



Estudio del comportamiento fagotrófico del fitoplancton mediante técnicas de análisis celular

Study of the feeding behaviour of mixotrophic phytoplankton using single cell analysis

Miguel Angel Ballen Segura

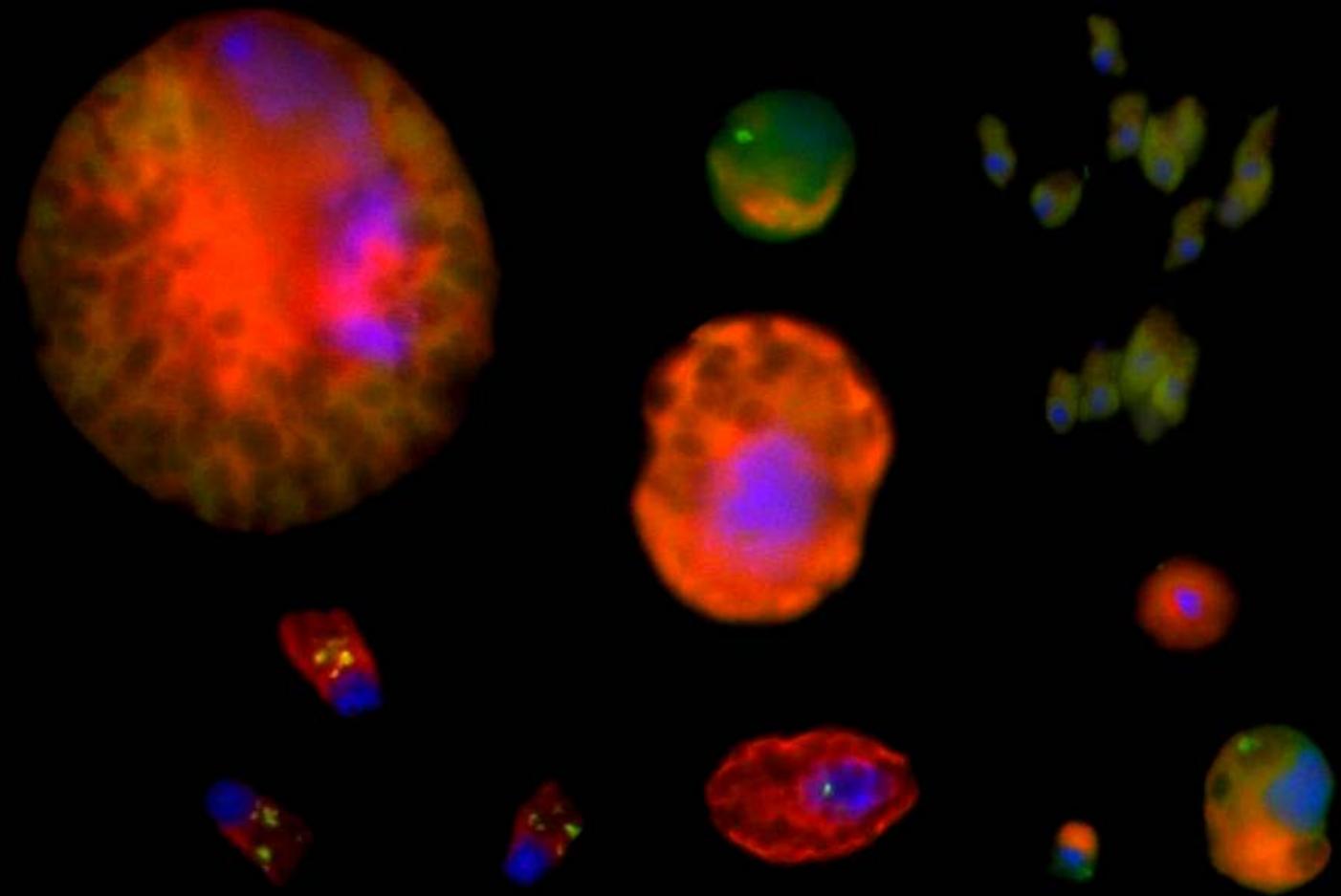
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Estudio de la actividad fagotrófica del fitoplancton mediante técnicas de análisis celular

Miguel Angel Ballen Segura



Tesis Doctoral

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO FAGOTRÓFICO DEL
FITOPLANCTON MEDIANTE TÉCNICAS DE ANÁLISIS CELULAR**

Tesis Doctoral

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia – Departament d'Ecologia

Programa de Doctorat: Ecologia Fonamental i Aplicada Bienio 2009-2011

Estudio del comportamiento fagotrófico del fitoplancton mediante técnicas de análisis celular

Study of the feeding behaviour of mixotrophic phytoplankton using single cell analysis

Memoria presentada por Miguel Angel Ballen Segura para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona

Miguel Angel Ballen Segura

Barcelona, Junio de 2012

Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CEAB)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Vo. Bo.

Director de la Tesis

Dra. Marisol Felip

Prof. Agr. UB

Vo. Bo.

Codirector de la Tesis

Dr. Jordi Catalan

Prof. Inv. CSIC

Agradecimientos

Fue un duro recorrido que difícilmente habría podido terminar sin el apoyo y colaboración de muchas personas. Gracias Marisol por toda tu colaboración, tiempo y paciencia dirigiendo esta tesis, por tus palabras de aliento en los momentos difíciles. Gracias Jordi por tu valiosa codirección, tus aportes no sólo enriquecieron esta tesis sino mis conocimientos y manera de ver la ciencia. Gracias a la comisión de seguimiento de tesis: Esperanza, Javier y Juan Manuel, por sus valiosos aportes.

También quiero agradecer a todos los que colaboraron en la campaña y toma de muestras de los lagos: Carmen, Maria, Hugo, JeanChris, Emilio, Pep, Lluís, Marisol y Dani. Un especial agradecimiento a Lluís Camarero por los análisis químicos de las muestras. Así mismo, quiero agradecer a Maria Fernández y Laura Navarro por su colaboración en la puesta en marcha y mantenimiento de los cultivos. A Carlos y Pau por su ayuda en la obtención de muestras del Cisó. A Herwig Stibor y Vera de Schryver por su ayuda durante mi estancia en Brest.

Muchas gracias a todos los que compartieron mi diario vivir en Blanes y Barcelona. Miquel, Albert, Joao, Carlos, JC, Clau y todos con los que celebré los numerosos títulos del Barça. A Francesco, Edu, Clara, Tati, Uri y todos aquellos con los que compartí magnificas tardes de Voley Playa. Son tantos ceabinos con quien he compartido durante estos años, a todos ellos muchas gracias. A Mario y Felipe que fueron mi apoyo en Barcelona. Clau, Tati y Carlos gracias especialmente a ustedes por estar ahí incondicionalmente en los buenos pero sobre todo en los malos momentos, por sus aportes y apoyo moral.

Finalmente quiero agradecer y dedicar esta tesis a las personas más importantes en mi vida. A mi familia por creer en mí y apoyarme en todo momento. A Nata por acompañarme estos cuatros largos años, fuiste y eres mi mayor apoyo y motivación para nunca decaer, gracias por tus correcciones, traducciones y toda la ayuda que me prestaste, hiciste los momentos difíciles más fáciles, y los fáciles maravillosos. Pero especialmente a mis padres, ustedes me apoyaron desde un principio e hicieron posible

este loco sueño, Má y Pá gracias por creer y confiar en mí, por su incondicionalidad y amor. Sin ustedes nada de esto hubiese sido posible. GRACIAS.

Contenido

1. Introducción	1
Mixotrofia	1
Métodos de estudio de la fagotrofia	2
Comportamiento fagotrófico	4
Objetivos	6
2. Materiales y Métodos	11
2.1 Medición de la actividad fagotrófica	11
2.1.1 Hibridación fluorescente in situ (CARD-FISH)	11
2.1.2 Microesferas fluorescentes de látex (FLM)	12
2.2. Calibración del contenido vacuolar como tasas de ingestión	13
2.2.1 Organismo y condiciones de cultivo	13
2.2.2 Diseño experimental	14
2.2.3 Análisis estadístico	17
2.3 Actividad fagotrófica en un lago de alta montaña a lo largo del día	17
2.3.1 Área de estudio y obtención de muestras	17
2.3.2 Medición de la actividad fagotrófica	18
2.3.3 Análisis estadístico	20
2.4 Variabilidad de la actividad fagotrófica entre lagos de montaña	20
2.4.1 Área de estudio	20
2.4.2 Toma y análisis de muestras	20
2.4.3 Parámetros químicos	21
2.4.4 Actividad fagotrófica	21
2.4.5 Análisis estadístico	22
Capítulo I. Calibración del contenido vacuolar como tasas de ingestión	
3. Resultados	31
3.1 Patrones luz/oscuridad de la actividad fagotrófica	31
3.2 Cambios temporales del comportamiento fagotrófico	35
4. Discusión	39

Capítulo II. Actividad fagotrófica en un lago de alta montaña a lo largo del día

5. Resultados	47
5.1 Características del sistema	47
5.2 Comunidad de procariotas	48
5.3 Comunidad fitoplanctónica	51
5.4 Patrones temporales de fagotrofia	51
5.5 Patrones de selección de presas	55
6. Discusión	57
6.1 Variación temporal de la actividad fagotrófica	58
6.2 Selección de presas	61

Capítulo III. Variabilidad de la actividad fagotrófica entre lagos de montaña

7. Resultados	67
7.1 Características de los lagos	67
7.2 Comunidades de procariotas	69
7.3 Comunidades fitoplanctónicas con capacidad mixotrófica	73
7.4 Variación de la actividad fagotrófica entre lagos	74
7.4.1 Selección de presas	80
7.5 Variación de la actividad fagotrófica entre protistas	81
7.5.1 Selección de presas	86
7.6 Efectos del tamaño celular sobre la actividad fagotrófica	87
8. Discusión	89
8.1 Importancia de los mixótrofos en los lagos de alta montaña	89
8.2 El tamaño de los protistas mixotróficos determinan su actividad fagotrófica	91
8.3 Efecto del tamaño sobre el comportamiento selectivo: “mi tamaño determina tu suerte”	93
9. Conclusiones	99
10. Bibliografía	104

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Mixotrofia

La mixotrofia se define como una combinación de nutrición fototrófica y heterotrófica que se presenta en un mismo organismo. Cuando la nutrición heterotrófica consiste en la captura de material particulado (presas) se habla de organismos fagotróficos. Esta capacidad mixotrófica se asocia a una ventaja competitiva de algunas microalgas en situaciones de estrés, generadas por déficit de luz o de nutrientes en el medio (Jones 2000, Medina-Sánchez *et al.*, 2004). Estos organismos mixotróficos son habituales en las comunidades planctónicas y en algunos sistemas, principalmente oligotróficos, se les ha considerado como principal factor controlador de las comunidades bacterianas. (Havskum and Riemann 1996, Zubkov and Tarran 2008).

La mixotrofia se encuentra ampliamente distribuida entre los diferentes grupos de organismos que componen las comunidades planctónicas, tanto en sistemas marinos como de agua dulce. Dinoflagelados que pueden ingerir bacterias, algas o incluso pequeños ciliados (Hitchman and Jones 2000, Kim *et al.*, 2008), criptofíceas (Tranvik *et al.*, 1989, Schumann *et al.*, 2005, Boëchat *et al.*, 2007) o crisofíceas (Caron *et al.*, 1993, Rothhaupt 1997, Flöder *et al.*, 2006, Boëchat *et al.*, 2007) son algunos de los grupos con reconocida capacidad fagotrófica descritos en la literatura.

Dentro de las especies mixotróficas se han descrito diferentes comportamientos o estrategias nutricionales, que se sitúan a lo largo de un espectro continuo desde la puramente autotrófica a la heterotrófica absoluta (Jones 1994). Estas estrategias responden a necesidades diferentes que se han sistematizado en la clasificación propuesta por Jones (2000). Así, es posible observar protistas: 1) principalmente

heterótrofos y que emplean la fototrofia sólo cuando el número de presas es limitante para su crecimiento (Andersson *et al.*, 1989) ; 2) principalmente autótrofos y que ingieren presas cuando la luz es limitante (Jones and Rees 1994); 3) que ingieren presas como fuente de sustancias esenciales para el crecimiento (Kimura and Ishida 1985); y 4) que ingieren presas para completar los requerimiento del mantenimiento celular en periodos prolongados de disponibilidad de luz por debajo de las necesidades para compensar la respiración (Tranvik *et al.*, 1989).

A pesar de los costos energéticos que le puede conllevar a un protista mixótrofo tener las dos maquinarias funcionales, en comparación a un autótrofo o heterótrofo estricto, su presencia en la mayor parte de los sistemas acuáticos oligotróficos, sugieren que la mixotrofia puede ser una estrategia que le conceda ventajas a estos organismos (Jones 2000, Medina-Sánchez *et al.*, 2004), ya sea por la obtención de carbono orgánico que pueden incorporar a su biomasa (Caron *et al.*, 1993, Burkholder *et al.*, 2008), como también por la obtención de nutrientes inorgánicos provenientes de las presas, que les permite mantener su crecimiento (Raven 1997, Zubkov and Tarran 2008). Además, ejerce un control directo sobre la abundancia bacteriana, que deriva en una eliminación directa de su principal competidor por los nutrientes minerales (Thingstad *et al.*, 1996).

Métodos de estudio de la fagotrofia

Durante las ultimas décadas, ha aumentando el interés sobre la actividad y el papel que desarrollan los protistas fagotróficos, entre ellos las especies mixotróficas, en los sistemas acuáticos. Partículas inertes como microesferas de látex (Børsheim 1984, Pace and Bailiff 1987) o bacterias marcadas con fluorocromos (Sherr *et al.*, 1987), han sido utilizadas como presas alternativas para estimar las tasas de filtración e ingestión por parte de los protistas en diferentes condiciones de experimentación. Estos métodos presentan la ventaja de requerir protocolos experimentales fáciles y estimaciones rápidas con tiempos cortos de incubación (Sherr *et al.*, 1987), así mismo la identificación y cuantificación de estas partículas en el interior de los protistas no suele conllevar mayor dificultad (figura 1).

Sin embargo, pronto se vio cierta capacidad de los protistas para discernir entre bacterias y microesferas e incluso entre bacterias vivas y muertas (Sherr *et al.*, 1987, González *et al.*, 1993, Jürgens and De Mott 1995). Esta capacidad puede llevar a evitar la ingestión de la partícula o incluso después de ser ingeridas a su rápida expulsión (Boenigk *et al.*, 2001a), impidiendo así, evaluar los procesos digestivos y, por lo tanto, una correcta estima de la asimilación de carbono y nutrientes. Así mismo, la utilización de presas artificiales no permite evaluar adecuadamente la selección natural de presas, limitándose muchas veces a una selección por tamaños (Chrzanowski and Šimek 1990, Šimek and Chrzanowski 1992) y desconociendo la posible selección entre los diferentes grupos de procariotas.

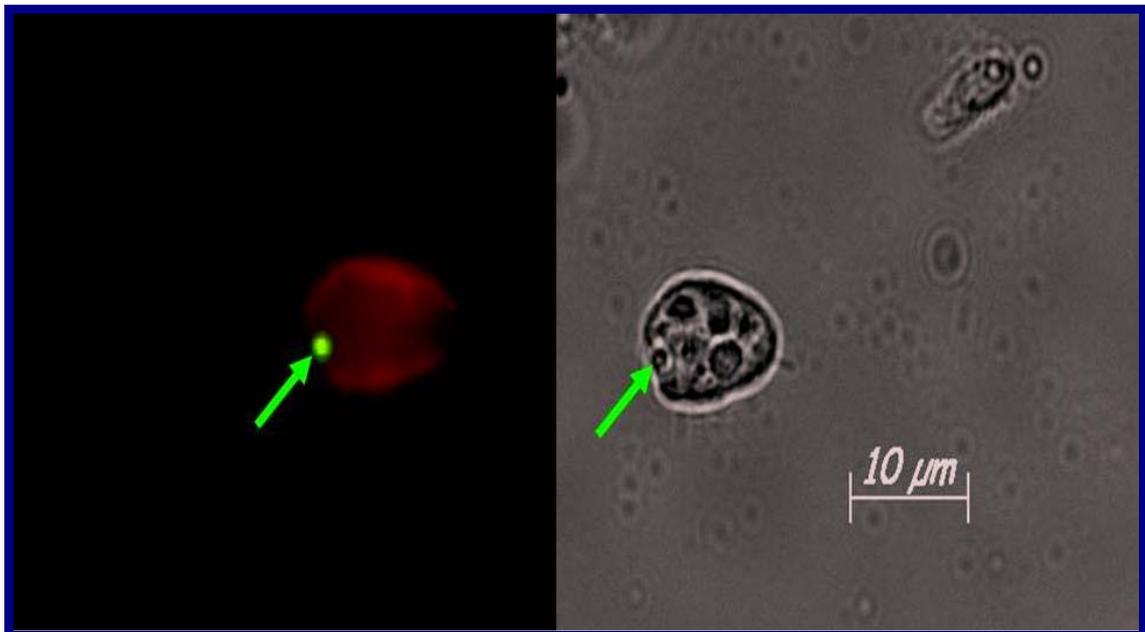


Figura 1. Ingestión de microesferas de látex fluorescentes por una criptofícea. Microscopía de fluorescencia (izquierda), microscopía óptica (derecha).

Por otro lado, el desarrollo de herramientas moleculares basadas en el diseño de sondas oligonucleótidas para marcar células procariotas y eucariotas, ha permitido aumentar el enfoque sobre la actividad fagotrófica de los protistas. Técnicas como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Pernthaler *et al.*, 2001a) y modificaciones de esta como el CARD-FISH (Pernthaler *et al.*, 2002) han permitido no sólo evaluar y cuantificar los diferentes grupos taxonómicos que componen el bacterioplancton, y que son potenciales presas, sino que han hecho posible evaluar el contenido y composición de presas de las

vacuolas alimenticias de los protistas fagotróficos (figura 2) (Medina-Sánchez *et al.*, 2005). De esta forma, no son necesarias las incubaciones, lo cual conlleva a una reducción en la manipulación de las muestras. Así mismo, que la captura e ingestión se realice sobre las presas naturales, también confiere más realismo. Con la utilización de diferentes sondas específicas para cada uno de los grupos de procariotas es posible evaluar de una manera más detallada la selección de presas.

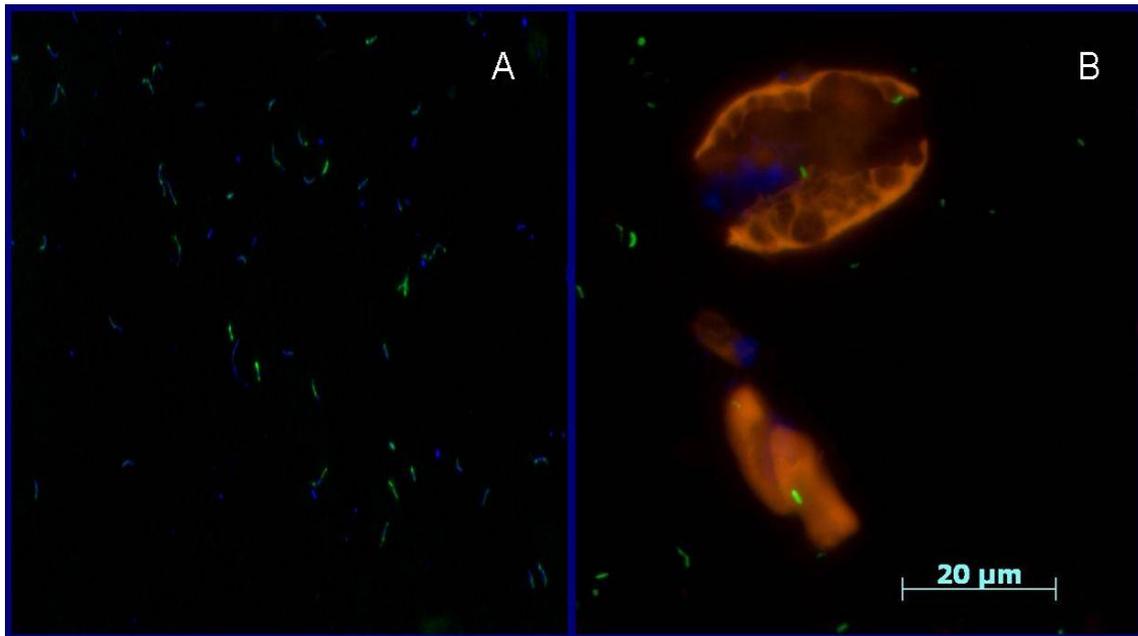


Figura 2. Catalized Reported Deposition-FISH (CARD-FISH). A) Procariotas marcadas con DAPI (azul) e hibridadas con la sonda Bet42a para Betaproteobacteria (verde). b) Procariotas hibridadas dentro de la vacuola alimenticia de diversos protistas mixotróficos.

Comportamiento fagotrófico

Es un hecho conocido que la actividad fagotrófica de los protistas es la mayor fuente de mortalidad del bacterioplancton tanto en sistemas marinos como de agua dulce (González *et al.*, 1993, Sherr and Sherr 2002, Pernthaler 2005), además, juegan un papel importante en el reciclaje y transferencia de nutrientes a niveles tróficos superiores (Azam *et al.*, 1983, Caron *et al.*, 1985, Goldman *et al.*, 1985). Así mismo, la actividad predatoria de los protistas puede influir en la estructura morfológica, composición taxonómica y estado fisiológico de las comunidades bacterianas (Hahn and Höfle 2001). De esto se deriva la importancia de conocer y entender el comportamiento, mecanismos y los factores que controlan la actividad fagotrófica de los protistas.

Organismos modelos especialmente dinoflagelados, se han utilizado para tratar de dilucidar los mecanismos de reconocimiento, captura, ingestión y digestión de las presas (Buskey 1997, Hansen and Calado 1999, Berge *et al.*, 2008, Roberts *et al.*, 2011b). Un modelo conceptual de este mecanismo se describe en la figura 3. Según la forma en que los protistas concentran y capturan sus presas, pueden dividirse en filtradores, que por medio de cilios o flagelos producen corrientes que arrastran a sus presas hacia ellos, y interceptores, que buscan a través de su movimiento el contacto directo con la presa (Fenchel 1986, Montagnes *et al.*, 2008). Una vez la presa es capturada, es individualmente ingerida y almacenada, sola o con otras, en vacuolas alimenticias para su inmediata o posterior digestión. Características de las presas como el tamaño, superficie celular, movilidad, liberación de señales químicas, estado fisiológico pueden potencialmente influir, entre otras, sobre uno o varios de los pasos que configuran la actividad fagotrófica, derivando en diferentes comportamientos selectivos por parte de los protistas (Jürgens 2007, Roberts *et al.*, 2011b). Así mismo, características ambientales como la radiación, temperatura y estado trófico del sistema, pueden modificar el comportamiento tanto de las presas como del depredador (Sherr *et al.*, 1988, Urabe *et al.*, 2000, Medina-Sánchez *et al.*, 2004, Bastidas Navarro *et al.*, 2011).

A pesar de lo anteriormente descrito, es poco lo que se conoce sobre las preferencias alimenticias que exhiben los distintos grupos de protistas mixotróficos en sistemas naturales. Evidencias tanto directas, basadas en la inspección de las vacuolas alimenticias de flagelados heterotróficos (Jezbera *et al.*, 2005, Jezbera *et al.*, 2006), como indirectas -consistentes en cambios estructurales, morfológicos y de composición de las comunidades bacterianas, atribuidos a la presión depredatoria de protistas fagotróficos (Šimek *et al.*, 2001a, Šimek *et al.*, 2001b, Šimek *et al.*, 2003, Salcher *et al.*, 2005)-, sugiere la posibilidad de comportamientos selectivos, sobre grupos taxonómicos de procariotas específicos, como consecuencia de estrategias de las presas para evadir su depredación o de los protistas en busca de optimizar el beneficio obtenido de la fagotrofia. De igual forma, se desconoce si estos posibles comportamientos selectivos son compartidos por protistas filogenéticamente muy

próximos, o si, por lo contrario, son específicos e influenciados por las características propias de cada uno.

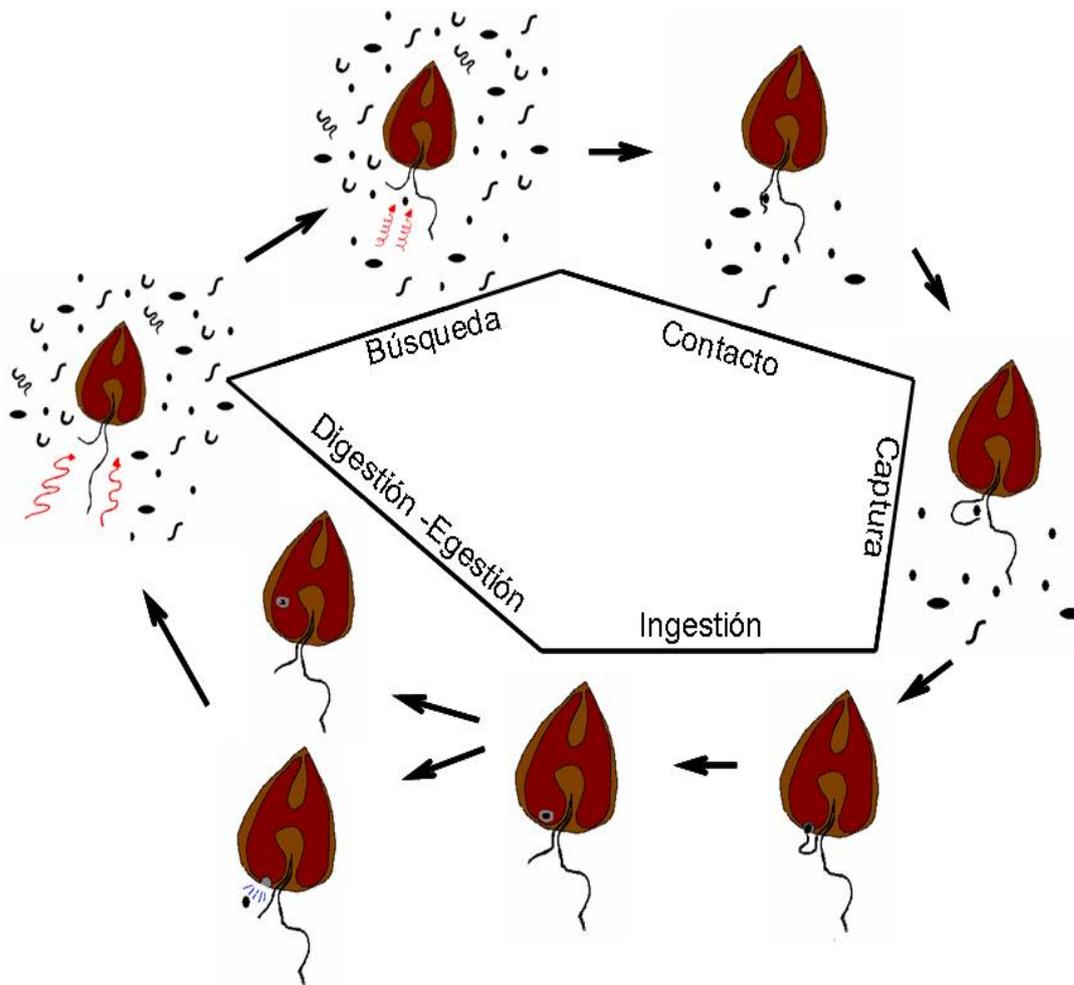


Figura 3. Modelo conceptual del mecanismo de alimentación de un protista fagotrófico.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es evaluar el comportamiento fagotrófico en especies fitoplanctónicas por medio de técnicas de análisis celular que permiten establecer patrones individuales de cada una de ellas. Para alcanzar este objetivo se comparan dos técnicas: la ingestión de microesferas fluorescentes de látex y el contenido de las vacuolas alimenticias por medio de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en diferentes especies fitoplanctónicas en condiciones controladas de cultivo. Esta comparación permite finalmente la calibración del contenido vacuolar para estimar tasas

de ingestión. Así mismo, se evalúan los cambios temporales a corta escala de tiempo (horas) de la actividad fagotrófica y los comportamientos selectivos de presas en diferentes especies fitoplanctónicas de un lago de alta montaña. Finalmente, se compara la actividad fagotrófica y la selección de presas en comunidades fitoplanctónicas naturales, de un gradiente trófico de lagos de alta montaña para identificar generalidades de los patrones de ingestión observados.

Materiales y Métodos

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Medición de la actividad fagotrófica

2.1.1 Hibridación fluorescente in situ (CARD-FISH)

El protocolo del CARD-FISH propuesto por (Medina-Sánchez *et al.*, 2005) fue utilizado para evaluar la actividad fagotrófica en protistas mixotróficos. Las muestras para este fin, fueron fijadas con una solución de Lugol alcalino al 0,5 % (v/v), seguido por formaldehído tamponado (pH 7) al 2 % y unas gotas de tiosulfato de sodio al 3 % para decolorar la fijación del Lugol (método de fijación LFT). Después de una hora de fijación a temperatura ambiente, fueron filtradas al vacío (<100 mm Hg) sobre filtros de membrana de policarbonato de 25 mm de diámetro (con tamaño de poro de 2 μm para protistas y de 0,2 μm para procariotas). Los filtros fueron lavados dos veces con agua Milli-Q, secados al aire y almacenados a -20 °C hasta su procesamiento.

Previo a la hibridación, los filtros fueron sumergidos en una solución de agarosa al 0.1-0.4 % a una temperatura de 35-40 °C, para proteger y evitar la pérdida de células durante el resto del procedimiento. A continuación, los filtros fueron incubados a 37 °C durante una hora en una solución fresca de lisozima y durante 30 min en una solución de acromopetidasa con el fin de permeabilizar las paredes celulares tanto de las procariotas como de los protistas. Seguido de esto, los filtros fueron puestos en HCl 0,01 M para desactivar posibles actividades de peroxidas endógenas y en etanol al 50, 80 y 100 % para deshidratar la muestra. Los filtros fueron hibridados a 35 °C durante cuatro horas con cuatro sondas oligonucleótidas diferentes (tabla 1), que fueron agregadas en cada caso a una concentración final de 50 ng μl^{-1} . Después de la hibridación los filtros fueron transferidos a un tampón de lavado calentado previamente, durante 10 min a 37 °C. Posteriormente los filtros fueron incubados en PBS (Phosphate buffered saline)

durante 15 min a temperatura ambiente, lavados con agua Milli-Q, y la señal fue amplificada con una incubación en una mezcla de tampón de amplificación y tiramida-Alexa-Fluor 488 durante 15 min a 42 °C en condiciones de oscuridad. La composición de los diferentes tampones se pueden encontrar en Medina-Sánchez *et al.* (2005). Finalmente, los filtros fueron lavados en PBS durante 15 min, etanol al 96 % durante un minuto y contrastados con una solución de DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; 1 µg ml⁻¹ concentración final). Los filtros fueron montados sobre portaobjetos con la ayuda de una gota de Citifluor (Citifluor AF1) y almacenados a -20 °C hasta su conteo.

Tabla 1. Sondas oligonucleótidas usadas en este estudio.

Probe	Specificity	Sequence (5'-3') °	%FA*	Reference
Arch-915	Archaea	GTGCTCCCCGCAATTCCT	40	(Medina-Sánchez <i>et al.</i> , 2005)
CF319a	<i>Citofaga-Flavobacterium</i>	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	55	(Ishii <i>et al.</i> , 2004)
HGC69A	Actinobacteria	TATAGTTACCACCGCCGT	30	(Warnecke <i>et al.</i> , 2005)
Bet42a	Betaproteobacteria	GCCTTCCCCTTCGTTT	55	(Warnecke <i>et al.</i> , 2005)

*FA: Concentración de formamida en el tampón de hibridación

2.1.2 Microesferas fluorescentes de látex (FLM)

Microesferas fluorescentes (Fluoresbrite® Yellow Green Microspheres, Polysciences Inc.) de un tamaño de 0,75 µm y con un espectro de excitación máxima a 441 nm y de emisión máxima a 485 nm, fueron utilizadas como presas artificiales para evaluar la actividad fagotrófica en diferentes especies de protistas mixotróficos. Este tamaño fue seleccionado por ser el tamaño medio de los procariotas tanto en condiciones de cultivo como en el medio natural. La solución de microesferas, fue preparada en dilución con agua Milli-Q en una proporción de 1:1000, y almacenada en condiciones de oscuridad a una temperatura de 4 °C. Para establecer la concentración exacta de microesferas necesarias en los experimentos, una cantidad conocida de muestra y de solución de microesferas fue filtrada sobre membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 0,2 µm y se realizaron conteos tanto del número de procariotas teñidas con DAPI (1 µg ml⁻¹ concentración final) como de microesferas en la solución de trabajo. De esta manera, en todos los experimentos, la cantidad agregada de microesferas fue siempre

aproximadamente el 10% del total de procariotas contadas por DAPI. Previo a la adición de las microesferas en la muestra, estas fueron sonicadas suavemente para evitar la formación de agregados que dificultaran la ingestión por parte de los protistas. Una vez añadidas las microesferas en la concentración correcta, las muestras se dejaron en incubación durante un tiempo previamente establecido. La estimación de este tiempo se realizó a partir de experimentos previos en cada muestra, donde un número conocido de microesferas fue adicionado y se realizaron mediciones de la ingestión de partículas a los 0, 5, 10, 20, 30 y 60 min. El momento en que se obtuvo mayor ingestión de partículas fue tomado como el tiempo óptimo de incubación. Posteriormente a la incubación, las muestras se fijaron por el método LFT. Después de una hora de fijación a temperatura ambiente, se contrastaron con DAPI (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ concentración final) y se filtraron al vacío (<100 mm Hg) sobre filtros de membrana de policarbonato de 25 mm de diámetro con tamaño de poro de 2 μm para protistas y de 0,2 μm para procariotas y microesferas. Finalmente los filtros fueron puestos sobre portaobjetos con la ayuda de una gota de Citifluor (Citifluor AF1) y almacenados a -20°C hasta su conteo.

2.2 Calibración del contenido vacuolar como tasas de ingestión

2.2.1 Organismos y condiciones de cultivo

Se utilizaron cinco especies de protistas mixotróficos (figura 4) para comparar entre los dos métodos de medición de la actividad fagotrófica. Dos especies de Cryptophyta: *Cryptomonas ovata* (cepa SAG979-3) y *Chroomonas* sp. (cepa SAG980-1), y la Chrysophyta *Ochromonas tuberculata* (cepa CCAP979/64) fueron obtenidas de la colección de cultivos de microalgas del SAG (Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen) y del CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa). Por otro lado, dos especies de Cryptophyta (*Cryptomonas* sp1. y *Cryptomonas* sp2.) fueron obtenidas de una muestra natural tomada en el lago Cisó (2°45'05"E y 42°07'35"N), ubicado cerca de l'Estany de Banyoles en Girona.

Las especies de cultivos crecieron previamente durante meses en un medio enriquecido (Desmidiacean Medium MiEB12) y condiciones de luz y temperatura controlada (ciclos de luz y oscuridad de 12:12 y temperatura de 20 °C). La muestra del lago Cisó fue

obtenida en la mañana previa al inicio del experimento y prefiltrada a través de una malla de nylon de 50 μm con el objetivo de remover los depredadores más grandes. Posteriormente, la muestra fue puesta en botellas de 2 litros y colocada en una cámara de incubación bajo las mismas condiciones de luz y temperatura que las especies de cultivo.

2.2.2 Diseño experimental

En la figura 5 se puede observar un esquema del diseño experimental utilizado en la comparación de métodos. Las mediciones de la actividad fagotrófica fueron hechas en intervalos de cuatro horas durante 24 horas. Tanto la muestra natural como los cultivos fueron mantenidos en condiciones de ciclos de luz-oscuridad de 12:12 y temperatura de 20 °C durante todo el experimento. Alícuotas de 40 ml de la muestra del Cisó y de 12 ml para los cultivos fueron tomadas en cada intervalo de tiempo. Las muestras para CARD-FISH fueron fijadas, filtradas y almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento. La hibridación se realizó con la sonda BET42a (Biomers.net, Alemania) específica para el grupo de Betaproteobacteria, abundante tanto en los cultivos como en el lago Cisó (entre el 16 y el 35 % del total de células contadas por DAPI). En las alícuotas para microesferas, estas fueron agregadas en una concentración del 10% con respecto al total de procariotas presentes en cada muestra, y dejadas en incubación durante 1 hora para la muestra del Cisó y 10 min para los cultivos. Estos tiempos fueron estimados previamente como los necesarios para observar la mayor ingestión de microesferas y evitar la posible expulsión de éstas. Posteriormente las muestras fueron tratadas como se describen en los apartados 2.1.1 y 2.1.2. Tanto para microesferas como para CARD-FISH las mediciones se realizaron por triplicado.

