



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Análisis de la
Respuesta de las
Formas de Resistencia
de Microorganismos
Acuáticos ante un
Gradiente de
Temperaturas Extremas**

Alumno: Rosa Dolores Prieto Utrera

Junio. 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Análisis de la
Respuesta de las
Formas de Resistencia
de Microorganismos
Acuáticos ante un
Gradiente de
Temperaturas Extremas**

Alumno: Rosa Dolores Prieto Utrera

Junio, 2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Efectos del Cambio global sobre los humedales	3
1.2. La importancia de las lagunas	5
1.3. La red trófica microbiana	6
1.4. La comunidad críptica	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo general	10
2.2. Objetivos específicos	10
3.MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
3.1. Área de estudio	10
3.2. Toma de muestras.....	12
3.3. Procesamiento en el laboratorio.....	13
3.4. Análisis biológico.....	13
3.5. Técnica de la citometría de flujo	14
<i>3.5.1. Análisis de los datos obtenidos con el citómetro de flujo</i>	18
4.RESULTADOS	19
4.1. Comunidad críptica heterotrófica	19
4.2. Fitoplancton (citometría de flujo).....	25
5.DISCUSIÓN.....	30
5.1. Citometría de flujo (fitoplancton)	31
5.2. Comunidad críptica heterotrófica	32
6.CONCLUSIÓN	34
7.BIBLIOGRAFÍA.....	35

RESUMEN

Los ecosistemas acuáticos están siendo fuertemente amenazados por las alteraciones derivadas de la crisis ambiental planetaria que tiene su principal motor en el cambio climático. Una de sus consecuencias más relevantes es la implicación que tiene sobre las comunidades microbianas, y en particular sobre los organismos autotróficos, de importante papel ecológico ya que son los productores primarios y por lo tanto la base de la red trófica de los sistemas acuáticos. Este estudio está orientado al análisis de la eclosión de la comunidad microbiana en los sedimentos presentes en la laguna del Hituelo, una laguna temporal ubicada en el municipio de Martos, en la provincia de Jaén, bajo diferentes condiciones de temperatura. Utilizamos para ello como herramienta la citometría de flujo debido a su idoneidad para el estudio de la comunidad autotrófica, su dinámica de eclosión y las diferentes poblaciones existentes en aguas continentales.

Palabras clave: Cambio climático, microorganismos, identificación, adaptación, citometría.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are being strongly threatened by alterations derived from the planetary environmental crisis that has its main engine in the climate change. One of its most important consequences is the involvement it has on microbial communities, and particularly on the autotrophic organisms, of an important ecological role, since they are primary producers and therefore the basis of the trophic network of aquatic systems. This study is oriented to the analysis of the hatching of the microbial community in sediments present in the wetland lake of Hituelo, a temporary pond located in the municipality of Martos, in the province of Jaen, under different temperature conditions. We used flow cytometry as a tool due to its suitability for studying the autotrophic community, its hatching dynamics and the different populations existing in inland waters.

Keywords: Climate Change, microorganisms, identification, adaption, cytometry.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Efectos del Cambio Global sobre los humedales

Dadas su variedad y heterogeneidad intrínsecas, los efectos del cambio climático van a depender de las especificidades de cada sistema y por lo tanto es difícil hacer una evaluación general. En el balance hídrico serán muy importantes también los cambios antrópicos en los usos del agua en el entorno de los humedales (Álvarez et al., 2006). El desarrollo humano está destruyendo buena parte de los hábitats, utilizando gran cantidad de energía y disponiendo de una poderosa tecnología en rápida expansión que condiciona el destino de la tierra. El ritmo al que ocurren los cambios es cada vez más rápido y supone un cambio global (Costas & López, 2011). Uno de los motores del cambio global es precisamente la emisión de gases de efecto invernadero que está provocando un aumento de las temperaturas globales del planeta (Trenberth et al., 2009). Por lo tanto, una alteración en este proceso desequilibra totalmente el balance energético y produce graves alteraciones climáticas (Karl & Trenberth, 2003).

En los humedales, los aumentos de temperatura incrementarán la evaporación de la lámina de agua, la transpiración de las plantas emergentes (Sánchez Carrillo et al., 2001) así como las tasas de los procesos microbianos (Schindler, 1997). Ese aumento de la transpiración probablemente genere ambientes más salinos, favoreciendo sinérgicamente la dominancia de especies más tolerantes a la salinidad (Lissner et al., 1999). Una de las principales consecuencias que tiene el cambio climático sobre los humedales es el aumento relativo de las concentraciones de nutrientes en los períodos más secos, lo que implica la proliferación de los productores primarios y con ello un aumento de los procesos de eutrofización (Wetzel, 2001; Smith, 2003; Camargo et al., 2007).

Los escenarios de los modelos que predicen el incremento de la temperatura a escala regional andaluza, para zonas con un clima Mediterráneo sub-continental de veranos cálidos, nos sitúan en predicciones que van desde los 3,6 a los 6,5°C de media para finales de siglo (5º Informe IPCC; AR5 2014). Esta situación modificaría totalmente las características físico-químicas del medio acuático, la dinámica de organismos y sus conexiones tróficas, incluso en algunos casos, incrementando el impacto de las radiaciones de onda corta por la pérdida de absorbancia por agua. Del mismo modo se verían afectados procesos celulares como la orientación, la motilidad, la asimilación de nutrientes o replicación del ADN. Por todo ello, los organismos planctónicos utilizaran diversas estrategias de defensa como son la migración, la foto-protección química a través del empleo de antioxidantes y sustancias protectoras, técnicas para recuperar el daño celular producido por la radiación solar (García, 2012) o la generación de formas de resistencia en espera de que las condiciones ambientales sean más adecuadas para la recuperación de la actividad (Brendonck & De Meester, 2003).

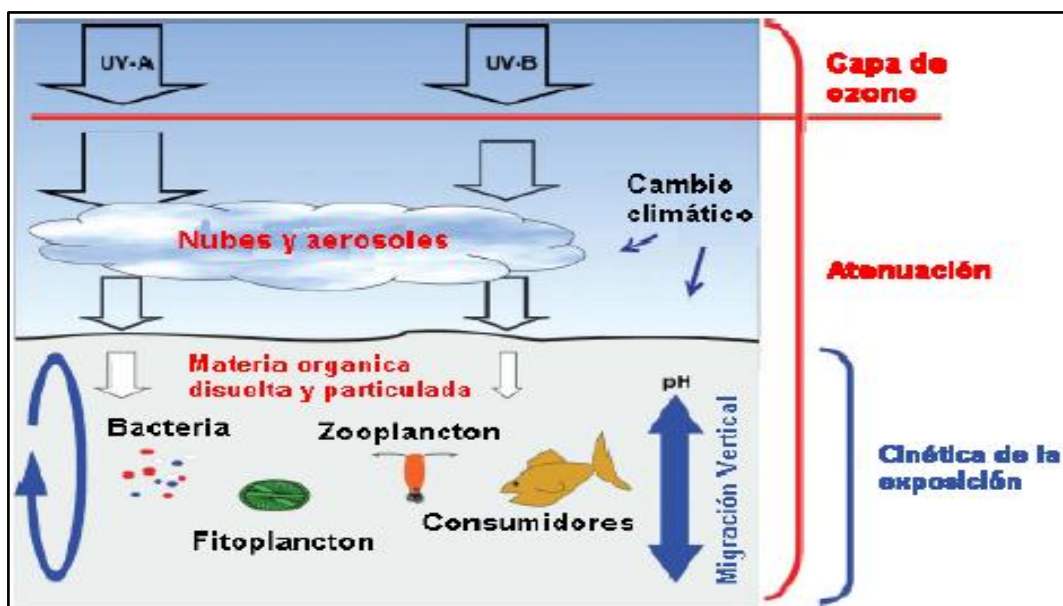


Figura 1. Diagrama de interacción entre la RUV y el cambio climático en ecosistemas acuáticos (García, 2012).

1.2. La importancia de las lagunas

Los humedales forman parte de los espacios naturales con mayor valor ambiental, tanto por el mantenimiento de una elevada diversidad biológica como por la importancia que han tenido para el desarrollo de la humanidad, desde una perspectiva cultural, histórica y económica y como fuente de riqueza sostenible y científica (Bernáldez, 1987; Williams, 1999; Ortega et al., 2006). A estos beneficios que aportan los humedales se le conoce como servicios ecosistémicos. En concreto en España, los humedales aportan un gran número de servicios ecosistémicos que suministran a la sociedad, beneficios como el abastecimiento de agua, el control y moderación del cambio climático, potabilización y depuración del agua, reserva de material genético, provisión de alimentos o el disfrute estético y paisajístico entre otros muchos.

Con el paso del tiempo se le ha dado mayor interés a los servicios ambientales de los ecosistemas, evidenciando que estos son de vital importancia para el desarrollo y para el sostenimiento de todo el planeta, destacando la importancia de los humedales, formados principalmente por el recurso hídrico e imprescindibles para el progreso y sustento de todos los seres vivos y considerados como los espacios más amenazados en el planeta (Bonilla et al., 2012). De este modo, aumentan las pérdidas en cuanto a la biodiversidad y cambian las estructuras de las comunidades ya que son propensos a recibir aguas sin tratamiento previo, contaminadas, que deterioran la calidad del agua (Luna Pabello & Castañeda, 2014).

Las lagunas y los humedales se encuentran entre los sistemas más productivos de la Tierra y sus poblaciones han desarrollado adaptaciones ante los diferentes cambios. No obstante se consideran espacios muy frágiles a las alteraciones ambientales y por ello se consideran ecosistemas con un elevado riesgo de desaparición (Bécares, 2004). Se estima que cerca del 50% de ellos han desaparecido y existen regiones en las que se ha perdido el 99% de los mismos, debido al escaso valor que se les ha dado frente a otros usos económicos de los terrenos en los que se desarrollaban (Heynes et al., 2017).

En el ámbito general, los servicios que prestan los humedales se clasifican en tres grandes grupos:

- 1) Servicios de regulación en los ciclos biogeoquímicos y el control de carbono, así como la disminución del efecto en las inundaciones y sequías ya que actúan amortiguando las perturbaciones y proporcionando humedad al suelo.
- 2) Servicios de abastecimiento, entre los que destacan el suministro de agua potable, el suministro de alimento o productos bioactivos como fuente de energía y el aporte genético y ecológico ya que son un reservorio de biodiversidad.
- 3) Servicios culturales, ya que actualmente se ha producido un aumento en el turismo en la naturaleza, utilizando los humedales como recurso para la educación ambiental. Los paisajes del agua son cada vez más solicitados por la población y en ellos se desarrollan multitud de actividades de carácter recreativo. De ahí el aumento del conocimiento científico de estos ecosistemas, lo que contribuye a un aumento de la inversión pública para el desarrollo de proyectos de investigación y programas de educación ambiental, lo que hace que se decante por una tendencia de conservación y mantenimiento de estos espacios ecológicos (Borja Barrega et al., 2012).

1.3. La red trófica microbiana

El fitoplancton es el componente autótrofo de la comunidad planctónica. Incluye organismos fotosintéticos procariotas (cianobacterias) y eucariotas (microalgas) que se encuentran cerca de la superficie de la columna de agua donde captan la luz necesaria para realizar la fotosíntesis. Estos organismos son importantes para el sustento de la vida en la Tierra, ya que por un lado, el fitoplancton es el responsable de la gran parte del oxígeno presente en la atmósfera terrestre liberado mediante la fotosíntesis, y por otro lado, lleva a cabo la fijación de materia orgánica conocido como producción primaria que es la base de la cadena trófica en los sistemas acuáticos (Rouco, 2011). De hecho algunos autores señalan que el 45 % de la fotosíntesis tiene lugar en ecosistemas acuáticos (Falkowski 1994; Field et al., 1998).

A su vez, estos organismos son claves en el mantenimiento del equilibrio planetario y su clima a través del intercambio entre atmósfera y océano de gases relevantes en el mantenimiento climático (Rost et al., 2008).

Las aguas continentales ocupan aproximadamente el 1% de la superficie del planeta (charcas, ríos, lagos, embalses) y contienen una comunidad de organismos fitoplanctónicos muy diversa (cianobacterias, clorofíceas, diatomeas, dinofíceas, etc.) extraordinariamente productivas. Así contribuyen a la producción primaria del planeta mucho más de lo que les corresponde por superficie (Costas, E. & López Rodas, V., 2011).

Otras variables a tener en cuenta son la irradiancia y la temperatura. Su importancia radica en el control de las tasas de fotosíntesis y por ello, la producción primaria se ve ampliamente afectada por fenómenos de cambio ambiental tanto de origen natural como aquellos derivados de la actividad antropogénica (Rouco, 2011).

Además de suministrar alimento a los animales, el fitoplancton juega un papel central en el ciclo de nutrientes en los hábitats acuáticos (Rodríguez et al., 2012). Es utilizado también como organismos bioindicadores, ya que nos proporcionan información sobre los cambios físicos y químicos del agua (Vásquez et al., 2006). La capacidad para mantenerse en suspensión para persistir dentro de la zona fótica es una de sus cualidades más relevantes; por ello incrementan adaptaciones imprescindibles ya que la mayoría de ellos presentan una densidad de 1.01 a 1.03 veces más elevada a la del agua, diferencia pequeña, pero que determina su hundimiento (Cortolima, 2007).

