

Conceptos y técnicas en ecología fluvial

Edición a cargo de:

ARTURO ELOSEGI

Profesor titular de Ecología en la Universidad del País Vasco

SERGI SABATER

Catedrático de Ecología en la Universidad de Girona

Separata del capítulo 12

La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos

NORA GÓMEZ

JHON CHARLES DONATO

ADONIS GIORGI

HELENA GUASCH

PILAR MATEO

SERGI SABATER

Primera edición: abril 2009

ISBN: 978-84-96515-87-1

© los autores, 2009

© de la edición en español, Fundación BBVA, 2009

La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos

NORA GÓMEZ, JHON CHARLES DONATO, ADONIS GIORGI,
HELENA GUASCH, PILAR MATEO Y SERGI SABATER

12.1. Introducción

Las algas son organismos eucariotas o procariotas, uni o pluricelulares, sin estructuras de conducción, que presentan un amplio rango de tamaños. Estos productores primarios habitan una gran variedad de ambientes acuáticos. Algunos conforman el *plancton*, que es el conjunto de organismos que viven suspendidos en la masa de agua, y otros el *bentos*, o conjunto de organismos asociados al fondo o a plantas u objetos sumergidos (Wetzel 2001). La mayoría de las algas bentónicas están representadas por cianobacterias (llamadas cianófitas en la terminología botánica), algas verdes (clorófitas), diatomeas (bacillariófitas) y algas rojas (rodófitas). Por la cantidad de especies y la diversidad de sus formas de vida, las diatomeas son el principal grupo de algas en los ríos (Sabater 2008). En relación con el tipo de sustrato al que se asocian, distinguimos las *algas epífitas* (sobre la vegetación sumergida), las *algas epipélicas* (en sedimentos blandos limoarcillosos), las *algas epilíticas* (sobre sustratos duros) y las *algas epipsámicas* (asociadas a sustrato arenoso). En términos generales, las algas bentónicas tienen altas tasas de renovación y poseen estrategias vitales oportunistas que les permiten explotar con éxito diversos hábitats (Biggs 1996). Cuando los ríos tienen un flujo muy lento, mayor profundidad o altas concentraciones de nutrientes, el plancton puede alcanzar una importancia destacada.

Las algas bentónicas o planctónicas son, a menudo, los más importantes productores primarios en ríos

Todos los grupos de algas fluviales presentan clorofila *a* como pigmento fotosintético mayoritario. Las cianobacterias presentan, además, ficocianinas y ficoeritri-

na como pigmentos accesorios. Suelen frecuentar ambientes que sufren desecación y aguas con altas concentraciones de nutrientes, principalmente fósforo, aunque algunas especies dominan en aguas oligotróficas. Los euglenófitos presentan clorofila *a* y *b*, y suelen habitar ambientes con alto contenido de materia orgánica disuelta. Las clorófitas comparten con los euglenófitos la presencia de clorofila *a* y *b*. Algunos géneros como *Oedogonium*, *Stigeoclonium* y *Cladophora* pueden observarse a simple vista, ya que alcanzan varios centímetros. Las diatomeas presentan clorofila *a* y *c*, y fucoxantina como pigmento accesorio, que les otorga una coloración verde amarronada. Las rodófitas (como *Batrachospermum* e *Hildenbrandia*) presentan clorofila *a*, ficocianina y ficoeritrina, siendo el predominio de esta última la que les otorga su característica coloración rojiza.

Técnica 28. Muestreo y observación de algas no diatomeas

En esta técnica se describe cómo recolectar y acondicionar las algas bentónicas para su observación. Las técnicas específicas para diatomeas se detallan en la técnica 29, y las específicas de cianobacterias en la técnica 31.

MATERIAL

- Viales de cristal o plástico.
- Espátula, cuchillo o cepillo dental.
- Formaldehído al 40%.
- Corer de metacrilato (o jeringa sin su ápice).
- Tijeras.
- Cámara Palmer-Maloney (capacidad 0,1 mL).
- Cámara Sedgewick-Rafter (capacidad 1 mL).
- Cubreobjetos y portaobjetos.
- Pipetas Pasteur o cuentagotas.
- Microscopio de investigación.

PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Muestreo sobre sustratos naturales

Dada la elevada variabilidad espacial de las comunidades algales, a menudo es necesario tomar réplicas en tres puntos distintos del tramo (de tres a cinco muestras por cada punto), ubicados en zonas con similar velocidad de la corriente, y separados entre sí por unos 50-150 m. Se recolectan muestras de sustratos naturales (rocas, cantos rodados o sedimentos finos) en tres puntos a lo largo de un transecto longitudinal. Los puntos de muestreo deben ubicarse en la parte central del cauce o, si no es posible, cerca de los márgenes, pero

asegurando siempre que el sustrato esté permanentemente sumergido. Es conveniente realizar una caracterización visual del área muestreada, reconociendo la presencia de macroalgas (como *Spirogyra*, *Batrachospermum*, etc.) y de biofilms de microalgas con distinta coloración para asegurar un muestreo representativo.

Para el muestreo de algas sobre *sustratos duros* de grandes dimensiones se obtienen las muestras de la superficie disponible más cercana. Cuando el material disponible es de cantos rodados o rocas de mediana dimensión, en cada punto de muestreo se recogen al azar rocas o cantos rodados de tamaño semejante. De cada roca se recolecta el material en una superficie definida, utilizando para ello una plantilla de superficie interna de 1 cm², y anotándose la superficie total muestreada. Para la remoción del material se emplean cepillos de dientes o bien navajas para el caso de material incrustante. Para lavar estos utensilios se emplea agua destilada, asegurándose que queden limpios antes de ser reutilizados en el próximo sitio a muestrear. El material colectado en cada muestra se introduce en un vial con unos 50 mL de agua del río, preferentemente filtrada para evitar la presencia de organismos planctónicos. Posteriormente se etiqueta la muestra; para su conservación se puede utilizar formol a concentración final del 4%.

Para el muestreo de *sustratos blandos* con predominio de limos y arcillas es aconsejable utilizar una pipeta de 10 mL a la cual se le secciona la parte inferior, colocando en el extremo contrario un aspirador manual (fig. 12.1). En la parte inferior se le acopla un adaptador de goma o plástico que permita apoyar en la superficie de los sedimentos, y así asegurar que se aspire la capa superficial (primeros 5-10 mm), que es la fotosintéticamente activa. En cada sitio de muestreo se recogen al menos 5 unidades muestrales de 1 cm² de superficie de los sedimentos.

Las algas sobre sustrato duro se muestrean por raspado



Figura 12.1:
Detalle del aspirador
de sedimentos finos

Figura 12.2:
Acondicionamiento de tallos
de macrófitos emergentes



Las algas sobre sustrato
blando se recogen de la
capa superficial

En el caso de sedimentos con predominio de arena se puede emplear un corer de metacrilato que permita la extracción de los primeros milímetros, o bien una jeringa a la cual se le seccione la parte inferior y se mantiene el émbolo del lado contrario para facilitar la extracción del material.