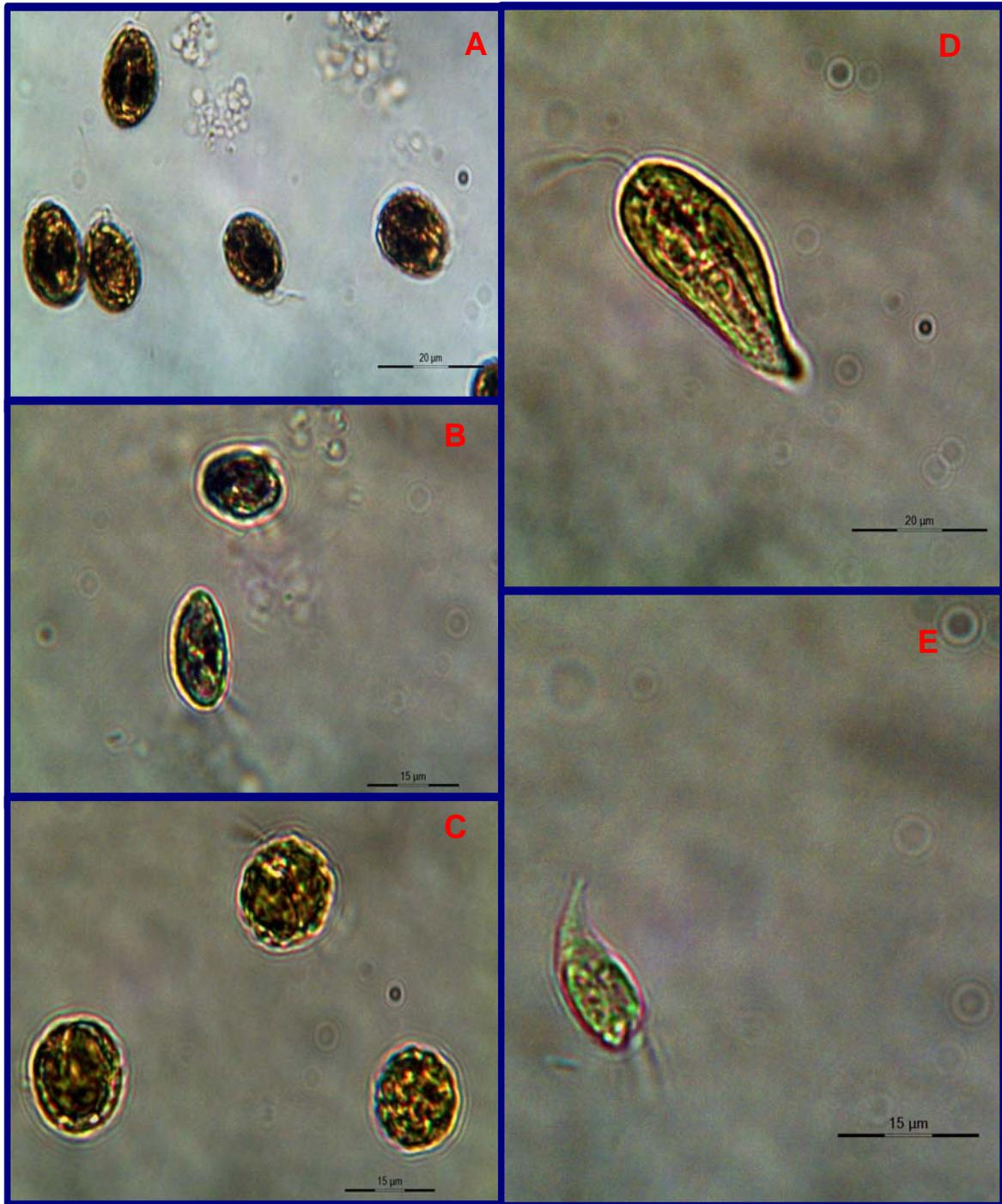


Figura 4. Algunos de los principales protistas mixotróficos estudiados. A) *Cryptomonas ovata* (cepa SAG979-3), B) *Chroomonas* sp. (cepa SAG980-1), C) *Ochromonas tuberculata* (cepa CCAP979/64), D) *Cryptomonas* sp.1, E) *Cryptomonas* sp.2

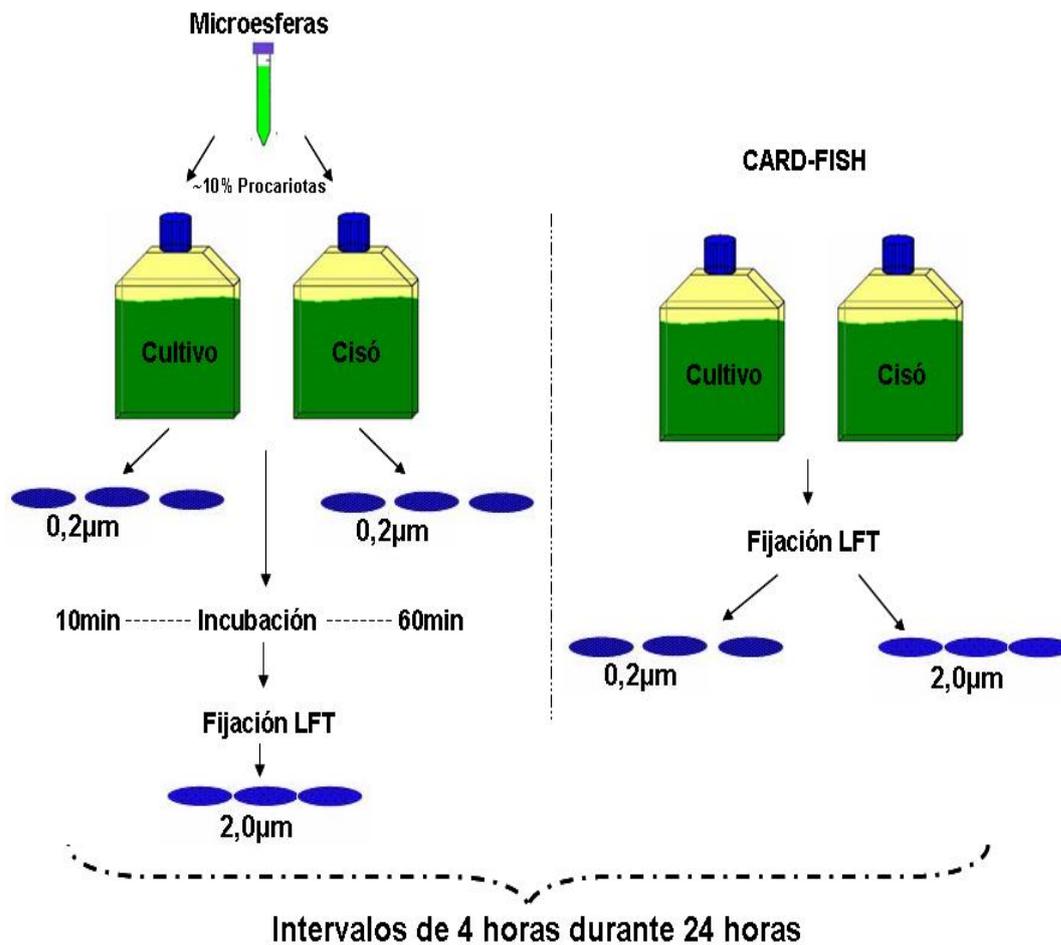


Figura 5. Diseño experimental planteado para comparar la actividad fagotrófica con dos métodos de análisis celular.

Los filtros fueron observados bajo un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager con una lámpara X-Cite 120, un set de filtros apropiados para DAPI (Zeiss filter set 01, BP365/12 FT396 LP397) y Alexa-Fluor 488 (Zeiss filter sets 09, BP450-490 FT510 LP515, o 24 DBP485/20 DFT500/600 BP515-540 + LP610) y una cámara acoplada AxioCamMrm con un software de adquisición de imagen AxioVision para PC. Para los procariotas, un mínimo de 500 células fueron contadas en un número de campos visuales conocidos, siempre cuantificando el número de microesferas o de células que además fueron hibridadas por la sonda de Betaproteobacteria en el caso de los filtros de CARD-FISH. Así mismo para los protistas, un mínimo de 100 individuos de cada especie fueron contados, cuantificando siempre el número de microesferas o bacterias hibridadas que presentaban en su interior (contenido de la vacuola).

Las tasas de filtración e ingestión en el método de microesferas fue calculada de acuerdo a (Urabe *et al.*, 1999) de la siguiente manera:

$$I_R = C_R \times (B + F)$$

$$C_R = N / F \times 60 / t$$

Donde I_R es tasa de ingestión (presas célula⁻¹ h⁻¹), C_R es tasa de filtración (nl célula⁻¹ h⁻¹), B y F son la concentración de bacterias y microesferas de la muestra (por nl), N es el número de microesferas ingeridas por protista y t es el tiempo de incubación (minutos).

2.2.3 Análisis estadístico

Se realizaron ANOVAs de una vía para probar estadísticamente las diferencias en la actividad fagotrófica en condiciones de luz y oscuridad para cada una de las especies y con ambas técnicas usadas, se empleó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 20.

2.3 Actividad fagotrófica en un lago de alta montaña a lo largo del día

2.3.1 Área de estudio y obtención de muestras

El Estany Redon (42°38'N, 0°46'E) es un lago oligotrófico de alta montaña, localizado a 2240 m sobre el nivel del mar en la Val d'Aran (Pirineos centrales) (figura 6). Tiene un área superficial de 24 ha, una profundidad máxima de 73 m, y una profundidad media de 32 m. Se trata de un lago dimíctico que permanece cubierto de hielo y nieve unos 6 meses al año y tiene un periodo de renovación promedio de 4 años. Durante los periodos libres de hielo, la entrada de radiación solar es elevada a causa de la transparencia del agua, presenta profundidades del disco Secchi que arriban hasta los 20 m. Este lago ha sido ampliamente estudiado y una descripción más detallada de sus características puede encontrarse en Catalan (1988,1989, 1992) y Felip (1997).

El lago fue muestreado a principios de agosto del 2004 durante el periodo de estratificación estival. Muestras integradas desde los 0 m hasta los 60 m fueron tomadas desde el punto de máxima profundidad, en cuatro momentos diferentes a lo largo de un

día (24 h, 07 h, 11 h y 14 h). Las muestras fueron prefiltradas a través de una red de tamaño de malla de 40 μm para remover el zooplancton más grande y se separaron en dos submuestras, una fue fijada con Lugol alcalino al 0,5 % (v/v) para la posterior caracterización de la comunidad fitoplanctónica en el microscopio invertido (Sournia 1978) la otra submuestra fue fijada con LFT y filtrada como se explicó anteriormente para la realización del CARD-FISH (apartado 2.1.1). Todas las muestras fueron tomadas por duplicado. Paralelamente, se realizaron perfiles de luz y temperatura, y se obtuvieron muestras para la caracterización de la composición química del agua de acuerdo a los protocolos descritos por Felip *et al.* (1999).

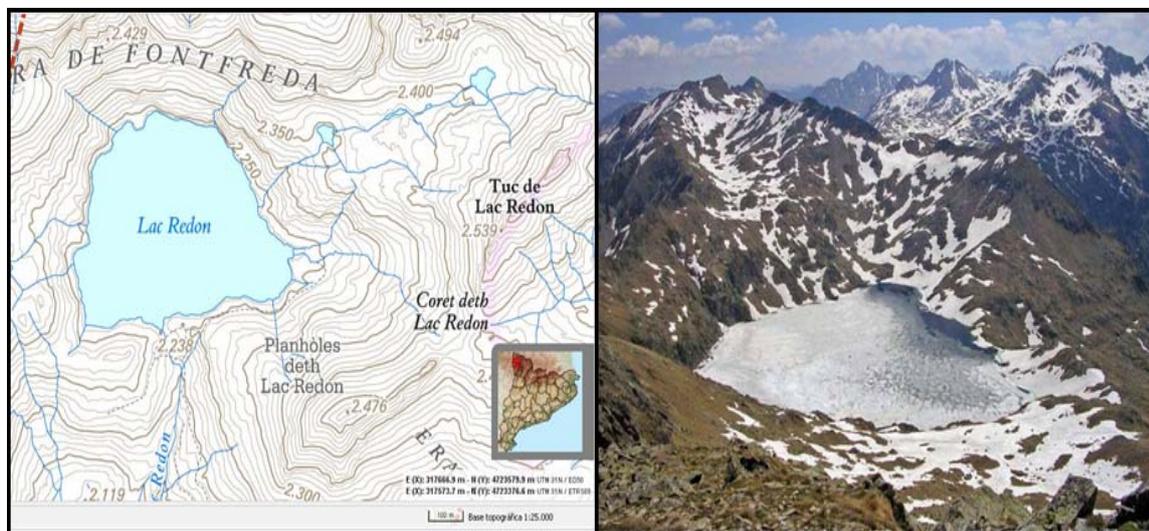


Figura 6. Mapa topográfico (1:25000 (tomado del Institut Cartogràfic de Catalunya) y fotografía del Estany Redon (tomado de <http://www.lacsdespyrenees.com/es/lac-1299-Esthan%20Redon.html>)

2.3.2 Medición de la actividad fagotrófica.

El protocolo de CARD-FISH explicado anteriormente (apartado 2.1.1), fue utilizado para determinar los grupos microbianos presentes en las muestras, así como la ingestión de bacterias y/o arqueas por parte de los protistas. Cuatro sondas oligonucleótidas (tabla 1) fueron usadas para la hibridación de los filtros.

Los filtros fueron examinados a x1000 aumentos para bacterias, arqueas y los protistas más pequeños (<10 μm), y a x400 aumentos para los protistas más grandes (>10 μm), bajo el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager. Para procariotas un mínimo

de 500 células fueron contadas para establecer su abundancia total (conteos de DAPI), estableciendo siempre el número de células hibridadas en la respectiva sonda con el fin de estimar la abundancia y el porcentaje de hibridación del grupo marcado. Adicionalmente, un mínimo de 100 células de cada uno de los grupos marcados, fueron medidas por medio del software de análisis de imagen AxioVision 4.8 para obtener el tamaño característico, el cual fue estimado como la raíz cuadrada del área. Por otra parte, para los protistas la forma y tamaño de los cloroplastos observados por autofluorescencia de la clorofila permitió la identificación de los individuos hasta nivel de género o especie cuando fue posible, y fueron contados hasta obtener un mínimo de 100 individuos de la especie más abundante. La observación paralela de las muestras por microscopía invertida, ayudo a la identificación de los individuos observados por fluorescencia. A cada individuo identificado y contado se le evaluó el número de presas que presentaba en su interior (contenido de la vacuola alimenticia). Para su cuantificación se establecieron las siguientes categorías: categoría 1, individuos que no presentaban células hibridadas en su interior; categoría 2, individuos que presentaban entre una y cinco células hibridadas en su interior; categoría 3, individuos con seis a diez células hibridadas en su interior, categoría 4, individuos con 11 a 20 células hibridadas en su interior y, finalmente, categoría 5 aquellos individuos con más de 20 células hibridadas en su interior.

Así pues para cada especie de protista en cada momento del día y para cada una de las sondas utilizadas, se obtuvo un patrón de actividad fagotrófica concreto. Con el fin de caracterizar dicho patrón se cálculo el promedio de ingestión (\bar{X}) y la desviación estándar (S) ponderados utilizando las siguientes fórmulas:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^5 F_i \times X_i}{\sum_{i=1}^5 F_i}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^5 X_i (F_i - \bar{X})^2}{\sum_{i=1}^5 (F_i - 1)}}$$

Donde, F_i es la frecuencia de individuos y X_i el contenido de presas asociado a cada una de las categorías de ingestión (i). El Valor de X_i se estableció como la media entre el contenido mínimo y el contenido promedio de la clase de ingestión.

2.3.3. Análisis Estadístico

ANOVAs de una y dos vías, fueron realizadas para analizar los cambios temporales de la composición del bacterioplancton. Para analizar los cambios en el tiempo de la actividad fagotrófica se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con el paquete estadístico STATISCA 7.1 (StatSoft, Inc). Por otra parte, ANOVAs basadas en permutaciones con el software PERMANOVA 1.0.1 (Primer-E), debido a que los datos carecían de normalidad y homocedasticidad, fueron usadas para determinar el efecto del tiempo y tipo de presa (grupo de procariota) sobre la ingestión de cada especie.

2.4 Variabilidad de la actividad fagotrófica entre lagos de montaña.

2.4.1 Área de estudio

Un gradiente altitudinal de 20 lagos con características físico-químicas y morfológicas diferentes de los Pirineos Centrales fue seleccionado para este estudio. Algunas de las características así como su ubicación se presentan en la tabla 2.

2.4.2 Toma y análisis de muestras

Durante 10 días del mes de Julio de 2008 los diferentes lagos fueron muestreados. Después de ubicar el punto de mayor profundidad, se realizaron medidas del disco de Secchi y perfiles de temperatura para caracterizar la estructura física de la columna de agua. Posteriormente, con ayuda de una botella Rutner, se tomó una muestra a 1,5 veces la profundidad del disco de Secchi que corresponde con la localización del máximo profundo de clorofila estival (Deep chlorophyll maximum DCM). En caso de lagos someros donde dicha profundidad superaba la del fondo, la muestra fue tomada entre 1-2 m por encima de este. En el caso de la Bassa d'Oles y la Bassa Nera no fue posible obtener la muestra del DCM, por lo cual se obtuvieron a 1 m por debajo de la superficie. De esta muestra se tomaron submuestras para la caracterización de la composición química, de la comunidad fitoplanctónica y de la actividad mixotrófica de esta.

2.4.3 *Parámetros químicos*

Con la muestra tomada para la química general, se realizaron medidas de conductividad y alcalinidad por titulación acidométrica. Los aniones (SO_4^{2-} , NO_3^- i Cl^-) y cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) mayoritarios fueron medidos por electroforesis capilar, y el amonio (NH_4^+) por espectrofotometría con el método del indofenol (Fresenius *et al.*, 1988). El fósforo total (TP) se obtuvo por digestión oxidativa con persulfato seguido de espectrofotometría con el método del verde de malaquita (Camarero 1994). El nitrógeno disuelto (TDN) por digestión oxidativa con persulfato a la autoclave, y la determinación de nitratos (NO_3^-) por espectrofotometría de radiación UV (Slanina *et al.*, 1976) y nitritos (NO_2^-) con el método de la sulfanilamida y naftil-etilen-diamida (Grasshoff *et al.*, 1983). Los silicatos (DRSi) fueron determinados por el método Koroleff (A.P.H.A. *et al.*, 1992). Por su lado, el carbono orgánico disuelto y el total (DOC y TOC) se determinaron por medio de un analizador Shimadzu TOC5000. Finalmente la determinación de pigmentos se realizó por extracción con acetona al 90%, mediciones del espectro de absorbancia y los cálculos de la concentración de clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) y clorofila c (Chlc) con las fórmulas de Jeffrey and Humphrey (1975). Las abundancias relativas de feopigmentos y carotenoides con relación a la clorofila se estimaron mediante los cocientes de las absorbancias $\text{Abs}_{443}/\text{Abs}_{413}$ y $\text{Abs}_{472}/\text{Abs}_{664}$ respectivamente.

2.4.4 *Actividad fagotrófica*

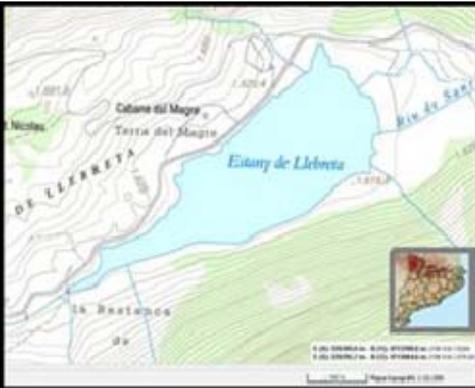
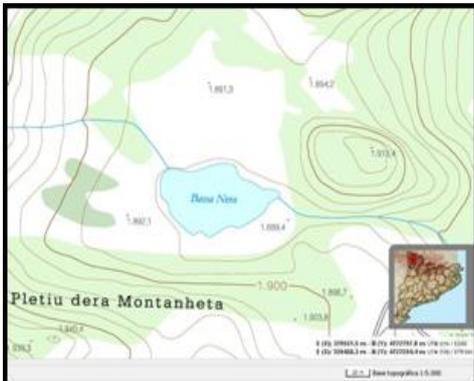
La muestra obtenida en cada lago fue dividida en dos submuestras, la primera fue fijada con Lugol alcalino al 0,5 % (v/v) para la posterior caracterización de la comunidad fitoplanctónica en el microscopio invertido (Sournia 1978). La segunda submuestras fue fijada con LFT y filtrada como se explicó en el apartado 2.1.1, para posteriormente realizar el CARD-FISH. Cuatro sondas oligonucleótidas (indicadas en la tabla 1) fueron utilizadas para la hibridación de los filtros.

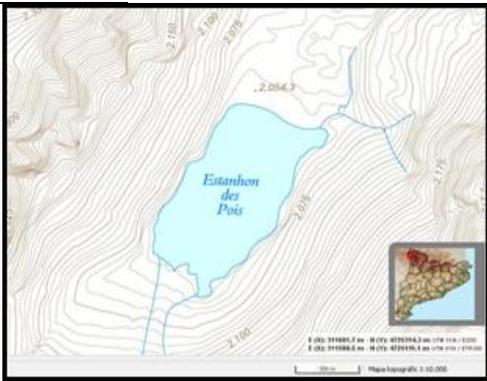
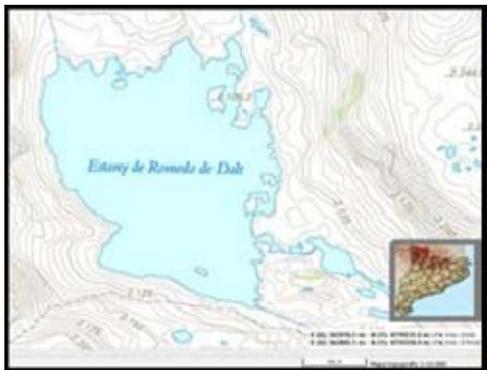
Los filtros fueron examinados x1000 aumentos para bacteria, arqueas y los protistas más pequeños (<10 μm), y a x630 aumentos para los protistas más grandes (>10 μm) bajo el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Imager. Un mínimo de 500 células para procariontas fueron contadas para establecer su abundancia (conteos de DAPI) y paralelamente se estableció el número de células hibridadas en cada una de las sondas utilizadas. Adicionalmente, un mínimo de 100 células de cada uno de los grupos marcados, fueron medidas por medio del software de análisis de imagen AxioVision 4.8 con el fin obtener el tamaño característico, el cual fue estimado como la raíz cuadrada del área. Observaciones paralelas de las muestras por epifluorescencia y por microscopia invertida fueron realizadas para la identificación de la comunidad fitoplanctónica. Para establecer la abundancia de cada grupo se contaron células hasta un mínimo de 100 de la especie más abundante. Adicionalmente para cada célula contada e identificada el número de procariontas que presentaban en su interior fue cuantificado (contenido de la vacuola alimenticia). Se establecieron 10 categorías de ingestión y se cálculo el promedio de ingestión (\bar{X}) y la desviación estándar (S) ponderados como se explicó en el apartado 2.3.2.

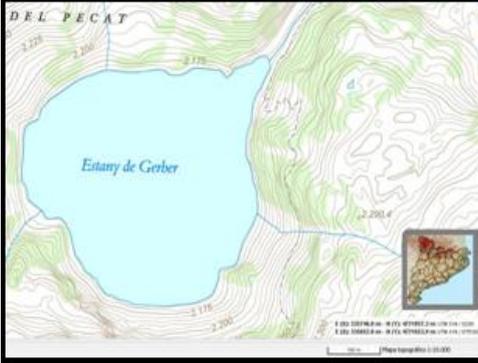
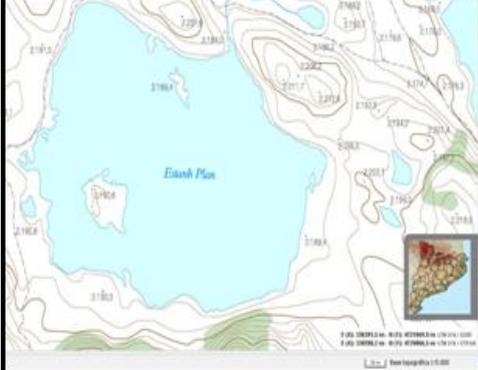
2.4.5 *Análisis estadístico*

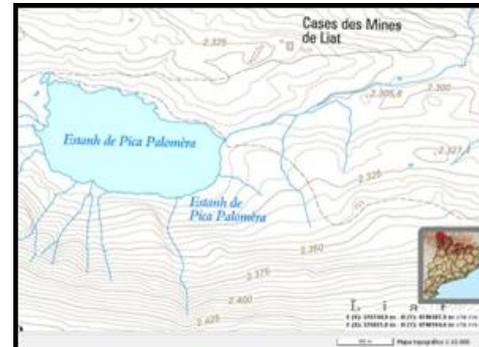
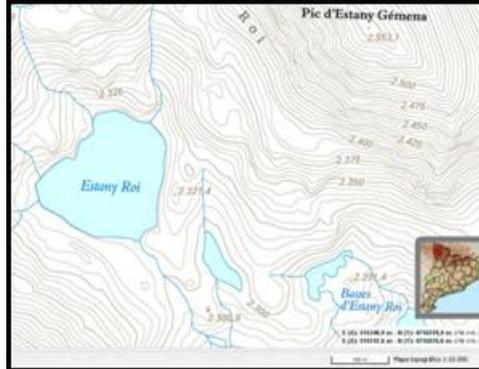
Los factores que condicionan la actividad fagotrófica de los protistas y el comportamiento selectivo sobre distintos tipos de presas se estudiaron mediante modelos lineales mixtos (Zuur *et al.*, 2009) , que consideran tanto factores d efectos fijos como de efectos aleatorios. Para ello se utilizó el paquete estadístico S-PLUS 6.1.

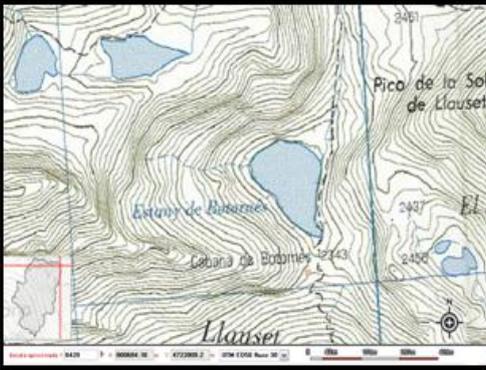
Tabla 2. Lagos seleccionados para el presente estudio. (Los mapas son tomados del Institut Cartogràfic de Catalunya y del Sistema de Información Territorial de Aragón). Fotografías tomadas de Joseph M Gasol, Jean Christophe Auguet, Hugo Sarmiento y google.com

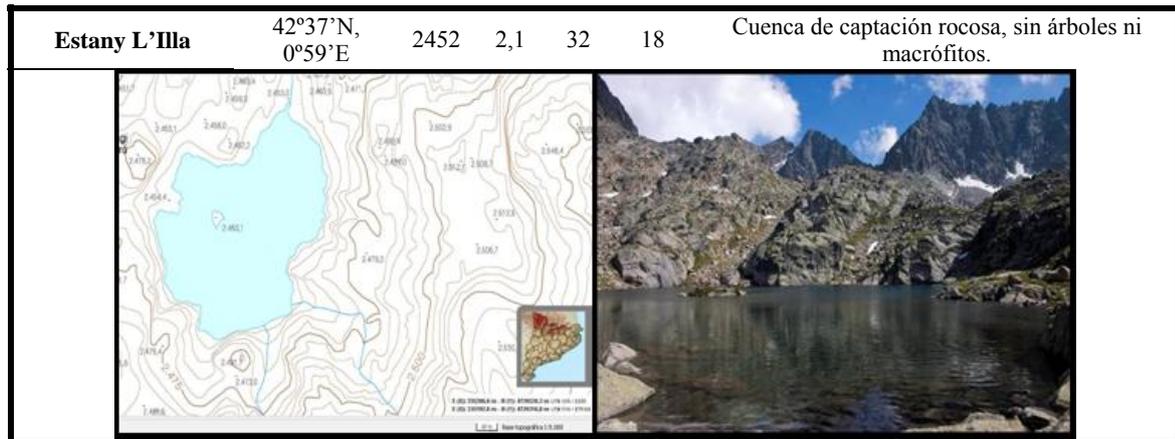
Lago	Coordenadas	Altitud (m.)	Área lago (ha.)	Área cuenca (ha)	Profundidad (m)	Característica
Bassa d' Oles	42°42'N, 0°46'E	1600	1,3	85	1	Pequeño con macrófitos
 						
Estany de Llebreta	42°33'N, 0°53'E	1620	1,3	5438	11,5	Árboles y macrófitos
 						
Bassa Nera	42°38'N, 0°55'E	1890	0,6	94	2	Turbera. Denso cinturón de macrófitos
 						

Estanhon des Pois	42°39'N, 0°42'E	2056	3,9	151	19.5	Ausencia de árboles y macrófitos. Cuenca de captación rocosa.
						
Estany Romedo de Dalt	42°42'N, 1°19'E	2114	14,4	260	40	Con algunos árboles y macrófitos. Cuenca de captación rocosa.
						
Estanh Long de Liat	42°48'N, 0°52'E	2140	27,1	177	32	Pradera
						
Estany de Felià	42°27'N, 0°57'E	2140	1,4	148	5.5	Pradera sin árboles y algunos macrófitos
						

Estany de Gerber	42°37'N, 0°59'E	2170	14,9	388	63	Sin macrófitos, ubicado sobre la línea límite de bosque
						
Estanh Plan	42°37'N, 0°55'E	2188	5	23	11	Cuenca de captación rocosa, con algunos árboles y macrófitos.
						
Embalse de Llauset	42°39'N, 0°41'E	2190	44,3	778	90	Embalse sin la presencia de árboles y macrófitos.
						
Estany Redon	42°38'N, 0°46'E	2240	24		73	
						

Ibonet Perramó	42°38'N, 0°29'E	2293	0,7	18	5	Pequeño lago sobre la línea límite de bosque sin macrófitos.
						
Estanh de Pica Palomèra	42°47'N, 0°52'E	2308	4,9	69	10	Lago ácido sin presencia de árboles ni macrófitos
						
Estany Roi	42°34'N, 0°48'E	2310	3,5	117	10	Cuenca de captación rocosa, sin árboles ni macrófitos.
						
Bassa de les Granotes	42°34'N, 0°58'E	2330	0,7	3	5	No presenta salida de agua, árboles presentes en la cuenca de captación.
						

Estany de Certascan	42°42'N, 1°18'E	2335	56,9	421	113.1	Lago largo y profundo, sin árboles ni macrófitos.
						
Estany de Botornàs	42°35'N, 0°40'E	2340	3,7	290	22	Cuenca de captación rocosa, sin árboles ni macrófitos.
						
Estany d' Aixeus	42°36'N, 1°22'E	2370	3,4	82	15.5	Lago ácido sin presencia de árboles ni macrófitos
						
Estanh de Pòdo	42°36'N, 0°56'E	2450	4,6	33	20	Cuenca de captación rocosa, sin árboles ni macrófitos.
						



Capítulo I

Calibración del contenido vacuolar como tasas de ingestión

3. Resultados

3.1 Patrones luz/oscuridad de la actividad fagotrófica

Las concentraciones promedio de procariotas (conteos de DAPI), Betaproteobacteria y protistas tanto para el lago Cisó, como para los diferentes cultivos, se encuentran registradas en la tabla 3. Tanto para procariotas como para protistas, el lago Cisó presentó menor abundancia con respecto a los cultivos. De estos últimos, el cultivo de *Chroomonas* sp. presentó la mayor cantidad de bacterias mientras que el de *O. tuberculata* la menor.

Todas las especies presentaron ingestión de microesferas y se observaron bacterias hibridadas en su interior (figura 7). Las tasas estimadas de ingestión promedio encontradas en las especies de cultivo estuvieron dentro del rango de 0.3 y 20 procariotas protista⁻¹ h⁻¹ siendo *C. ovata* y *Chroomonas* sp. las más activas. En la muestra del Cisó la actividad fue más baja y las tasas de ingestión promedio encontradas estuvieron entre 0.3 y 2.8 procariotas protista⁻¹ h⁻¹ (figura 8 y 9). Por otro lado, el contenido en las vacuolas alimenticias estuvo en el rango de 0,04 a 2 procariotas protista⁻¹ en el caso de las especies en cultivo y entre 0.06 y 0.2 para las Cryptophyta del Cisó (figura 8 y 9).