En contraposición, encontramos el otro lado de la red trófica microbiana compuesta por organismos heterotróficos bacterianos, flagelados y ciliados. En cuanto a las bacterias heterótrofas, se tiene indicio de que compiten por los nutrientes inorgánicos con el fitoplancton por lo tanto también intervienen activamente en la productividad y reciclado de nutrientes, llegando incluso a superar a la biomasa fitoplanctónica en medios oligotróficos. Tanto la presencia del fitoplancton y del bacterioplancton y sus relaciones a nivel productivo y degradativo, constituyen el pilar del desarrollo de la biota de un sistema acuático (Abarzúa et al., 1995). Entre los consumidores bacterianos acuáticos más relevantes se encuentran los flagelados, ciliados y amebas, particularmente los ciliados fagótrofos, los cuales establecen simbiosis con una gran parte de organismos y entre ellos mismos caracterizándose por su elevada capacidad indicadora de las condiciones ambientales existentes en el sistema (Mayén-Estrada et al., 2016).

Para analizar el estado trófico de un sistema acuático, uno de los rasgos más significativos es la composición del zooplancton y las relaciones entre este y el fitoplancton. Entre los más destacados, los rotíferos ya participan activamente en la cadena trófica, siendo el eslabón entre el fitoplancton y los consumidores secundarios, ya que son capaces de transformar la energía desde las bacterias las cuales no pueden ser utilizadas por otros organismos (Conde Porcuna et al., 2004).

Hay tres principales compuestos en el zooplancton que actúan como protector solar (Hairston, 1976). Uno de ellos son los carotenoides, con acción antioxidante y encargados de eliminar los radicales libres producidos por la radiación solar. Otro de ellos es la melanina y actúa como escudo solar (Hebert & Emery, 1990) y por último, los aminoácidos tipo micosporina o MAAs, que disipan la energía de la luz ultravioleta en forma de calor (Shick & Dunlap, 2002).

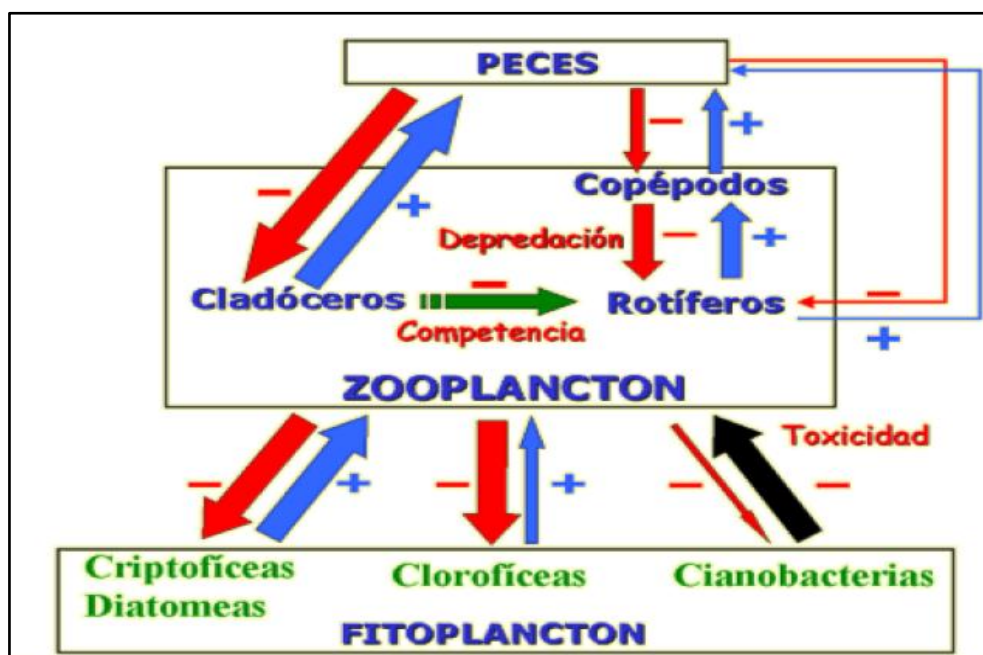


Figura 2. Esquema general de las interacciones biológicas entre organismos. Las flechas con mayor grosor indican un mayor efecto relativo (Conde-Porcuna et al., 2004).

1.4. La comunidad críptica

El zooplancton está formado por diversas comunidades de organismos con elevadas tasas de crecimiento, con lo cual son capaces de responder de manera eficaz a

ambientes cambiantes. Esa característica se ve apoyada por su capacidad para producir huevos de resistencia que son capaces de permanecer en estado latente durante décadas, formas de resistencias semejantes a un banco de semillas de plantas terrestres (Marcus et al., 1994).

Los microorganismos que habitan en ambientes acuáticos, están continuamente sometidos a fluctuaciones que afectan tanto a su supervivencia como a su reproducción en diferente escala temporal y espacial. Por consiguiente una de las principales adaptaciones que realizan estos organismos consiste en someterse a periodos de inactividad, para disminuir así el impacto de los cambios externos. Se forman reservorios bióticos o bancos de huevos en estado de latencia, que pueden persistir en varias estaciones o generaciones o tener duraciones más cortas (Brendonck & De Meester, 2003). La alta concentración de metabolitos específicos, la temperatura elevada, la baja concentración de alimentos o el fotoperiodo, son algunas los parámetros que originan la aparición de etapas latentes o periodos de inactividad (Mortimer, 1935), así mismo la profundidad es un parámetro importante en cuanto al banco de huevos. Cuando vuelven a cambiar las condiciones ambientales, más favorables, el desarrollo vuelve a reanudarse (Danks, 1987; Brendonck, 1996; Marcus, 1996). La zona donde se depositan estas formas de resistencia se denominada banco de huevos activo (Cáceres & Hairston, 1998) formada por los individuos que eclosionan y están presentes en los primeros centímetros de sedimento.

De hecho autores como Alekseev et al. (2007) sugieren que “los bancos de huevos son el producto del equilibrio de dos procesos generales: la obtención de individuos inactivos que permanecen en el tiempo y la exclusión de individuos en estado latente”. Existen así diferentes procesos que originan la inactividad de los organismos, entre ellos destacan la diapausa, caracterizada por la regulación neurohormonal interna de la latencia (Marcus, 1996) que ocurre en rotíferos monogonantes (Gilbert, 1974) y copépodos calanoides tanto de agua dulce como de agua salada (Grice & Marcus, 1981; Marcus, 1996). En Otras especies existen individuos que retardan el desarrollo como adultos o utilizan la “estrategia de reposo reproductivo” (Lonsdale et al., 1993).

Los bancos de huevos también se ven alterados por la depredación o infección y por el entierro de estos en zonas muy profundas donde las condiciones no permiten la eclosión (Parker et al., 1996; Grice & Marcus, 1981). Por ello, los estudios de bancos de huevos han llevado a nuevos enfoques para investigar el medio ambiente, como el nuevo campo de la "ecología de la resurrección" (Jeppesen et al., 2001; Kerfoot & Weider, 2004,). Por lo tanto evolutivamente la latencia y la diapausia son las principales respuestas a alteraciones en el fotoperiodo, de ahí su relevancia en el estudio para posteriores escenarios de cambio climático. Estas adaptaciones podrían haber servido de base genética para el progreso y la distinción en diferentes grupos filogenéticos (Battauz, 2016). Así, la formación de un reservorio de huevos en estado latente en un hábitat debería ser un acontecimiento importante para los organismos que se enfrentan a una ambiente incierto, variable o nuevo (Coulas et al. 1998). Por lo tanto el reservorio debería ser objeto de protección no solo para la investigación si no para la preservación del sistema acuático.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo consiste en analizar la dependencia de la eclosión del banco de semillas de una laguna mediterránea con la temperatura del medio.

2.2. Objetivos específicos

- Analizar la eclosión de la comunidad heterotrófica
- Analizar la eclosión del fitoplancton

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

La laguna del Hituelo está localizada al oeste de Martos, en la provincia de Jaén. Se trata de un pequeño humedal continental, somero y de poca mineralización enmarcado en un entorno de suaves lomas de calizas y margas (Ortega et al., 2007). Pertenece a la cuenta hidrográfica del Guadalquivir y presenta una altitud de 476 metros. Sus aportes son de origen superficial con posibles aportes subterráneos. La zona se caracteriza por la localización en el piso bioclimático

mesomediterráneo y bajo un ombroclima seco, dominado por una sequía estival que puede prolongarse incluso hasta los doce meses del año. El humedal se constituye en una marcada depresión de forma circular originada posiblemente por disolución y hundimiento progresivo de los materiales yesíferos sobre los que se asienta la cubeta (Ortega et al., 2007).

En cuanto a la vegetación, la laguna del Hituelo presenta una fisonomía variada dependiendo de la profundidad del agua que acumule en cada ciclo anual. Predominan los helófitos, enneas y tarajal, mientras en el entorno prevalece el cultivo del olivar.

Con respecto a la fauna, es una de las lagunas más importantes para las aves acuáticas de la provincia. Sus características de hábitat la hacen especialmente importante como zona de reproducción, descanso y alimentación.

La cuenca de la laguna del Hituelo está destinada prácticamente en su totalidad al olivar de secano, que llega hasta el mismo borde del humedal, ocupando incluso las zonas de inundación más someras, que son anualmente roturadas.

Representa un Humedal de gran valor e interés cultural ya que constituye una zona de descanso de la Vía Pecuaria denominada “Vereda de Fuensalobre”.

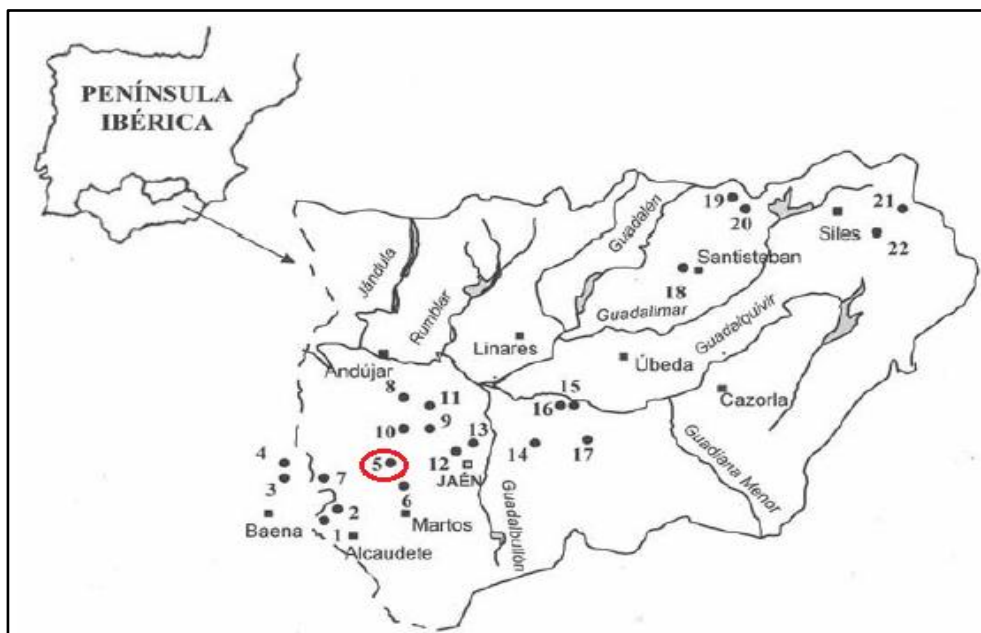


Figura 3. Comarca del Alto Guadalquivir y localización de los diferentes humedales. 5: Laguna de Hituelo (Ortega et al., 2006).

3.2. Toma de muestras

El muestreo se realizó el día 19 de Diciembre de 2018.

Se estableció una zona de muestreo situada en el centro de la laguna, y en esta zona se seleccionaron varios puntos de muestreo realizando un transecto. De cada punto se tomó una muestra de sedimento húmedo de la laguna que se encontraba sin lámina de agua en el momento de muestreo. Para ello se utilizó una pequeña pala y bolsas de plástico donde se iban almacenando las muestras recolectadas. A continuación fueron llevadas al laboratorio y se colocaron de forma extendida en bandejas de plástico para favorecer el secado. Así se colocaron en la cámara a 20°C durante 1 mes para su adaptación a un ciclo natural de secado.



Figura 4. Laguna del Hituelo en el momento de la recolección de muestras.

3.3. Procesamiento en el laboratorio (hidratación)

Pasado este mes de secado, la muestra se encontraba totalmente seca. Se comenzó entonces con la hidratación del sedimento. Se trabajó con dos cámaras de cultivo, una a 20°C y otra a 25°C. De cada temperatura se usaron 3 repeticiones. En vasos de precipitado se añadió 200 gramos de sedimento y medio litro de agua mineral "Font Natura". Los vasos se cubrieron con una malla de nylon (tamaño del poro 50 µm) para así evitar una posible contaminación externa. Las muestras a 25°C se colocaron en hidratación una semana después que las de 20°. Una vez pasada la semana de hidratación, se procedió al análisis biológico.