Si dominan *macrófitos* o *macroalgas* sumergidas en el tramo, es posible muestrear la planta entera (si es pequeña), o bien cortar una parte utilizando un cuchillo o tijera. Se debe guardar la planta o una parte de ella en una bolsa de plástico con cierre hermético (fig. 12.2). Recolectar cinco réplicas, evitando las partes sumergidas de las hojas flotantes (por ejemplo, nenúfares) que no reciban luz directa. Si dominan los macrófitos emergidos, las muestras se obtienen de porciones permanentemente sumergidas, seccionándolos a partir de 2 cm de la superficie del sedimento, para así evitar que se contaminen con éstos.

Para medidas cuantitativas debe secarse el macrófito o calcularse su superficie para referir el número de organismos encontrados en una unidad de biomasa o de superficie. Para uniformizar el muestreo se recomienda muestrear siempre las mismas especies de macrófitos o, en su defecto, especies de fisonomía similar.

Muestreo sobre sustratos artificiales

Los sustratos artificiales
son una buena
alternativa al muestreo
de sustratos naturales

Si la obtención de materiales de sustratos naturales resulta inviable, se pueden disponer sustratos artificiales que imiten los naturales más abundantes. Entre ellos se cuentan cristales esmerilados, cerámicos, arenas artificiales o plantas acuáticas artificiales. Se debe, en todo caso, probar la eficacia de estos materiales antes de usarlos rutinariamente, para verificar que realmente sean colonizados

por algas, y que su composición se parezca a la hallada sobre sustrato natural. Cuando se utilizan pegamentos o adhesivos se debe tener especial precaución en que no posean sustancias tóxicas. Dado que los sustratos artificiales suelen ser más homogéneos que los naturales, se puede reducir el número de réplicas, siendo tres el número más adecuado.

Observación y conteo

Para observar, identificar y contar las algas de la muestra se procede de diferente forma según se trate de diatomeas (técnica 29) o de no diatomeas. En este último caso se coloca una alícuota de muestra entre un portaobjetos y un cubreobjetos, observándolos con una magnificación adecuada y empleando distintos tipos de iluminación para observar mejor las estructuras (contraste interferencial, de fases, campo oscuro, etc.). También se pueden emplear tinciones distintas, según el grupo algal, para así facilitar la identificación (presencia de vainas, mucílago, almidón, etc.). Asimismo, es posible elaborar preparados semipermanentes sellando el portaobjeto y cubreobjeto con esmalte para uñas, lo que permitirá observar las muestras más tarde.

Para el conteo de las algas se pueden emplear cámaras (Palmer-Maloney o Sedgewick-Rafter). El uso de estos utensilios depende de las características del material; si predominan las formas filamentosas se recomienda la Sedgewick-Rafter. Se coloca una parte alícuota de la muestra previamente homogeneizada en la cámara de recuento. Una densidad de entre 10 y 20 células por campo resulta apropiada para el conteo, en caso contrario hay que diluir la muestra para facilitar la observación. Se deben identificar y contar 300-400 células. En el caso de formas filamentosas, se puede asumir una porción determinada, por ejemplo una longitud de 10 μm , como el equivalente a una célula; en ese caso, debe indicarse en el recuento final. Cuando se trata de algas muy pequeñas, se recomienda colocar un volumen reducido de muestra sobre un cubreobjetos y realizar el conteo a una magnificación de 1000X.

Hay que identificar y contar un mínimo de 300 células al microscopio

Para calcular la densidad de algas halladas en la cámara de recuento se debe tener en cuenta la cantidad de campos observados al microscopio y el volumen de muestra contenida en cada uno de ellos. Para el cálculo de este último se requiere conocer la profundidad de la cámara de recuento utilizada y la superficie del campo, que se calcula a partir del radio. Para el cálculo de la densidad se emplea la siguiente fórmula:

$$D_{spx} = \frac{N_{spx} \cdot V_t}{V_c \cdot A} \quad (12.1)$$

donde D_{spx} : densidad de la especie x (células por unidad de superficie o volumen), N_{spx} : número de células de la especie x , V_t : volumen total de la muestra (mL), V_c : volumen de los campos contados (mL), y A : área de sustrato muestreado (cm^2).

Una alternativa al método anterior consiste en utilizar una micropipeta de 50 μL para obtener una parte alícuota de muestra, que puede montarse directamente entre porta y cubreobjetos. Este último método subestima las algas de mayor tamaño, por lo que hay que observar numerosas partes alícuotas de la muestra para que el conteo realizado sea representativo.

Técnica 29. Tratamiento y análisis de diatomeas

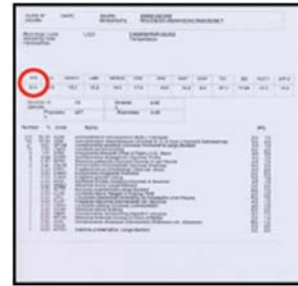
Las diatomeas se clasifican en función de su frústulo silíceo, lo que sólo puede hacerse tras eliminar la materia orgánica incluida en sus células

Se describe el tratamiento de muestras de diatomeas para eliminar la materia orgánica, y su posterior montaje en resina para su observación al microscopio. En la bibliografía del final del capítulo pueden encontrarse más detalles de los procedimientos y protocolos, así como las principales floras recomendadas.

MATERIAL

- Viales de cristal o plástico.
- Espátula, cuchillo o cepillo dental.
- Formaldehído al 40%.
- Reactivos de limpieza de diatomeas: HCl diluido; H_2O_2 al 30% (100 volúmenes).

Figura 12.3:
Secuencia de análisis en el estudio de diatomeas, desde el campo hasta la elaboración del inventario



- Otros reactivos de limpieza de diatomeas: H_2SO_4 concentrado; KMnO_4 en cristales.
- Campana de extracción de gases adecuada para ácidos.
- Cubreobjetos y portaobjetos.
- Resina artificial de alto índice de refracción (Naphrax, Hyrax o similar).
- Microscopio de investigación con objetivo de inmersión de alta apertura numérica.

LIMPIEZA DE LAS DIATOMEAS

Para una identificación adecuada de las diatomeas es necesario eliminar todo el contenido de materia orgánica celular o extracelular. Esto puede realizarse exponiendo la muestra a agentes oxidantes fuertes. En aguas ricas en carbonato cálcico se recomienda eliminar previamente los carbonatos con HCl diluido. Para limpiar los frústulos de las diatomeas se debe tratar la muestra con reactivos que permitan la digestión de la materia orgánica. Aunque hay diversas posibilidades, se recomienda digerir la materia orgánica mediante solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% (100 volúmenes). En caso de materia orgánica difícilmente digerible, como filamentosas, se puede optar por una digestión más enérgica mediante ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y permanganato potásico (KMnO_4) en cristales, añadiendo peróxido de hidrógeno como catalizador.

En los dos casos hay que limpiar los restos de reactivo mediante lavados sucesivos con agua destilada o desionizada. Los lavados pueden realizarse mediante filtros (0,4 μm de poro) o mediante centrifugación suave.

MONTAJE DE PREPARACIONES PERMANENTES DE DIATOMEAS

Una vez digerido el material, se coloca en un vial limpio con un volumen conocido de agua destilada. Se agita el vial y, con una pipeta Pasteur, se deposita el material en un cubreobjetos. Una vez evaporado el líquido, se procede al montaje con resina. Se requiere de un medio de montaje con un índice de refracción superior a 1,6 (recomendado el Naphrax).

