

*Algas verdes en el picoplancton
y nanoplancton del estuario del río Nervión
(Golfo de Vizcaya)*

eman'la zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Aitor Alonso González 2011



**AUTORIZACION DEL/LA DIRECTOR/A DE TESIS
PARA SU PRESENTACION**

Dr/a. EMMA ORIVE AGUIRRE con N.I.F.14870713-V y Dr/a. SERGIO SEOANE PARRA con N.I.F. 14257348-Q como Directores/as de la Tesis Doctoral: ALGAS VERDES EN EL PICOPLANCTON Y NANOPLANCTON DEL ESTUARIO DEL RÍO NERVIÓN (GOLFO DE VIZCAYA) realizada en el Departamento BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA por el Doctorando Don/ña. AITOR ALONSO GONZÁLEZ, autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En LEIOA a de de 2011.

LOS/LAS DIRECTORES/AS DE LA TESIS

Fdo.: _____

Fdo.: _____

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento de BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA en reunión celebrada el día 27 de SEPTIEMBRE ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada: ALGAS VERDES EN EL PICOPLANCTON Y NANOPLANCTON DEL ESTUARIO DEL RÍO NERVIÓN (GOLFO DE VIZCAYA) dirigida por los/las Dres/as. EMMA ORIVE AGUIRRE y SERGIO SEOANE PARRA y presentada por Don/ña. AITOR ALONSO GONZÁLEZ ante este Departamento.

En LEIOA a de de 2011

Vº Bº DIRECTOR/A DEL DEPARTAMENTO SECRETARIO/A DEL DEPARTAMENTO

Fdo.: _____

Fdo.: _____

ACTA DE GRADO DE DOCTOR
ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

DOCTORANDO DON/ÑA. AITOR ALONSO GONZÁLEZ
TITULO DE LA TESIS ALGAS VERDES EN EL PICOPLANCTON Y
NANOPLANCTON DEL ESTUARIO DEL RÍO NERVIÓN (GOLFO DE
VIZCAYA)

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, a otorgado por _____ la calificación de:

unanimidad ó mayoría

Idioma/s defensa: CASTELLANO

En LEIOA a _____ de _____ de 2011

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: _____

Dr/a: _____

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: _____ Dr/a: _____ Dr/a: _____

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: _____

*Algas verdes en el picoplancton
y nanoplancton del estuario del río Nervión
(Golfo de Vizcaya)*

A mi familia y amigos, y a Brisa Morena.

El futuro no está escrito, al menos en su versión definitiva, no es más que un borrador en los sueños de los luchadores.

Índice

| | |
|--|-----------|
| - Agradecimientos..... | 19 |
| - 1. Introducción, objetivos y área de estudio | 23 |
| - 1.1. Introducción | 24 |
| - 1.1.1. Las algas verdes y su origen..... | 24 |
| - 1.1.2. Importancia de las algas verdes..... | 26 |
| - 1.1.3. Las algas verdes en el estuario del Nervión..... | 27 |
| - 1.2. Ocasión y objetivos del estudio | 28 |
| - 1.3. Área de estudio | 29 |
| - 2. Estudio quimiotaxonómico | 33 |
| - 2.1. Introducción | 34 |
| - 2.2. Material y métodos | 36 |
| - 2.3. Resultados | 43 |
| - 2.4. Discusión | 48 |
| - 2.5. Conclusión | 52 |
| - 3. Abundancia y composición del picofitoplancton | 55 |
| - 3.1. Introducción | 56 |
| - 3.1.1. Grupos picofitoplanctónicos diferenciados y cuantificados en base a su autofluorescencia..... | 56 |
| - 3.1.2. Taxones de algas verdes picoplanctónicas y su abundancia..... | 59 |
| - 3.2. Material y métodos | 61 |
| - 3.2.1. Protocolo general de TSA-FISH..... | 66 |
| - 3.2.2. Protocolo de TSA-FISH utilizado en este estudio..... | 66 |
| - 3.2.3. Sondas empleadas en este estudio..... | 69 |
| - 3.2.4. Variación en las réplicas de las muestras de verano de 2010..... | 70 |

| | |
|---|------------|
| - 3.3. Resultados | 70 |
| - 3.3.1. Poblaciones picoplanctónicas detectadas en base a su autofluorescencia..... | 70 |
| - 3.3.2. Hibridaciones de control con cultivos de algas aisladas del estuario..... | 73 |
| - 3.3.3. Variación del protocolo de permeabilización..... | 75 |
| - 3.3.4. Mejora de la relación señal/ruido..... | 77 |
| - 3.3.5. Marcaje inespecífico..... | 82 |
| - 3.3.6. Abundancia del picofitoplancton según su autofluorescencia..... | 87 |
| - 3.3.7. Abundancia relativa de las clorofitas picoplanctónicas..... | 91 |
| - 3.4. Discusión | 95 |
| - 3.4.1. Utilización de SDC para la creación de regiones que permitan estimar el picoplancton..... | 95 |
| - 3.4.2. Discrepancias entre citometría y epifluorescencia para la estima del picoplancton..... | 97 |
| - 3.4.3. Limitaciones de la técnica FISH aplicada a la caracterización de poblaciones picoplanctónicas..... | 99 |
| - 3.4.3.1. Número de ribosomas por célula..... | 99 |
| - 3.4.3.2. Penetración de las sondas y accesibilidad de las secuencias objetivo..... | 101 |
| - 3.4.3.3. Relación señal/ruido..... | 102 |
| - 3.4.3.3.1. Soluciones para la amplificación de la señal específica..... | 102 |
| - 3.4.3.3.2. Soluciones para la reducción del ruido..... | 105 |
| - 3.4.4. Abundancia de los grupos picofitoplanctónicos..... | 107 |
| - 3.4.5. Abundancia relativa de las clorofitas en la fracción picoplanctónica..... | 111 |
| - 3.5. Conclusión | 112 |
| - 3.5.1. Interpretación de las poblaciones detectadas mediante citometría de flujo..... | 112 |

| | |
|---|------------|
| - 3.5.2. Discrepancias entre citometría y epifluorescencia para la estima del picoplancton..... | 113 |
| - 3.5.3. Aplicación del TSA-FISH para la estimación de la abundancia del picofitoplancton..... | 114 |
| - 3.5.4. La comunidad picofitoplanctónica del estuario del Nervión y la importancia relativa que las clorofitas tienen en ella..... | 116 |
| - 4. Taxones de algas verdes del estuario del río Nervión..... | 119 |
| - 4.1. Introducción..... | 120 |
| - 4.2. Material y métodos..... | 121 |
| - 4.2.1. Aislamiento de cepas y condiciones de cultivo..... | 121 |
| - 4.2.2. Microscopía óptica..... | 124 |
| - 4.2.3. Protocolos de microscopía electrónica de transmisión..... | 125 |
| - 4.2.4. Protocolo de microscopía electrónica de barrido..... | 127 |
| - 4.3. Resultados y discusión..... | 129 |
| - 4.3.1. <i>Eutreptiella</i> da Cunha..... | 129 |
| - 4.3.1.1. <i>Eutreptiella eupharyngea</i> Moestrup & Norris..... | 132 |
| - 4.3.1.2. <i>Eutreptiella gymnastica</i> Throndsen..... | 142 |
| - 4.3.2. <i>Mamiella</i> (Parke & Rayns) Moestrup..... | 150 |
| - 4.3.2.1. <i>Mamiella gilva</i> (Parke & Rayns) Moestrup..... | 153 |
| - 4.3.3. <i>Nephroselmis</i> Stein..... | 162 |
| - 4.3.3.1. <i>Nephroselmis pyriformis</i> (Carter) Ettl..... | 165 |
| - 4.3.4. <i>Pyramimonas</i> Schmarda..... | 176 |
| - 4.3.4.1. <i>Pyramimonas orientalis</i> Butcher..... | 179 |
| - 4.3.4.2. <i>Pyramimonas moestrupii</i> McFadden..... | 194 |
| - 4.3.4.3. <i>Pyramimonas grossii</i> Parke..... | 202 |
| - 4.3.4.4. <i>Pyramimonas robusta</i> Pienaar & Sym..... | 212 |
| - 4.3.4.5. <i>Pyramimonas propulsa</i> Moestrup & Hill..... | 218 |
| - 4.3.5. <i>Oltmannsiellopsis</i> Chihara & Inouye..... | 227 |

| | |
|---|------------|
| - 4.3.5.1. <i>Oltmannsiellopsis unicellularis</i> Inouye & Chihara..... | 230 |
| - 4.3.5.2. <i>Oltmannsiellopsis viridis</i> (Hadgraves & Steele) Inouye & Chihara..... | 237 |
| - 4.3.6. <i>Chlamydomonas</i> Ehrenberg..... | 242 |
| - 4.3.6.1. cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. (CGA20)..... | 244 |
| - 4.3.6.2. cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. (CGA21)..... | 248 |
| - 4.3.6.3. cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. (CGA22)..... | 252 |
| - 4.3.6.4. cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. (CGA23)..... | 257 |
| - 4.3.6.5. cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. (CGA24)..... | 263 |
| - 4.3.6.6. <i>Chlamydomonas</i> cf. <i>coccoides</i> (CGA25)..... | 266 |
| - 4.3.6.7. cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. (CGA26)..... | 272 |
| - 4. Conclusiones..... | 277 |
| - 5. Referencias..... | 283 |
| - Apéndices..... | 311 |
| - Apéndice A: preparación de eluyentes para HPLC..... | 312 |
| - Apéndice B: cultivo y procesado para extracción de pigmentos de cepas aisladas del estuario del Nervión para la obtención de sus ratios pigmentarios mediante HPLC..... | 314 |
| - Apéndice C: disoluciones para TSA-FISH..... | 317 |
| - Apéndice D: preparación de medios de cultivo..... | 323 |

Agradecimientos

Este apartado está dedicado a todas esas personas que han hecho posible, de una u otra manera, que fuera yo capaz de terminar este trabajo y no a la inversa, que este trabajo acabara conmigo.

En primer lugar querría agradecer a mi directora Emma Orive la oportunidad que me ha dado para llevar a cabo esta tesis doctoral que formalmente me inicia en el mundo de la investigación. También quisiera dar las gracias a mis compañeros de fatigas Aitor Laza y Sergio Seoane por todo lo que me han enseñado en torno al fitoplancton y por su colaboración en este trabajo de investigación.

Aunque no hayamos recorrido un largo camino en el laboratorio, no puedo dejar de agradecer a Helena Isabel Dias, nombre en clave ``Lena'', el haber colaborado conmigo durante esas largas tardes de muestreo y tedioso filtrado, o el apoyo brindado en los largos experimentos de FISH o HPLC. Al menos en la ciencia llegarás muy alto.

Entre los compañeros que llevaron a buen puerto su máster en el laboratorio no puedo dejar de acordarme de Fernando Ugalde por su pícaro humor y su simpatía y franqueza a la hora de hablar y de entender la vida. También agradezco a Zihortza Ortuzar el haberme hecho más llevadero el máster con sus opiniones y comentarios sobre las idas y venidas de aquel impredecible marasmo y sobre todo aquello que nos dio por comentar.

Entre los alumnos internos que han trabajado en el laboratorio siempre recordaré con especial simpatía a Natalia Díaz. Gracias Natalia por aceptarme como soy y por darme una amistad que tanto me llena. Corre por el mundo, y al volver, acuérdate, como de ti se acuerdan, de los que dejaste aquí ayer.

Ainhize Butrón también ha sido otra de esas personas que aunque durante corto tiempo ha ayudado a hacer más llevadero el duro trabajo en el laboratorio. Aunque, aligerando cargas y haciendo olvidar la rutina no hay quién pueda igualar a Guillermo Aravena, que, aliviando las tuyas, se llevaba nuestras preocupaciones. Gracias

Guillermo por tantas visitas agradables como nos hiciste en esos días en que tu futuro era incierto y aun así nunca perdías la sonrisa y la esperanza. A estas alturas ya te habrán hecho un monumento en ``El Templo´´, pero si no es así, gracias a las frecuentes contribuciones del Doctor Seoane pronto será posible.

En cuanto a colaboración en el trabajo no puedo dejar de agradecer a la profesora África García-Orad el prestar su laboratorio para que la genial Maialen Martínez me iniciara en los secretos de la técnica FISH. Maialen, trabajadora incansable, te deseo lo mejor por haber sido paciente maestra y agradable compañera. Lástima que no pudiéramos haber llevado más haya nuestra colaboración, pues sentía que formábamos un equipo.

Y hablando de Maialens, mi agradecimiento a Maialen Garmendia por hacer tan amenas las prácticas del máster. No pierdas nunca esa sonrisa y esa mirada que tanto dicen sin necesidad de gastar saliva.

Muchas gracias también, al doctor Fabrice Not por su desinteresada colaboración y útil consejo en todo lo relacionado con el FISH, y por su buena disposición para aceptarme en una estancia de investigación que finalmente no pudo ser. Gracias asimismo, tanto al Dr. Øjvind Moestrup como al Dr. Stuart Sym, así como al resto de investigadores que han colaborado en este estudio compartiendo desinteresadamente sus trabajos publicados.

También he de agradecer los consejos, la paciencia con las muestras que no salían y los amenos y útiles comentarios de Alex Díez, Ricardo Andrade y Jon Arluzea.

En cuanto al resto de amigos y familiares la lista es demasiado amplia para citarlos a todos. A los familiares jamás podré agradecerles suficientemente todo lo que han hecho por mí, tanto en esta tesis como en todos los aspectos de mi vida, así que no se me ocurre otra manera de agradecerles todo esto si no es andando recto el resto del camino.

Por citar algunos amigos, no puedo olvidarme de Ibai Olariaga, que se mantuvo a mi lado cuando todo parecía ir mal, estuvo siempre dispuesto a escuchar mis

problemas y me prestó su ánimo y simpatía para hacerme sonreír y ver la luz cuando el mundo se oscurecía a mi alrededor. No importa, Ibai, el tiempo o la distancia, la amistad siempre queda como el poso dulce de un tiempo maravilloso que fue y volverá a ser al reencontrarse los amigos.

Jon Rebollar y Araceli Rodríguez siempre han sido capaces de hacerme sonreír y de llevar mi mente por senderos agradables en conversaciones entretenidas y divertidas. Muchas gracias por vuestra amistad.

Unai Zorriketa y Laura Calle, habéis sido mis amigos y consejeros durante estos últimos años, me habéis ayudado a levantarme cuando he caído y a no tropezar demasiadas veces en la misma piedra. Me he sentido querido por vosotros y no puedo deciros otra cosa más que os quiero.

Y finalmente, Brisa Morena. Has sido la luz de mis días, me has traído, risas, lágrimas, amistad y amor. Has hecho que cada segundo a tu lado valiera lo que años de experiencia y has cambiado mi manera de comprender la vida. Tantas cosas te he dicho, tantas por decir... Y todo se queda en nada, aunque todo lo lees en mi mirada. Se siempre feliz, que no te falte de nada. Serás rica con cualquier cosa que tengas y en mi pecho tendrás siempre un hogar en que poder cobijarte cuando lo deseas.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y ÁREA DE ESTUDIO

1.1. Introducción

1.1.1. Las algas verdes y su origen

Se pueden definir las algas verdes como un grupo de organismos que tienen en común la capacidad para la fotosíntesis oxigénica y la presencia de la clorofila *b* entre los pigmentos accesorios para la realización de ésta. Dichas características hacen de las algas verdes un grupo de organismos fotótrofos o mixótrofos muy heterogéneo, en el que coinciden tanto seres unicelulares y pluricelulares como procariotas y eucariotas, y que, según Grahan y Wilcox (2000), alberga unas 7000 especies. Este conglomerado de especies proviene de linajes evolutivos independientes, siendo uno de éstos el que daría lugar a las plantas terrestres (Inouye & Okamoto 2005). Sería por tanto un taxón polifilético, esto es, un grupo de cuyos componentes no se conoce un ancestro común a partir del cual establecer todas las relaciones filogenéticas que han dado origen al propio grupo.

Según el trabajo de Inouye y Okamoto (2005), que constituye una revisión acerca de los distintos avances de los últimos años en materia de teoría evolutiva de las plantas, las algas verdes estarían compuestas por tres linajes: *Viridiplantae* (divisiones Chlorophyta y Streptophyta), Chlorarachniophyta y Euglenophyta. Dicho trabajo no hace referencia a los dinoflagelados del género *Lepidodinium*, que tienen cloroplastos con clorofilas *a* y *b* (Watanabe *et al.* 1990) y por tanto también pueden ser considerados como algas verdes bajo el criterio empleado en este estudio. Además, al considerar las algas como protistas autótrofos, excluye también de este grupo a las algas procariotas con clorofila *b*, las llamadas proclorofitas, que comprenden los géneros de cianobacterias *Prochloron*, *Prochlorococcus* y *Prochlorotrix*.

Viridiplantae, Chlorarachniophyta y Euglenophyta, habrían adquirido la capacidad fotosintética gracias a distintos eventos de endosimbiosis ocurridos a lo largo de su historia evolutiva (Inouye & Okamoto 2005). Por un lado tendríamos el linaje que daría lugar a las plantas terrestres, que se engloba en el taxón *Viridiplantae*, definido por Cavalier-Smith (1981), y que comprende las divisiones Chlorophyta y Streptophyta, esta última contendría los ancestros de las algas colonizadoras del medio terrestre. Este

linaje, junto con el de las divisiones de Rhodophyta y Glaucophyta, habría adquirido la fotosíntesis mediante un evento de endosimbiosis primaria en el que un ancestro común a estas tres divisiones, protista y heterótrofo, habría fagocitado una cianobacteria que habría pasado a ser un simbiote para posteriormente quedar asimilado como un orgánulo más: el cloroplasto. Por su parte, los linajes de Chlorarachniophyta y Euglenophyta habrían obtenido la capacidad fotosintética mediante endosimbiosis secundaria, esto es, habiendo fagocitado y asimilado un simbiote, perteneciente a *Viridiplantae* en este caso en concreto.

El caso de los dinoflagelados del género *Lepidodinium* es algo más complicado. El grupo de los dinoflagelados a lo largo de su historia evolutiva parece haber sufrido numerosos eventos de endosimbiosis y pérdida de cloroplastos que ha dado lugar a los diferentes linajes que lo componen (Saldarriaga *et al.* 2001, Minge *et al.* 2010). Todos estos linajes provienen en su mayoría de un ancestro común que tenía plastos con peridina y cuyo cloroplasto provendría en última instancia de una Rhodophyta, pero que a lo largo de su historia se ha perdido o substituido por otros (Saldarriaga *et al.* 2001, Inouye & Okamoto 2005). En el caso concreto del género *Lepidodinium*, los cloroplastos tendrían como origen, según los estudios más recientes, una clorofícea y no una prasinofícea como se creía hasta ahora (Matsumoto *et al.* 2011).

Por su parte, las proclorofitas, siendo como son cianobacterias, son fotoautótrofos originalmente. Primero se pensó que una de ellas podía haber sido el endosimbionte que dio lugar a las algas verdes eucariotas debido a que disponían de clorofila *b*. Sin embargo, posteriormente se descartó esa idea gracias a análisis genéticos, al tiempo que se conocía que constituyen un grupo polifilético filogenéticamente diverso, y por lo tanto, que el empleo de la clorofila *b* como pigmento accesorio se ha dado independientemente en bastantes ocasiones a lo largo de la evolución (Palenik & Haselkorn 1992).

La taxonomía dentro de cada uno de los grupos de algas verdes comentados, y en especial de las divisiones mencionadas, es demasiado extensa como para tratarla en esta introducción. Aunque como buen punto de partida para profundizar en ella se

recomiendan las siguientes referencias: divisiones Chlorophyta (Graham & Wilcox 2000), Streptophyta (Marin & Melkonian 1999, Graham & Wilcox 2000), Chlorarachniophyta (Hibberd & Norris 1984), Euglenophyta (Walne *et al.* 1986, Wotowski & Hindák 2005), género *Lepidodinium* (Watanabe *et al.* 1990, Hansen *et al.* 2007) y proclorofitas (Lewin 1976, Burger-Wiersma 1986, Chisholm *et al.* 1992).

1.1.2. Importancia de las algas verdes

En su labor como base de los ecosistemas acuáticos cabe destacar el papel de las proclorofíceas, y en especial el género *Prochlorococcus*, como uno de los taxones más abundantes sobre todo en zonas oceánicas centrales con escaso contenido en nutrientes (Partensky *et al.* 1999a). También es importante la contribución que en distintos ambientes marinos pueden realizar las clorofitas, en especial las de la clase prasinofíceas, no solo siendo uno de los grupos de eucariotas más habituales del picofitoplancton (Diez *et al.* 2004, Worden 2006, Medlin *et al.* 2006), considerado en este estudio como el conjunto de las algas de tamaño inferior a 3 μm siguiendo a Vaultot y colaboradores (2008), sino también como uno de los más abundantes tanto en ambientes oceánicos como costeros (Not *et al.* 2004, Not *et al.* 2005, Vaultot *et al.* 2008). En cuanto a los ambientes de agua dulce, las algas verdes, y en especial las clorofitas, son importantes componentes del fitoplancton tanto de ríos como de lagos, llegando a ser en muchas ocasiones el grupo dominante, destacando taxones como el ubicuista *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Ankistrodesmus* o *Scenedesmus* (Happey-Wood 1988).

Por otra parte, las algas verdes, y de nuevo sobre todo las clorofitas, tienen una importancia creciente en cuanto a sus usos se refiere. Así, se emplean algas de *Chlorella* y otros géneros, como complemento alimenticio en nutrición humana o como alimento para animales, sobre todo en acuicultura tanto para alimentar larvas de moluscos como zooplancton que después se emplea como alimento de larvas de peces (Spolaore *et al.* 2006). También se emplean clorofitas para la obtención de combustibles renovables o alternativos como biodiésel e hidrógeno (Schenk *et al.* 2008, Meuser *et al.* 2009), como bioremediadores en el tratamiento biológico de aguas residuales (Valderrama *et al.*

2002), o incluso como fuente de sustancias con aplicaciones farmacéuticas (Rho *et al.* 1997) o cosméticas (Spolaore *et al.* 2006).

1.1.3. Las algas verdes en el estuario del Nervión

Las algas verdes constituyen uno de los grupos más importantes en la comunidad fitoplanctónica del estuario del río Nervión. Su importancia es mayor en la fracción picoplanctónica siendo la clorofila *b* el pigmento auxiliar dominante, hasta el punto de que su variación temporal y espacial a nivel de comunidad sigue patrones similares a los de la clorofila *a* (Seoane *et al.* 2006), lo que implica que el devenir de las algas verdes afecta en gran medida a esta fracción de la comunidad.

En cuanto a abundancia celular, en ocasiones las clorofitas llegan a ser uno de los grupos más importantes del fitoplancton, alcanzando densidades que superan las 10^6 céls. \cdot l⁻¹, mientras que las euglenofitas llegan a superar los 10^5 céls. \cdot l⁻¹ (Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006). Destacan los géneros *Chlamydomonas* entre las clorofíceas, *Pyramimonas* y *Tetraselmis* entre las prasinofíceas y *Eutreptiella* entre las euglenofitas. También se ha detectado al menos una floración de la prasinofícea *Cymbomonas tetramitiformis* y la presencia del dinoflagelado *Lepidodinium chlorophorum* (Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006). Además, tanto este dinoflagelado como varias cepas de clorofitas y de otras microalgas han sido aisladas y sus pigmentos analizados mediante cromatografía de alta resolución (Laza-Martínez *et al.* 2007).

En la fracción picoplanctónica, son relativamente frecuentes en cultivos establecidos a partir de muestras del estuario, las prasinofíceas *Micromonas pusilla* y el género *Nephroselmis*, y ocasionalmente se ha registrado la presencia de *Mamiella gilva* y algas que presumiblemente pertenecen al género *Nannochloris* (Trebouxiophyceae). Algunas de estas algas debido a su tamaño también pueden considerarse como nanoplancton (3-20 μ m).

Finalmente, hasta donde alcanza el conocimiento del autor no se tiene constancia de la presencia de algas de la división Chlorarachniophyta ni de ninguna proclorofita en el estuario.

1.2. Ocasión y objetivos del estudio

Pese a que los estudios previos citados anteriormente dan a entender su importancia en el estuario, la taxonomía de las algas verdes del río Nervión no había sido estudiada en profundidad hasta la fecha. Razón por la cual se planteó la posibilidad de realizar el presente estudio que tiene como objetivos los siguientes:

- **Objetivo fundamental:** conocer la diversidad específica de las algas verdes y su importancia relativa en la comunidad fitoplanctónica del estuario del río Nervión.

Serían **objetivos concretos** para lograr el fundamental los siguientes:

1. Estimar la importancia relativa de las algas verdes respecto al conjunto de la comunidad fitoplanctónica y a la fracción inferior a 3 μm .
2. Identificar las especies de algas verdes presentes en el estuario.

Para determinar la importancia relativa de las algas verdes en el estuario se ha empleado un conjunto de técnicas que permiten una resolución taxonómica y una capacidad de cuantificación variables en cuanto a los grupos de algas cuya importancia pueden estimar.

Se ha realizado un análisis quimiotaxonómico a partir de pigmentos marcadores detectados mediante cromatografía de alta precisión (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography), para estimar las aportaciones relativas al total de la clorofila *a* de cada uno de los grandes grupos algales, tanto en el total de la comunidad como en la fracción picoplanctónica. Los resultados de este análisis se muestran en el segundo capítulo de este trabajo.