Figura 5. Vasos de precipitado con el sedimento y malla en cada cámara de cultivo.

3.4. Análisis biológico

Pasada una semana de la hidratación, se comenzó con el análisis de las comunidades de microorganismos y para ello se utilizaron dos técnicas, por un lado la observación de muestras de la comunidad microbiana heterotrófica mediante la microscopía óptica y por otro lado el uso de la citometría de flujo para la fracción autotrófica de esta comunidad. El periodo de análisis biológico duró un mes, durante el cual, cada 7 días se observaron las muestras en el microscopio y cada 3 o 4 días se procedía a realizar la citometría de flujo.

Para el recuento con el microscopio se utilizó la Cámara de Sedgewick-Rafter, ya que sirve para el conteo de plancton u otras partículas disueltas en el agua. La

cámara de vidrio mide 76x40 mm y tienen 2 mm de grosor, con una cámara rectangular de 50x20 mm y 1 mm de profundidad y con una cuadrícula de 1000 milímetros cuadrados. La capacidad de la cámara es de 1ml de líquido por lo tanto, 1 μ l en cada cuadrícula. Con una pipeta paster se colocó un mililitro de agua de la muestra en la Cámara de Sedgewick y se añadieron dos gotas de formol al 4% para facilitar así el recuento. Previamente con la pipeta se removió suavemente el sedimento. Se colocó en el microscopio y procedimos al recuento de microorganismos. Usamos los objetivos 20x y 40x. También se utilizó la cámara auxiliar Leica DC 150 acoplada al microscopio con la que se tomaron fotografías de los microorganismos presentes en la muestra.

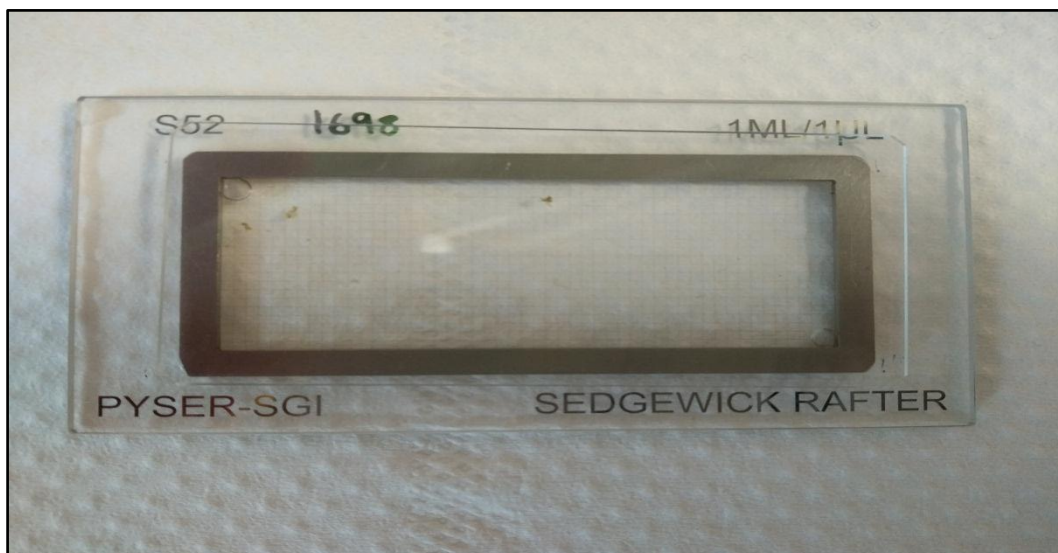


Figura 6. Cámara de Sedgewick Rafter.

Para la identificación en grandes grupos de los microorganismos se utilizó la guía de ciliados (Foissner & Berger, 1996), un atlas de claves taxonómicas (Streble & Dieter, 1978) y el Atlas de microorganismos de la Junta de Andalucía (Consejería de medio ambiente, 2010). Por último, las tablas y gráficas con los datos obtenidos del recuento se realizaron con Excel.

3.5. Técnica de la citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico rápido, objetivo y cuantitativo que permite la medida de las propiedades ópticas, y con ello de ciertas características

físicas y químicas de células o partículas suspendidas en un fluido. La capacidad para medir parámetros celulares como el tamaño, la forma, la rugosidad, la fluorescencia de pigmentos o fluorocromos, son algunas de las características analíticas más importantes. El principio en el que se basa esta tecnología consiste en hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso monocromático de alta intensidad (usualmente un láser) con una longitud de onda fija (el más usado es el de iones de Argón que emite luz azul, 488nm). La información producida puede estructurarse en dos tipos: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la fluorescencia.

En el caso particular del presente estudio se ha usado un citómetro de flujo de los servicios técnicos de la Universidad de Jaén de la marca Becton-Dickinson LSR Fortessa (Figura 7).

La configuración óptica del equipo permite la captación de la fluorescencia en las zonas de emisión de los pigmentos que se reflejan en la figura 8. Es de señalar que el espectro de emisión de la clorofila coincide con el señalado como PerCP-Cy5.5.



Figura 7. Citómetro de flujo BD LSRFortessa™ de la Universidad utilizado para el estudio.

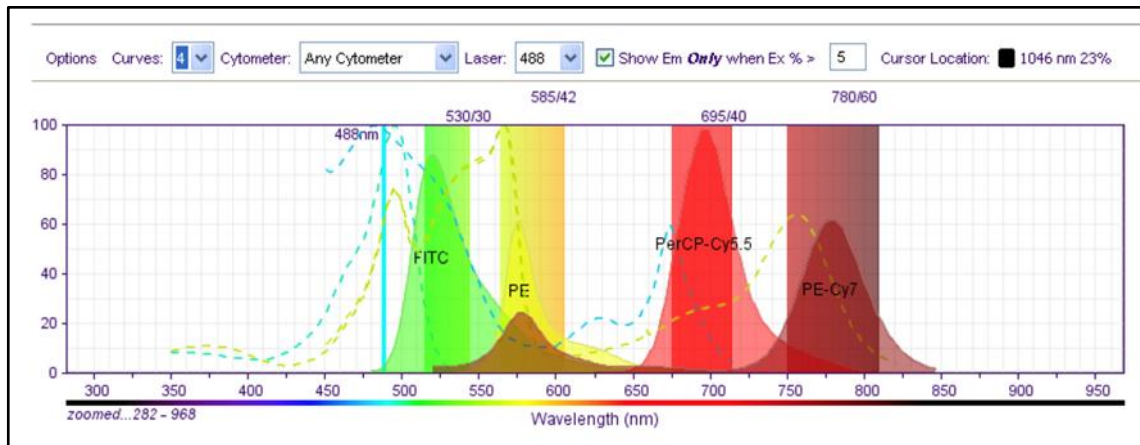


Figura 8. Espectro de excitación de los fluorocromos que definen los rangos de longitudes de onda captados por los PMT del citómetro LSR-Fortessa.

El citómetro es capaz de medir más de 1000 células por segundo, siendo usual un tiempo de adquisición entre 1 y 5 minutos por muestra (Bernad, 2018).

A nivel general, un citómetro de flujo estándar está formado por 5 componentes básicos, el sistema de fluidos, las fuentes de luz, los componentes electrónicos, el sistema óptico y el sistema informático (Flores, 2016).

El sistema de fluidos: incluye aquellos componentes que permiten transportar, enfocar y pasar secuencialmente las partículas de la muestra con el punto que coincide con el haz de luz. Así el líquido se inyecta en el interior de un fluido isotónico en movimiento a una velocidad menor a la de dicho fluido (fluido envolvente). Mediante el flujo de presiones de ambos fluidos se alinean las partículas de la muestra y pasan de una en una por la luz del láser de menor a mayor velocidad (Keren et al., 1994).

Fuentes de luz: como ya se ha indicado, se suele utilizar láseres como fuentes de luz que emiten longitud de ondas monocromáticas específicas, entre ellos el láser azul (488nm), el láser rojo (630nm) y a veces un tercer láser de luz ultravioleta. (McCoy, 2002; Wood, 2006). El espectro de excitación de los fluorocromos están lógicamente determinados por el tipo de láser empleado, lo cual determina el conjunto de fluorocromos adecuados a cada tipo de láser (Flores, 2016).

Sistema electrónico: su función consiste en transformar la señal luminosa en una señal digital para que de esta manera pueda ser procesada por el sistema informático (Barrera et al., 2004).

Sistema óptico: está formado por el conjunto integrado de lentes y prismas para enfocar el haz de luz, la fibra óptica que conduce la luz para que interceda con la muestra y los filtros y espejos que envían la luz con una determinada longitud de onda a los diferentes detectores (Flores, 2016). Hay 3 tipos principales de detectores. En primer lugar, los de tipo fotodiodo, formados por los FSC “forward scatter”, que detectan intensidades elevadas de luz, los PMT “photomultiplier tube” denominados tubos fotomultiplicadores para intensidades de luz mínimas, los SSC “sideward scatter” que detectan luz dispersada lateralmente y por último los detectores espectrales para medir simultáneamente varios fluorocromos.

La dosis de luz total almacenada por el detector es directamente proporcional a la cantidad de moléculas de fluorocromo que hay en la partícula examinada, así como a la cantidad de señal producida por el detector (Givan, 2001; Flores, 2016).

Sistema informático: compuesto por el ordenador y los programas informáticos que se encargan de analizar los datos y controlar los elementos del citómetro (McCoy, 2002). Los datos de las mediciones se almacenan de forma consecutiva en una matriz que contiene toda la información de cada partícula siguiendo un formato FCS “flow cytometry standards” (Karen, 1994).

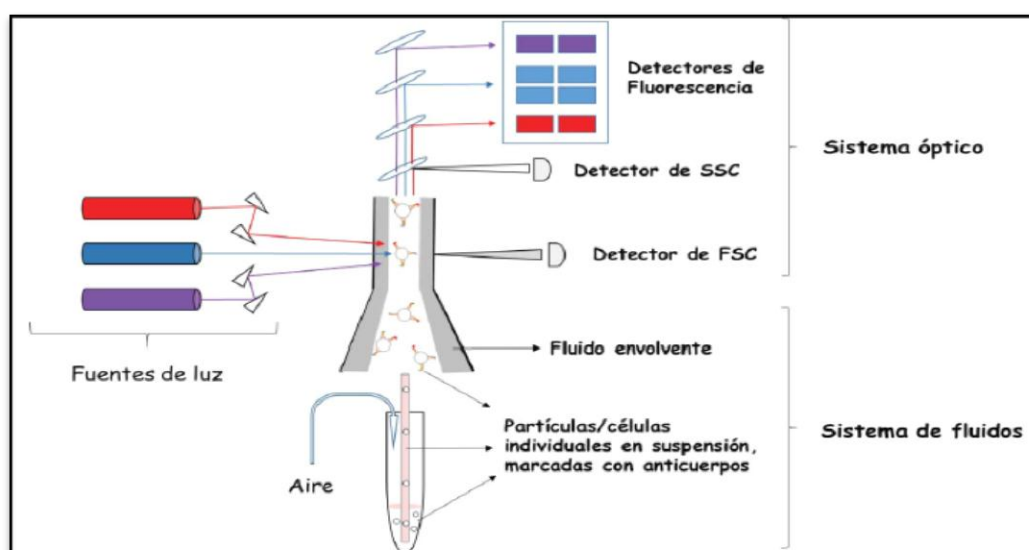


Figura 9. Esquema representativo de un citómetro de flujo y sus componentes principales. (Pedreira et al., 2013; Flores Montero, 2016). El SSC corresponde con dispersión lateral de luz y el FSC con dispersión frontal de luz.

3.5.1. Análisis de los datos obtenidos con el citómetro de flujo

Los datos del citómetro se analizaron mediante el software WinMDI.

Después de la obtención de los citogramas biparamétricos con el software WinMDI, se identificaron las diferentes nubes de puntos que corresponden con las comunidades clasificadas según su diámetro esférico:

- R1: es la región total, en la que se incluyen todas las células fluorescentes, eliminando el “ruido” (material sin fluorescencia específica).
- R2: en ella se incluye el picoplancton (0.2-24 μm).
- R3: corresponde al ultraplancton (2-8 μm).
- R4: corresponde con los organismos de mayor tamaño, nanoplancton (8-20 μm) y microplancton (>20 μm).

Las medidas de tamaño celular se hicieron a partir de la señal de luz dispersada lateralmente (SSC) enfrentados con la fluorescencia de la clorofila (PERCYP). Para el cálculo del biovolumen, se utilizó la siguiente fórmula: $\text{biovolumen} = 2,2482 * \text{FSC} - 2,2627$ determinada previamente por Bernad-Cobo (2018).

Por otro lado, para la obtención de los espectros se utilizó la plantilla de extrapolación de 1024 canales que ofrece el citómetro LSRFortessa™. Así se obtuvieron los diferentes gráficos de dispersión donde se refleja el biovolumen y también los histogramas relacionados con el número de células y tamaño de las poblaciones.