Es conveniente realizar montajes permanentes de diatomeas

CONTEO E IDENTIFICACIÓN DE DIATOMEAS

Hay que contar de 300 a 500 individuos, incluyendo todas las especies previamente identificadas. El conteo se realiza al microscopio de luz directa o con uno que esté provisto de contraste interferencial o de fases. En el análisis de rutina es aconsejable referirse a los individuos como valvas, y no como frústulos completos, ya que, a menudo, es difícil encontrar los organismos intactos con las dos valvas.

Las observaciones se hacen siempre con una magnificación de 1000X, usando aceite de inmersión y objetivos de gran apertura numérica.

Para el conteo de las valvas se recomienda efectuar transectos a lo largo del cubreobjeto con un desplazamiento horizontal o vertical, contando cada diatomea que quede incluida en el campo. La identificación de especies requiere el uso de monografías especializadas (cuadro 12.1).

Técnica 30. Fitoplancton

En ríos de bajo gradiente el fitoplancton puede alcanzar un buen desarrollo, resultando importante su estudio. A continuación se describe cómo deben ser colectadas y acondicionadas las muestras de fitoplancton para su observación.

MATERIAL

- Botellas de plástico de 100 mL de volumen.
- Ioduro de potasio con ácido acético o acetato de sodio al 70% (Lugol).
- Red de pesca de fitoplancton (Nytal o similar), de 25-30 μm de diámetro de poro.
- Columnas y cámaras de sedimentación de Utermöhl.

PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Para los estudios cuantitativos se extraen muestras por triplicado en el centro del cauce, sumergiendo una botella en los primeros centímetros de la columna de agua. Se recomienda que las muestras tengan un volumen de unos 100 mL de agua. La recolección debe evitar resuspender material del fondo. En caso de tratarse de ríos anchos y profundos se pueden extraer muestras del centro y de las márgenes y a distintas profundidades. Las muestras son fijadas con dos o tres gotas de Lugol y almacenadas en la oscuridad.

Para extraer muestras cualitativas se emplean redes de plancton con apertura de poro inferior a 35 μm .

Observación y conteo

Para la identificación taxonómica detallada se recurre a muestras cualitativas, ya que las especies raras sólo aparecen de forma esporádica en las muestras cuantitativas. Para las diatomeas se puede emplear la técnica 29 y para las no diatomeas la técnica 28.

Se puede muestrear el fitoplancton de forma cuantitativa mediante botellas, o de forma cualitativa con el uso de redes

Anagnostidis y Komárek 1985
Anagnostidis y Komárek 1988
Anagnostidis y Komárek 1990
Bicudo y Picudo 1970
Coesel 1987
Comas 1989a
Comas 1989b
Comas 1990
Comas 1992
Comas 1996
Croasdale et al. 1983
Geitler 1932
Hegewald et al. 1980
Iltis 1984
Komárek y Anagnostidis 1986
Komárek y Anagnostidis 1989
Komárek y Anagnostidis 1999
Komárek y Anagnostidis 2005
Krammer 2002
Krammer y Lange-Bertalot 1986, 1991
Krieger y Bourrelly 1956
Lange-Bertalot 1993, 2001
Parra et al. 1982a
Parra et al. 1982b
Parra et al. 1982c
Parra et al. 1982d
Rivera et al. 1982
Steinitz-Kankan et al. 1982
Tell y Conforti 1986
Therezien 1985
Whitton, 2002
Yacubson 1980

Cuadro 12.1:

Segundas referencias bibliográficas de utilidad para identificar las algas de ambientes fluviales

Las muestras de fitoplancton se disponen en cámaras tubulares de sedimentación que son observadas en un microscopio invertido. La elección del volumen de la cámara de sedimentación depende de la concentración de fitoplancton en la muestra. Si hay más de 10 000 cel/mL las cámaras poco profundas (< 5 mL) pueden ser adecuadas. En caso contrario, se recomienda utilizar cámaras de sedimentación mayores. El tiempo de sedimentación requerido se calcula considerando que es necesario decantar 2 horas por cada cm de altura que tenga la cámara. La cantidad de campos que se debe contar depende de la frecuencia de las especies presentes en la muestra; es recomendable que se contabilicen al menos 100 individuos de la especie más frecuente. Los datos se expresan en cel/mL, de acuerdo con la ecuación 12.2. En el caso de especies filamentosas en las cuales las células sean de difícil observación, se puede asumir que la unidad corresponda a una porción determinada del filamento equivalente a una célula,

Las muestras de botella se concentran por sedimentación

por ejemplo, 10 μm . La magnificación de observación recomendable es de 400X o superior. La densidad algal de calcula mediante la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ cel}/\text{mL} = CA_t / A_c T_c V \quad (12.2)$$

donde C : número de organismos contados, A_t : área total de la cámara de sedimentación (mm^2), A_c : área de un campo (mm^2), T_c : número total de campos contados, y V : volumen de muestra sedimentado (mL).

Para la determinación de fitoplancton se usa una gran variedad de manuales y monografías (cuadro 12.1).

Técnica 31. Recolección y análisis de cianobacterias

En determinados ríos las cianobacterias forman colonias macroscópicas (fig. 12.4a) o tapetes, pero normalmente aparecen como parte de los biofilms sobre piedras o sedimentos (fig. 12.4b).

MATERIAL

- Viales de cristal o plástico.
- Espátula, cuchillo o cepillo dental.
- Formaldehído al 40%.
- Medios de cultivo (descritos en el texto).
- Campana de gases que permita condiciones de esterilidad.
- Autoclave.
- Placas de Petri.
- Parafilm.
- Cámara Neubauer.
- Microscopio de investigación con contraste de fases o epifluorescencia.

Figura 12.4:
Colonias de cianobacterias
(a) o cianobacterias
formando parte de un
biofilm mixto (b)



PROCEDIMIENTO

Para muestrear cianobacterias del biofilm, se recogen al menos tres piedras del lecho del río por punto de muestreo. Éstas deben estar sumergidas, tener un cierto tapiz homogéneo en la cara superior, y ser de tamaño suficiente como para poder realizar el raspado del biofilm (de entre 4 y 5 cm de diámetro mínimo). Además, es necesario que el sustrato componente admita la extracción del tapiz sin romperse, y que sea representativo de la zona. Seleccionar una parte uniforme de

