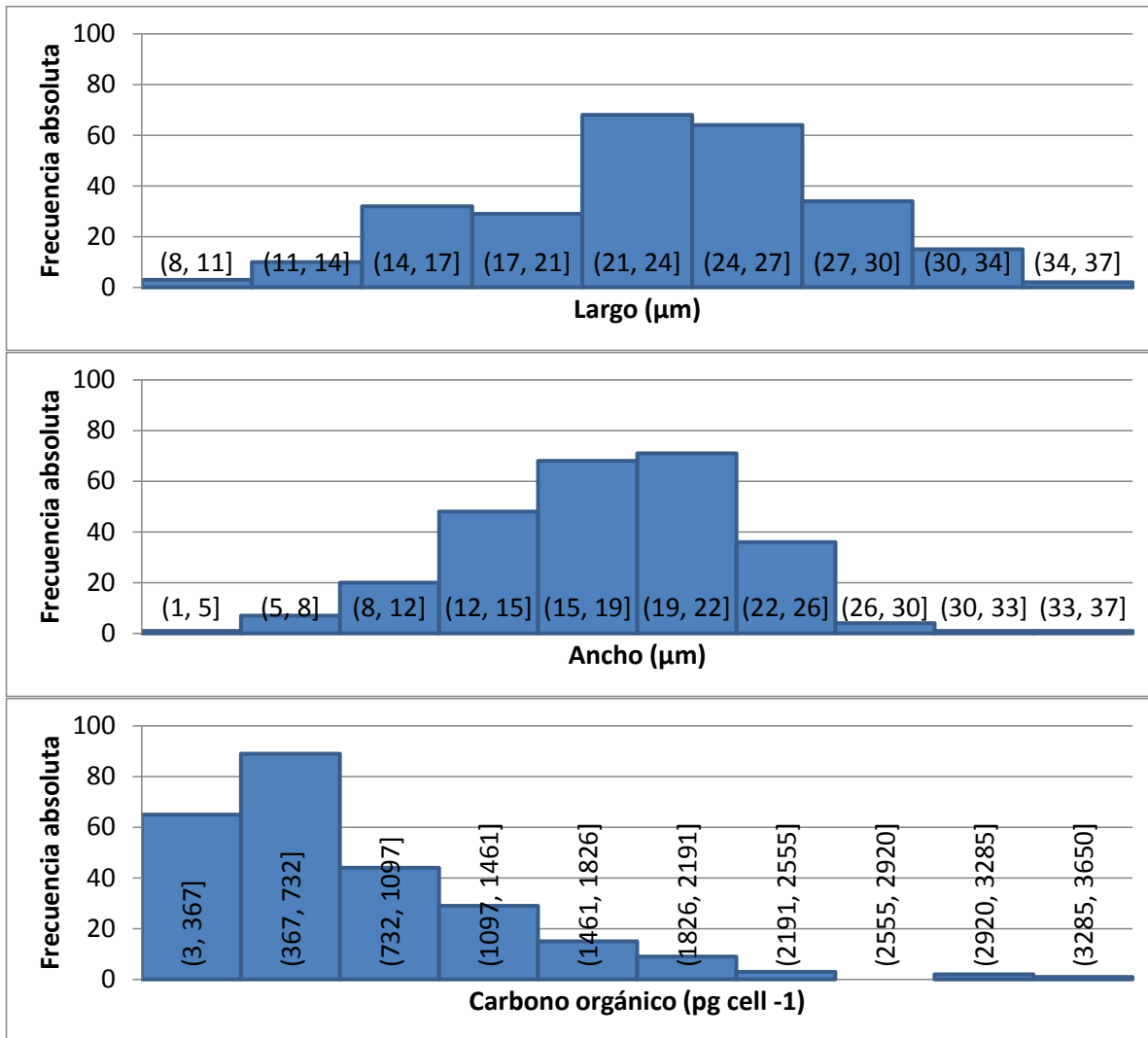


Figura 11. Distribución de largo, ancho y carbono orgánico de los escuticociliados del lago Alchichica.

Los cultivos clonales de escuticociliados presentaron las siguientes posibles agrupaciones en cuanto al tamaño y carbono orgánico de sus miembros (Figura 12). Cabe aclarar que el código de cada cultivo corresponde a la profundidad de la muestra a partir de la que se creó - la primera parte- y al pozo de la placa que le dio origen - la segunda parte-.

- Grupo 1: Cultivo clonal 35 m A1. Este se conformó por células pequeñas, agrupándose en el cuadrante inferior izquierdo de la gráfica de largo contra ancho de las células.
- Grupo 2: Demás cultivos clonales. Fueron heterogéneos, con células tanto pequeñas como grandes.

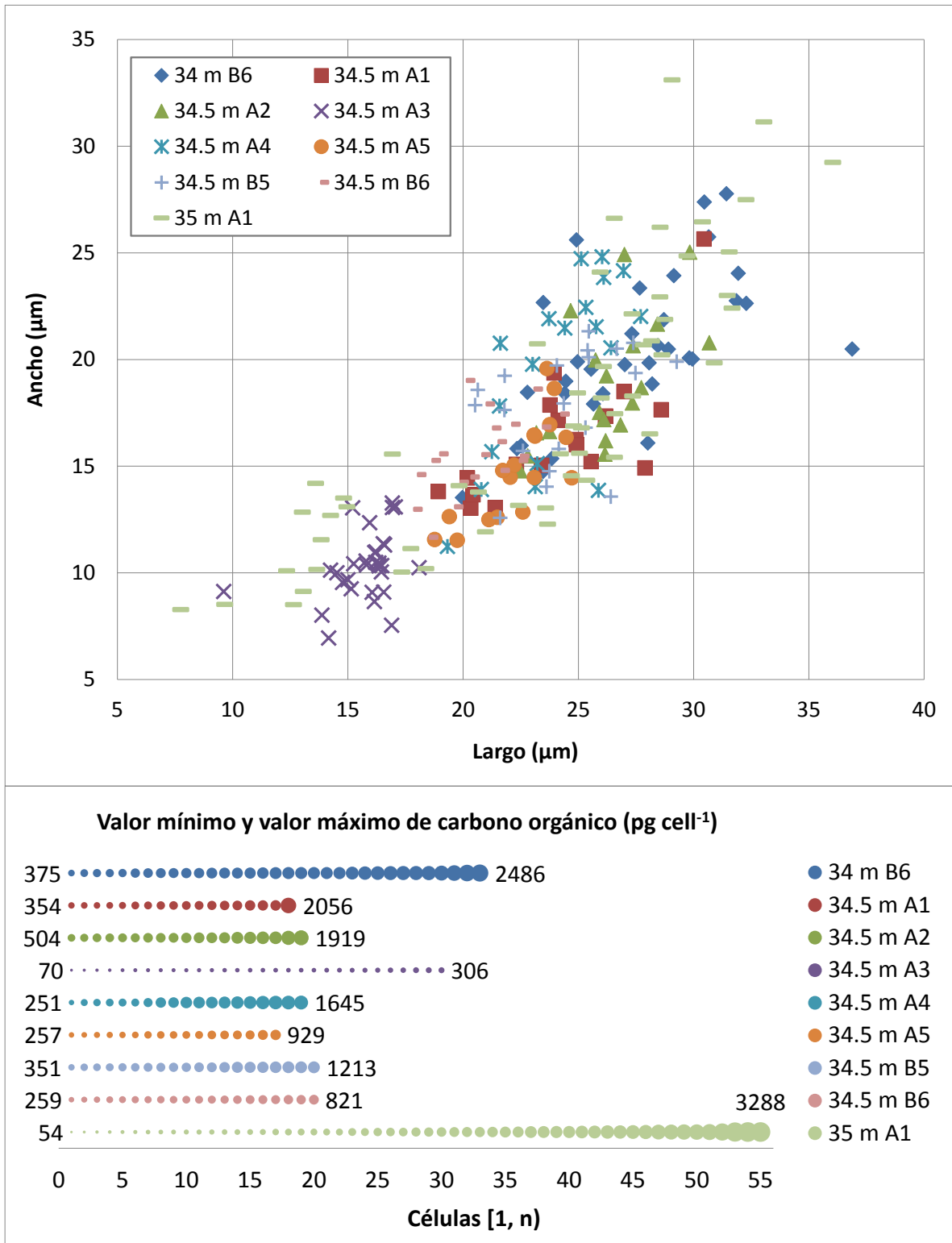


Figura 12. Valores mínimos y máximos de carbono orgánico de distintos cultivos clonales de escuticociliados. Cada círculo representa una célula individual.

## CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

En la presente tesis se investigó la relación entre morfotipos de escuticociliados y su identificación como morfoespecies o como fases ontológicas del Lago Alchichica (tanto en la oxiclina e hipolimnion) durante la estratificación bien establecida y tardía del año 2013. Para esto se conjuntó el estudio de los parámetros ambientales con el de los cultivos de escuticociliados.

Durante los muestreos realizados, el lago Alchichica presentó un patrón monomítico cálido como el observado en lagos tropicales suficientemente profundos (Lewis, 1996). Durante la estratificación estable la oxiclina permaneció acoplada a la termoclina y durante la estratificación tardía se mantuvo por debajo de la termoclina. Este comportamiento coincide con estudios anteriores en este lago (Peštová *et al.*, 2008; Macek *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2009; Bautista-Reyes y Macek, 2012).

Así mismo, durante todos los muestreos de julio a diciembre, el hipolimnion de este cuerpo de agua permaneció anóxico, coincidiendo con estudios anteriores donde se menciona que el oxígeno disuelto declina bruscamente desarrollando concentraciones  $\leq 1 \text{ mg L}^{-1}$  debajo de la termoclina, agotándose en el hipolimnion desde julio hasta principios de diciembre (Alcocer *et al.*, 2000).

Dadas las condiciones anteriormente descritas, cabe mencionar que en los cuerpos de agua con estratificación estacional e hipolimnion anóxico, suelen desarrollarse comunidades microbianas anaerobias compuestas de bacterias, arqueas heterotróficas y protistas, ya que son los únicos organismos fagotróficos capaces de completar sus ciclos de vida bajo condiciones anóxicas. Cabe destacar la importancia de la comunidad de protistas (en especial los ciliados y flagelados bacterívoros) como el factor principal en la utilización de la producción bacteriana ya que en estas zonas no suelen encontrarse metazoos (Fenchel *et al.*, 1990; Zubkov *et al.*, 1992; Fenchel y Finlay, 1995; Guhl *et al.*, 1996; Alcocer *et al.*, 2000). Lo anteriormente descrito coincide con la composición de la comunidad microbiana en el lago Alchichica observada en la presente tesis y en estudios previos (Macek *et al.*, 2008 y 2009; Bautista-Reyes y Macek, 2012).