A partir del cálculo del biovolumen en escala logarítmica (Log10), con Excel se realizaron las gráficas donde se representa la evolución de las categorías de tamaños a lo largo del tiempo.

Para el análisis estadístico, en primer lugar se estimó la variabilidad de los datos calculando la desviación estándar y el error estándar con Excel.

Con el fin de encontrar un modelo estadístico para predecir la probabilidad de eclosión, se les aplicó a los datos el test de normalidad Shapiro-Wilk W. A continuación se realizaron ANOVA de medidas repetidas para analizar el efecto de la temperatura sobre la eclosión de las categorías de tamaños tanto en los datos

obtenidos con el citómetro como en los obtenidos con el microscopio. Se realizaron con el software de libre uso denominado PAST.

4. RESULTADOS

4.1. Comunidad críptica heterotrófica

Como puede observarse en la figura 10, en la primera semana predominaron las cianobacterias y los ciliados, siendo estos más abundantes. En la segunda semana hubo dos picos máximos, el mayor correspondió a los ciliados que aumentaron su densidad y a partir de este punto fueron disminuyendo progresivamente; así el segundo pico correspondió con la eclosión de las algas verdes (fue su momento de eclosión y aunque decrecieron en la tercera semana, volvieron a presentar un aumento leve al final). Pese que en las primeras semanas no hubo presencia de euglenofitas, estas aumentaron considerablemente su densidad en la 4ª semana, siendo el grupo más abundante al terminar el seguimiento. Las diatomeas presentaron una concentración más o menos estable desde el principio, teniendo un ligero pico en la tercera semana. Por último, de los grupos heterótrofos, los rotíferos eclosionaron en la cuarta semana y no se observaron branchiopodos.

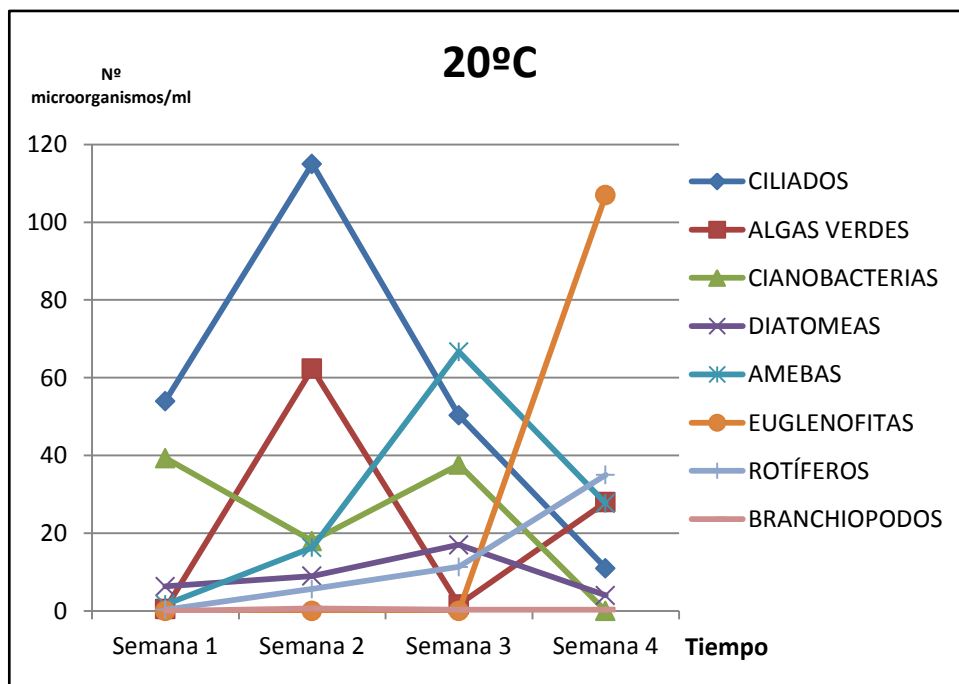


Figura 10. La gráfica representa la eclosión a lo largo del tiempo del número de organismos/ml de los diferentes grupos a 20°C.

En la figura 11, cabe destacar la eclosión de ciliados con una alta concentración de individuos durante la primera semana, seguidos por las cianobacterias. En esta semana también eclosionaron las algas verdes y las diatomeas. En los demás grupos de microorganismos puede observarse una dinámica de eclosión que fue disminuyendo a lo largo de las semanas y que se torna uniforme.

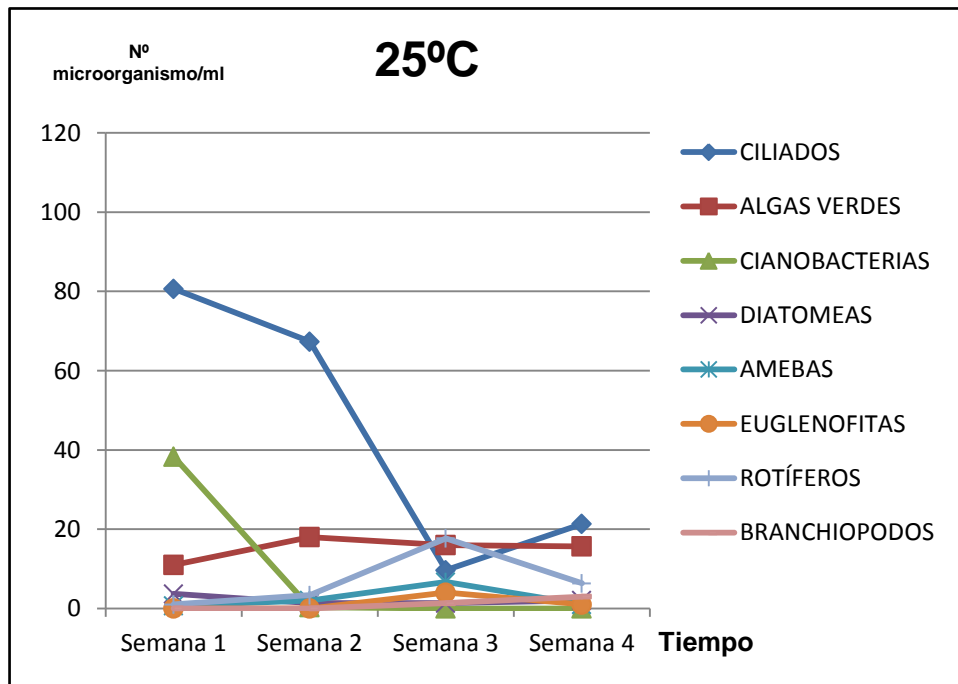


Figura 11. La gráfica representa la eclosión a lo largo del tiempo del número de organismos/ml de los diferentes grupos a 25°C.

En general, en los controles de mayor temperatura parece denotarse una eclosión más temprana que a menor temperatura. A su vez a 25°C se observa menor densidad de individuos que en los de 20°C. Todo esto se puede apreciar en las figuras 12, 13, 14 y 15.

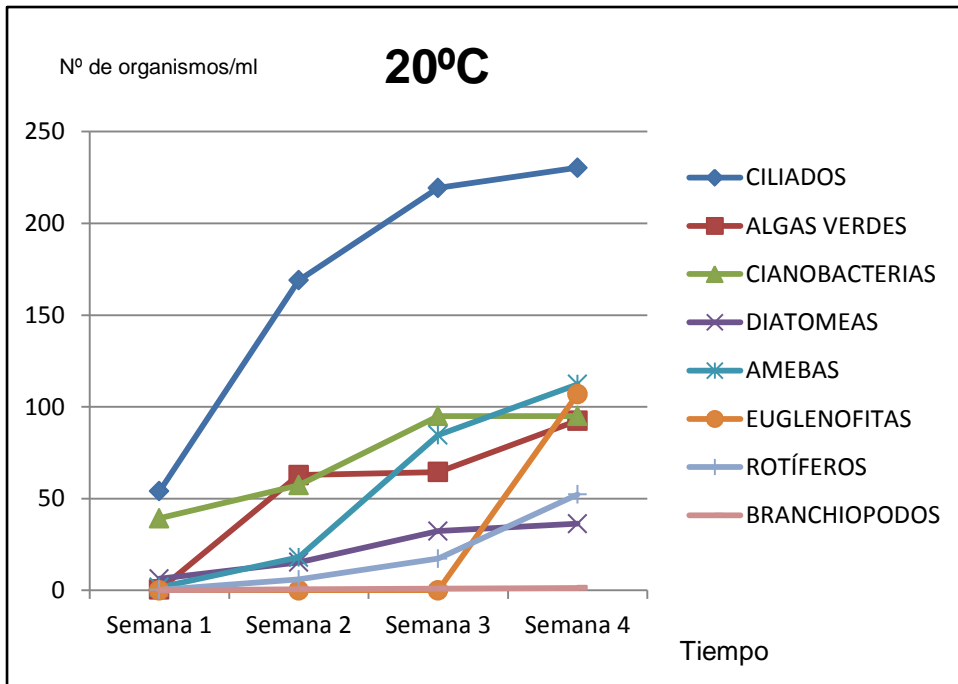


Figura 12. La gráfica muestra el número de organismos acumulados cada semana.

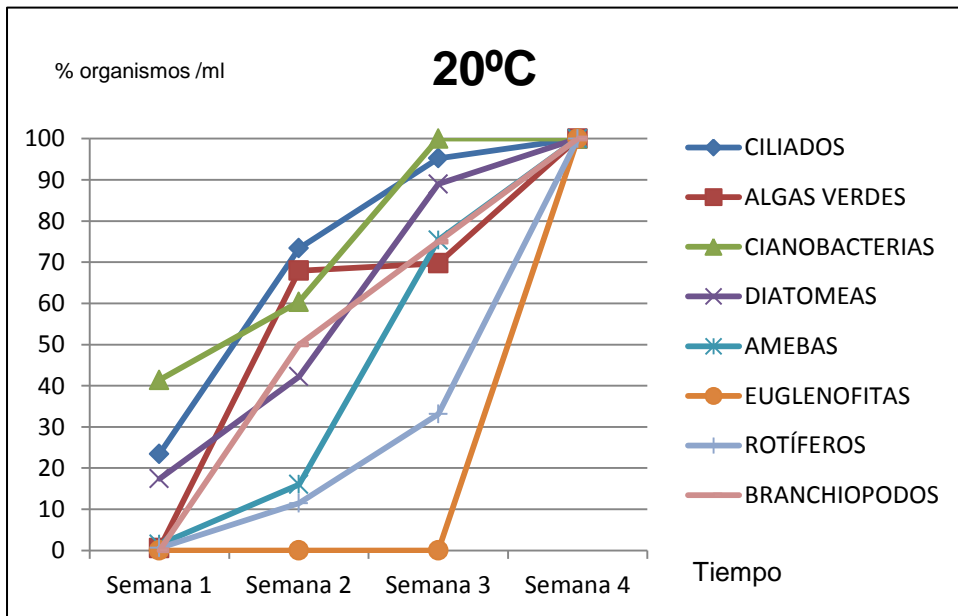


Figura 13. La gráfica muestra el porcentaje de organismos acumulados cada semana.

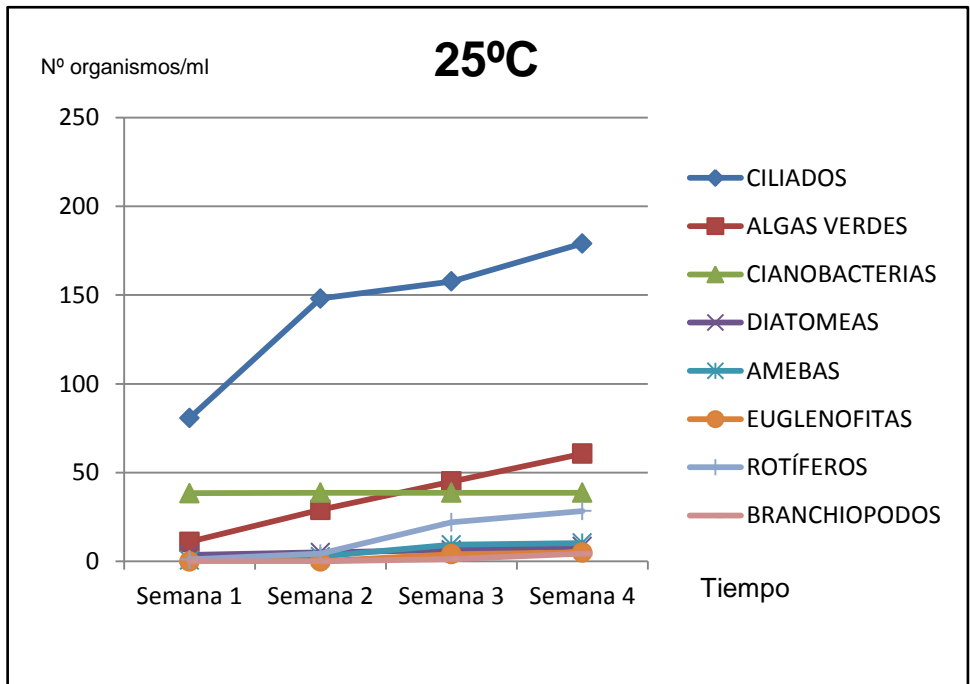


Figura 14. La gráfica muestra el número de organismos acumulados cada semana.