Las cianobacterias se muestrean por raspado del sustrato

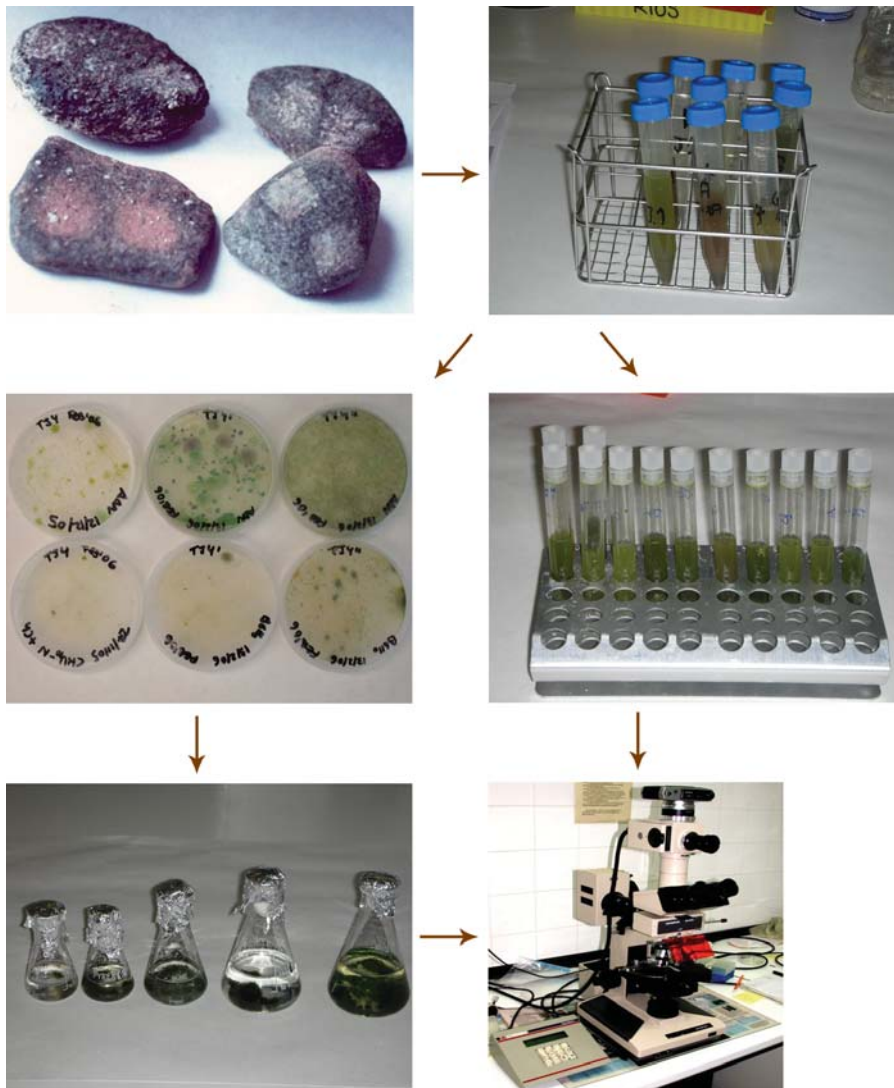


Figura 12.5: Secuencia recomendable en el análisis de cianobacterias desde su recolección hasta su identificación

la superficie rocosa, que permita un raspado fácil (4-16 cm²). Con un cepillo de cerdas no muy duras se raspa la superficie elegida. Todo el material utilizado debe ser previamente lavado con etanol para eliminar contaminaciones, y aclarado después con abundante agua destilada. El material extraído se resuspende en 5-10 mL de agua del río o de medio de cultivo para cianobacterias, si se quieren aislar las mismas según se especifica más adelante.

Para la posterior observación al microscopio, se separa una alícuota y se fija con formol a una concentración final del 4% (fig. 12.5).

CULTIVOS DE CIANOBACTERIAS

Algunos grupos de cianobacterias se deben cultivar para poder ser identificados

Los cultivos de cianobacterias son necesarios para ciertos grupos de taxonomía problemática, cuya identificación depende de conocer el ciclo vital, o para la observación de características morfológicas específicas, que se pueden propiciar en medios artificiales.

Composición de los medios de cultivo

Se pueden encontrar muchas recetas de medios de cultivos para el crecimiento y mantenimiento de cianobacterias en laboratorio. La elección de un medio de cultivo determinado depende de los objetivos planteados. En el caso que se trate de identificar las cianobacterias de un hábitat determinado, se cultivan en un medio de características semejantes a las encontradas en el río estudiado. Así, para cia-

Cuadro 12.2:
Composición del medio de cultivo Chu No.10 D modificado

Componentes	Concentración
KH ₂ PO ₄	0,032 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,101 mM
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O*	0,250 mM
NaHCO ₃	0,188 mM
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,009 mM
Na ₂ -EDTA	0,010 mM
Microelementos	
H ₃ BO ₃	11,560 μM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,229 μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,193 μM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,028 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079 μM
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,037 μM

* Para medio sin nitrógeno, se reemplaza este componente por CaCl₂·2H₂O a una concentración de 0,25 mM.

Componentes	Concentración
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,180 mM
Na_2 -EDTA	0,003 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,300 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,250 mM
$NaNO_3^*$	17,650 mM
Ácido cítrico	0,029 mM
Citrato férrico amónico	0,020 mM
Na_2CO_3	0,190 mM
Microelementos	
H_3BO_3	46,00 μ M
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	9,10 μ M
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,77 μ M
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1,60 μ M
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,32 μ M
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0,17 μ M

Cuadro 12.3:
Composición del medio
de cultivo BG11

* Para el medio BG11₀ (sin nitrógeno), se desestima este componente.

nobacterias de ecosistemas fluviales hay que tener en cuenta, sobre todo, la concentración de nutrientes.

El *medio Chu No. 10 D modificado* (Chu 1942) es bajo en nutrientes, muy útil para dilucidar los rasgos morfológicos, citológicos y fisiológicos característicos de ciertas poblaciones que viven en medios oligotróficos (por ejemplo, *Rivulariaceae*). Además, si no se le añade fuente alguna de nitrógeno, se consigue el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. Su composición en sales se muestra en el cuadro 12.2. El medio se tampona con HEPES [ácido 4-(2 hidroxietil)-1-piperacilil-etanosulfónico] a una concentración 2,5 mM y se ajusta el pH a 7,8.

El *medio BG11* (Rippka et al. 1979) utiliza concentraciones de nitrato muy altas y concentraciones de fósforo relativamente altas, salvo en el caso del BG11₀ (medio sin nitrógeno), donde no se añade fuente alguna de nitrógeno, potenciando así el crecimiento de las cianobacterias fijadoras. La composición y concentración de sales se muestran en el cuadro 12.3. El medio se tampona con HEPES a una concentración 2,5 mM y se ajusta el pH a 7,8.

En función de los
objetivos se pueden usar
distintos medios de
cultivo de cianobacterias

El *medio de Allen y Arnon* (Allen y Arnon 1955) contiene altas concentraciones de nitratos y muy altas de fósforo. Este medio se ha diseñado para conseguir altos crecimientos celulares. La composición y concentración de sales se muestran en el cuadro 12.4.

Cuadro 12.4:
Composición del medio de cultivo de Allen y Arnon

Componentes	Concentración
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2,00 mM
NaCl	4,00 mM
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,00 mM
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,50 mM
Na ₂ -EDTA	76,75 μM
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	69,16 μM
NaNO ₃ *	6,25 mM
KNO ₃ *	6,25 mM
Microelementos	
H ₃ BO ₃	46,000 μM
MoO ₃	1,250 μM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,100 μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,770 μM
NH ₄ VO ₃	0,196 μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,320 μM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,170 μM

* En el caso del medio sin nitrógeno, se desestiman estos componentes.