Tabla 3. Abundancia promedio de procariotas totales (conteos DAPI), procariotas hibridadas con la sonda (Betaproteobacteria) y protistas en cada una de las muestras utilizadas en este estudio

Muestra		Conteos DAPI (10 ⁶ cel ml ⁻¹)		Betaproteobacteria 10 ⁶ cel ml ⁻¹	Protistas 10 ³ cel ml ⁻¹
		CARD-FISH	Microesferas		
Lago Cisó	<i>Cryptomonas</i> sp.1	4,38 ± 0,84	6,35 ± 0,69	1,50 ± 0,17	0,94 ± 0,17
	<i>Cryptomonas</i> sp.2	4,38 ± 0,84	6,35 ± 0,69	1,50 ± 0,17	1,75 ± 0,36
Cultivos	<i>C. ovata</i>	84,86 ± 11,72	44,70 ± 12,98	16,3 ± 2,34	53,04 ± 7,26
	<i>Chroomonas</i> sp.	152,47 ± 8,18	122,83 ± 13,49	41,7 ± 8,34	116,20 ± 20,78
	<i>O. tuberculata</i>	12,40 ± 2,22	9,24 ± 1,24	3,70 ± 3,35	103,30 ± 39,16

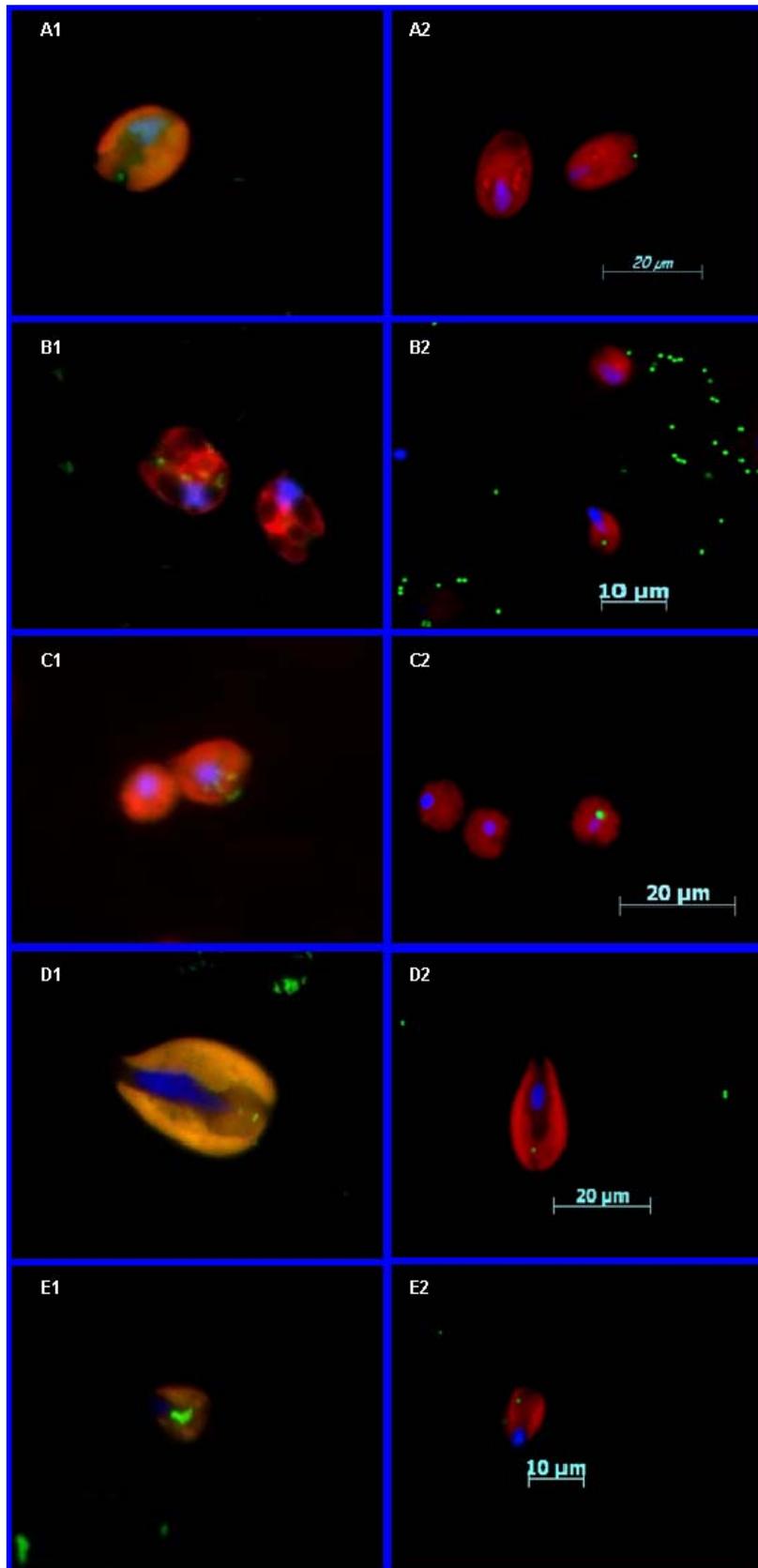


Figura 7. Protistas mixotróficos con ingestión de bacterias (1) y microesferas (2): (A) *C. ovata*, (B) *Chroomonas* sp., (C) *O. tuberculata*, (D) *Cryptomonas* sp.1 y (E) *Cryptomonas* sp.2

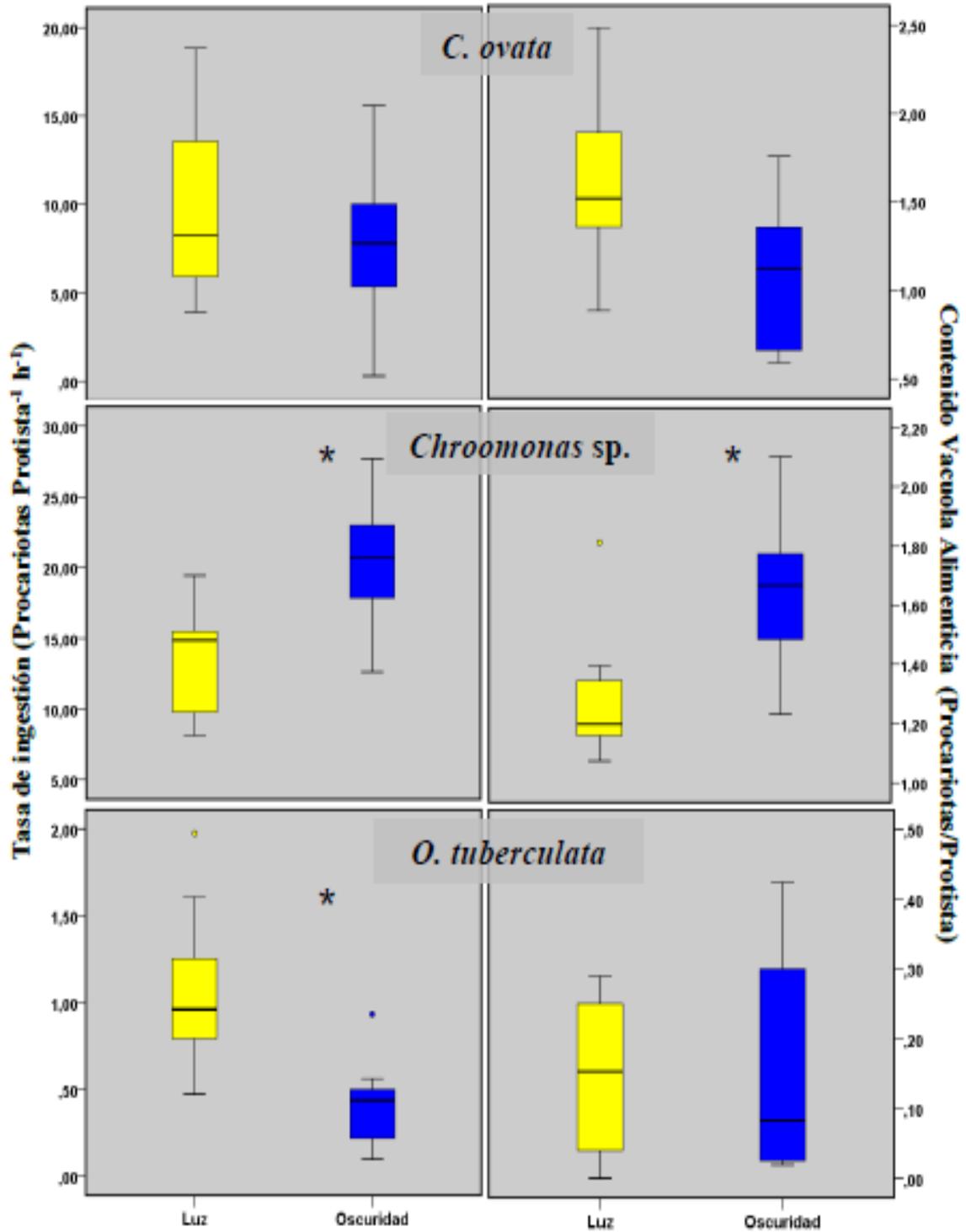


Figura 8. Comparación entre las tasas de ingestión y contenido de la vacuola alimenticia de las tres especies de cultivo en condiciones de luz y oscuridad (*ANOVA $P < 0,05$).

Diferencias entre la actividad en condiciones de luz y oscuridad fueron observadas en las diferentes especies y con los dos métodos. *C. ovata* exhibió una actividad levemente mayor en condiciones de luz con respecto a la oscuridad, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa con ninguna de las dos técnicas (figura 8). *O. tuberculata* y *Cryptomonas* sp.1 y sp.2 así mismo presentaron mayor actividad bajo condiciones de luz, las diferencias son estadísticamente significativas para las tasas de ingestión estimadas a partir de las microesferas (figura 8 y 9). Por su parte *Chroomonas* sp. presentó un patrón opuesto con mayores actividades en oscuridad (figura 8), diferencias que aparecen significativas con ambos métodos (ANOVA $P < 0,05$).

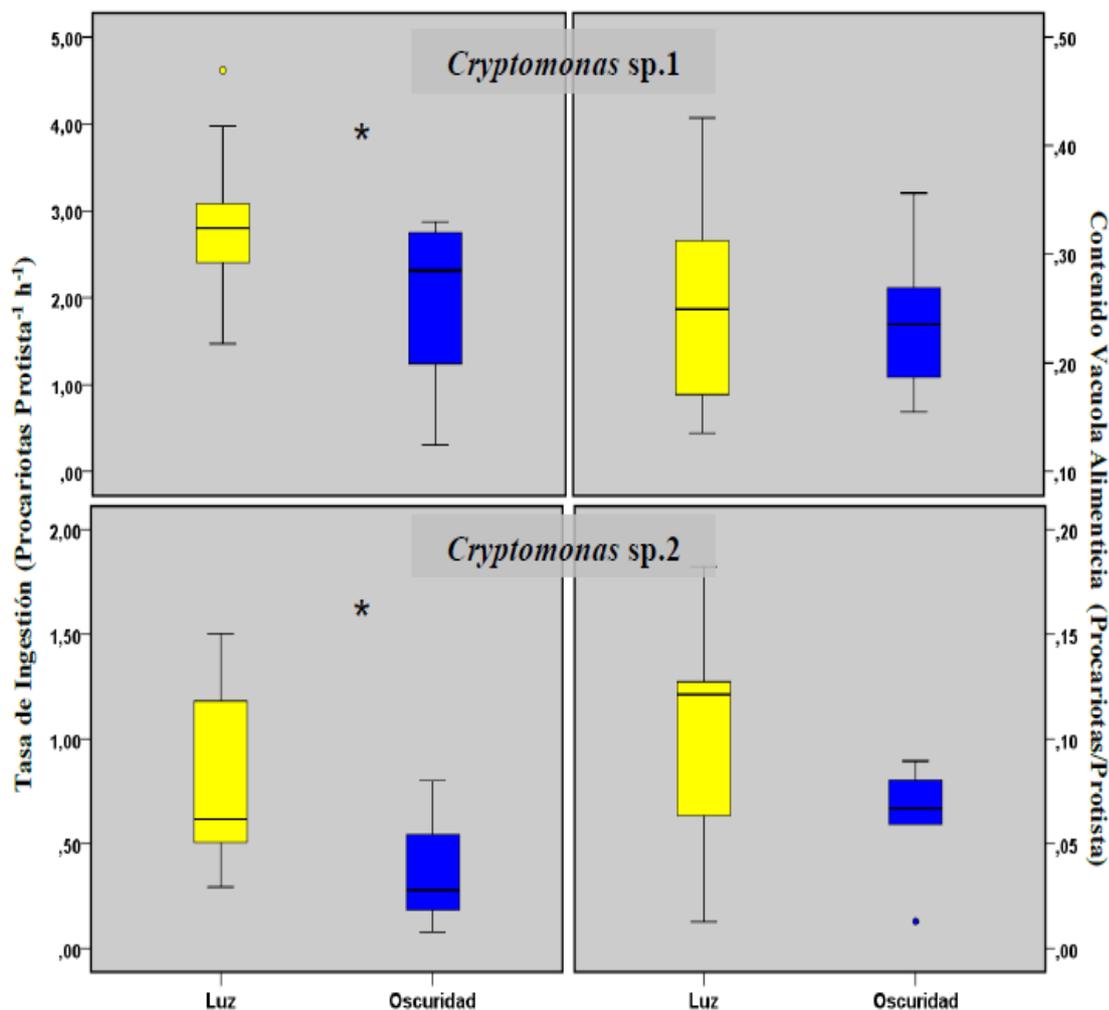


Figura 9. Comparación entre las tasas de ingestión y contenido de la vacuola alimenticia de las dos Cryptophyta del Cisó en condiciones de luz y oscuridad (*ANOVA $P < 0,05$)

3.2 Cambios temporales del comportamiento fagotrófico

Con el fin de caracterizar la variación temporal de la actividad fagotrófica de las especies, se calcularon las diferencias del contenido de vacuolas alimenticias obtenido por CARD-FISH entre los consecutivos intervalos de tiempo y se compararon con el promedio de las tasas de ingestión estimadas por la captura de microesferas (figuras 10, 11 y 12). De esta manera es posible evaluar los procesos de ingestión y digestión en cada una de las especies. Tendencias negativas o positivas en las tasas de ingestión indicarían mayor o menor captura de presas por parte de los flagelados, mientras que los cambios en el contenido de las vacuolas indican el balance entre la ingestión y la digestión de las presas en el intervalo de tiempo concreto. Por ejemplo valores negativos en la diferencia del contenido de las vacuolas revelan una mayor importancia de los procesos digestivos (tasa de digestión mayor que la tasa de ingestión) en ese tiempo concreto.

Las especies presentaron comportamientos diferentes: *C. ovata* presentó una tendencia positiva de ingestión en el periodo de cambio entre oscuridad y luz que se alarga durante la primera parte del ciclo de luz (figura 10). Así mismo, presentó dos valores negativos en el cambio del contenido de las vacuolas en momentos de oscuridad indicando un dominio de los procesos digestivos. *O. tuberculata* por su parte, presentó una tendencia de aumento en la captura de presas similar a *C. ovata* pero un solo momento, en el periodo intermedio de oscuridad, donde el balance ingestión-digestión fue negativo (figura 10). *Chroomonas* sp. tendió a aumentar la captura de presas durante la primera mitad del periodo de oscuridad y luego disminuyó hasta el final del experimento. Así mismo, presentó tres momentos en que el balance ingestión-digestión se inclinó hacia la digestión, uno en el periodo de oscuridad, otro en el cambio de oscuridad a luz y el último bajo condiciones de luz (figura 11).

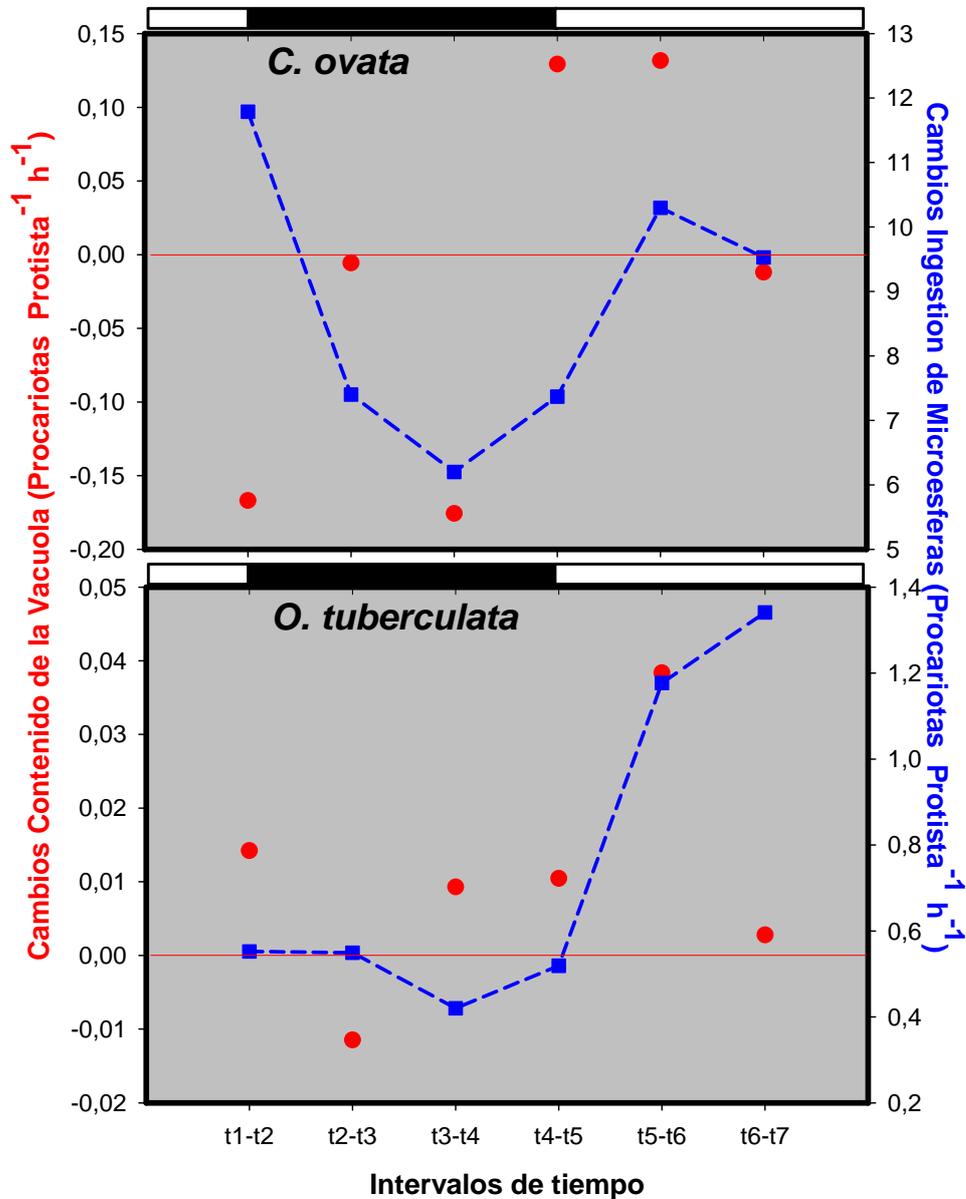


Figura 10. Comparación entre los cambios en el contenido de la vacuola alimenticia y la tasa de ingestión promedio en los diferentes intervalos de tiempo para *C. ovata* y *O. tuberculata*. La franja negra en el eje superior indica el periodo de oscuridad.

En las especies del Cisó se observó una tendencia positiva de la ingestión en el intervalo de cambio entre oscuridad y luz, sin embargo, las dos especies difirieron en su actividad digestiva. La *Cryptomonas* sp.1 presentó dos momentos de mayor digestión: uno en condiciones de oscuridad y otro en momentos de luz, mientras que *Cryptomonas* sp.2 presentó tres, dos de ellos en oscuridad y uno en condiciones de luz (figura 12).

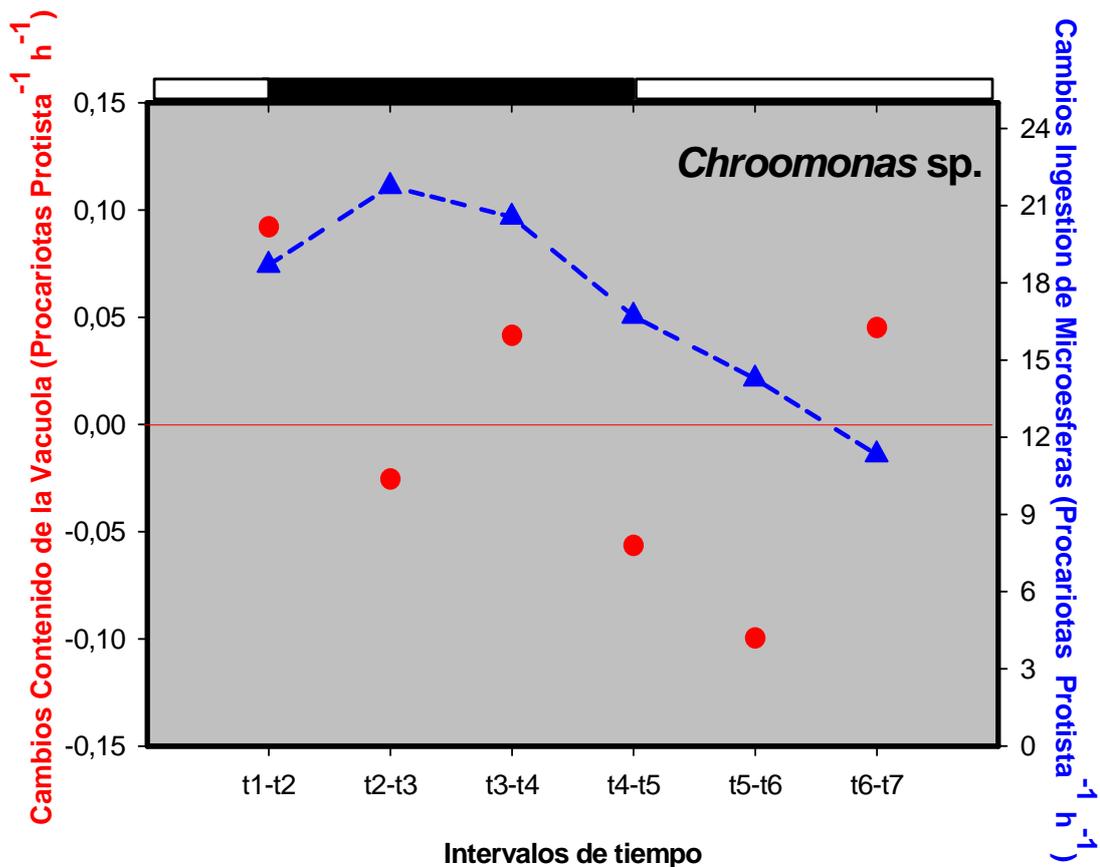


Figura 11. Comparación entre los cambios en el contenido de la vacuola alimenticia y la tasa de ingestión promedio en los diferentes intervalos de tiempo para *Chroomonas sp.*. La franja negra en el eje superior indica el periodo de oscuridad.

Finalmente, considerando todas las especies y tiempos, se relacionó el contenido de las vacuolas alimenticias y las tasas de ingestión (figura 13). De esta forma, a partir de la pendiente de la regresión se estimó las tasas de digestión y el tiempo de vida media de una bacteria en el interior de una vacuola digestiva. Así, la tasa de ingestión general para todas las especies en su conjunto fue de $8,7 \pm 0,8$ procariontes protista $^{-1} h^{-1}$ que equivaldría a un tiempo de vida media aproximado de 7 min. Igualmente, se evaluó por separado la tasa de ingestión para las especies con tamaños mayores a $10 \mu m$ (*C. ovata*, *Cryptomonas sp1.* y *O. tuberculata*) y la de especies menores a este tamaño (*Chroomonas sp.* y *Cryptomonas sp2.*). Las tasas de ingestión estimadas fueron de $5,6 \pm 0,7$ procariontes protista $^{-1} h^{-1}$ que representaría una vida media de la presa en el interior del depredador de 10 min para las especies de mayor tamaño. Mientras que para las especies pequeñas la tasa de ingestión estimada fue mayor ($11,8 \pm 0,9$ procariontes protista $^{-1} h^{-1}$) requiriendo un tiempo de 5 min para digerir una bacteria. Las diferencias

entre las rectas de regresión obtenidas para las especies grandes y para las pequeñas son estadísticamente significativas ($F = 19,72$; $P < 0,05$).

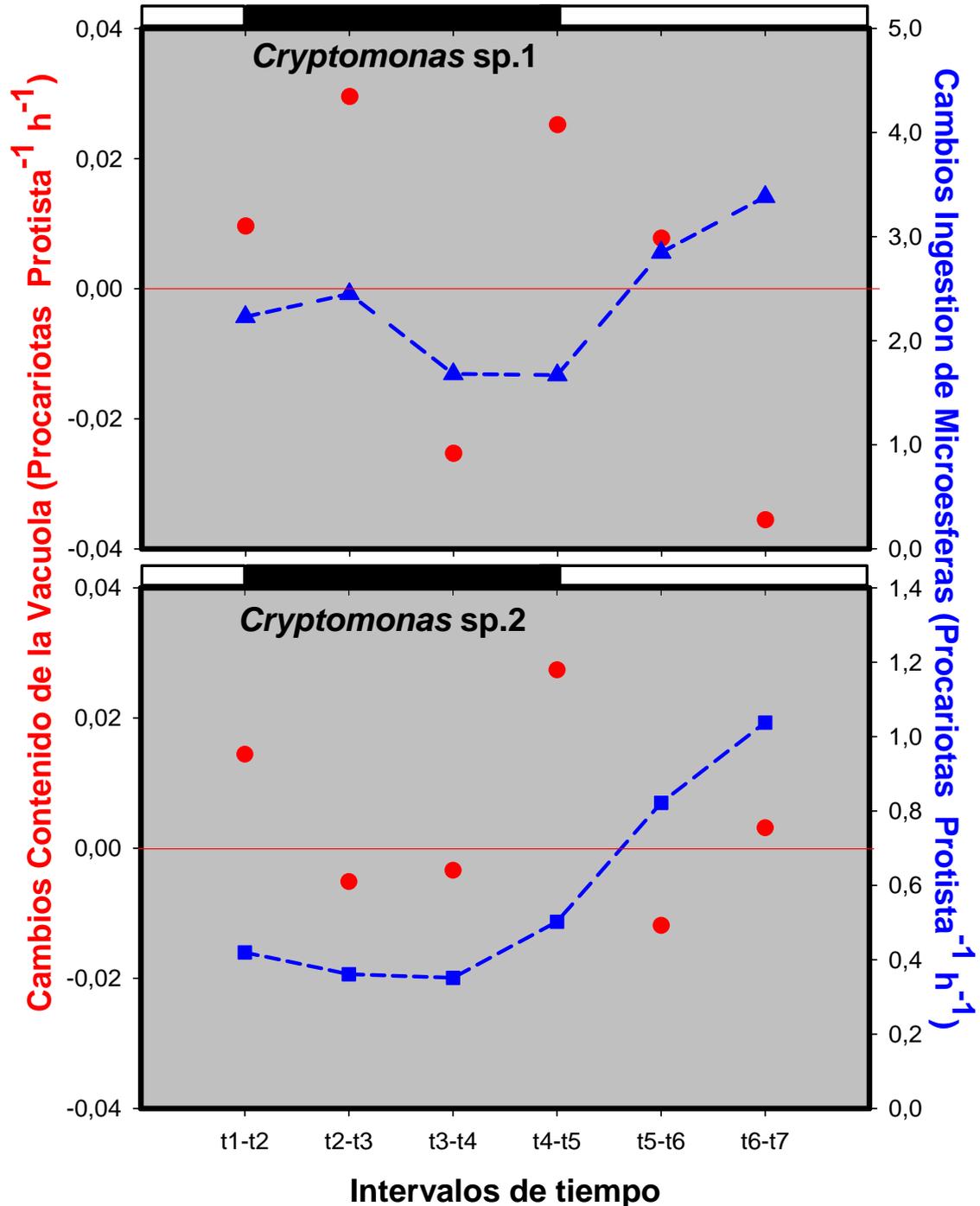


Figura 12. Comparación entre los cambios en el contenido de la vacuola alimenticia y la tasa de ingestión promedio en los diferentes intervalos de tiempo para las Cryptophyta del Cisó. La franja negra en el eje superior indica el periodo de oscuridad.

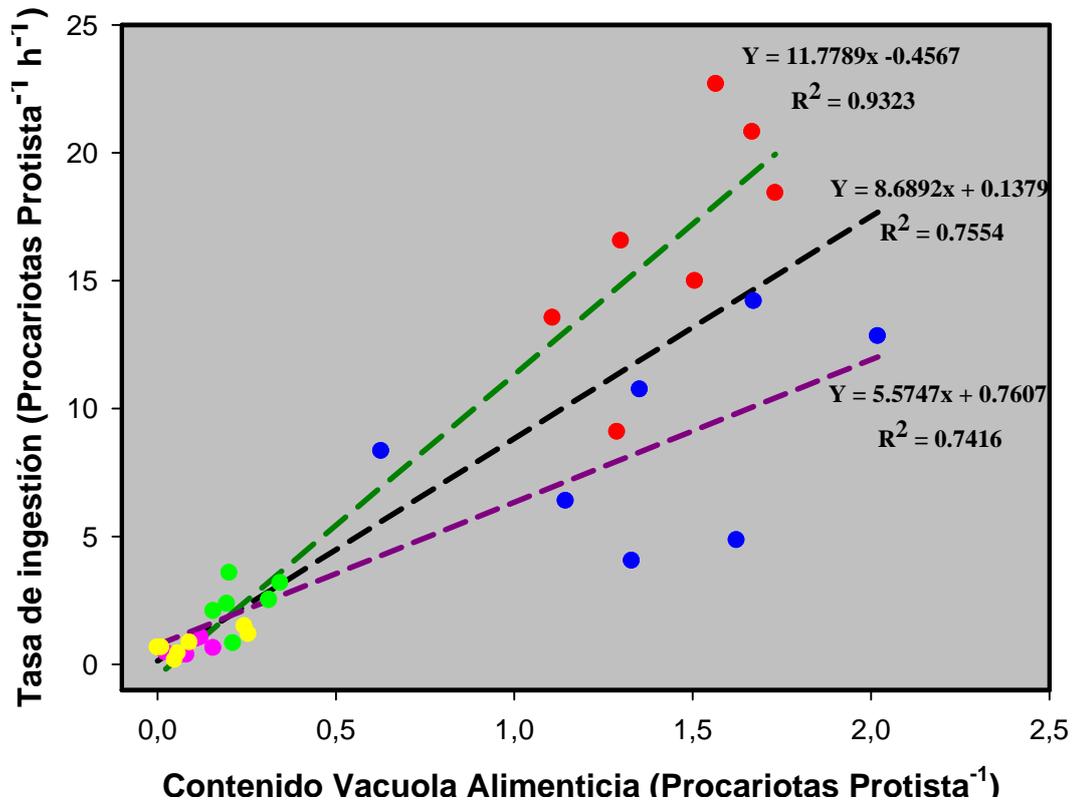


Figura 13. Relación entre la tasa de ingestión estimada por microesferas y el contenido de las vacuolas alimenticias medidos por CARD-FISH. Los colores de los puntos indican especies: *C. ovata* (azul), *Chroomonas* sp. (rojo), *O. tuberculata* (amarillo), *Cryptomonas* sp.1 (verde) y *Cryptomonas* sp.2 (rosa). Las líneas muestran las rectas de regresión obtenidas, considerando tres conjuntos de datos respectivamente: todas las especies a la vez (negra); valores para las especies mayores a $10\mu\text{m}$ (verde) y valores para las especies menores a $10\mu\text{m}$ (morado).

4. Discusión

La importancia de la actividad fagotrófica ha sido estudiada en diversas especies mixotróficas. Tasas de ingestión han sido reportadas tanto para especies de cultivo como en sistemas naturales, en rangos que pueden variar de muy poca actividad ($0,01$ procariotas protista $^{-1}$ h $^{-1}$) hasta actividades mucho más altas, que pueden alcanzar valores de 63 a 89 procariotas protista $^{-1}$ h $^{-1}$ (Bird and Kalff 1989, Sanders *et al.*, 1990, Marshall and Laybourn-Parry 2002). En el presente estudio se obtuvieron tasas de ingestión que se encuentran dentro de estos rangos, sin embargo, entre las especies se observaron claras diferencias: las dos Cryptophyta procedentes de cultivos presentaron mayores tasas de ingestión que las especies procedentes del lago. *O. tuberculata* exhibió

bajas tasas de ingestión comparada con las otras especies de cultivo, aunque similares a las encontradas por Porter (1988) para ésta misma especie ($0,83 \text{ procariotas protista}^{-1} \text{ h}^{-1}$), y a las reportadas para otras especies del genero *Ochromonas* (Porter 1988, Pålsson *et al.*, 2005, Shannon *et al.*, 2007).

Estudios que evalúan el contenido de las vacuolas alimenticias han sido realizados especialmente en ciliados y flagelados heterotróficos (Capriulo and Degnan 1991, Boenigk *et al.*, 2001a, Li *et al.*, 2001, Jezbera *et al.*, 2005), sin embargo, en estos se evalúa la ingestión de presas grandes, especialmente microalgas, que son relativamente fáciles de distinguir dentro de una vacuola gracias a la autofluorescencia de la clorofila. Jezbera *et al.* (2005) utilizó el método del FISH para evaluar la composición de las vacuolas alimenticias de dos especies de flagelados heterotróficos y un ciliado, encontrando ingestiones de 1,3 a 3,5 bacterias protista⁻¹ para los primeros y de 21 a 23 bacterias protista⁻¹ para el segundo. En el presente estudio por medio del método del CARD-FISH se obtuvieron valores similares a los reportados para los flagelados especialmente en la especie con mayor actividad como fueron *C. ovata* o *Chroomonas* sp. Es de destacar, que hasta el momento, este es el primer trabajo que cuantifica el número de presas procariotas presentes en las vacuolas alimenticias de flagelados mixotróficos.

Las tasas de ingestión de bacterias así como el contenido de bacterias de las vacuolas alimenticias presentaron diferencias en función de la disponibilidad de luz (figura 8 y 9). De las cinco especies estudiadas cuatro presentaron mayores actividades bajo condiciones de luz mientras que *Chroomonas* sp. lo hizo en momentos de oscuridad. El efecto de la luz sobre la actividad fagotrófica en diferentes protistas ha sido documentado tanto en condiciones de cultivo (Porter 1988, Caron *et al.*, 1993, Flöder *et al.*, 2006) como en condiciones naturales (Urabe *et al.*, 2000). Este efecto diverso de la luz podría estar relacionado con la finalidad que cumple la fagotrofia en la especie concreta es decir, de los beneficios que obtienen de la ingestión de presas. Así, las especies que mayor actividad presentaron en condiciones de luz, podrían estar obteniendo nutrientes principales como nitrógeno o fósforo de sus presas, que les permitiría equilibrar su estequiometría cuando fijan carbono por fotosíntesis, en los

momentos de oscuridad, esta obtención de carbono fotosintético cesaría, y por lo tanto, no sería necesario mantener una actividad fagotrófica alta. Esto ha sido sugerido por Urabe *et al.* (2000) que reportaron diferentes actividades durante el día y la noche en *Cryptomonas ovata*. En algunos estudios se ha visto que el estrés o la fotoinhibición producida por dosis muy elevadas de luz pueden comportar un aumento de la fagotrofia en algunas especies (Medina-Sánchez *et al.*, 2004). Sin embargo, es poco probable que este sea el caso del presente estudio, puesto que las magnitudes referenciadas exceden los niveles de luz en el que fueron mantenidos los sistemas de cultivo.

Chroomonas sp. que exhibió el comportamiento opuesto respecto a la luz, podría utilizar la fagotrofia como una fuente adicional o principal de carbono en momentos en que este no es aportado por la fotosíntesis. Esto es sugerido por el aumento de la concentración de esta especie en los momentos de luz por lo cual es posible pensar que mientras en la oscuridad utiliza la fagotrofia para obtener carbono y nutrientes, en momentos de luz lleva a cabo la división celular. Aunque quizás, la explicación puede estar ligada a la obtención de productos bioquímicos importantes en determinadas funciones fisiológicas como se ha descrito en algunas especies (Boëchat *et al.*, 2007).

La concentración de las presas también ha sido propuesta como un factor que afecta las tasas de ingestión de protistas fagotróficos (Porter 1988, Capriulo 1990). Un mayor número de presas, aumentaría la probabilidad de encuentro con el depredador y por lo tanto una mayor posibilidad de ser capturada e ingerida. A pesar de que las abundancias de presas y depredadores variaron entre los diferentes sistemas de cultivo y el lago Cisó (tabla 3), la proporción depredador-presa fue similar en todas (1:1000 aprox.) con excepción del cultivo de *O. tuberculata* (1:100 aprox.) en el cual la probabilidad de encuentro entre el depredador y su presa podría ser menor y explicar su menor actividad fagotrófica con respecto a las otras especies de cultivo.

La actividad fagotrófica de los protistas mixotróficos así como su impacto sobre las comunidades bacterianas generalmente se ha enfocado en el proceso de ingestión, principalmente por las limitaciones metodológicas que conlleva la utilización de presas inertes que pueden ser rápidamente expulsadas por los organismos (Boenigk *et al.*,

2001a, b). De esta manera, los procesos digestivos así como las tasas a las que ocurren son poco conocidas. La comparación entre la ingestión de presas artificiales y los contenidos de las vacuolas alimenticias marcados con CARD-FISH ha permitido evaluar la digestión y estimar las tasas en que ocurren para las diferentes especies.

Las diferencias entre las tasas de ingestión y los contenidos de la vacuola permiten inferir diferencias en el comportamiento de las diferentes especies estudiadas. Las Cryptophyta pequeñas (*Chroomonas* sp. y *Cryptomonas* sp.2) parecen digerir inmediatamente las presas una vez son ingeridas, lo cual lleva a que menos presas sean observadas en las vacuolas a pesar que sus tasa de ingestión permanezcan altas como en el caso de *Chroomonas* sp. (figura 11). Por el otro las Cryptophyta grandes y la Chrysophyta *O. tuberculata* parecen tener un comportamiento contrario, almacenando o reteniendo por más tiempo las presas ingeridas en sus vacuolas antes de ser digeridas, lo cual conlleva a que la probabilidad de encontrar presas en su interior en un momento específico sea mayor.

Estas diferencias entre especies fueron observadas además en las tasas de digestión estimadas. Estas tasas y los tiempos de vida media de una bacteria en la vacuola alimenticia son bajos comparados con aquellos reportados para otros protistas, especialmente ciliados (Nilsson 1977, Fok *et al.*, 1982, Sherr *et al.*, 1988, Capriulo and Degnan 1991, Boenigk *et al.*, 2001a). Sin embargo son similares a los reportados por Boenigk *et al.* (2001a) para flagelados heterotróficos. La digestión puede ser influenciada por la temperatura (Sherr *et al.*, 1988, Capriulo and Degnan 1991, Dolan and Coats 1991), estado fisiológico del protista (Shannon *et al.*, 2007), así como la composición y digestibilidad de la presa (González *et al.*, 1993, Boenigk *et al.*, 2001a, b). De estos factores, el más importante parece ser la temperatura debido a la actividad enzimática que requiere el proceso de digestión (Sherr *et al.*, 1988, Capriulo 1990). En el presente estudio todas las mediciones se realizaron a la misma temperatura (20 °C), lo que sugiere que algún otro u otros factores adicionales son los responsables de las diferencias entre especies observadas.

Los resultados del presente trabajo muestran que el tamaño de los flagelados es un factor importante que influye sobre la tasa de digestión. Un flagelado pequeño, tendría una menor volumen para ser ocupado por vacuolas alimenticias y podrían acumular menor cantidad de presas en su interior, por lo cual, la velocidad en que una vacuola llena es vaciada y disponible para ser reutilizada o degradada liberando el espacio para la formación de nuevas, podría ser crucial en la optimización de la actividad fagotrófica. Por el contrario, aquellos flagelados mayores, podrían tener un mayor número de vacuolas o vacuolas de mayor tamaño y por lo tanto el tiempo en que las presas permanecen en éstas podría ser mayor, implicando tasas de digestión menores. Un efecto indirecto similar del tamaño de los flagelados sobre la digestión es reportado por González *et al.* (1993), quien encontró que flagelados alimentados con bacterias limitadas por recursos presentaban un mayor biovolumen y digerían a una menor velocidad que aquellos de menor tamaño alimentados con presas en estado de crecimiento exponencial que digerían a mayor velocidad.