A su vez, la fracción picoplanctónica, en la que las algas verdes han demostrado tener mayor importancia en estudios previos (Seoane *et al.* 2006), se ha estudiado con epifluorescencia y citometría de flujo para la cuantificación de los grandes grupos del picofitoplancton en términos de abundancia celular, y se ha estimado la aportación

relativa de varios taxones de algas verdes mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH, del inglés Fluorescence *In Situ* Hybridization), que permite una mayor resolución taxonómica que todas las anteriores técnicas. Los resultados obtenidos mediante estas técnicas se muestran en el tercer capítulo de este trabajo.

Para identificar las especies de algas verdes presentes en el estuario del Nervión se han analizado mediante métodos de microscopía óptica, y electrónica en los casos en que ha sido necesario, la morfología de cepas aisladas en el propio estuario, identificándolas hasta nivel de especie siempre que ha sido posible. Los taxones encontrados y toda la información empleada para su identificación se reúnen en el cuarto capítulo.

Cada uno de los citados capítulos tiene una estructura que consta de introducción, material y métodos, resultados, discusión y conclusiones. Tras ellos sigue un capítulo final en el que se resumen las principales conclusiones de este trabajo.

1.3. Área de estudio

El estuario del río Nervión (Fig. 1.1.), situado en la provincia de Vizcaya, al norte de España (43° 14' - 43°23' N, 3° 07' - 2° 55' O), vierte sus aguas al golfo de Vizcaya. Desde el límite de marea, junto a la Isla de San Cristóbal en La Peña, Bilbao, hasta su límite exterior en Zierbana, comprende una extensión de 23 km. A lo largo del estuario se diferencian una zona interior y otra exterior. La interior, conocida como la Ría de Bilbao, se encuentra totalmente canalizada, tiene unos 15 km de largo por 50-145 m de ancho y 2-9 m de profundidad, y va abriéndose hacia el exterior. La zona exterior, conocida como el Abra de Bilbao, tiene una extensión de unos 25 km², con una profundidad de hasta 30 m y una anchura máxima de unos 3800 m (Seoane 2005).

El estuario tiene un régimen de mareas semidiurno, con una amplitud mareal máxima en mareas vivas de unos 4,6 m y una mínima en mareas muertas de 1,2 m (Cearreta 1991). La entrada de agua marina al estuario es 2-7,5 veces mayor que la de agua dulce (Cearreta 1991; Saiz-Salinas *et al.* 1996) por lo que los parámetros físico-químicos del estuario dependen en gran medida del flujo mareal. De esta manera en la

mayor parte del estuario se da una fuerte estratificación salina con una amplia capa de agua salada de fondo (≈ 30 psu) y una fina capa superficial de agua dulce que va perdiendo importancia hacia la zona exterior.

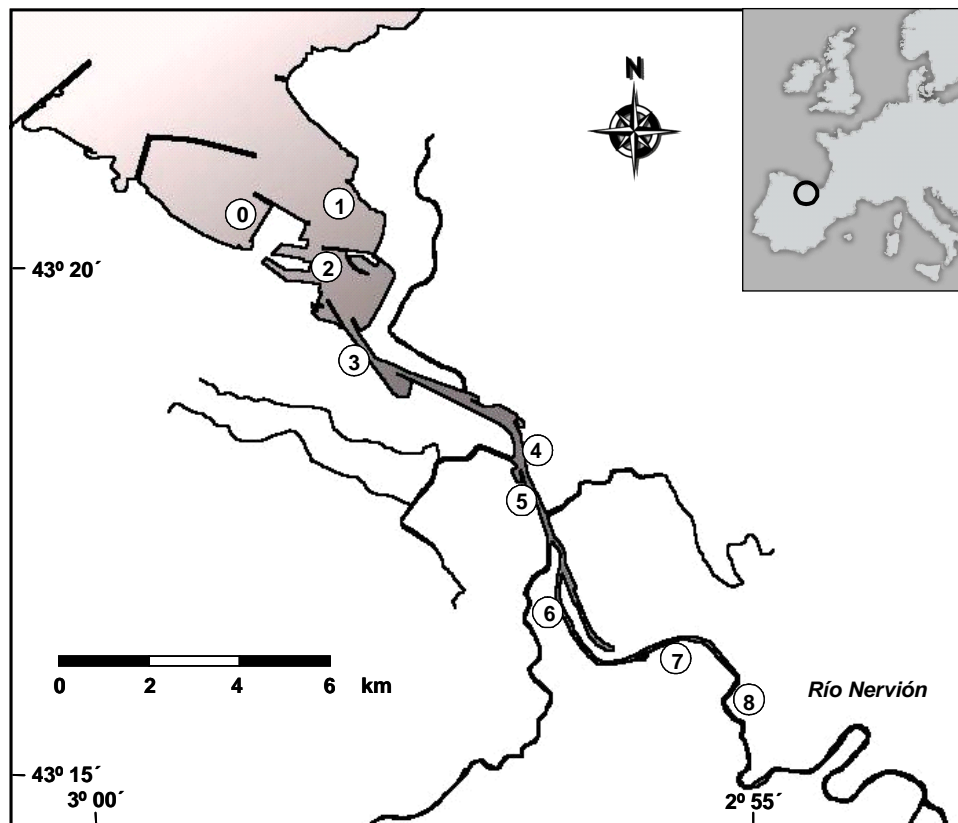


Figura 1.1.: situación de las estaciones de muestreo del estuario del río Nervión muestreadas periódicamente en el marco de un proyecto de monitorización de la calidad sus aguas.

Sobre el estuario drena una cuenca de unos 1640 km^2 , siendo los cursos de agua que van a dar directamente al estuario los siguientes: Nervión-Ibaizabal, Cadagua, Galindo, Asua y Gobela-Udondo.

El clima imperante en el estuario y la cuenca es el atlántico con influencia mediterránea, caracterizado por una alta pluviosidad, baja insolación, temperaturas suaves y vientos de moderados a fuertes.

La cuenca de drenaje acoge una población cercana al millón de habitantes, residentes de Bilbao y el resto de municipios que componen la zona que ha venido a llamarse el Gran Bilbao. A la enorme presión que ha supuesto, y aún supone, semejante densidad de población hay que añadirle que desde el siglo XIX hasta la actualidad las

márgenes del estuario han ido siendo ocupadas no solo por usos urbanos del suelo, sino también por una importante actividad industrial que ha ido variando a lo largo del tiempo: desde minería y metalurgia a la fabricación de maquinaria y construcción naval, incluyendo elaboración de papel e industrias químicas (fábricas de ácido nítrico y sulfúrico) y petroquímica. De esta manera, se ha llegado a perder hasta más del 99% de la superficie intermareal original, sus aguas y sedimentos se han contaminado con materia orgánica y metales pesados y sus niveles de oxígeno han disminuido drásticamente (Saiz-Salinas 1996), llegando a considerarse como la zona costera más contaminada de la cornisa cantábrica (Cearreta *et al.* 2000).

En los últimos 40 años esa actividad industrial entro en declive y gracias a esto, y a que se comenzó a depurar las aguas residuales procedentes del Gran Bilbao, en la actualidad comienzan a verse los primeros síntomas de mejoría en la calidad de las aguas del estuario. Como ejemplos cabe destacar la reducción que se ha dado en la demanda química y bioquímica de oxígeno (Gorostiaga *et al.* 2003, García-Barcina *et al.* 2006) y la recuperación progresiva de la fauna y flora.

En el presente estudio se han analizado muestras recogidas, o algas aisladas, en las estaciones 0-3 y 5, dentro del proyecto de monitorización llevado a cabo por el Laboratorio de Fitoplancton de la Universidad del País Vasco denominado *Fitoplancton del estuario del Nervión-Ibaizabal y de los últimos tramos de sus principales afluentes: estudio de seguimiento*, financiado por el Consorcio de Aguas Bilbao-Bizkaia. Asimismo, se han analizado algas procedentes de los estuarios cercanos de Urdaibai y del Barbadún, así como otras aisladas a partir de muestras ocasionales tomadas en el puerto deportivo de Getxo, muelle y dársena a la derecha de la estación 2 en la Fig. 1.1., y del propio Abra. Los detalles concretos relacionados con la periodicidad, recogida, procesado y análisis de muestra se describen en los apartados de material y métodos correspondientes a cada uno de los capítulos comentados. En cada capítulo se describen los métodos y técnicas empleadas para obtener los resultados que se exponen en ellos.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO DE LA ABUNDANCIA
RELATIVA DE LOS GRUPOS QUE COMPONEN LA
COMUNIDAD DEL FITOPLANCTON Y SU FRACCIÓN
PICOPLANCTÓNICA EN LA ZONA EXTERIOR DEL
ESTUARIO DEL NERVIÓN CON ESPECIAL REFERENCIA A
LAS ALGAS VERDES

2.1. Introducción

Estudios previos han demostrado que las algas verdes, principalmente las prasinofíceas, tienen un papel importante en cuanto a abundancia relativa se refiere dentro de las poblaciones fitoplanctónicas, en especial en la fracción picoplanctónica, de ambientes acuáticos costeros y estuaricos (Biegala *et al.* 2003, Not *et al.* 2004, Not *et al.* 2005, Not *et al.* 2007, Not *et al.* 2008, Viprey *et al.* 2008). En estudios realizados en el propio estuario del Nervión se ha observado, empleando la técnica de HPLC o cromatografía líquida de alta precisión, un importante aporte de las algas con clorofila *b* al total de la clorofila *a*, sobre todo en la fracción picoplanctónica, y se han obtenido los patrones pigmentarios de un buen número de taxones de algas verdes tanto pico- como nanoplanctónicos (Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006, Laza-Martínez 2007), considerando estas últimas como las algas de tamaño entre 3-20 μm .

La técnica de HPLC es habitualmente empleada para la detección y cuantificación de pigmentos, tanto clorofilas como otros pigmentos accesorios, que forman parte del aparato fotosintético de las algas. El conjunto de pigmentos presente en un alga y la proporción de cada uno de estos respecto a la clorofila *a* (ratio pigmentario) tienen carácter taxonómico, por lo que el análisis de pigmentos se ha empleado en multitud de ocasiones en estudios de este tipo (Zapata *et al.* 2001, Zingone *et al.* 2002, Latasa *et al.* 2004, Seoane *et al.* 2009c). Por su parte, los ratios pigmentarios también se emplean en quimiotaxonomía, o taxonomía a partir de marcadores químicos, para la estimación de la contribución a la clorofila *a* total que los distintos grupos algales con contenido pigmentario conocido, realizan en las poblaciones fitoplanctónicas.

En este último cometido está muy extendido el uso del programa CHEMTAX, diseñado por Mackey y colaboradores (1996), cuyo funcionamiento se explica más adelante en el apartado de material y métodos. Muchos trabajos sobre ecología de las poblaciones algales han confiado en esta herramienta como medio para estimar la abundancia relativa de los distintos grupos de microalgas tanto en ambientes marinos como dulceacuícolas de distintas partes del mundo (Rodríguez *et al.* 2002, Ansotegui *et al.* 2003, Greisberger & Teubner 2007, Eker-Develi *et al.* 2008, Lionard *et al.* 2008, Wright *et al.* 2009b). Sin embargo, sólo unas pocas clorofilas y carotenoides ofrecen

una interpretación quimiotaxonómica no ambigua, siendo realmente marcadores específicos de un único tipo de algas, como por ejemplo, las clorofilas c_2 -MGDG para algunas haptofitas, la prasinoxantina y la sifonoxantina para algunas prasinofíceas y la peridinina para algunos dinoflagelados (Zapata *et al.* 2001, Ansotegui *et al.* 2003, Jeffrey & Wright 2006). Esta circunstancia hace necesario el empleo de técnicas microscópicas en combinación con el análisis de pigmentos, para poder tener un conocimiento lo más exacto posible de los grupos que componen la comunidad fitoplanctónica objeto de estudio (Mackey *et al.* 1996, Irigoien *et al.* 2004). Dicho conocimiento es un requisito *a priori* del programa CHEMTAX para poder ofrecer unos resultados fiables y basados en la realidad.

Otro de los problemas para la aplicación del CHEMTAX consiste en que los ratios de pigmentos accesorios varían tanto entre especies de un mismo género, como dentro de una misma especie dependiendo de la cepa y de las condiciones ambientales a las que estén expuestas las algas (Schlüter *et al.* 2000, Rodríguez *et al.* 2006, Yao *et al.* 2006, Seoane *et al.* 2009c), por lo que es recomendable usar ratios pigmentarios originados a partir de medias de los conseguidos de cepas aisladas en la propia población a analizar y sometidas a distintas condiciones de cultivo.

Teniendo en cuenta la utilidad de la técnica de HPLC en combinación con el programa para quimiotaxonomía CHEMTAX, se decidió utilizar ambos con el objetivo de caracterizar la población fitoplanctónica presente en el estuario del Nervión, así como su fracción picoplanctónica ($<3 \mu\text{m}$) y el aporte relativo que las algas verdes realizan en ambas. Para ello, y teniendo en cuenta las limitaciones del CHEMTAX, se emplearon ratios de especies aisladas del estuario en combinación con los obtenidos en la bibliografía, y datos de abundancia de los taxones analizados aportados por recuentos realizados al microscopio con la técnica de recuento de Utermöhl (Utermöhl 1958, Hasle 1978, Edler & Elbrächter 2010). Debido a lo complicado que sería realizar un estudio a tan gran escala se redujeron los muestreos al periodo de mayor abundancia picoplanctónica en el estuario, comprendido entre los meses de marzo a septiembre, y se limitó a la parte exterior del mismo, estaciones 1 y 2, donde se sabe por estudios previos que la contribución relativa de la fracción $<8 \mu\text{m}$ es mayor (Butrón *et al.* 2009). Por la misma razón la mayoría de los ratios obtenidos de las especies aisladas en el estuario corresponden a cepas mantenidas en solo unas condiciones de cultivo.

2.2. Material y métodos

-Recogida y procesamiento de las muestras:

1. **Recogida y traslado:** se recogieron muestras de 10 l de agua superficial de las estaciones 1 y 2 durante los meses de abril a septiembre de 2008. No se incluyó marzo en los muestreos aunque estaba previsto, pues debido a las condiciones meteorológicas especialmente adversas tuvo que retrasarse el muestreo previsto para finales de ese mes hasta comienzos de abril, por lo que finalmente se realizaron 2 muestreos durante este mes. Para la recogida de muestras se emplearon bidones de plástico opacos que se cubrieron con bolsas de plástico negras para proteger las muestras del sol durante su traslado hasta el laboratorio.
2. **Filtración:** a su llegada al laboratorio, y tras ser agitadas manualmente las muestras, se filtraron 0,7-2 l de agua para el análisis del total de la comunidad, mientras que para la fracción inferior a 3 μm se filtraron de 2,75-8 l, a través de filtros de GF/F (Whatman International Ltd., Reino Unido) de 0,7 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, a una presión aproximada de 100 mm Hg y bajo luz atenuada.
3. **Conservación:** terminada la filtración se secaron los filtros doblados por la mitad con papel absorbente, se introdujeron en papel de aluminio debidamente identificado y se congelaron en N_2 líquido, donde se conservaron hasta su posterior análisis, que tuvo lugar en un plazo de 5-11 meses.

-Extracción y análisis de los pigmentos:

1. **Extracción:** los filtros se descongelaron a temperatura ambiente en el propio papel de aluminio. Después, y a partir de aquí siempre bajo luz atenuada, se cortaron en pedazos pequeños que se mezclaron con 1-4 ml de acetona al 90% en un vial con tapón perforable, embutido en papel de aluminio para proteger de la luz su contenido. El volumen de acetona a emplear en la extracción se determinó según la concentración de la muestra (mayor o menor color del filtro), de manera que

quedara un volumen lo mayor posible de un extracto lo más concentrado posible. Se pretendía así, que los picos de pigmentos minoritarios pudieran cuantificarse sin problemas, lográndose además extracto suficiente como para repetir los análisis. Los pedazos de filtro con la acetona se homogenizaron con una varilla de vidrio en un vial como los anteriores. Una vez conseguido este extracto se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm de teflón (Olimpeak[®], Teknokroma S. Coop. Ltda., Barcelona, España), la jeringa y el filtro ambos desechables, mientras se pasaba a un vial distinto. A una parte del extracto filtrado se le añadió, en otro vial, agua destilada en una proporción de extracto: agua de 1:0,4 para mejorar la resolución de los picos. Esta mezcla fue la que se inyectó en el HPLC para el análisis. El extracto de mantuvo en frío hasta que se realizó la inyección, llevada a cabo a la mayor brevedad posible para que la degradación no afectara a los pigmentos.

2. **Análisis:** se inyectaron 100 μl de extracto mezclado con agua en un HPLC equipado con un desgasificador Waters in-line degasser AF, una bomba binaria Waters 1525, un inyector Rheodyne[®] 7125 (IDEX Health & Care, Wertheim-Mondfeld, Alemania), una precolumna y una columna cromatográfica Symmetry[™] C8 3,5 μm , un horno de columna modelo 5HC, un detector de fluorescencia Waters 2475, un detector de fotodiodos Waters 2996, (Waters Corporation, Massachusetts, EE. UU.). El método empleado en el análisis fue el expuesto en Zapata y colaboradores (2000), pero con una reducción de 10 veces en la concentración de piridina en el eluyente A (concentración final de 0,025 M). Los eluyentes empleados y su preparación se detallan en el apéndice A.
3. **Tratamiento de los datos:** los datos de absorción y fluorescencia obtenidos mediante el HPLC se procesaron empleando el software Empower PRO 5.0 suministrado por el fabricante del equipo. Mediante dicho software se identificaron los pigmentos en base a sus tiempos de retención cromatográfica y a su espectro de absorción a 440 nm.
4. **Calibración del HPLC:** para la cuantificación de las concentraciones de los pigmentos de las muestras analizadas se construyeron patrones de calibrado que relacionaban la superficie de los picos cromatográficos de estándares purificados con sus respectivas concentraciones mediante regresión lineal. Los pigmentos

usados para la calibración fueron: clorofila *a*, *b* y *c*₂, fucoxantina, luteína, peridina y zeaxantina. Todos fueron suministrados por DHI, Hørsholm, Dinamarca.

-Quimiotaixonomía:

Los datos sobre abundancia pigmentaria obtenidos mediante HPLC se analizaron utilizando el programa CHEMTAX 2.0.5. (CSIRO/Australian Antarctic División) empleado habitualmente en estudios pigmentarios para la estimación de la abundancia relativa a la clorofila *a* de las distintas clases pigmentarias (Irigoién *et al.* 2004, Lewitus *et al.* 2005, Lionard *et al.* 2008, Wright *et al.* 2009a), o dicho de otro modo, para expresar qué porcentaje de clorofila *a* total pertenece a cada una de esas clases que componen la comunidad fitoplanctónica. Para dicha estimación el programa requiere dos tipos de entradas de datos. Por un lado necesita las abundancias pigmentarias obtenidas de distintas muestras de la población objeto de estudio. Y por el otro, requiere la introducción de las clases pigmentarias y sus respectivos ratios de pigmentos accesorios característicos frente a clorofila *a*. Estos ratios conforman lo que se conoce como firma pigmentaria. Partiendo de esos datos, el programa concibe la estimación de las clases pigmentarias, como un problema de cálculo matricial de soluciones infinitas. De esta manera y mediante un proceso iterativo de aproximación y variación de los ratios iniciales que se le proporcionan, es capaz de arrojar los resultados de abundancia relativa de las clases que en teoría más se ajustan a las muestras que se le proporcionan inicialmente. Los detalles concretos acerca de los fundamentos del CHEMTAX se describen en el trabajo de Mackey y colaboradores (1996).

Habiendo obtenido, gracias a su análisis mediante HPLC, las abundancias pigmentarias de las muestras recogidas en las estaciones 1 y 2 durante el periodo de abril a septiembre de 2008, solo restaba determinar las clases pigmentarias que conformaron la población fitoplanctónica en dicho periodo, y aportar los ratios pigmentarios de éstas, para así poder conseguir la estimación de su abundancia relativa y la caracterización de la población.

En ese empeño, se utilizaron tanto los datos de recuentos de microalgas mediante la técnica del Utermöhl (Tabla 2.1.), como las observaciones acerca de presencia de distintos taxones en muestras *in vivo* y cultivos obtenidos mediante el

método de diluciones seriadas (Thronsend 1978), para determinar cuales eran las clases algales más representativas de la población. A su vez, se emplearon los datos de los distintos pigmentos accesorios detectados mediante HPLC para determinar cuales eran los más importantes a nivel de total de comunidad y de fracción inferior a 3 μm , lo cual se hizo comparando la abundancia relativa de cada uno respecto a la suma total de las concentraciones de todos los pigmentos accesorios (Tablas 2.2.-2.3.). De esta manera se eligieron las categorías pigmentarias más representativas de la comunidad y sus respectivos pigmentos marcadores que se utilizarían en el análisis realizado mediante el programa CHEMTAX (Tabla 2.4.).

Las categorías pigmentarias definidas fueron las relacionadas a continuación: Bacillariophyceae/Dictyochophyceae/Haptophyta (algas con fucoxantina considerando todo el grupo), Cryptophyta, Chlorophyceae/Prasinophyceae 1 y 2 (clorofíceas y prasinofíceas sin prasinoxantina), Prasinophyceae 3 (prasinofíceas con prasinoxantina), Dinophyta 1 (dinoflagelados con peridina) y Cyanophyta 2 (cianofitas cocoides planctónicas marinas, representadas mayoritariamente por el género *Synechococcus* en este estudio). Los tipos pigmentarios señalados a los que se refieren las categorías se

Tabla 2.1.: principales taxones detectados mediante recuentos Utermöhl en muestras no fraccionadas de la comunidad fitoplanctónica del estuario del Nervión entre abril y septiembre de 2008. Taxones principales, su abundancia relativa media (Media), desviación estándar (D. E.) y valores mínimos (Mín.) y máximos (Máx.), todos en forma de porcentaje. La abundancia se calculó respecto al total de células contadas en las estaciones 1 y 2 entre los meses de abril a septiembre de 2008. Tabla creada a partir de los datos obtenidos en las mismas estaciones de muestreo por parte del Laboratorio de Fitoplancton de la Universidad del País Vasco dentro del programa denominado *Fitoplancton del estuario del Nervión-Ibaizabal y de los últimos tramos de sus principales afluentes: estudio de seguimiento*, financiado por el Consorcio de Aguas Bilbao-Bizkaia.

| Taxón | Media | D.E. | Mín. | Máx |
|----------------------------|-------|-------|------|-------|
| Bacillariophyceae | 51,85 | 23,89 | 7,37 | 90,34 |
| Cryptophyta | 19,36 | 15,14 | 4,47 | 63,46 |
| Flagelados sin identificar | 8,28 | 8,53 | 0,00 | 32,26 |
| Haptophyta | 7,20 | 7,50 | 0,00 | 20,38 |
| Chlorophyceae | 6,18 | 7,11 | 0,00 | 25,38 |
| Prasinophyceae | 2,64 | 3,04 | 0,00 | 8,19 |
| Dinophyta | 1,63 | 2,96 | 0,00 | 10,07 |
| Dictyochophyceae | 1,31 | 1,61 | 0,00 | 4,76 |
| Otros | 1,56 | 1,63 | 0,00 | 6,45 |

corresponden con los descritos en Jeffrey y Wright (2006). El resto de categorías, entre las que se incluyen algas verdes tales como las euglenofíceas o las proclorofitas, no se tuvo en cuenta debido a su nula o escasa presencia (Tabla 2.1., Otros).

Una vez hecha la selección, se obtuvieron los ratios pigmentarios necesarios para la aplicación del programa. Estos ratios se eligieron, preferentemente, de especies numéricamente representativas de esas clases y aisladas en el propio estuario del Nervión. Algunas fueron analizadas en estudios previos y otras en este mismo trabajo (Tabla 2.4., consultar apéndice B para condiciones de cultivo). En los casos en que no

Tabla 2.2.: pigmentos accesorios principales y su abundancia relativa en la comunidad fitoplanctónica del estuario del Nervión entre abril y septiembre de 2008. La abundancia relativa se calculó respecto al total de concentración de pigmentos accesorios, estimados mediante HPLC, en muestras pertenecientes a toda la comunidad de las estaciones 1 y 2 durante los meses de marzo a septiembre de 2008.