Los medios se preparan en condiciones de esterilidad, a partir de reactivos de alta pureza, agua destilada y material previamente esterilizado. Para cada uno de los medios, se puede añadir además el antibiótico cicloheximida con una concentración final en el medio de 0,1 g/L. Se trata de un antibiótico que afecta a células eucariotas, impidiendo así el crecimiento de hongos, levaduras y algas verdes, lo que facilita el crecimiento de las cianobacterias, haciéndolas más competitivas. La preparación de la cicloheximida requiere usar guantes y mascarilla, puesto que es nocivo para el ser humano. Se esteriliza utilizando filtros estériles de 0,2 μm de diámetro de poro. La cicloheximida se deteriora fácilmente a altas temperaturas, por lo que se añade al medio una vez que está frío tras autoclararlo.

Preparación de medios de cultivo con agar en placas de Petri

Para poder aislar las cianobacterias y estudiar sus características con fines taxonómicos, es necesario sembrar el material extraído del biofilm en placas de Petri con medio de cultivo agarizado, que sirve a las cianobacterias de sustrato sobre el que crecer. Para ello, se utiliza medio de cultivo líquido y se combina con agar purificado (1,5% concentración final), con el fin de que adquiera un estado sólido.

Para la preparación de medios sólidos se ha de evitar esterilizar el medio de cultivo *BG11* con el agar, ya que se producen compuestos tóxicos. Para otros medios

quizá no sea el caso, pero sería aconsejable esterilizar el medio de cultivo y el agar en soluciones separadas al doble de su concentración, y mezclarlas sólo después de enfriar alrededor de 45 °C.

Siembra en placas de Petri

Debe sembrarse en un medio de cultivo y en condiciones lo más parecidas al medio natural, o favorecer el crecimiento con unas condiciones más idóneas, para así obtener una mayor efectividad en el aislamiento. Cuantas más variaciones se realicen más probable será obtener un mayor número de especies. Así, se recomienda sembrar en distintos medios de cultivo. El procedimiento se describe a continuación:

1. Agitar bien la muestra del material recolectado y tomar 0,3 mL que se añaden en la placa de Petri con el medio de cultivo agarizado.
2. Extender con un asa de siembra de vidrio de manera uniforme por toda la superficie de la placa.
3. Una vez completada la siembra, tapar cada placa, sellándola con parafilm y dejarlas boca arriba un día hasta que no haya líquido sobre las placas. Posteriormente, darles la vuelta y dejar crecer las cianobacterias sembradas. Los regímenes de temperatura y luz deben acercarse a las condiciones de su hábitat natural. Si no se dispone de un incubador se dejan a temperatura ambiente, en el laboratorio.
4. Dejar crecer durante 30-40 días. Realizar un seguimiento para que las colonias no lleguen a solaparse.

La siembra y la preparación de los medios de cultivos han de realizarse en campanas estériles de flujo continuo de aire. Si no se dispone de este material, deben realizarse cerca de la llama de un mechero para evitar contaminaciones por bacterias o por eucariotas.

Aislamiento de cianobacterias

Una vez transcurrido el período de incubación, observar en las placas, mediante la lupa binocular, las diferentes colonias que han crecido. Seleccionar y tomar muestras de las mismas con un capilar muy fino, fabricado estirando el extremo de una pipeta Pasteur bajo la llama de un mechero Bunsen. La muestra se coloca en un portaobjetos, se añade una gota de agua y el cubreobjetos, y se observa al microscopio. Una vez observada la colonia y la estirpe de cianobacteria, se repite la operación, sembrando el pequeño inóculo obtenido en otra placa de Petri con el mismo medio de cultivo. Se coloca en el incubador y se deja crecer. Una vez la estirpe crece bien en medio agarizado, se siembran esas colonias en medio de cultivo líquido, del que se podrán tomar después muestras para estudiar sus características taxonómicas.

Las cianobacterias se identifican al microscopio de contraste de fases o de epifluorescencia

Observación y recuento de las muestras fijadas

El análisis cuantitativo se realiza observando al microscopio las muestras fijadas con formol. Se toma una alícuota de la muestra previamente homogeneizada y se monta en una cámara Neubauer. Se cuentan de 300 a 500 células de las especies previamente identificadas, utilizando una magnificación 1000X y, si es necesario, contraste de fases. Es posible también emplear un microscopio con lámpara de epifluorescencia para facilitar el recuento. La autofluorescencia diferencial de las ficobiliproteínas (al excitarse con luz verde) permite visualizar y contar fácilmente las cianobacterias presentes. El recuento de cada muestra se realiza por duplicado.

Técnica 32. Pigmentos fotosintéticos

La estima de pigmentos fotosintéticos puede llevarse a cabo mediante espectrofotometría (técnica que se detalla a continuación) y por cromatografía. La técnica más común en este segundo caso es la *cromatografía líquida de alta presión* (HPLC). Ésta requiere un equipo adecuado (véase técnica 23) y patrones que permitan la identificación de cada uno de los pigmentos que aparecen en los cromatogramas. Su exactitud y precisión (permite la correcta identificación de los productos de degradación de las clorofilas y los distintos carotenoides) hacen aconsejable las medidas con HPLC cuando se requiera distinguir los pigmentos. Se recomienda al potencial interesado que consulte las obras de Zapata et al. (1987, Millie et al. (1993), y de Schmid y Stich (1995).

Técnica 32a. Pigmentos fotosintéticos por espectrofotometría

La clorofila *a* se utiliza como indicador de la biomasa algal

El análisis de clorofila permite estimar la cantidad de pigmentos fotosintéticos (que se estima como parte mayoritaria de la clorofila *a*). A la vez, este cálculo es representativo de la biomasa de los productores primarios (algas). Dadas las características diferenciales de los compartimentos planctónico y bentónico, la metodología debe ser distinta, aunque el material y los procedimientos son comunes en muchos de los pasos.

MATERIAL

La macro 12.1 permite calcular el contenido en clorofila de muestras tanto planctónicas como bentónicas

- Cubo de plástico (2-5 L) para recoger agua del río para clorofilas planctónicas.
- Jeringuilla de 60 mL y portafiltras Millipore (Swinnex-47).
- Papel de aluminio.
- Botes de plástico para recoger las muestras bentónicas.
- Cuadrado de superficie interna de 1 cm² que permita definir un área de muestreo sobre sustratos sólidos.

- Pinzas de plástico.
- Filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F).
- Baño de ultrasonidos.
- Pipetas automáticas.
- Acetona al 90%.
- Medidor de luz en el campo y en el laboratorio.
- Espectrofotómetro de doble haz.
- Cubetas de cuarzo de 1 y 5 cm.
- Nevera portátil.

ANÁLISIS DE CLOROFILAS BENTÓNICAS

Recolección de las muestras

Recolectar muestras de los sustratos naturales (piedras, rocas) en tres puntos distintos del río no afectados por las condiciones litorales, y separados entre ellos unos 50-150 m. Si no hay piedras o es imposible recogerlas, obtener las muestras de la superficie disponible más cercana. En cada punto se recogen al azar cinco sustratos sólidos de tamaño semejante. De cada uno se recolecta el material en una superficie definida, utilizando para ello un cuadrado de superficie interna de 1 cm². Hay que recoger el material suficiente que permita obtener una medida correcta de clorofila. Debemos anotar el número de veces que se ha recogido material mediante el cuadrado. Anotar también la presencia de herbívoros en las muestras recogidas.