La similitud de los resultados obtenidos con la ingestión de microesferas y el contenido de las vacuolas alimenticias marcadas con el CARD-FISH, sugiere que este último podría reflejar las tasas de ingestión por lo menos a escala de minutos, de esta forma utilizando los valores de las tasas de digestión estimadas en este trabajo, diferenciadas para especies pequeñas ($<10\ \mu\text{m}$) y grandes ($>10\ \mu\text{m}$), podrían ser utilizadas para estimar las tasas de ingestión sin necesidad de utilizar presas artificiales. Así mismo, las diferencias observadas entre especies pequeñas y grandes plantean la necesidad de tener en cuenta el tamaño del depredador a la hora de realizar estimas de flujos de carbono y nutrientes.

Capítulo II

Actividad fagotrófica en un lago de alta montaña a lo largo del día

5. Resultados

5.1 Características del sistema

Las características químicas del Estany Redon durante el mes de agosto de 2004, se encuentran sintetizadas en la tabla 4. La concentración de fósforo total durante los cuatro momentos de muestreo varió de 50 a 62 nat-g l⁻¹, mientras que la fracción reactiva disuelta varió de 0 a 2,77 nat-g l⁻¹. El lago presentó una termoclina entre los 7 y 11 m de profundidad con temperaturas superficiales de 13-14 °C e inferiores a 6 °C a partir de los 20 m. La zona fótica se extendió al menos hasta los 40 m, 10 % PAR a 20 m y 1 % PAR a 40 m. La penetración de la radiación UV era elevada, a 12 m llegaba al 1 % del UVB mientras que esa misma proporción de UVA llegaba casi a los 30 m.

Tabla 4. Parámetros químicos del Estany Redon en agosto de 2004.*

Parámetro	Promedio	DS	Mínimo	Máximo
pH	6,72	0,29	6,25	7,08
Alcalinidad (µeq l ⁻¹)	53,5	4,01	50	63
Conductividad (µS cm ⁻¹)	11,17	0,32	10,9	11,8
Na ⁺ (µeq l ⁻¹)	12,24	1,61	8,64	14,11
K ⁺ (µeq l ⁻¹)	1,94	0,68	0,83	3,05
Ca ₂ ⁺ (µeq l ⁻¹)	77,08	3,84	72,82	83,12
Mg ₂ ⁺ (µeq l ⁻¹)	6,91	0,66	5,3	7,75
Cl ⁻ (µeq l ⁻¹)	221,43	0,93	5,71	8,67
NO ₂ ⁻ (µeq l ⁻¹)	0,08	0,04	0,02	0,14
NO ₃ ⁻ (µeq l ⁻¹)	10,33	0,75	9,47	11,61
NH ₄ ⁺ (µeq l ⁻¹)	0,77	0,36	0,36	1,42
SO ₄ ²⁻ (µeq l ⁻¹)	22,37	1,57	20,34	25,58
DIC (mg C l ⁻¹)	0,95	0,23	0,76	1,44
DOC (mg C l ⁻¹)	0,42	0,11	0,26	0,58
DRSi (µat-g l ⁻¹)	10,08	1,47	8,41	12,84
PC (µat-g l ⁻¹)	9,59	2,36	5,93	12,57
PN (µat-g l ⁻¹)	1,27	0,31	0,79	1,67
PP (nat-g P l ⁻¹)	34,74	5,6	25,46	41,58
TDP (nat-g P l ⁻¹)	23,46	10,64	10,82	44,86

*PC, carbono particulado; PN, nitrógeno particulado; PP, fósforo particulado; DRSi, silicio disuelto reactivo.

5.2 Comunidad de procariotas

La abundancia de procariotas estimada a partir del promedio de conteos de DAPI para todas las sondas en las diferentes horas de muestreo osciló entre $3,5 \times 10^5 \pm 5,1 \times 10^4$ y $5,2 \times 10^5 \pm 7,6 \times 10^4$ cel ml⁻¹, presentando diferencias significativas en el tiempo (figura 14) (ANOVA P<0,05). Las mayores abundancias se observaron durante la noche y madrugada y disminuyeron en horas de mañana y tarde. El total de células hibridadas osciló entre $9,8 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$ y $2,0 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$ cel ml⁻¹, que corresponde a un porcentaje de hibridación entre el 27-37 %, el cual no mostró diferencias significativas en el tiempo (ANOVA P>0,05).

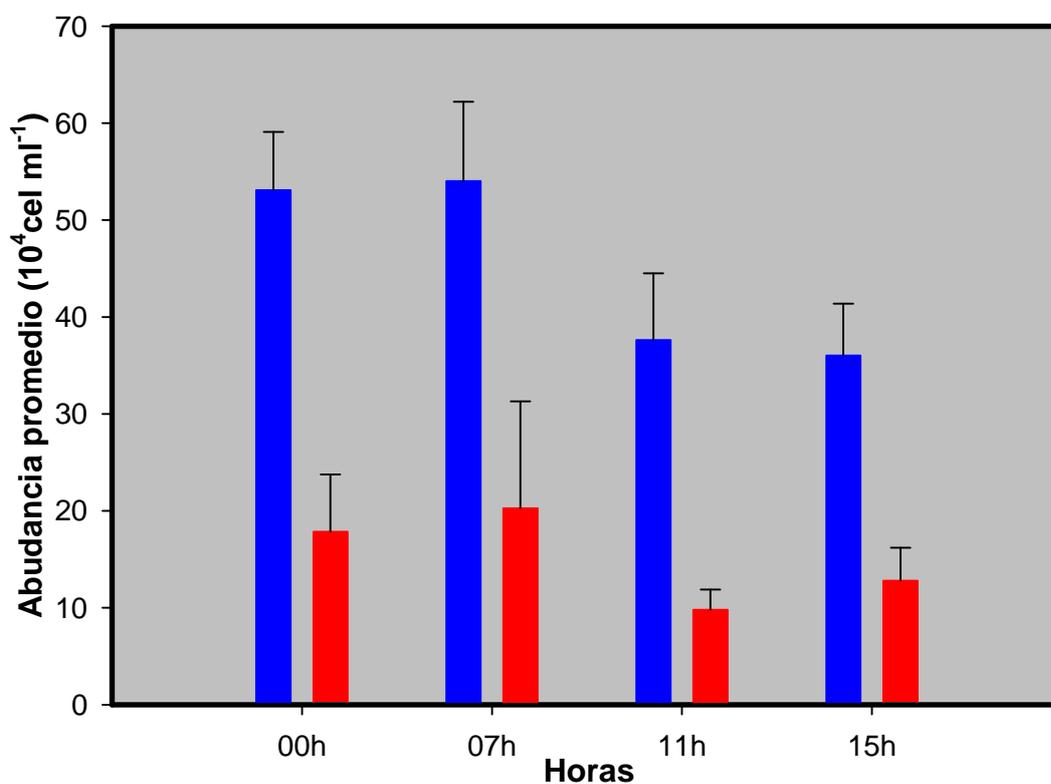


Figura 14. Promedio de conteos de DAPI (azul) y número de células hibridadas (todas las sondas, rojo) en los cuatro tiempos.

Con respecto a la composición de la comunidad de procariotas, el grupo de las Betaproteobacteria (*Betap*) mostró las mayores abundancias, representando entre el $12,40 \pm 3,27$ % y el $20,16 \pm 8,79$ % del total de conteos de DAPI, con excepción de la tarde (14 h), momento en el cual el grupo de Actinobacteria (*Actino*) fue más importante (figura 15). Las *Citofaga-Flavobacterium* (*Cito-Fla*) representaron entre un $4,00 \pm 2,03$

% y un $7,20 \pm 4,54$ % y finalmente Archaea promediaron entre un $3,22 \pm 2,79$ % y un $15,57 \pm 2,69$ %. Tanto las diferencias de la abundancia de los grupos y su variación en el tiempo fueron estadísticamente significativas (ANOVA $P < 0,05$), indicando una variación en la composición de la comunidad de procariotas de la columna de agua a lo largo del día.

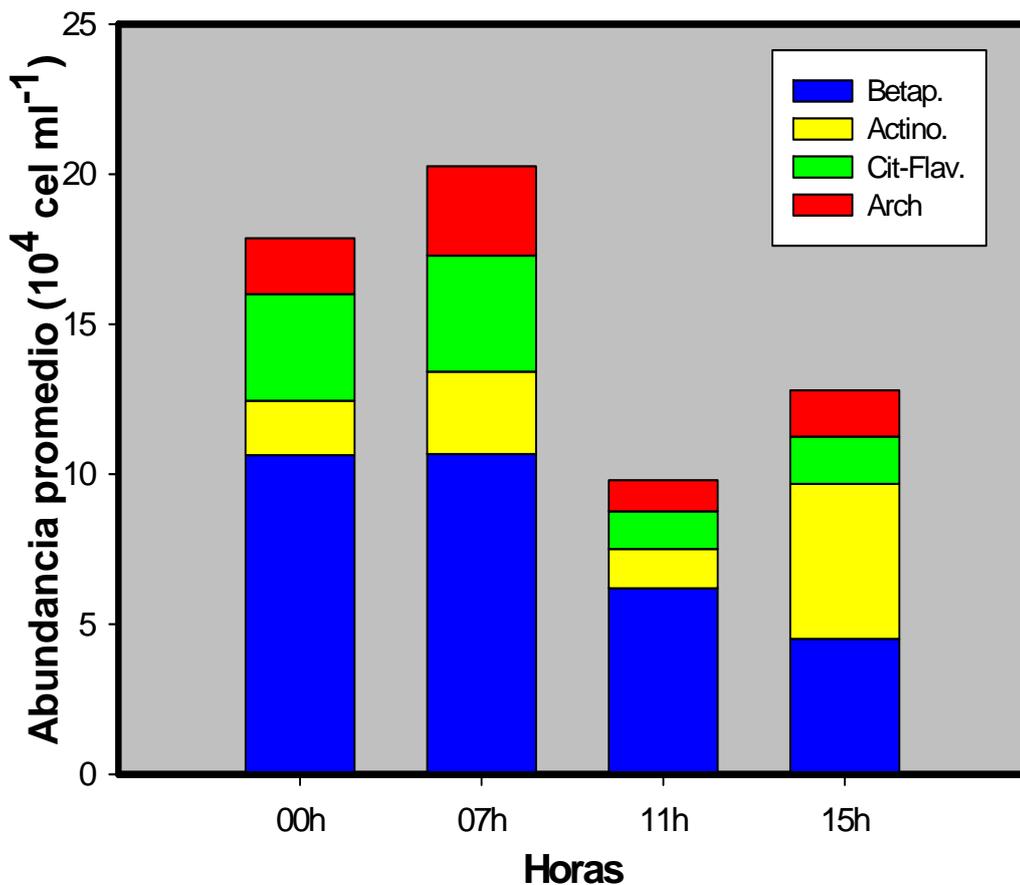


Figura 15. Composición de la comunidad de procariotas en los cuatro diferentes tiempos.

Con respecto al tamaño celular de los grupos de procariotas, las *Actino* fueron las más pequeñas con tamaños característicos menores a $0,7 \mu\text{m}$ durante los cuatro momentos del día (figura 16) y su variación durante el día fue mínima (figura 17). Los otros tres grupos por su parte, presentaron rangos de tamaños más amplios (entre $0,38 - 1,58 \mu\text{m}$), y con una clara variación temporal en Archaea y *Cito-Fla*, las cuales presentaron células más grandes en horas de la noche que fueron disminuyendo a lo largo del día.

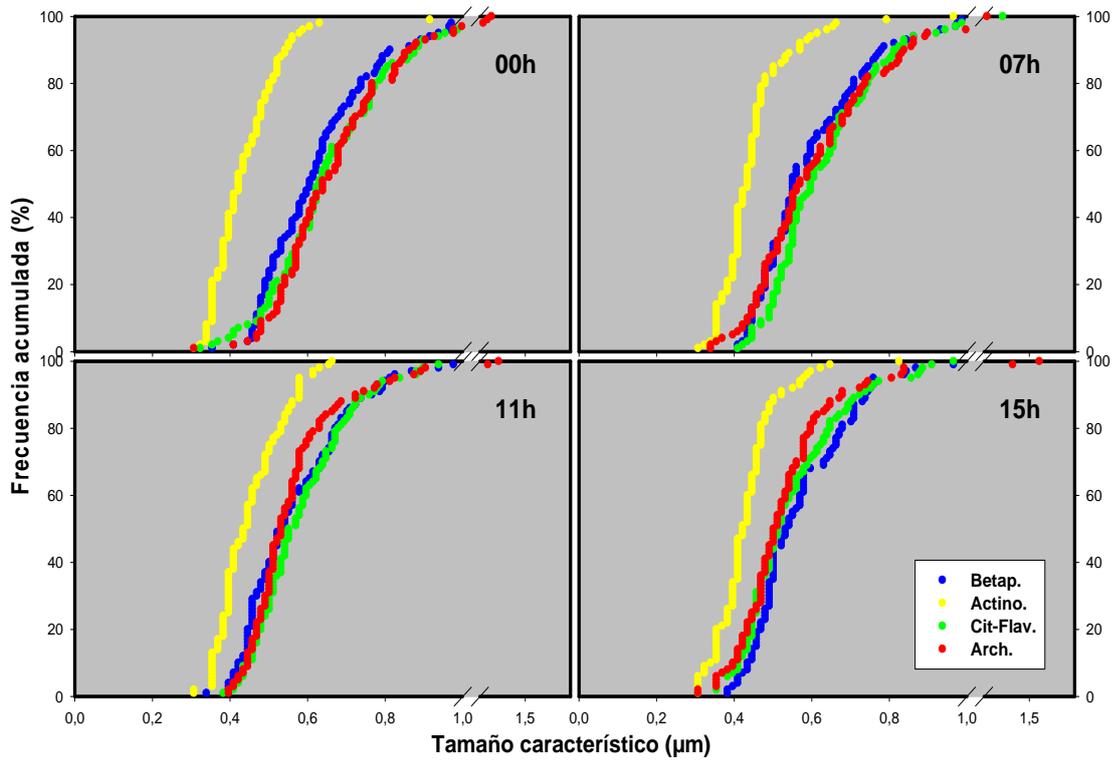


Figura 16. Frecuencias acumuladas del tamaño característico de los procariotas en los cuatro momentos del día.

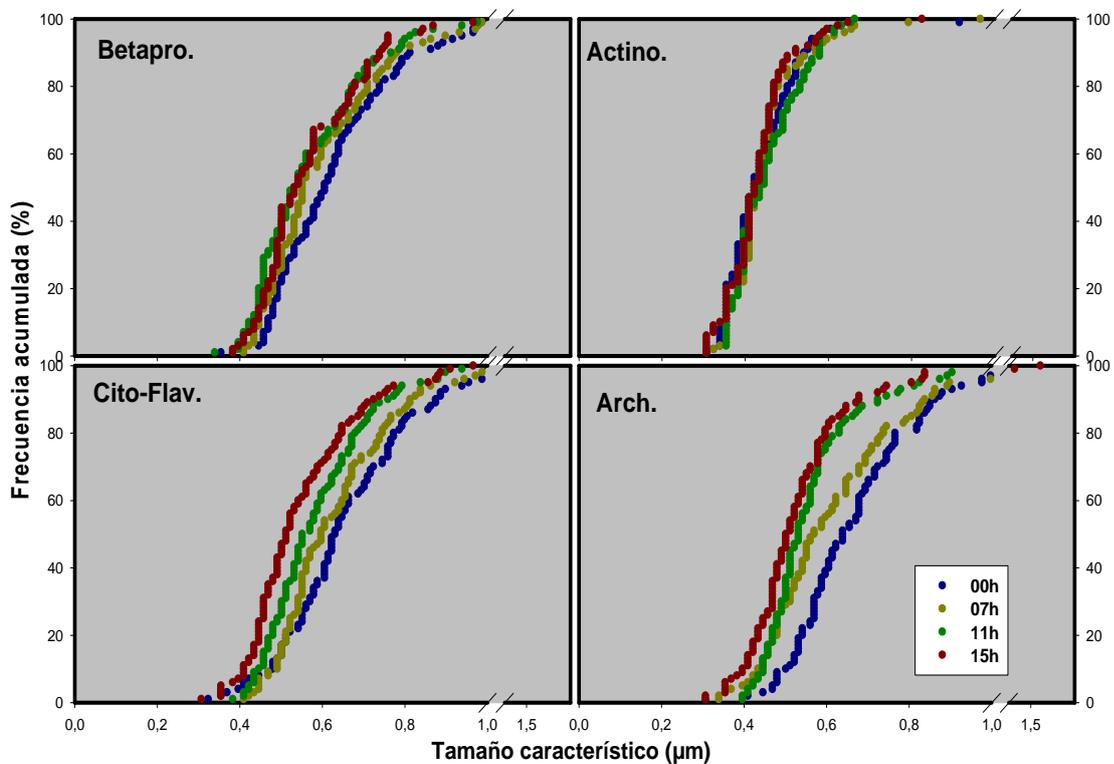


Figura 17. Frecuencias acumuladas del tamaño característico de cada uno de los grupos de procariotas en los cuatro momentos del día.

5.3 Comunidad fitoplanctónica

La comunidad de fitoplancton presente en el Estany Redon durante el estudio, estuvo dominada por cuatro grupos taxonómicos que abarcaron 17 géneros diferentes, de los cuales no todos pudieron ser identificados a nivel de especie. Las Chrysophyta fueron el grupo que presentaron mayores abundancias, seguidas por las Dinophyta, las Cryptophyta y finalmente las Chlorophyta. En 12 de los géneros se observó actividad fagotrófica (tabla 5), de los cuales tres fueron seleccionadas para evaluar sus comportamientos fagotróficos.

Tabla 5. Lista de las principales especies fitoplanctónicas presentes en el Estany Redon durante el periodo de estudio, se indica su abundancia máxima y observación de actividad fagotrófica.

Grupo	Genero/Especie	Abundancia máxima (ind ml ⁻¹)	Ingestión
Chlorophyta	<i>Monoraphydium</i> sp.	40	No
	<i>Oocystis borgeii</i>	1	No
	<i>Sphaerocystis schroeteri</i>	11	No
	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	2	No
	<i>Pseudoquadrigula</i> sp.	4	No
Cryptophyta	<i>Chroomonas acuta</i>	7	Si
	<i>Cryptomonas marsonii</i>	2	Si
	<i>Cryptomonas ovata</i>	22	Si
	<i>Rhodomonas minuta</i>	85	Si
Chrysophyta	<i>Chrysococcus</i> sp.	277	Si
	<i>Chromulina parvula</i>	1162	Si
	<i>Chromulina</i> sp.	417	Si
	<i>Dinobryon cylindricum</i>	120	Si
	<i>Ochromonas</i> sp.1	134	Si
	<i>Ochromonas</i> sp.2	101	No
	<i>Pseudokephyrion inflatum</i>	1751	Si
Dinophyta	<i>Wolozynskia</i> sp.	1	Si
	<i>Amphidinium elenkinii</i>	274	Si
	<i>Amphidinium</i> sp.1	177	No
	<i>Gymnodinium</i> sp.1	3	No
	<i>Gymnodinium</i> sp.2	10	Si
	<i>Gymnodinium</i> sp.3	1	No
	<i>Gymnodinium uberrimum</i>	1	Si
	<i>Peridinium incospicuum</i>	1	No

5.4 Patrones temporales de fagotrofia

Las Cryptophyta *Cryptomonas ovata* y *Rhodomonas minuta* y la Chrysophyta *Dinobryon cylindricum* fueron seleccionadas para evaluar detalladamente la actividad fagotrófica en los cuatro diferentes momentos del día (figura 18). *C. ovata* presentó contenidos de vacuolas alimenticias promedio entre $2,9 \pm 3,3$ y $4,1 \pm 7,5$ procariotas

protista⁻¹, alcanzando su mayor actividad en las horas de la noche y madrugada, disminuyendo durante el resto del día (figura 19), estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis $P < 0,05$). El mismo patrón fue observado en *D. cylindricum* que en la madrugada presentó un mayor contenido promedio ($1,5 \pm 4,9$ procariotas protista⁻¹) y en la mañana el menor ($0,9 \pm 2,3$ procariotas protista⁻¹) (figura 19); sin embargo estas diferencias en *D. cylindricum* no fueron estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis $P > 0,05$).

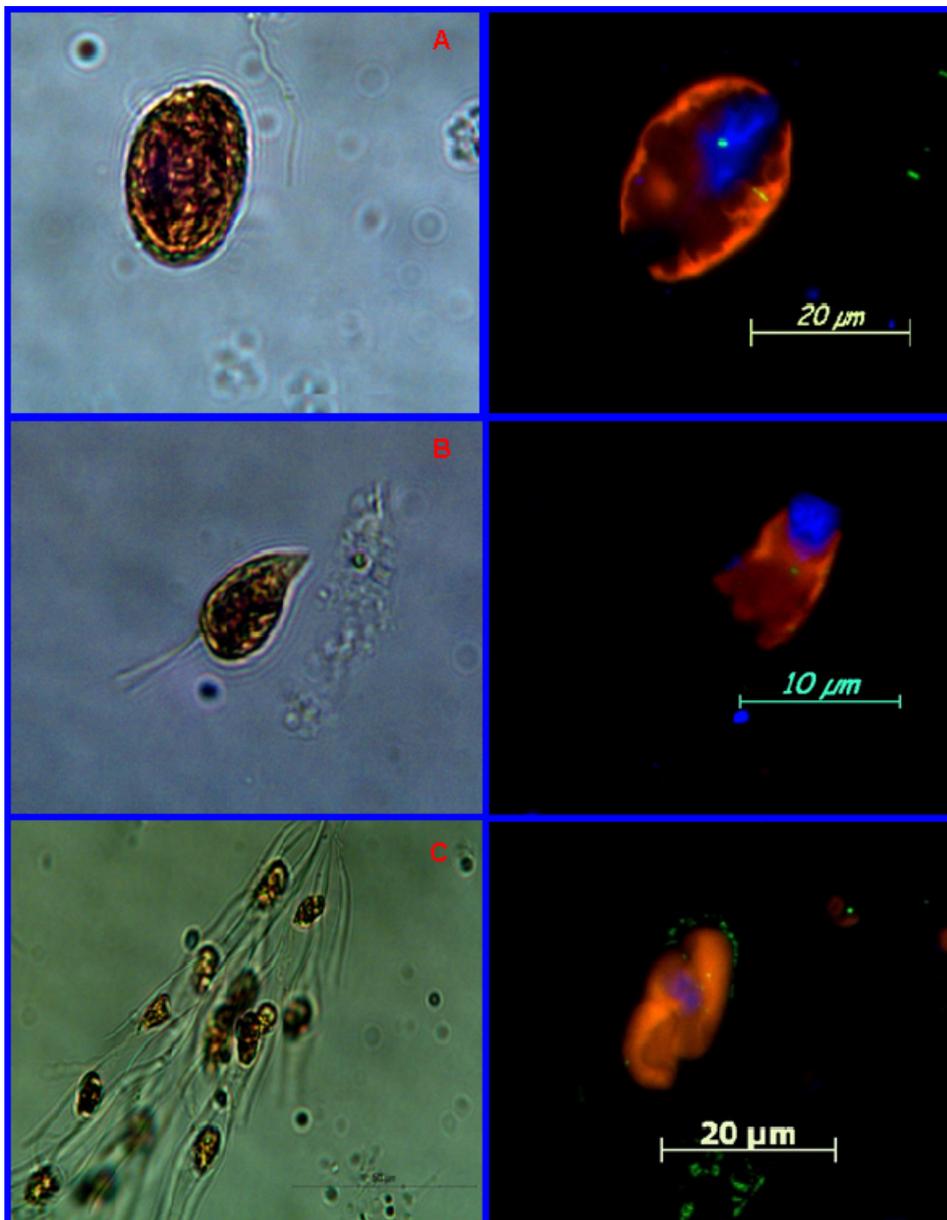


Figura 18. Imágenes por microscopía invertida (izquierda) y por epifluorescencia (derecha) de los tres protistas mixotróficos seleccionados para evaluar la actividad fagotrófica en el Estany Redon: (A) *C. ovata*, (B) *R. minuta* y (C) *D. Cylindricum*.

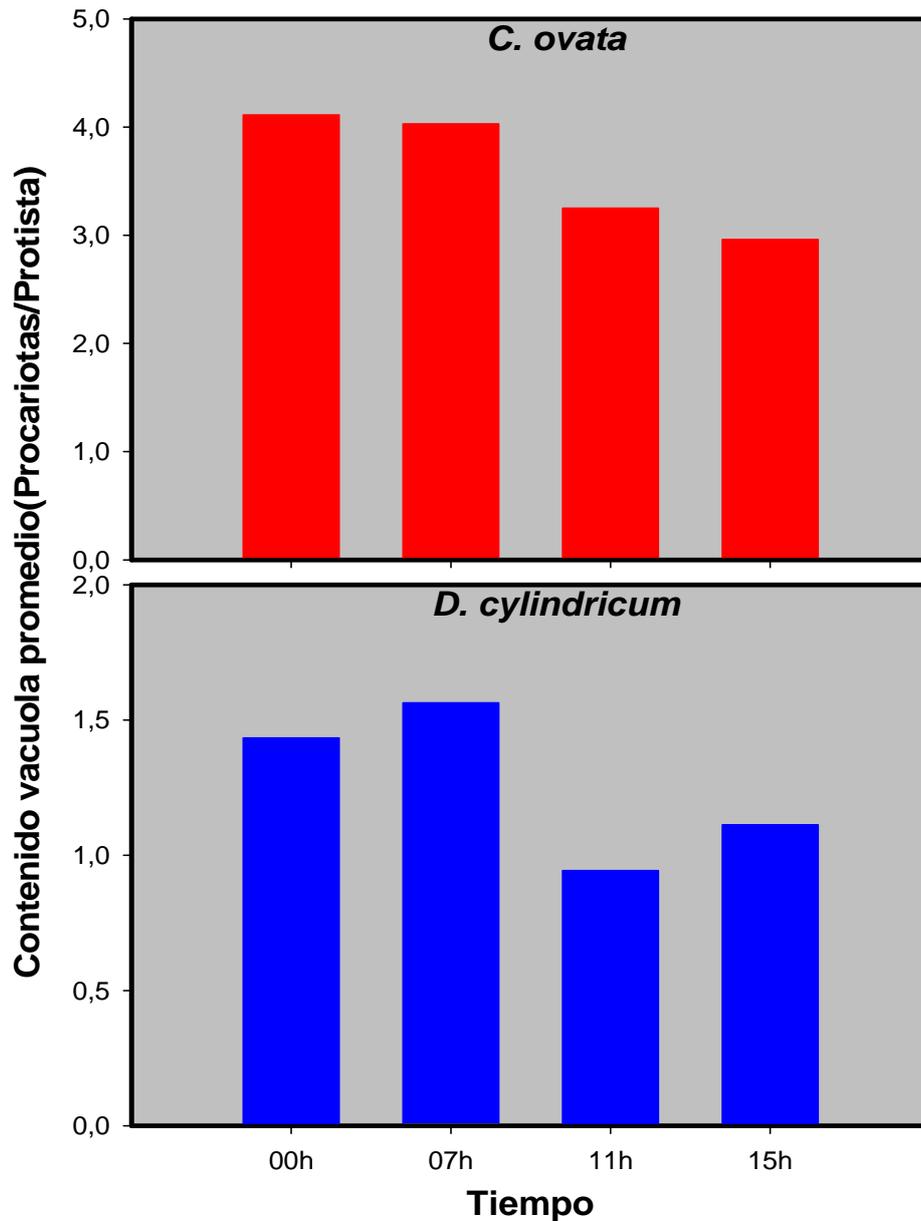


Figura 19. Contenido de presas (promedio de todos los individuos) de *C. ovata* y *D. cylindricum* en los cuatro momentos del día.

Por otro lado, *R. minuta* presentó un comportamiento diferente con una alta actividad fagotrófica muy variable: durante la noche presentó un contenido promedio de $2,8 \pm 3,8$ procariotas protista⁻¹, que disminuyó en la madrugada e incrementó a lo largo de la mañana alcanzando el valor más alto ($4,5 \pm 5,9$ procariotas protista⁻¹) a las 11h y disminuyendo de nuevo durante las horas de la tarde (figura 20). Estas diferencias en el tiempo fueron estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis $P > 0,05$).

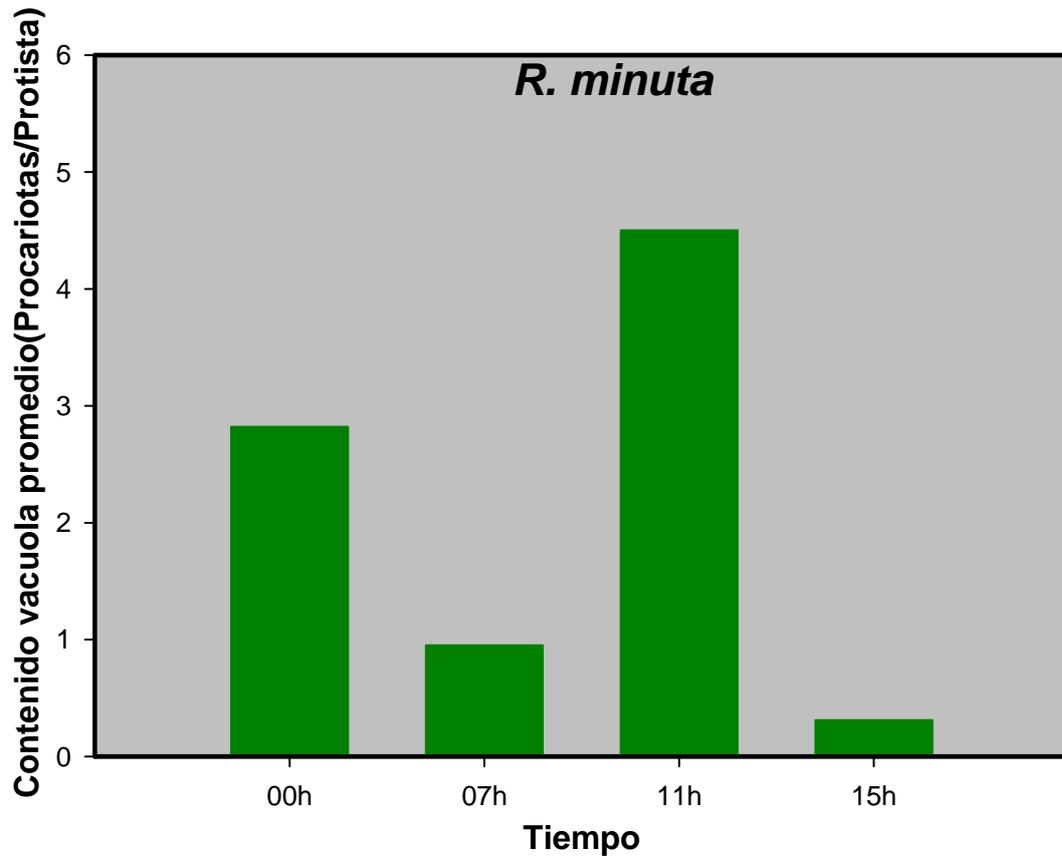


Figura 20. Contenido de la vacuola promedio de todos los individuos de *R. minuta* encontrados en los cuatro momentos del día.

A partir de las velocidades de digestión obtenidas de la relación del apartado 3.2 (ver figura 13), se estimaron las tasas de ingestión de cada uno de los protistas en los diferentes momentos del día (tabla 6). Debido a que las velocidades de digestión del apartado 3.2 fueron estimadas a una temperatura constante de 20 °C y la digestión varía en función de la temperatura, para realizar esta estimación se asumió un Q_{10} de 2 y una temperatura de 5 °C, que puede tomarse como la temperatura promedio de las profundidades donde suelen encontrarse los tres protistas seleccionados en este estudio. De esta forma, *C. ovata* presentó tasas de ingestión entre 5,5 y 7,6 procariotas protista⁻¹h⁻¹. Por su parte, *R. minuta* exhibió tasas de ingestión entre 1,2 y 11 procariotas protista⁻¹h⁻¹ y finalmente en *D. cylindricum* variaron entre 1,7 y 2,9 procariotas protista⁻¹h⁻¹.

Tabla 6. Tasas de ingestión estimadas a partir de las velocidades de digestión del apartado 3.2. Se asumió una $Q_{10} = 2$ y una temperatura del agua de 5 °C.

Especie	Tiempo	Tasa de ingestión (Procariontes Protista ⁻¹ h ⁻¹)
<i>C. ovata</i>	00h	7,65
	07h	7,49
	11h	6,05
	15h	5,51
<i>R. minuta</i>	00h	11,09
	07h	3,74
	11h	17,69
	15h	1,22
<i>D. cylindricum</i>	00h	2,67
	07h	2,91
	11h	1,76
	15h	2,07

5.5 Patrones de selección de presas

Para determinar si además de un patrón temporal de actividad fagotrófica, existía una preferencia en el tipo de presas por parte de las distintas especies de protistas, se evaluó la ingestión para cada uno de los grupos de procariontes marcados con las diferentes sondas. *C. ovata* durante la noche presentó principalmente presas del grupo *Betap* aunque en la madrugada y mañana fue especialmente importante la presencia de Archaea (figura 21). Por otro lado, *D. cylindricum* ingirió principalmente *Betap* especialmente en la noche y madrugada, aunque también exhibió presas de los demás grupos en los diferentes momentos del día (figura 21). Finalmente *R. minuta* mostró una ingestión casi exclusiva del grupo *Archeae* excepto en la noche donde también presenta presas del grupo *Betap* (figura 21). Para las tres especies, las diferencias entre las sondas fueron estadísticamente significativas (ANOVA $P < 0,05$).

Para analizar si las preferencias en la ingestión observadas eran debidas a un comportamiento selectivo o no, se calculó un índice de selectividad (IS) de acuerdo con la siguiente formula:

$$IS_i = \frac{\%CV_i - \%Proc_i}{\%CV_i + \%Proc_i}$$

Donde IS_i es el índice de selección sobre el grupo de presas i , $\%CV_i$ es la proporción de presas del grupo i ingeridas por el protista con respecto a la ingestión total y $\%Proc_i$ es la proporción de presas del grupo i con respecto al total de células hibridadas de los

cuatro grupos disponibles para ser depredadas. Así, valores superiores o inferiores a cero indican comportamientos selectivos tanto positivos (prefiere su ingestión) como negativos (evita su ingestión) y un valor de cero sería un ingestión al azar o accidental. De esta forma se pudo observar que el grupo Archaea fue seleccionado positivamente por todas las especies mientras que *Actino* fue generalmente seleccionado negativamente (figura 22). Dentro de las especies, *R. minuta* presentó el comportamiento más selectivo ingiriendo principalmente Archaea y evitando los otros tres grupos (figura 22), mientras que *C. ovata* y *D. cylindricum* ingirieron adicionalmente otros grupos de presas en momentos específicos.

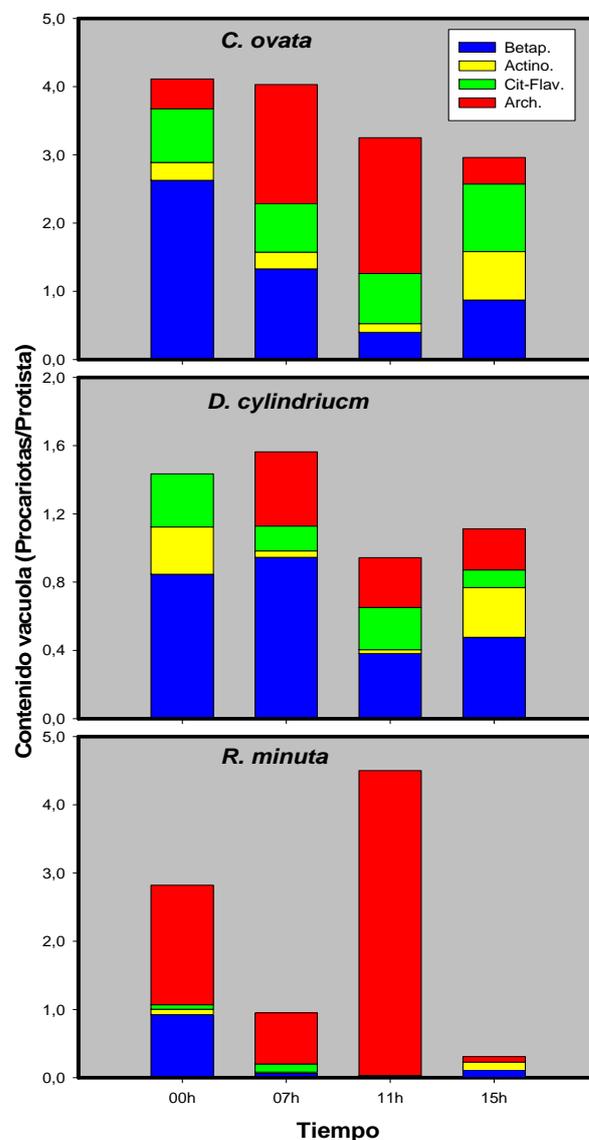


Figura 21. Cambios temporales de ingestión de *C. ovata*, *D. cylindricum* y *R. minuta* y proporciones de los cuatro grupos de procariotas marcados.