Abreviaturas: aloxantina (Alo.) β -caroteno (β), carotenoide desconocido 35 (Carot. Desc. 35), clorofila *a* (*a*), clorofila *b* (*b*), clorofila *c*₁ (*c*₁), clorofila *c*₂ (*c*₂), clorofilida *a* (Clda. *a*), diadinoxantina (Dia.), Fucoxantina (Fuco.), luteína (Lut.), micromonal (Mical.), micromonol (Microl.), Mg-3, 8-divinil-feoporfirina a5 monometil éster (MgDVP), neoxantina (Neo.), peridininina (Per.), prasinoxantina (Pra.), uriolido (Uri.), violaxantina (Viola.), zeaxantina (Zea.). El resto de abreviaturas como en la Tabla 2.1.

| Pigmento | Media | D. E. | Mín. | Máx |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Fuco. | 36,10 | 5,99 | 21,79 | 46,11 |
| Dia. | 10,20 | 2,31 | 6,05 | 13,39 |
| <i>c</i> ₂ | 9,69 | 2,61 | 5,01 | 14,53 |
| <i>b</i> | 7,95 | 2,71 | 2,54 | 11,45 |
| Alo. | 7,46 | 5,70 | 3,21 | 26,16 |
| <i>c</i> ₁ | 4,27 | 2,55 | 0,00 | 8,72 |
| Clda. <i>a</i> | 3,90 | 5,28 | 0,00 | 15,94 |
| Lut. | 3,58 | 4,63 | 0,00 | 13,97 |
| β | 3,10 | 0,65 | 2,09 | 4,31 |
| Zea. | 2,55 | 3,26 | 0,00 | 10,71 |
| Viola. | 2,02 | 1,23 | 0,00 | 3,81 |
| Per. | 1,85 | 2,38 | 0,00 | 7,18 |
| MgDvP | 1,25 | 0,68 | 0,00 | 2,08 |
| Pra. | 1,12 | 1,08 | 0,00 | 2,89 |
| Otros | 4,96 | 4,10 | 0,00 | 13,26 |

se disponía de ratios de especies pertenecientes al estuario, se recurrió a la bibliografía. Debido a la disponibilidad limitada de este tipo de ratios en cuanto a nivel específico se refiere, se optó por buscar solo los de las especies más abundantes de cada categoría pigmentaria, algo que no se ha podido conseguir en todos los casos.

En los casos en los que se ha logrado más de un ratio representativo de una misma categoría, se ha estimado el ratio de la misma a partir de la media ponderada respecto a la abundancia relativa, estimada por Utermöhl, de los taxones que componían dicha categoría. En cambio, se ha utilizado una media aritmética, en lugar de la ponderada, cuando se carecía de datos de abundancia sobre algunos taxones de una misma clase. Los ratios iniciales con los que se alimentó el programa CHEMTAX se muestran en las Tablas 2.5.-2.6.

Tabla 2.3.: pigmentos accesorios principales y su abundancia relativa en la fracción <3 µm de la comunidad fitoplanctónica del estuario del Nervión entre abril y septiembre de 2008. La abundancia relativa se calculó respecto al total de concentración de pigmentos accesorios, estimados mediante HPLC, en muestras de la fracción <3 µm de las estaciones 1 y 2 durante los meses de abril a septiembre de 2008. Abreviaturas de los pigmentos como en Tabla 2.2.

| Pigmento | Media | D. E. | Mín. | Máx |
|------------------------|--------------|--------------|-------------|------------|
| <i>b</i> | 31,08 | 12,60 | 18,31 | 49,83 |
| Viola. | 13,03 | 5,81 | 6,80 | 23,46 |
| Pra. | 10,43 | 5,39 | 0,01 | 19,18 |
| Zea. | 10,41 | 17,42 | 0,00 | 65,78 |
| Neo. | 6,00 | 3,24 | 0,01 | 11,93 |
| Fuco. | 3,90 | 6,48 | 0,00 | 18,70 |
| MgDvP | 3,42 | 2,44 | 0,00 | 5,88 |
| Lut. | 3,20 | 9,18 | 0,00 | 34,22 |
| Alo. | 3,06 | 5,54 | 0,00 | 16,56 |
| β | 2,53 | 1,51 | 0,00 | 4,37 |
| Micral. | 2,09 | 1,72 | 0,00 | 4,29 |
| <i>c</i> ₂ | 2,05 | 2,83 | 0,00 | 7,75 |
| Carot. Desc. 35 | 1,81 | 1,41 | 0,00 | 3,85 |
| Uri. | 1,81 | 2,00 | 0,00 | 4,58 |
| Microl. | 1,22 | 0,86 | 0,00 | 2,57 |
| Dia. | 1,21 | 2,22 | 0,00 | 6,72 |
| Otros | 2,76 | 2,82 | 0,00 | 9,88 |

Tabla 2.4.: categorías pigmentarias elegidas para el análisis CHEMTAX. Se muestran las categorías pigmentarias, sus taxones representativos, la abundancia relativa de estos en recuentos Utermöhl y sus pigmentos característicos (columnas). El sombreado indica las clases y taxones utilizados en el análisis de la fracción <3 µm. En las clases compuestas se perderían Dictyocophyceae y Prasinophyceae 1 y 2 respectivamente, por ser poco probable que una parte significativa de sus células pudiera estar presente en la fracción <3 µm. Las especies incluidas en la fracción picoplantonica se han tenido en cuenta debido a que gracias a su forma y dimensiones al menos parte de sus células son capaces de atravesar los filtros de 3 µm de ancho de poro. Abreviaturas de los pigmentos como en Tabla 2.2. Junto a los taxones se muestran, en superíndice, las fuentes utilizadas para obtener sus ratios.

| Categoría pigmentaria | Tipo pigmentario ¹ | Taxones | Total de su clase ⁶ | Pigmentos | | |
|--|---------------------------------------|---|--------------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| Bacillariophyceae/ Dictyochophyceae/ Haptophyta | Bacillariophyceae Tipo 1 | <i>Skeletonema</i> sp. 5-10 µm (cf. <i>costatum</i>) ^{3, b} | 49,47% | c₂ | Fuco. | β |
| | Dictyochophyceae (Chrysophyta Tipo 2) | <i>Skeletonema</i> sp. 2 µm (cf. <i>potamos</i>) ^{4, e} | 30,12% | | | |
| | Haptophyta Tipo 3 | <i>Apedinella spinifera</i> ^{a, b} | 100,00% | c₂ | Fuco. | β |
| | Haptophyta Tipo 7 ² | <i>Isochrysis galbana</i> ^{a, b, d} | 11,86% | | | |
| | Haptophyta Tipo 8 | <i>Chrysochromulina</i> sp. ^{a, b, d} | 85,22% | | | |
| Cryptophyta | Cryptophyta Tipo 1 | <i>Imantonia</i> sp. ^{a, b, d} | Solo encontrada en cultivos | Alo. | c₂ | |
| | | <i>Hemiselmis</i> sp. ^a | 74,45% | | | |
| | | <i>Plagioselmis</i> sp. ^f | 14,09% | | | |
| | | <i>Teleaulax</i> sp. ^b | 9,65% | | | |
| Chlorophyceae/ Prasinophyceae 1 y 2 | Chlorophyceae Tipo 1 | <i>Chlamydomonas</i> cf. <i>coccoloides</i> ^b | 99,33% | b | Zea. | β |
| | Prasinophyceae Tipo 1 | <i>Tetraselmis</i> sp. ^b | 44,99% | | | |
| | Prasinophyceae Tipo 2 | <i>Pyramimonas</i> sp. ^{b, g} | 39,75% | | | |
| Prasinophyceae 3 | Prasinophyceae Tipo 3 | <i>Mamiella gilva</i> ^c | 15,26% | b | Pra. | Zea. β |
| | | <i>Micromonas pusilla</i> ^b | Solo encontrada en cultivos | | | |
| Dinophyta 1 | Dinophyta Tipo 1 | <i>Heterocapsa pygmaea</i> ^{5, b} | 3,32% | c₂ | Per. | β |
| | | <i>Prorocentrum triestinum</i> ^a | 6,98% | | | |
| Cyanophyta 2 | Cyanophyta Tipo 2 | <i>Synechococcus</i> sp. ^b | Solo encontrada en cultivos | Zea. | β | |

Tabla 2.4. (Cont.):

1. Jeffrey & Wright 2006.
2. Existe controversia acerca de si el género *Chrysochromulina* se puede englobar en un solo tipo debido a su diversidad pigmentaria (Seoane S. Comunicación personal).
- 3 y 4. Estos 2 taxones de *Skeletonema* han sido tradicionalmente clasificados como *S. cf. costatum* y *S. cf. potamos* a la espera de un estudio taxonómico en profundidad.
5. Tanto el género *Heterocapsa* como la división Dinophyta estaban mejor representados por *H. rotundata* (58,85% de las células de Dinophyta) pero ante la imposibilidad de encontrar sus ratios pigmentarios se optó por utilizar los de su congénere más abundante.
6. Según los recuentos Utermöhl.
 - a. Seoane *et al.* 2006.
 - b. Laza-Martínez *et al.* 2007.
 - c. Latasa *et al.* 2004.
 - d. Seoane *et al.* 2009c.
 - e. Yao *et al.* 2006.
 - f. Schluter *et al.* 2000.
 - g. Cepas aisladas durante este mismo estudio.

2.3. Resultados

En este apartado se explican cuáles fueron los integrantes principales de cada categoría y los aportes que éstas hicieron a la clorofila *a* de la comunidad fitoplanctónica durante el transcurso del estudio.

A nivel de comunidad el grupo mayoritario fue el de las algas con fucoxantina, formado por diatomeas, dictiocofíceas y haptofitas, siendo testimonial la presencia de otros grupos como rafidofitas, crisofitas, o posibles dinoflagelados con fucoxantina, con menos de un 1,5% de todas las células observadas para ambas estaciones durante el periodo de estudio (Tabla 2.1., Otros). Entre los taxones principales de este grupo destacan las diatomeas del género *Skeletonema*, con dos integrantes que, a falta de un estudio taxonómico en profundidad, se han venido denominando tradicionalmente en los estudios previos realizados en el estuario del Nervión como *S. cf. costatum* y *S. cf. potamos*. Estas dos especies supusieron en conjunto el 79,59% de las diatomeas contadas mediante la técnica de Utermöhl (Tabla 2.4.). Por su parte, la clase Dictyochophyceae estuvo representada exclusivamente por la especie *Apedinella spinifera*, mientras que entre las haptofitas destacaron *Isochrysis galbana* y el género *Chrysochromulina*, que comprendían en conjunto el 97,8% de las haptofitas. Entre las haptofitas también se tuvo en cuenta, en términos pigmentarios, el género *Imantonia* que estuvo presente a menudo en los cultivos celulares establecidos a partir de las

Tabla 2.5.: matriz de ratios iniciales para el análisis CHEMTAX de las muestras del total de comunidad fitoplanctónica recogidas en las estaciones 1 y 2 del estuario del Nervión entre los meses de abril a septiembre de 2008. Se muestran los ratios de los pigmentos accesorios (columnas) respecto al contenido de clorofila *a* en las clases pigmentarias establecidas (filas) para las citadas muestras. Abreviaturas: diatomeas (Bacillariophyceae) (Diat.); Dictyocophyceae (Dictyo.), Haptophyta (Hapto.), Cryptophyceae (Crypto.), Chlorophyceae (Choro.); Prasinophyceae (Pras.), Dinophyta (Dino.) y Cyanophyceae (Ciano.). Abreviaturas de los pigmentos como en Tabla 2.2.

| Pigmento Clase | c₂ | Per. | Fuco. | Pra. | Alo. | Zea. | b | a | β |
|---------------------------------|----------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|----------|
| Diat./Dictyo./Hapto. | 0,1112 | | 0,7402 | | | | | 1 | 0,0206 |
| Crypto. | 0,0834 | | | | 0,2608 | | | 1 | |
| Chloro./Pras. 1-2 | | | | | | 0,0032 | 0,7108 | 1 | 0,0507 |
| Pras. 3 | | | | 0,1690 | | 0,0230 | 0,9165 | 1 | 0,0375 |
| Dino. 1 | 0,1300 | 0,9496 | | | | | | 1 | 0,0110 |
| Cyano. 2 | | | | | | 0,8360 | | 1 | 0,0800 |

Tabla 2.6.: matriz de ratios iniciales para el análisis CHEMTAX de las muestras de la fracción <3 μm recogidas en las estaciones 1 y 2 del estuario del Nervión entre los meses de abril a septiembre de 2008. Se muestran los ratios de los pigmentos accesorios (columnas) respecto al contenido de clorofila *a* en las clases pigmentarias establecidas (filas) para las citadas muestras. Abreviaturas como en Tabla 2.5.

| Pigmento Clase | c₂ | Fuco. | Pra. | Alo. | Zea. | b | a | β |
|---------------------------------|----------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|----------|
| Diat./Hapto. | 0,1450 | 0,4112 | | | | | 1 | 0,0391 |
| Crypto. | 0,0290 | | | 0,2030 | | | 1 | |
| Chloro. | | | | | | 0,7030 | 1 | 0,0460 |
| Pras. 3 | | | 0,1690 | | 0,0230 | 0,9165 | 1 | 0,0375 |
| Cyano. 2 | | | | | 0,8360 | | 1 | 0,0800 |

muestras recogidas para este estudio. La categoría pigmentaria compuesta por estos tres grandes grupos explicaba un 61,42 % de media de la variabilidad de la clorofila *a* en el total de ambas estaciones (Fig. 2.1.), llegando en casos puntuales hasta el 84,29% como en el mes de junio en la estación 1. Por otro lado, los máximos de clorofila *a* tuvieron lugar en junio en ambas estaciones, $7,51 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ en la estación 1 y $14 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ en la 2, coincidiendo con los máximos aportes relativos de estas algas, lo que hace suponer su papel fundamental en términos pigmentarios dentro de la comunidad.

El segundo grupo en importancia a nivel comunitario fue el compuesto por las criptofitas, entre las que destacaron los géneros *Hemiselmis*, *Plagioselmis* y *Teleaulax*, suponiendo en conjunto el 98,19% de las criptofitas observadas (Tabla 2.4.). Éstas llegaron a aportar de media el 15,14% de la clorofila *a* comunitaria (Fig. 2.1.), siendo más importantes en la estación 2, en la que aportaron una media del 18,54% de la clorofila *a*, llegando a alcanzar un máximo del 52,08% durante el mes de mayo.

El resto de grupos no llegó a tener un aporte medio para las dos estaciones mayor al 10% (Tabla 2.1.), y solo en ocasiones puntuales superaron estos valores. La categoría pigmentaria formada por las clorofíceas del tipo 1 y prasinofíceas de los grupos 1 y 2, que tuvieron como representantes principales a *Chlamydomonas* cf. *cocoides* (99,33% de clorofíceas al Utermöhl, Tabla 2.4.) y los géneros *Tetraselmis* y *Pyramimonas* (en conjunto, el 84,74% de las prasinofíceas), lo hizo en la estación 1 en el segundo muestreo de abril, y de abril a julio en la estación 2, con un máximo en esta última del 23,5% en abril. Las prasinofíceas del grupo 3, representadas por *Mamiella gilva* (15,26% de las prasinofíceas) y el género *Micromonas* (solo presente en cultivos) lo hicieron a principios de abril y los meses de agosto y septiembre en ambas estaciones, con máximos al comienzo de la primavera de hasta un 17% de la clorofila *a*. Los dinoflagelados del grupo 1, cuyos representantes principales eran especies del género *Heterocapsa*, tales como *H. rotundata*, *H. pygmaea* y *H. cf. minima* (que sumaron el 63,58% de los dinoflagelados, datos no mostrados), *Gyrodinium flagellare* (14,62%), el género *Scrippsiella* (8,31%) y *Prorocentrum triestinum* (6,98%), llegaron a superar el 10% ligeramente solo en la estación 2 durante el mes de septiembre. Y finalmente, las cianobacterias del grupo 2, representadas por el género *Synechococcus* (solo observado en cultivos) aportaron el 12,61 y el 16,44% de la clorofila *a* en las estaciones 1 y 2 respectivamente durante el segundo muestreo de abril.

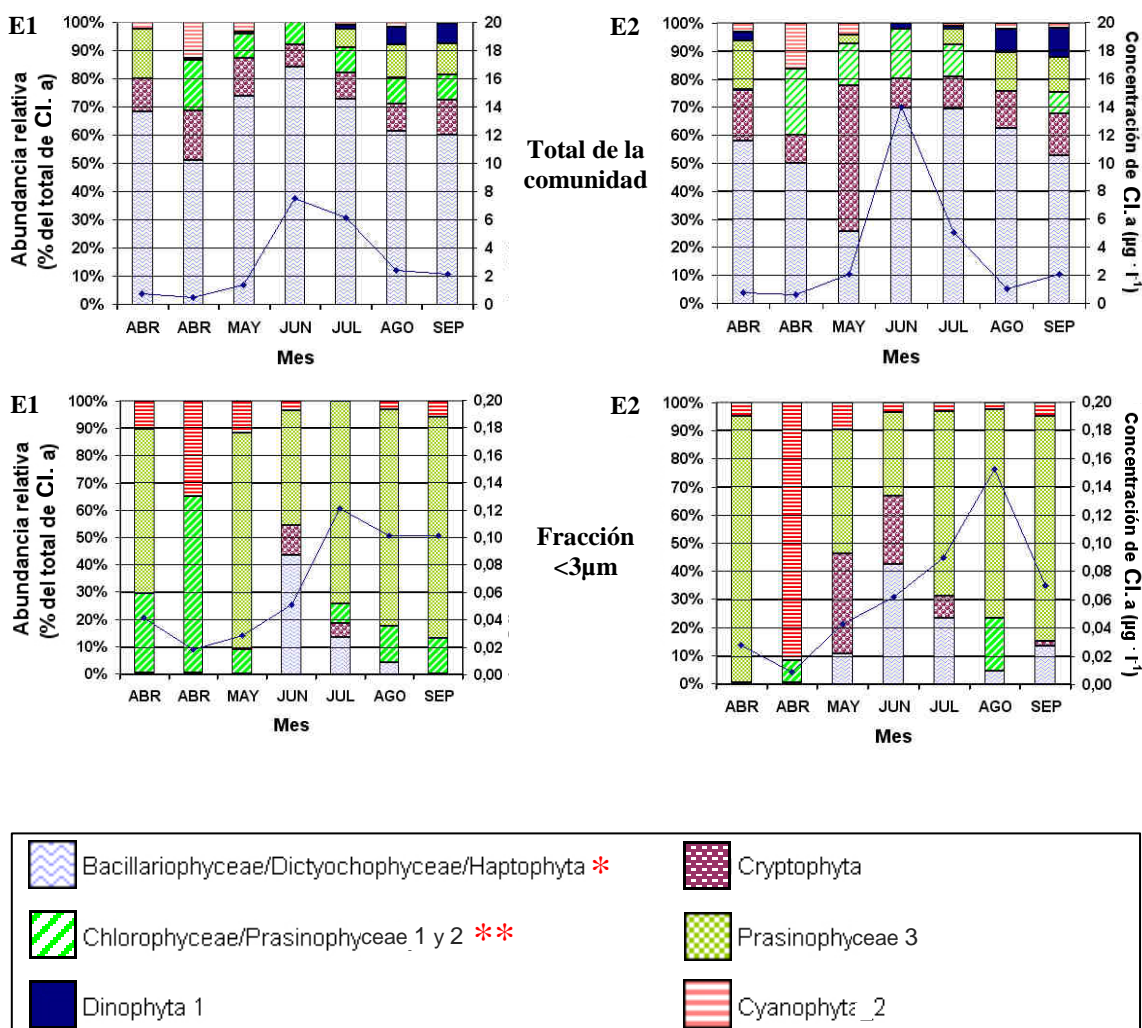


Fig. 2.1: caracterización mediante CHEMTAX del total de la población y la fracción picoplanctónica en las estaciones 1 y 2 del estuario del Nervión entre abril y septiembre de 2008. Abundancias relativas de cada una de las principales clases pigmentarias, en forma de porcentaje del total de clorofila *a* (ejes de ordenadas de la izquierda y barras), representadas junto a la concentración de clorofila *a* en $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (ejes de ordenadas de la derecha y líneas), estimados ambos para cada mes de la campaña (ejes de abscisas). Se muestran tanto los datos correspondientes al total de la comunidad (arriba) y los de la fracción <3 μm (abajo) para la estación 1 (izquierda) y la 2 (derecha).

*: en el caso de la fracción <3 μm esta categoría solo contenía especies de la clase Bacillariophyceae y de la división Haptophyta.

** : en el caso de la fracción <3 μm esta categoría solo contenía especies de la clase Chlorophyceae.

Para la estimación de la abundancia relativa de los grupos taxonómicos anteriormente citados en la fracción picoplanctónica, se tuvieron en cuenta, exclusivamente, los taxones susceptibles de atravesar el filtro de 3 μm de ancho de poro en una cantidad significativa, ya sea por su reducido tamaño, su forma peculiar o la aparente plasticidad de sus células. La relación de taxones considerados para este análisis se puede observar en la Tabla 2.4. (encuadrados en gris). En la fracción picoplanctónica la distribución de la clorofila *a* varió considerablemente respecto de la descrita para el total de la comunidad. En el picoplancton las algas con fucoxantina y las criptofitas pasaron a tener un papel secundario cediendo el protagonismo a las prasinofíceas del grupo 3, las cianobacterias del 2 y las clorofíceas del 1.

El tipo pigmentario con mayor importancia relativa lo constituyeron las prasinofíceas del grupo 3, con un aporte medio para las dos estaciones del 57,58% de la clorofila *a* total en esta fracción, llegando a menudo a ser las responsables de más de 2/3 de ésta (Fig. 2.1.). En concreto, esta situación se pudo observar todos los meses excepto en abril y junio, en la estación 1, y desde finales de abril a julio en la 2, ambos incluidos. Al mismo tiempo, los máximos de clorofila *a* detectados para la fracción picoplanctónica tuvieron lugar durante los meses de julio ($0,12 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) y agosto ($0,15 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) para las estaciones 1 y 2 respectivamente, coincidiendo con momentos en los que el aporte de este grupo a la clorofila *a* era alto. Puntualmente, estas algas llegaron incluso a ser responsables de la práctica totalidad de la clorofila *a* perteneciente al picoplancton, como ocurrió en la estación 2 en el primer muestreo de abril, donde llegaron a aportar el 94,9% de ésta.

El resto de categorías pigmentarias aportaron bastante menos de media al total de clorofila *a* de la fracción inferior a 3 μm para las 2 estaciones: cianofitas del grupo 2 (13,51%), clorofíceas (11,63%), diatomeas/haptofitas (11,1%) y criptofitas (6,16%). Sin embargo, puntualmente todas llegaron a suponer una importante porción de la clorofila *a* picoplanctónica, coincidiendo con sus máximos aportes a la comunidad para una o ambas estaciones. Así, las cianofitas llegaron a aportar el 91,83% en la estación 2 y un 34,97% en la estación 1 a finales del mes de abril; las clorofíceas el 64,83% en la estación 1 en esas misma fechas, coincidiendo con su máximo a nivel de comunidad; las diatomeas/haptofitas, sobrepasaron el 42% en ambas estaciones en junio, coincidiendo con el máximo de clorofila *a* y sus máximos aportes para la comunidad; de la misma

manera, las criptofitas alcanzaron un máximo del 35,7% del total de la clorofila *a* en la estación 2 en mayo, coincidiendo con su máximo aporte al total de la comunidad.

2.4. Discusión

Los principales grupos pigmentarios identificados en el presente estudio a nivel de comunidad han sido las algas con fucoxantina (diatomeas, haptofitas y dictiocofíceas) y las criptofitas. Éstos son los mismos que se han venido registrando en estudios previos para la parte exterior del estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006).

Tanto en el cercano estuario de Urdaibai, así como en general en los estuarios del País Vasco las diatomeas tienen un papel dominante que a menudo comparten con otras algas portadoras de fucoxantina, mientras que las criptofitas tienen una importancia más puntual como productoras de floraciones (Ansotegui *et al.* 2001 y 2003, Orive *et al.* 2004). Las diatomeas también son el grupo dominante en multitud de ambientes estuáricos y costeros de distintas partes del mundo (Furuya *et al.* 2003, Silva *et al.* 2008, Lionard *et al.* 2008). Entre los taxones más abundantes en los estuarios del País Vasco se citan, junto con otras diatomeas formadoras de cadenas, *Skeletonema costatum* y *S. potamos* con abundancias de hasta $1,3 \cdot 10^8$ céls. \cdot l⁻¹ en el caso de la primera, durante agosto de 2003 para el estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2005). *S. costatum* es además muy frecuente en zonas costeras de otros lugares del mundo como por ejemplo en la Bahía de Tokio, donde es la especie principal en una comunidad dominada durante todo el año por diatomeas (Ramalah & Furuya 2002). Estas y otras diatomeas de pequeño tamaño como los géneros *Thalassiosira* y *Cyclotella* alcanzan grandes densidades entre los meses de mayo a septiembre en el estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006) suponiendo un grupo importante en la comunidad fitoplanctónica.

Entre las dictiocofíceas se cita *Apedinella spinifera* como una de las más importantes en el estuario de Urdaibai (Ansotegui *et al.* 2003), alcanzando sus máximos entre mayo y agosto en el del Nervión, donde es, en ocasiones, la principal

representante de su clase (Orive *et al.* 2004, Seoane *et al.* 2005 , Seoane *et al.* 2006), al igual que en el presente estudio, en el que fue la única de las dictiocofíceas detectada.

En cuanto a las haptofitas, son muy comunes los géneros *Chrysochromulina* y la especie *Isochrysis galvana* (en el nanoplancton) y el género *Imantonia* (en el picoplancton) teniendo sus máximos las 2 primeras en agosto en el estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2005).