Etiquetar las muestras y guardarlas en viales de plástico en frío (nevera) y en la oscuridad (recubierto con hoja de aluminio) hasta su análisis en el laboratorio. Una vez en el laboratorio, congelar la muestra hasta el análisis, a ser posible a -20 °C.

Para muestrear sustratos blandos y epifiton seguir la técnica 28. Los sedimentos son sonicados durante 2 minutos para facilitar el desprendimiento de los especímenes adheridos a los mismos, repitiendo este procedimiento por lo menos tres veces. El sobrenadante es filtrado por un filtro Whatman GF/F.

En el caso del epifiton colocar la macrófita en agua destilada y sonicarla tres veces durante 2 minutos. Filtrar el líquido con material epifítico mediante un filtro Whatman GF/F.

Extracción de la clorofila

Describimos a continuación un procedimiento de extracción y lectura de pigmentos clorofilicos sin corrección por feopigmentos. Existen otros métodos (acidificación del extracto; Lorenzen 1967) que incluyen esta corrección, aunque su baja fiabilidad en muestras naturales desaconseja su uso. Debe aclararse que la estima con acidificación es aproximativa y, de buscarse una estima más exacta de la

Las muestras para pigmentos fotosintéticos se extraen igual que las de comunidades

La técnica espectrofotométrica que incluye corrección para feopigmentos es poco fiable

representación de los pigmentos derivados de la clorofila, es preciso usar cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El procedimiento a seguir comprende los pasos siguientes:

1. Añadir de 5 a 10 mL de acetona al 90% en cada vial hasta cubrir totalmente la muestra.
2. Guardar la muestra y el extracto en la nevera de 8 a 12 horas. El disolvente orgánico extraerá la clorofila de las muestras.
3. Someter las muestras a un baño de ultrasonidos durante 2 minutos.
4. Efectuar una segunda adición de 5 mL de acetona al 90% y homogenizar la muestra mecánicamente hasta la total extracción de la clorofila.
5. Filtrar los extractos (Whatman GF/C) para disminuir la turbidez.
6. Leer las absorbancias a 665 y 750 nm, mediante un espectrofotómetro. La clorofila *a* absorbe principalmente a los 665 nm. El valor en 750 nm se utiliza para descontar la turbidez de la muestra, que no debería ser mayor a 0,015. El valor de la absorbancia a 430 indica concentración de carotenoides y otros pigmentos accesorios.
7. Estimar las concentraciones de clorofila mediante la expresión empírica siguiente:

$$Chl\ a = 11,4(A_{665} - A_{750})V / (LS) \quad (12.3)$$

donde *Chl a*: clorofila *a* (mg/m³), *A_x*: absorbancia a *x* nm, *V*: volumen del extracto (mL), *L*: longitud de la cubeta del espectrofotómetro (cm), y *S*: superficie de sustrato muestreado (cm²).

ANÁLISIS DE CLOROFILA PLANCTÓNICA

El compartimento planctónico corresponde al asociado a la columna del agua. Por tanto, previo a su análisis, debe ser filtrado o sedimentado.

Recolección de muestras

Recoger 2-5 litros de agua, en dos puntos distintos del río, distantes entre ellos 50-150 m, siempre en la zona de agua libre y, si es el caso, en coincidencia con las muestras de fitoplancton que se recojan. Filtrar el agua recogida en el campo, con una jeringuilla de 60 mL, un portafiltros Millipore (Swinnex-47) y filtros Whatman GF/F. Guardar los filtros en viales, en frío (4 °C) y en la oscuridad hasta su análisis.

Extracción y análisis de las muestras en el laboratorio

1. Poner 10 mL de acetona al 90% en los viales hasta cubrir bien el filtro.
2. Guardar las muestras en la nevera de 8 a 12 horas. El disolvente orgánico extraerá la clorofila de las muestras.

3. Someter las muestras a ultrasonidos durante 2 minutos.
4. Añadir 10 mL de acetona al 90%, y disponer el filtro en un homogenizador hasta su total desintegración.
5. Filtrar las muestras (Whatman GF/F) para disminuir la turbidez de la misma.
6. Leer las absorbancias a 630, 645, 665 y 750 nm, mediante un espectrofotómetro. La cubeta del espectrofotómetro suele ser de 1 o 5 cm de anchura; este dato es relevante y debe incorporarse a la ecuación.
7. Estimar las concentraciones de clorofila mediante la siguiente ecuación:

$$Chl\ a\ (\mu\text{g/L}) = \left[11,6(A_{665} - A_{750}) - 1,31(A_{645} - A_{750}) - 0,14(A_{630} - A_{750}) \right] V_e / (V_f L) \quad (12.4)$$

donde *Chl a*: clorofila *a* ($\mu\text{g/L}$), A_x : absorbancia a x nm, V_e : volumen del extracto (L), V_f : volumen filtrado (L), y L : longitud de la cubeta (cm).

La clorofila se mide con el espectrofotómetro

ANÁLISIS DE FICOBILIPROTEÍNAS BENTÓNICAS

Extracción y cuantificación

Se pueden llevar a cabo dos métodos distintos. Uno de ellos, basado en la extracción con tolueno, mide la ficocianina como pigmento mayoritario de las ficobiliproteínas. Este método es más rápido y sencillo, pero el tolueno es un disolvente orgánico tóxico, por lo que debe manipularse siempre con guantes y en campana extractora. Por este motivo, explicamos un segundo protocolo de extracción y cuantificación de ficobiliproteínas basado en el glicerol.

El método del tolueno es sencillo aunque debe operarse con cuidado

A. Extracción con tolueno

1. Tomar una parte alícuota de 2 mL del material en tubos Eppendorf y añadir 100 μL de tolueno, agitando enérgicamente durante 90 segundos.
2. Mantener en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante 4 horas.
3. Centrifugar los tubos Eppendorf a 14000 rpm durante 10 minutos para sedimentar los restos celulares.
4. Leer la absorbancia del sobrenadante a 620 nm, en una cubeta de 1 cm de anchura.
5. Estimar la concentración de ficocianina mediante la ecuación 12.5 (Blumwald y Tel-Or 1982):

$$PC = 135A_{620} \quad (12.5)$$

donde *PC*: concentración de ficocianina *c* ($\mu\text{g/mL}$), y A_{620} : absorbancia a 620 nm.

B. Extracción con glicerol

1. Tomar una alícuota de 1 mL de la muestra y centrifugar a 6-7 °C, 10000 rpm durante 10 minutos.

2. Descartar el sobrenadante, observando que el precipitado quede seco, y añadir 100 μL de glicerol.
3. Con ayuda de un homogenizador para tubos Eppendorf, homogeneizar la mezcla, sometiéndola posteriormente a un baño de ultrasonidos durante 3 minutos.
4. Transcurrido este tiempo, dejar reposar a 4 $^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad durante un mínimo de 1 hora.
5. Someter las muestras a choque osmótico añadiendo 900 μL de agua destilada.
6. Volver a sonicar las muestras durante 1 minuto.
7. Centrifugar nuevamente a 6-7 $^{\circ}\text{C}$, 10000 rpm durante 10 minutos.
8. Analizar en el espectrofotómetro el sobrenadante, midiendo a 750, 652, 615 y 562 nm, mediante cubetas de 1 cm de anchura.