Dentro de los estratos anóxicos a menudo se presentan fuertes gradientes en las concentraciones de oxígeno y de sulfuro de hidrógeno, como lo registrado en el Mar Negro donde la capa óxica está separada de la anóxica por un estrato en el que el oxígeno decae a  $4.5\text{-}13.5 \mu\text{mol L}^{-1}$  y el sulfuro de hidrógeno se incrementa respectivamente (Vinogradov y Flint, 1987 en Sergeeva *et al.*, 2011). Sin

embargo, en el presente trabajo, a pesar de que las muestras presentaban un olor característico a sulfuro de hidrogeno, no se encontraba en concentraciones importantes de acuerdo con los valores registrados del el potencial redox y el pH (Sergeeva *et al.*, 2011).

En otros ambientes las preferencias de oxígeno de los protistas se relacionan con aquellas de sus presas, como las bacterias incoloras del sulfuro, que se encuentran en la estrecha zona donde el sulfuro se acopla con la presencia de oxígeno (Fenchel *et al.* 1995). Esta característica se observa en diversos sistemas, como el Mar Negro, La Cuenca Cariaco del Mar Caribe, el fiordo Framvaren en Noruega y en el lago Cisó en España, entre otros (Fenchel, 1990; Massana y Pedros-Alió, 1994; Stoeck *et al.* 2011; Sergeeva *et al.*, 2011). Sin embargo, este comportamiento contrasta con el encontrado en el lago Alchichica donde el hipolimnion se encuentra evidentemente en condiciones de anaerobiosis estricta (Macek *et al.*, 2009).

En cuanto a la composición de la comunidad de ciliados en ambientes anóxicos se ha observado que la diversidad es menor que en las zonas óxicas, y que mantiene una estructura similar entre distintos cuerpos de agua, dominando los mismos grupos taxonómicos como escuticociliados, oligotricos y prostomátidos (Dyer *et al.*, 1986; Fenchel *et al.* 1990, 1995; Brek-Latinien *et al.*, 2012).

En el caso de los escuticociliados, estos se presentan frecuentemente cerca del límite entre las condiciones óxicas y anóxicas, generalmente asociados a la disponibilidad de alimento, p. e. j. bacterias y detrito (Finlay *et al.*, 1991; Guhl *et al.*, 1996; Brek-Latinien *et al.*, 2012). Los géneros de escuticociliados comúnmente encontrados en la oxiclina e hipolimnion de los lagos en estratificación están *Cinetochilum* spp., *Cristigera* spp., *Cyclidium* spp. y *Pleuronema* spp., entre otros (Finlay *et al.*, 1991; Guhl *et al.*, 1996). Esta composición coincide con lo observado en el lago Alchichica en esta tesis y en particular en un estudio previo (Sánchez-Medina *et al.*, 2016).

Este comportamiento se ha observado en el lago Alchichica, así como en otros lagos de la cuenca Oriental, de la que forma parte (Macek *et al.*, 1994, 2000, 2008 y 2009; Sánchez-Medina *et al.*, 2016).

Sobre la base de las observaciones anteriores, se enfatiza la importancia de la comprensión del comportamiento y del estado de las variables ambientales para buscar o crear un método adecuado para el cultivo de los escuticociliados, enfatizando en su requisito de bajas concentraciones de oxígeno disuelto, y en el caso de los escuticociliados del lago Alchichica, su requisito por un reducido contenido de materia orgánica (“oligotróficas”) en su medio de cultivo (para mayor detalle ver la sección de anexos, el medio de cultivo de caldo nutritivo). En este estudio se comprobó que el



método más efectivo para el cultivo de estos organismos es el uso combinado del medio de cultivo compuesto de 1 grano de trigo con cáscara, 1 mL de agua destilada, 5 mL de muestra seleccionada y 20 mL de agua del lago Alchichica filtrada por 0.2µm en conjunto con una atmósfera poco oxigenada y reducida (conseguida al extinguirse una vela dentro de un desecador) Trigg (1985) mencionó que esta se encuentra entre el 5% y 10% de oxígeno y entre 2% y 5% de dióxido de carbono.

El uso de esta atmósfera parece ser un requisito para el cultivo de escuticociliados (al menos los provenientes del lago Alchichica), ya que en años anteriores se intentó generar este tipo de cultivos, pero sin éxito, debido a que no se utilizaban tales condiciones de la atmósfera. De la misma manera, este método de cultivo permitió la permanencia de euplótidos a diferencia del otro tratamiento (con poco oxígeno, pero sin estar enriquecido con dióxido de carbono) donde se perdían después de un par de resiembras.

Para ilustrar el hecho de que los cultivos de escuticociliados permanecieron en condiciones óptimas, se menciona que las fases más frecuentes tras el marcaje con DAPI fueron aquellas asociadas a la reproducción (células con tres o más fragmentos de macronúcleo, así como células en bipartición). Otra evidencia de ello son las distintas clases de tamaño que se formaron, lo que indica que los cultivos mantuvieron poblaciones en crecimiento donde siempre hubo células grandes y “viejas” listas para dividirse, así como células pequeñas y “jóvenes” que acababan de completar su división celular (Weisse y Stadler, 2006).

En lo que se refiere al tamaño de los escuticociliados de cultivo, estos se encontraron entre los 21 µm y 27 µm de largo, y 15 µm y 22 µm de ancho. Estas medidas coinciden con escuticociliados tales como *Cristigera setosa*, *Cyclidium citrullus*, *Cyclidium glaucoma* y *Protocyclidium terricola*, entre otros (Foissner *et al.*, 2002; Esteban *et al.*, 2000; Aladro-Lubel *et al.*, 1990; Dragesco y Dragesco-Kernéis, 1986).

Adicionalmente se reconoció un grupo, un cultivo clonal (35 m A1 en Figura 12) caracterizado por células pequeñas en cuanto a su largo, ancho y carbono orgánico, del cual se desconoce su identidad taxonómica a nivel de especie, por lo que se propone realizar investigaciones subsecuentes.

Por otro lado, el método de cultivo permitió la observación directa de las poblaciones de escuticociliados, registrando una diferente motilidad de los cultivos provenientes de distintas profundidades, durante varios días. En el caso de una menor motilidad se sabe que es una respuesta cinética que indica la existencia de condiciones óptimas ya que las células disminuyen su velocidad

de nado o incluso se adhieren a superficies sólidas, acumulándose en un sitio, en este caso cerca del grano de trigo y en la película viscosa que lo recubre una vez en el medio de cultivo (Fenchel, 2012). Hecha la observación anterior, la motilidad característica de los cultivos de cada profundidad no se debe a adaptaciones morfológicas inmediatas (en una generación), sino que es propia de los organismos que componen el cultivo.

De acuerdo con lo anterior y aunado al hecho de que medio metro (36 m y 36.5 m) entre la profundidad de origen de los cultivos es una distancia suficiente para que presenten una curva de crecimiento diferente, se estaría reflejando una composición distinta de especies, cada una con un requerimiento de oxígeno distinto. Estas observaciones coinciden con aquellas realizadas en ecosistemas donde la comunidad de ciliados responde drásticamente a los cambios en la concentración de oxígeno y temperatura, creando un patrón vertical de distribución de especies características (Brek-Latinien *et al.*, 2012).

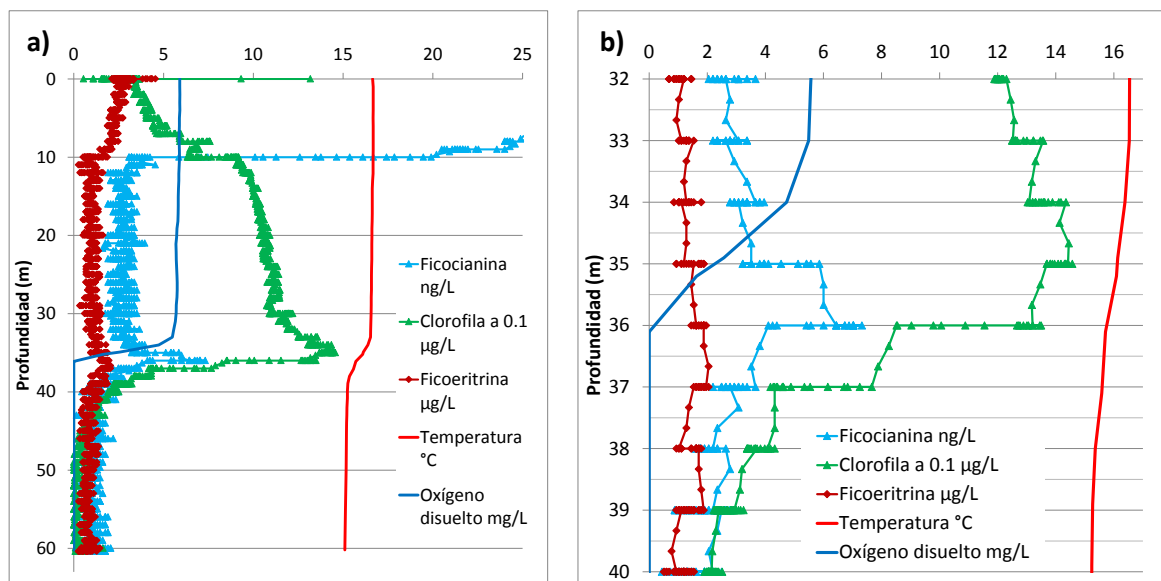


Figura 13. Perfiles fisicoquímicos del muestreo de diciembre de 2013. a) Profundidad total del lago. b) Detalle de los 32 m a los 40 m. Se señala con líneas punteadas los 36 m y 36.5 m.

En cuanto a los distintos morfotipos que compusieron los cultivos de escuticociliados, se encontraron diez y se describieron con base en sus características nucleares. Al momento de intentar identificarlos taxonómicamente a nivel de morfoespecies se llegó a la conclusión de que las diferencias morfológicas de estos corresponden más bien a diferencias ontológicas. Una explicación a este hecho son las complejas interacciones que entre los niveles de flujo génico y de diversidad genética que subyacen en las morfoespecies, encontrándose como ejemplo al escuticociliado

*Cyclidium glaucoma* el cual presenta un alto flujo de genes y gran diversidad genética (Finlay *et al.*, 2006).

Respecto a la identificación por encima del nivel de especie, se encontraron escuticociliados pertenecientes a la familia Cyclidiidae, entre ellos el género *Cristigera* sp. y el género *Cyclidium* sp.

Estos resultados coinciden con las especies encontradas por Fenchel *et al.*, (1990) donde dos especies de *Cyclidium* (*C. flagellatum* y *C. citrullus*) se hallaron abundantemente en la zona subóxica (1 a 2% OD) en dos estuarios, así como un escuticociliado cercano a *Cristigera*. Cabe mencionar que estas especies de *Cyclidium* se han mantenido en condiciones de laboratorio bajo esas mismas concentraciones de OD (Fenchel y Bernard, 1996), mientras que en el presente trabajo se han mantenido con bajos niveles de OD (entre el 5% y 10% de OD; Trigg, 1985).