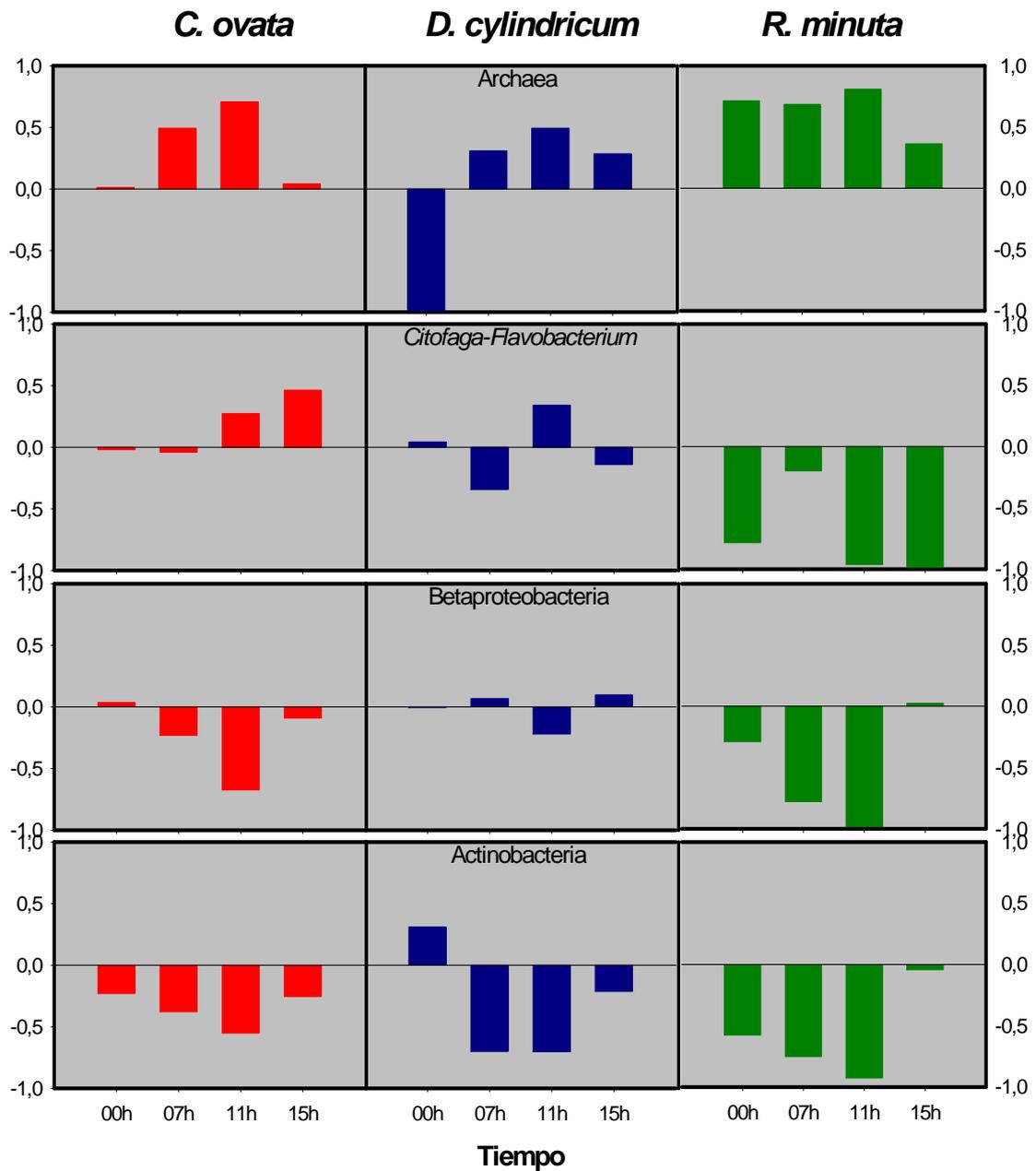


Figura 22. Valores del índice de selección observado en las tres especies de protistas, para cada uno de los grupos de procariotas marcados y en los cuatro diferentes momentos del día.

6. Discusión

La abundancia de la comunidad de procariotas en el Estany Redon fue similar a la reportada previamente en el sistema (Felip 1997) y conforme a la de otros lagos de alta montaña (Pernthaler *et al.*, 1998, Medina-Sánchez *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2006). Por otro lado, el número de células hibridadas con respecto al total obtenido por los conteos de DAPI (porcentaje de hibridación) fueron similares a los encontrados por Felip *et al.*

(2009) para el mismo sistema. Sin embargo, este porcentaje es bajo comparado con los obtenidos en otros sistemas tanto continentales como marinos (Pernthaler *et al.*, 2002, Sekar *et al.*, 2003, Ishii *et al.*, 2004, Garneau *et al.*, 2006, Pérez and Sommaruga 2007, Wilhartitz *et al.*, 2007). El nivel de hibridación es afectado por el número de ribosomas que presentan los procariotas y puede ser una medida indirecta de su estado fisiológico y la actividad que presentan en el sistema (Oda *et al.*, 2000). De esta forma es posible que gran parte de los procariotas del Redon sean células inactivas o que presenten muy bajo número de ribosomas como consecuencia de múltiples factores estresantes, como pueden ser la baja disponibilidad de nutrientes y los altos índices de radiación. Sin embargo, a pesar del bajo porcentaje de hibridación obtenido, este no presentó diferencias significativas en los cuatro momentos del día, por lo tanto, los cambios o patrones temporales no son derivados de una diferencia en la eficiencia de hibridación de la técnica.

La composición de la comunidad de procariotas fue similar a la encontrada por otros autores en sistemas de alta montaña. El grupo de las Betaproteobacteria ha sido reportado en porcentajes del 16 al 50 % del total de células marcadas con DAPI, siendo el grupo más importante dentro de *Eubacteria* (Alfreider *et al.*, 1996, Pernthaler *et al.*, 1998, Glöckner *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 2006, Pérez and Sommaruga 2007). Por su parte, el grupo Actinobacteria puede representar entre el 27 y 32 % (Sekar *et al.*, 2003, Pérez and Sommaruga 2007) mientras que *Citofaga-Flavobacterium* alcanza entre 1 y 10 % (Alfreider *et al.*, 1996, Pernthaler *et al.*, 1998, Glöckner *et al.*, 1999, Pérez and Sommaruga 2007). Finalmente las arqueas pueden representar entre el 5 y el 10 % del total de células marcadas con DAPI (Pernthaler *et al.*, 1998, Medina-Sánchez *et al.*, 2005, Catalan *et al.*, 2006). El rango de tamaños celulares de las procariotas observadas en este trabajo son similares a los reportados por otros autores para el mismo sistema (Felip 1997) y para otros lagos de alta montaña (Salcher *et al.*, 2010).

6.1 Variación temporal de la actividad fagotrófica

Dos patrones temporales de la actividad fagotrófica fueron observados en las tres especies seleccionadas. *C. ovata* y *D. cylindricum* presentaron una ligera mayor actividad en horas de la noche con respecto al día, mientras *R. minuta* mostró una mayor

variabilidad con dos picos de actividad, uno menor a media noche y uno mayor a medio día (tabla 6). Diferentes efectos de la luz sobre la actividad fagotrófica han sido reportados tanto en experimentación de laboratorio como en observación *in situ*. Mayor actividad fagotrófica durante la noche ha sido observada en *Dinobryon* sp. (Bird and Kalff 1987), y en el dinoflagelado *Prorocentrum minimum* (Stoecker *et al.*, 1997), mientras que el patrón opuesto ha sido reportado para diferentes flagelados mixotróficos entre ellos *Cryptomonas* spp. y *Dinobryon* spp (Urabe *et al.*, 2000, Pålsson and Granéli 2003, Medina-Sánchez *et al.*, 2004).

Diferentes estrategias nutricionales han sido identificadas en especies mixotróficas, relacionadas con la finalidad de la actividad fagotrófica o fototrófica (Jones 1994, 2000). De esta forma, se pueden encontrar especies en las cuales su fuente principal de carbono son las presas ingeridas y que complementan su crecimiento o mantenimiento por medio de la fotosíntesis o cuando las presas le son limitantes. Este podría ser el caso de *D. cylindricum* que habitualmente se encuentra en la zona profunda del Estany Redon, donde la cantidad de luz que llega es mínima y podría ser limitante para un crecimiento fotosintético. De esta forma aumentaría su actividad fagotrófica en horas de la noche para obtener carbono y nutrientes y durante el día reduciría ligeramente su actividad para realizar la fotosíntesis y complementar sus requerimientos para el crecimiento. Por su parte, *C. ovata* se puede encontrar en las zonas superficiales del lago hasta los 20 m dentro de la zona fótica, donde la luz no sería un limitante para el crecimiento autotrófico, esto implicaría que *C. ovata* tuviese una estrategia nutricional diferente (grupo C según la clasificación de Jones (2000)) en la cual su modo nutricional principal sería la fototrofia y su actividad fagotrófica le permitiría obtener sustancias esenciales, como son nutrientes o vitaminas, para su crecimiento. Stoecker *et al.* (1997) observó una mayor ingestión en *P. minimum* en horas de la noche, que fue explicado como un mecanismo para obtener nitrógeno y fósforo que será utilizado durante las horas de la mañana cuando el dinoflagelado realiza la fotosíntesis.

Dentro de este grupo de mixótrofos que son principalmente fotótrofos también podría incluirse a *R. minuta*. El pequeño pico de actividad fagotrófica observado durante la noche podría ser explicado de igual manera que en *C. ovata*; sin embargo, la mayor

actividad observada en momentos del medio día plantea la posibilidad de una estrategia diferente o complementaria. Urabe *et al.* (2000) encontró que *Cryptomonas* sp. exhibió una mayor ingestión en horas del día y disminuyó durante la noche, lo cual fue atribuido a un balanceo de la estequiometría para su crecimiento. Así mismo, otros autores han encontrado un mayor impacto de la bacterivoria de flagelados mixotróficos en lagos de alta montaña durante horas del medio día, lo cual ha sido explicado como una estrategia adaptativa al estrés generado por las altas radiaciones solares que reciben estos sistemas acuáticos (Medina-Sánchez *et al.*, 2004, Felip *et al.*, 2009). Así, *R. minuta* podría aumentar su ingestión en horas de la noche para obtener nutrientes o factores esenciales que serán necesarios para su crecimiento fotosintéticos y por otro lado alcanzaría su máxima actividad fagotrófica en horas del medio día como respuesta al aumento de la radiación solar que puede inhibir la actividad fotosintética del fitoplancton (Callieri *et al.*, 2001), complementando así la obtención de carbono para su crecimiento.

Sin embargo, la radiación también puede conllevar efectos adversos sobre la actividad fagotrófica. Recientemente Bastidas Navarro *et al.* (2011) reportaron un efecto negativo de la radiación ultravioleta sobre la actividad fagotrófica en flagelados mixotróficos y heterotróficos. Mayores tasas de ingestión fueron encontradas en especies mantenidas exclusivamente bajo radiación fotosintéticamente activa (PAR) en comparación con aquellas mantenidas con radiación ultravioleta (UV+PAR). Esta reducción de ingestión podría ser derivada de dos efectos: por un lado, un efecto directo sobre la célula (alteración de la morfología o movilidad), y por otro lado, un efecto negativo indirecto sobre la fotosíntesis que reduciría los requerimientos de nutrientes obtenidos vía fagotrofia. En las especies analizadas en el presente estudio, especialmente *R. minuta*, se observó una reducción en el número de presas ingeridas durante las horas de la tarde (15h) cuando la radiación solar aún es alta, sin embargo, no es claro si esta disminución es atribuible a un efecto acumulado de la radiación durante las horas del medio día.

Por otro lado, las tasas de ingestión estimadas a partir del contenido de las vacuolas alimenticias y las velocidades de digestión obtenidas en el primer capítulo de esta tesis para las tres especies, fueron similares a las reportadas por otros autores tanto para Chrysophyta como Cryptophyta (Caron *et al.*, 1993, Urabe *et al.*, 2000, Domaizon *et*

al., 2003, Laybourn-Parry and Marshall 2003). De esta forma, asumiendo una Q_{10} de 2 para diferentes temperaturas, es posible obtener buenas estimaciones de la tasa de ingestión a partir de los contenidos de las vacuolas obtenidas por CARD-FISH en relación al tamaño celular de los depredadores.

6.2 Selección de presas

En el presente trabajo fue claramente evidenciada una selección positiva sobre Archaea en los tres protistas seleccionados, especialmente en *R. minuta*. A la actualidad, este es el primer reporte de un patrón selectivo sobre este grupo de procariotas por parte de protistas fagotróficos. La selección de las presas puede venir determinada por diferentes pasos que incluyen: (1) la captura de la presa, que implica su búsqueda, contacto y posterior captura, (2) el procesamiento de la presa que involucra una ingestión y posterior digestión generalmente dentro de una vacuola alimenticia y (3) finalmente el beneficio en términos de nutriente o carbono que le puede aportar al depredador cada tipo de presa. Así mismo, diferentes parámetros, ligados a las presas o al depredador pueden afectar estos pasos y por lo tanto modificar los comportamientos selectivos de los protistas (Roberts *et al.*, 2011b).

El tamaño de las presas ha sido propuesto como un factor principal en el comportamiento selectivo por parte de los protistas (Šimek and Chrzanowski 1992, González *et al.*, 1993, Salcher *et al.*, 2005). En aquellos depredadores cuyo mecanismo de captura es la intercepción directa de la presa, como es el caso de los tres protistas del Redon analizados, la selección por tamaños puede ser explicada por un simple modelo geométrico en el cual las tasas de encuentro entre depredador y presa incrementa proporcionalmente al radio de la presa (Fenchel 1982). Sin embargo, las Archaea seleccionadas positivamente en el Estany Redon presentaron un rango de tamaño muy similar a *Betap* y *Cito-Fla*, seleccionadas negativamente, por lo cual la probabilidad de encuentro de estos tres grupos con los protistas es similar, sugiriendo así, que otros u otros factores diferentes al tamaño influyeron sobre la selección de este grupo. Cabe destacar que las *Actino* presentaron tamaños mucho menores a los demás grupos y adicionalmente fueron seleccionadas negativamente, por lo cual para este grupo, si es posible que un reducido tamaño le represente una estrategia satisfactoria para evitar ser

ingeridas, lo cual además, ha sido reportado por otros autores (Jezbera *et al.*, 2005, Jezbera *et al.*, 2006). Así mismo, es interesante observar que el impacto de la ingestión de los protistas sobre las Archaea, pudo conllevar a una variación en la estructura de tamaños de estas últimas (figura 17), con células más pequeñas en los momentos con mayor presión predatoria.

La movilidad de las presas es otro factor que puede influir sobre su captura, ya que aumenta la probabilidad de que presa y depredador entren en contacto. González *et al.* (1993) reportó que bacterias móviles son mayormente ingeridas que aquellas especies no móviles. De igual forma, diferentes velocidades de las presas pueden implicar diferentes capacidades de captura por parte de los protistas (Grossart *et al.*, 2001, Matz and Jürgens 2005). En muchas Archaea se ha observado movilidad generado por una flagelo (Jarrell *et al.*, 1996), que además difiere estructuralmente al flagelo de las bacterias (Bardy *et al.*, 2003). Es posible por lo tanto, que diferencias en la capacidad de movilidad entre las arqueas y bacterias, propicien el patrón de ingestión selectiva observado. Sin embargo, es necesaria una mayor investigación en este aspecto para corroborar esta posibilidad.

Por otro lado, la interacción celular entre un protista fagotrófico y su presa desde un sentido fisicoquímico, esta sujeta a fuerzas similares a aquellas que determinan la agregación coloidal entre superficies (Monger and Landry 1990), por lo tanto, la adhesión entre células dependerá de la interacción electrostática e hidrofóbica entre el depredador y presa. De este modo, diferencias en las propiedades fisicoquímicas de las superficies celulares conduciría a diferencias tanto en el comportamiento selectivo de los depredadores como en la vulnerabilidad de las presas. Monger *et al.* (1999), propone que las tasas en que son removidas las bacterias en suspensión por parte de los protistas fagotróficos, podría variar hasta dos veces sólo por la variación natural de la hidrofobicidad de la superficie celular. De igual forma, Hammer *et al.* (1999) reporta una relación positiva entre en la tasa de ingestión del dinoflagelado *Oxyrrhis marina* y la carga electrostática de las diferentes partículas dadas como presas. Es posible pensar entonces, que una hidrofobicidad, o una carga electrostática específica en las arqueas, podría explicar su mayor vulnerabilidad a ser capturadas por los protistas. Así mismo,

estas diferencias serían posibles, desde un punto de vista fisiológico, ya que la características hidrofóbicas y electroestáticas pueden estar directamente relacionadas con el estatus nutricional de las células (Kjelleberg and Hermansson 1984, Martel 2009).

Después de que una presa es capturada, su ingestión y posterior digestión depende de la interacción entre las superficies celulares del depredador y su presa, así como de la digestibilidad de esta última. Por consiguiente, diferencias en la composición de las superficies celulares, así como características que faciliten, dificulten o impidan su digestión, puede derivar en diferentes comportamientos selectivos por parte de los protistas. Diferencias en la estructura lipídica de la membrana plasmática, así como, la composición proteica la pared celular entre bacterias y arqueas son bien conocidas. Estas últimas carecen de peptidoglicano en su pared celular y pueden presentar un pseudopeptidoglicano como en el caso de algunas arqueas metanógenas (Madigan *et al.*, 2008), o bien, la pared celular puede ser una simple capa superficial paracristalina (capa S) compuesta de proteínas o glicoproteínas (Beveridge *et al.*, 1997, Madigan *et al.*, 2008). Estas diferencias estructurales entre bacterias y arqueas, he incluso entre los diferentes grupos de cada dominio, pueden derivar en diferencias en su vulnerabilidad ha ser digeridas y por lo tanto a patrones selectivos diferentes como los observados en flagelados heterotróficos o ciliados (Iriberry *et al.*, 1994, Boenigk *et al.*, 2001a, b, Jezbera *et al.*, 2005, Jezbera *et al.*, 2006).

Finalmente, el último parámetro que puede afectar la selección de presas por parte de los protistas es el beneficio que pueden obtener, en términos de carbono, nutrientes, vitaminas u otros factores importantes de crecimiento. Tanto en flagelados heterotróficos como en ciliados se ha reportado selección de presas según su valor nutricional. Presas con bajos ratios N:P, C:P y C:N fueron seleccionadas preferentemente por *Ochromonas* sp. (Shannon *et al.*, 2007) y por *Paraphysomonas vestita* (John and Davidson 2001). En contraste, los ciliados *Cyclidium glaucoma* y *Euplotes vannus* seleccionan presas con altos ratios C:P y N:P (Gruber *et al.*, 2009). De esto se desprende, que los protistas pueden seleccionar de manera diferentes sus presas, en relación a su calidad, en términos de contenido de fósforo y nitrógeno, según las

condiciones propias del sistema así como la estequiometría propias del depredador. Así, en condiciones de limitación por nutrientes, los protistas podría buscar maximizar los beneficios obtenidos de sus presas, seleccionando aquellas con alto valor nutricional (altos ratios C:N y C:P) y por lo contrario, en condiciones óptimas de nutrientes, podrían seleccionar aquellas presas de bajo valor nutricional con el fin de disminuir los costos que conllevaría balancear su estequiometría interna. De esta manera, es posible que la selección positiva de los protistas del Redon sobre las arqueas, sea determinada por el valor nutricional de este grupo. Adicionalmente, las arqueas de los lagos de alta montaña han sido descritas por oxidar amonio (Auguet *et al.*, 2011), por lo cual podría ocurrir que su selección esté relacionada con el nitrógeno.

Los resultados del presente estudio indican un patrón temporal y un comportamiento selectivo independiente del tamaño de las presas, por parte de protistas mixotróficos. Se reporta por primera vez una selección positiva sobre el dominio Archaea que no puede ser explicado exclusivamente por una discriminación dependiente del tamaño de las presas. Futuros trabajos sobre este comportamiento selectivo son necesarios para elucidar las causas que han llevado a los protistas mixotróficos del Estany Redon a seleccionarlas arqueas sobre otros grupos numéricamente más importantes dentro del sistema. Ampliar y mejorar el entendimiento de estos comportamientos selectivos llevara a unas mejores estimaciones de los flujos de carbono y nutrientes hacia los niveles superiores de las cadenas tróficas, así como a un mejor entendimiento de las interacciones que se presentan en sistemas acuáticos como los lagos de alta montaña.

Capítulo III

Variabilidad de la actividad fagotrófica entre lagos de montaña

7. Resultados

7.1. Características de los lagos

En la tabla 7 se muestran las principales características químicas de las muestras del máximo profundo de clorofila de los 20 lagos evaluados en este estudio. Aunque todos presenten características propias de los lagos de alta montaña, se evidencian ciertos gradientes además del altitudinal. Sistemas ácidos como el Pica Palomera o el Aixeus contrastan con aquellos que presentan pH más básicos como el Pois. Sistemas como la Bassa d'Oles, Filià o Aixeus presentaron valores mayores de mineralización, en contraste, la Bassa Nera, Redon o el Romedo de Dalt exhibieron bajas concentraciones de sales disueltas. Con respecto a los macronutrientes, las mayores concentraciones de fósforo y nitrógeno se observaron en el Pòdo y Bassa d'Oles, mientras que las menores se presentaron en la Pica Palomera y el Long de Liat. El carbono orgánico e inorgánico disuelto (DOC y DIC) se observó en mayor concentración en sistemas como la Bassa d'Oles, Bassa Nera o Filià, mientras que fueron minoritarios en el Aixeus, Certascan o Pica Palomera. La concentración de clorofila *a* (Chla), comúnmente utilizada como un indicador de la biomasa del fitoplancton del sistema, y hasta cierto punto de la producción primaria, fue mayor en la Bassa Nera (5,28 µg/l) y Roi (5,23 µg/l). En contraste, los sistemas estudiados que en ese momento eran menos productivos fueron el Certascan (0,20 µg/l) y Pica Palomera (0,53 µg/l). Los valores de los índices de carotenos y feofitinas (tabla 7) apuntan que no hay degradación de la clorofila en las muestras, indicando un buen estado fisiológico de las poblaciones fitoplanctónicas estudiadas.

Tabla 7. Composición química de las muestras.

Lago	Nutrientes										Pigmentos												
	Prof. Muestra ^a	pH	Alcalinidad ^b	Conductividad ^b	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	DRSt ^c	DIC ⁻	DOC ⁻	TDP ^d	TDN ^e	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	CHLA ^f	CHLB ^g	CHLC ^g	ICAROT	IFEO
Bassa d'Oles	0,00	8,02	1284	154,00	9,76	207,59	40,36	0,46	1132,84	129,22	26,34	18,53	4,00	294,41	23,52	0,28	0,02	0,09	3,76	0,28	0,33	0,94	1,20
Llebreja	9,50	7,55	249	30,60	5,07	41,26	32,95	5,28	279,56	19,65	43,93	2,90	1,10	202,66	ND	1,12	0,10	8,64	1,84	0,17	0,27	1,08	1,08
Bassa Nera	0,50	7,28	480	53,00	8,72	11,77	47,23	0,00	387,72	31,52	111,18	5,72	5,47	143,05	24,43	0,61	0,05	0,10	5,28	0,50	1,14	1,31	1,24
Pois	13,00	8,19	516	67,20	7,24	74,26	41,57	4,91	464,99	55,28	44,95	9,30	0,30	82,19	13,79	0,30	0,11	13,27	2,86	0,09	0,50	1,69	1,32
Romeo de Dalt	21,50	6,31	22	5,80	9,48	10,44	20,56	0,41	26,35	6,54	16,39	0,68	0,75	103,36	12,67	0,44	0,02	3,00	2,82	0,21	0,44	0,99	1,19
Long de Liat	18,00	7,27	132	20,80	8,60	44,87	17,80	2,83	130,39	10,79	5,05	2,40	0,70	67,53	5,04	0,46	0,01	2,42	1,02	0,06	0,18	1,19	1,16
Filà	2,00	7,79	1330	133,30	7,47	71,07	21,32	1,10	1197,00	194,14	12,78	18,60	ND	94,18	20,72	0,58	0,15	15,96	1,70	0,08	0,06	1,36	1,28
Gerber	18,00	7,13	148	23,40	10,93	21,18	29,43	9,44	163,45	7,39	35,36	2,06	0,56	88,09	8,89	0,29	0,10	7,01	1,26	0,11	0,26	1,57	1,24
Plan	8,00	7,04	115	16,70	6,76	19,34	37,33	3,14	141,78	13,36	8,16	2,26	1,44	63,44	7,14	0,41	0,01	0,10	0,58	0,10	0,15	1,28	1,05
Llausset	15,00	7,47	424	60,40	29,25	87,29	47,54	0,09	460,91	33,24	ND	ND	ND	113,17	18,34	0,51	0,06	16,05	1,08	0,10	0,19	1,21	1,20
Redon	30,00	6,67	58	10,50	4,97	21,17	12,79	0,75	86,69	7,33	8,09	1,12	0,16	50,51	ND	1,63	0,01	7,58	0,63	0,00	0,05	1,32	1,29
Ibonet Perranó	4,00	7,49	239	33,30	8,79	32,26	17,13	2,33	298,83	10,79	25,33	2,06	0,40	150,41	16,80	0,44	0,06	12,80	0,60	0,00	0,06	1,53	1,20
Pica Palomera	8,50	4,61	-26	29,60	7,29	181,40	10,13	4,06	103,97	24,52	20,92	0,93	-0,05	49,74	8,82	6,01	0,00	3,80	0,53	0,04	0,07	1,57	1,24
Roi	8,50	7,06	161	25,80	5,84	50,99	39,85	3,30	190,28	20,33	69,66	3,30	0,40	126,45	17,85	1,91	0,18	12,83	5,23	0,46	0,81	1,16	1,20
Bassa de les Granotes	3,50	6,45	20	9,80	15,81	20,93	29,03	0,46	46,14	7,57	37,89	0,59	2,25	118,58	26,04	0,97	0,08	0,10	4,57	1,40	0,25	1,21	1,26
Cerascan	30,00	5,67	2	9,10	7,24	38,63	16,31	2,86	36,41	11,10	23,46	0,38	0,15	77,60	35,00	1,01	0,11	15,31	0,20	0,00	0,01	0,69	1,26
Aixeus	12,50	4,97	-13	49,90	7,50	407,08	75,76	4,57	139,78	157,96	173,49	0,40	0,10	73,71	17,99	0,35	0,13	19,29	0,60	0,04	0,07	1,09	1,14
Botomais	18,00	7,23	178	24,10	5,58	40,93	23,79	2,66	213,06	10,19	36,19	4,33	0,25	168,48	19,18	0,45	0,06	14,30	1,97	0,17	0,30	1,03	1,23
Podó	14,00	6,41	83	9,40	18,97	22,08	18,82	3,22	82,35	7,48	29,83	2,26	0,30	273,48	78,75	1,18	0,02	4,43	4,18	0,33	1,01	1,24	1,27
Illa	15,00	6,68	77	13,30	4,99	14,82	15,99	5,28	60,37	13,24	17,63	1,11	0,38	69,63	7,00	0,72	0,04	5,78	1,30	0,14	0,17	1,19	1,20

Unidades: 1) $\mu\text{eq/l}$; 2) mg/l ; 3) mg/l ; 4) $\mu\text{atg/l}$; 5) $\mu\text{g/l}$; 6) $\mu\text{S/cm}$; 7) metros. ND= no disponible

7.2 Comunidades de procariotas

Las abundancias de procariotas estimadas a partir de los conteos con DAPI en los diferentes sistemas exhibieron un gradiente (figura 23). La Pica Palomera y el Aixeus presentaron las menores concentraciones de procariotas ($2,1$ y $2,8 \times 10^5$ cel ml^{-1} respectivamente), mientras que el Roi ($32,2 \times 10^5$ cel ml^{-1}) y la Bassa de las Granotes ($24,6 \times 10^5$ cel ml^{-1}) presentaron las mayores. El total de células hibridadas (suma del número de células hibridadas con cada una de las sondas utilizadas) osciló entre $0,5 \times 10^5$ cel ml^{-1} de la muestra del Certascan y $10,6 \times 10^5$ cel ml^{-1} obtenido en la Bassa Nera. El porcentaje total de recuperación osciló entre el 13,4 % (muestra de Llauset) y 64,2 % (muestra de Aixeus).

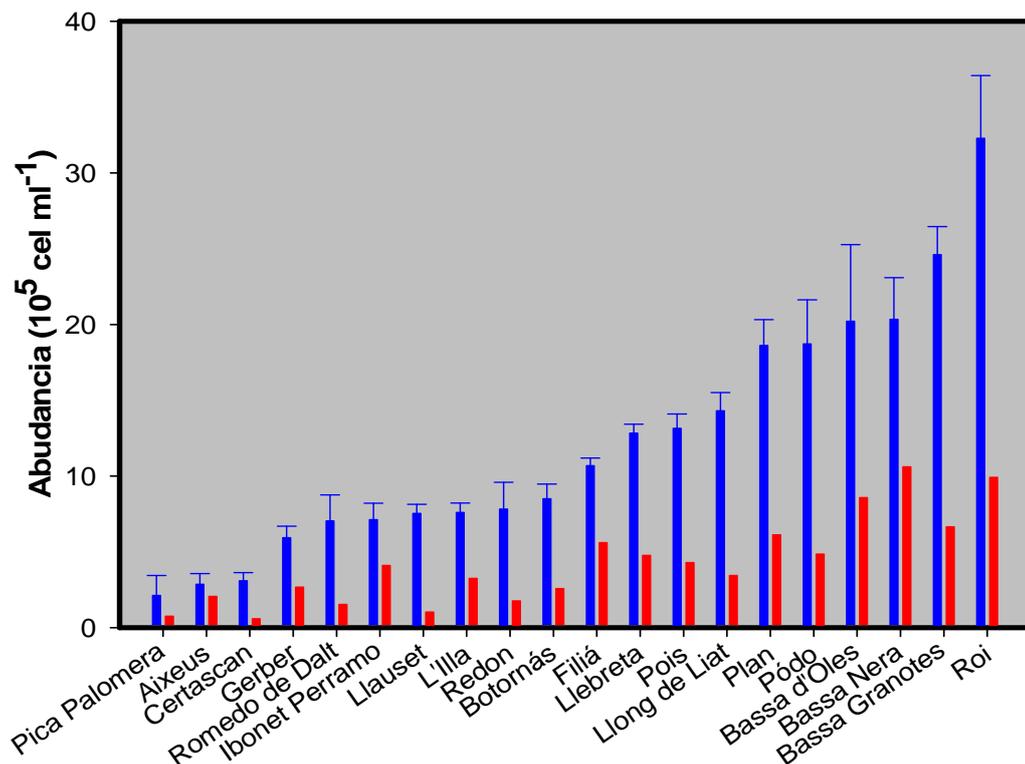


Figura 23. Promedio de los conteos con DAPI (azul) y número de células hibridadas (rojo) de los 20 lagos analizados en el presente estudio.

Con respecto a la composición de las comunidades de procariotas (figura 24), el grupo de las Betaproteobacteria (*Betap*) fue el más abundante en 16 de los 20 lagos analizados, con porcentajes respecto al total de conteos de DAPI que oscilaron entre el 7,9 % (Llauset) y 56,3 % (Aixeus). El segundo grupo más importante fueron las

Actinobacteria (*Actino*), dominando numéricamente en 3 lagos y con porcentajes que variaron entre 0,5 % (Bassa d'Oles) y 14,7 % (Gerber). Las *Citofaga-Flavobacterium* (*Cito-Fla*) dominaron numéricamente en el Pois con un porcentaje del 21 % y su menor abundancia fue en el Romedo de Dalt (0,3 %). Así mismo, este grupo estuvo ausente en el Aixeus. Finalmente, Archaea fueron numéricamente menos importantes en la mayoría de los lagos (entre 0,1 y 6%) y fue ausente en Pica Palomera, Aixeus y Llauset.

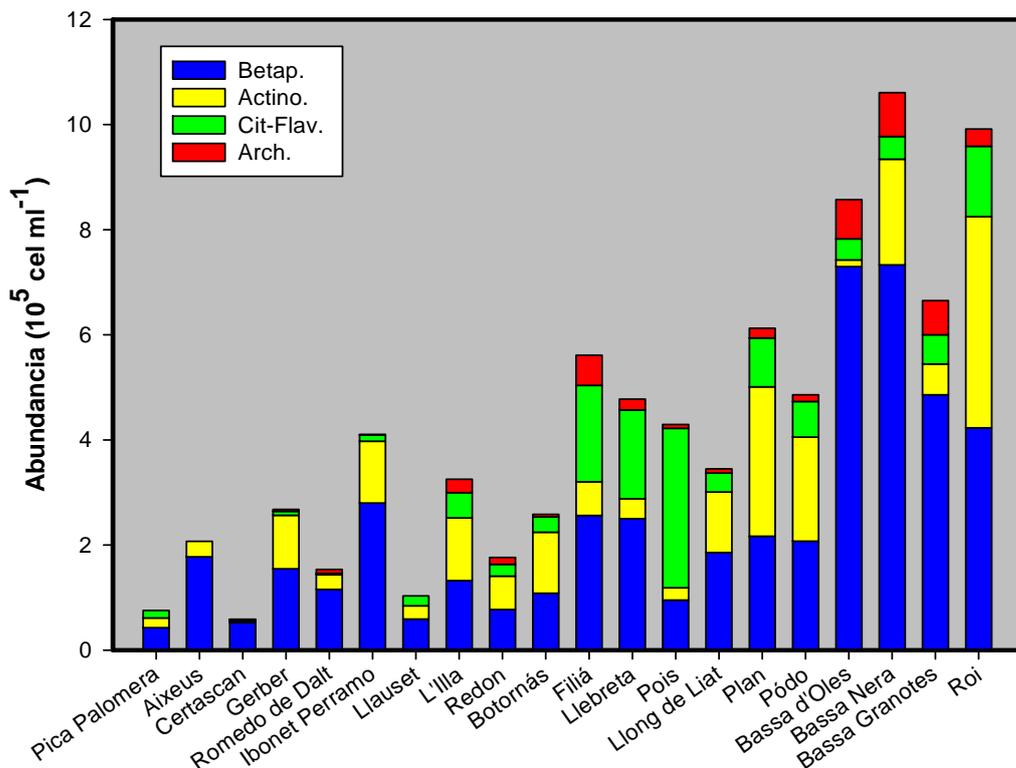


Figura 24. Composición de las comunidades de procariotas en los 20 lagos analizados en el presente estudio.

Por otro lado, las *Actino* exhibieron los menores tamaños en los 20 lagos (figura 25), consistieron generalmente en pequeños cocos y bacilos con un tamaño característico entre 0,4 y 0,6 μm de longitud. Los otros tres grupos presentaron mayores tamaños, así como mayor diversidad de tamaños y formas (figura 25 y 26). En general consistieron en bacilos y pequeños filamentos con tamaños característicos entre 0,5 y 1,0 μm de longitud, en algunos sistemas como Llebrete o la Bassa de las Granotes las arqueas estaban dominadas por filamentos que alcanzaban las 3,0 μm de longitud característica.