Para asegurar la extracción del total de ficobiliproteínas, al precipitado se le realizan extracciones sucesivas hasta que no tenga coloración verde azulada.

Calcular la concentración de ficobiliproteínas mediante la fórmula tricromática de Bennett y Bogorad (1973) (ecuaciones 12.6 a 12.8).

$$PC = (A_{615} - 0,474 A_{652}) / 5,34 \quad (12.6)$$

$$APC = (A_{652} - 0,208 A_{615}) / 5,09 \quad (12.7)$$

$$PE = [A_{562} - (2,41 PC) - (0,849 APC)] / 9,62 \quad (12.8)$$

donde PC : concentración de ficocianina c ($\mu\text{g}/\text{mL}$), APC : concentración de aloficocianina a ($\mu\text{g}/\text{mL}$), PE : concentración de ficoeritrina r ($\mu\text{g}/\text{mL}$), A_{615} : absorbancia a 615 nm, A_{652} : absorbancia a 652 nm, y A_{562} : absorbancia a 562 nm.

Técnica 32b. Estima de la eficiencia fotosintética y de la biomasa algal mediante fluorimetría

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas basadas en la fluorimetría. Este es un método alternativo para estudiar la producción primaria y determinar la biomasa algal. Existen *fluorímetros de pulsos de amplitud modulada* (como Phyto-PAM de Walz) que, excitando la clorofila simultáneamente con luz de distintas longitudes de onda (470, 525, 640 y 665 nm), permiten evaluar la biomasa de los distintos grupos algales presentes en una muestra. La precisión de los resultados depende de la complejidad de la muestra estudiada, y de la ca-

libración previa del aparato con patrones específicos, aspectos que no se desarrollarán aquí.

El fluorímetro de pulsos de amplitud moderada (PAM) utiliza tres tipos de luz distintos (*modulada, actínica y de saturación*) que permiten analizar la cinética de inducción de fluorescencia en organismos fotosintetizadores. Combina así la posibilidad de provocar el efecto Kautsky, mediante la realización de pulsos de luz saturante, con la medida de la emisión de fluorescencia (Schreiber 2004, Schreiber et al. 2002). Dicha combinación es posible gracias a un sistema selectivo de amplificación de los pulsos, con los que se registra sólo la fluorescencia generada por los pulsos de luz de medida.

El fluorímetro de pulsos de amplitud modulada permite determinar el contenido de pigmentos de forma no intrusiva

El uso del PAM permite estudiar varios parámetros relacionados con la fotosíntesis. Entre ellos, el *rendimiento fotónico efectivo*, Φ'_{PSII} , también llamado *eficiencia fotoquímica del PSII por fotón absorbido*, que ha sido utilizado para calcular la producción primaria. Este parámetro proporciona una estima de la eficiencia en el transporte de electrones en el aparato fotosintético. La *tasa total de transporte de electrones* (ETR) se obtiene multiplicando el rendimiento fotónico efectivo por el número de fotones absorbidos, y debería guardar una relación de proporcionalidad con la tasa de fijación de carbono. Dicha proporcionalidad se mantiene en condiciones de luz próximas a la saturación, pero pierde linealidad a irradiancias elevadas. En estas circunstancias se obtienen valores crecientes de tasa de transporte de electrones que no siempre corresponden a un incremento similar en la fijación de carbono, hecho que desaconseja la utilización del PAM como sustitutivo de otras estimas de producción primaria.

MATERIAL

- Fluorímetro de pulsos de amplitud modulada.
- Soporte específico de sujeción de la muestra con distancia fija al lector de fluorescencia.

ESTIMA DE LA BIOMASA ALGAL MEDIANTE LA FLUORESCENCIA BASAL (F_0)

Previo calibración del fluorímetro, se estima la biomasa algal sobre la base de los valores de fluorescencia basal (F_0), que es la que emite la clorofila sin excitación por la luz. Esta medida puede ser equivalente a la estima de clorofila, aunque no completamente en biofilms gruesos o en tejidos multicapas.

La fluorescencia basal sirve para estimar la cantidad de clorofila

Procedimiento

1. Fijar los parámetros de medida del aparato.
2. Colocar un soporte que permita mantener constante la distancia entre la muestra y el sensor.

3. Adaptar la muestra a la oscuridad durante un mínimo de 3 minutos.
4. Medir la emisión de fluorescencia a 470 nm para las algas verdes, a 520 nm para las diatomeas y a 645 nm para las cianobacterias.

ESTIMA DE LA EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA SOBRE LA BASE DEL RENDIMIENTO FOTÓNICO EFECTIVO: Φ'_{PSII}

El rendimiento fotónico efectivo permite estimar la eficiencia fotosintética de la comunidad

Para estimar el rendimiento fotónico es esencial controlar la temperatura y medir la luz incidente de forma precisa, dado que ambos parámetros afectan de manera sustancial a la medida realizada. Así pues, las medidas se realizan a 25 °C, en condiciones de saturación de luz, es decir, entre 80 y 350 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (según la historia lumínica de las comunidades que se consideren).

Procedimiento

1. Fijar los parámetros de medida del aparato.
2. Colocar un soporte que permita mantener constante la distancia entre la muestra y el sensor.
3. Aplicar un pulso de saturación sobre una muestra iluminada y obtener el rendimiento fotónico efectivo. Se recomienda realizar un mínimo de tres medidas por muestra y utilizar un mínimo de tres muestras por punto de muestreo.
4. El rendimiento fotónico efectivo se calcula mediante la ecuación 12.9:

$$\Phi'_{PSII} = (Fm' - F) / Fm' \quad (12.9)$$

donde Φ'_{PSII} : rendimiento fotónico efectivo, F : emisión de fluorescencia basal, y Fm' : emisión máxima de fluorescencia provocada por un pulso de luz saturante sobre una muestra iluminada.

12.2. Bibliografía

- ALLEN M.B., y ARNON D.I. «Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm». *Plant Physiology* 30 (1955): 366-372.
- ANAGNOSTIDIS K., y KOMÁREK J. «Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1.Introduction». *Archiv fur Hydrobiologie. Algological Studies* 38-39 (Suppl. 71) (1985): 291-302.
- ANAGNOSTIDIS K., y KOMÁREK J. «Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales». *Archiv fur Hydrobiologie. Algological Studies* 50-53 (Suppl. 80) (1988): 327-472.
- ANAGNOSTIDIS K., y KOMÁREK J. «Modern approach to the classification-system of cyanophytes. 5. Stigonematales». *Archiv fur Hydrobiologie. Algological Studies* 59 (Suppl. 86) (1990): 1-73.
- BENNETT A., y BOGORAD L. «Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga». *Journal of Cell Biology* 58 (1973): 419-435.