En el presente estudio las algas con fucoxantina realizan su máximo aporte a la clorofila *a* comunitaria durante el mes de junio en ambas estaciones muestreadas. Según Orive y colaboradores (2004) esta dinámica de floraciones veraniegas está relacionada con una desviación de la estacionalidad de las floraciones algales en las zonas estuáricas y costeras del País Vasco, y en general del golfo de Vizcaya, respecto de la estacionalidad habitual en las aguas bajo mayor influencia marina del mismo golfo. Esta desviación consiste en que en contraposición a la dinámica normal en las regiones templadas, consistente en floraciones primaverales y mínimos de fitoplancton estivales, en las zonas estuarico-costeras mencionadas suele darse una floración de grandes diatomeas microplanctónicas (20-200 μm) a finales de invierno o principios de primavera (Revilla *et al.* 2002, Ansotegui *et al.* 2003). Estas floraciones pueden agotar los nutrientes de manera temprana, lo que puede impedir la floración primaveral más habitual en las regiones de aguas templadas. Esta circunstancia puede no llegar a darse en zonas muy enriquecidas en nutrientes por plumas estuáricas o afloramientos, aunque incluso en estos ambientes pueden llegar a darse condiciones oligotróficas si la descarga fluvial o el aporte de fondo son reducidos. Sin perjuicio de lo anterior, gracias a los aportes fluviales las zonas exteriores de los estuarios pueden tener unas concentraciones de nutrientes no limitantes durante todo el verano que permitan la proliferación de floraciones estivales. Esta situación no es exclusiva de los estuarios en el Golfo de Vizcaya sino que también se dan floraciones durante el verano en otros estuarios y zonas costeras como por ejemplo en el estuario de Schelde, compartido por Bélgica y los Países Bajos (Lionard *et al.* 2008), o en el canal de la Mancha (Irigoién *et al.* 2004).

Por su parte, entre las criptofitas destacan *Hemiselmis* y *Teleaulax* como unos de los más habituales y abundantes, tanto en el estuario del Nervión como en el de

Urdaibai, y en menor medida *Plagioselmis* en el Nervión, con máximos entre abril y septiembre (Ansotegui *et al.* 2001, Ansotegui *et al.* 2003, Orive *et al.* 2004, Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006). Las criptofitas suelen ser más abundantes en aguas oligotróficas, de zonas templadas o de latitudes altas, tanto de agua dulce como marina (Graham & Wilcox 2000), por lo que su máximo en mayo podría venir condicionado por una reducción en los niveles de nutrientes tras una posible floración a principios de primavera. Aunque sabiendo que en el estuario del Nervión alcanzan sus máximas densidades en las estaciones intermedias (Seoane *et al.* 2006), su mayor abundancia en mayo puede estar debida a que las fuertes lluvias acaecidas durante la primavera del 2008, que obligaron a retrasar el muestreo de marzo a principios de abril y produjeron una baja salinidad y gran turbiedad durante el de mayo, desplazaran su óptimo de salinidad hacia las estaciones exteriores (datos no mostrados).

Pese a que tanto las clorofíceas (Lionard *et al.* 2008) como las prasinofíceas sin prasinoxantina (Rodríguez *et al.* 2002) y con ella (Not *et al.* 2004), los dinoflagelados con peridina (Silva *et al.* 2008) y las cianobacterias del tipo 2 (Miyazono *et al.* 1992) como *Synechococcus*, pueden llegar a tener un papel dominante en distintos ambientes oceánicos, costeros o estuáricos del mundo, en el presente estudio tienen un papel secundario en el total de la comunidad en términos de clorofila *a*, no aportando más del 10% de media para ambas estaciones. Todos los taxones comentados en los resultados como pertenecientes a este grupo son habituales en el estuario del Nervión y la mayoría de ellos también en el de Urdaibai (Ansotegui *et al.* 2001, Ansotegui *et al.* 2003, Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006). Las prasinofíceas con prasinoxantina, las clorofíceas y las cianobacterias comentadas en el apartado de resultados, contienen especies picoplanctónicas o que por su reducido tamaño pueden aparecer en la fracción inferior a 3 μm . El crecimiento de estas pequeñas formas se ve favorecido frente al fitoplancton de mayor tamaño en condiciones de oligotrofia (Chisholm 1992), y el hecho de que estos taxones tengan unos aportes de clorofila máximos a nivel comunitario en abril, hace suponer que el estado trófico de la comunidad se acercaba más a dichas condiciones. Esto unido al hecho de que también las clorofíceas y prasinofíceas sin prasinoxantina, tuvieran sus mayores aportes entre abril y julio a nivel comunitario, podría ser indicativo de una población de transición entre las citadas floraciones de invierno tardío y la floración de algas con fucoxantina de principios de verano. Las dos últimas categorías pigmentarias estuvieron representadas durante la campaña de 2008,

principalmente por taxones nanoplanctónicos, *Chlamydomonas cf. coccooides* entre las clorofíceas, y los géneros *Tetraselmis* y *Pyramimonas* entre las prasinofíceas; aunque el primero sea susceptible por su reducido tamaño (3-6 μm) de aparecer en la fracción picoplanctónica. Varios estudios indican una tendencia a la reducción de la distribución de tamaños de la población fitoplanctónica a medida que se da una transición de mayor a menor en el estado trófico del agua (Tamigneaux *et al.* 1997, Vidussi *et al.* 2000, Ansotegui *et al.* 2003), por ejemplo desde una situación en la que predominan las formas microplanctónicas hacia una en la que predominan las nano- o picoplanctónicas. Esta circunstancia podría ser la explicación para una mayor importancia de taxones nano- y picoplacntónicos durante la primavera, hipótesis que no se pudo confirmar sin un análisis de concentraciones de nutrientes correspondientes al periodo de estudio.

Continuando en la misma línea cabe especular con que a finales del verano, una vez comenzado el decaimiento de la floración registrada en junio, el nivel de nutrientes volvería a estar bajo favoreciendo la proliferación de las prasinofíceas con praxinosantina y cianofíceas picoplanctónicas. Aunque el CHEMTAX no indique un aumento importante de estas últimas, los datos de citometría y epifluorescencia en general lo confirman (ver Figs. 3.41. y 3.42. y texto relacionado). En estas circunstancias el decaimiento de las algas con fucoxantina, daría una oportunidad a los dinoflagelados, que a menudo alcanzan altas densidades tras floraciones de diatomeas debido a su habilidad para nutrirse de fuentes de materia orgánica y almacenar fósforo (Graham & Wilcox 2000) pudiendo proliferar en condiciones de oligotrofia. Ésta podría ser la razón por la que los dinoflagelados presentan un mayor aporte a la clorofila *a* durante septiembre.

En cuanto a la comunidad picoplanctónica los principales grupos han sido las prasinofíceas con prasinoxantina, con los géneros *Micromonas* y *Mamiella*; las cianobacterias del tipo 2, con *Synechococcus*; y las clorofíceas del tipo 1, con *Chlamydomonas cf. coccooides*. A esta escala, las algas con fucoxantina y las criptofitas pasan a tener un papel secundario coincidiendo sus máximos en la fracción picoplanctónica con sus máximos aportes comunitarios, hecho que pudiera deberse al paso de algunas algas con dimensiones cercanas a las 3 micras, o incluso mayores, a través del filtro con ese mismo diámetro de poro. La circunstancia de que células con dimensiones mayores de los tamaños de poro nominal de los filtros empleados en el

separación de las poblaciones planctónicas aparezcan en fracciones en las que, teóricamente, deberían estar ausentes, no es inusual, siendo comentado por diversos trabajos (Anderson & Fenchel 1985, Stockner *et al.* 1990, Wright *et al.* 2009a). Estos trabajos dan a entender que durante el filtrado, algunas células pueden expresarse a través de poros por los que en circunstancias normales no pasarían. Argumentan además, que los filtros comúnmente empleados en el fraccionamiento de las muestras tienen siempre algún que otro poro de mayor tamaño que el nominal, por los que puede pasar un porcentaje, pequeño en principio, de células rígidas, como las diatomeas por ejemplo, que no pasaría por los poros normales.

En el estuario del Nervión, al igual que en otros muchos ambientes marinos tanto oceánicos como costeros y estuáricos, las prasinofíceas dominan el picoplancton (Díez *et al.* 2001a, Díez *et al.* 2001b, Biegala *et al.* 2003, Not *et al.* 2004, Romart & Vaultot 2004, Díez *et al.* 2004, Worden 2006, Vaultot *et al.* 2008), siendo el grupo que mayor aporte medio realiza a la clorofila *a* de esta fracción. Tal y como se ha explicado anteriormente este grupo tiene unos mayores aportes también para esta fracción en el primer muestreo de abril, sobre todo en la estación 2, y en los meses de agosto y septiembre, puede que influenciado por una menor cantidad de nutrientes en el agua. Finalmente, los grupos de las cianofitas, y clorofíceas, fueron importantes sobre todo a finales de abril, en consonancia con la hipótesis de una reducción de nutrientes al menos a comienzos de la primavera.

2.5. Conclusión

El grupo principal de algas verdes en la zona exterior del estuario del Nervión es el de las clorofitas, siendo otros grupos como el de las euglenofitas de escasa relevancia en términos de abundancia relativa, tanto pigmentaria como celular.

La abundancia relativa de las clorofitas es mayor en la fracción picoplactónica, en la que cabe destacar el papel predominante de las prasinofíceas sin prasinoxantina durante la primavera y el verano. Además, en esta fracción también las clorofíceas, junto con las cianobacterias, pueden llegar a tener aportes puntuales importantes al total de la clorofila *a*. Los máximos aportes de estos grupos tuvieron lugar a comienzos de

primavera y finales de verano, cuando tal vez la concentración de nutrientes en el agua fuera reducida tras floraciones de algas de mayor tamaño. Finalmente, las diatomeas y criptofitas tienen un papel secundario en esta fracción, coincidiendo con sus máximos a nivel poblacional. Es posible por tanto, que sus aportes a la clorofila *a* sean debidos al paso a través del filtro de 3 µm de algunas células de similar o mayor tamaño que éste.

A nivel de comunidad, durante el periodo de primavera y verano predominaron en la zona exterior del estuario del Nervión las algas con fucoxantina tales como las diatomeas, haptofitas y dictiocofíceas, seguidas en importancia por las algas con aloxantina, las criptofitas.

Como hipótesis de trabajo, puesto que se carece de datos de concentración de nutrientes, se plantea que la variación temporal de la abundancia de estas algas en la parte exterior del estuario, podría estar condicionada por una dinámica de floraciones tempranas a finales de invierno o comienzos de primavera, común en las aguas estuárico-costeras del País Vasco. Estas floraciones tempranas podrían mantener unos niveles bajos de nutrientes durante la primavera, favoreciendo una población de transición con predominio de formas nano- y picoplanctónicas, incluyendo las criptofitas, prasinofíceas, clorofíceas y cianobacterias como *Synechococcus*, mientras que, presumiblemente gracias a los aportes del río Nervión, se podrían llegar a dar nuevas floraciones durante el verano, sobre todo de algas con fucoxantina, en las que se alcanzaran concentraciones de clorofila *a* mayores que las de primavera. Hacia finales del verano las floraciones de algas de mayor tamaño podrían volver a agotar los nutrientes favoreciendo nuevos máximos en la abundancia de las algas nano- y picoplanctónicas, y de algunos taxones como los dinoflagelados, con capacidad para almacenar nutrientes o utilizar fuentes de materia orgánica como sustento.

CAPÍTULO 3

ABUNDANCIA Y COMPOSICIÓN DEL PICOFITOPLANCTON

3.1. Introducción

Una vez establecida la importancia de las algas verdes en la fracción picoplanctónica de la zona exterior del estuario del Nervión, se decidió estudiar la composición de esta fracción más en profundidad. Así, en el siguiente capítulo se exponen y se discuten de manera conjunta los resultados de la cuantificación de las algas del picoplancton y su distribución en grandes grupos y taxones específicos de algas verdes. Esto ha sido posible gracias al empleo de técnicas de microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo y de TSA-FISH. Los grandes grupos en los que estas técnicas permiten clasificar la población fitoplanctónica son, salvo en el caso de TSA-FISH, más de carácter funcional que taxonómico, debido a las limitaciones que a día de hoy dichas técnicas plantean a la hora de la identificación de las microalgas. Los citados grupos, pese a ser en gran medida dependientes de la técnica empleada, sirven para representar una realidad ecológica de la que poder así extraer conclusiones relevantes acerca de las poblaciones fitoplanctónicas.

3.1.1. Grupos picofitoplanctónicos diferenciados y cuantificados en base a su autofluorescencia

Tanto la citometría como la epifluorescencia, pese a requerir de instrumentación muy diferente para su empleo, tienen en común el basarse en la fluorescencia diferencial del fitoplancton para clasificarlo.

Las moléculas fluorescentes de las que estas técnicas dependen para la obtención de información pueden encontrarse en la naturaleza en distintos organismos y en el medio ambiente. En el caso de las microalgas, como en el de todas las células vegetales, éstas se encuentran fundamentalmente representadas por las clorofilas y otros pigmentos fotosintéticos accesorios tales como las ficobilinas. La fluorescencia producida por estos pigmentos propios de las algas forma lo que se llama su autofluorescencia. Esta fluorescencia intrínseca de las microalgas es diferente según los pigmentos que haya implicados en ella. Este hecho ha dado pie a que se empleen tanto la epifluorescencia (Johnson & Sieburth 1979, Van Leire *et al.* 1989, Miyazono *et al.* 1992, Masquelier &

Vaulot 2008, Masquelier *et al.* 2011, entre otros) como la citometría de flujo (Li 1995, Reul *et al.* 2006, Grob *et al.* 2007a, Grob *et al.* 2007b, Reul *et al.* 2008) en multitud de estudios ecológicos para la identificación y cuantificación de la abundancia de ciertos grupos planctónicos con señales autofluorescentes características.

En general, todas las algas con solo clorofilas como pigmentos fluorescentes dan una señal de fluorescencia roja bajo una luz azul, mientras que las algas que también cuentan con ficobilinas tienen señales distintas. Existen tres tipos principales de ficobilinas: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina (PE, PC y APC respectivamente, de sus siglas en inglés). Dependiendo de su ficobilina mayoritaria, la señal fluorescente de las algas es diferente. Así, las algas con PE en cantidades importantes dan una señal naranja bajo la luz azul, mientras que en las que abundan PC y/o APC producen una fluorescencia roja bajo una luz roja (Collier 2000, Marie *et al.* 2005). Entre las algas con PE y PC se hayan algunas cianobacterias, criptofitas, dinoflagelados y rodofitas, mientras que la APC solo se encuentra en algunas cianobacterias y en las rodofitas (Jeffrey & Wright 2006). Estos pigmentos también pueden aparecer en pequeñas concentraciones en algunas proclorofitas. Todas estas algas son susceptibles de estudiarse mediante estas técnicas debido a su autofluorescencia.

Sin embargo, hay ocasiones en las que las moléculas o células de interés no tienen una autofluorescencia significativa o carecen totalmente de ella. En estos casos se emplean moléculas fluorescentes, generalmente sintéticas, para marcar moléculas o características celulares de interés. Estos tintes fluorescentes reciben el nombre de fluorocromos y actualmente existe gran variedad de ellos en el mercado. Entre los más utilizados se encuentra el 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI de su abreviatura en inglés) que se une al ADN, marcando, en principio, todas las células con dicha molécula de una muestra, tanto eucariotas como procariotas. Utilizando tinciones de DAPI puede llegar a distinguirse entre ambos tipos de células, puesto que en las células eucariotas el núcleo aparece como un orgánulo azulado distinguible del cual carecen las procariotas (Masquelier & Vaulot 2008). Esta tinción ha sido ampliamente utilizada en multitud de estudios de epifluorescencia para poder cuantificar las células autótrofas del plancton en general, y es muy empleada, junto con la observación de la autofluorescencia para la identificación de las células y el fraccionamiento por tamaños para el estudio del estado

trófico de las poblaciones planctónicas (Sato *et al.* 2007, Masquelier & Vaultot 2008 y Yang *et al.* 2008 por citar algunos ejemplos actuales).

En cuanto a epifluorescencia se refiere, en el presente estudio se han empleado tanto la observación de la autofluorescencia como la tinción con DAPI para la cuantificación de las formas autótrofas, sin distinción entre eucariotas y procariotas, de la fracción picoplanctónica de la comunidad algal de la parte exterior del estuario del Nervión. Se eligió emplear esta técnica en combinación con la citometría de flujo porque, frente a esta última, la epifluorescencia permite: **(1)**, visualizar lo que se cuenta, de manera que el ojo experto puede llegar a diferenciar entre grupos taxonómicos en base a características morfológicas apreciables en las células teñidas con DAPI (como el núcleo y los cloroplastos por ejemplo), contando con la ayuda que la autofluorescencia ofrece respecto a su contenido pigmentario; y **(2)**, permite, según Masquelier y Vaultot (2008), distinguir organizaciones celulares tales como colonias y agrupar los organismos en distintas clases en base a su tamaño.

En la práctica sin embargo, y en cuanto al picoplancton se refiere, resulta a menudo difícil diferenciar claramente entre células procariotas y eucariotas, o reconocer taxones por su morfología debido al reducido tamaño de las células. Por esa razón, en los recuentos de epifluorescencia realizados durante el presente estudio únicamente se diferenciaron 2 grupos de microalgas atendiendo a su autofluorescencia. Por un lado, el picofitoplancton con PE, dominado por cianobacterias como se verá más adelante. Y por otro lado, el picofitoplancton sin PE, dominado por las eucariotas.

Por su parte, la citometría de flujo se aplicó al recuento de las muestras recogidas con el mismo propósito: la cuantificación de las distintas formas autótrofas de la población picoplanctónica. Pero a diferencia de la epifluorescencia, esta técnica permite la realización de recuentos automatizados de miles de células en cuestión de segundos, lo que da robustez estadística a los resultados y facilita la replicación de los recuentos. Además, evita la subjetividad inherente a los recuentos de epifluorescencia, aplicando unos criterios objetivos de clasificación en cuanto en tanto se pueden regular los umbrales de detección del citómetro. Siguiendo la metodología aplicada en este

estudio, esta técnica permite diferenciar, en base a su autofluorescencia y a parámetros de dispersión lumínica, las algas eucariotas y procariotas picoplanctónicas. Esto se debe a que las primeras tienen mayores valores de dispersión y fluorescencia roja de clorofilas (Gasol 1999). Además, en base a su señal de PE, los subgrupos que se pudieron distinguir dentro de esas categorías fueron: entre las algas procariotas, 2 grupos de cianobacterias, pertenecientes uno, al género *Synechococcus*, y el otro, presumiblemente al género *Prochlorococcus*; y otros 2 grupos entre las eucariotas, picofitoeucariotas sin PE y picofitoeucariotas con PE. Salvo estas excepciones, suele ser difícil, utilizando tan solo los parámetros de dispersión y autofluorescencia, hacer una clasificación más detallada que la meramente relativa al tamaño inferido mediante la dispersión y la relacionada con la presencia o ausencia de PE.

3.1.2. Taxones de algas verdes picoplanctónicas y su abundancia

Para estimar la abundancia de las algas verdes en la fracción picoplanctónica se empleó la técnica TSA-FISH (del inglés Tyramide Signal Amplification-Fluorescence *In Situ* Hybridization, hibridación fluorescente *in situ* con amplificación de señal mediante tiramida). Las técnicas FISH consisten en la detección *in situ* (en la propia célula o material genético) de secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante sondas complementarias portadoras de marcas fluorescentes. La naturaleza de las sondas, que pueden ser de ADN o ARN, depende en parte, aunque no necesariamente, de las secuencias que se quieran marcar: ADN nuclear, plastídial, mitocondrial, ARN ribosómico (ARNr) o mensajero (ARNm). Generalmente se emplean sondas de ADN por permitir una unión más estable entre sonda y secuencia objetivo.

Las aplicaciones de estas técnicas son múltiples y variadas, abarcando tanto la detección de genes y mutaciones específicas en el caso de sondas de ADN (Konac *et al.* 2003, Moroni *et al.* 2005), como el estudio de patrones de expresión celular y cuantificación de ARNm *in situ* con sondas específicas para estas moléculas (Robertson & Thach 2008, Schymura *et al.* 2010). Resulta especialmente interesante, en el contexto de este trabajo, su aplicación para la identificación y estudio de la composición taxonómica de comunidades microbiológicas utilizando sondas de ARNr (Amann *et al.* 1990b, Simon *et al.* 1995, Simon *et al.* 2000, Not *et al.* 2002, Biegala *et al.* 2003, Not *et al.* 2004, Massana *et al.* 2006).

Por ser tan extendido su uso, en este trabajo se emplean sondas de 18S ARNr para la estimación de la abundancia relativa de las algas picoplanctónicas del estuario del Nervión. En concreto la abundancia de las algas pertenecientes a la división Chlorophyta, las algas verdes más importantes en este estuario tal y como se desprende del anterior capítulo. Dentro de éstas, se han analizado las pertenecientes al orden Mamiellales y al género *Micromonas*.

Existen dos variantes principales de FISH (Simon *et al.* 2000): la variante tradicional y la variante de células completas (whole cell FISH). La variante tradicional hibrida las sondas sobre amplificadas por PCR de los genes diana adheridos a una membrana (dot blot) o en pocillos de una placa que contiene las sondas adheridas y a la cual se añade el amplificado. La variante de células completas hibrida las sondas en células en suspensión (FISH In Suspension), sobre un filtro, o bien sobre cortes citológicos de éstas.

Para cumplir con el objetivo propuesto, se ha utilizado una técnica de células completas, más adecuada para la cuantificación puesto que permite medir características de células individuales, y no valores cualitativos (presencia/ausencia) o semi-cuantitativos, como suelen ser los amplificados en el dot blot.

Las sondas de ARNr tienen algunas características que hacen su uso preferible frente a otras: **(1)**, las moléculas de ARNr difieren a lo largo de su tamaño en la conservación relativa de su secuencia, esto es, contienen zonas más conservadas evolutivamente y otras más variables (Amann *et al.* 1990b, Simon *et al.* 2000), lo que las hace adecuadas tanto para el diseño de sondas específicas a nivel de reino, división y clase, si tienen como objetivo las zonas más conservadas, o por el contrario a nivel taxonómico menor (familia, género o especie) si tienen como objetivo zonas poco conservadas; **(2)**, simplifican la tarea de identificación y cuantificación de especies picoplanctónicas al empleo de una sola técnica, cuando habitualmente solo la identificación ya requiere de una batería de ellas (Simon *et al.* 1995); **(3)**, no requiere del cultivo de las microalgas para su identificación, lo que permite estimar abundancias de especies que aún no se han podido cultivar; y **(4)**, las moléculas de ARNr son naturalmente amplificadas en las células debido al gran número de ribosomas que pueden llegar a tener, lo que permite que sondas con una sola marca fluorescente basten

para poder detectar las células (Wallner *et al.* 1993), evitando así los problemas relacionados con la amplificación PCR y la cuantificación de ADNr marcado (Amann *et al.* 1995, Simon *et al.* 2000).

Aún así, para estudios como éste, se hace necesario el empleo de técnicas de amplificación de la señal fluorescente en combinación con FISH. Esto se debe a que se analizan comunidades naturales en las que conviven poblaciones de células con contenidos de ARNr muy diferentes, ya sea debido a sus distintos tamaños, o ya sea porque el contenido de ARNr es variable no solo entre especies, sino también dentro de una misma especie dependiendo de la fase de crecimiento de las células (Wallner *et al.* 1993). Esta combinación es especialmente necesaria para la detección de las células picoplanctónicas de menor tamaño, por lo que en este trabajo se emplea el FISH en su variante de amplificación de señal mediante tiramida (TSA-FISH). Esta técnica implica la deposición de múltiples fluorocromos unidos a tiramidas (compuestos fenólicos) en la proximidad de sondas hibridadas que han sido marcadas con la enzima peroxidasa del rábano (HRP, del inglés Horse Radish Peroxidase), la cual cataliza esta deposición (Bobrow *et al.* 1989, Schönhuber *et al.* 1997, Speel *et al.* 1999, Biegala *et al.* 2003).

3.2. Material y métodos

-Procesamiento de las muestras para microscopía de epifluorescencia:

1. **Recogida, fijación y traslado:** se recogieron muestras de 250 ml de agua superficial en botellas de vidrio de color topacio de las estaciones 1 y 2 durante los meses de junio a septiembre de 2008 y 2010. Estas muestras se fijaron inmediatamente o bien con glutaraldehído al 0,5 % o bien con formaldehído al 1% de concentración final. Las muestras se mantuvieron en frío y oscuridad hasta su traslado al laboratorio, donde fueron almacenadas en un frigorífico hasta su procesamiento en los 2 días siguientes a su recogida.
2. **Filtración:** tras ser agitadas manualmente se filtraron 0,98, 1,8, 9,8 o bien 19,8 ml de muestra, dependiendo de la abundancia de plancton esperada, a través de filtros

de policarbonato negro de 0,2 μm de ancho de poro y 25 mm de diámetro (Osmonics Inc., EE. UU.) a una presión aproximada de 100 mm Hg.