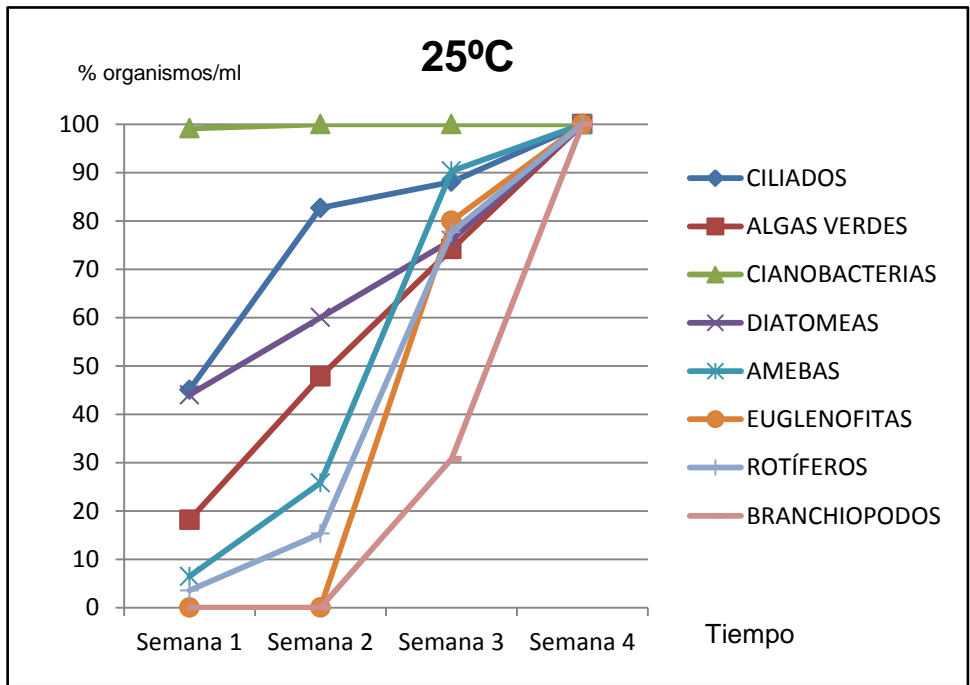


Figura 15. La gráfica muestra el porcentaje de organismos acumulados cada semana.

Como puede observarse en la tabla 1, la ANOVA no permite deducir que exista un efecto significativo con respecto a ninguno de los dos factores, por lo tanto no parece haber diferencias de eclosión entre los grupos de 20°C y 25°C.

Source	df	F	P
Factor A	1	4,885	0,1141
Factor B	7	2,418	0,05541
A x B	7	0,4664	0,8477

Tabla 1. ANOVA de medidas repetidas que muestran el efecto de la temperatura (Factor A) sobre los grupos de organismos (Factor B).

La figura 16 permite apreciar que en general existe una tendencia por la cual disminuye la abundancia de todos los grupos de organismos conforme aumenta la temperatura de incubación, exceptuando los branchiópodos que se mantienen más o menos estables incluso parece que aumentan ligeramente. A su vez el gráfico B complementa esta interpretación, destacando una bajada de las amebas y euglenofitas.

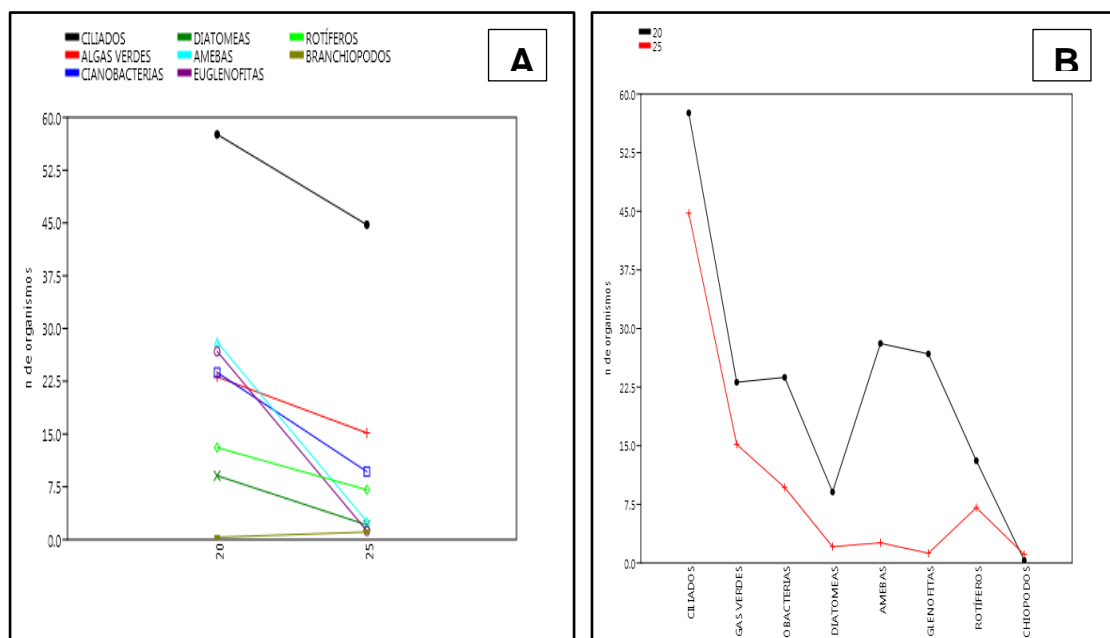


Figura 16: Variación de los grupo taxonómicos con respecto a la temperatura (A). En el gráfico (B) se muestran enfrentados los grupos en relación con ambas temperaturas. Medidas predichas por un ANOVA de medidas repetidas.

Análisis visual de las muestras

Todas las imágenes se tomaron a 20x. En la figura 17 pueden observarse especies encontradas durante el análisis con el microscopio óptico. La A corresponde con un alga perteneciente al género *Closterium* con forma semilunar típica de este género con numerosas cloroplastos en su interior. En la B puede verse dos rotíferos cuya identidad se desconocen rodeados de detritus. La C corresponde con una Euglenofita, comúnmente presentes en agua dulce rica en materia orgánica. La D es *Daphnia sp*, conocida también como pulgas de agua pertenecientes al género de crustáceos planctónicos.

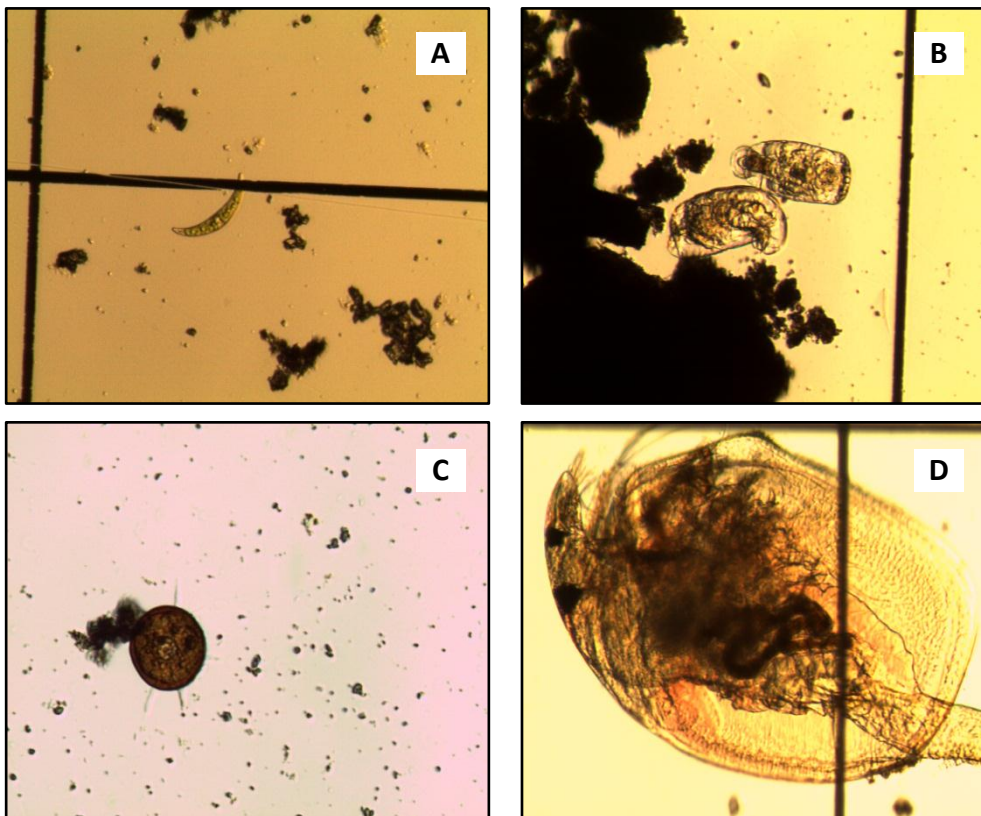


Figura 17: Imágenes de las especies encontradas durante el análisis con el microscopio óptico.

4.2. Fitoplancton (citometría de flujo)

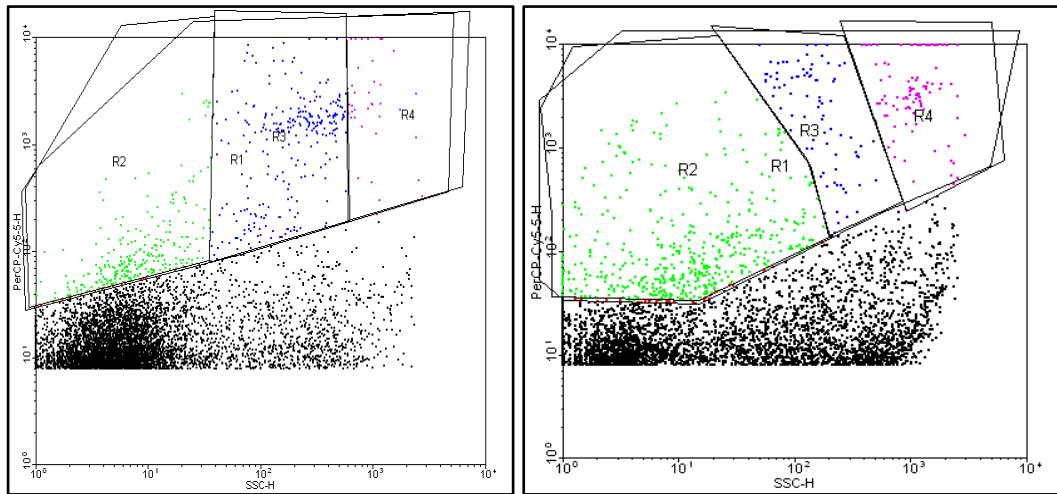


Figura 18. Citogramas de nubes de puntos y espectros. Muestran los resultados de las comunidades fitoplanctónicas. Las regiones coloreadas corresponden con la terminología definida en materiales y métodos. SSC vs Clorofila

Con respecto a las figuras 19 y 20, se pudo observar que con forme aumenta la temperatura disminuía el número total de células en general. A 20°C se apreció que la riqueza de los organismos de menor tamaño fue mayor y esta disminuyó en las categorías de mayor tamaño que corresponde a R3 y R4. En contraposición a una temperatura de 25°C, se dio un aumento en los primeros días de las categorías de tamaño medio (R3) que disminuyó conforme fue pasando el tiempo y fueron viendo favorecidas de nuevo las categorías de menor tamaño.

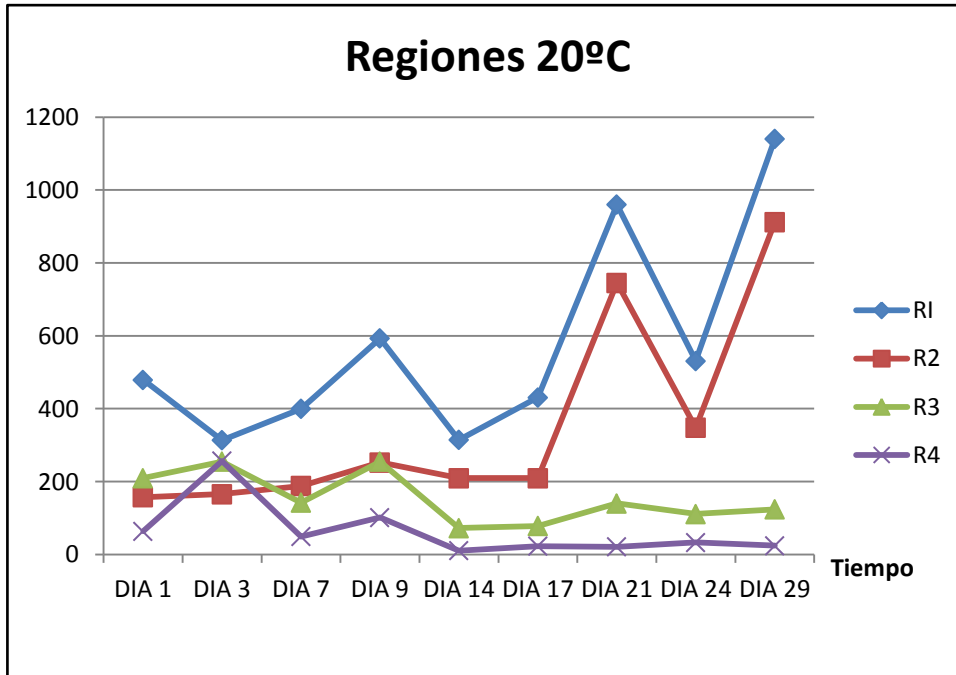


Figura 19. La gráfica representa la abundancia de organismos distribuidos en las diferentes regiones a lo largo del tiempo en el grupo de 20°C.