- BICUDO C., y PICUDO R.H. *Algas do aguas continentais brasileiras*. Sao Paulo: Fundação Brasileira para o desenvolvimento do ensino do Ciências, 1970.
- BIGGS B.J.F. «Patterns in benthic algae of streams». En R.J. Stevenson, M.L. Bothwell, y R.L. Lowe, eds. *Algal ecology*. San Diego: Academic Press Inc, 1996: 31-56.
- BLUMWALD E., y TEL-OR E. «Osmoregulation and cell composition in salt-adaptation of *Nostoc muscorum*». *Archives of Microbiology* 132 (1982): 168-172.
- CHU S.P. «The influence of the mineral composition of the media on the growth of planktonic algae. Part 1. Methods and culture media». *Journal of Ecology* 30 (1942): 284-325.
- COESEL P.F.M. «Taxonomic notes on Colombian desmids». *Cryptogamie Algologie* 8 (1987): 127-142.
- COMAS A. «Taxonomische übersicht der Zonobialen Chlolorokkalkalgen von Kuba. I. Fam. Hydrodictyaceae». *Algological studies* 55 (1989a): 129-151.
- COMAS A. «Taxonomische übersicht der Zonobialen Chlolorokkalkalgen von Kuba. Ii. Fam. Coelastraceae». *Algological studies* 56 (1989b): 347-364.
- COMAS A. «Taxonomische übersicht der Zonobialen Chlolorokkalkalgen von Kuba. Iii. Fam. Scenedesmaceae». *Algological studies* 61 (1990): 55-94.
- COMAS A. «Taxonomische beitrage zur grunalgenflora (Chrorellales) Kuba». *Algological studies* 65 (1992): 11-21.
- COMAS A. «Las Chlorococcales dulceacuícolas de Cuba». *Bibl Phycol* 99 (1996).
- CROASDALE H.C., BICUDO C.E., y PRESCOTT G.M. *Desmidiaceae: Placodermae, section 5*. Lincoln y Londres: Nebraska Press, 1983.
- DESIKACHARY T.V. *Cyanophyta*. New Delhi: ICAR-Indian Council of Agriculture Research, 1959.
- FIGUEROA F.L., CONDE-ÁLVAREZ R., y GÓMEZ I. «Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions». *Photosynthesis Research* 75 (2003): 259-275.
- GEITLER L. Cyanophyceae. En L. Rabenhorst, ed. *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1932: 1-1196.
- HEGEWALD D.E., SCHNEPT E., y ALDAVE A. «Investigations on the lakes of Perú and their phytoplankton: 5. The algae of laguna Huaypo, Cuacu, with special reference to *Francia*, *Oocystis* and *Scenedesmus*». *Archiv fur Hydrobiologie* 56 (1980): 387-420.
- ILTIS A. «Algues du lac Titicaca et des lacs de la vallée d'Hichu Kkota (Bolivie)». *Cryptogamie Algologie* 5 (1984): 85-108.
- KOMÁREK J., y ANAGNOSTIDIS K. *Cyanoprokaryota. Chroococcales*. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1999.
- KOMÁREK J., y ANAGNOSTIDIS K. «Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 2- Chroococcales». *Archiv fur Hydrobiologie* 46 (Suppl. 73) (1986): 157-226.
- KOMÁREK J., y ANAGNOSTIDIS K. «Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales». *Archiv fur Hydrobiologie. Algological Studies* 36 (Suppl. 82) (1989): 247-345.
- KOMÁREK J., y ANAGNOSTIDIS K. *Cyanoprokaryota: Oscillatoriales*. München: Elsevier, 2005.
- KRAMMER K. *Diatoms of Europe, volume 3: Diatoms of European inland waters and comparable habitats*. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2002.
- KRAMMER K., y LANGE-BERTALOT K. *Bacillariophyceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1986-1991.
- KRIEGER W., y BOURRELLY P. «Desmidiacees des Andes du Venezuela». *Ergebn Deutsch Limnol Venezuela - expedition 1952* 1 (1956): 141-195.
- LANGE-BERTALOT H. *Bibliotheca diatomologica, 85 new taxa und über 100 weitere neu definierte taxa ergänzend zur süßwasserflora von Mitteleuropa*. Stuttgart: J. Cramer, 1993.

- LANGE-BERTALOT H. *Navicula sensu stricto 10. Genera separated from Navicula sensu lato. Frustulia*. Ruggell, Liechtenstein: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2001.
- MILLIE D.F., PAERL H.W., y HURLEY J.P. «Microalgal pigments assessments using high-performance liquid chromatography: A synopsis of organismal and ecological applications». *Can J Fish Aquat Sci* 50 (1993): 2513-2527.
- PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., RIVERA P., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. I. Cyanophyceae*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982a.
- PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., RIVERA P., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. II. Chrysophyceae*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982b.
- PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., RIVERA P., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. III. Cryptophyceae*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982c.
- PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., RIVERA P., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. V. Chlorophyceae. Parte I. Volvocales*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982d.
- RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J.B., HERDMAN M., y STANIER R.Y. «Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria». *Journal of General Microbiology* 111 (1979): 1-61.
- RIVERA P., PARRA O., GONZÁLEZ M., DELLAROSSA V., y ORELLANA M. *Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. IV. Bacillariophyceae*. Santiago: Universidad de Concepción (Chile), 1982d.
- SABATER S. «Diatoms». En G. Likens, y J. Padisak, eds. *Water encyclopedia*, 2008 (en prensa).
- SCHMID H., Y STICH H.B. «HPLC-analysis of algal pigments: Comparison of columns, column properties and eluents». *Journal of Applied Phycology* 7 (1995): 487-494.
- SCHREIBER U. «Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview». *Advances in Photosynthesis and Respiration* 19 (2004): 279-319.
- SCHREIBER U., GADEMANN R., BIRD P., RALPH P.J., LARKUM A.W.D., y KUHL M. «Apparent light requirement for activation of photosynthesis upon rehydration of desiccated beachrock microbial mats». *Journal of Phycology* 38 (2002): 125-134.
- STEINIZ-KANKAN M., NIENABER M., RIEDINGER M., OETTY-HARELL M., y MILLER M. «Estudios limnológicos en la laguna de San Marcos con descripciones de las especies principales de diatomeas». *Publ Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales* 3 (1982): 39-65.
- TELL G., y CONFORTI V. *Euglenophyta pigmentadas de la Argentina. Bibliotheca Phycologica-band 75*. Stuttgart: J. Cramer, 1986.
- THEREZIEN V. «Contribution a l'étude del algues d'eau douce de Bolivia, desmidiales». *Nova Hedwigia* 41 (1985).
- WETZEL R.G. *Limnology: Lake and river ecosystems*. San Diego: Academic Press, 2001.
- WHITTON B.A. «Phylum Cyanophyta». En D.M. John, B.A. Whitton, y A.J. Brook, ed. *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 25-122.
- YACUBSON S. «The phytoplankton of some freshwater bodies from Zulia state (Venezuela)». *Nova Hedwigia* 33 (1980): 279-339.
- ZAPATA M., AYALA A.M., FRANCO J.M., y GARRIDO J.L. «Separation of chlorophylls and their degradation products in marine phytoplankton by reversed-phase high-performance liquid chromatography». *Chromatographia* 23 (1987): 26-30.