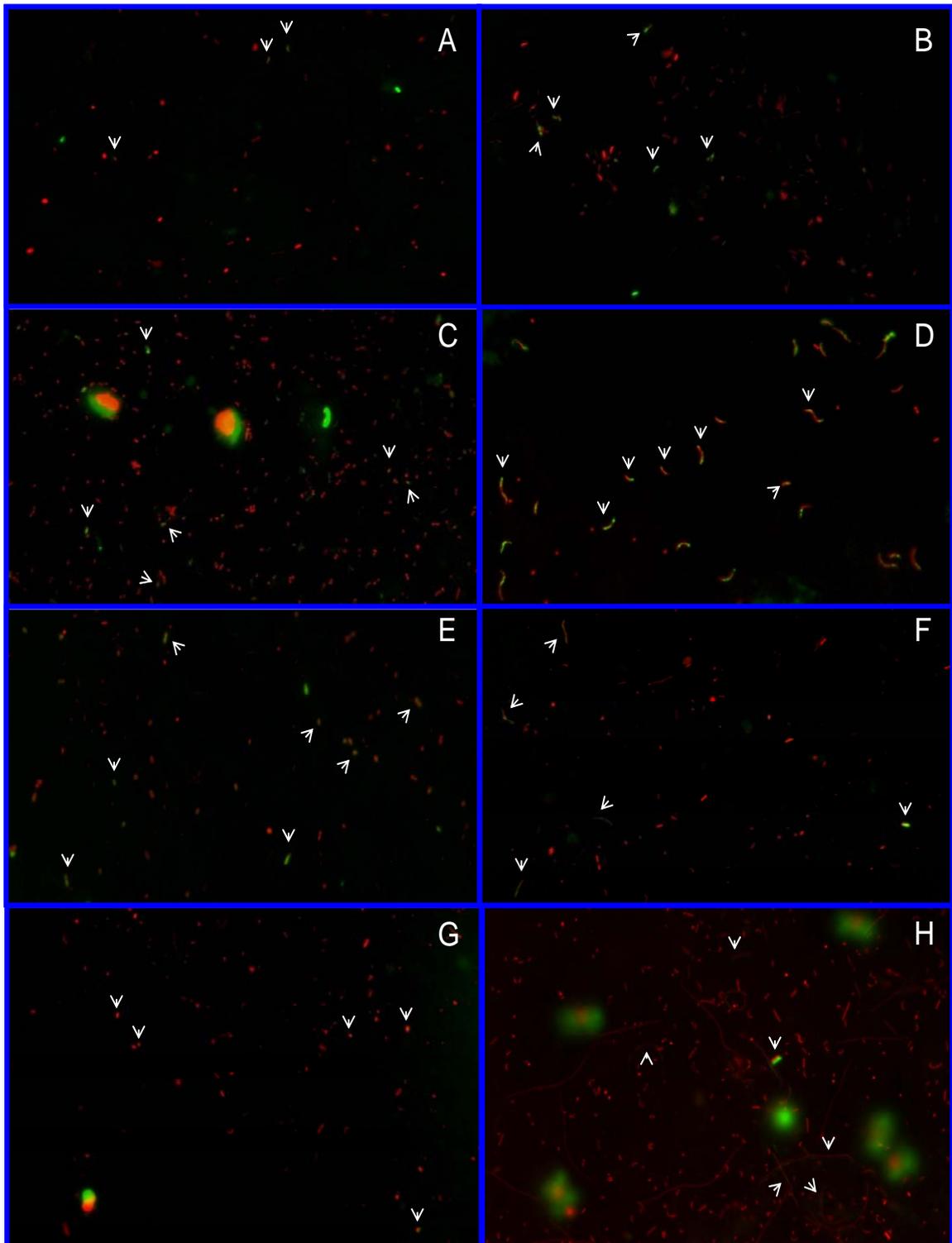
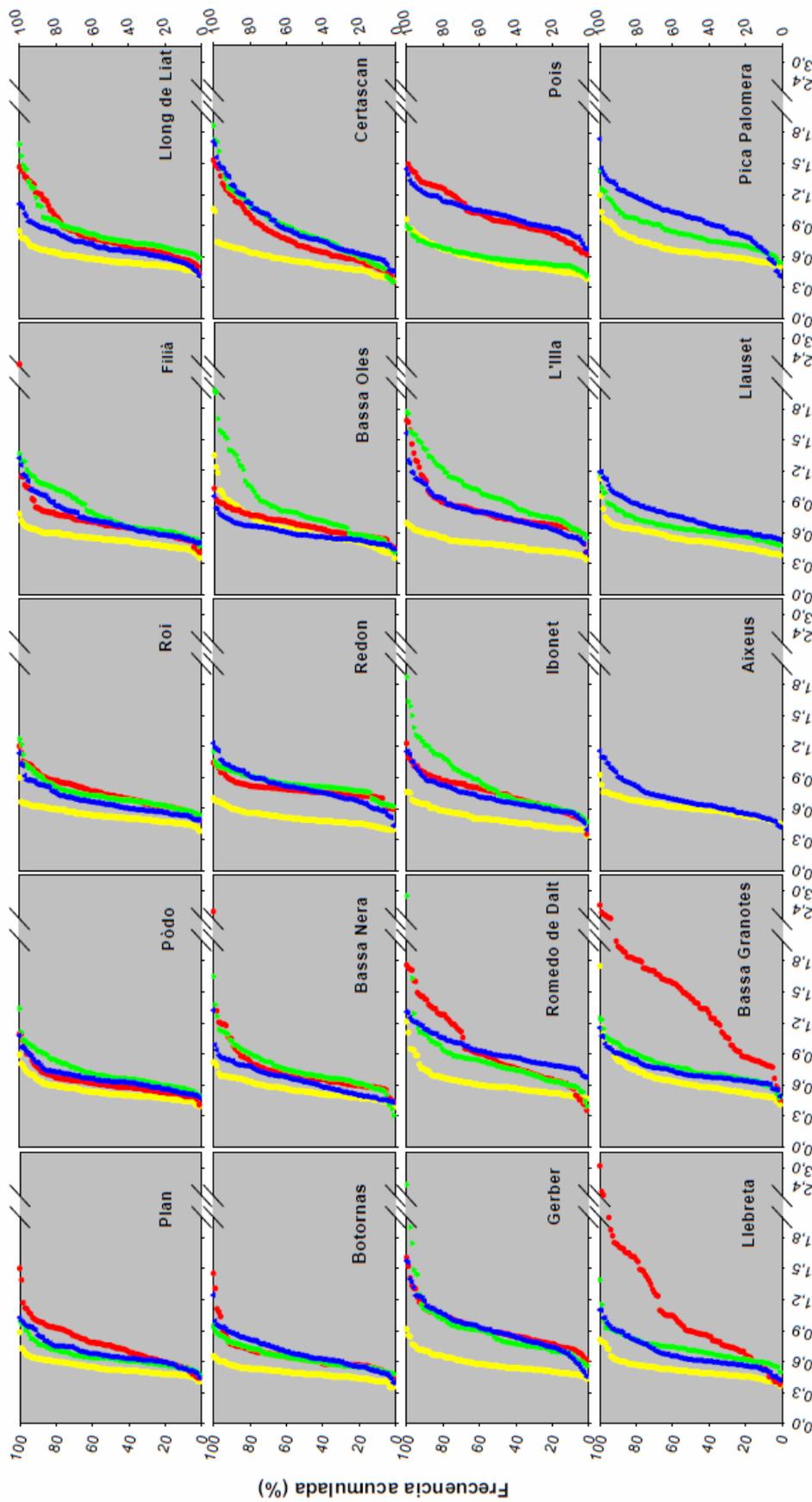


Figura 25. Ejemplos de las procariotas marcadas con DAPI (rojo) y el CARD-FISH para las diferentes sondas oligonucleótidas (verde) en diferentes lagos. A) Actinobacteria del lago L'Illa. B) Actinobacteria del lago Pica Palomera. C) Betaproteobacteria de la Bassa d'Oles. D) Betaproteobacteria del Pois. E) *Citofaga-Flavobacterium* del Pois. F) *Citofaga-Flavobacterium* del L'Illa. G) Archaea del Pòdo. H) Archaea de la Bassa de las Granotes.



Tamaño característico
 Figura 26. Distribución en frecuencia acumulada del número de células del tamaño característico de los cuatro grupos de procariontas en los 20 lagos analizados. Actinobacteria (amarillo), Betaproteobacteria (azul), *Cytofaga-Flavobacterium* (verde) y Archaea (rojo)

7.3 Comunidades fitoplanctónicas con capacidad mixotrófica

Las especies fitoplanctónicas que presentaron ingestión en los diferentes lagos, pertenecían principalmente al grupo Chrysophyta, Cryptophyta y Dinophyta, de las cuales las primeras fueron, en general, numéricamente más importantes. Con el fin de facilitar el estudio y la comparación entre las comunidades de los diferentes sistemas, las diferentes especies fueron agrupadas según el grupo taxonómico, el tamaño celular y en algunos casos por la presencia de teca (tabla 8). De esta forma, dentro de las Chrysophyta se obtuvieron ocho categorías de las cuales hay dos formas coloniales (figura 27D y figura 28E) y tres formas tecadas (figura 27C y F y figura 28E). En las Cryptophyta se observaron tres categorías que difieren principalmente por su tamaño (figura 27I y figura 28A y H) y finalmente las Dinophyta presentaron ocho categorías de las cuales tres pueden ser afiliadas al género *Amphidinium* (figura 27E y H y figura 28B) y dos al género *Gymnodinium* (figura 27J y figura 28G), mientras que los tres restantes son dinoflagelados tecados afiliados al género *Peridinium* (figura 27D y I) o *Woloszynskia* (figura 28F).

Con respecto al tamaño se observó que la mayoría de las Chrysophyta encontradas son células por lo general menores a 8 μm de longitud, con la excepción de *Dinobryon* (*Crisófito* 7) que puede alcanzar las 15 μm . Las Cryptophyta fueron generalmente más grandes (células mayores a 8 μm) mientras que las Dinophyta presentaron un amplio rango de tamaños con células de 5 μm (*Dinófito* 1) hasta células que superaban las 20 μm .

Todas las especies de los tres grupos taxonómicos descritas en la tabla 8 presentaron presas ingeridas. Sin embargo, hay una gran variabilidad en la frecuencia de células que presentaron ingestión respecto a la presa (grupo procariota), así como entre los grupos de protistas e incluso entre especies del mismo grupo entre los diferentes lagos. Con el fin de profundizar en la actividad fagotrófica, en los siguientes apartados se analiza en detalle su variación en relación al sistema (comparativa entre lagos), y en relación al tipo de protista (comparativa entre categorías considerando el conjunto de lagos).

Tabla 8. Protistas mixotróficos analizados en el presente estudio clasificados en categorías según su tamaño y la presencia o ausencia de tecas. Se muestra los géneros a los que se pueden asociar, así como su abundancia (células ml⁻¹) máxima y mínima y el número de lagos donde se encontraron.

Grupo	Categoría	Tamaño	Genero(s) asociado(s)	Abundancia		N° Lagos
				Mínima	Máxima	
Cryptophyta	Criptófita 1	<10 µm	<i>Chroomonas, Rhodomonas.</i>	122 ± 29	3348 ± 1666	9
	Criptófita 2	10-15 µm	<i>Rhodomonas, Cryptomonas</i>	21 ± 6	453 ± 126	7
	Criptófita 3	>15 µm	<i>Cryptomonas</i>	10 ± 0	444 ± 295	16
Chrysophyta	Crisófita 1	<3 µm	<i>Chromulina</i>	199 ± 29	4168 ± 1045	15
	Crisófita 2	3-5 µm	<i>Chromulina, Ochromonas</i>	40 ± 26	3192 ± 499	15
	Crisófita 3	Tecada <5µm	<i>Kephyrion, Pseudokephyrion</i>	27 ± 0	3792 ± 286	9
	Crisófita 4	Colonial <5 µm	<i>Uroglena</i>	460 ± 69	11531 ± 5623	2
	Crisófita 5	5-10 µm	<i>Chromulina, Ochromonas</i>	56 ± 25	1392 ± 601	10
	Crisófita 6	Tecada 5-10 µm	<i>Chrysococcus</i>	21 ± 14	3140 ± 1853	3
	Crisófita 7	>10 µm	<i>Dinobryon</i>	26 ± 31	1234 ± 522	12
	Crisófita 8	>10 µm	<i>Ochromonas</i>	131 ± 99	576 ± 370	4
Dinophyta	Dinófita 1	<5 µm	<i>Amphidinium</i>	58 ± 23	522 ± 176	6
	Dinófita 2	5-10 µm	<i>Amphidinium</i>	55 ± 17	241 ± 81	5
	Dinófita 3	10 µm	<i>Gymnodinium</i>	35 ± 14	1369 ± 448	9
	Dinófita 4	>10µm<	<i>Amphidinium</i>	30 ± 0	1911 ± 299	12
	Dinófita 5	10-20 µm	<i>Peridinium</i>	12 ± 3	1455 ± 454	14
	Dinófita 6	>20 µm	<i>Woloszynskia</i>	28 ± 2	341 ± 73	5
	Dinófita 7	>10 µm	<i>Gymnodinium</i>	11 ± 2	114 ± 28	4
	Dinófita 8	>20 µm	<i>Peridinium</i>	14 ± 0	98 ± 36	9

7.4 Variación de la actividad fagotrófica entre lagos

En la figura 29 se puede observar la actividad fagotrófica, medida como el contenido de las vacuolas alimenticias promedio de las diferentes categorías de protistas presentes en cada sistema que presentaron ingestión en cada uno de los 20 lagos analizados. La ordenación de los lagos en el eje X fue establecida según la abundancia total de procariotas (presas) presentes en cada uno de ellos (ver figura 23). En general se observa que la medida del contenido promedio presenta desviaciones estándar elevadas debido a las variaciones del comportamiento individual. La Bassa Nera y la Bassa de Oles exhibieron la menor actividad con valores de contenido de la vacuola de $1,42 \pm 0,96$ y $1,49 \pm 1,63$ procariotas protista⁻¹ respectivamente, mientras que la Bassa de las Granotes ($5,55 \pm 2,29$ procariotas protista⁻¹) y el Pòdo ($4,70 \pm 5,40$ procariotas protista⁻¹) mostraron la mayor actividad. Los sistemas ácidos (Pica Palomera y Aixeus) presentaron bajas actividades con valores de $2,64 \pm 1,75$ y $2,00 \pm 1,04$ procariotas protista⁻¹ y no difirió con respecto a los básicos como el Pois ($2,48 \pm 1,49$ procariotas protista⁻¹). Así mismo, no se observó un patrón de actividad relacionado con la

abundancia total de procariotas en el medio, ni con la biomasa fitoplanctónica de la muestra (chl_a), ni con la disponibilidad de nutrientes o profundidad del sistema.

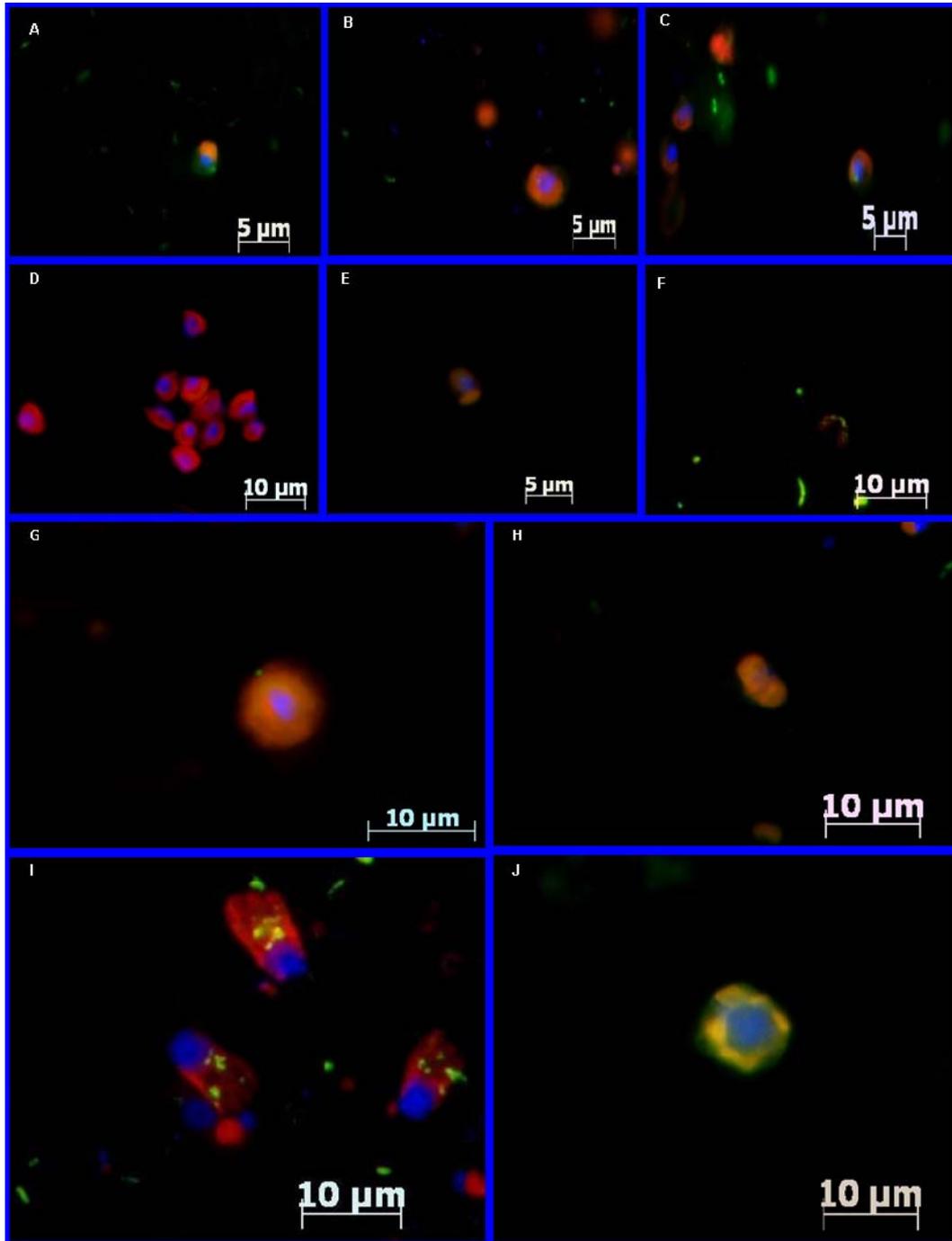


Figura 27. Imágenes de algunos protistas mixotróficos <math><10\ \mu\text{m}</math>, habituales en lagos evaluados obtenidas por microscopía de epifluorescencia. En azul aparecen los núcleos teñidos con DAPI, en rojo la autofluorescencia de la clorofila y en verde las bacterias hibridadas con CARD-FISH. A) *Crisófitas* 1 B) *Crisófitas* 2 C) *Crisófitas* 3 D) *Crisófitas* 4 E) *Dinófitas* 1 F) *Crisófitas* 6 G) *Crisófitas* 5 H) *Dinófitas* 2 I) *Criptófitas* 1 y K) *Dinófitas* 3.

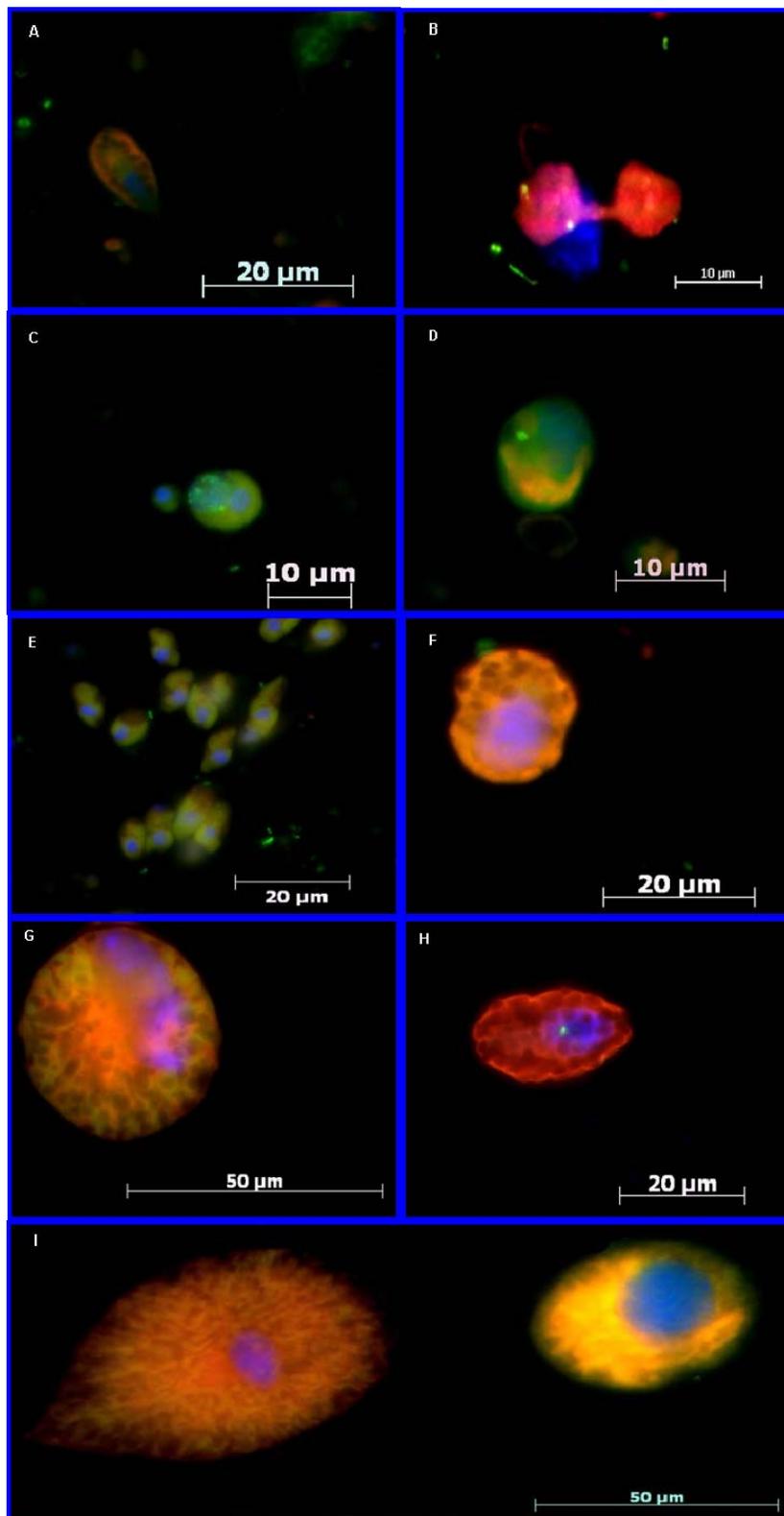


Figura 28. Imágenes de algunos protistas mixotróficos $>10 \mu\text{m}$, habituales en lagos evaluados obtenidas por microscopía de epifluorescencia. En azul aparecen los núcleos teñidos con DAPI, en rojo la autofluorescencia de la clorofila y en verde las bacterias hibridadas con CARD-FISH. A) *Criptófita* 2. B) *Dinófitita* 4 C) *Crisófitita* 8 D) *Dinófitita* 5 E) *Crisófitita* 7 F) *Dinófitita* 6 G) *Dinófitita* 7 H) *Criptófita* 3 I) *Dinófitita* 8.

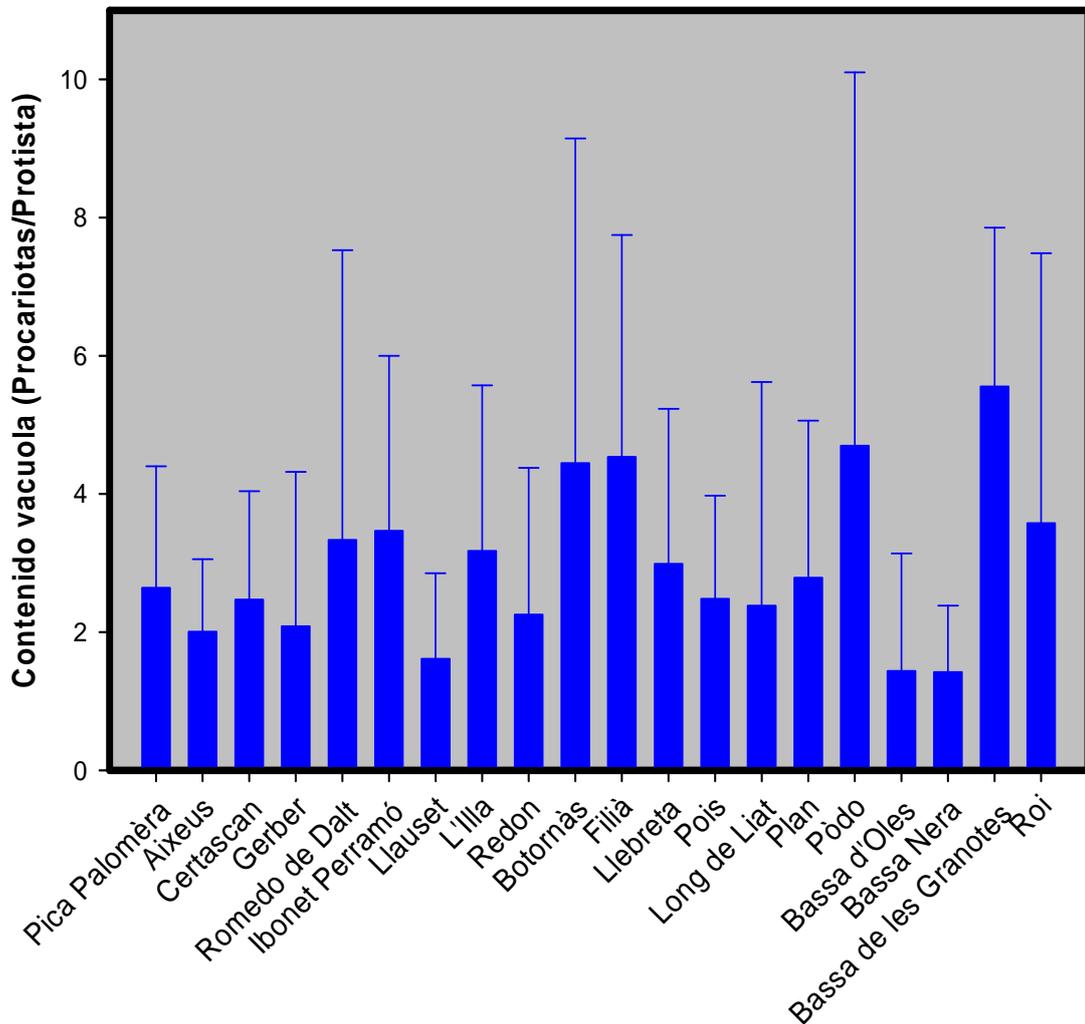


Figura 29. Medida de la actividad fagotrófica estimada en los diferentes lagos analizados. El contenido de la vacuola es el valor medio respecto a todos los protistas mixotróficos que presentaron ingestión (suma de las presas marcadas con cada una de las sondas).

La forma en que esta actividad fagotrófica afecto a los diferentes grupos de procariotas, propios de cada sistema, puede ser observado en la figura 30. En todos los lagos, la mayor presión predatoria se dio principalmente sobre las *Actino*, seguido por las *Betap*. *Archaea* y *Cito-Fla* por su parte, fueron observados en menor cantidad como parte del contenido de las vacuolas alimenticias de los protistas. La presión mayoritaria sobre *Actino* y *Betap* fue un comportamiento generalizado que se observó en una elevada proporción de las categorías que presentaban ingestión (figura 31) En contraste, en aquellos sistemas donde hubo ingestión sobre *Archaea* o *Cito-Fla*, el porcentaje de

categorías que lo realizaban fue entre medio y bajo, es decir, que no fue un comportamiento generalizado entre los mixotrófos presentes en la muestra.

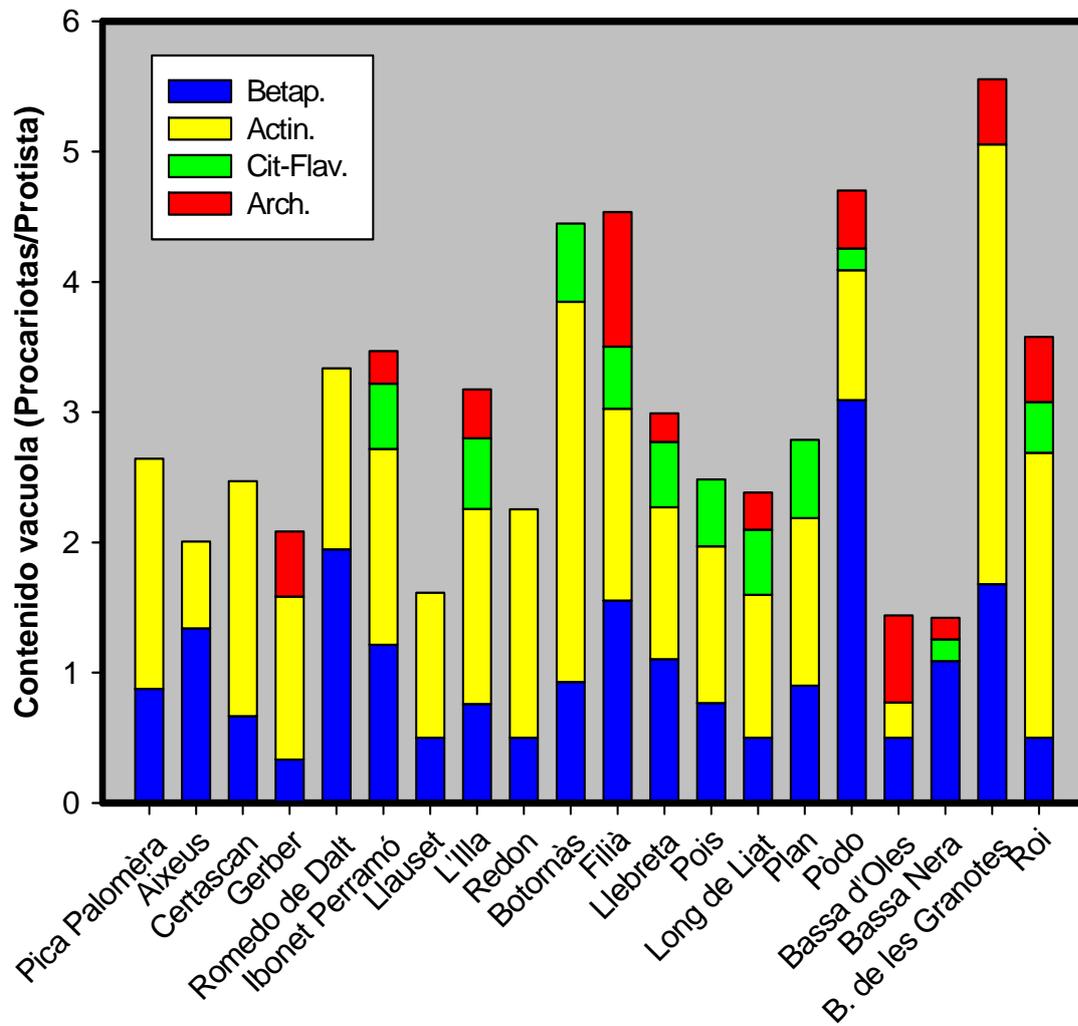


Figura 30. Composición del conjunto de presas ingeridas por protistas mixotróficos en los diferentes lagos analizados. El contenido de la vacuola, es el valor medio considerando todos los protistas mixotróficos que presentaron presas hibridadas en su interior y para cada sonda específica.

A partir del contenido de presas medido para cada categoría de protista en los diferentes lagos, se estimó la correspondiente tasa de ingestión para cada una de ellas en función de su tamaño y mediante los valores de la regresión obtenidas en el apartado 3.2 (ver figura 13). Posteriormente, teniendo en cuenta las abundancias de los diferentes protistas, se estimó la presión de “grazing” en cada sistema (tabla 9), obteniendo valores entre 1013

± 1424 procariotas $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Plan) y 17256 ± 22745 procariotas $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (Roi). Esta presión de *grazing* a su vez equivale a un porcentaje de procariotas depredadas que osciló entre $0,22 \% \text{h}^{-1}$ en la Bassa de las Granotes y $4,17 \% \text{h}^{-1}$ en el Certascan.

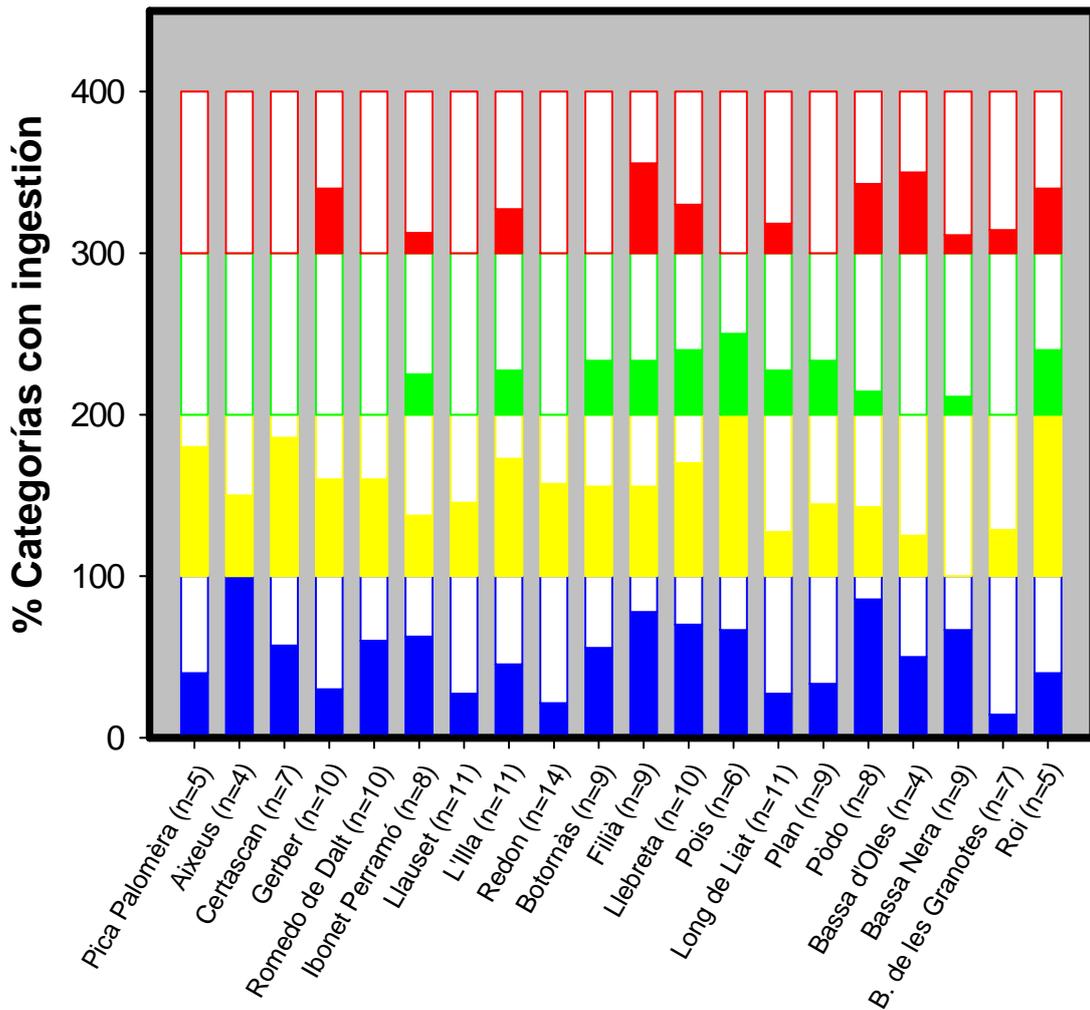


Figura 31. Proporción de categorías que presentaban ingestión para los cuatro grupos de presas y en los diferentes lagos. En el eje X se indica el número concreto de categorías de mixótrofos presentes en cada uno de los lagos. Los colores representan Betaproteobacteria (azul), Actinobacteria (amarillo), *Citofaga-Flavobacterium* (verde) y Archaea (rojo).

Tabla 9. Estima de la actividad fagotrófica de los protistas mixotróficos en los 20 lagos analizados. La tasa de ingestión fue estimada a partir de las tasas de digestión del apartado 3.2. Para esto se asumió una $Q_{10} = 2$ y una temperatura del DCM de 5°C.