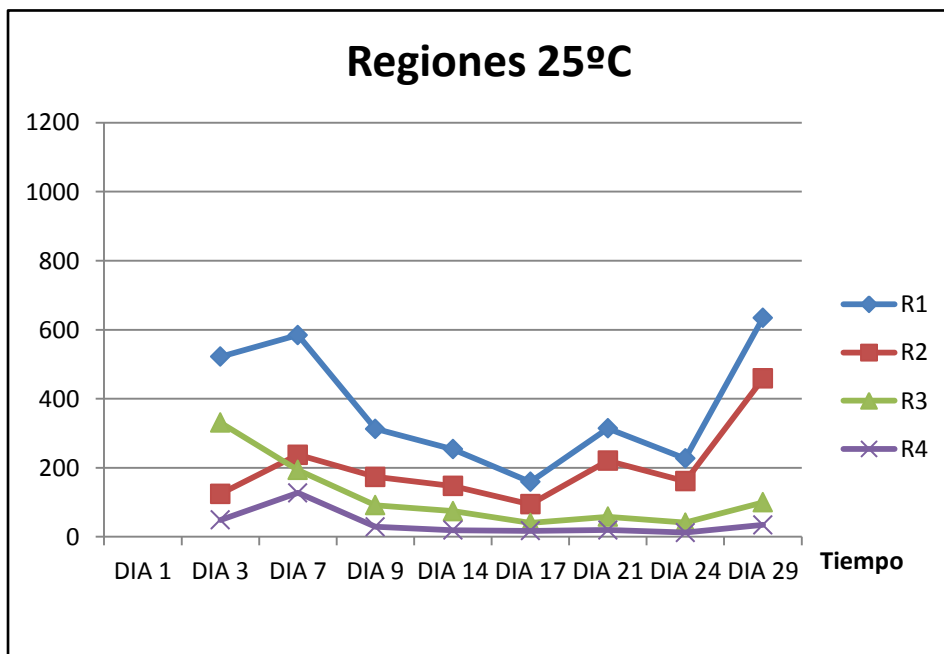


Figura 20. La gráfica representa la abundancia de organismos distribuidos en las diferentes regiones a lo largo del tiempo en el grupo de 25°C.

En las siguientes figuras (21, 22, 23 y 24) puede observarse enfrentados el biovolumen de las dos variantes de temperaturas en las diferentes categorías de tamaños. Las flechas rojas indican los puntos donde las barras de error no se solapan y por lo tanto si presentan diferencias con respecto a las dos temperaturas. Donde menos diferencias pueden observarse es en las categorías de tamaño medio correspondiente al ultraplankton. En las demás categorías de tamaños si existen diferencias entre ambas temperaturas.

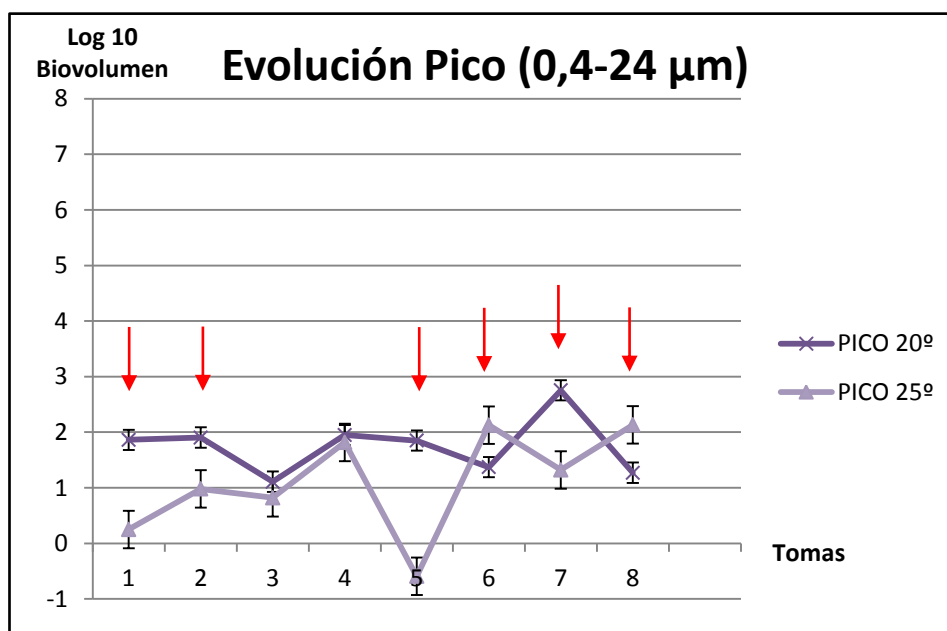


Figura 21. Variación del biovolumen del picoplancton (log) a lo largo del periodo de muestreo para los dos tratamientos.

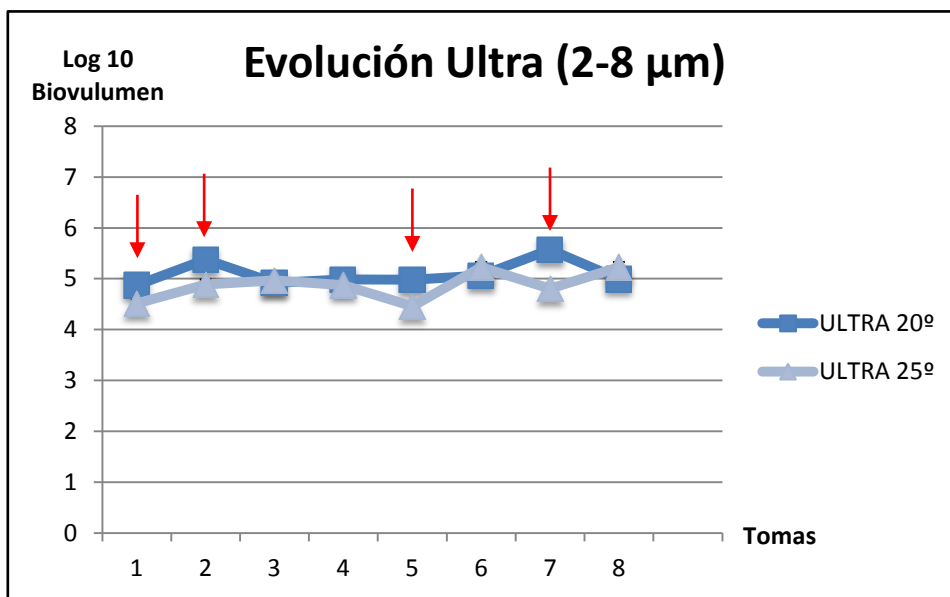


Figura 22. Variación del biovolumen del ultraplankton (log) a lo largo del periodo de muestreo para los dos tratamientos.

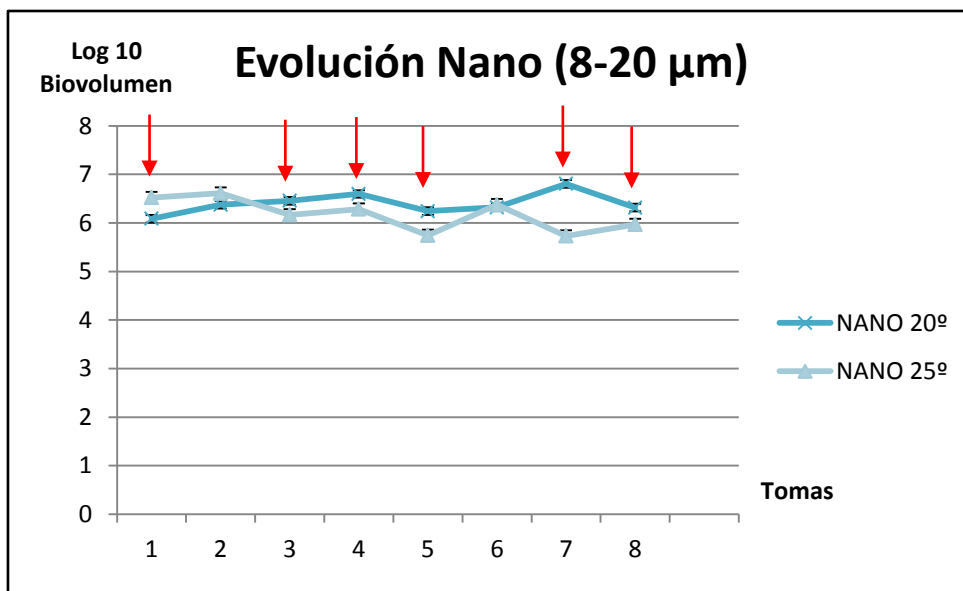


Figura 23. Variación del biovolumen del nanoplankton (log) a lo largo del periodo de muestreo para los dos tratamientos.

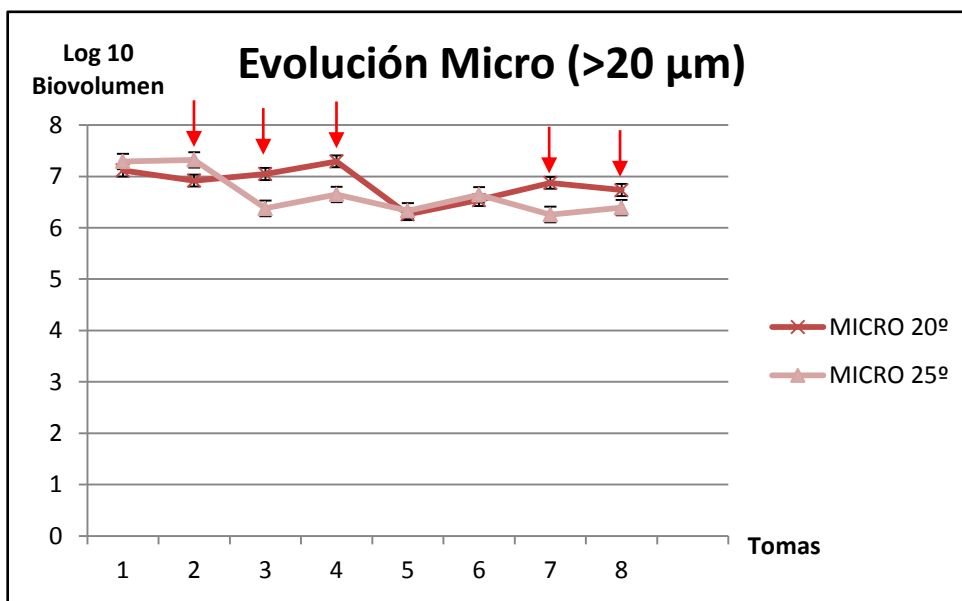


Figura 24. Variación del biovolumen del microplancton (log) a lo largo del periodo de muestreo para los dos tratamientos.

Como puede observarse en la tabla 2, la ANOVA mostró un efecto significativo con respecto al factor B ($p < 0,0001$), por lo tanto se denota una variación a lo largo de la eclosión entre las diferentes categorías de tamaños.

Source	Df	F	P
Factor A	1	3,66	0,09718
Factor B	3	781,2	<0,0001
A x B	3	1,104	0,3697

Tabla 2. ANOVA de medidas repetidas que muestran el efecto de la temperatura (Factor A) sobre las categorías de tamaños (Factor B).

Tal y como muestra la figura 25, no se observaron grandes diferencias entre ambas temperaturas con las categorías de tamaños, excepto en Pico y Nanoplancton, en las cuales disminuyó el biovolumen a 25°C.