En el caso del lago Alchichica, se han identificado anteriormente los escuticociliados *Cinetochilum margaritaceum* sobre la termoclina al igual que los escuticociliados afines a *Cristigera* spp., a *Uronema nigricans* cerca de la oxiclina, a *Cyclidium* spp. en el hipolimnion anóxico y a *Isocyclidium globosum* cerca del fondo (Macek *et al.*, 2008; Peštová *et al.*, 2008; Sánchez-Medina *et al.*, 2016).

Dichos patrones se deben probablemente a que *U. nigricans* no puede vivir sin oxígeno (Bernard y Fenchel, 1996) mientras que de *Cyclidium* se conocen algunos anaerobios simbióticos (Esteban *et al.* 1993; Esteban y Finlay 1994). En cuanto a *Cristigera*, se han identificado especies anaeróbicas marinas (Fenchel *et al.*, 1990; Finlay *et al.*, 1991), de agua salobre (Esteban *et al.*, 2000) y de agua dulce (Olmo, 1998; Esteban y Olmo, 1997).

Por otro lado, *Isocyclidium globosum* y *Cyclidium porcatum* se reportaron en un lago kárstico (Esteban *et al.*, 1993; Esteban y Finlay, 1994) cubiertos con procariotas simbióticos al igual como los escuticociliados en el lago Alchichica (Peštová *et al.*, 2008; Bautista Reyes y Macek, 2012). Sin embargo, en este estudio nunca se observaron los escuticociliados arriba mencionados, aunque se sabe que otros miembros de la subclase Scuticociliatia (Small, 1967) también poseen bacterias ectosimbiontes (Zubkov *et al.*, 1992)

Respecto a la relación entre los morfotipos y las fases ontogénicas de los escuticociliados hay que mencionar que gracias a esto se pudo reconstruir un ciclo de vida polimórfico, en este caso para la familia Cyclidiidae, ya que incluye indistintamente tanto al escuticociliado del género *Cyclidium* sp. como al género *Cristigera*.

El polimorfismo es una característica compartida por algunos otros escuticociliados como los pertenecientes a los géneros *Urocryptum*, *Uronema*, *Pseudocohnilembus*, *Miamiensis*, *Glauconema*, *Potomacus* y *Propostoma*, entre otros (Pérez-Uz y Guinea, 2001; Fenchel, 1990; Olendzenski, 1999; Gómez-Saladín y Small 1993; Small *et al.*, 1986; Thompson, 1966; Kuhlmann *et al.*, 1997). Este tipo de elasticidad estructural se considera como una estrategia de resistencia o bien, como un enfoque oportunista del aprovechamiento de recursos (Fenchel, 1990).

En el caso del ciclo de vida polimórfico presentado en esta tesis, se identificaron tres fases principales (trofote, tomonte y quiste) y de una fase cuyo desarrollo es incierto en el que se postulan dos posibles escenarios asociados a distintas formas de reproducción (fisión binaria o conjugación).

La primera de las fases principales (llamada ORDINARIO) concierne al trofote, la cual es una forma madura cuyas funciones son la dispersión, la alimentación y el crecimiento (Lynn, 2008). Dado que no hay ninguna observación que sugiera que estos escuticociliados sean parásitos o parasíticos, el trofote sería del tipo microstomado, alimentándose de bacterias y creciendo hasta doblar su tamaño para convertirse en un tomonte en división, lo que llevaría a la tercera fase principal (FISION BINARIA) (Lynn, 2008). El hecho de que los organismos doblen su tamaño se puede comprobar al observar la distribución por clases del carbono orgánico (Figura 11).

En caso de carencia de alimento o que prevalezca cualquier otra circunstancia ambiental estresante, el escuticociliado puede formar un quiste, lo cual conduce a la tercera fase principal del ciclo de vida (ENQUISTAMIENTO) (Lynn, 2008).

Mediante la observación directa de los cultivos o las tinciones y marcajes, no se registró ninguna evidencia de la existencia de la fase de trofote, la cual es una fase de dispersión de nado rápido (Lynn, 2008).

En la segunda fase principal (ENQUISTAMIENTO) el trofote, que corresponde a la primera fase principal (ORDINARIO), el número de vacuolas aumenta para formar quistes, con un tamaño similar al del trofote. Esta es una fase inactiva e inmóvil, con las funciones de protección y de dispersión y como se mencionó antes, se produce si el alimento es limitado o prevalece cualquier otra circunstancia ambiental estresante (Lynn, 2008), ejemplo de esto es la observación directa realizada en los cultivos “viejos”, de cinco o seis semanas, en donde se encontró a la mayoría de los escuticociliados en este estado, algo adheridos en la pared de su contenedor (botella para cultivo de tejidos).

Los quistes formados son probablemente de protección ya que no se observó más de un macronúcleo y un micronúcleo dentro de este como para sugerir que fuera un quiste reproductivo. Además, el organismo presentó características propias de los quistes de protección, las cuales son forma redondeada, sin boca y rodeado por tres o más capas secretadas o "membranas" (periquiste, ectoquiste, mesoquiste, endoquiste, metaquiste) (Lynn, 2008). En las observaciones se reconoció una "pared gruesa y granulada" la cual puede coincidir con alguna o varias de estas capas. La forma esférica de estos quistes difiere de los de otros escuticociliados como *Urocryptum tortum* que se caracterizan por ser piriformes (Pérez-Uz y Guinea, 2001).

Posteriormente ocurre el desenquistamiento en el que se observó que los escuticociliados resultantes de los quistes presentaron una conformación nuclear similar a estos, con un micronúcleo y un macronúcleo. Cuando en los quistes se puede observar la organización de los organelos, en este caso los núcleos, es porque se encuentran muy cerca de su eclosión (Pérez-Uz y Guinea, 2001). Después de esta fase, se pasa a la primera fase principal (ORDINARIO) donde las células pierden el micronúcleo.

La tercera etapa principal (FISIÓN BINARIA) se desarrolla cuando el trofante (ORDINARIO) se preparará para dividirse, alargándose y duplicándose para dar lugar a un tomonte, el cual es una fase de división, de forma grande y, asimismo, una forma parental, capaz de producir descendencia a partir de la fisión binaria regular, obteniéndose así un proter y un opisto. Estos productos filiales dan lugar a trofantes (ORDINARIO) (Lynn, 2008).

Nunca se ha observado (en este y en estudios previos de este sitio) organismos sin área oral o con una reducción de esta por lo que se descarta la existencia del tomito en este ciclo de vida. En contraste, existen otros escuticociliados que incluyen esta fase en su ciclo polimórfico como *Glauconema bermudense*, *Miamensis avidus* y *Urocryptum tortum* (Small *et al.* 1986; Gómez-Saladín y Small 1993; Pérez-Uz y Guinea, 2001).

La última fase, de la cual se desconoce con precisión su desarrollo corresponde a escuticociliados con tres o cuatro macronúcleos. En esta fase se propusieron dos escenarios probables.

El escenario 0 se encuentra entre el trofante con dos macronúcleos grandes y aquel con dos macronúcleos segmentados y alargados. En esta transición el organismo desarrolla el proceso de conjugación y con ello tres o cuatro núcleos. Este tipo de reproducción se presenta cuando el alimento se ha agotado y un tipo de cruce complementaria está presente (Lynn, 2008). Una

evidencia que hace falta es la observación y registro de los conjugantes o exconjugantes para afirmar con confianza que este proceso ocurre de la manera descrita.

Asimismo, el escenario 1 se ubica después del teronte con dos macronúcleos grandes y alargados, desarrolla tres y luego cuatro macronúcleos, de los cuales dos pasarán a cada nuevo producto filial. En este escenario la célula aumenta de tamaño y entra dentro del proceso de la fisión binaria regular (FISIÓN BINARIA), manteniéndose en los cultivos con alimento suficiente (Lynn, 2008).

En la descripción anterior del ciclo de vida de la familia Cyclidiidae, se presenta evidencia sobre la preferencia de los escuticociliados (anaerobios o microaerobios) por las profundidades a las que se encuentran, ya que es bajo estas condiciones que ellos pueden desarrollar su ciclo de vida por completo. Esto difiere de otros estudios en donde se sugiere que la presencia de escuticociliados en la zona anóxica corresponde a la búsqueda de recursos, alejándose de su hábitat común, ya sea el epilimnion o el sedimento (Fenchel *et al.*, 1990).

En conclusión, en el presente estudio se comprobó que los morfotipos de escuticociliados, observados tanto en marcaje fluorescente con DAPI (morfología de núcleos) como en las impregnaciones de plata (QPS) son en realidad fases del ciclo de vida polimórfico de dos especies de escuticociliados de la familia Cyclidiidae.

Además, se corroboró que el estudio taxonómico de los escuticociliados a nivel de especie requiere del uso de cultivos, de herramientas de identificación tradicionales (tinciones de plata, observaciones en vivo), así como de herramientas propias de la biología molecular.

Finalmente, cabe señalar el estudio del ciclo de vida de la familia Cyclidiidae en el lago Alchichica se puede continuar al investigar con mayor detalle la transición entre cada fase propuesta, en especial al centrarse en su reproducción, ya sea por fisión binaria o por conjugación.

También se insta a investigar otros métodos de identificación morfológica como la estandarización del protocolo con Taxol ya que es muy prometedor debido a su rapidez y sencillez, siendo la composición del agua del lago Alchichica un obstáculo a superar.

A manera de colofón se invita a reflexionar sobre el hecho de que ciertos aspectos ecológicos, como son la diversidad, la composición y el rol que juegan los organismos, son inestables en tanto sea inestable la precisión de la identificación de especies, ya que estas especies taxonómicas pueden estar empatadas con especies ecológicas.

Por otro lado, la importancia y urgencia del estudio de los cuerpos de agua tropicales radica en que el conocimiento que existe de ellos es mucho menor al que existe respecto a los cuerpos de agua templados, debido a que la limnología lleva años estudiándolos desde que surgió como disciplina.

Por último, el estudiar y comprender el funcionamiento interno de los sistemas con bajos niveles de OD durante su estratificación es especialmente importante debido a que las condiciones de hipoxia y anoxia repercuten en la producción de estos, lo que en muchos casos se traduce en pérdidas económicas.

## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

- El método óptimo para generar y mantener cultivos de escuticociliados de vida libre provenientes de la oxiclina e hipolimnion del lago Alchichica, fue el medio de cultivo compuesto de 1 grano de trigo con cáscara, 1 mL de agua destilada, 5 mL de muestra seleccionada y 20 mL de agua del lago Alchichica filtrada por  $0.2\mu\text{m}$  (medio de trigo 2) en combinación con una atmósfera poco oxigenada y enriquecida con dióxido de carbono producida por una vela extinguida dentro de un desecador (método de Trigg, 1985).
- Cada cultivo, proveniente de una distinta profundidad presentó un patrón de crecimiento distinto, siendo los cultivos más desarrollados aquellos obtenidos en el piso del metalimnion (36 m y 36.5 m), justo al decaer el oxígeno disuelto hasta la anoxia, coincidiendo con el segundo máximo de ficocianina (el primero se encontró cerca de los 10 m) y por debajo del valor máximo de clorofila. En ellos se observaron las fases exponencial y estacionaria.
- La mayoría de los escuticociliados medidos (cultivos para la curva de crecimiento y cultivos clonales) se encontraron en el rango de  $21\ \mu\text{m}$  a  $27\ \mu\text{m}$  de largo y  $15\ \mu\text{m}$  a  $22\ \mu\text{m}$  de ancho.
- Entre los cultivos clonales de escuticociliados se reconoció un grupo (cultivo clonal 35 m A1) caracterizado por células pequeñas en cuanto a tamaño y carbono orgánico. Los demás cultivos clonales fueron heterogéneos.
- Los cultivos de escuticociliados de distintas profundidades (misma fecha de muestreo) presentaron una motilidad distinta (mayor o menor movimiento) durante varios días, seguramente asociado a que cada cultivo contaba con distintas adaptaciones ante las mismas condiciones ambientales.
- Se determinaron diez fases en el ciclo de vida de al menos dos especies de escuticociliados, según las características de los núcleos de las células (DAPI).
- Los morfotipos no presentaron diferencias taxonómicas obvias a nivel de especie o de género como para determinar la especie a la que corresponden. Sin embargo, las diferencias morfológicas de los morfotipos correspondieron a diferencias ontológicas.



- Los escuticociliados estudiados corresponden a la familia Cyclidiidae Ehrenberg, 1838, a los géneros *Cristigera* sp. y *Cyclidium* sp.
- Se propuso un ciclo de vida para la familia Cyclidiidae en el lago Alchichica, el cual consta de tres fases principales y una fase de desarrollo incierto (célula con tres o cuatro macronúcleos) con dos posibles escenarios, uno afín al proceso de conjugación y otro afín al proceso de fisión binaria, siendo este el más probable.
- Es posible que el escenario 0 se desencadene por vejez del cultivo, efectuando la conjugación como proceso reproductivo, mientras que el escenario 1, la reproducción por fisión binaria, se mantiene en los cultivos jóvenes.

#### 7.1. CONCLUSIÓN FINAL

- Se comprobó que la mayor parte de los morfotipos de escuticociliados, observados tanto en tinción DAPI (morfología de núcleos, parte de ciliatura) como en las impregnaciones de plata (protargol) son realmente estados de ciclo polimórfico de dos especies.

## 7.2. RECOMENDACIONES

- Los cultivos de escuticociliados son imprescindibles para una identificación exitosa, por lo que la caracterización detallada de su hábitat y su subsecuente simulación para su cultivo se vuelven puntos muy importantes a considerar.
- El estudio taxonómico de los escuticociliados por debajo de nivel de género requiere del uso de cultivos, de herramientas de identificación tradicionales (tinciones de plata, observaciones en vivo), así como de herramientas propias de la biología molecular.
- Hay técnicas de caracterización morfológica novedosas como el uso del Taxol, el cual es muy prometedor para la identificación taxonómica debido a su rapidez y sencillez, siendo el tipo de agua del lago Alchichica una complicación. Asimismo, hay técnicas que son útiles para otros propósitos como lo es el marcaje fluorescente con DAPI con el que se pueden estudiar los ciclos de vida de los escuticociliados.
- El estudio del ciclo de vida de la familia Cyclidiidae en el lago Alchichica se puede continuar al investigar con mayor detalle la transición entre cada fase propuesta, en especial al centrarse en su reproducción, ya sea por fisión binaria o por conjugación.
- Se presentó un grupo entre los cultivos clonales de escuticociliados caracterizado por células pequeñas en cuanto a tamaño y carbono orgánico, del cual se desconoce su identidad taxonómica a nivel de especie, hasta el momento (para mayor detalle ver la sección de resultados).

## BIBLIOGRAFÍA

- Alcocer, J., E. Escobar, A. Lugo, L.M. Lozano y L.A. Oseguera. (2001): Benthos of a seasonally-astatic, saline, soda lake in Mexico, *Hydrobiologia*. 466: 291-297.
- Alcocer, J., A. Lugo, E. Escobar, M.R. Sánchez y G. Vilaclara. (2000): Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 27: 3166-3169.
- Aladro-Lubel, M.A., M.E. Martínez-Murillo y R. Mayén-Estrada. (1990): Manual de ciliados psamófilos marinos y salobres de México. IBUNAM. 174 pp.
- Armenta, M.A., G. Vilaclara, S. De la Cruz-Reyna, S. Ramos, N. Cenicerros, O. Cruz, A. Aguayo y F. Arcega-Cabrera. (2008): Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* 178: 249-258.
- Arredondo, J.L., O. Vera y A.O. Ortiz. (1984): Análisis de componentes principales y cúmulos de datos limnológicos en el lago de Alchichica, Puebla. *Biotica* 9: 23-39.
- Arredondo-Figueroa, J.L., L.E. Borrego, R.M. Castillo y M.A. Valladolid. (1983): Batimetría y morfometría de los lagos "maars" de la Cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biotica*. 8: 37-47.
- Arregui, L., C. Muñoz-Fontela, A. Guinea y S. Serrano. (2003): FLUTAX facilitates visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs. *Eur. J. Protistol.* 39: 169-172.
- Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray, L. Meyer-Reil y F. Thingstad. (1983): The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Bautista-Reyes, F. y M. Macek. (2012): Ciliate food vacuole content and bacterial community composition in the warm-monomictic crater Lake Alchichica (Mexico). *FEMS Microbiol. Ecol.* 79: 85-97.
- Bernard, C. y T. Fenchel. (1996): Some microaerobic ciliates are facultative anaerobes. *Eur. J. Protistol.* 32: 293-297.
- Boenigk, J., M. Ereshefsky, K. Hoef-Emden, J. Mallet y D. Bass. (2012): Concepts in protistology: species definitions and boundaries. *Eur. J. Protistol.* 48: 96-102.
- Brek-Laitinen, G., J.L. Bellido y A. Ojala. (2012): Response of a microbial food web to prolonged seasonal hypoxia in a boreal lake. *Aquat. Biol.* 14: 105-120.
- Callieri, C., M. Coci, G. Corno, M. Macek, B. Modenutti, E. Balseiro y R. Bertoni, R. (2013): Phylogenetic diversity of non-marine picocyanobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85(2):293-301. DOI: 10.1111/1574-6941.12118.
- Camacho, A., J. Erez, A. Chicote, M. Florin, M.M. Squires, C. Lehmann y R. Bachofen. (2001): Microbial microstratification, inorganic carbon photoassimilation and dark carbon fixation at the chemocline of the meromictic Lake Cadagno (Switzerland) and its relevance to the food web. *Aquat. Sci.* 63: 91-106.
- Camacho, A. y E. Vicente. (1998): Carbon photoassimilation by sharply stratified phototrophic communities at the chemocline of Lake Arcas (Spain). *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 11-22.
- Clarke, K.J., B.J. Finlay, G. Esteban, B.E. Guhl y T.M. Embley. (1993): *Cyclidium porcatum* n. sp.: a free-living anaerobic scuticociliate containing a stable complex of hydrogenosomes, eubacteria and archaeobacteria. *Eur. J. Protistol.* 29: 262-270.
- Daniel, W. W. (2007): Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa Wiley. 755 pp.
- Dragesco, J., y A. Dragesco-Kernéis. (1986): Ciliés libres de l'Afrique intertropicale: Introduction à la connaissance et à l'étude des Ciliés. IRD Editions. 559 pp.
- Dyer, B.D., N. Gaju, C. Pedrós-Alió, I. Esteve y R. Guerrero. (1986): Ciliates from a fresh water sulfuretum. *BioSystems.* 19: 127-135.
- Esteban, G.F., y B.J. Finlay. (2003): Cryptic freshwater ciliates in a hypersaline lagoon. *Protist.* 154: 411-418.
- Esteban, G.F., B.J. Finlay, J.L. Olmo y P.A. Tyler. (2000): Ciliated protozoa from a volcanic crater-lake in Victoria, Australia. *J. Nat. Hist.* 34: 159-189.
- Esteban, G.F. y J.L. Olmo. (1997): *Cristigera pleuronemoides* Roux, 1901: a cosmopolitan ciliate that embraces at least three nominal species. *Eur. J. Protistol.* 33: 426-431.
- Esteban, G. y B.J. Finlay. (1994): A new genus of anaerobic scuticociliate with endosymbiotic methanogens and ectobiotic bacteria. *Arch. Protistenkd.* 144: 350-356.
- Esteban, G., B.J. Finlay y T.M. Embley (1993): New species double the diversity of anaerobic ciliates in a Spanish lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 109: 93-100.
- Fan, X., X. Lin, K.A. Al-Rasheid, S.A. Al-Farraj, A. Warren y W. Song. (2011): The diversity of scuticociliates (Protozoa, Ciliophora): a report on eight marine forms found in coastal waters of China, with a description of one new species. *Acta Protozool.* 50: 205-2018.
- Fenchel, T. (2012): Protozoa and oxygen. *Acta Protozool.* 52: 11-20.