3. **Tinción:** dependiendo del volumen filtrado se le añadió a todo, o a los últimos 1,8 ml, ya sobre el filtro, 0,02 ó 0,2 ml de DAPI ($100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), respectivamente, hasta conseguir una concentración final de $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Se dejó teñir durante 5 min la mezcla y se filtró.
4. **Montaje y conservación:** una vez filtrado todo el volumen, se montó el filtro sobre un portaobjetos y se le añadió una gota de aceite de inmersión para microscopía de baja fluorescencia Nikon 50 tipo A (Nikon Corporation, Tokio, Japón) antes de ponerle el cubreobjetos. Inmediatamente los filtros se guardaron en un congelador a -20°C hasta su posterior análisis, en unos pocos días generalmente, aunque algunas muestras se conservaron hasta 3 meses y medio antes de poder ser contadas.
5. **Recuento:** los recuentos se llevaron a cabo con un microscopio Leica DMRB (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemania) equipado con óptica para contraste de fases y epifluorescencia. Se contaron 40 campos al azar a 1000X empleando un objetivo PL FLUOTAR 100X (de la misma casa) y aceite de inmersión de baja fluorescencia, aplicado directamente sobre el cubreobjetos. Introduciendo la media de células $\cdot \text{campo}^{-1}$ a la siguiente ecuación se estimaba la abundancia en células $\cdot \text{l}^{-1}$ de los distintos grupos estudiados:

$$C_i = \frac{N * A_F * D}{A_C * V}$$

Donde C_i es la concentración en céls. $\cdot \text{l}^{-1}$ del grupo i del picoplancton; N , el número de céls. $\cdot \text{campo}^{-1}$; A_F , el área de filtrado, o lo que es lo mismo $\pi \cdot r^2$, donde r es la mitad del diámetro interno del embudo de filtración, en μm^2 ; D , el factor de dilución del fijador, que es igual a $1 + (\text{volumen de fijador} \cdot \text{volumen de muestra}^{-1})$; A_C , el área de un campo del microscopio a los aumentos empleados, en μm^2 ; y V , el volumen de muestra fijada que se ha filtrado, en litros.

-Procesamiento de las muestras para citometría de flujo:

La fijación, el almacenamiento y el análisis de las muestras son adaptados de Marie y colaboradores (1999) y Marie y colaboradores (2005).

1. **Recogida, traslado y fijación:** se recogieron mensualmente muestras de agua de 1 l en botellas de plástico (Nalgene®, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) de las estaciones 1 y 2 durante los meses de junio a septiembre de 2008 a 2010. Se mantuvieron en frío y oscuridad durante su traslado al laboratorio, donde fueron fijadas inmediatamente a su llegada con formaldehído al 1% de concentración final durante 15-20 min en el frigorífico (4-8°C).
2. **Almacenamiento:** tras su fijación, se alicuotaron 3 réplicas de 1,5 a 10 ml por cada estación, en tubos Eppendorf o viales Falcon, y se conservaron congeladas en N₂ líquido hasta su posterior análisis en los 4 meses siguientes, para el cual se dejaron descongelar a temperatura ambiente. La elección del volumen de réplica se basó en la disponibilidad de espacio para su conservación en N₂ líquido, pero es recomendable tener muestra en exceso por si fuera necesario repetir el análisis.
3. **Calibración del citómetro durante la campaña de 2008:** el análisis de las muestras de esta campaña se llevó a cabo con un citómetro EPICS Elite (Beckman Coulter®, California, EE. UU.) equipado con un láser azul de argón, que emite a una longitud de onda de 488 nm, y con los siguientes filtros: filtro de paso de banda (BP, del inglés Band Pass) BP 488 nm, para la detección de los parámetros de dispersión frontal o Forward Scatter (FS, mediante fotodiodo, canal FS) relacionado con el tamaño celular, y dispersión lateral o Side Scatter (SS, mediante fotomultiplicadores, al igual que el resto de parámetros, canal PMT1), relacionado con la complejidad celular; BP 525 nm, para la detección de la emisión verde de la fluoresceína (canal PMT2); BP 575 nm, para la emisión naranja de la PE (PE, canal PMT3); y un filtro de paso alto (LP, del inglés Long Pass) LP 610 nm para la emisión roja de las clorofilas (canal PMT4). Como paso previo al análisis de las muestras se puso a punto el citómetro empleando como controles cultivos de microalgas picoplanctónicas aisladas directamente del estuario del Nervión. Como control negativo de PE se empleó un cultivo de *Micromonas* sp., mientras que

como control positivo de este mismo pigmento se empleó una cepa de *Synechococcus* sp. Para la optimización de los parámetros de medida del citómetro se emplearon también microesferas fluorescentes, Fluoresbrite® Plain YG 1.0 Micron (Polyscience Europe GmbH, Eppelheim, Alemania), posteriormente éstas se emplearon como referencia interna para comparar poblaciones de distintos citogramas. Las condiciones de análisis elegidas se detallan en la Tabla 3.1. Para la cuantificación de los volúmenes de muestra analizados se calibró el flujo del citómetro mediante regresión lineal entre el tiempo de análisis de unas muestras de prueba y su volumen, determinado mediante la variación de peso de la muestra durante el análisis. En dichas muestras se dejó correr solo agua durante 3, 5, 7, 9 y 11 min respectivamente, y la diferencia de peso se obtuvo pesando las muestras antes y después del análisis. Una vez estimado el flujo, se pasaron las muestras a analizar midiendo el tiempo de análisis para poder inferir el volumen analizado de la ecuación: $V_{ana} = F \cdot t$, donde V_{ana} , es el volumen analizado; F, el flujo expresado en forma de unidad de volumen por unidad de tiempo, y t, el tiempo de análisis. Como fluido envolvente se empleó agua destilada. Las densidades de fitoplancton se obtuvieron al dividir el número de células detectadas entre el volumen analizado.

4. **Calibración del citómetro durante las campañas de 2009-2010:** en esta ocasión se empleó un citómetro Gallios (Beckman Coulter®, California, EE. UU.) equipado con un láser azul de argón de 488 nm) y con los siguientes filtros: BP 488 nm, para la detección de los parámetros de FS (mediante fotomultiplicadores al igual que el resto de parámetros, canal FS) y SS (Canal SS); BP 525 nm, para la detección de la señal de fluoresceína (canal PMT1); BP 575 nm, para la emisión de PE (canal PMT2); y BP 675 nm para la detección de la fluorescencia de las clorofilas (canal PMT4). Todos los filtros BP con un ancho de banda de ± 15 nm. Se puso a punto el citómetro empleando los cultivos de control y microesferas ya citadas. Para cuantificar los volúmenes analizados se pesó cada muestra antes y después del análisis ante la evidente falta de constancia en el flujo del citómetro. En este caso también se empleó agua destilada como fluido envolvente. Los parámetros de los detectores usados en el análisis se muestran en la Tabla 3.2.
5. **Generación de citogramas y recuento:** para cada réplica se generó un citograma empleando las condiciones de análisis descritas anteriormente y con el flujo de los

citómetros al máximo durante 5 min. Los datos así adquiridos se guardaron en forma de archivo de datos en modo de lista (.lmd). Posteriormente se emplearon los programas informáticos WINMDI 2.9 (<http://en.bio-soft.net/other/WinMDI.html>, J. Trotter) y Summit 4.3 (Dakko Colorado, Fort Collins, EE. UU.) para definir las distintas poblaciones observadas en las muestras y cuantificar cada una de ellas sabiendo el volumen de muestra analizado en cada caso.

6. **Determinación de las poblaciones picoplanctónicas a analizar:** además de los cultivos de control ya comentados se emplearon cultivos de diluciones seriadas (SDC, del inglés Serial Dilution Cultures) de las muestras recogidas para obtener citogramas en los que se pudieran identificar las poblaciones naturales. Estos cultivos se prepararon en placas de pocillos de poliestireno. En cada pocillo se añadían 1,8 ml de medio de cultivo f/2 y 0,2 ml de la muestra natural o de la dilución anterior. Así se prepararon 3 series de 4 diluciones decimales cada una (hasta diluir 10000 veces la muestra), tanto para la muestra sin filtrar como para la fracción $<3\mu\text{m}$ de cada estación y muestreo. Con todo esto se establecieron las siguientes regiones en los citogramas a analizar: por un lado, la correspondiente a las microesferas de referencia (Fig. 3.1. y 3.2., en amarillo), diferenciadas en base a su señal de fluoresceína y SS; y por el otro, en base a la fluorescencia de clorofilas y PE, y su FS, las distintas poblaciones comentadas en el apartado de resultados.

Tabla 3.1.: parámetros del citómetro EPICS Elite empleado para el análisis del picoplancton durante la campaña de 2008. Se muestran los distintos canales de detección (columnas) y sus respectivos parámetros de medida (filas). FS, Forward Scatter; y PMT#, fotomultiplicador numero #.

| Parámetro | Canal | | | | |
|------------------|-------|------|------|------|------|
| | FS | PMT1 | PMT2 | PMT3 | PMT4 |
| Voltaje | 750 | 350 | 636 | 750 | 820 |
| Ganancia | 20 | 3 | 10 | 10 | 10 |
| Ganancia de pico | 10 | - | 5 | 5 | 5 |

Tabla 3.2: parámetros del citómetro Gallios empleado para el análisis del picoplancton durante las campañas de 2009-2010. Se muestran los distintos canales de detección (columnas) y sus respectivos parámetros de medida (filas). FS, Forward Scatter; SS, Side Sactter; y PMT#, fotomultiplicador numero #.

| Parámetro | Canal | | | | |
|-----------|-------|-----|------|------|------|
| | FS | SS | PMT1 | PMT2 | PMT4 |
| Voltaje | 250 | 250 | 250 | 405 | 407 |
| Ganancia | 7,5 | 10 | 1 | 1 | 1 |

3.2.1. Protocolo general de TSA-FISH

Este protocolo general ha sido adaptado de los trabajos de Not y colaboradores (2002) y Biegala y colaboradores (2003).

-Diseño de las sondas: generalmente se hace aplicando un software como el ARB a una base de datos con secuencias de 18S ARNr algales. La especificidad de las sondas que el programa propone puede ser testada *in silico* gracias a aplicaciones públicamente disponibles en internet como el Ribosomal Database Project (RDP), Probe Check o el BLAST de GeneBank. Luego éstas se suelen pedir a casas comerciales que las venden ya marcadas, o sin marcar, de manera que se le añade la marca deseada y luego se purifican previo uso. En el presente estudio se emplearon sondas validadas en estudios previos (Tabla 3.3)

-Hibridación: las muestras recogidas, una vez fijadas, son concentradas por centrifugación o filtración, para luego ser deshidratadas mediante etanol, lo que elimina las clorofilas causantes de gran parte de la señal fluorescente de fondo (Simon *et al.* 2000) y permeabiliza las células favoreciendo la entrada de las sondas. A continuación, se les añade un medio de hibridación que lleva la sonda de ARNr y la mezcla se incuba a temperatura específica durante el tiempo necesario (condiciones dependientes de la sonda).

-Amplificación de la señal: tras la incubación se retiran las sondas no hibridadas con uno o varios lavados con un tampón similar al de hibridación de astringencia equivalente, y otro con TNT (lo que aumenta la relación señal/ruido). Después se les añade el medio de amplificación TSA y se incuban durante 30 min en la oscuridad. Tras lo cual se lavan los fluorocromos sobrantes con tampón TNT y, tras desechar éste, se añade un tinte de contraste para el ADN como DAPI o PI.

3.2.2. Protocolo de TSA-FISH utilizado en este estudio

El protocolo específico seguido en este trabajo ha sido adaptado de los trabajos de Not y colaboradores (2002) y Biegala y colaboradores (2002).

-Procesamiento de muestras naturales:

1. **Recogida:** se tomaron muestras de 10 l de agua superficial de las estaciones 1 y 2, con periodicidad más o menos mensual, durante los meses de julio a septiembre de 2010.
2. **Filtración:** 1 l de agua se destinó para el TSA-FISH y se filtró, a través de filtros de 3 μm de ancho de poro y 47 mm de diámetro (Nucleopore[®], Whatman International Ltd., Reino Unido), para separar la fracción picoplanctónica.
3. **Fijación:** 900 ml del volumen filtrado se fijaron con 100 ml de formaldehído al 10% (1% de concentración final) a 4° C durante 1 h.
4. **Filtración:** tras la fijación se filtraron 3 replicas por muestra, de 100 ml cada una, a través de filtros de 0,2 μm de poro y 47 mm de diámetro (Anodisk[®], Whatman International Ltd., Reino Unido).
5. **Deshidratación:** sin retirar el filtro del kitasatos, se realizó la deshidratación de éstos en una serie de disoluciones de etanol de graduación creciente (50%, 80% y 100%, 3 min. en cada una), que se filtraban para ser sustituidas.
6. **Almacenamiento:** tras la deshidratación se procedió al almacenamiento de los filtros en N₂ líquido o en cámara frigorífica a -80° C, sin partir y cada uno debidamente etiquetado y envuelto en papel de aluminio o en placa Petri sellada.

-TSA-FISH:

1. **Descongelación:** se descongelaron los filtros a temperatura ambiente y se partieron los pedazos necesarios (1 por sonda a hibridar y control a realizar) con unas tijeras, siempre manejando con pinzas los pedazos de filtro.
2. **Inicio de la hibridación:** a cada pedazo, ya colocados sobre portas, se les añadieron 10 o 20 μl según el tamaño, lo suficiente para que quedara

completamente empapado, de una mezcla de 50 μl de tampón de hibridación (ver Apéndice C) y 5 μl de sonda ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Alemania). La mezcla de tampón y sonda se realiza el mismo día de la hibridación para evitar la degradación de esta última.

3. **Incubación:** se llevó a cabo a 35°C y durante 3 h, manteniendo los portas en placas Petri, de 14 cm de diámetro, con papel empapado en 800 μl de tampón de hibridación, para saturar la atmósfera y así evitar la evaporación del tampón que empapaba las muestras.
4. **Lavado:** se realizaron 2 lavados a 37°C durante 20 min cada uno, con los pedazos en placas de pocillos de poliestireno, sumergidos en 5 ml de tampón de lavado precalentado a esa temperatura.
5. **Aclarado:** tras los lavados se realizó un aclarado con 5 ml de agua estéril durante 1 min.
6. **Equilibrado:** con 5 ml de tampón TNT (ver Apéndice C) durante 15 min y en una placa de pocillos distinta a la anterior.
7. **Amplificación de la señal:** tras trasladar los pedazos a portas distintos a los anteriores se les añadieron a cada uno 10 μl de mezcla TSA (ver Apéndice C) y se dejaron incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min.
8. **Lavado:** se realizaron, en las mismas placas del equilibrado, 2 lavados de 20 min cada uno, a 55°C , con 5 ml de tampón TNT precalentado a esa temperatura, para detener la reacción y lavar los reactivos sobrantes.
9. **Aclarado:** con 5 ml de agua estéril durante 1 min.
10. **Tinción con DAPI:** se añadieron 10 μl de DAPI ($5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) por pedazo y se incubaron durante 5-7 min, a oscuras y a temperatura ambiente.
11. **Lavado:** con 5 ml de agua estéril durante 10 min.

12. **Montaje:** los pedazos se dejaron secar en portas limpios y posteriormente se les añadió una gota de preservador de fluorescencia AF-1 (Citifluor Ltd., Canterbury University, Reino Unido) antes de ponerles el cubre y sellarlo con laca de uñas para evitar evaporación.
13. **Recuento:** los recuentos se llevaron a cabo a 1000X empleando el microscopio Leica DMRB y el aceite de baja fluorescencia comentados anteriormente. Se contaron 40 campos por pedazo, o un mínimo de 2000 células en el caso de las sondas de mayor categoría taxonómica.

3.2.3. Sondas empleadas en este estudio

Las sondas utilizadas fueron las siguientes (Tabla 3.3): el conjunto de sondas que debería marcar todas las células eucariotas (conjunto EUK o simplemente EUK, de aquí en adelante) compuesto por las sondas EUK1209R (Giovannoni *et al.* 1988), CHLO01 y NCHLO01 (Simon *et al.* 1995); la sonda CHLO02, específica para la división Chlorophyta (Simon *et al.* 2000); la sonda PRAS04, específica para el orden Mamiellales excepto el género *Dolichomastix* (Not *et al.* 2004); y la sonda MICRO01 específica para *Micromonas pusilla* (Not *et al.* 2004).

Tabla 3.3.: Sondas oligonucleotídicas de 18S ARNr empleadas en este estudio.

| Sonda | Especificidad | Secuencia | Fuente |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| EUK1209R | CONJUNTO EUK (Eukarya) | 5'-GGG CAT CAC AGA CCT -3' | Giovannoni <i>et al.</i> 1988 |
| CHLO01 | | 5'-GCT CCA CGC CTG GTG GTC-3' | Simon <i>et al.</i> 1995 |
| NCHLO01 | | 5'-GCT CCA CTC CTG GTG GTC-3' | Simon <i>et al.</i> 1995 |
| CHLO02 | Chlorophyta | 5'-CTT CGA GCC CCC AAC TTT-3' | Simon <i>et al.</i> 2000 |
| PRAS04 | Mamiellales | 5'-CGT AAG CCC GCT TTG AAC-3' | Not <i>et al.</i> 2004 |
| MICRO01 | <i>Micromonas pusilla</i> | 5'-AAT GGA ACA CCG CCG GCG-3' | Not <i>et al.</i> 2004 |

3.2.4. Variación en las réplicas de las muestras de verano de 2010

Las muestras recogidas, una vez procesadas como queda explicado en el apartado anterior, proporcionaron 3 réplicas para cada estación y mes (24 en total) en forma de filtros sobre los que aplicar el TSA-FISH. Debido a la gran cantidad de hibridaciones que hubiera requerido el análisis de todas las réplicas (4 hibridaciones por réplica, 96 en total, sin contar los controles), solo se analizó la octava parte de ellas, con la intención de obtener una idea aproximada de la variación entre réplicas. El análisis de las réplicas consistió en utilizar las mismas sondas en cada uno de los 3 filtros obtenidos para una misma estación y mes. El coeficiente de variación (C.V.) medio para las sondas empleadas, basado en el número de células por campo marcadas con las mismas sondas en distintos filtros, fue de un 33,7% (datos no mostrados), siendo el menor C.V. el de el conjunto EUK (20,26%) y el mayor el de la sonda CHLO02 (49,46%).

3.3. Resultados

3.3.1. Poblaciones picoplanctónicas detectadas en base a su autofluorescencia

Como ya se ha explicado, mediante la microscopía de epifluorescencia solo se pudieron diferenciar algas con y sin PE. Sin embargo, mediante la citometría de flujo se pudo profundizar en la composición de estos dos grupos. Así, entre las algas con PE se estableció una región basada en citogramas del cultivo control de *Synechococcus* sp. (Fig 3.1., A-D y Fig. 3.2., en azul) y otra que coincidía con la forma de cultivos de *Hemiselmis* sp. (datos no mostrados), y en forma y posición en los citogramas, con poblaciones de SDC con importante presencia de este género (Fig. 3.2., A y B, en rojo), por lo que se estableció esta región como la de las picofitoeucariotas con PE. En ambos casos, las poblaciones observadas en los cultivos monoalgales eran dos o incluso más en el caso de *Synechococcus* sp. en los SDC, evidenciando un heteromorfismo de las células en estos taxones (Fig. 3.1., A y C, Fig. 3.2., A y B).

En cuanto a las algas sin PE, se establecieron 2 regiones: una para las algas

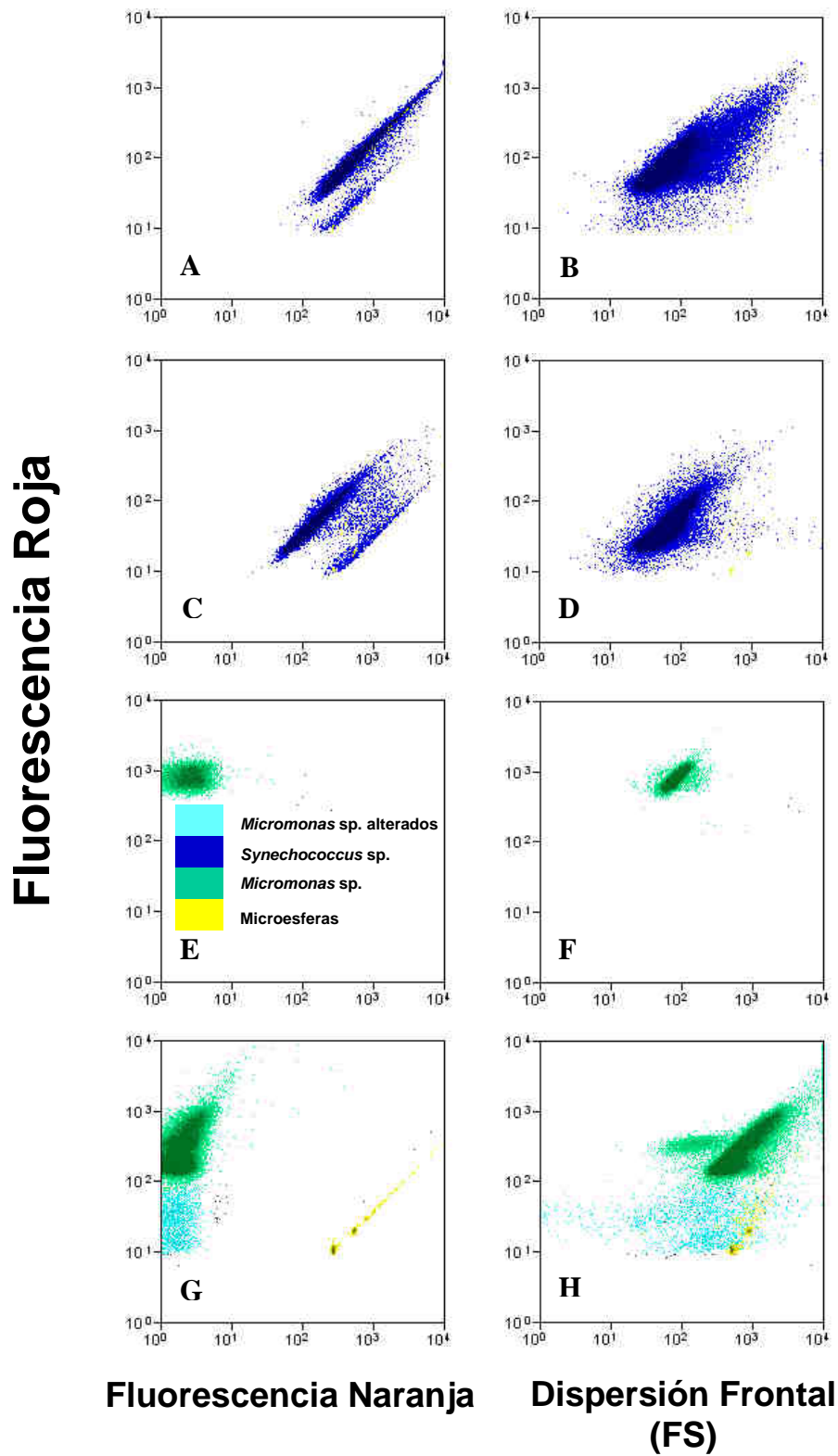


Fig. 3.1.: citogramas de cultivos de control de *Micromonas sp.* y *Synechococcus sp.*: cultivos de *Synechococcus sp.* vivo (A, B) y fijado (C,D) y un cultivo de *Micromonas sp.* vivo (E, F) e inmediatamente después de fijar (G, H). El eje de ordenadas muestra la señal de fluorescencia roja de las clorofilas mientras que los ejes de abscisas muestran la fluorescencia naranja de las ficoeritrinas (izquierda) y la dispersión frontal (derecha).