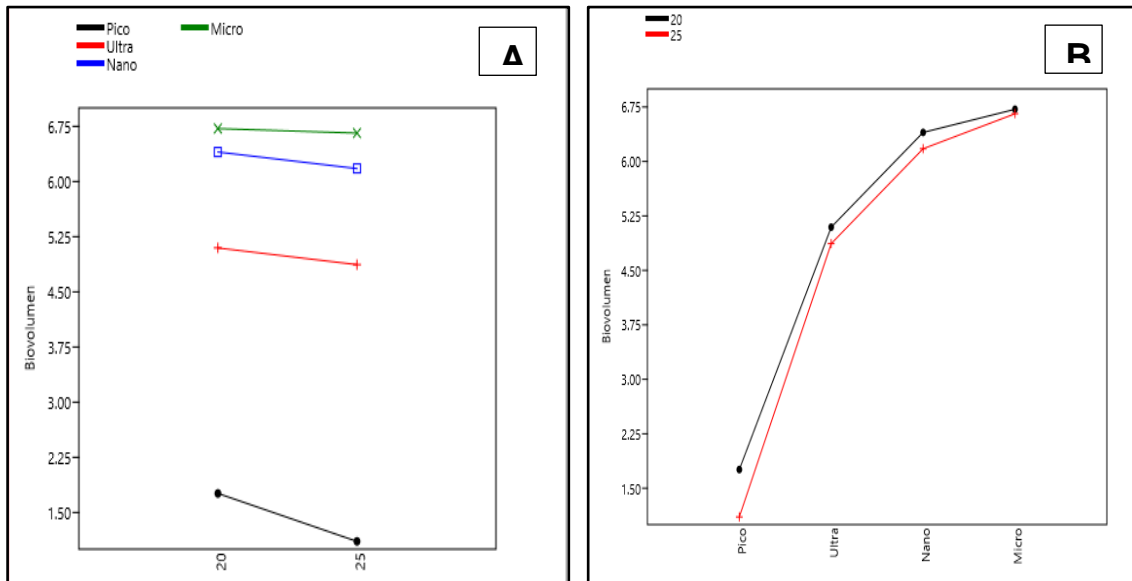


Figura 25. Variación de las categorías de tamaños con respecto a la temperatura (A). En el gráfico (B) se muestran enfrentadas las categorías de tamaños en relación con ambas temperaturas. Medidas predichas por un ANOVA de medidas repetidas.

5. DISCUSIÓN

La intención de este estudio es realizar un seguimiento de los grupos microbianos (analizados mediante la microscopía óptica a niveles taxonómicos de grandes grupos y utilizando la citometría de flujo) que forman este tipo de ecosistemas acuáticos y sus diferentes formas de eclosión en dos tratamientos de temperatura distintas, para simular así las características de un escenario de cambio climático severo.

Según los resultados obtenidos en este estudio, si existen diferencias en la eclosión de los diferentes microorganismos, tanto en la comunidad autótrofa como en la comunidad heterótrofa, aunque estas diferencias no han sido tan elevadas como se esperaba. En términos generales, la temperatura a 20°C es más favorable para la eclosión de todas las categorías de tamaños y grupos taxonómicos. Por lo tanto se podría afirmar que en un futuro escenario de cambio climático, un aumento de las temperaturas tendría un efecto directo en la eclosión de las comunidades microbianas, siendo menos favorables para su supervivencia, reproducción y desarrollo y alterando la estructura y distribución de los ecosistemas acuáticos.

5.1. Comunidad fitoplanctónica (citometría de flujo)

Dada la importancia y los resultados que se han obtenido mediante la técnica del citómetro de flujo en este estudio, se confirma la eficacia de su uso tanto en el estudio de ecosistemas acuáticos como en otros muchos aspectos relacionados con la ecología, denotando una mayor precisión estadística con respecto de la microscopía óptica tradicional.

Su rápida capacidad para analizar simultáneamente características ópticas como el tamaño, la estructura, la forma, el índice de refracción o la fluorescencia, hace que sea una tecnología apropiada para estudiar, identificar, medir y discriminar los organismos que forman las comunidades fitoplanctónicas (Bernad, 2018). También para analizar pequeños organismos, como el picoplancton, cuyo diminuto tamaño les hace muy difícil de observar y contabilizar con técnicas tradicionales (Yensch & Horan, 1989).

Según los resultados, la temperatura sí afecta a la distribución de las categorías de tamaños (Tabla 2), siendo la temperatura de 20°C la que más favorece a la eclosión, a excepción del ultraplancton que es el que menos diferencias presenta en ambas temperaturas (Figura 22), por lo tanto los microorganismos de tamaño medio son los menos afectados. Por otro lado, en las categorías de mayor tamaño correspondientes al microplancton, durante las primeras semanas favorecen la eclosión a 25°C pero esta va disminuyendo progresivamente (Figura 24).

La concentración de fitoplancton total es mayor en el grupo de 20°C (Figura 20) con lo cual en este grupo hay mayor cantidad de poblaciones de organismos. La comunidad fitoplanctónica dominante en ambos grupos corresponde al picoplancton seguida del ultraplancton (Figura 19 y 20). Según los estudios de Simek y Chrzanowski (1992), la gran concentración de organismos con tamaños entre 02-24 μm , podría deberse a la ausencia de depredadores para estos tamaños. El rango de volúmenes bacterianos para ecosistemas acuáticos de agua dulce corresponden a valores 0.01 y 0.2 μm^3 (Cole et al., 1993).

Por otra parte, el enfrentamiento entre la dispersión lateral de la luz (SSC), que ofrece información sobre la complejidad interna de las partículas y la fluorescencia roja recogida por los fotodetectores, hace posible realizar un análisis de los

diferentes tipos de información sobre la estructura física y química de cada partícula de forma individual. Obtenemos así los diferentes espectros de biovolumen, los cuales presentan una mayor heterogeneidad en la categoría de picoplancton (Figura 21). En estudios previos, Wetzel y Sondergaard (1998), comentan que en la superficie correspondiente a lagos someros es donde más producción bacteriana hay.

Como puede verse, el número de organismos fitoplanctónicos se ha ido reduciendo a lo largo del tiempo en ambos grupos. Este hecho puede estar comprometido con el aumento del zooplancton. Guerrero et al., (2006) afirma en estudios previos realizados en lagunas salinas del Alto Guadalquivir que en relación con la estación del año, las comunidades fitoplanctónicas de estos sistemas varían notablemente, por lo tanto en época de estación húmeda, disminuye la concentración de sales al aumentar el volumen de la laguna, mientras que en la estación seca sucede lo antagónico. Únicamente las algas halotolerantes son capaces de sobrevivir cuando aumenta la salinidad debido a la escasa aparición de depredadores y por lo tanto durante temporadas secas, aumenta la biomasa del pico y nanoplancton, favoreciendo el dominio de las clases de tamaños más pequeños. Nuestro estudio se realizó en ausencia de agua y esto podría explicar las concentraciones de fitoplancton encontradas.

5.2. Comunidad críptica heterotrófica

Los resultados obtenidos en la Figura 10 muestran en general una mayor tasa de eclosión a 20°C, por lo tanto esta temperatura sería más favorable para su desarrollo, a excepción de los branchiópodos, que muestran mayor tasa de eclosión a 25°C (su reducido número puede deberse a la corta duración del experimento). Existen cambios significativos en la segunda semana del grupo de 20°C, momento en el que se produjo un aumento de casi todos los grupos de microorganismos, aunque teniendo en cuenta la turbidez que presentaban los ensayos a 20°C (Figura 5) cabría de esperar que estas poblaciones fuesen menores debido a que la turbidez podría estar afectando a la disponibilidad de agua. También existen diferencias entre ambos grupos. Tanto los ciliados, algas verdes y cianobacterias eclosionaron durante las primeras semanas, y a partir de la 3ª semana fueron disminuyendo (esto puede deberse a la aparición de los primeros rotíferos), siendo esta disminución más

drástica a 25°C. Los rotíferos y las euglenofitas tuvieron una eclosión más tardía, a partir de la 3ª semana y siendo más abundantes a 20°C (Figura 10 y 11). Cabe mencionar la posibilidad de que la elevada concentración de rotíferos eclosionados a lo largo de las últimas semanas pudiera estar relacionada con eventos reproductivos in situ (Edmondson, 1965).

La comunidad zooplanctónica presenta diferentes estrategias evolutivas para desarrollarse y conseguir sobrevivir en condiciones ambientales extremas como muestran diferentes investigaciones. Tanto la latencia como la diapausia representan la principal manifestación de la respuesta al fotoperiodo (Battauz, 2016). Una teoría sugiere que en circunstancias de frío y oscuridad alargan el periodo de diapausia e incrementan la resistencia de los huevos almacenados. (Chittapum et al., 2005).

Por otro lado, según Rai y Gaur (2001), uno de los organismos con más capacidad fisiológica para soportar temperaturas extremas y sequía son las cianobacterias. El papel de los organismos en la actividad de los sistemas acuáticos se ve alterado por los cambios ambientales bruscos. El fitoplancton es capaz de aclimatarse a cambios ambientales extremos e inducir diferentes técnicas adaptativas de periodos de inactividad y eclosión, según Viiverberg, (1989), los microorganismos consiguen aclimatarse pero sólo durante períodos de tiempo reducidos. El presente estudio muestra que el tiempo de aclimatación es bastante largo y más progresivo a temperaturas más normales (20°C), mientras que a 25°C la aclimatación produce una eclosión alta y brusca en los primeros estadíos que implica una disminución progresiva a lo largo del tiempo. Por lo tanto, las condiciones ambientales pueden influir en la tasa de producción de huevos (Hirche et al., 1997; Niehoff, 2004). Existe una interacción entre la temperatura y la tasa de producción de huevos, en el cual la producción de huevos disminuye gradualmente cuando la temperatura llega a un nivel máximo (Uye, 1981, Rodríguez & otros, 1995; Ianora, 1998). Otros autores tampoco han encontrado un efecto significativo de la temperatura con las categorías de tamaños (Jamieson & Burns, 1988; Hirche et al., 1997; Caramujo & Boavida, 1999). Así las variaciones en la producción de huevos y el tiempo de desarrollo aumenta en los extremos de rango térmico especialmente en gradientes de temperatura elevados (Herzig, 1983). En otros estudios, se ha observado que a temperaturas elevadas hay una mayor variabilidad en el desarrollo post-embriionario

(Jiménez-Melero et al., 2007), sin embargo, en nuestro estudio no se puede afirmar con claridad.

Según Huntley y López (1992), la temperatura representa más del 90% de la variabilidad en la tasa de desarrollo, en contraposición de este estudio en el cual no se han encontrado diferencias tan significativas en cuanto a temperaturas se refiere. Por lo tanto esta variabilidad podría asociarse a las diferencias genéticas presentes entre los diferentes grupos de organismos, en los cuales factores ambientales como la temperatura o la alimentación influye en su plasticidad.

Los resultados del presente trabajo nos permiten comprender más profundamente la dinámica de resistencia y eclosión de la comunidad críptica microbiana, la cual resulta una interesante estrategia para evitar los períodos inestables y críticos propios del cambio global, garantizando el progreso de la vida y favoreciendo la recuperación de los sistemas, potenciando la resiliencia de los ecosistemas (Battauz, 2016).

6. CONCLUSIÓN

- La temperatura de 20°C favorece la eclosión y el desarrollo de la comunidad críptica microbiana, tanto de los organismos autótrofos como de los organismos heterótrofos, teniendo como excepción en este grupo a los branchiopodos, para los cuales su eclosión se ve más estimulada a 25°C.
- A 25°C disminuye el biovolumen de microorganismos en ambas comunidades crípticas.
- También se han observado diferencias en cuanto a la temperatura y eclosión de las categorías de tamaños. En las categorías de tamaño medio (ultraplancton) es donde menos diferencias se observan entre ambas temperaturas. A 25°C los organismos de mayor tamaño (microplancton) eclosionan antes que los que se encuentran a 20°C, mientras que a 20°C, favorece la eclosión de las categorías de menor tamaño (picoplancton).
- Los organismos que más sensibilidad muestran a la temperatura son las amebas, diatomeas y cianobacterias, ya que puede observarse un mayor contraste en el número de organismos para ambas temperaturas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abarzúa, M., Basualto, S., & Urrutia, H. (1995). Relación entre la abundancia y biomasa de fitoplancton y bacterioplancton heterotrófico en aguas superficiales del Golfo de Arauco, Chile. *Investigaciones marinas*, 23, 67-74.
- Álvarez Cobelas, M., Catalán, J., & García de Jalón, D. (2006). Impactos sobre los ecosistemas acuáticos continentales. *Impactos del cambio climático en España*, 203-220.
- Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., Del Rosario Sainz Espuñes, T., & Mendoza Pérez, F. (2004, January). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17, 42-55.
- Battauz, Y.S. (2016). Propágulos del zooplancton: importancia en el mantenimiento de la diversidad en los ambientes acuáticos y dispersión de las especies, 40-63.
- Bécares, E. (2004). Ecología de las lagunas y humedales. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 13, 1-1.
- Bernáldez, F.G. (1987). Las zonas encharcables españolas: el marco conceptual. En: Bases científicas para la protección de los humedales en España. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 9-30.
- Bonilla Alvarez, L. X., Gallo Orozco, J.P., Salazar Lopez, L., Jaramillo Londoño, A.M., & Sierra Parada, R. (2012). Estructura y dinámica de la comunidad fitoplanctónica en el humedal "El Resbalón", 1-6.
- Borja Barrera, C., Camacho González, A., & Florín Beltrán, M. (2012). Lagos y humedales en la evaluación de los ecosistemas del milenio en España. *Ambienta: La revista del Ministerio de Medio Ambiente*, (98), 82-90.
- Brendonck, L., & De Meester, L. (2003). Egg banks in freshwater zooplankton: evolutionary and ecological archives in the sediment. *Hydrobiologia*, 491, 65-84.