- Fenchel, T. y C. Bernard. (1996): Behavioral responses in oxygen gradients of ciliates from microbial mats. *Eur. J. Protistol.* 32: 55-63.
- Fenchel T., C. Bernard, G. Esteban, B.J. Finlay, P.J. Hansen y N. Iversen. (1995): Microbial diversity and activity in a Danish fjord with anoxic deep water. *Ophelia.* 43: 45-100.
- Fenchel, T., y B.J. Finlay. (1991): The biology of free-living anaerobic ciliates. *Eur. J. Protistol.* 26: 201-215.
- Fenchel, T. (1990): Adaptive significance of polymorphic life cycles in Protozoa: responses to starvation and refeeding in two species of marine ciliates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 136: 159-177.
- Fenchel, T. (1987): Ecology of Protozoa: the biology of free-living phagotrophic protists. Springer-Verlag. 197 pp.
- Fenchel, T. (1986): Protozoan filter feeding. *Prog. Protistol.* 1: 65-113.
- Fenchel, T. y B.J. Finlay. (1995): Ecology and Evolution in Anoxic Worlds. Oxford University Press. 294 pp.
- Fenchel, T., L.D. Kristensen y L. Rasmussen. (1990). Water column anoxia: vertical zonation of planktonic protozoa. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 62:1-10.
- Filonov, A., I. Tereshchenko y J. Alcocer. (2006): Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophys. Res. Letters.* 33. L07404.
- Finlay, B.J., G.F. Esteban, S. Brown, T. Fenchel y K. Hoef-Emden. (2006): Multiple cosmopolitan ecotypes within a microbial eukaryote morphospecies. *Protist.* 157: 377-390.
- Finlay, B.J., K.J. Clarke, E. Vicente y M.R. Miracle. (1991): Anaerobic ciliates from a sulphide-rich solution lake in Spain. *Eur. J. Protistol.* 27: 148-159.
- Foissner, W., A. Chao y L.A. Katz. (2008): Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). *Biodivers. Conserv.* 17: 345-363.
- Foissner, W., S. Agatha y H. Berger (2002): Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha region and the Namib Desert. *Denisia.* 1459 pp.
- Foissner, W., H. Berger y J. Schaumburg. (1999): Identification and ecology of limnetic plankton ciliates. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft. 793 pp.
- Ford, E. B. (1965). Genetic polymorphism. MIT Press, Cambridge. 101 pp.
- Gao, F., S. Gao, P. Wang, L.A. Katz y W. Song. (2014): Phylogenetic analyses of cyclidiids (Protista, Ciliophora, Scuticociliatia) based on multiple genes suggest their close relationship with thigmotrichids. *Mol. Phylogenet. Evol.* 75: 219-226.
- Gao, F., L.A. Katz y W. Song. (2013): Multigene-based analyses on evolutionary phylogeny of two controversial ciliate orders: Pleuronematida and Loxocephalida (Protista, Ciliophora, Oligohymenophorea). *Mol. Phylogenet. Evol.* 68: 55-63.
- Gao, F., L.A. Katz y W. Song. (2012): Insights into the phylogenetic and taxonomy of philasterid ciliates (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatia) based on analyses of multiple molecular markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* 64: 308-317.
- García, E. (2004): Modificaciones al sistema Köppen-García (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, UNAM. 90 pp.
- Gasca, D.A. (1981): Algunas notas de la génesis de los lagos cráter de la Cuenca de Oriental. Puebla-Tlaxcala-Veracruz. Colección científica: Prehistoria 98. Instituto Nacional de Antropología e Historia. 55 pp.
- Gifford, D.J. (1991): The Protozoan-Metazoan Trophic Link In Pelagic Ecosystems. *J. Eukaryot. Microbiol.* 38: 81-86.
- Gifford, D.J. (1988): Impact of grazing by microzooplankton in the northwest arm of Halifax Harbour, Nova Scotia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 47: 259-258.
- Gómez-Saladín, E., y E.B. Small. (1993): Oral morphogenesis of the microstome to macrostome transformation in *Miamiensis avidus* strain Ma/2. *J. Eukariot. Microbiol.* 40: 363-370.
- Guhl, B. E., B.J. Finlay y B. Schink. (1996): Comparison of ciliate communities in the anoxic hypolimnia of three lakes: general features and the influence of lake characteristics. *J. Plankton Res.* 18: 335-353.
- INEGI (2011): <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/pue/fisio.cfm?c=444&e=22>
- Jerome, C.A., D.J. Montagnes y F.J.R. Taylor. (1993): The effect of the quantitative protargol stain and Lugol's and Bouin's fixatives on cell size: a more accurate estimate of ciliate species biomass. *J. Eukaryot. Microbiology.* 40: 254-259.
- Kuhlmann, H.W., R. Bräucker y A.G. Schepers. (1997): Phototaxis in *Porpostoma notatum*, a marine scuticociliate with a composed crystalline organelle. *Eur. J. Protistol.* 33: 295-304.
- Laybourn-Parry, J. (1994): Seasonal Successions of Protozooplankton in Fresh-Water Ecosystems of Different Latitudes. *Mar. Microb. Food Webs.* 8: 145-162.
- Laybourn-Parry, J. (1992). Protozoan plankton ecology. Springer. Netherlands. 232 pp.
- Laybourn-Parry, J., J. Olver, A. Rogerson y P.L. Duverge. (1990): The temporal and spatial patterns of protozooplankton abundance in a eutrophic temperate lake. *Hydrobiologia.* 203: 99-110.
- Lee, J.J., E.B. Small, D.H. Lynn y E.C. Bovee. (1985): Some techniques for collecting, cultivating and observing protozoa. En: Lee, J.J., S.H. Hutner y E.C. Bovee. (Eds.) An Illustrated Guide to the Protozoa. Soc. Protozool. Special Publ. Allen Press. 629 pp.
- Lewis Jr, W.M. (1996): Tropical lakes: how latitude makes a difference. *Perspectives in tropical limnology:* 43-64.
- Lewis Jr, W.M. (1983): A revised classification of lakes based on mixing. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 1779-1787.

- Lobban, C.S., L.M. Raymundo y D.J. Montagnes. (2011): *Porpostoma guamensis* n. sp., a philasterine scuticiliate associated with brown-band disease of corals. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58: 103-113.
- Long, H., y R.A. Zufall. (2010): Diverse modes of reproduction in the marine free-living ciliate *Glauconema trihymene*. *BMC Microbiol.* 10: 108.
- Lugo, A. (2000): Variación espacial y temporal de la estructura de la comunidad planctónica del Lago de Alchichica, Puebla, con algunos aspectos de interacciones tróficas. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 98 pp.
- Lynn, D. (2008): *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature*. Springer. 606 pp.
- Macek, M., J. Alcocer, A. Lugo Vázquez, M.E. Martínez-Pérez, L. Peralta-Soriano y G. Vilaclara-Fatjó. (2009): Long term picoplankton dynamics in a warm-monomictic, tropical high altitude lake. *J. Limnol.* 68: 183-192.
- Macek, M., D. Peštová y M.E. Martínez-Pérez. (2008): Seasonal and spatial dynamics of a ciliate assemblage in a warm-monomictic Lake Alchichica (Puebla, Mexico). *Hidrobiológica*. 18: 25-35.
- Macek, M., C. Callieri, K. Šimek y A. Lugo-Vázquez. (2006): Seasonal dynamics, composition and feeding patterns of ciliate assemblages in oligotrophic lakes covering a wide pH range. *Arch. Hydrobiol.* 166: 261-287.
- Macek, M. (2002): Annual and spatial distribution of the ciliates in lakes of the Bohemian Forest. *Silva Gabreta* 8: 95-108.
- Macek, M., A. Lugo y G. Vilaclara. (2000): Pelagic ciliate assemblage of high-altitude lake Atexcac (Puebla, México): Comparison with similar lakes in other regions. En: Munawar, M., S.G. Lawrence, I.F. Munawar y D.F. Malley. (Eds.) *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Backhuys Publishers. 435 pp.
- Macek, M., K. Šimek, J. Pernthaler, V. Vyhánek y R. Psenner. (1996): Growth rates of dominant planktonic ciliates in two freshwater bodies of different trophic degree. *J. Plankton Res.* 18: 463-481.
- Macek, M., G. Vilaclara y A. Lugo. (1994): Changes in protozoan assemblage structure and activity in a stratified tropical lake. *Mar. Microb. Food Webs.* 8: 235-249.
- Mansano, A.S., K.F. Hisatugo, M.A. Leite, A.P. Luzia y M.H. Regali-Seleghim. (2013): Seasonal variation of the protozooplanktonic community in a tropical oligotrophic environment (Ilha Solteira reservoir, Brazil). *Braz. J. Biol.* 73: 321-330.
- Martínez-Pérez, M.E., M. Macek y M.T. Castro-Galván. (2004): *In situ* measured elimination of *Vibrio cholerae* from brackish water. *Trop. Med. Int. Health.* 9: 1-8.
- Massana, R. y C. Pedrós-Alió. (1994): Role of anaerobic ciliates in planktonic food webs: abundance, feeding, and impact on bacteria in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1325-1334.
- Montagnes, D.J.S., A.B. Barbosa, J. Boenigk, K. Davidson, K. Jürgens, M. Macek, J.D. Parry, E.C. Roberts y K. Šimek. (2008): Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study. *Aquat. Microb. Ecol.* 53: 83-98.
- Montagnes, D.J.S. y D.H. Lynn. (1993): A quantitative protargol stain (QPS) for ciliates and other protists. En: Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr y J. Cole (Eds.) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. 777 pp.
- Montagnes, D.J.S. y D.H. Lynn. (1987): A quantitative protargol staining (QPS) for ciliates: method description and test of its quantitative nature. *Mar. Microb. Food Webs.* 2: 83-93.
- Olendzenski, L.C. (1999): Growth, fine structure and cyst formation of a microbial mat ciliate: *Pseudocohnilembus pusillus* (Ciliophora, Scuticociliatida). *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 132-141.
- Olmo-Rísquez, J.L. (1998): Diversidad local y global de los protozoos ciliados de hábitats de agua dulce. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 108 pp.
- Oliva, M.G., A. Lugo, J. Alcocer, L. Peralta y L.A. Oseguera. (2009): Planktonic bloom-forming *Nodularia* in the saline Lake Alchichica, Mexico. *Natural Resources and Environmental Issues.* 15: 22.
- Oliva, M.G., A. Lugo, J. Alcocer, L. Peralta y M.R. Sánchez. (2001): Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia.* 466: 299-306.
- Pan, X., C. Shao, H. Ma, X. Fan, K.A. Al-Rasheid, S.A. Al-Farraj y X. Hu. (2011): Redescriptions of two marine scuticociliates from China, with notes on stomatogenesis in *Parauronema longum* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Acta Protozool.* 50: 301.
- Patterson, D.J., K. Nygaard, G. Steinberg y C.M. Turley. (1993): Heterotrophic flagellates and other protists associated with oceanic detritus throughout the water column in the mid North Atlantic. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 73: 67-95.
- Pérez-Uz, B. y Guinea, A. (2001): Morphology and infraciliature of a marine Scuticociliate with a polymorphic life cycle: *Urocryptum tortum* n. gen., n. comb. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48: 338-347.
- Peštová, D., M. Macek y M.E. Martínez-Pérez. (2008): Ciliates and their picophytoplankton - feeding activity in a high altitude warm-monomictic saline lake. *Eur. J. Protistol.* 44: 13-25.
- Porter, K. G. y Y.S. Feig. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- Posch, T., M. Löferer-Kroßbacher, G. Gao, A. Alfreider, J. Pernthaler y R. Psenner. (2001): Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. *Aquat. Microb. Ecol.* 25: 55-63.