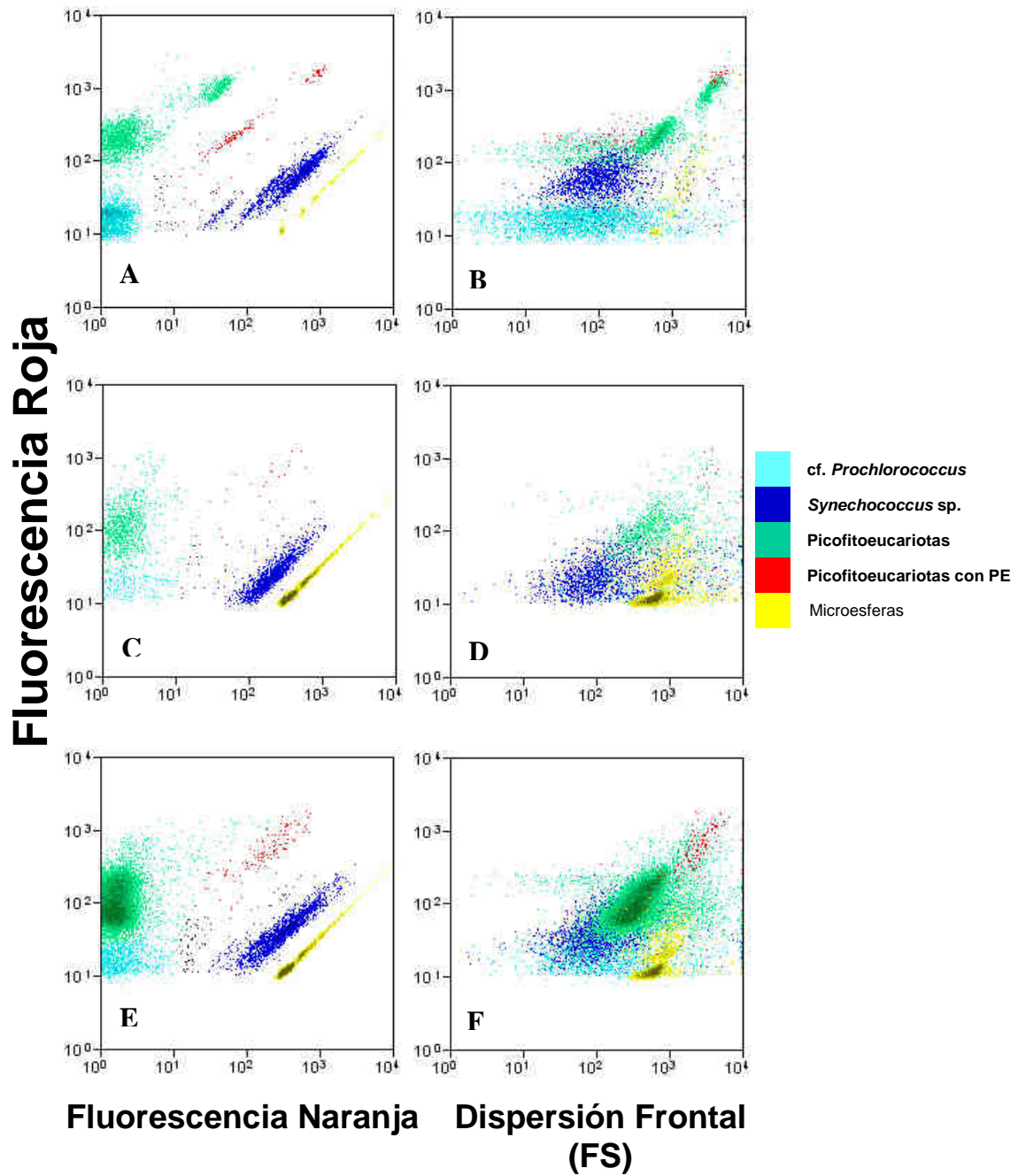


Fig. 3.2.: citogramas de cultivos de diluciones en serie (SDC) y de muestras naturales durante la campaña de 2010: SDC establecido a partir de una muestra de la estación 2 durante el mes de agosto (A, B); SDC de la estación 1 correspondiente al muestreo de julio (C, D); y citograma de una muestra natural de la estación 2, también del muestreo de agosto (E, F). Ejes igual que en la Fig. 3.1.

picoeucariotas (Figs. 3.1.-3.2., en verde), basadas en la dispersión de poblaciones del cultivo control de *Micromonas* sp. (Fig. 3.1., E-H) y de algas pertenecientes a esta categoría que aparecieron en SDC (Fig. 3.2., A y B, en este caso *Pyramimonas* sp. y cf. *Nephroselmis*), mientras que la otra región, que albergaría las poblaciones del género *Prochlorococcus* (Fig. 3.2., en azul verdoso), se definió en base a la literatura (Marie *et al.* 1999, Partensky *et al.* 1999b, Marie *et al.* 2005, Pan *et al.* 2005, Reul *et al.* 2006), pues no se disponía de cultivo control alguno, ni se identificó este alga en los SDC. Por otro lado, en cultivos de *Micromonas* sp. fijados al igual que las muestras naturales, con formaldehído al 1% de concentración final, se observó que células de esta especie sufren una alteración de sus propiedades ópticas tras la fijación, que hace que parte de su población quede dentro de la región establecida para *Prochlorococcus* sp. (Fig. 3.1., G y H), incluso con una señal de dispersión lateral similar a la de las células procariotas (datos no mostrados). Finalmente, todas estas poblaciones identificadas en los cultivos tuvieron su análoga en las muestras naturales analizadas (véase como ejemplo Fig. 3.2., E-F).

3.3.2. Hibridaciones de control con cultivos de algas aisladas del estuario

Se realizaron controles de hibridación para todas las sondas empleadas en este estudio. Las especies utilizadas para los controles, y sus respuestas teóricas ante las sondas empleadas fueron las siguientes: *Synechococcus* sp. (microalga procariota de la división Cyanophyta), negativa para EUK y el resto de sondas; *Nannochloropsis* sp. (microalga eucariota, perteneciente a la división Heterocontophyta y a la clase Eustigmatoficeae), positiva para el conjunto EUK y negativa para el resto; cf. *Nannochloris* (microalga eucariota, de la división Chlorophyta, de la clase Trebouxophyceae según Henley *et al.* 2004), positiva para EUK y para CHLO02 y negativa para PRAS04; y *Micromonas* sp. (Chlorophyta del orden Mamiellales), positiva para EUK y el resto de sondas.

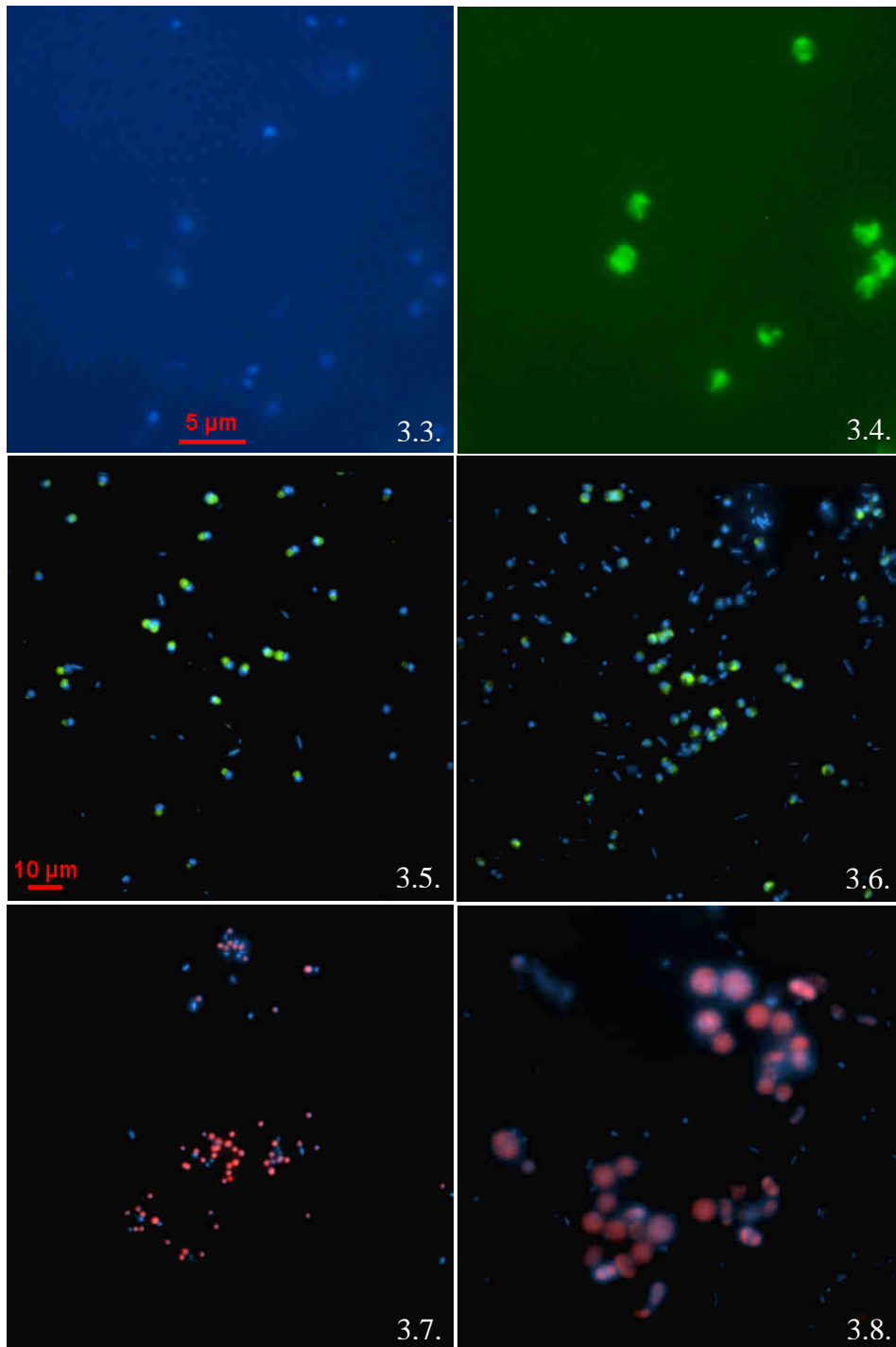
Además de estos controles también se realizaron con los mismos géneros los recomendados por el fabricante de las sondas, que consistían en una reacción de

hibridación sin sonda, y otra sin el paso de amplificación de la señal (TSA) para poder ver, respectivamente, la autofluorescencia de las células y la debida a su actividad peroxidasa endógena.

Los resultados de los controles fueron los esperados en el caso de los géneros *Micromonas* y *Synechococcus* (Figs. 3.3-3.7., resultados de sonda MICRO01 no mostrados). En el caso de *Micromonas* sp., la fluorescencia parecía estar más concentrada junto al núcleo de la célula, teñido con DAPI (puede que marcando los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso).

En los casos de *Nannochloropsis* sp. y cf. *Nannonchloris* no se apreció célula alguna que tuviera un marcaje de fluoresceína (Fig. 3.8.). Es más, la inmensa mayoría de las células aparecía sin apenas teñirse por el DAPI y conservando aún una autofluorescencia roja notable. El hecho de que estas células mantuvieran aún gran parte de su autofluorescencia debida a las clorofilas, indica que los baños de etanol de 3 min aplicados en el protocolo no fueron suficientes para hacer lavar las clorofilas de estas células. Dichos baños, se realizan con la intención de desestabilizar tanto la pared como la membrana celular aumentando la permeabilidad de las células hasta el punto de hacer posible la entrada de las sondas de ARN utilizadas. Por tanto, el hecho de que no se pudieran lavar las clorofilas es indicativo de que no se consiguió una permeabilización correcta de las células. Tanto la imposibilidad de una tinción adecuada con DAPI como con las sondas utilizadas para el FISH no hacen más que corroborar la idea anterior de una mala permeabilización.

En cuanto a los controles de autofluorescencia y peroxidasa endógena, éstos no se realizaron con *Synechococcus* sp. debido a que, al no dar fluorescencia alguna en el color del marcador de fluoresceína utilizado en estos experimentos, las pruebas realizadas con sondas valían también como controles. La fluorescencia de color rojo observada (Fig. 3.7) se debe a la autofluorescencia producida por las ficobilinas propias de este alga, que al ser hidrofílicas, a diferencia de las clorofilas, no se lavaron con los baños de alcohol. En el caso de *Micromonas* sp., los controles de actividad peroxidasa endógena mostraban una tenue señal de fluoresceína, de mucha menor intensidad que la que ofrecían las células marcadas con sondas (no mostrado).



Figs. 3.3.-3.8.: hibridaciones de control para las sondas empleadas en la técnica TSA-FISH.

Fig. 3.3.-3.4.: marcaje de un cultivo de *Micromonas* sp. mediante la sonda CHLO02. La Fig. 1 muestra la señal de fluorescencia del DAPI mientras que en la Fig 2 aparece la de la fluoresceína.

Fig. 3.5.-3.6.: el mismo cultivo de *Micromonas* sp. marcado mediante el conjunto de sondas EUK (Fig. 3.5.) y la sonda PRAS04 (Fig. 3.6.).

Fig. 3.7.: marcaje de un cultivo de *Synechococcus* mediante el conjunto de sondas EUK. Nótese el resultado negativo del marcaje de fluoresceína y la autofluorescencia de color rojo debida a las ficobilinas.

Figs. 3.3.-3.8.: hibridaciones de control para las sondas empleadas en la técnica TSA-FISH (Cont.).

Fig. 3.8.: marcaje de una mezcla de cultivos de cf. *Nannochloris* (células redondeadas rojas) y *Nannochloropsis* sp. (células cilíndricas rojas) en la que se puede apreciar como las células de ambos géneros han mantenido su autofluorescencia roja, mientras que apenas se han marcado para el DAPI y no muestran ninguna señal de fluorescencia.

Todas las figuras obtenidas a 1000X mediante microscopía de epifluorescencia. Figs. 3.3.-3.4. con la escala de la Fig. 3.3. y Figs. 3.5.-3.8. con la de la Fig. 3.5. Las Figs. 3.5.-3.8. representan fotografías fusionadas de un mismo campo, en cada una de ellas, observado con el juego de filtros para la visualización de la emisión azul del DAPI y la verde de la fluorescencia. Estas fotografías se obtuvieron con un microscopio Olympus BX41. Las células que solamente tienen fluorescencia azul son bacterias del cultivo.

3.3.3. Variación del protocolo de permeabilización

Tras la primera experiencia fallida con los controles de *Nannochloropsis* sp. y cf. *Nannochloris*, se intentó cambiar los tiempos de los baños de alcohol para ver si aumentándolos se conseguía una mejora en la permeabilización de las células. Así, se sometieron filtros con cultivos de *Nannochloropsis* sp. y cf. *Nannochloris* (en fase exponencial) a baños de alcohol de 6, 9, 12 y 15 min, respectivamente, seguidos de una tinción con DAPI tal y como detalla el protocolo (Fig. 3.9.). Los resultados de estas

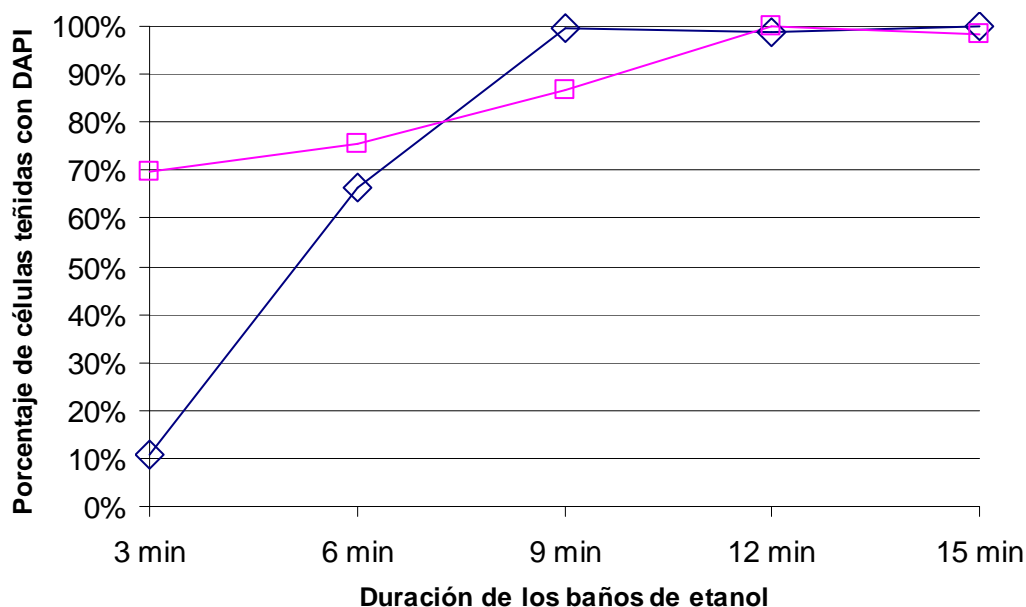


Fig. 3.9.: ensayo de aumento de permeabilidad a las sondas para FISH con células de cultivos de cf. *Nannochloris* y *Nannochloropsis* sp. Relación entre el tiempo de cada uno de los baños de etanol de graduación ascendente (eje X) y el porcentaje de células teñidas con DAPI (eje Y) en cada uno de los filtros de cultivos de cf. *Nannochloris* (rombos azules) y *Nannochloropsis* sp. (cuadrados magenta) utilizados en el ensayo. Para obtener cada uno de los porcentajes medios de tinción con DAPI se observaron 10 campos de cada filtro (cada uno con más de 160 células).

pruebas indicaron una mejora progresiva de la tinción con DAPI, hasta conseguirse una tinción total o casi total de las células de ambos cultivos con baños de 12 y 15 min, en lugar de los 3 min originales. Incluso así, gran parte de las células de cf. *Nannochloris* aún seguían conservando la autofluorescencia de las clorofilas (Figs. 3.10.-3.17.). Por tanto, el aumento en los tiempos de deshidratación favorecía la tinción, y en teoría, también la permeabilización. Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió hacer un ensayo de tinción FISH con cultivos de cf. *Nannochloris* y *Nannochloropsis* sp, usando por cada filtro, 3 baños de 15 min cada uno en lugar de los 3 min originales, pese a suponer un drástico aumento en el tiempo total del protocolo. El resultado de dichos ensayos ofreció una tinción positiva muy tenue en parte de las células diana y solo en el caso de *Nannochloris* (Figs. 3.18.-3.19.), por lo que terminamos desechando este procedimiento en la optimización del protocolo.

Pese a la indudable limitación que supone el que las sondas utilizadas en este estudio no sean capaces de marcar dos de las algas picoplanctónicas que se hayan con frecuencia en muestras recogidas en el estuario del Nervión, se decidió que sería bueno tener, aunque fuera sesgada, una noción del aporte, en cuanto a abundancia celular se refiere, que la división Chlorophyta hace al total de la comunidad picoplanctónica del estuario. Con ese objetivo se obtuvieron muestras de las estaciones 1 y 2 durante los meses de verano (junio-septiembre) del año 2009 por el procedimiento previamente descrito.

3.3.4. Mejora de la relación señal/ruido

Una vez aplicado el TSA-FISH, en algunos filtros se observaron resultados incongruentes. Estos resultados consistían en una estima de densidad de células de clorofitas mayor que las de eucariotas, hecho en principio imposible por definición, puesto que al ser la división Chlorophyta una categoría dentro del dominio Eukarya, todas las clorofitas deberían marcarse también con el conjunto EUK, específico para eucariotas. En este caso, la hipótesis de una permeabilización diferencial de las sondas no parecía adecuada, puesto que en pruebas hechas con cultivos de *Micromonas* sp. también se dio este tipo de incongruencia (Tabla 3.4., tratamiento con SDS al 0,01%),

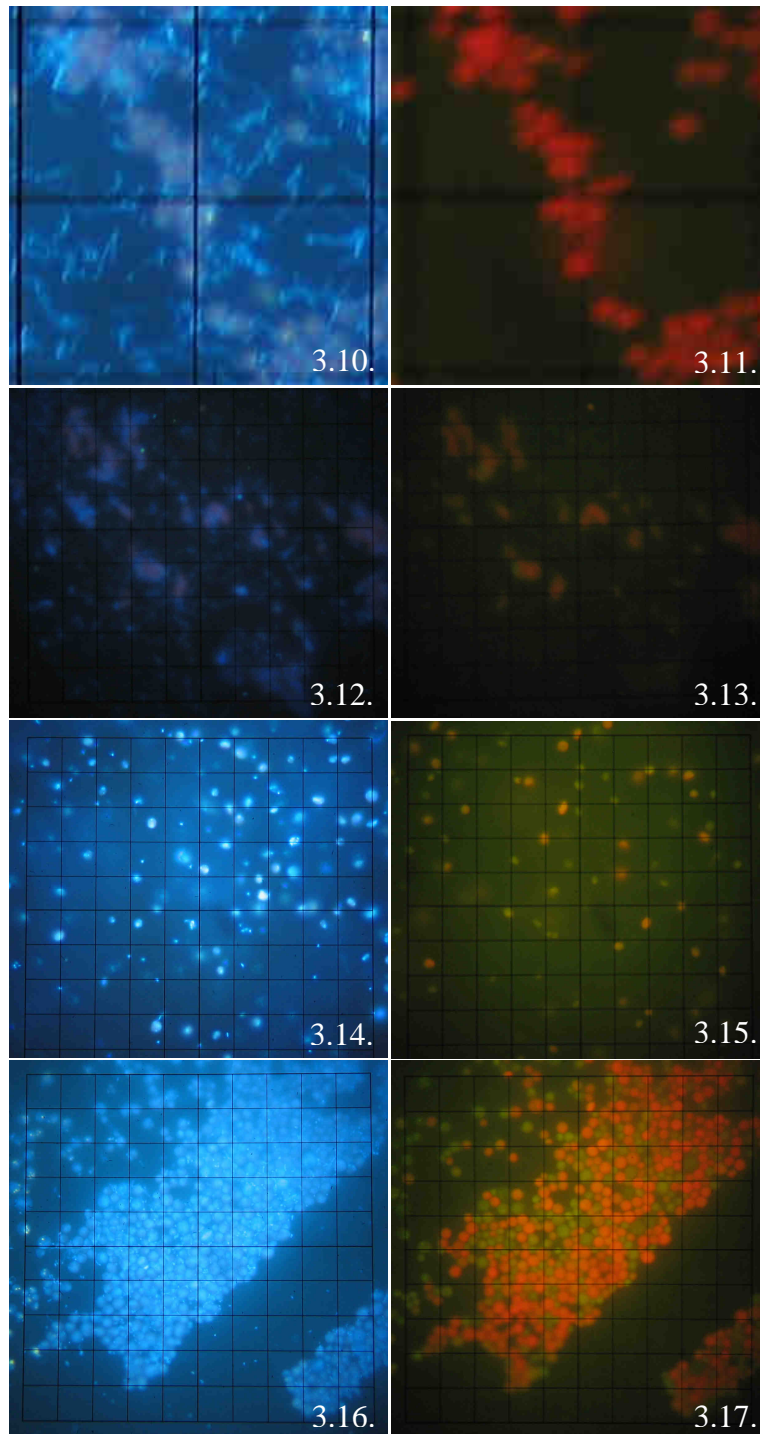


Fig. 3.10-3.17.: variación en la tinción mediante DAPI de células deshidratadas en baños de etanol de distinta duración. Células de un cultivo de cf. *Nannochloris* deshidratado en baños de etanol de graduación ascendente de 6 (Figs. 3.10.-3.11.), 9 (Figs. 3.12.-3.13.), 12 (Figs. 3.14.-3.15.) y 15 min (Figs. 3.16.-3.17.) de duración, respectivamente.

En las Figs. 3.10.-3.11., obtenidas a 400X, cada cuadrado de la retícula superpuesta tiene 25 μm de lado y en las Figs. 3.12.-3.17., obtenidas a 1000X, tiene 10 μm . Todas las Figs. obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. Las Figs. de la derecha muestran la señal de fluorescencia del DAPI y las de la izquierda la de autofluorescencia.

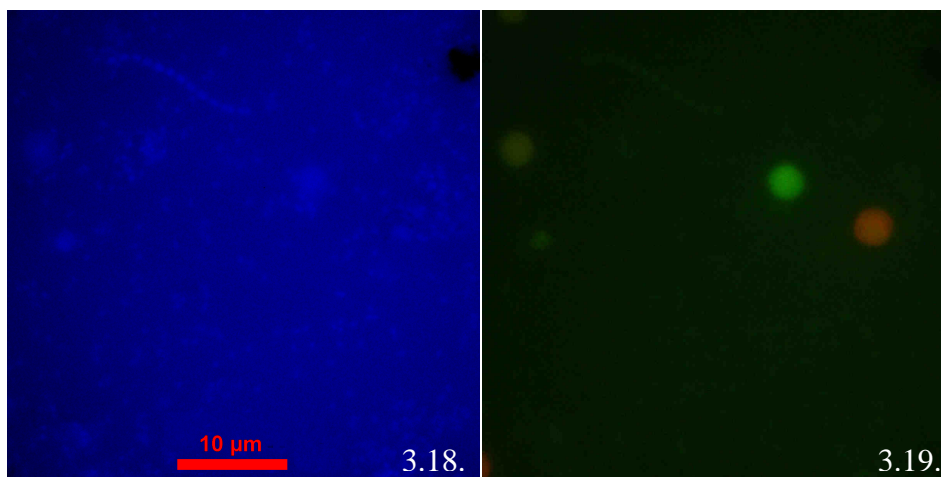


Fig. 3.18.-3.19.: marcaje parcial de cf. *Nannochloris*. TSA-FISH empleando la sonda CHLO02 sobre un filtro con un cultivo de cf. *Nannochloris* en fase exponencial deshidratado en baños de 15 min de etanol de graduación creciente. La Fig. 3.18. muestra la señal de DAPI de las células mientras que la Fig. 3.19. muestra las señales de la fluoresceína (verde) y la autofluorescencia remanente (rojo). Nótese el marcaje parcial con la fluoresceína.

Ambas figuras a la misma escala y obtenidas a 1000X mediante microscopía de epifluorescencia.

por lo que se atribuyó el fenómeno a las diferencias en la relación señal/ruido que se apreciaba entre las sondas. La fluorescencia de fondo de los filtros tras la hibridación, era, en general, mucho mayor en el caso de las células hibridadas con el conjunto EUK y la sonda PRAS04, por lo que se podía estar subestimando la abundancia de células eucariotas y del orden Mamiellales, no llegándose a contar las células con un marcaje más débil. La fluorescencia estaba también repartida de manera irregular en los filtros, siendo notablemente mayor respecto al fondo y más uniforme en zonas en las que las células parecían estar adheridas a tapices o placas (Figs. 3.30.-3.31.), quizá compuestos por cristales de algún ingrediente del medio de cultivo f/2 ó de SDS, formados al atemperarse los filtros empleados en las hibridaciones. Ambas soluciones, mientras se mantienen en la nevera, muestran cristales con forma laminada visibles a simple vista, que se disuelven cuando se calientan o atemperan, y es un hecho reconocido que la estructura de los cristales de SDS es plana y en forma de placa (Smith *et al.* 2004).