Lago	Tasa de Ingestión (Proc. Prot ⁻¹ h ⁻¹)	Grazing total (10 ³ Proc. ml ⁻¹ h ⁻¹)	Procariontes depredadas (% h ⁻¹)
Pica Palomera	10,3 ± 4,8	1,7 ± 1,1	2,3
Aixeus	6,6 ± 3,3	2,1 ± 3,4	1,0
Certascan	5,7 ± 2,9	2,4 ± 3,9	4,2
Gerber	6,6 ± 4,7	8,7 ± 15,1	3,3
Romede de Dalt	7,3 ± 5,4	2,7 ± 4,5	1,7
Ibonet Perramo	7,9 ± 4,5	9,7 ± 16,5	2,4
Llauset	5,3 ± 3,2	1,5 ± 1,6	1,4
L'Illa	7,6 ± 4,4	2,8 ± 3,8	0,9
Redon	5,9 ± 3,7	2,3 ± 3,4	1,3
Botornas	9,2 ± 5,3	5,1 ± 6,6	2,0
Filia	12,8 ± 4,4	12,6 ± 17,1	2,3
Llebreta	7,1 ± 3,5	6,7 ± 10,3	1,4
Pois	8,3 ± 4,3	11,5 ± 13,4	2,7
Llong de Liat	5,4 ± 4,0	3,3 ± 7,2	1,0
Plan	7,2 ± 3,0	1,0 ± 1,4	0,2
Podo	11,2 ± 8,0	11,2 ± 24,0	2,3
Bassa d'Oles	2,9 ± 1,1	4,4 ± 8,9	0,5
Bassa Nera	3,0 ± 4,2	2,9 ± 5,8	0,3
Bassa Granotes	8,8 ± 0,6	1,4 ± 1,7	0,2
Roi	11,8 ± 6,3	17,3 ± 22,7	1,7

7.4.1 Selección de presas

Con el fin de establecer si los patrones de ingestión observados en los diferentes lagos (figura 30) eran debidos a la disponibilidad de presas en el medio, o por lo contrario, había una preferencia diferencial por ingerir algunos de estos grupos, se calcularon los índices de selección (ver apartado 5.5) para cada una de los protistas analizados. Este índice tiende a resaltar los patrones selectivos más extremos, por ejemplo un clara preferencia de un determinado tipo de presas (valores >0,1) conlleva la obtención de valores negativos del índice para los otros tipos de presas que no siempre corresponde a un rechazo real de estos. Por esta razón y para resaltar aquellas selecciones (designadas como secundarias) que podrían quedar enmascaradas por las selecciones principales, el índice fue aplicado dos veces consecutivas. En un principio, el índice fue aplicado teniendo en cuenta los cuatro grupos de procariontes (obtención de las selecciones principales), en un segundo paso el índice se calculo considerando solo aquellos grupos de procariontes que no presentaron una selección positiva en el primero (obtención de las

selecciones secundarias). De esta forma, en la figura 32 se pueden observar el comportamiento selectivo de los protistas mixotróficos sobre los cuatro grupos de procariotas en cada uno de los lagos. Para esto se tuvo en cuenta en cada lago el número de categorías de protistas que presentaban valores de índice de -1 (rechazo), $<-0,1$ (selección negativa), de $-0,1$ a $0,1$ (selección al azar) y $>0,1$ (selección positiva principal o secundaria).

Las *Actino* fueron seleccionadas positivamente por la mayoría de los protistas en 14 de los 20 lagos estudiados, de los siete sistemas restantes, en cuatro fueron seleccionadas positivamente por una minoría de los protistas, en el Pòdo su selección fue secundaria y en la Bassa Nera fue seleccionada negativamente por todos los protistas presentes. Por su parte, la selección de *Betap* fue en general al azar o positiva secundaria, sólo en el Pois, Pòdo y la Bassa Nera presentó una selección positiva principal por la mayoría de los protistas. Finalmente, *Cito-Fla* y Archaea presentaron selecciones negativas en la mayoría de los lagos, con la excepción de casos puntuales donde algunos grupos de protistas pueden seleccionarlos positivamente, como el Certascan para las arqueas o el Botornàs para *Cito-Fla*.

7.5 Variación de la actividad fagotrófica entre protistas.

En la figura 33 se puede observar la actividad fagotrófica de cada uno de las categorías establecidas (ver apartado 7.3), medida como el promedio del contenido de la vacuola en cada uno de los lagos donde se encuentran presentes. Aunque la variabilidad en la medida es elevada, hay una clara relación con el tamaño células, de esta forma, las células de menor tamaño presentaron contenidos menores, cuyos valores que oscilaron entre $1,33 \pm 1,45$ y $1,66 \pm 0,94$ procariotas protista⁻¹ para la *Crisófito* 1 y *Dinófito* 1 respectivamente. A tamaños intermedios los contenidos también presentaron valores intermedios, como es el caso de la *Dinófito* 3 ($3,28 \pm 2,16$ procariotas protista⁻¹) o la *Criptófito* 1 ($3,39 \pm 2,03$ procariotas protista⁻¹), mientras que las Dinophyta más grandes, la *Criptófito* 3. y la *Crisofito* 8 exhibieron los mayores contenidos que variaron entre $4,50 \pm 4,76$ y $6,45 \pm 6,82$ procariotas protista⁻¹.

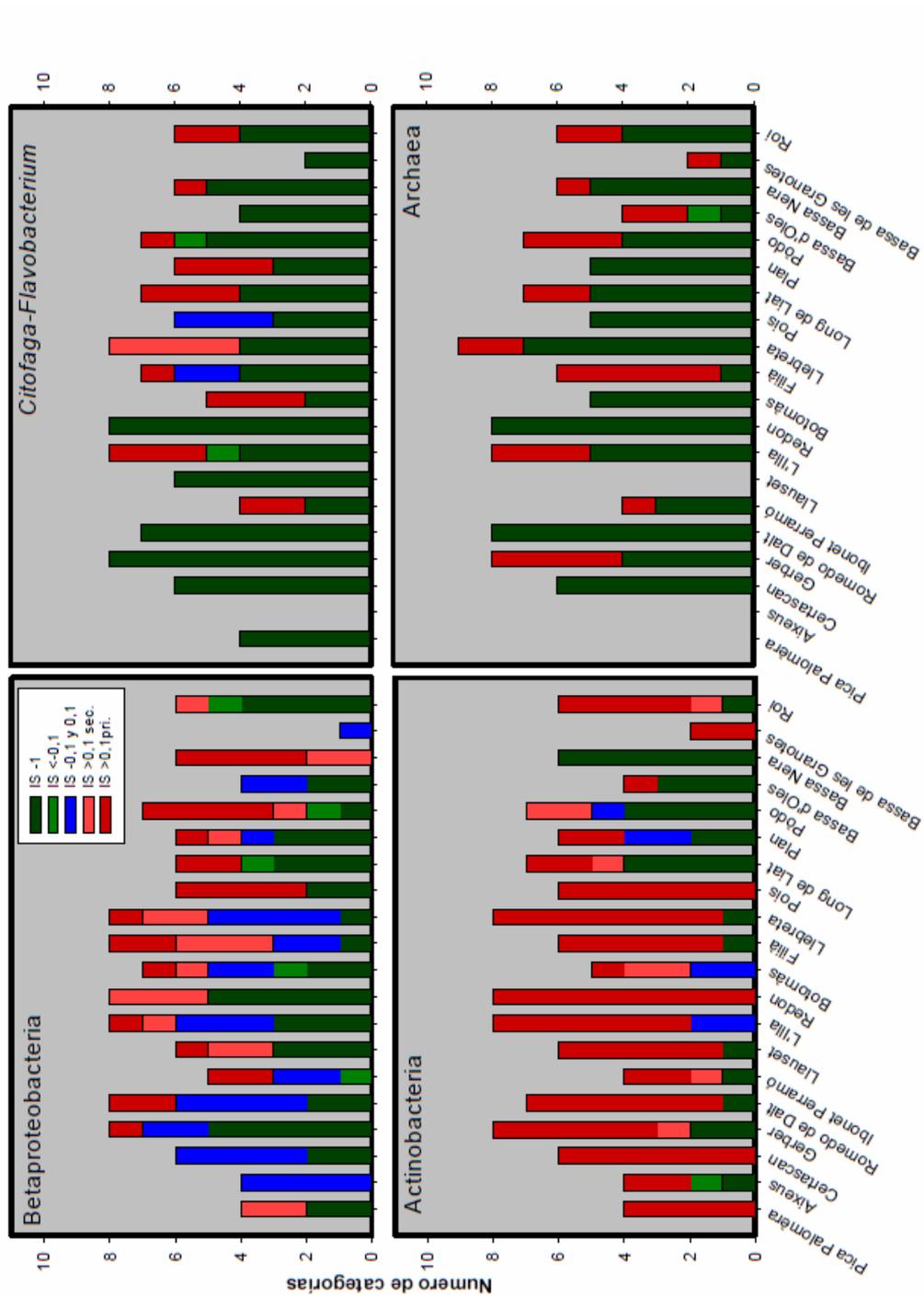


Figura 32. Comportamiento selectivo de los protistas mixotróficos en cada lago. En el eje de las Y se representa en número de categorías de protista que presentan un valor del índice de selección (IS) que puede ser -1 (verde oscuro), <-0.1 (verde claro), entre -0.1 y 0.1 (azul) y >0.1 (rojo y rosa). El color rojo

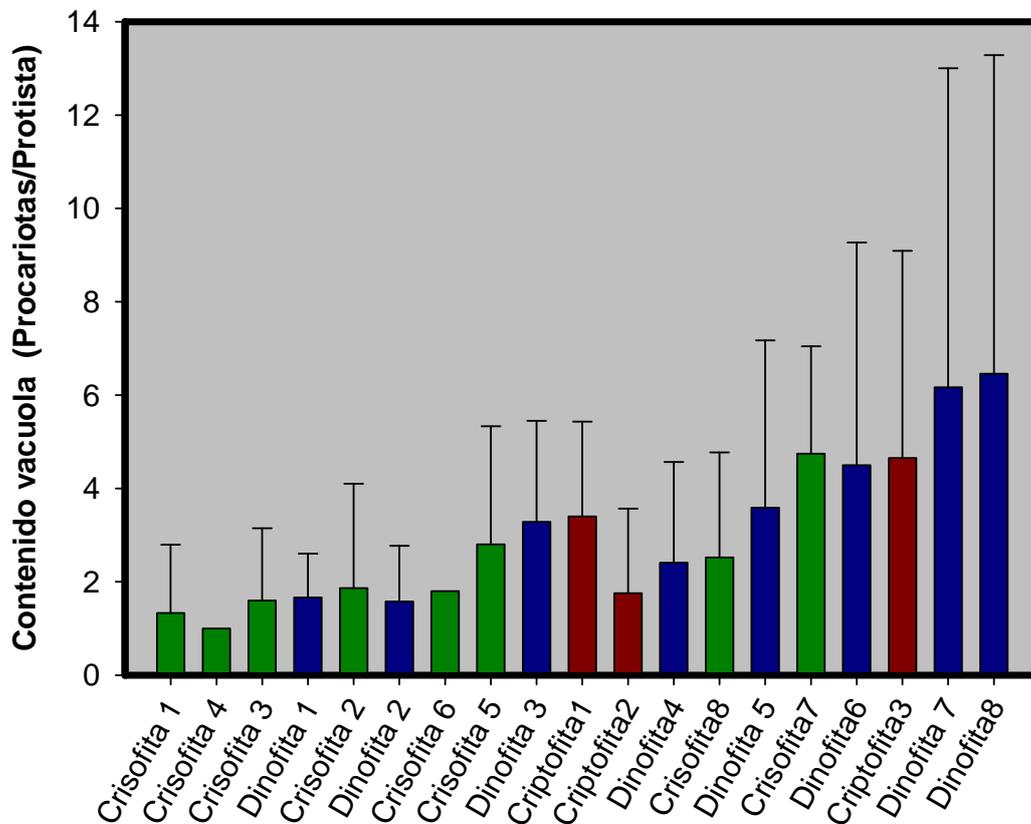


Figura 33. Actividad fagotrófica de los diferentes categorías establecidas ordenados por el tamaño celular. El contenido de la vacuola es el valor promedio del número presas ingeridas (suma de los cuatro grupos de procariotas marcadas) por cada categoría de protistas, en cada uno de los lagos donde se encuentra presente. Los colores representan cada uno de los grupos taxonómicos: Chrysophyta (verde), Cryptophyta (rojo) y Dinophyta (azul).

A partir de la abundancia de cada categoría de protista, se estimo la tasa de *grazing* total que ejercía cada una de ella en los diferentes lagos. Debido a su gran abundancia, las Chrysophyta ejercen una mayor presión de depredación alcanzando a remover entre 7513 procariotas $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (*Crisófita* 5) y 29990 procariotas $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (*Crisófita* 6) (figura 34). Así mismo, la *Criptófita* 1 ejerce también una alta presión de *grazing* alcanzando a remover 18978 procariotas $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$. Por el contrario las Dinophyta ejercen la menor presión de depredación con valores que oscilaron entre 267 procariotas $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (*Dinófita* 8) y 4658 procariotas $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ (*Dinófita* 3).

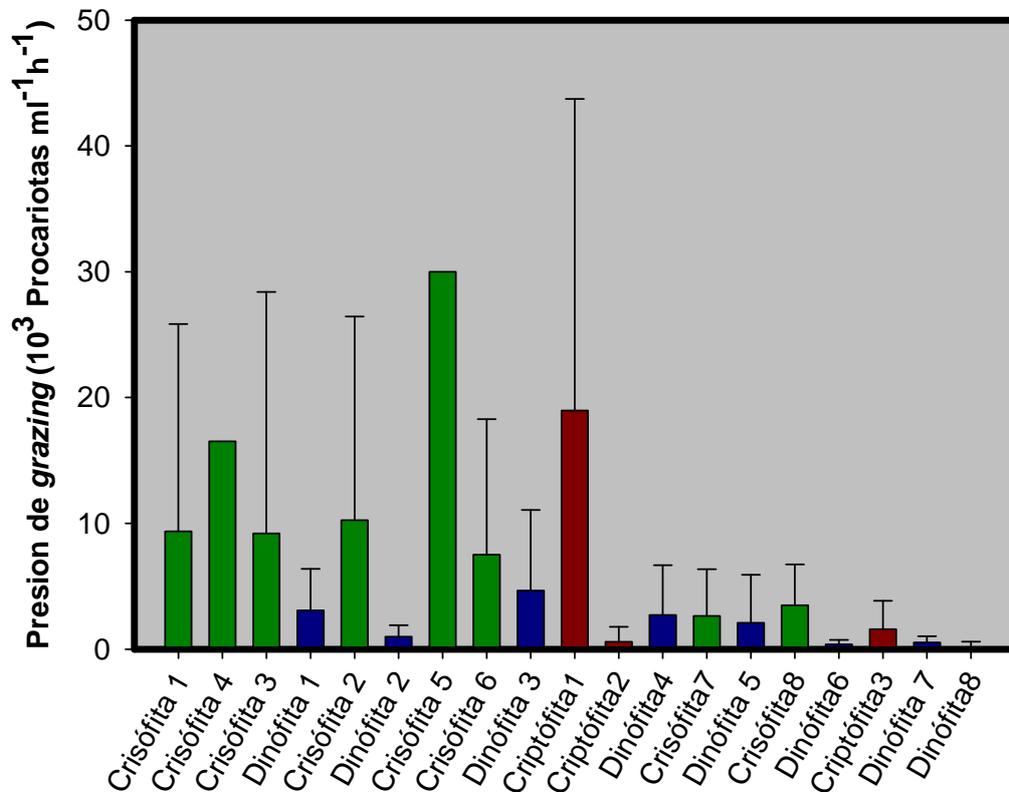


Figura 34. Estimaciones de la presión de *grazing* que ejercen los diferentes protistas analizados. Los colores representan cada uno de los grupos taxonómicos: Chrysophyta (verde), Cryptophyta (rojo) y Dinophyta (azul).

Por otro lado, la composición de presas en las vacuolas de los protistas se indica en la figura 35. Al igual que a nivel de lagos, las *Actino* y las *Betap* fueron las principales presas para la mayoría de los protistas con valores que oscilaron entre $0,67 \pm 0,71$ y $3,50 \pm 3,87$ procariontes protista⁻¹ para las primeras y entre $0,24 \pm 0,54$ y $4,67 \pm 4,72$ procariontes protista⁻¹ para las segundas. En el caso de la *Criptófito 1* y la *Dinófito 6* una notable fracción de su fagotrofia fue sobre las arqueas con valores de $0,57 \pm 0,54$ y $0,71 \pm 0,76$ procariontes protista⁻¹ respectivamente, mientras para *Crisófito 4* las arqueas fueron sus únicas presas. La mayor ingestión de *Cito-Fla* la presentaron el *Dinófito 3* ($0,50 \pm 0,53$ procariontes protista⁻¹, *Crisófito 7* ($0,50 \pm 0,53$ procariontes protista⁻¹) y la *Criptófito 3* ($0,47 \pm 0,65$ procariontes protista⁻¹).

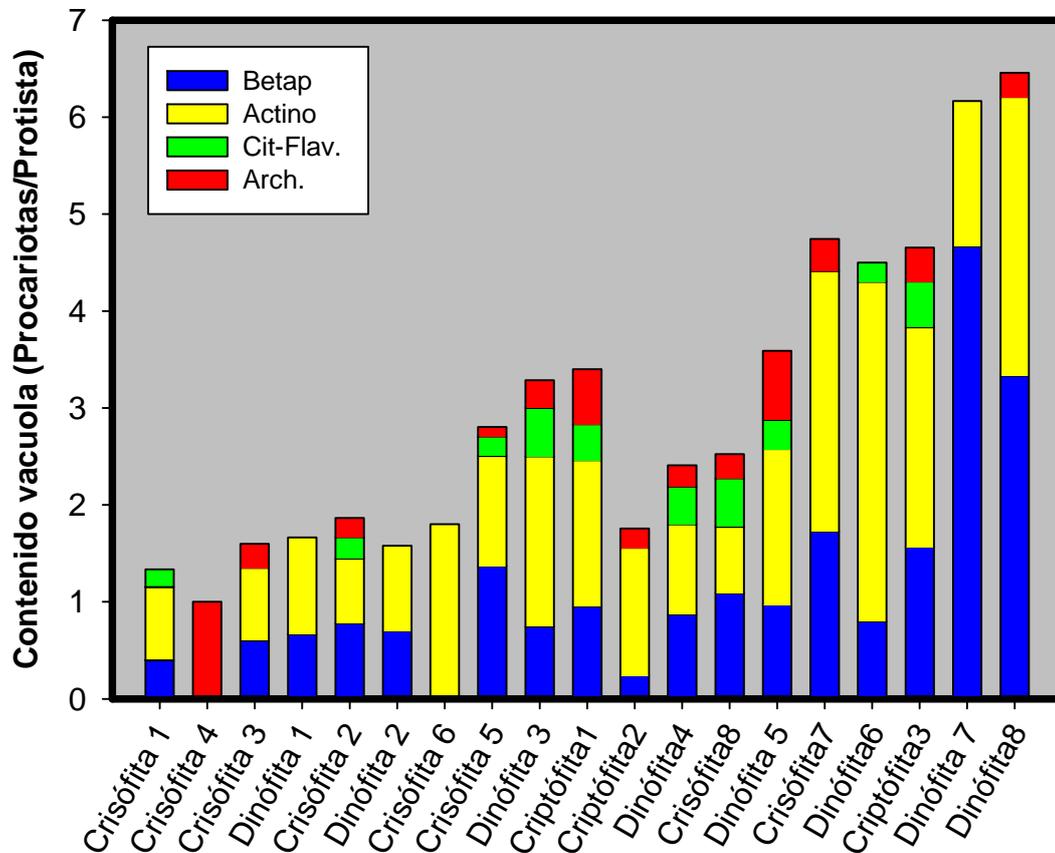


Figura 35. Composición de presas de las vacuolas alimenticias para las diferentes categorías de protistas establecidas. El valor del contenido de la vacuola es el promedio de presas ingeridas por el conjunto de individuos de una categoría en los diferentes lagos donde se encuentra.

En la figura 36-A se puede observar el porcentaje de lagos en que cada uno de las categorías de protistas presentaron presas ingeridas de cada uno de los grupos de procariotas. Estos porcentajes tendieron a seguir un patrón similar a la composición de la dieta alimenticia de cada uno de los protistas, con una gran mayoría de lagos presentando ingestión sobre *Actino* y *Betap*. Sin embargo, a un nivel más específico en cada uno de las categorías se puede observar que sólo en aquellos de mayor tamaño y, especialmente, para la ingestión sobre *Actino*, más de la mitad de las células exhibieron alguna actividad fagotrófica (figura 36, B), mientras para los de menor tamaño la ingestión de presas se presentó sólo en un número reducido de individuos. Ejemplos de esto son los casos de la *Crisófitas 6* o *Criptófitas 1*, que presentaron ingestión sobre *Actino* y *Betap* en la mayoría de los lagos donde estuvieron presentes pero esta

ingestión sólo fue llevada a cabo por un número muy reducido de individuos, o el caso contrario del *Dinófito 7* que ingirió *Actino* en pocos lagos pero esta actividad fue llevada a cabo por la mayoría de los individuos de la población.

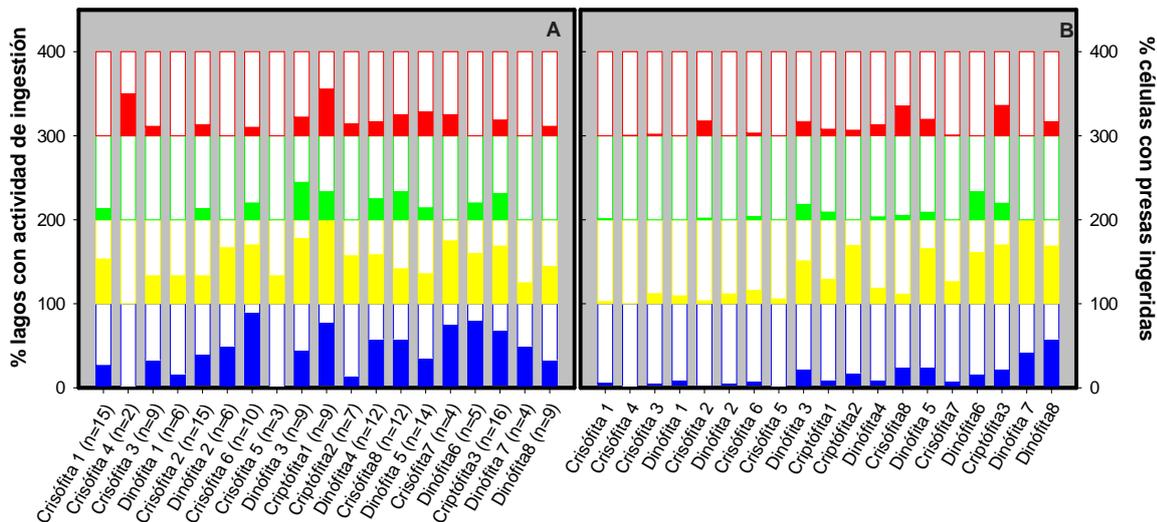


Figura 36. Porcentajes de actividad fagotrófica. A) Porcentaje de lagos en que las distintas categorías de protistas presentaron presas ingeridas en sus vacuolas alimenticias para cada uno de los cuatro grupos de procariotas diferenciados: n, corresponde al número de lagos donde apareció el protista. B) Proporción de individuos que presentaron ingestión de presas para cada grupo de procariotas. Los colores representan cada uno de los grupos de procariotas: Betaproteobacteria (azul), Actinobacteria (amarillo), *Citofaga-Flavobacterium* (verde), Archaea (rojo).

7.5.1 Selección de presas.

Al igual que en el apartado 7.4.1, se calculó el índice de selección para determinar si la mayor ingestión sobre algún grupo podría ser explicado por su abundancia en el medio (figura 37). 16 de las 19 categorías establecidas presentaron una selección positiva sobre *Actino* en la mayoría de los lagos donde se encontraban. Así mismo, en una minoría de lagos, protistas como la *Criptófito 1* y 3 seleccionaron *Actino* al azar o positivamente pero de una manera secundaria. Por su parte para las *Betap*, de las 19 categorías de protistas, la *Crisófito 2*, y los dinoflagelados *Dinófito 7* y *Dinófito 8* las seleccionaron positivamente en la mayoría de lagos donde se encontraron presentes. De igual manera, seis categorías las seleccionaron al azar principalmente, mientras que en el caso de la *Crisófito 1* y la *Criptófito 1* esta selección fue en un gran número de lagos negativa

evitando así su ingestión. Finalmente sobre este grupo de presas, en la mayoría de los protistas pero en una minoría de lagos, se presentó una selección positiva secundaria.

Para el grupo de Archaea y el de *Cito-Fla* la selección por la mayoría de los protistas y en un gran número de lagos fue negativa, con excepciones puntuales como fue el caso de la *Criptófita* 1 y la *Dinófita* 5 que en un número considerable de lagos seleccionó positivamente a las Archaea.

7.6 Efectos del tamaño celular sobre la actividad fagotrófica

Con el fin de establecer los factores que puedan explicar la variación de la actividad fagotrófica entre los protistas y sus comportamientos selectivos, se realizaron modelaciones lineales mixtas (Zuur *et al.*, 2009) relacionando en primer lugar el contenido de las vacuolas alimenticias, con el tamaño celular de cada protistas y otros factores como la abundancia total de presas (conteos de DAPI), el grupo taxonómico (Chrysophyta, Cryptophyta y Dinophyta) y la presencia o ausencia de tecas alrededor de la célula. En segundo lugar, se relacionó la selección de presas que se presentaron los protistas sobre cada uno de los grupos de presas con el tamaño medio de éstas en cada uno de los lagos estudiados.

En la tabla 10 se pueden observar los valores del modelo que mejor explica la variación del contenido de las vacuolas de los protistas. El tamaño celular fue el factor que mejor explicó la varianza de la actividad fagotrófica, la cual siguió una relación positiva, es decir, los protistas más grandes presentaron mayor contenido de las vacuolas con respecto a los pequeños, como se observa en la figura 32. Adicionalmente, al modelo se le agrego una variación aleatoria proveniente del grupo taxonómico al que pertenece cada protista, y una proveniente del lago que se relaciona con la dispersión de los puntos.

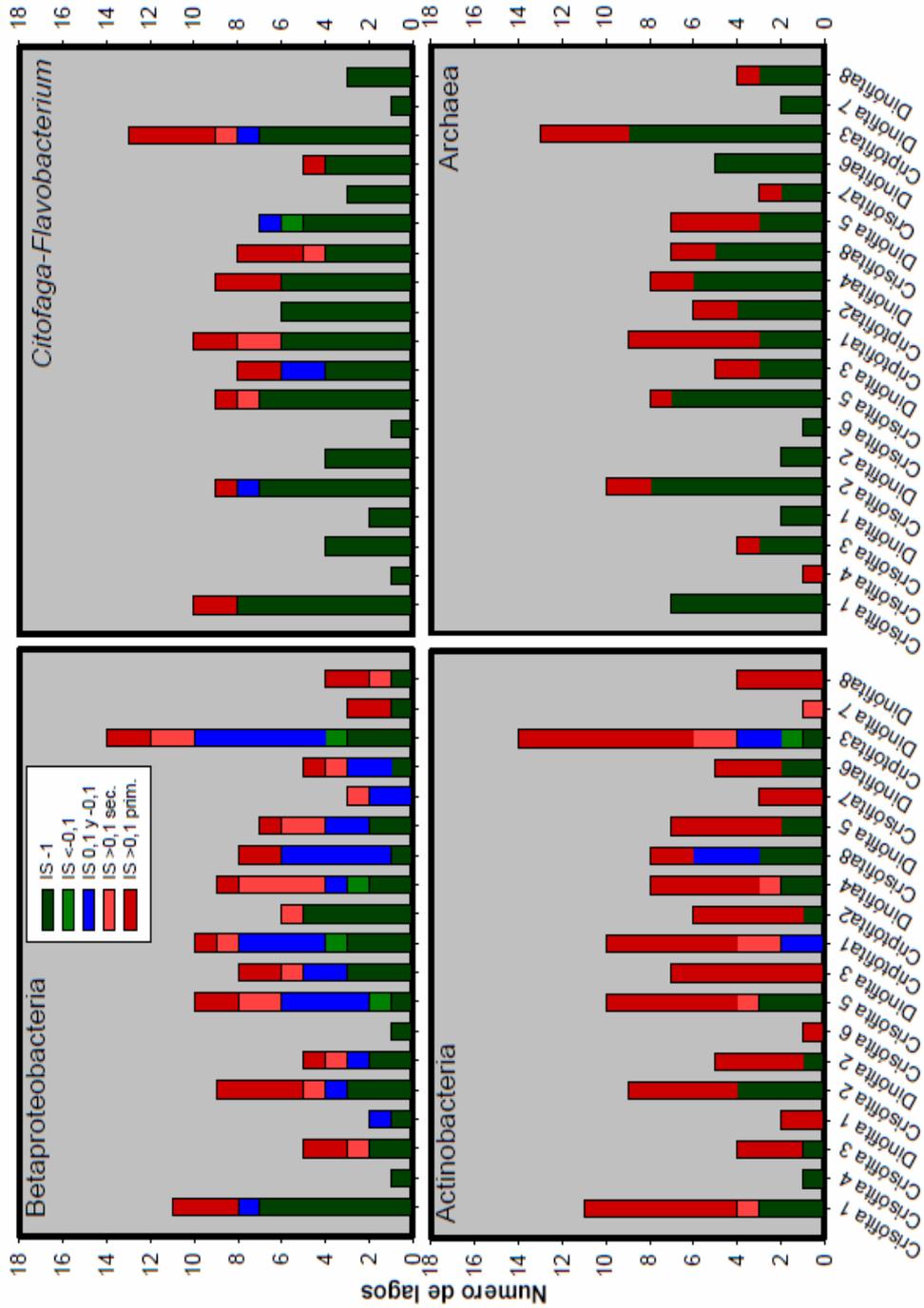


Figura 37. Comportamiento selectivo de los protistas. En el eje de las Y se representa el número de lagos en que cada categoría de protista presentó un valor del índice de selección (IS) que puede ser -1 (verde oscuro), $<-0,1$ (verde claro), entre $0,1$ y $0,1$ (azul) y $>0,1$ (rojo y rosa). El color rojo indica una selección positiva principal, mientras el color rosa indica una selección positiva secundaria.

Tabla 10. Relación de la actividad fagotrófica con el tamaño de los protistas

	Coficiente	Desvest	gl	t-valor	p-valor
Intercepción	1,24903	0,27776	100	4,49674	<0,0001
Tamaño protista	0,16232	0,02703	100	6,00622	<0,0001

Así mismo, en la tabla 11 se muestran los modelos de la relación entre la selección sobre cada uno de los grupos de procariotas con respecto a su tamaño que fueron estadísticamente significativos. La selección sobre *Actino* y *Cito-Fla* fue significativamente explicada por el tamaño de las *Betap*. Además el tamaño de Archaea también presenta una cierta influencia sobre la selección de *Actino*. La influencia del tamaño de *Betap* en la selección de *Actino* fue positiva (figura 38), mientras que para *Cito-Fla* la influencia fue negativa (figura 38). Finalmente, la selección de Archaea y *Betap* no se relacionó ni con la selección de los demás grupos, ni con el tamaño celular propio o el de los demás grupos.

Tabla 11. Relación del comportamiento selectivo con el tamaño de las presas

Selección		Coficiente	Desvest	gl	t-valor	p-valor
<i>Actino</i>	Intercepción	44,8240	69,7114	14	0,6429	0,5306
	Tamaño Archaea	92,2083	29,4800	14	3,1278	0,0074
	Tamaño <i>Betap</i> .	134,4028	44,1533	14	3,0440	0,0088
<i>Cito-Fla</i>	Intercepción	105,1611	24,6456	17	4,2669	0,0005
	Tamaño <i>Betap</i>	-115,0600	33,0761	17	-3,4786	0,0029

8 Discusión

8.1 Importancia de los mixótrofos en los lagos de alta montaña

Es poca la información que se tiene sobre la presión depredatoria que ejercen los flagelados mixotróficos sobre las comunidades de procariotas, especialmente en sistemas como los lagos de alta montaña, así como las generalización o diferenciación de los comportamientos fagotróficos entre las diferentes especies de protistas (Montagnes *et al.*, 2008), o entre especies similares habitando sistemas diferentes. En el presente estudio se pueden observar tasas de ingestión considerables en todos los lagos

muestreados (tabla 9), teniendo en cuenta que las muestras fueron obtenidas en el máximo profundo de clorofila, donde se supone que las especies fitoplanctónicas tienen el óptimo de luz para sus actividades fototróficas, parece probable entonces que la fagotrofia en estos sistemas sea una actividad habitual de los protistas mixotróficos y no una respuesta a eventos puntuales. En algunos casos parece existir comportamientos similares entre especies presentes en un mismo lago, como puede ser el caso del Pica Palomera y el Certascan donde todos los protistas mixotróficos seleccionan preferentemente sobre el grupo de Actinobacteria o el Filià donde la mayoría seleccionan Archaea (ver figura 32).

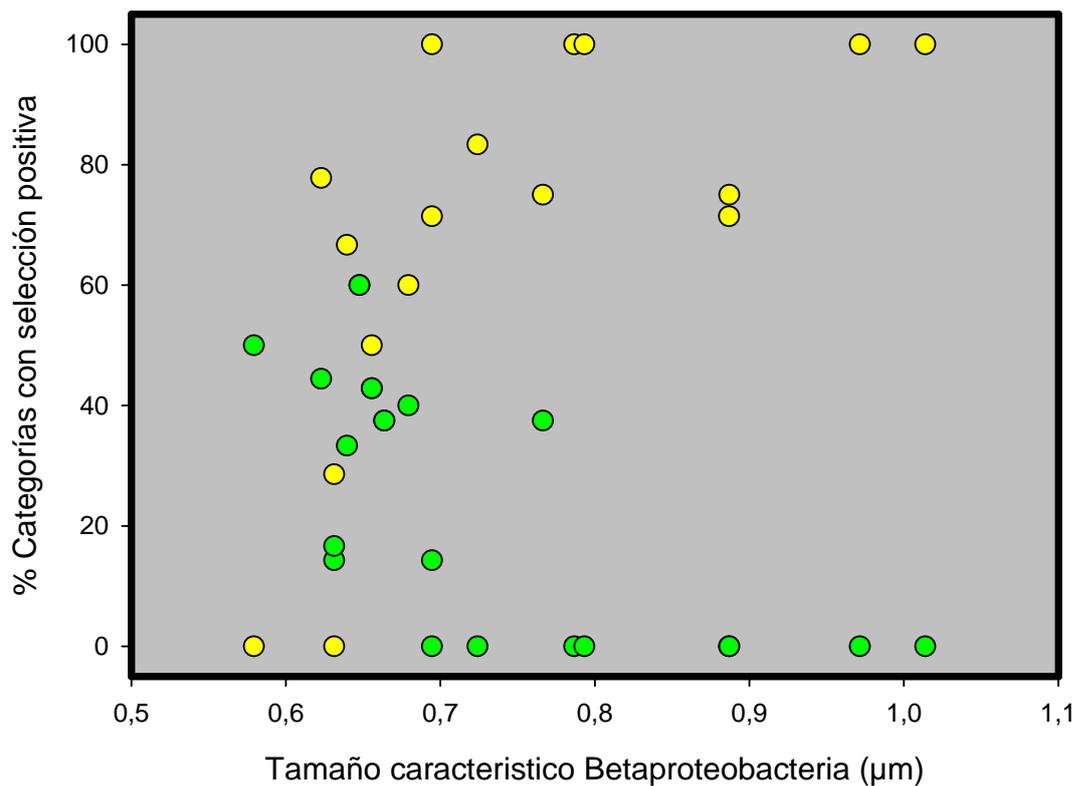


Figura 38. Relación entre el tamaño celular de las Betaproteobacteria y la selección sobre los grupos de Actinobacteria (amarillo) y *Citofaga-Flavobacterium* (verde).

También se presentan comportamientos similares entre especies taxonómicamente muy próximas, incluidas en la misma categoría, que se encuentran en diferentes lagos. Este es el caso de la *Crisófito* 1 correspondiente a pequeñas Chrysophyta flageladas

(*Chromulina* y/o *Ochromonas*) de pocas micras de diámetro, o la *Crisófito* 7 categoría que engloba los individuos del género *Dinobryon*; o la *Dinófito* 3 entre otras, las cuales presentan preferencias similares por las Actinobacteria, o las *Criptófito* 1 que parece generalizar su preferencia por Archaea (ver figura 37). Sin embargo, también se pueden encontrar casos opuestos donde las diferentes especies de un lago tienen comportamientos particulares como en el Botornàs o especies estrechamente relacionadas que presentan comportamientos diferentes en los distintos sistemas donde se encuentran presentes (por ejemplo la *Crisófito* 8 o la *Criptófito* 3). Estadísticamente no se pudo determinar que el factor clase de protista tuviera ninguna influencia con el factor de selección. Es la composición de los propios procariontes (presas), en grupos o tamaño, el factor que más influye sobre la selección de las mismas.