- Sánchez-Medina, X., M. Macek, F. Bautista-Reyes, A. Perz, P. Bonilla-Lemus y M. Chávez-Arteaga (2016): Inter-annual ciliate distribution variation within the late stratification oxycline in a monomictic lake, Lake Alchichica (Mexico). *J. Limnol. Spec. Iss. (Proc. VI Congr. Nac. Limnol., México 2014) JL-AMLAC* 13.
- Sánchez-Medina, X. (2013): Análisis de la composición de los ciliados en la interfase termoclina y/o oxiclina en lagos cráter de la Cuenca Oriental, Puebla. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 67 p.
- Sergeeva, N.G., A.J. Gooday, S.A. Mazlumyan, E.A. Kolesnikova, A. Lichtschlag, T.N. Kosheleva y O.V. Anikeeva. (2011): Meiobenthos of the oxic/anoxic interface in the Southwestern region of the Black Sea: abundance and taxonomic composition. En: Altenbach, A., J.M. Bernhard y J. Seckbach (Eds.) *Anoxia: evidence for eukaryote survival and paleontological strategies*. Springer Publishing Company. 648 pp.
- Serrano, S., L. Arregui, B. Pérez-Uz, P. Calvo y A. Guinea. (2008): Guidelines for the Identification of ciliates in wastewater treatment plants. IWA Publishing. 122 pp.
- Sherr, E.B. y B.F. Sherr. (1993): Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. En: Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr y J. Cole (Eds.) *Current of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. CRC Press. 800 pp.
- Sherr, E.B. y B.F. Sherr. (1988): Role of microbes in pelagic foods webs: a revised concept. *Limnol. Oceanogr.* 33: 1225-1227.
- Sherr, E.B. y B.F. Sherr. (1987): High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates. *Nature*. 325: 710-711.
- Sherr, B.F., E.B. Sherr y F. Rassoulzadegan. (1988): Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: temperature dependence. *App. Environ. Microb.*, 54(5), 1091-1095.
- Šimek, K., J. Bobková, M. Macek y J. Nedoma. (1995): Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: A study at the species and community level. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1077-1090.
- Skibbe, O. (1994): An improved quantitative protargol stain for ciliates and other planktonic protists. *Arch. Hydrobiol.* 130: 339-347.
- Small, E.B., J.O.H.N. Heisler, J. Sniezek y T.M. Iliffe. (1986): *Glauconema bermudense* n. sp. (Scuticociliatida, Oligohymenophorea), a troglotic ciliophoran from Bermudian marine caves. *Stygologia*. 2: 167-179.
- Stoeck, T. y A. Behnke. (2011): The Anoxic Framvaren Fjord as a Model System to Study Protistan Diversity and Evolution. En: Altenbach, A., J.M. Bernhard y J. Seckbach (Eds.) *Anoxia: evidence for eukaryote survival and paleontological strategies*. Springer Publishing Company. 648 pp.
- Tiffany, M. A., B.K. Swan, G.F. Gebler, J.C. Cole, M.R. González, K.M. Reifel, J.M. Watts, E.B. Small y S.H. Hurlbert. (2007): Ciliate plankton dynamics and survey of ciliate diversity in the Salton Sea, California, 1997-1999. *Lake Reservoir Manag.* 23: 606-619.
- Thompson Jr, J.C. (1966): *Potomacus pottsi* ng, n. sp., a hymenostome ciliate from the Potomac River. *J. Protozool.* 13: 459-462.
- Trigg, P.I. (1985): Recent advances in malaria parasite cultivation and their application to studies on host-parasite relationships: a review. *B. World Health Organ.* 63: 387-398.
- U.S. Geological Survey. (2008): <http://volcanoes.usgs.gov/images/pglossary/maar.php>
- Valiela, I. (1991): Ecology of water columns. En: Barnes, S.R. y K.H. Mann (Eds.) *Fundamentals of Aquatic Ecology*. John Wiley & Sons. 280 pp.
- Vilaclara G., M. Chávez, A. Lugo, H. González y M. Gaytán. (1993): Comparative description of crater-lakes Basic chemistry in Puebla State, Mexico. *Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 25: 435-440.
- Weisse, T. y P. Stadler. (2006): Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution. *Limnol. Oceanogr.* 51: 1708-1715.
- Zhang, Q., M. Miao, M.C. Strüder-Kypke, K.A. Al-Rasheid, S.A. Al-Farraj y W. Song. (2011): Molecular evolution of *Cinetochilum* and *Sathrophilus* (Protozoa, Ciliophora, Oligohymenophorea), two genera of ciliates with morphological affinities to scuticociliates. *Zool. Scr.* 40: 317-325.
- Zubkov, M.V., A.F. Sazhin y M.V. Flint. (1992): The microplankton organisms at the oxic-anoxic interface in the pelagial of the Black Sea. *FEMS Microbiol. Lett.* 101: 245-250.

## ANEXOS

### REGLA DE STURGES (Daniel, 2007)

#### Introducción

Para agrupar un conjunto de observaciones se debe seleccionar un conjunto de intervalos contiguos que no se traslapen, para que cada valor en el conjunto de observaciones pueda ser puesto en uno y solo uno de los intervalos. Estos intervalos normalmente se identifican como intervalos de clase.

Una de las primeras consideraciones cuando se agrupan datos es la de determinar cuantos intervalos se deben incluir. Resulta inadecuado incluir pocos intervalos, porque se perdería información. Por otro lado, si se utilizan muchos intervalos, el objetivo de resumir no se consigue.

La mejor guía en este caso, así como para la toma de otras decisiones sobre la agrupación de datos, es el conocimiento de los datos. Puede ser que los intervalos de clase queden determinados por los precedentes, como en el caso de las tabulaciones anuales, en las que los intervalos de clase de los años anteriores se conservan para propósitos comparativos.

Una regla empírica que habitualmente se sigue establece que deben ser entre 6 y 15 intervalos. Si hay menos de seis intervalos, los datos se han resumido en exceso y la información que contienen se habrá perdido. Si hay más de 15 intervalos, los datos no fueron resumidos lo suficiente.

#### Regla de Sturges

Quienes deseen guías más específicas para decidir cuantos intervalos de clase son necesarios, pueden utilizar la fórmula propuesta por Sturges.

Esta fórmula se enuncia  $k = 1 + 3.322 (\log_{10} n)$ , donde  $k$  es el número de intervalos de clase y  $n$  es el número de valores en el conjunto de datos en observación.

La respuesta que se obtiene con la regla de Sturges no es definitiva, sino que se debe considerar únicamente como guía. El número de intervalos de clase especificado para esta regla deberá incrementarse o disminuirse por conveniencia y para lograr una presentación más clara.

## Ejemplo

Suponga que una muestra tiene 275 observaciones para agrupar. El logaritmo base 10 de 275 es 2.4393. Con la aplicación de la fórmula de Sturges se obtiene  $k = 1 + 3.322(2.4393) \dots 9$ .

En la práctica, otras consideraciones pueden sugerir el uso de 8 o menos, o quizá 10 o más intervalos de clase.

Otra pregunta que se debe responder se refiere a la amplitud del intervalo de clase. Los intervalos de clase generalmente deben ser de la misma amplitud, aunque algunas veces esto es imposible.

La amplitud se determina dividiendo el rango entre  $k$ , que es el número de intervalos de clase.

Simbólicamente, la amplitud de los intervalos de clase está dada por:  $R/w$  (2.3.1)  $k$  donde  $R$  (el rango) es la diferencia entre la observación más pequeña y la más grande dentro del conjunto de datos. Por lo general, con este procedimiento se obtiene una amplitud que no es conveniente usar, y de nuevo se debe utilizar el sentido común para elegir la amplitud (normalmente cercana a la que se obtiene con la ecuación 2.3.1) que sea más conveniente.

## NOTAS SOBRE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Como se mencionó en las conclusiones de este trabajo, el conjunto del medio de trigo 2 con el tratamiento 2 fue el método óptimo para el tipo de metodología aquí usada. Sin embargo, en caso de que se desee acortar este tiempo y obtener un crecimiento más rápido (en una semana), se recomienda usar el medio de caldo nutritivo con una concentración menor a 7:5, con la precaución de que el máximo número de células se mantiene sólo durante un día.

Al preparar medios de cultivo basados en trigo, usando agua del lago Alchichica, se deben hervir los granos de trigo en agua destilada y posteriormente adicionar el agua del lago filtrada por 0.2 $\mu$ m. Esto para evitar que precipite el agua de dicho lago al hervirla (su composición favorece estas reacciones). Además, tras realizar el medio nunca se deben desechar los granos de trigo utilizados, incluso si el medio está enriquecido con bacterias. Esto debido a que los escuticociliados requieren continuamente de las vitaminas que posee el trigo.



Tabla 8. Detalles sobre los medios de cultivo utilizados durante el estudio.

Nombre	Componentes	Método	Tipo de envase
Medio de trigo 1	1 grano de trigo con cáscara 1 mL de agua destilada 2 mL de muestra 27 mL de agua del lago Alchichica filtrada por 0.2 $\mu$ m	Se calentó durante 2 minutos en microondas el grano de trigo en el agua destilada. Se esperó a que se enfriara y se le agregó la muestra y se aforó con agua del lago	Botellas de cultivo de tejidos de 30 mL
Medio de trigo 2	1 grano de trigo con cáscara 1 mL de agua destilada 5 mL de muestra seleccionada 20 mL de agua del lago Alchichica filtrada por 0.2 $\mu$ m	Se calentó durante 2 minutos en microondas el grano de trigo en el agua destilada. Se le agregó el agua del lago y se aforó con la muestra.	Botellas de cultivo de tejidos de 30 mL
Caldo nutritivo 1	Caldo nutritivo 10 % Agua de la muestra seleccionada	Caldo nutritivo: Muestra. Proporciones probadas: 11:1, 9:3, 7:5, 5:7, 3:9 y 1:11.	Tubos de ensaye con tapa de rosca
Caldo nutritivo 2	3 mL de caldo nutritivo 10% 1 mL de muestra seleccionada 8 mL de agua del lago Alchichica filtrada por 0.2 $\mu$ m	Se mezcló el caldo nutritivo con el de agua del lago y el agua de la muestra.	Tubos de ensaye con tapa de rosca
Medio para dilución 1	1 grano de trigo con cáscara 1 mL de agua destilada 24 mL de agua del lago Alchichica filtrada por 0.2 $\mu$ m	Se calentó durante 2 minutos en microondas el grano de trigo en el agua destilada y se le agregó el agua del lago. El grano se desechó.	Placa con pozos para cultivo de tejidos
Medio para dilución 2	1 grano de trigo con cáscara 1 mL de agua destilada 24 mL de agua del lago Alchichica filtrada por 0.2 $\mu$ m	Se calentó durante 2 minutos en microondas el grano de trigo en el agua destilada y se le agregó el agua del lago.	Placa con pozos para cultivo de tejidos
Medio para dilución 3	Cultivos en fase estacionaria filtrados por 2 $\mu$ m	Filtrar los cultivos en fase estacionaria para mantener únicamente las bacterias.	Placa con pozos para cultivo de tejidos
Para curva de crecimiento	1 grano de trigo con cáscara 140 mL de muestra fresca	En la muestra fresca se colocó el grano de trigo.	Botellas de PET de 140 mL

Para obtener cultivos de ciliados mixtos se probó el medio de cultivo de caldo nutritivo 1 y 2, el medio de trigo 1 y 2 que permitieron la vida de los cultivos hasta por 4 semanas y mantuvieron la población en fase estacionaria desde la 3ª semana. También se probaron tres medios de cultivo para el método de dilución.