- Brendonck, L. (1996). Diapause, quiescence, hatching requirements: what can we learn from large freshwater branchiopods (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca, Notostraca, Conchostraca). *Hydrobiologia*, 320, 85-97.
- Cáceres, C.E., & Hairston, N.G. (1998). Benthic-pelagic coupling in planktonic crustaceans: the role of the benthos. *Archiv für Hydrobiologie*, 52, 163-174.
- Camargo, J.A., & Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 16, 98-110.
- Caramujo, M.J., & Boavida, M.J. (1999). Characteristics of the reproductive cycles and development times of *Copidodiaptomus numidicus* (Copepoda: Calanoida) and *Acanthocyclops robustus* (Copepoda: Cyclopoida). *Journal of plankton research*, 21(9).
- Chittapun, S., Pholpunthin, P., & Segers, H. (2005) Restoration of tropical peat swamp rotifer communities after perturbation: an experimental study of recovery of rotifers from the resting egg bank. *Hydrobiologia*, 546, 281-289.
- Cole, J.C., Pace M.L., Caraco N.F., & Steinhart, G.S. (1993). Bacterial biomass and cell size distributions in lakes: More and larger cells in anoxic waters. *Limnol. Oceanogr.*, 38, 1627-1632.
- Conde-Porcuna, J.M., Ramos-Rodríguez, E., & Morales-Baquero, R. (2004). El zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lénticos. *Ecosistemas* 13 (2), 23-29.
- Cortolima, C. (2007). Plan de ordenación y manejo de la cuenca hidrográfica mayor del río Totare. 2, 107-113.
- Costas, E., & Rodas, V.L. (2011). El papel del fitoplancton en el cambio climático: ¿cuánto depende nuestro destino de unas pequeñas microalgas? *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 77, 30-54.
- Coulas, RA, Macisaac, HJ., & Dunlop, W. (1998). Depredación selectiva en un zooplankton introducido (*Bythotrephes cederstroemi*) por arenque de lago

- (*Coregonus artedii*) en Harp Lake, Ontario. *Biología del agua dulce*, 40, 343-355.
- Danks, H.V., (1978). Some effects of photoperiod, temperature and food on emergence in three species of Chironomidae (Diptera). *Canadian Entomologist*, 110, 289-300.
- Edmondson, W.T. (1965) Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature. *Ecol. Monogr*, 35, 61-111.
- Falkowski, P.G., (1994). The Role of Phytoplankton Photosynthesis in Global Biogeochemical Cycles. *Photosynthesis Research* 39, 235-258.
- Flores Montero, J.A. (2016). Nuevas estrategias metodológicas y de análisis de datos de citometría de flujo aplicadas al diagnóstico y clasificación de las hemopatías malignas. *Universidad de Salamanca. Tesis doctoral*, 130-188.
- Foissner, W. & Berger, H. (1996). A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater biology*, 35, 375-482.
- García, L.P. (2012). Efectos interactivos entre la temperatura y la radiación solar sobre organismos acuáticos en un contexto de cambio climático. Tesis doctoral, 56-79.
- Gilbert, J.J. (1974). Dormancy in rotifers. *Transactions of the American Microscopical Society*, 93, 490-513.
- Givan, A.L. (2001). Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biology*, 63, 19-50.
- Grice, G.D. & Marcus, N.H. (1981). Dormant eggs of marine copepods. *Oceanography and Marine Biology Review*, 19, 125-140.
- Hairton, N.G. (1976) Photoprotection by carotenoid pigments in copepod *Diaptomus nevadensis*. *National Academy of Sciences*, 73, 971-974.
- Hebert, P.D.N. & Emery, C.J. (1990). The adaptive significance of cuticular pigmentation in *Daphnia*. *Functional Ecology*, 4, 703-710.

- Herzig, A., (1983). The ecological significance of the relationship between temperature and duration of embryonic development in planktonic freshwater copepods. *Hydrobiologia* 100, 65-91.
- Heynes-Silerio, S.A., del Socorro González-Elizondo, M., Ruacho-González, L., González-Elizondo, M., & López-Enríquez, I.L. (2017). Vegetación de humedales del municipio de Durango, Durango, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 88(2), 358-364.
- Hirche, H.J., U. Meyer & B. Niehoff, (1997). Egg production of *Calanus finmarchicus*: effect of temperature, food and season. *Marine Biology* 127, 609-620.
- Huntley, M. & López, M.D.G. (1992). Temperature-dependent production of marine copepods: a global synthesis. *American Naturalist* 140, 201-242.
- Ianora, A., (1998). Copepod life history traits in subtemperate regions. *Journal of Marine Systems* 15, 337-349.
- Inventario de humedales de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente. http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural._Uso_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/humedales/propuesta_inclusion_humedales_iha/jaen/Laguna_de_Hituelo_ficha.pdf
- Jamieson, C. & C. Burns, (1988). The effects of temperature and food on copepodite development, growth and reproduction in three species of *Boeckella* (Copepoda: Calanoida). *Hydrobiologia* 164, 235-257.
- Jeppesen, E., Jensen, J.P., Skovgaard, H. & Hvidt, C.B. (2001). Changes in the abundance of planktivorous fish in Lake Skanderborg during the past two centuries a palaeoecological approach. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 172, 143-152.
- Jiménez-Melero, R. (2007). Population dynamics, demography and production of *Arctodiaptomus salinus* (Copepoda: Calanoida) in a saline endorheic pond. *PhD thesis, Universidad de Jaén*.
- Jiménez-Melero, R., Parra, G., & Guerrero, F. (2012). Effect of temperature, food and individual variability on the embryonic development time and fecundity of

- Arctodiaptomus salinus (Copepoda: Calanoida) from a shallow saline pond. *Hydrobiologia*, 686(1), 241-256.
- Karl, T.R. & Trenberth, K.E. (2003) Modern Global Climate change. *Science*, 302, 1719-1723.
- Keren, D.F., Hanson, C.A., Hurtubise, P.E. (1994). Flow cytometry and clinical diagnosis. Chicago: ASCP Press, 75-93.
- Kerfoot, W.C. & Weider, L.J. (2004). Experimental paleoecology (resurrection ecology): chasing Van Valen's Red Queen hypothesis. *Limnology and Oceanography*, 49, 1300-1316.
- Kessler, K. & Lampert, W. (2004) Depth distribution of Daphnia in response to a deep water algal maximum: the effect of body size and temperature gradient. *Freshwater Biology*, 49, 392-401.
- Kraan, J., Gratama, J.W., Keeney, M., D'Hautcourt, J.L. (2003). Setting up and calibration of a flow cytometer for multicolor immunophenotyping. *Biology Regul Homeost Agents*, 17, 223-33.
- Lissner J., Schierup H.H., Comín F.A. & Astorga V. (1999). Effect of climate on the salt tolerance of two *Phragmites australis* populations. I. Growth, inorganic solutes, nitrogen relations and osmoregulation. *Aquatic Botany*, 64, 317-333.
- Longobardi, G.A. (1992). Flow Cytometry. First Principles. *New Cork: Willey-Liss*, 30-55.
- Lonsdale, D.J., Weissman, P. & Dobbs, F.C. (1993). A reproductive-resting stage in an harpacticoid copepod, and the significance of genetically based differences among populations. *Bulletin of Marine Science*, 53, 180-193.
- Luna Pabello, V.M., & Castañeda, S.A. (2014). Sistema de humedales artificiales para el control de la eutroficación del lago del Bosque de San Juan de Aragón. TIP: *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 32-55.
- Marcus, N.H. (1996). Ecological and evolutionary significance of resting eggs in marine copepods: past, present and future studies. *Hydrobiologia*, 320, 141-152.

- Marcus, N.H., Lutz, R., Burnett, W., & Cable, P. (1994). Age, viability, and vertical distribution of zooplankton resting eggs from an anoxic basin: Evidence of an egg bank. *Limnology and Oceanography* 39, 154-158.
- Mayén-Estrada, R., M. Reyes-Santos, M.E. Vicencio-Aguilar & R. Aguilar-Aguilar. (2016). Protozarios (Protozoa). *En: La biodiversidad en la Ciudad de México*, 2,204-208.
- McCoy, J.P. (2002). Basic principles of flow cytometry. *Hematological Oncology Clinic North Am*, 16, 229-43.
- Mittag, A., Tarnok, A. (2009). Basics of standardization and calibration in cytometry-- a review. *Journal of biophotonics*, 2(8-9), 470-81.
- Mortimer, C.H. (1935). Untersuchungen uber den Generationswechsel der Cladoceran. *Naturwissenschaften*, 23, 476-480.
- Niehoff, B., (2004). The effect of food limitation on gonad development and egg production of the planktonic copepod *Calanus finmarchicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 307: 237-259.
- Orfao, A., Ciudad, J., López, A., López-Berges, M.C., Vidriales, B., Macedo, A., et al. (1993). La citometría de flujo en el diagnóstico clínico. Servicio General de Citometría. Universidad de Salamanca, 30-66.
- Ortega, F., Parra, G., & Guerrero, F. (2006). Usos del suelo en las cuencas hidrográficas de los humedales del Alto Guadalquivir: Importancia de una adecuada gestión. *Limnetica*, 25, 723-732.
- Ortega, F., Salazar, C. & Guerrero, F. (2007). Vegetación de los humedales del Alto Guadalquivir: las lagunas de origen kárstico y lagunas sobre rañas del noreste de la provincia de Jaén. *Acta Granatense*, 6, 1-14.
- Palumbi, S.R. (2001) Humans as world's greatest evolutionary force. *Science*, 293, 1786-1790.
- Parker, B.R., Wilhelm, F.M. & Schindler, D.W. (1996). Recovery of *Hesperodiaptomus arcticus* populations from diapausing eggs following elimination by stocked salmonids. *Canadian Journal of Zoology*, 74, 1292-1297.

- Pedreira, C.E., Costa, E.S., Lecrevisse, Q., van Dongen, J.J., Orfao, A. (2013). Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol*, 31(7), 415-25.
- Plan Andaluz de Humedales. Consejería de Medio Ambiente (2002). https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/plan_humedales.pdf
- Rai LG, Gaur JP (2001) Algal adaptation to environmental stress. *Springer. Berlin*, 63-85.
- Rodríguez Garzón, L.S., (2012). Determinación del estado trófico de tres ecosistemas lenticos de la sabana de Bogotá con base al fitoplancton, en dos periodos climáticos contrastantes. *Trabajo de grado para optar al título de bióloga*, 1-116.
- Rodríguez, V., F. Guerrero & B. Bautista, (1995). Egg production of individual copepods of *Acartia grani* Sars from coastal waters: seasonal and diel variability. *Journal of Plankton Research* 17, 2233-2250.
- Rost, B., Zondervan, I., & Wolf-Gladrow, D., (2008). Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions. *Marine Ecology Progress Series* 373, 227-237.
- Rouco molina, M., (2011). Mecanismos genéticos y estrategias adaptativas de productores primarios (microalgas y cianobacterias) en un escenario de cambio global. *Madrid: departamento de producción animal, Universidad Complutense de Madrid*.
- Sánchez Carrillo S. & Alvarez Cobelas M. (2001). Nutrient dynamics and eutrophication patterns in a semiarid wetland: the effects of fluctuating hydrology. *Water, Air and Soil Pollution*, 131, 97-118.
- Schindler D.W. (1997). Widespread effects of climate warming on freshwater ecosystems in North America. *Hydrological Processes*, 11, 1043-1057.
- Shick, J.M. & Dunlap, W.C. (2002) Mycosporine like amino acids and related Gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV Protective Functions in Aquatic Organisms. *Review Physiology.*, 64, 223-262.

- Simek, K. & Chrzanowski, T.M. (1992). Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 3715-3720.
- Smith, V.H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. *Environ. Science Pollution. R*, 10, 126-139.
- Steinberg, C.E.W. (2003) Ecology of humic substances in freshwaters. Determinants from geochemistry to ecological niches. *Springer*, 52-70.
- Streble, H., & Dieter, K. (1987). Atlas de los microorganismos de agua dulce.
- Trenberth, K.E., Fasullo, J.T. & Kiehl, J. (2009) Earth's global energy budget. *Bulletin of American Meteorological Society*, 90, 311-323.
- Uye, S., (1981). Fecundity studies of neritic calanoid copepods *Acartia clausi* Giesbrecht and *A. steueri* Smirnov: a simple empirical model of daily egg production. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 50, 255-271.
- Vásquez, G., Castro, G., González, I., Pérez, R., & Castro, T. (2006). Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. *Contactos*, (60), 41-48.
- Vijverberg, J., (1989). Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and in situ conditions: a review. *Freshwater Biology* 21, 317-373.
- Wetzel, R. G. & Sondergaard, M. (1998). Role of submerged macrophytes for the microbial community and dynamics of dissolved organic carbon in aquatic ecosystems. *In: The structuring role of submerged macrophytes in lakes*, 133-148.
- Wetzel, R.G. (2001). Limnology, 3rd edition. *Academic Press*, 95-155.
- Williams, W.D. (1999). Conservation of wetlands in drylands: a key global issue. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 9, 517-522.
- Wood, B. (2006). 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 130(5), 680-90.

Yentsch, C.M., Horan, P.K. (1989). Cytometry in the aquatic sciences. *Cytometry*, 10, 497-499.