Para comprobar la hipótesis de subestimación por baja fluorescencia se decidió tratar de mejorar la señal de las sondas cambiando la concentración de SDS, tanto del tampón de hibridación como del de lavado, del 0,01 % original a un 0,1 %. El cambio surtió el efecto deseado aumentando la relación señal/ruido de las hibridaciones con EUK y PRAS04, como puede apreciarse en las Figs. 3.20.-3.33. A su vez se

consiguieron unas estimaciones de concentración celular mucho más similares entre sí, con un coeficiente de variación de 6,72%, frente al 19,7% conseguido con el protocolo original (Tabla 3.4.), y siendo las diferencias entre ellas estadísticamente irrelevantes. Para la comparación de las densidades obtenidas se realizaron varias Pruebas T para la igualdad de medias de muestras independientes mediante el programa SPSS Statistics 17.0.1 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.). En éstas, se compararon los valores de células por campo obtenidos en los recuentos de 40 campos realizados como control de la hibridación de las sondas (EUK, CHLORO02 y PRAS04) en cultivos de *Micromonas* sp. Se definió una variable de agrupación (SONDA) para comparar los datos obtenidos para cada sonda con los del resto, asignando cada valor a su respectivo grupo/sonda. Se compararon después las medias de cada grupo por parejas y en todos los casos el valor p fue mayor que 0,05 (datos no mostrados) lo que hace imposible desestimar la hipótesis nula de la igualdad de medias.

Tabla 3.4.: mejora de la detección mediante incremento de la concentración de SDS. Concentraciones de *Micromonas* sp. estimadas partiendo de hibridaciones de 3 de las sondas utilizadas en este estudio, junto con su coeficiente de variación (C. V.) y porcentaje de recuperación medio de células (columnas). Para el TSA-FISH se emplearon tampones de hibridación y de lavado con 0,01 y 0,1 % (m/V) de SDS respectivamente (primera columna y filas). Las concentraciones fueron estimadas a partir del número medio de células contadas en 40 campos de cada pedazo de filtro. Para el tratamiento de SDS 0,01% se contaron 2 pedazos de filtro para el conjunto de sondas EUK y la sonda CHLO02, y 3 pedazos para la sonda PRAS04. Con el tratamiento SDS 0,1% se contó 1 pedazo para cada una de las anteriores. Todas estas pruebas se realizaron partiendo del mismo cultivo fijado.

| Tratamiento | Concentración Estimada (Cél.s. / ml) | | | Media | C.V. (%) | Concentración Original (Cél.s. / ml) | Porcentaje de Recuperación Medio (%) |
|-------------|--------------------------------------|--------|--------|--------|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | EUK | CHLO02 | PRAS04 | | | | |
| SDS 0,01% | 342228 | 496436 | 381511 | 406725 | 19,7 | 2493333 | 16,31 |
| SDS 0,1% | 587687 | 610040 | 534493 | 577407 | 6,72 | | 23,16 |

Asimismo, se observó, en estas hibridaciones de control, que los porcentajes de recuperación medios de células marcadas no llegaban al 25% de la concentración inicial del cultivo filtrado, ni siquiera en los controles en los que se emplearon tampón de hibridación y de lavado con 0,1% de SDS (Tabla 3.4.). Teniendo en cuenta el escaso porcentaje de recuperación de células que la técnica ofrecía, interpretar los resultados de ésta en forma de estimaciones de la concentración celular en las muestras recogidas carecía de sentido, y por tanto, se han interpretado en forma de porcentajes de células marcadas pertenecientes a las categorías específicas de cada sonda.

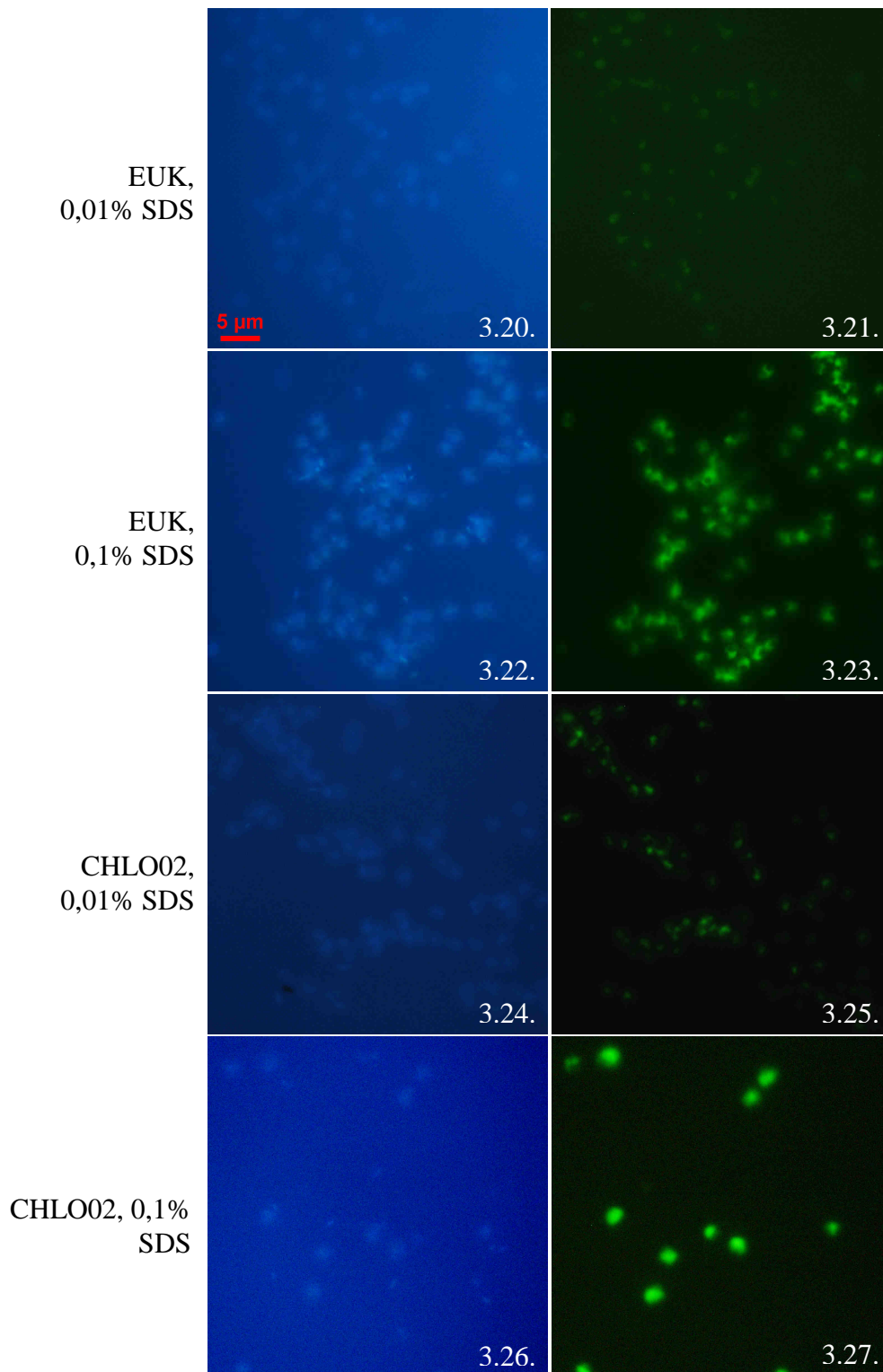


Fig. 3.20-3.33: hibridación con las distintas sondas empleadas con la técnica de TSA-FISH de un cultivo de *Micromonas* sp. Figs. 3.20.-3.21., 3.24.-3.25. y 3.28.-3.31., con 0,01% de SDS en tampones de hibridación y lavado; Figs. 3.22.-3.23., 3.26.-3.27. y 3.32.-3.33., con 0,1%. Las sondas empleadas en cada caso así como la concentración de SDS aparece al margen de cada par de Figs. Las Figs. pares muestran la señal fluorescente del DAPI, mientras que las impares muestran la señal de la fluorescencia de las células de un mismo campo. Nótese la señal de fluorescencia más potente e uniforme en las células adheridas a placas en las Figs. 3.30. y 3.31.

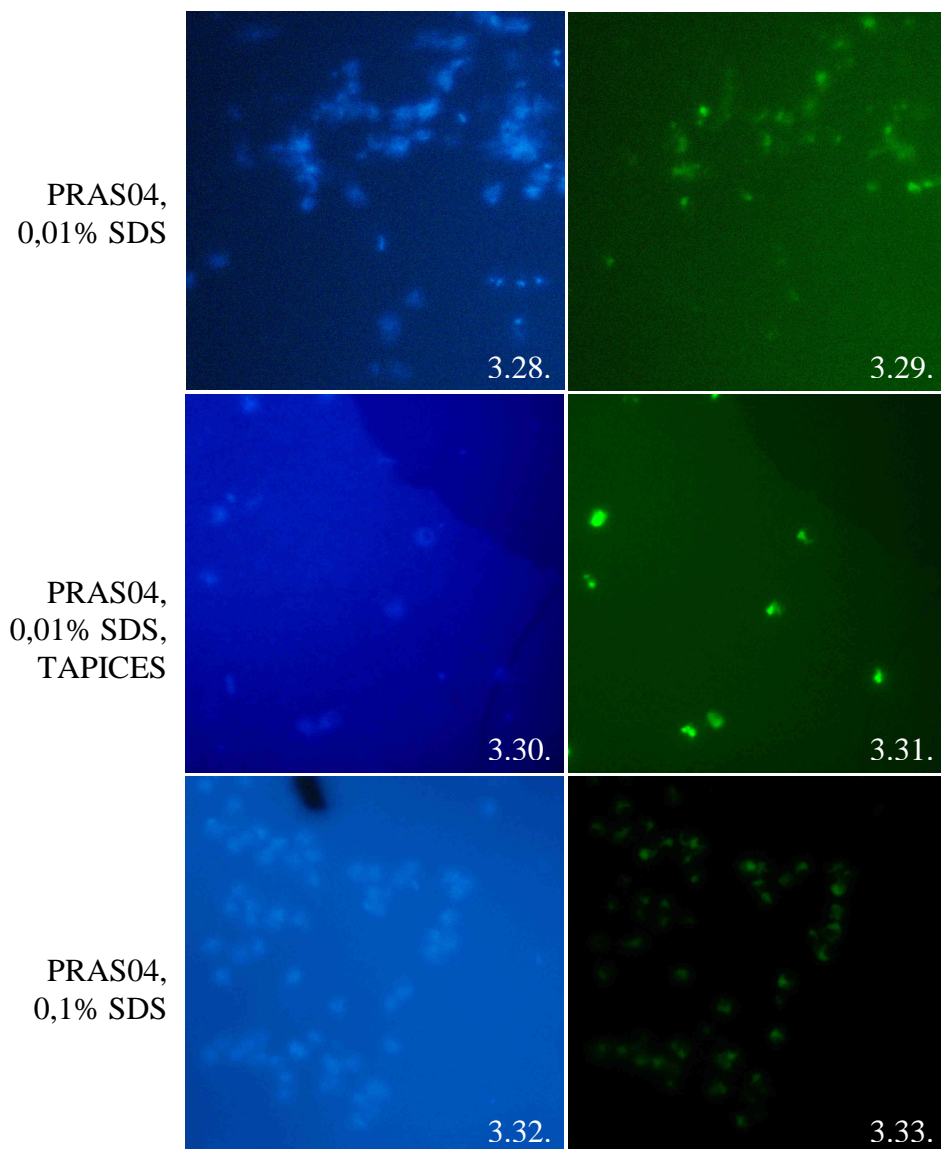


Fig. 3.20-3.33.: hibridación con las distintas sondas empleadas con la técnica de TSA-FISH de un cultivo de *Micromonas* sp. (Cont.). Todas las figuras con la misma escala que la Fig. 3.20. y obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. Figs. 3.21., 3.25., 3.29. y 3.31. con 800 ms de exposición mientras que el resto de figuras tiene 200ms. Las sondas usadas en cada caso así como la concentración de SDS aparecen al margen de cada par de figuras.

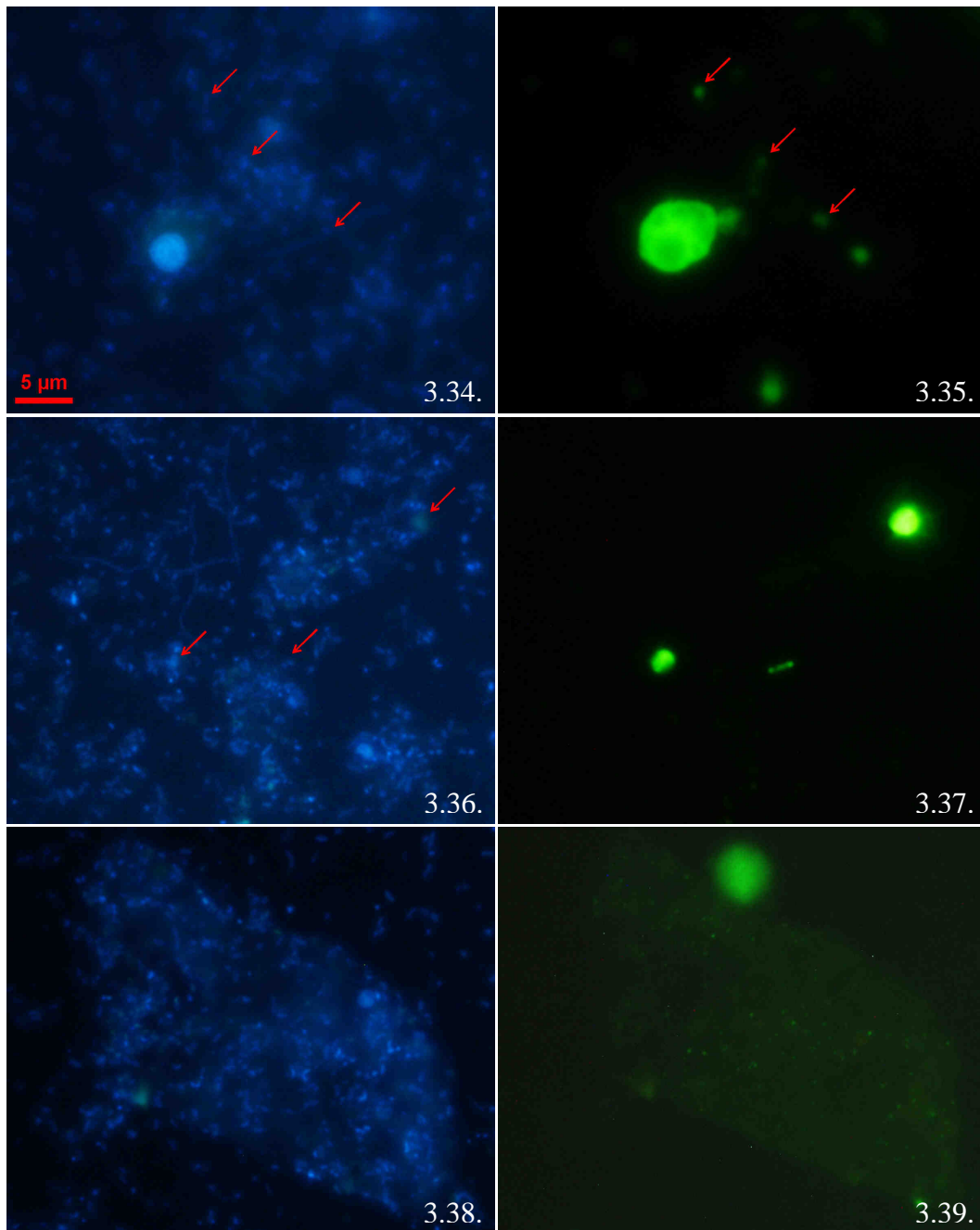
3.3.5. Marcaje inespecífico

Una vez solucionados los problemas derivados de la excesiva fluorescencia de fondo en las hibridaciones se estimó apropiado el estado de la técnica para emplearla con muestras naturales. Con esa intención se recogieron muestras nuevamente durante el verano de 2010 para realizar las estimaciones de los taxones marcados y de nuevo se

encontraron problemas, pero en este caso relacionados con la fluorescencia inespecífica que en las hibridaciones podía estar dando lugar a células no objetivo marcadas con fluoresceína. Para esta campaña además de con el resto se realizaron hibridaciones con la sonda MICRO01, específica para *Micromonas pusilla*,

Resultó imposible discernir, basándose solamente en el marcaje fluorescente, si todas las células marcadas pertenecían o no a las categorías de las sondas empleadas en este estudio. Excepto para la sonda MICRO01, cuyas células resultaron identificables mediante las señales fluorescentes de DAPI y de fluoresceína en conjunto, pues de esta especie se disponía de cultivos unialgales con los que se habían realizado pruebas de FISH. Por tanto, se utilizaron inicialmente 2 formas de contar las muestras: la primera, consistía en contar todas las células marcadas con fluorescencia verde debida a las sondas; y la segunda, en contar de manera exclusiva las células que tenían un marcaje más intenso, las cuales a juzgar por los estudios previos consultados en la bibliografía (Wallner *et al.* 1993, Simon *et al.* 1995 y Simon *et al.* 2000) deberían albergar la mayoría de las células específicamente marcadas. El umbral de fluorescencia a partir del cual se consideraron marcadas específicamente las células fue subjetivo y sujeto al observador, como no podía ser de otra manera tratándose de recuentos visuales realizados directamente con el microscopio sin ningún tipo de ayuda de análisis de imagen. De cualquier manera, estos recuentos fueron realizados siempre por el mismo observador, lo que reduce la variabilidad de dicho umbral. Para una idea de la diferencia de intensidad en el marcaje presuntamente inespecífico frente al específico de las células véanse las Figs. 3.34.-3.35.

En todas las hibridaciones realizadas se han observado células marcadas inespecíficamente. Dicho de otro modo, entre todos los valores de densidad celular (cél. · campo⁻¹) obtenidos para las distintas sondas utilizadas en este estudio han resultado ser menores los pertenecientes a los recuentos de las células con mayor fluorescencia, a las que a partir de aquí nos referiremos como células marcadas específicamente, obviando el pequeño porcentaje de células marcadas intensamente de manera inespecífica, que de hecho existe como se pudo observar por alguna posible diatomea o tapiz bacteriano marcado de manera extraordinaria con la sonda MICRO01 (Figs. 3.36.-3.39.).



Figs. 3.34.-3.39.: marcaje inespecífico durante la aplicación de la técnica TSA-FISH.

Fig. 3.34.-3.35.: células marcadas con el conjunto de sondas EUK. Las células señaladas mediante flechas son una muestra de la población marcada con menor intensidad y, supuestamente, de manera inespecífica.

Fig. 3.36.-3.37.: células marcadas con el conjunto de sondas MICRO01. Mediante flechas se señalan 2 células de *Micromonas* sp. y una posible diatomea marcada de manera inespecífica.

Fig. 3.38.-3.39.: un tapiz bacteriano marcado ligeramente en muestras hibridadas con la sonda MICRO01.

Todas las Figs. obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia y con la escala de la Fíg. 3.34. Las Figs. de la derecha muestran la señal de DAPI y las de la izquierda, las señales de fluorescencia de idénticos campos.

Los porcentajes de células marcadas de manera débil, y en principio inespecífica, fueron altos para todas las sondas (Fig. 3.40.) pero fueron mayores para las sondas con mayor espectro taxonómico. Así, para el conjunto de sondas EUK y la sonda CHLO02, un 84,57% y un 72,93% de las células que marcaron quedó por debajo de lo que se consideró como específicamente marcado frente a un 36,74% y un 43,02% para las sondas PRAS04 y MICRO01 respectivamente.

En cuanto a la relación de los valores obtenidos mediante ambas maneras de contar, se emplearon las siguientes herramientas estadísticas para determinar la existencia de diferencias significativas en las abundancias relativas estimadas: en los casos en los que la distribución de los datos se aproximaba a la normal, según el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov, se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA) de un factor; y en los casos en los que la normalidad no era atribuible a los datos, se utilizaron pruebas U de Mann-Whitney. Como factor para el ANOVA se creó una variable que reflejara numéricamente la sonda y la manera de contar las células empleadas en cada caso. Por lo tanto este factor tenía 8 categorías numéricas correspondientes a cada una de las 2 maneras de contar las células marcadas con cada una de las 4 sondas empleadas en este estudio. También para la realización de las ANOVAs se unieron los datos de abundancia (cél. · campo⁻¹) mediante variables de agrupación que correspondían a las muestras analizadas (las categorías del eje de abscisas de la Fig. 3.40.). Las comparaciones entre maneras de contar lo marcado por una misma sonda se realizaron mediante las pruebas *post hoc* de comparaciones múltiples de T2 de tamhame, T3 de Dunnet, Games-Howell y C de Dunnet, puesto que el test de homogeneidad de varianzas de Levenne indicaba que las estimaciones no cumplían el criterio de homocedasticidad, esto es, no tenían una varianza igual.

Entre los resultados obtenidos cabe destacar que prácticamente en la totalidad de los casos existieron diferencias significativas, a excepción de los de la sonda PRAS04 en las muestras de junio de la estación 1 y la 2 (Fig. 3.40.). Aunque la variación entre muestras puede ser similar, las diferencias observadas impiden que se pueda emplear indistintamente una manera de contar u otra para estimar la abundancia relativa de las categorías taxonómicas marcadas, por lo que se optó por el recuento de las células más brillantes como mejor método para la estimación de dicha abundancia.

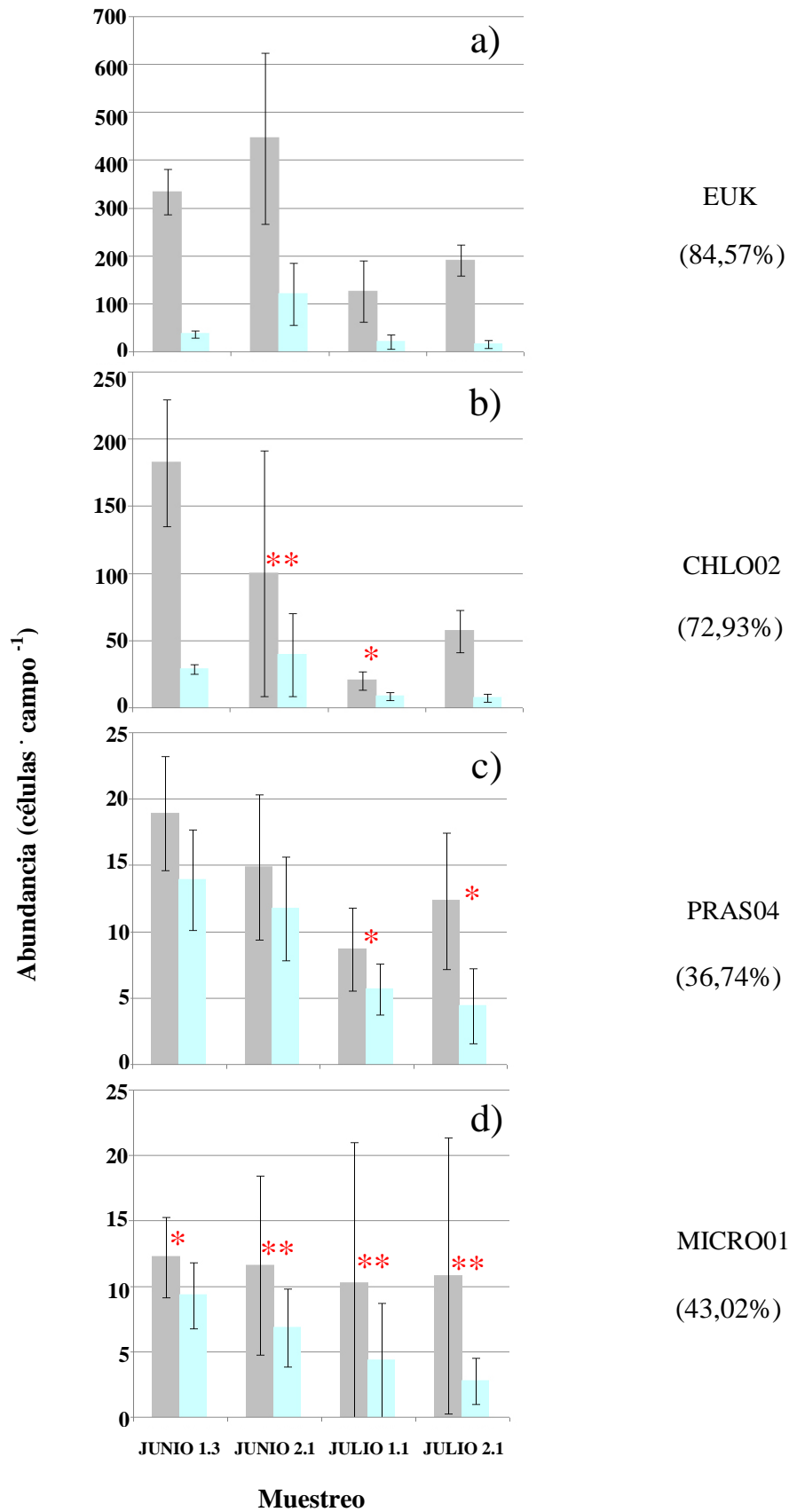


Fig. 3.40.: resultados de dos maneras de estimar la abundancia relativa de Chlorophyta, Mamiellales y *Micromonas* sp., en el estuario del Nervión en muestras del verano de 2010. Continúa en la página siguiente.