- Medio de caldo nutritivo 1: Resultó ser un medio de cultivo viable para los escuticociliados, en proporciones bajas de caldo nutritivo (menores a 7:5).
- Medio de caldo nutritivo 2: Los cultivos resultantes presentaron escasos escuticociliados o sin estos, debido a que el crecimiento de los cultivos fue rápido (1 semana), permaneciendo un número adecuado para los protocolos de identificación morfológica durante muy poco tiempo (un día).
- Medio de trigo 1: Permitió determinar que a partir de los 8 días los cultivos presentaron una población suficiente para utilizar el método de DAPI y que el día 17 alcanzaron su máximo crecimiento. También se pudo mantener los cultivos hasta por 25 días y mostró ser adecuado para resiembras. Además, se observó una motilidad distinta entre los organismos provenientes de distintas profundidades (misma fecha de muestreo y misma edad de cultivo). Este comportamiento se mantuvo durante varios días.
- Medio de trigo 2: En combinación con el tratamiento 2 resultó ser un medio de cultivo más útil que el medio de trigo 1 para realizar resiembras de cultivos de escuticociliados.
- Medio para dilución 1: Fue un medio de cultivo inadecuado para el aislamiento de escuticociliados. En este medio el grano de trigo se desechó.
- Medio para dilución 2: Fue un medio de cultivo útil para el aislamiento, proliferación y mantenimiento de los cultivos de escuticociliados. En este medio el grano de trigo se conservó en el medio.
- Medio para dilución 3: Fue un medio de cultivo inadecuado para el aislamiento de escuticociliados. En este medio se filtraron cultivos previos (en fase estacionaria) para mantener únicamente las bacterias.

## TÉCNICAS DE IMPREGNACIÓN Y MARCAJE FLUORESCENTE

### DAPI

Para el conteo rápido de las poblaciones se empleó el marcador fluorescente DAPI (Porter y Feig, 1980). La tinción DAPI (4',6 -diamidino-2-fenilindol) se realizó sobre membranas de policarbonato con un diámetro de poro de 2  $\mu\text{m}$ , previamente teñidas con negro de clorazol (Sigma-Aldrich) para reducir la fluorescencia de la mismas. Se concentró la muestra fijada con formaldehído al 2% y se le agregó DAPI en una concentración de 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Porter y Feig, 1980).

### TINCIÓN CUANTITATIVA DE PROTARGOL (QPS)

Para el conteo e identificación de los ciliados se utilizó la tinción cuantitativa de protargol sobre membrana (conocida como QPS; Montagnes y Lynn, 1987, 1993). Se realizó sobre membranas de ésteres de celulosa marca Millipore (Irlanda) con un diámetro de poro de 1.2  $\mu\text{m}$  o 3  $\mu\text{m}$ . La muestra se fijó con la solución de Bouin concentrada, adicionada al 7% (Sherr y Sherr, 1993), siguiendo el método modificado de Montagnes y Lynn (1987, 1993) y Skibbe (1994). Se utilizó el proteinato de plata – protargol (Fluka, hecho en Francia) para impregnar la muestra.

#### Protocolo:

1. Las muestras se filtran sobre la membrana de ésteres de celulosa (1.2 a 3  $\mu\text{m}$ ) con baja presión, se lavan (1 min) con agua poco mineralizada (en el valle de México utilizamos agua marca e-pura ®).
2. Las membranas se colocan sobre un portaobjetos precalentado a  $\sim 55^{\circ}\text{C}$  y se les coloca encima un cubreobjetos con una gota de agar al 2.5 % caliente; se dejan calentar por  $\sim 2$  min.
3. Se deja solidificar el agar (enfriar), se remueve el cubreobjetos deslizándolo y se levanta la membrana; se lavan en agua.
4. Las membranas se fijan en formaldehído al 10 % durante 5 min; se lavan con agua.
5. Se sumergen en la solución de  $\text{KMnO}_4$  0.5% durante 5 min. aproximadamente (según resultados previos para la especie y/o la muestra); se lavan con agua destilada.

6. Las membranas se sumergen en ácido oxálico 2.5% durante el mismo tiempo que en la solución de  $\text{KMnO}_4$  0.5%, hasta que blanquean.
7. Se lavan bien primero con agua destilada y con agua e-pura ®.
8. Se colocan en una caja Petri con piezas de cobre (limpiadas previamente) en baño María, y se espolvorea Protargol (Proteinato de plata) sobre el agua (aprox. A 0.5 a 2 %), a 65°C durante ~40 min más 20 min enfriándose. El baño María puede remplazarse por el uso de un horno de microondas con un termostato.
9. Las membranas se revelan con hidroquinona 1% en la solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  al 5% (combinar una solución fresca con una previamente usada).
10. El tiempo de la impregnación se corrige según los resultados de la observación en el microscopio.
11. Se hace un lavado de las membranas en tres ocasiones, siendo el último de 6 s en agua destilada.
12. Una a una se sumergen las membranas en cloruro de oro al 0.5% durante un corto tiempo (12 s aproximadamente). En el caso de sobreteñir el fondo (dependiendo de la calidad/grosor de agar-agar) se aumentará el tiempo de lavado.
13. Se introducen en ácido oxálico 2% (se deja el mismo tiempo que en el paso anterior), las membranas se lavan con agua.
14. Las membranas se estabilizan en  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  al 5%.
15. Se deshidratan en una serie de alcohol (etanol 70%, etanol 96%, etanol 96%, fenol-xilol (2:3), xilol.
16. Se montan con bálsamo Canadá (neutro) entre un portaobjetos y cubreobjetos.

## TAXOL

Para la identificación taxonómica se utilizó Flutax, que es un derivado fluorescente del Taxol (Paclitaxel) que se une específicamente a los microtúbulos y dada la importancia de estas estructuras para la taxonomía de ciliados esta metodología resulta muy valiosa por su simplicidad y rápidos resultados (Serrano *et al.* 2008).

Además, puede usarse como tinción “*in vivo*” ya que no siempre requiere de fijación o permeabilización, aunque esto último suele dar mejores resultados en ciliados como los hipotricos, difíciles de teñir con las tinciones tradicionales de plata debido a su fragilidad (Serrano *et al.* 2008).

Protocolo (Serrano *et al.* 2008):

1. Concentración e incubación de ciliados en una solución de 1  $\mu$ M de Flutax por 10 minutos.
2. Colocarles en Citifluor (medio de montaje) y observar inmediatamente en un microscopio de fluorescencia.

## TABLAS

Tabla 9. Fechas y profundidades de los muestreos.

<b>Fecha</b>	<b>Profundidades muestreadas y cultivadas (m)</b>	<b>Total de muestras</b>
25/7/2012	17, 24, 25, 27, 28, 29	6
24/7/2013	24, 26, 27, 28	4
21/8/2013	21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33	13
16/10/2013	23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32	9
13/11/2013	28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37	10
12/12/2013	34, 34.5, 35, 35.5, 36, 36.5, 37, 37.5, 38, 38.5	10

Tabla 10. Sets de filtros de fluorescencia Leica equipados en el microscopio.

<b>Cubo de filtro</b>	<b>Rango de excitación</b>	<b>Filtro de excitación</b>	<b>Espejo dicromático</b>	<b>Filtro de supresión</b>
A	UV	340-380	400	425
Y3	Azul	545/30	565	610/75
B/G/R	UV	420/30	415	465/20
B/G/R	UV	495/15	510	530/30
B/G/R	UV	570/20	590	640/40

Tabla 11. Datos de largo, ancho y carbono orgánico de los escuticociliados de cultivo.

	Profundidad	Largo	Ancho	Carbono orgánico	Clave del cultivo		
	m	μm	μm	pg cél. <sup>-1</sup>			
Cultivos para curva de crecimiento	34.0	20.8	14.4	442.6			
	34.0	19.6	12.4	309.6			
	34.0	23.1	14.7	512.7			
	34.0	24.5	15.5	606.9			
	34.0	23.6	15.1	550.6			
	34.0	20.3	14.1	415.6			
	35.5	22.3	12.6	363.6			
	35.5	29.2	19.6	1150.8			
	36.0	22.5	12.2	342.2			
	36.0	24.2	16.2	656.5			
	36.0	21.7	13.2	388.2			
	36.0	23.3	14.4	493.7			
	36.0	24.5	15.3	584.7			
Cultivos de escuticociliados	38.0	24.0	16.3	658.2			
	38.0	22.2	15.5	546.7			
	38.0	22.5	13.4	412.1			
	38.0	17.9	12.9	304.7			
	38.0	25.6	17.3	789.8			
	38.0	21.3	14.5	457.7			
	38.0	23.6	15.5	579.2			
	38.0	17.8	11.9	259.6			
	38.0	23.9	16.1	633.6			
	38.0	21.0	14.1	429.8			
	38.0	21.6	13.3	392.0			
	Cultivos clonales de escuticociliados	34.0	14.1	12.5	226.8	A3	
		34.0	28.9	20.5	1244.7	B6	
34.0		30.5	27.4	2343.9	B6		
34.0		22.8	18.5	796.8	B6		
34.0		24.4	18.4	849.4	B6		
34.0		24.5	19.0	903.9	B6		
34.0		27.7	23.3	1547.4	B6		
34.0		28.7	21.9	1408.5	B6		
34.0		28.0	16.1	744.1	B6		
34.0		23.8	15.4	577.2	B6		
34.0		31.4	27.8	2486.5	B6		
34.0		26.1	18.4	905.4	B6		
34.0		22.5	16.0	589.0	B6		
34.0		27.0	19.8	1082.4	B6		
34.0		20.0	13.5	374.9	B6		
34.0		29.8	20.1	1233.1	B6		
34.0		28.4	20.6	1244.9	B6		
34.0		29.1	23.9	1712.1	B6		
34.0		25.5	19.5	1001.6	B6		
34.0		28.2	18.9	1028.5	B6		
34.0		22.3	15.8	573.6	B6		
Cultivos clonales de escuticociliados		34.0	31.9	22.8	1692.4	B6	
		34.0	24.9	25.6	1676.8	B6	
		34.0	30.7	25.7	2085.3	B6	
		34.0	29.9	20.0	1231.8	B6	
		34.0	25.0	19.9	1013.9	B6	
		34.0	23.5	14.8	524.2	B6	
	34.0	27.3	21.2	1261.0	B6		
	34.0	28.1	19.8	1134.3	B6		
	34.0	36.9	20.5	1589.1	B6		
	34.0	25.7	17.9	844.7	B6		
	34.0	31.9	24.0	1894.0	B6		
	34.0	32.3	22.6	1696.7	B6		
	34.0	23.5	22.7	1237.9	B6		
	Cultivos clonales de escuticociliados	34.5	22.3	15.1	520.7	A1	
		34.5	20.2	14.4	432.3	A1	
		34.5	20.3	13.0	354.3	A1	
		34.5	18.9	13.8	370.5	A1	
		34.5	30.5	25.6	2056.1	A1	
		34.5	24.9	16.2	674.3	A1	
		34.5	21.4	13.1	374.1	A1	
		34.5	25.6	15.2	607.1	A1	
		34.5	28.6	17.6	913.6	A1	
		34.5	23.4	15.0	543.3	A1	
		34.5	24.0	19.4	922.0	A1	
		34.5	27.0	18.5	947.2	A1	
		34.5	23.8	17.9	778.5	A1	
		34.5	24.1	17.1	727.9	A1	
		34.5	20.4	13.7	391.1	A1	
		34.5	27.9	14.9	636.5	A1	
		34.5	26.2	17.3	807.8	A1	
		34.5	24.9	16.0	655.1	A1	
		Cultivos clonales de escuticociliados	34.5	26.2	16.2	704.4	A2
			34.5	27.7	18.7	993.3	A2
34.5			29.8	25.0	1918.6	A2	
34.5			27.0	24.9	1720.7	A2	
34.5			27.4	20.6	1197.3	A2	
34.5			22.5	14.8	504.1	A2	
34.5			27.3	18.0	905.3	A2	
34.5			25.9	17.5	816.0	A2	
34.5			26.8	16.9	789.4	A2	
34.5	30.7		20.8	1359.6	A2		
34.5	28.4		21.7	1368.6	A2		
34.5	26.1		17.2	790.6	A2		
34.5	25.7		20.0	1054.2	A2		
34.5	24.7		22.3	1257.3	A2		