Este estudio no sólo confirma la importancia de los protistas mixotróficos como consumidores de bacterias en los lagos de alta montaña, sino que evidencia que el consumo recae principalmente en las especies de menor tamaño. A pesar que los protistas pequeños (<10 µm) presentaron menores contenidos de presas en sus vacuolas (figura 33) y que en la mayoría de los lagos el porcentaje de células que presentaban este contenido era bajo (figura 36), debido a su mayor abundancia, ejercieron un mayor impacto de *grazing* sobre las comunidades bacterianas (figura 34). Esto está en concordancia con lo reportado por Zubkov and Tarran (2008) y, recientemente, por Hartmann *et al.* (2012), los cuales observaron que las especies fitoplanctónicas marinas con capacidad mixotrófica y tamaños <5 µm podrían ser las principales responsables de la bacterivoria en el Océano Atlántico norte y en los giros subtropicales. Si bien las categorías que más consumen están en el rango de tamaño entre 5-10 µm (*Crisófito* 5 y *Criptófito* 1), las Chrysophyta más pequeñas (<5 µm) ejercen en su conjunto una alta presión predatoria, por la misma razón anteriormente expuesta (figura 34).

8.2 El tamaño de los protistas mixotróficos determinan su actividad fagotrófica

En la literatura se discute la importancia y el efecto que algunas características de las presas, como son el tamaño, la movilidad, la estructura y la composición de la pared celular entre otras, ejercen sobre la capacidad fagotrófica que puede exhibir un protista mixotrófico o heterotrófico (Chrzanowski and Šimek 1990, Šimek and Chrzanowski

1992, González *et al.*, 1993, Monger *et al.*, 1999). Sin embargo, es menos conocido como características propias del depredador influyen sobre su comportamiento fagotrófico. Factores como el estado fisiológico, movilidad, tamaño, señales químicas o la composición de receptores de membrana para la identificación de las presas, han sido identificados por influir en los diferentes pasos que constituyen los mecanismos de alimentación de un protista fagotrófico (ver figura 3) (Montagnes *et al.*, 2008, Roberts *et al.*, 2011a, Roberts *et al.*, 2011b). Así mismo, se desconoce si estas características del depredador son rasgos dependientes o independientes del grupo taxonómico al que pertenece el protista.

En el presente trabajo se encontró una relación positiva entre el tamaño de los protistas y su actividad fagotrófica, medida como el contenido de presas que se acumulan en sus vacuolas alimenticias (tabla 10). Sobre esta relación además se presenta una mínima influencia del grupo taxonómico al que pertenece cada protista. Sin embargo, ni este factor ni la presencia o ausencia de una teca alrededor de la célula, resultaron estadísticamente significativos ($P > 0,05$), indicando que la importancia del tamaño es independiente de la morfología celular.

Aquellos organismos de mayor tamaño podrían albergar un mayor número de vacuolas alimenticias o bien pocas vacuolas pero de tamaños superiores, que en cualquiera de los dos casos, implicaría un mayor espacio para almacenar y digerir las presas capturadas. Esto es sugerido por González *et al.* (1993) cuando compararon la actividad de un flagelado heterotrófico alimentado con bacterias en diferentes condiciones de crecimiento que permitió obtener depredadores de diferentes tamaños, y observando que aquellos más grandes presentaban mayores tasas de ingestión que los de menor tamaño. Adicionalmente a la posibilidad de diferir en el número o tamaño de las vacuolas alimenticias, otra explicación podría relacionarse a un aumento en la probabilidad de encuentro entre el depredador y la presa. Organismos de mayor tamaño tienen una mayor probabilidad de contacto con sus presas (Flynn *et al.*, 1996), que adicionalmente, depende de la velocidad del depredador, la cual está relacionada positivamente con su tamaño (Catalan 1999). A su vez, el tamaño de la presa influye en la relación tamaño predador-tamaño presa y de esta manera en la posibilidad de contacto y captura por

parte del protista (Montagnes *et al.*, 2008). Así mismo, esta probabilidad de encuentro depende de la abundancia propia de cada depredador, por lo cual, en nuestro caso la mayor abundancia de las especies de menor tamaño pueda compensar dicha probabilidad con respecto a los protistas más grandes pero menos abundantes.

Por otro lado, en el primer capítulo de esta tesis, se observó una diferencia en la velocidad de digestión de las presas entre protistas grandes ($>10\ \mu\text{m}$) que digieren una bacteria en 10 min, y pequeños ($<10\ \mu\text{m}$) que tardan unos 5 min en hacerlo. Esta diferencia podría estar viéndose reflejada en los resultados obtenidos, en base a una misma tasa de ingestión en los protistas más grandes, que digieren de una manera más lenta, aumenta la probabilidad de encontrar siempre presas en el interior de sus vacuolas alimenticias; por el contrario, en aquellos más pequeños con tasas de digestión más rápidas, sería más difícil encontrar presas en sus vacuolas, puesto que ya habrían sido procesadas.

8.3 Efecto del tamaño de la presa sobre el comportamiento selectivo: “mi tamaño determina tu suerte”

Una clara preferencia sobre dos grupos de procariotas –*Actino* y *Betap*- fue evidenciado, tanto entre los diferentes lagos como entre las categorías de protistas establecidos. Debido a que el índice de selección aplicado ya tiene en cuenta la abundancia relativa de cada grupo, las selecciones positivas sobre el grupo de *Actino* no puede ser explicada por una ingestión al azar e indica que otros factores, diferentes a su abundancia, determino su patrón de selección.

Características morfológicas, fisiológicas y de comportamiento de las presas han sido descritas como factores importantes que determinan la selectividad en protistas fagotróficos (Chrzanowski and Šimek 1990, Šimek and Chrzanowski 1992, González *et al.*, 1993, Monger *et al.*, 1999). De estas características, el tamaño ha recibido un mayor atención y ha sido propuesto como el factor de mayor relevancia sobre los comportamientos selectivos de los protistas (Chrzanowski and Šimek 1990, Gonzalez *et al.*, 1990, Šimek and Chrzanowski 1992, Posch *et al.*, 2001, Jezbera *et al.*, 2006), además que puede influir en los diferentes pasos que componen el proceso de

alimentación de un protista fagotrófico (Roberts *et al.*, 2011b). Un amplio número de investigaciones han demostrado que bacterias con pequeños tamaños son menos susceptibles a la ingestión por parte de flagelados que aquellas con tamaños medios (Gonzalez *et al.*, 1990, Šimek and Chrzanowski 1992). En los lagos analizados en el presente estudio, se observó que las *Actino* fueron generalmente las más pequeñas, pero esto no les representó una protección contra la depredación de los protistas mixotróficos, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en el segundo capítulo de esta tesis y con lo reportado por otros autores que han observado que este grupo de bacterias es evitado por flagelados heterotróficos y es atribuido a su reducido tamaño (Pernthaler *et al.*, 2001b, Jezbera *et al.*, 2005, Jezbera *et al.*, 2006). Aunque las *Actino* fueron las más pequeñas, el tamaño relativo que fue medido en las muestras del DCM se encuentran dentro del rango de comestibilidad para los protistas (0,4 - 2 μm) usualmente reportados en la literatura (Gonzalez *et al.*, 1990, Holen and Boraas 1991, Šimek and Chrzanowski 1992) y son ligeramente mayores de las encontradas en las muestras del Redon donde no fueron ingeridas (comparar figura 17 y 26).

Aunque, en los modelos estadísticos elaborados el tamaño de las *Actino* no explicó su selección preferencial, ésta se relacionó con el tamaño de los otros grupos de procariontes. La selección dependió de una manera positiva del tamaño que presentaban las *Betap* (figura 38); es decir: “el tamaño de Betaproteobacteria determinó la suerte de las Actinobacteria”. Esto podría estar relacionado además con la abundancia que presenta cada grupo en los diferentes sistemas. Así, si las *Betap* numéricamente más importantes y por lo tanto más disponibles, aumentan su tamaño de manera que se hacen menos apetecibles para los protistas, éstos pasan a ingerir otras presas que aunque de menor abundancia son de menor tamaño como fue el caso de las *Actino*.

Las *Betap* se relacionaron igualmente con la selección de las *Cito-Fla* sólo que de una forma negativa. De esta manera, cuando las *Betap* presentan tamaños entre 0,4 y 0,7 μm , que ha sido reportado por muchos autores como tamaños elegibles por protistas fagotróficos (Gonzalez *et al.*, 1990, Holen and Boraas 1991, Šimek and Chrzanowski 1992), las *Cito-Fla* son ingeridas preferencialmente. Por el contrario, un aumento en el tamaño de las *Betap* parece representar un refugio contra la depredación para el segundo

grupo. Sin embargo, no está claro si este efecto es debido a estrategias similares por parte de los dos grupos, es decir que los dos grupos aumentan su tamaño paralelamente, lo cual no fue reflejado estadísticamente en el modelo, o si por lo contrario, los protistas se especializan exclusivamente en ingerir *Actino* cuando las *Betap* son más grandes y así discriminan finalmente de forma negativa sobre los otros grupos.

La actividad de los protistas mixotróficos representó una fuerte presión de *grazing* sobre las comunidades de procariotas de los diferentes sistemas (tabla 9), especialmente sobre los grupos menos abundantes, lo que podría determinar la estructura y composición del bacterioplancton. Numerosos trabajos han reportado cambios sucesionales de la estructura morfológica y la composición de las comunidades con relación a la presión depredatoria de protistas fagotróficos (Jürgens *et al.*, 1999, Šimek *et al.*, 2001a, Šimek *et al.*, 2001b, Salcher *et al.*, 2005). Así mismo, de estos estudios se desprende que ante una fuerte presión depredatoria, grupos filogenéticamente diferentes, muestran cambios morfológicos que modifican su susceptibilidad a la ingestión. Entre estos cambios se describen formación de grandes bacilos, microcolonias o filamentos en grupos como Betaproteobacteria o *Citofaga-Flavobacterium*. En el caso del presente estudio, se pudo observar bacilos y filamentos asociados a Archaea, *Betap* y *Cito-Fla* (figura 25). Sin embargo, no hubo una relación estadísticamente significativa entre la presencia de células de mayor tamaño en Archaea y *Betap* y la selección que los protistas ejercieron sobre ellos. Otros factores, no considerados en este estudio, o la complejidad de discernir entre el efecto y la respuesta deben explicar el comportamiento selectivo observado.

Conclusiones

9. Conclusiones

- Los contenidos de las vacuolas alimenticias caracterizados con el método del CARD-FISH reflejan las tasas de ingestión obtenidas a partir de la captura de microesferas, por lo menos a escalas de minutos (capítulo 1).
- Los protistas mixotróficos exhiben diferentes tasas de digestión en relación a su tamaño. Células de tamaños mayores a 10 μm requieren aproximadamente unos 10 min para digerir una bacteria, mientras que aquellas menores a este tamaño requieren la mitad del tiempo.
- El contenido de las vacuolas alimenticias está relacionado positivamente con el tamaño celular de los protistas. Así, en células más grandes que digieren de una manera más lenta, existe una mayor probabilidad de encontrar presas en las vacuolas con respecto a aquellas células más pequeñas que presentan tasas de digestión más rápidas.
- Diferencias temporales de la actividad fagotrófica, a escalas de horas, fueron observadas tanto en especies de cultivo (capítulo 1) como en sistemas naturales (capítulo 2), indicando cambios en las tasas de ingestión y de digestión de las presas.
- En el Estany Redon (capítulo 2) los flagelados mixotróficos *Cryptomonas ovata*, *Dinobryon cylindricum* y *Rhodomonas minuta* seleccionaron preferentemente sobre las presas del dominio Archaea. Esta preferencia no fue explicada ni por la abundancia ni por el tamaño celular de las presas.
- El patrón selectivo más general entre diferentes protistas mixotróficos y en diferentes sistemas es una preferencia sobre el grupo Actinobacteria. Aunque esta preferencia puede ser muy variable como reflejan los resultados del estudio detallado del Estany Redon.

- El tamaño celular de las presas es un parámetro importante en determinar las tasas de depredación selectiva que exhiben los mixótrofos sobre ellas. Aunque el efecto no se evidencia de manera directa e inmediata por la dificultad de identificar patrones efecto-respuesta. Se han observado relaciones significativas del efecto del tamaño del grupo más abundante (Betaproteobacteria) sobre las tasas de ingestión de otros grupos.
- El tamaño celular de los protistas mixotróficos condiciona la actividad fagotrófica en los lagos de montaña. Individuos con tamaños celulares grandes ($>10 \mu\text{m}$) presentan mayor contenido de presas en sus vacuolas, pero, debido a por su baja abundancia, el impacto sobre el bacterioplancton es bajo. Especies con tamaño pequeños ($<10 \mu\text{m}$) presentan un menor contenido, pero su alta abundancia y digestión más rápida hace que representen un mayor impacto sobre las comunidades bacterianas.
- Chrysophyta y Cryptophyta de tamaños menores a $10 \mu\text{m}$ ejercen la mayor presión depredatoria sobre las comunidades bacterianas dentro de la comunidad fitoplanctónica del DCM estival de los lagos de alta montaña.

Bibliografía

10. Bibliografía

- A.P.H.A., A.W.W.A., and W.P.C.F. 1992. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington.
- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. Amann, B. Sattler, F. Glöckner, A. Wille, and R. Psenner. 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (6):2138-2144.
- Andersson, A., S. Falk, G. Samuelsson, and Å. Hagström. 1989. Nutritional characteristics of a mixotrophic nanoflagellate, *Ochromonas* sp. *Microbial Ecology* **17**:251-262.
- Auguet, J.-C., N. Nomokonova, L. Camarero, and E. Casamayor. 2011. Seasonal changes of freshwater ammonia-oxidizing archaeal assemblages and nitrogen species in oligotrophic alpine lakes. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(6):1937-1945.
- Azam, F., T. Fenchel, J. Field, J. Gray, L. Meyer-Reil, and F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series* **10**:257-263.
- Bardy, S. L., Y. M. N. Sandy, and K. F. Jarrell. 2003. Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**:295-304.
- Bastidas Navarro, M., E. G. Balseiro, and B. E. Modenutti. 2011. UV radiation simultaneously affects phototrophy and phagotrophy in nanoflagellate-dominated phytoplankton from an Andean shallow lake. *Photochemical & Photobiological Sciences* **10**:1318-1325.
- Berge, T., P. Hansen, and Ø. Moestrup. 2008. Feeding mechanism, prey specificity and growth in light and dark of the plastidic dinoflagellate *Karlodinium armiger*. *Aquatic Microbial Ecology* **50**:279 - 288.

- Beveridge, T. J., P. H. Pouwels, M. Sára, A. Kotiranta, K. Lounatmaa, K. Kari, E. Kerosuo, M. Haapasalo, E. M. Egelseer, I. Schocher, U. B. Sleytr, L. Morelli, M. L. Callegari, J. F. Nomellini, W. H. Bingle, J. Smit, E. Leibovitz, M. Lemaire, I. Miras, S. Salamitou, P. Béguin, H. Ohayon, P. Gounon, M. Matuschek, K. Sahm, H. Bahl, R. Grogono-Thomas, J. Dworkin, M. J. Blaser, R. M. Woodland, D. G. Newell, M. Kessel, and S. F. Koval. 1997. V. Functions of S-layers. *FEMS Microbiology Reviews* **20**:99-149.
- Bird, D. and J. Kalff. 1987. Algal phagotrophy: regulating factors and importance relative to photosynthesis in *Dynobryon* (Chrysophyceae). *Limnology and Oceanography* **32** (2):277-284.
- Bird, D. and J. Kalff. 1989. Phagotrophic sustenance of a metalimnetic phytoplankton peak. *Limnology and Oceanography* **34** (1):155-162.
- Boëchat, I., G. Wiethoff, A. Krüger, B. Gücker, and R. Adrian. 2007. A biochemical explanation for the success of mixotrophy in the flagellate *Ochromonas* sp. *Limnology and Oceanography* **52** (4):1624-1632.
- Boenigk, J., C. Matz, K. Jürgens, and H. Arndt. 2001a. Confusing selective feeding with differential digestion in bacterivorous nanoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **48**(4):425-432.
- Boenigk, J., C. Matz, K. Jürgens, and H. Arndt. 2001b. The influence of preculture conditions and food quality on the ingestion and digestion process of three species of heterotrophic nanoflagellates. *Microbial Ecology* **42**:168 - 176.
- Børsheim, K. Y. 1984. Clearance rates of bacteria-sized particles by freshwater ciliates measured with monodisperse fluorescent latex beads *Oecologia* **63**:286-288.
- Burkholder, J., P. Glibert, and H. Skelton. 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* **8**:77-93.
- Buskey, E. J. 1997. Behavioral components of feeding selectivity of the heterotrophic dinoflagellate *Protoperdinium pellucidum*. *Marine Ecology Progress Series* **153**:77-89.
- Callieri, C., G. Morabito, Y. Huot, P. Neale, and E. Litchman. 2001. Photosynthetic response of pico- and nanoplanktonic algae to UVB, UVA and PAR in a high mountain lake. *Aquatic Sciences* **63**:286-293.

- Camarero, L. 1994. Assay of soluble reactive phosphorus at nanomolar levels in non-saline waters. *Limnology and Oceanography* **39**:707-711.
- Capriulo, G. M. 1990. Feeding-related ecology of marine protozoa. Pages 186-259 in G. M. Capriulo, editor. *Ecology of Marine Protozoa*. Oxford University Press, New York.
- Capriulo, G. M. and C. Degnan. 1991. Effect of food concentration on digestion and vacuole passage time in the heterotrichous ciliate *Fibrea salina*. *Marine Biology* **110**:199-202.
- Caron, D., R. Sanders, E. Lim, C. Marrasé, L. Amaral, S. Whitney, R. Aoki, and K. Porter. 1993. Light-dependent phagotrophy in the freshwater mixotrophic chrysophyte *Dinobryon cylindricum*. *Microbial Ecology* **25**:93-11.
- Caron, D. A., J. C. Goldman, K. O. Andersen, and M. R. Dennett. 1985. Nutrient cycling in a microflagellate food chain: II. Population dynamics and carbon cycling *Marine Ecology Progress Series* **24**:243-254.
- Catalan, J. 1988. Physical properties of the environment relevant to the pelagic ecosystem of a deep high-mountain lake (Estany Redó, Central Pyrenees). *Oecologia aquatica* **9**:89-123.
- Catalan, J. 1989. The winter cover of a high-mountain Mediterranean lake (Estany Redó, Pyrenees). *Water Resources Research* **25**:519-527.
- Catalan, J. 1992. Evolution of dissolved and particulate matter during the ice-covered period in a deep, high-mountain lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **49**:945-955.
- Catalan, J. 1999. Small-scale hydrodynamics as a framework for plankton evolution. *Japanese Journal of Limnology* **60**:469-494.
- Catalan, J., L. Camarero, M. Felip, S. Pla, M. Ventura, T. Buchaca, F. Bartumeus, G. de Mendoza, A. Miró, E. Casamayor, M.-S. JM., M. Bacardit, M. Altuna, M. Bartrons, and D. de Quijano. 2006. High mountain lakes: extreme habitats and witnesses of environmental changes. *Limnetica* **25 (1-2)**:551-584.
- Chrzanowski, T. H. and K. Šimek. 1990. Prey-size selection by freshwater flagellated protozoa. *Limnology and Oceanography* **35(7)**:1429-1436.

- Dolan, J. R. and D. W. Coats. 1991. Preliminary prey digestion in a predacious estuarine ciliate and the use of digestion data to estimate ingestion. *Limnology and Oceanography* **36**:558-565.
- Domaizon, I., S. Viboud, and D. Fontvieille. 2003. Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microbiology Ecology* **46**:317-329.
- Felip, M. 1997. Ecologia del microplàncton d' un estany profund d' alta muntanya (Redó, Pirineus). Ph.D. Thesis. University of Barcelona, Barcelona.
- Felip, M., L. Camarero, and J. Catalan. 1999. Temporal changes of microbial assemblages in the ice and snow cover of a high mountain lake. *Limnology and Oceanography* **44** (4):973-987.
- Felip, M., M. Gallardo, and J. Medina-Sanchez. 2009. Mixotrophy in a deep alpine lake: the effect of solar radiation on specific patterns of phagotrophy. *in ASLO Aquatic Sciences Meeting 2009, Nice, France.*
- Fenchel, T. 1982. Ecology of heterotrophic microflagellates. I. Some important forms and their functional morphology. *Marine Ecology Progress Series* **8**:211-223.
- Fenchel, T. 1986. The ecology of heterotrophic microflagellates. *Advanced in microbial ecology* **9**:57-97.
- Flöder, S., T. Hansen, and R. Ptacnik. 2006. Energy - Dependent bacterivory in *Ochromonas minima* - A strategy promoting the use of substitutable resources and survival at insufficient light supply. *Protist* **157**:291-302.
- Flynn, K. J., K. Davidson, and A. Cunningham. 1996. Prey selection and rejection by a microflagellate; implications for the study and operation of microbial food webs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **196**:357-372.
- Fok, A. K., Y. Lee, and R. D. Allen. 1982. The correlation of digestive vacuoles pH and size with the digestive cycle in *Paramecium caudatum* *Journal of Eukaryotic Microbiology* **29**:409-444.
- Fresenius, W., K. E. Quentin, and W. Schneider. 1988. Water analysis. Springer-Verlag, Berlin.

- Garneau, M., W. Vincent, L. Alonso-Sáez, Y. Gratton, and C. Lovejoy. 2006. Prokaryotic community structure and heterotrophic production in a river-influenced coastal arctic ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology* **42**:27-40.
- Glöckner, F., B. Fuchs, and R. Amann. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **65 (8)**:3721-3726.
- Goldman, J. C., D. A. Caron, K. O. Andersen, and M. R. Dennett. 1985. Nutrient cycling in a microflagellate food chain: I. Nitrogen dynamics. *Marine Ecology Progress Series* **24**:231-242.
- Gonzalez, J., E. Sherr, and B. Sherr. 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology* **56 (3)**:583-589.
- González, J. M., E. B. Sherr, and B. F. Sherr. 1993. Differential feeding by marine flagellates on growing versus starving, and on motile versus nonmotile, bacterial prey *Marine Ecology Progress Series* **102**:257-267.
- Grasshoff, K., M. Ehrhamdt, and K. Kremling. 1983. *Methods of sea water analysis*. 2 edition. Verlag Chemie, Weinheim.
- Grossart, H. P., L. Riemann, and F. Azam. 2001. Bacterial motility in the sea and its ecological implications. *Aquatic Microbial Ecology* **25**:247-258.
- Gruber, D. F., S. Tuorto, and G. L. Taghon. 2009. Growth phase and elemental stoichiometry of bacterial prey influences ciliates grazing selectivity. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56(5)**:466-471.
- Hahn, M. W. and M. G. Höfle. 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **35**:113-121.
- Hammer, A., C. Grüttner, and R. Schumann. 1999. The effect of electrostatic charge of food particles on capture efficiency by *Oxyrrhis marina* Dujardin (dinoflagellate). *Protist* **150**:375-382.
- Hansen, P. and A. J. Calado. 1999. Phagotrophic mechanisms and prey selection in free-living dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**:382-383.
- Hartmann, M., C. Grob, G. A. Tarran, A. P. Martin, P. H. Burkill, D. J. Scanlan, and M. V. Zubkov. 2012. Mixotrophic basis of atlantic oligotrophic ecosystems.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109(15)**:5756-5760.
- Havskum, H. and B. Riemann. 1996. Ecological importance of bacterivorous, pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Marine Ecology Progress Series* **137**:251-263.
- Hitchman, R. and H. Jones. 2000. The role of mixotrophic protists in the population dynamics of the microbial food web in a small artificial pond. *Freshwater Biology* **43**:231-241.
- Holen, D. A. and M. E. Boraas. 1991. The feeding behavior of *Spumella* sp. as a function of particle size: Implications for bacterial size in pelagic systems. *Hydrobiologia* **220**:73-88.
- Iriberry, J., I. Azúa, A. Labirua-Iturburu, and I. Barcina. 1994. Differential elimination of enteric bacteria by protist in a freshwater system. *The Journal of Applied Bacteriology* **77**:476-483.
- Ishii, K., M. Mubmann, B. MacGregor, and R. Amann. 2004. An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **50 (3)**:203-213.
- Jarrell, K. F., D. P. Bayley, and A. S. Kostyukova. 1996. The archaeal flagellum: a unique motility structure. *Journal of Bacteriology* **178(17)**:5057-5064.
- Jeffrey, S. W. and G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **167**:191-194.
- Jezbera, J., K. Horňák, and K. Šimek. 2005. Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology* **52**:351-363.
- Jezbera, J., K. Horňák, and K. Šimek. 2006. Prey selectivity of bacterivorous protists in different size fractions of reservoir water amended with nutrients. *Environmental Microbiology* **8(8)**:1330-1339.
- John, E. H. and K. Davidson. 2001. Prey selectivity and the influence of prey carbon:nitrogen ratio on microflagellate grazing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **260**:93-111.

- Jones, R. and S. Rees. 1994. Characteristics of particle uptake by the phagotrophic phytoflagellate *Dinobryon divergens*. *Marine Microbial Food Webs* **8 (1-2)**:97-110.
- Jones, R. I. 1994. Mixotrophy in planktonic protists as a spectrum of nutritional strategies. *Marine Microbial Food Webs* **8 (1-2)**:87-96.
- Jones, R. I. 2000. Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biology* **45**:219-226.
- Jürgens, K. 2007. Predation on bacteria and bacterial resistance mechanisms: comparative aspects among different predator groups in aquatic systems. *Microbiology Monographs* **4**:57-92.
- Jürgens, K. and W. R. De Mott. 1995. Behavioral flexibility in prey selection by bacterivorous nanoflagellates. *Limnology and Oceanography* **40(8)**:1503-1507.
- Jürgens, K., J. Pernthaler, S. Schalla, and R. Amann. 1999. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology* **65(3)**:1241-1250.
- Kim, S., Y. Kang, H. Kim, W. Yih, D. Coats, and P. M. 2008. Growth and grazing responses of the mixotrophic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* as functions of light intensity and prey concentration *Aquatic Microbial Ecology* **51**:301-310.
- Kimura, B. and Y. Ishida. 1985. Photophagotrophy in *Uroglena americana*, Chrysophyceae. *Japanese Journal of Limnology* **46**:315-318.
- Kjelleberg, S. and M. Hermansson. 1984. Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* **48(3)**:497-503.
- Laybourn-Parry, J. and W. Marshall. 2003. Photosynthesis, mixotrophy and microbial plankton dynamics in two high Arctic lakes during summer. *Polar Biology* **26**:517-524.
- Li, A., D. K. Stoecker, and D. W. Coats. 2001. Use of the "food vacuole content" method to estimate grazing by the mixotrophic dinoflagellate *Gyrodinium galatheanum* on cryptophytes. *Journal of Plankton Research* **23(3)**:303-318.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 2008. Brock. *Biología de los microorganismos*. 8ª edition. Prentice Hall, INC., Madrid.

- Marshall, W. and J. Laybourn-Parry. 2002. The balance between photosynthesis and grazing in Antarctic mixotrophic cryptophytes during summer. *Freshwater Biology* **47**:2060-2070.
- Martel, C. 2009. Conceptual bases for prey biorecognition and feeding selectivity in the microplanktonic marine phagotroph *Oxyrrhis marina*. *Microbial Ecology* **57**:589 - 597.
- Matz, C. and K. Jürgens. 2005. High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **71(2)**:921-929.
- Medina-Sánchez, J., M. Felip, and E. O. Casamayor. 2005. Catalyzed Reported Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization Protocol To Evaluate Phagotrophy in Mixotrophic Protists. *Applied and Environmental Microbiology* **71 (11)**:7321-7326.
- Medina-Sánchez, J., M. Villar-Argaiz, and P. Carrillo. 2004. Neither with nor without you: A complex algal control on bacterioplankton in a high mountain lake. *Limnology and Oceanography* **49 (5)**:1722-1733.
- Monger, B. C. and M. R. Landry. 1990. Direct-interception feeding by marine zooflagellates: the importance of surface and hydrodynamic forces. *Marine Ecology Progress Series* **65**:123-140.
- Monger, B. C., M. R. Landry, and S. L. Brown. 1999. Feeding selection of heterotrophic marine nanoflagellates based on the surface hydrophobicity of their picoplankton prey. *Limnology and Oceanography* **44**:1917-1927.
- Montagnes, D., A. Barbosa, J. Boenigk, K. Davidson, K. Jürgens, M. Macek, J. Parry, E. Roberts, and K. Simek. 2008. Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study. *Aquatic Microbial Ecology* **53**:83 - 98.
- Nilsson, R. J. 1977. On food vacuoles in *Tetrahymena pyriformis* GL *Journal of Eukaryotic Microbiology* **24**:502-507.
- Oda, Y., S. J. Slagman, W. G. Meijer, L. J. Forney, and J. C. Gottschal. 2000. Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridization of *Rhodospseudomonas palustris*. *FEMS Microbiology Ecology* **32**:205-213.
- Pace, M. L. and M. D. Bailiff. 1987. Evaluation of a fluorescent microsphere technique for measuring grazing rates of phagotrophic microorganisms. *Marine Ecology Progress Series* **40**:185-193.

- Pålsson, C. and W. Granéli. 2003. Diurnal and seasonal variations in grazing by bacterivorous mixotrophs in an oligotrophic clear-water lake. *Archives of Hydrobiology* **157**:289-307.
- Pålsson, C., E. S. Kritzberg, K. Christoffersen, and W. Granéli. 2005. Net heterotrophy in Faroe Islands clear-water lakes: causes and consequences for bacterioplankton and phytoplankton. *Freshwater Biology* **50**:2011-2020.
- Pérez, M. and R. Sommaruga. 2007. Interactive effects of solar radiation and dissolved organic matter on bacterial activity and community structure. *Environmental Microbiology* **9 (9)**:2200-2210.
- Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann. 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68 (6)**:3094-3101.
- Pernthaler, J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology* **3**:537-546.
- Pernthaler, J., F. Glöckner, S. Unterholzner, A. Alfreider, R. Psenner, and R. Amann. 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Applied and Environmental Microbiology* **64 (11)**:4299-4306.
- Pernthaler, J., F. O. Glöckner, W. Schönhuber, and R. Amann. 2001a. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology* **30**:207-226.
- Pernthaler, J., T. Posch, J. Šimek, J. Vrba, A. Pernthaler, F. O. Glöckner, U. Nubel, R. Psenner, and R. Amann. 2001b. Predator-specific enrichment of *Actinobacteria* from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture *Applied and Environmental Microbiology* **67**:2145-2155.
- Porter, K. G. 1988. Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia* **159**:89-97.
- Posch, T., J. Jezbera, J. Vrba, K. Šimek, J. Pernthaler, S. Andreatta, and B. Sonntag. 2001. Size selective feeding in *Cyclidium glaucoma* (Ciliophora, Scuticociliatida) and its effects on bacterial community structure: a study from a continuous cultivation system. *Microbial Ecology* **42**:217-227.

- Raven, J. 1997. Phagotrophy in phototrophs. *Limnology and Oceanography* **42**:198-205.
- Roberts, E. C., C. Legrand, M. Steinke, and E. C. Wootton. 2011a. Mechanisms underlying chemical interactions between predatory planktonic protists and their prey. *Journal of Plankton Research* **33**:833-841.
- Roberts, E. C., E. C. Wootton, K. Davidson, H. J. Jeong, C. D. Lowe, and D. J. Montagnes. 2011b. Feeding in the dinoflagellate *Oxyrrhis marina*: linking behaviour with mechanisms. *Journal of Plankton Research* **33(4)**:603-614.
- Rothhaupt, K. 1997. Nutrient turnover by freshwater bacterivorous flagellates: differences between a heterotrophic and a mixotrophic chrysophyte. *Aquatic Microbial Ecology* **12**:65-70.
- Salcher, M. M., J. Pernthaler, and T. Posch. 2010. Spatiotemporal distribution and activity patterns of bacteria from three phylogenetic groups in an oligomesotrophic lake. *Limnology and Oceanography* **55(2)**:846-856.
- Salcher, M. M., J. Pernthaler, R. Psenner, and T. Posch. 2005. Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquatic Microbial Ecology* **38**:215-229.
- Sanders, R. W., K. G. Porter, and D. A. Caron. 1990. Relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. *Microbial Ecology* **19**:97-109.
- Schumann, R., A. Hammer, S. Görs, and H. Schubert. 2005. Winter and spring phytoplankton composition and production in a shallow autrophic Baltic lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **62 (1-2)**:169-181.
- Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch, and R. Amann. 2003. An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **69 (5)**:2928-2935.
- Shannon, S., T. Chrzanowski, and J. Grover. 2007. Prey food quality affects flagellate ingestion rates. *Microbial Ecology* **53**:66 - 73.
- Sherr, B. F., E. B. Sherr, and R. D. Fallon. 1987. Use of monodispersed fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Applied and Environmental Microbiology* **53(5)**:958-965.

- Sherr, B. F., E. B. Sherr, and F. Rassoulzadegan. 1988. Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: Temperature dependence Applied and Environmental Microbiology **54(5)**:1091-1095.
- Sherr, E. B. and B. F. Sherr. 2002. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. Antonie van Leeuwenhoek **81**:293-308.
- Šimek, K., J. Armengol, M. Comerma, J. C. Garcia, P. Kojacká, J. Nedoma, and J. Hejzlar. 2001a. Changes in the epilimnetic bacterial community composition, production, and protist-induced mortality along the longitudinal axis of a highly eutrophic reservoir. Microbial Ecology **42**:359-371.
- Šimek, K. and T. Chrzanowski. 1992. Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. Applied and Environmental Microbiology **58 (11)**:3715-3720.
- Šimek, K., K. Horňák, M. Mašin, U. Christaki, J. Nedoma, M. G. Weinbauer, and J. R. Dolan. 2003. Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. Aquatic Microbial Ecology **31**:123-135.
- Šimek, K., J. Pernthaler, M. G. Weinbauer, M. Horňák, J. M. Dolan, J. Nedoma, M. Mašin, and R. Amann. 2001b. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. Applied and Environmental Microbiology **67(6)**:2723-2733.
- Slanina, J., W. A. Lingerak, and L. Bergman. 1976. A fast determination of nitrate in rain and surface waters by means of UV spectrophotometry Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie **280**:365-368.
- Sournia, A. 1978. Phytoplankton manual. Unesco.
- Stoecker, D. K., A. Li, D. W. Coats, D. E. Gustafson, and M. K. Nannen. 1997. Mixotrophy in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. Marine Ecology Progress Series **152**:1-12.
- Thingstad, T., H. Havskum, K. Garde, and B. Riemann. 1996. On the strategy of "eating your competitor"; A mathematical analysis of algal mixotrophy. Ecology **77**:2108-2118.

- Tranvik, L. J., K. G. Porter, and J. M. Sieburth. 1989. Occurrence of bacterivory in *Cryptomonas*, a common freshwater phytoplankter. *Oecologia* **78**:473-476.
- Urabe, J., T. Gurung , T. Yoshida, T. Sekino, M. Nakanishi, M. Maruo, and E. Nakayama. 2000. Diel changes in phagotrophy by *Cryptomonas* in lake Biwa. *Limnology and Oceanography* **45**:1558-1563.
- Urabe, J., T. B. Gurung , and T. Yoshida. 1999. Effects of phosphorus supply on phagotrophy by the mixotrophic alga *Uroglena americana* (Chrysophyceae). *Aquatic Microbial Ecology* **18**:77-83.
- Warnecke, F., R. Sommaruga, R. Sekar, J. Hofer, and J. Pernthaler. 2005. Abundances, identity, and growth sate of Actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Applied and Environmental Microbiology* **71 (9)**:5551-5559.
- Wilhartitz, I., R. Mach, E. Teira, T. Reinthaler, G. Herndl, and A. Farnleitner. 2007. Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultr-oligotrophic ground- and drinking water. *Journal of Applied Microbiology* **103 (4)**:871-881.
- Wu, Q., G. Zwart, M. Schauer, M. Kamst-van Agterveld, and M. Hahn. 2006. Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high mountain lakes located on the tibetan plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology* **72 (8)**:5478-5485.
- Zubkov, M. V. and G. A. Tarran. 2008. High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature* **455**:224-226.
- Zuur, A. F., E. N. Ieno, N. Walker, A. A. Saveliev, and G. M. Smith. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer, New York.