	Profundidad	Largo	Ancho	Carbono orgánico	Clave del cultivo
	m	µm	µm	pg cél. <sup>-1</sup>	
Cultivos clonales de esciticociliados	34.5	26.1	15.6	650.1	A2
	34.5	22.8	15.5	560.6	A2
	34.5	23.2	16.6	652.3	A2
	34.5	26.2	19.2	995.6	A2
	34.5	23.7	16.6	673.6	A2
	34.5	17.1	13.1	300.2	A3
	34.5	16.2	11.0	201.0	A3
	34.5	16.9	13.1	296.7	A3
	34.5	16.5	10.4	181.0	A3
	34.5	16.4	10.1	170.5	A3
	34.5	16.6	9.1	140.7	A3
	34.5	16.4	10.3	179.2	A3
	34.5	14.8	9.6	138.4	A3
	34.5	16.9	13.3	306.1	A3
	34.5	15.8	10.4	174.5	A3
	34.5	16.1	8.7	124.2	A3
	34.5	15.2	10.4	170.2	A3
	34.5	16.2	11.0	199.0	A3
	34.5	15.2	13.1	265.9	A3
	34.5	16.0	9.1	136.1	A3
	34.5	15.0	9.7	144.3	A3
	34.5	16.9	7.5	98.8	A3
	34.5	15.1	9.3	133.2	A3
	34.5	15.8	10.6	180.6	A3
	34.5	15.9	1.2	2.5	A3
	34.5	16.2	10.5	183.2	A3
	34.5	16.5	11.4	219.3	A3
	34.5	13.9	8.0	91.7	A3
	34.5	14.2	10.1	150.0	A3
	34.5	18.1	10.3	195.0	A3
	34.5	14.5	10.0	149.4	A3
	34.5	9.6	9.1	82.2	A3
	34.5	16.6	11.3	217.7	A3
	34.5	16.3	10.5	183.6	A3
	34.5	14.2	7.0	70.3	A3
	34.5	19.3	11.2	250.6	A4
	34.5	26.4	20.6	1144.8	A4
	34.5	26.0	24.8	1645.3	A4
	34.5	25.1	24.7	1576.1	A4
	34.5	25.3	22.4	1309.2	A4
	34.5	23.0	19.8	924.5	A4
	34.5	25.9	13.9	510.8	A4
	34.5	23.1	14.0	468.4	A4
	34.5	20.8	13.9	413.1	A4
	34.5	26.1	23.9	1524.1	A4
34.5	27.7	22.0	1379.0	A4	
34.5	21.6	20.8	956.4	A4	
34.5	21.6	17.8	703.8	A4	
34.5	23.7	21.9	1169.3	A4	

	Profundidad	Largo	Ancho	Carbono orgánico	Clave del cultivo
	m	µm	µm	pg cél. <sup>-1</sup>	
Cultivos clonales de esciticociliados	34.5	27.0	24.2	1615.6	A4
	34.5	23.2	15.1	545.2	A4
	34.5	21.2	15.7	536.4	A4
	34.5	25.8	21.5	1226.2	A4
	34.5	24.4	21.5	1156.0	A4
	34.5	19.7	11.5	269.2	A5
	34.5	24.5	16.4	671.6	A5
	34.5	23.1	16.4	638.5	A5
	34.5	22.0	14.5	474.4	A5
	34.5	21.5	12.6	350.0	A5
	34.5	21.1	12.5	338.5	A5
	34.5	23.1	14.5	495.7	A5
	34.5	18.8	11.6	257.4	A5
	34.5	22.2	15.0	516.1	A5
	34.5	19.4	12.6	317.9	A5
	34.5	23.1	16.5	641.3	A5
	34.5	23.9	18.6	854.0	A5
	34.5	21.7	14.8	488.1	A5
	34.5	23.6	19.6	929.4	A5
	34.5	22.6	12.9	383.0	A5
	34.5	23.8	16.9	700.2	A5
	34.5	24.7	14.5	529.9	A5
	34.5	11.8	10.3	128.4	A6
	34.5	23.7	14.8	531.0	B5
	34.5	25.5	20.1	1055.8	B5
	34.5	25.5	21.3	1187.8	B5
	34.5	24.4	17.9	804.6	B5
	34.5	22.6	15.7	572.5	B5
	34.5	29.3	19.9	1188.9	B5
	34.5	24.1	19.7	960.3	B5
	34.5	21.6	12.6	350.7	B5
	34.5	20.5	17.9	671.5	B5
	34.5	20.6	18.6	730.4	B5
	34.5	21.8	19.2	828.0	B5
	34.5	26.4	13.6	499.2	B5
	34.5	23.6	14.0	477.7	B5
	34.5	21.8	17.6	695.2	B5
	34.5	25.3	16.8	733.5	B5
	34.5	24.2	15.8	619.3	B5
	34.5	25.4	20.4	1087.7	B5
	34.5	27.5	19.4	1057.3	B5
	34.5	26.7	20.5	1150.6	B5
	34.5	27.4	20.8	1213.5	B5
	34.5	20.8	15.5	516.4	B6
	34.5	21.3	16.8	616.0	B6
34.5	22.5	15.3	536.9	B6	
34.5	21.7	14.8	487.2	B6	
34.5	22.5	15.5	553.0	B6	
34.5	23.1	18.6	821.4	B6	

	Profundidad	Largo	Ancho	Carbono orgánico	Clave del cultivo
	m	μm	μm	pg cél. <sup>-1</sup>	
Cultivos clonales de escuticociliados	34.5	20.4	14.5	439.0	B6
	34.5	18.1	14.6	395.1	B6
	34.5	18.7	15.3	446.8	B6
	34.5	22.1	17.0	653.8	B6
	34.5	19.0	15.6	473.6	B6
	34.5	19.7	13.1	345.8	B6
	34.5	17.9	13.0	309.0	B6
	34.5	21.5	16.1	576.3	B6
	34.5	20.2	19.0	748.4	B6
	34.5	24.3	17.4	757.7	B6
	34.5	23.5	16.8	682.3	B6
	34.5	18.6	11.7	259.3	B6
	34.5	21.0	17.9	692.7	B6
	34.5	19.9	14.2	414.1	B6
	35.0	14.8	13.5	277.3	A1
	35.0	36.0	29.2	3162.2	A1
	35.0	31.7	22.4	1632.5	A1
	35.0	27.3	22.1	1374.4	A1
	35.0	32.3	27.5	2503.4	A1
	35.0	28.6	26.2	2010.6	A1
	35.0	14.3	12.7	235.6	A1
	35.0	26.6	15.4	647.8	A1
	35.0	29.7	24.9	1883.6	A1
	35.0	28.2	20.9	1259.6	A1
	35.0	16.9	15.6	421.1	A1
	35.0	26.6	26.6	1931.0	A1
	35.0	30.4	26.4	2181.8	A1
	35.0	28.8	21.9	1412.0	A1
	35.0	15.0	13.1	263.2	A1
	35.0	31.5	23.0	1708.0	A1
	35.0	24.8	16.9	725.3	A1
	35.0	28.6	20.2	1201.3	A1
	35.0	17.3	10.0	179.2	A1
	35.0	31.6	25.0	2030.0	A1
	35.0	24.2	15.6	603.3	A1
	35.0	28.5	22.9	1540.0	A1
	35.0	27.8	20.7	1222.0	A1
	35.0	13.0	12.8	220.7	A1
	35.0	29.1	33.1	3269.8	A1
	35.0	25.0	18.4	870.4	A1
	35.0	27.4	18.3	939.1	A1
	35.0	26.1	19.7	1036.2	A1
	35.0	30.9	19.8	1248.1	A1
	35.0	26.0	24.1	1545.9	A1
	35.0	13.6	14.2	281.3	A1
35.0	33.1	31.1	3287.9	A1	
35.0	26.0	18.2	883.1	A1	
35.0	23.2	20.7	1024.5	A1	

	Profundidad	Largo	Ancho	Carbono orgánico	Clave del cultivo
	m	μm	μm	pg cél. <sup>-1</sup>	
Cultivos clonales de escuticociliados	35.0	22.4	13.2	398.3	A1
	35.0	20.7	13.8	403.1	A1
	35.0	28.1	16.5	786.0	A1
	35.0	17.7	11.1	225.7	A1
	35.0	21.0	11.9	305.8	A1
	35.0	18.4	10.2	196.2	A1
	35.0	23.7	12.3	366.2	A1
	35.0	23.6	13.0	411.5	A1
	35.0	19.8	14.1	403.5	A1
	35.0	25.1	16.8	727.3	A1
	35.0	25.1	15.6	626.0	A1
	35.0	24.7	14.5	536.4	A1
	35.0	7.8	8.3	54.5	A1
	35.0	26.6	17.5	831.5	A1
	35.0	12.4	10.1	129.2	A1
	35.0	9.7	8.5	71.9	A1
	35.0	13.7	10.2	144.5	A1
	35.0	25.4	14.3	535.1	A1
	35.0	12.6	8.5	93.9	A1
	35.0	13.1	9.1	111.7	A1
35.0	13.8	11.5	189.5	A1	