Fig. 3.40.: resultados de dos maneras de estimar la abundancia relativa de *Chlorophyta*, *Mamiellales* y *Micromonas sp.*, en el estuario del Nervión en muestras del verano de 2010. (Cont.): Abundancia (células \cdot campo⁻¹, eje de ordenadas) estimada para algunas de las muestras obtenidas durante los meses de junio y julio de 2010 (eje de abscisas) mediante TSA-FISH. Se muestran las células hibridadas con el conjunto de sondas EUK (a), y las sondas CHLO02 (b), PRAS04 (c) y MICRO01 (d). La columna derecha de cada pareja representa los valores obtenidos contando todas las células marcadas, mientras que la de la izquierda muestra los valores obtenidos contando solo las células marcadas específicamente (más brillantes). En los casos en los que las barras de error se superponen, los asteriscos indican: *, una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de las abundancias estimadas, apreciada mediante pruebas paramétricas para la comparación de medias (ver texto) y, **, una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en las pruebas no paramétricas, con la excepción de la diferencia entre los valores obtenidos para la sonda PRAS04 en la muestra de la estación 1 de junio para los que solo la prueba de Games-Howell detectó diferencias significativas. Los valores entre paréntesis al pie de cada sonda indican el porcentaje de células marcadas de manera débil y consideradas como células marcadas inespecíficamente.

3.3.6. Abundancia del picofitoplancton según su autofluorescencia

En general, los máximos de abundancia detectados mediante epifluorescencia se dieron en julio y agosto (Fig. 3.41.). Las concentraciones para el año 2008 fueron habitualmente menores, no llegando a alcanzar 10^7 céls. \cdot l⁻¹, mientras que en 2010 se llegaron a alcanzar densidades de $1,87 \cdot 10^7$ céls. \cdot l⁻¹ en agosto en la estación 2 por parte del picofitoplancton sin PE (Tabla 3.5.). En general, las concentraciones registradas para el picofitoplancton con PE, compuesto principalmente por cianobacterias, son mayores que las registradas para las algas sin este pigmento, salvo en los meses de agosto y septiembre de 2010 en ambas estaciones. Este predominio es más claro en la campaña del 2008 en la que algunos meses no se llegó a detectar mediante epifluorescencia otro picoplancton que no fuera cianobacteria.

Tabla 3.5.: parámetros de las poblaciones de microalgas picoplanctónicas con y sin ficoeritrina (PE) estimadas mediante epifluorescencia en muestras de los veranos de 2008 y 2010 para las estaciones 1 y 2. Máximos y mínimos (céls. \cdot l⁻¹) registrados y porcentaje relativo respecto al total de células de cada estación (E1 y E2).

| Parámetro | Estación | Picofitoplancton sin PE | Picofitoplancton con PE |
|-------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|
| Máximo | E1 | $9,74 \cdot 10^6$ | $1,13 \cdot 10^7$ |
| Mínimo | | 0 | $4,6 \cdot 10^5$ |
| Porcentaje relativo (%) | | 37,32 | 62,68 |
| Máximo | E2 | $1,87 \cdot 10^7$ | $7,59 \cdot 10^6$ |
| Mínimo | | 0 | $1,38 \cdot 10^6$ |
| Porcentaje relativo (%) | | 46,13 | 53,87 |

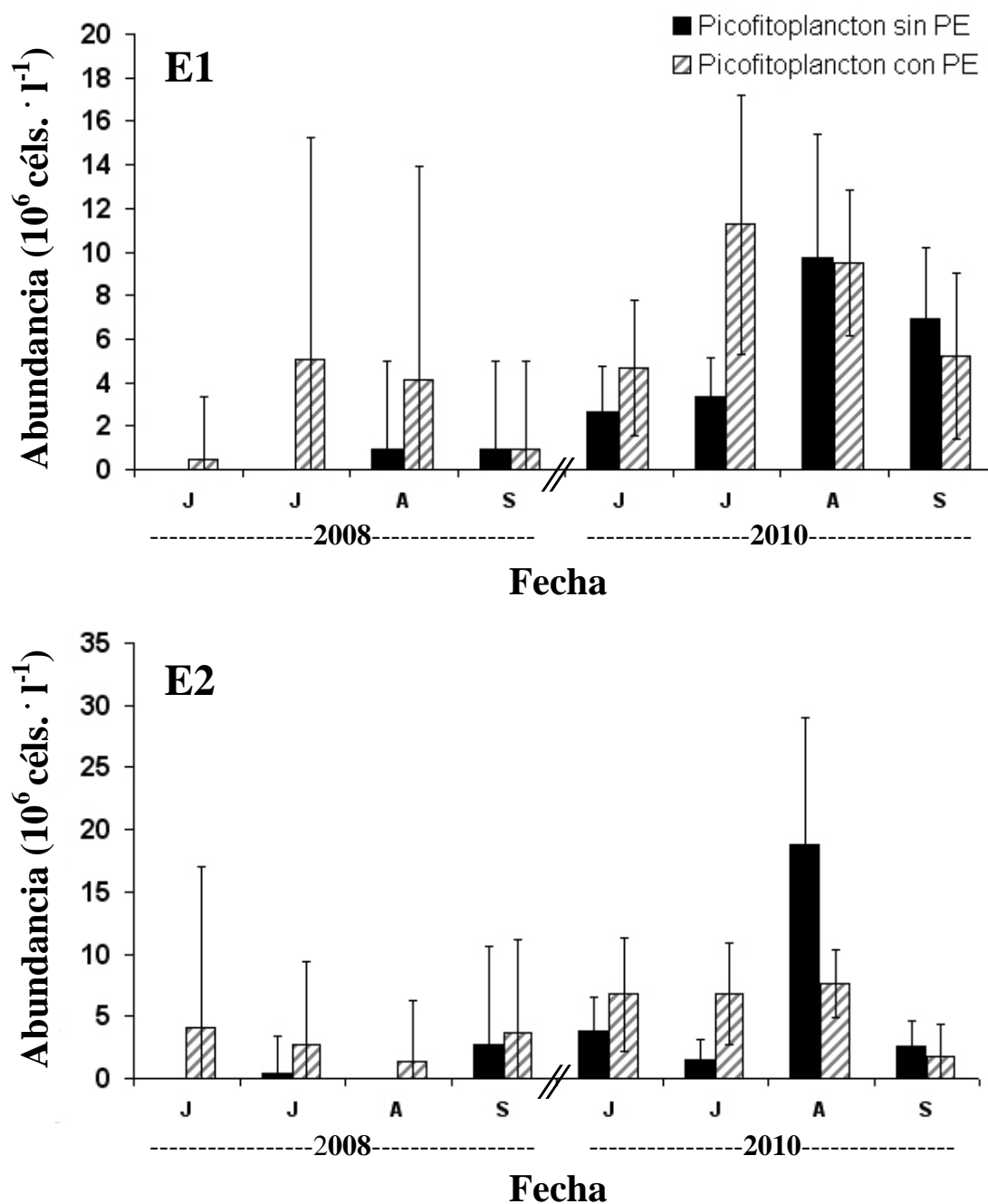


Fig. 3.41.: densidades celulares de las poblaciones de microalgas picoplanctónicas detectadas mediante epifluorescencia durante los veranos de 2008 y 2010 en las estaciones 1 y 2 (E1 y E2).

Las algas sin PE alcanzaron el máximo de densidad comentado anteriormente, y además supusieron un 37,32 y un 46,13% de las células estimadas para las estaciones 1 y 2 respectivamente. Por su parte, los algas con PE llegaron a su máxima densidad en la estación 1 en julio del 2010 con $1,13 \cdot 10^7$ céls. \cdot l^{-1} , llegando a comprender el 62,68 y el 53,87% de las células estimadas para las estaciones 1 y 2, respectivamente.

Al aplicar citometría también se detectó un aumento de las densidades

fitoplanctónicas estimadas entre los años 2008 y 2010 (Fig. 3.42.), asimismo los máximos de abundancia se dieron en julio y agosto para todos los grupos cuantificados, a excepción de 2008, año en que los picoeucariotas con PE tuvieron su máximo en septiembre en la estación 1, y *Synechococcus* en la estación 2 durante este mismo mes.

En general, las concentraciones estimadas mediante citometría fueron mucho mayores que las detectadas mediante epifluorescencia, con valores que superaron habitualmente las 10^6 céls. \cdot l⁻¹ para las dos poblaciones principales. Éstas fueron la de los picoeucariotas sin PE, que llegó a alcanzar $1,04 \cdot 10^8$ céls. \cdot l⁻¹ en la estación 2 en agosto de 2010, y la de *Synechococcus* con un máximo de $2,98 \cdot 10^7$ céls. \cdot l⁻¹ en la estación 1 el mismo mes (Tabla 3.6.). Las picoeucariotas sin PE supusieron un 64,52 y el 72,12% de las células, estimadas para las estaciones 1 y 2 respectivamente. Por su parte las algas del género *Synechococcus* fueron el 25,72% de las estimadas para la estación 1 y el 18,66% para la 2.

Las poblaciones de picofitoeucariotas con PE y posibles *Prochlorococcus* no llegaron a alcanzar densidades mayores de $1,2 \cdot 10^7$ céls. \cdot l⁻¹, siendo la presencia de las primeras casi testimonial, con cerca de un 0,75% de todas las células estimadas para cada una de las estaciones, mientras que las posibles *Prochlorococcus* supusieron un 9 y un 8,5%, aproximadamente, para las estaciones 1 y 2 respectivamente. Por otro lado, las picoeucariotas con PE alcanzaron una densidad máxima de $1,15 \cdot 10^6$ céls. \cdot l⁻¹ en agosto de 2010 en la estación 2, mientras que la posible población de *Prochlorococcus* alcanzó $1,18 \cdot 10^7$ céls. \cdot l⁻¹ en septiembre del mismo año en la estación 1.

Tabla 3.6.: parámetros de las poblaciones de microalgas picoplanctónicas estimadas mediante citometría de flujo en muestras recogidas durante los veranos de 2008-2010 para las estaciones 1 y 2. máximos y mínimos (céls. \cdot l⁻¹) registrados y porcentaje relativo respecto al total de células de cada estación (E1 y E2).

| Parámetro | Estación | <i>Prochlorococcus</i> spp. | <i>Synechococcus</i> spp. | Picofitoeucariotas sin PE | Picofitoeucariotas con PE |
|-------------------------|----------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Máximo | E1 | $1,18 \cdot 10^7$ | $2,98 \cdot 10^7$ | $7,99 \cdot 10^7$ | $1,01 \cdot 10^6$ |
| Mínimo | | $1,05 \cdot 10^5$ | $2,83 \cdot 10^5$ | $1,85 \cdot 10^5$ | 0 |
| Porcentaje relativo (%) | | 8,98 | 25,72 | 64,52 | 0,78 |
| Máximo | E2 | $9,65 \cdot 10^6$ | $1,9 \cdot 10^7$ | $1,04 \cdot 10^8$ | $1,15 \cdot 10^6$ |
| Mínimo | | $2,09 \cdot 10^5$ | $1,56 \cdot 10^5$ | $1,24 \cdot 10^6$ | $1,42 \cdot 10^3$ |
| Porcentaje relativo (%) | | 8,49 | 18,66 | 72,12 | 0,74 |

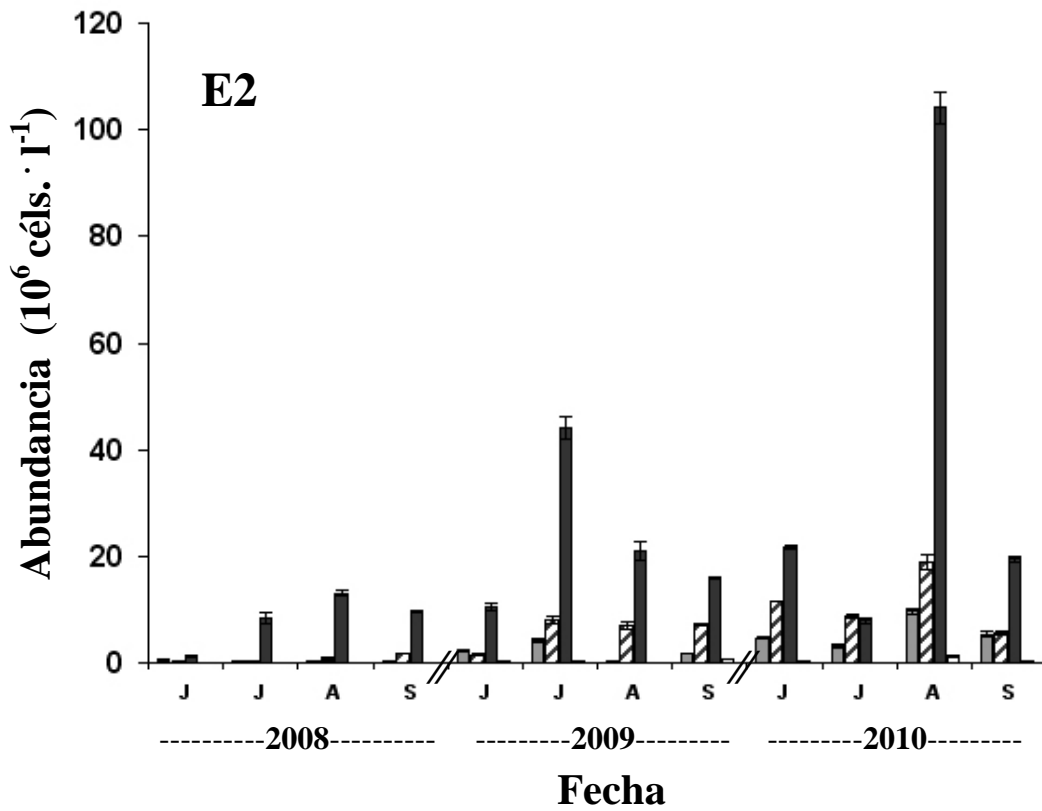
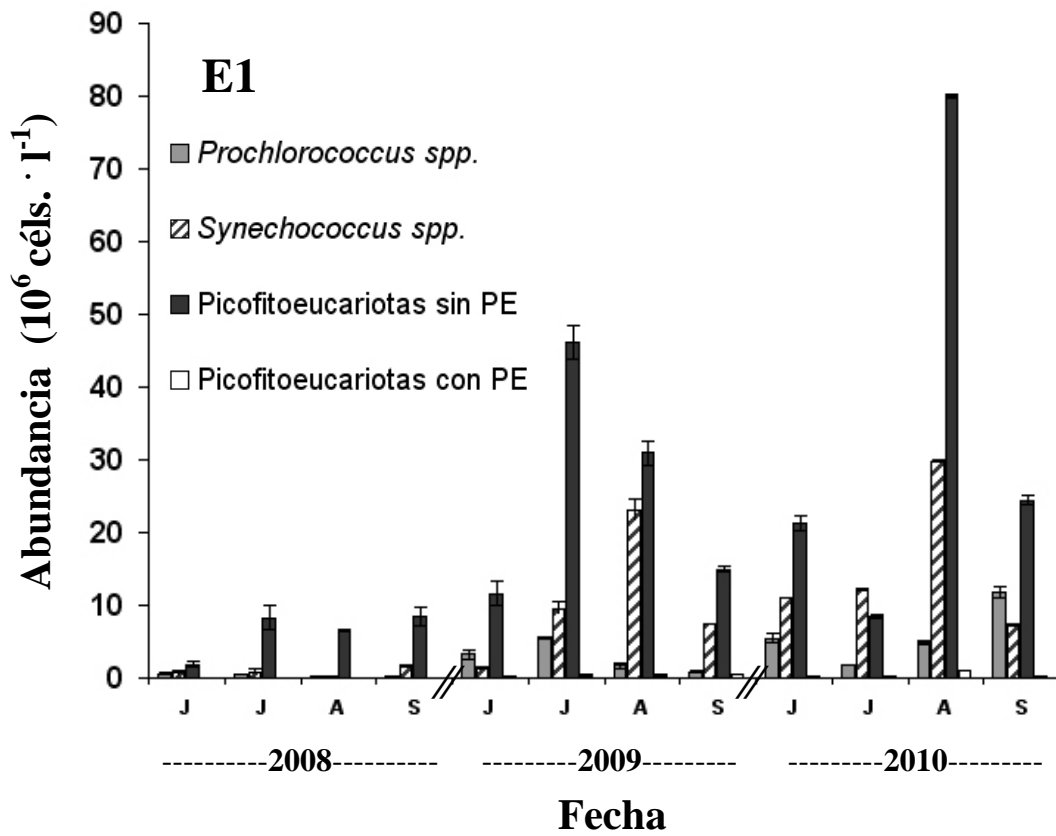


Fig. 3.42.: densidades celulares de las poblaciones de microalgas picoplantónicas detectadas mediante citometría de flujo durante los veranos de 2008-2010 en las estaciones 1 y 2 (E1 y E2).

3.3.7. Abundancia relativa de las clorofitas picoplanctónicas

Una vez establecido el protocolo con mejor relación señal/ruido y determinada la manera más adecuada de efectuar los recuentos de células marcadas con los medios disponibles, se aplicó la técnica de TSA-FISH a las muestras recogidas en las estación 1 y 2 durante la campaña de verano de 2010.

Los meses de junio a septiembre, el porcentaje de eucariotas picoplanctónicas detectados pertenecientes a la división Chlorophyta supuso de media para las 2 estaciones muestreadas, un 65,08% (con un rango de 32,94-90,58%), llegando a alcanzar valores máximos puntuales en torno al 90%, tanto en la estación 1 como en la 2, en agosto (Tabla 3.7. y Fig. 3.43.). Entre las clorofitas predominaron las algas marcadas como pertenecientes al orden Mamiellales, siendo de media el 50,98% de los eucariotas detectados (9,81-90,32%) y el 72,91% de las clorofitas (29,77-100,57%). Asimismo, especies del orden Mamiellales fueron las responsables del máximo registrado para las clorofitas en el mes de agosto, con un aporte de entre el 99 y el 101%. A su vez, el papel del género *Micromonas* ha sido notable entre las algas pertenecientes al citado orden, pues supone de media para ambas estaciones el 53,78% de estas algas (29,78-76,55%).

El aporte relativo que las clorofitas y sus distintos subgrupos analizados en este estudio supusieron a la comunidad picoplanctónica fue muy similar en ambas estaciones, excepto en junio, en que en la estación 1 predominaban las clorofitas, siendo un 79,61% de las eucariotas, frente al 32,94% en la estación 2 (Fig. 3.43.). El resto de meses su dinámica fue prácticamente idéntica. El aporte relativo de las clorofitas creció hasta el máximo en agosto para disminuir en septiembre, siguiendo el mismo patrón que el del orden Mamiellales. Al mismo tiempo, y también en ambas estaciones, la importancia relativa de *Micromonas* crecía hacia septiembre. Pese a su innegable similitud, se dieron ciertas diferencias entre los distintos grupos analizados respecto al aporte que realizan al total de eucariotas. De esta manera, en general todas las categorías supusieron un porcentaje ligeramente mayor de eucariotas en la estación 1, salvo en los casos de las clorofitas y el orden Mamiellales en julio, que fueron mayores en la estación 2. Esta circunstancia quedó reflejada en las abundancias relativas

Tabla 3.7.: abundancia relativa media de los taxones detectados mediante TSA-FISH para las estaciones 1 y 2 durante los meses de junio a septiembre de 2010. Se muestran los valores de abundancia media relativa de cada taxón respecto a la abundancia de los taxones de mayor nivel que lo engloban, tanto para ambas estaciones por separado como en conjunto, así como los rangos de dichos valores. La abundancia de células eucariotas se detectó mediante el empleo del conjunto EUK (sondas EUK 1209R, CHLO01 y NCHLO01); la abundancia de las clorofitas, mediante la sonda CHLO02; la de Mamiellales mediante la sonda PRAS04 y la de *Micromonas* sp. mediante la sonda MICRO01.

| | Taxón | % Eucariotas | Rango | % Chlorophyta | Rango | % Mamiellales | Rango |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------|-------------|---------------|--------------|---------------|-------------|
| Media Para Ambas Estaciones | Chlorophyta | 65,08 | 32,94-90,58 | | | | |
| | Mamiellales | 50,98 | 9,81-90,32 | 72,91 | 29,77-100,57 | | |
| | <i>Micromonas</i> sp. | 23,94 | 5,7-33,4 | 36,75 | 17,30-53,23 | 53,78 | 29,78-76,55 |
| E1 | Chlorophyta | 70,93 | 40,17-90,58 | | | | |
| | Mamiellales | 55,94 | 27,94-90,32 | 77,24 | 48,77-99,71 | | |
| | <i>Micromonas</i> sp. | 27,82 | 21,38-33,4 | 41,27 | 32,63-53,23 | 56,83 | 33,78-76,55 |
| E2 | Chlorophyta | 59,23 | 32,94-87,17 | | | | |
| | Mamiellales | 46,01 | 9,81-87,87 | 68,58 | 29,77-100,57 | | |
| | <i>Micromonas</i> sp. | 20,06 | 5,7-30,47 | 32,24 | 17,30-44,25 | 50,74 | 29,78-62,29 |

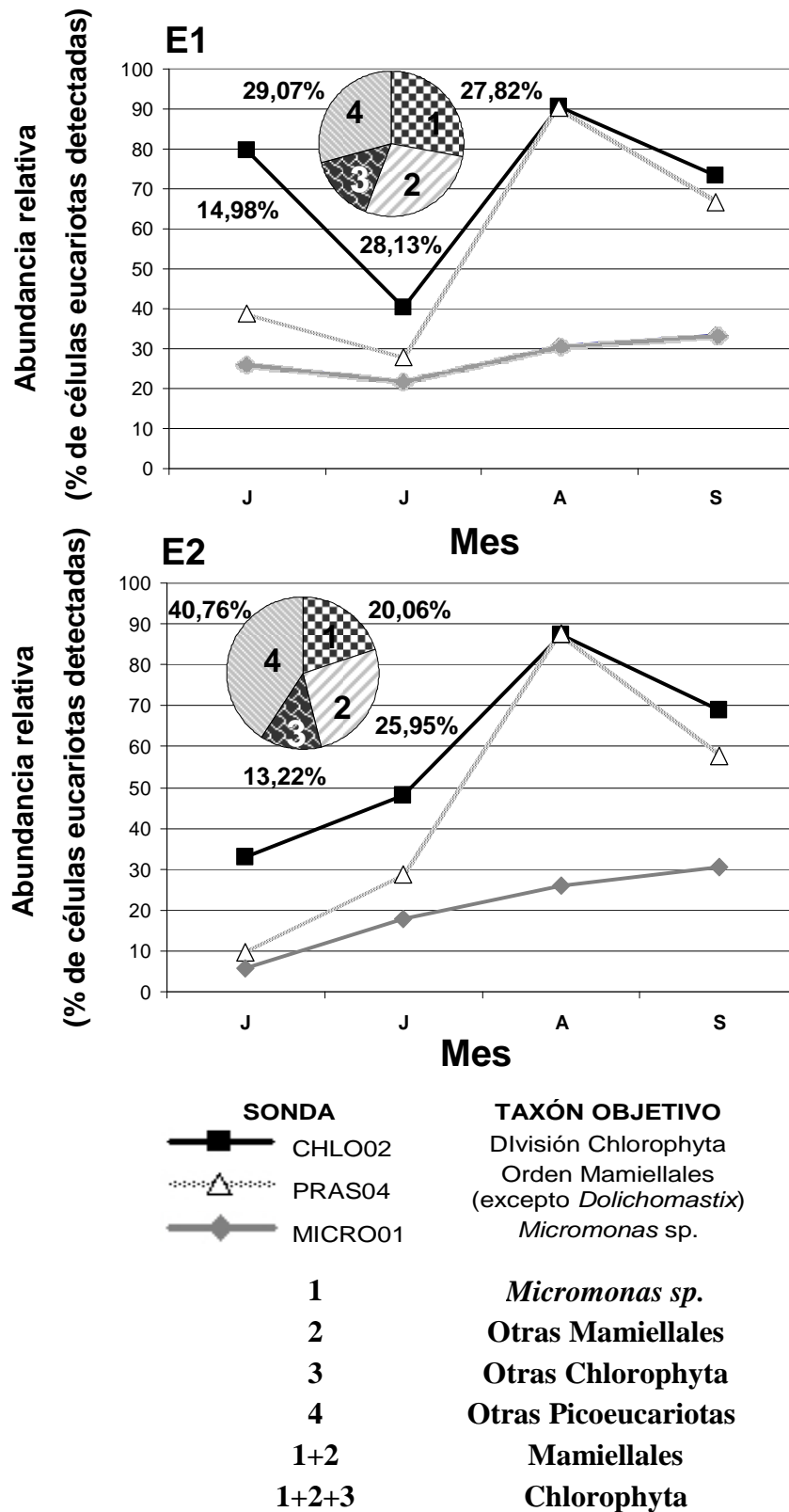


Fig 3.43.: dinámica de la abundancia relativa de los taxones detectados mediante TSA-FISH durante los meses de junio a septiembre de 2010. Los porcentajes de células eucariotas pertenecientes a cada taxón se calcularon respecto al total de células marcadas con el conjunto EUK (sondas EUK1209R, CHLO01 y NCHLO01). Se muestran por separado las abundancias relativas de la división Chlorophyta (sonda CHLO02), el orden Mamiellales (PRAS04) y *Micromonas* sp. (MICRO01) tanto para la estación 1 como para la 2 (E1 y E2). En los gráficos circulares se muestran los porcentajes medios obtenidos para cada taxón durante el 2010.

medias obtenidas para cada estación; de manera que tanto las de la división Chlorophyta, como las del orden Mamiellales y *Micromonas* sp. son mayores para la estación 1 como puede apreciarse en la Tabla 3.7. (70,93, 55,94 y 27,82% frente a 59,23, 46,01 y 20,06% para la estación 2, respectivamente).

Dentro del propio grupo de las clorofitas se dio el mismo fenómeno, siendo la importancia relativa media, tanto del orden Mamiellales como del género *Micromonas*, mayores en la estación 1 (77,24 y 41,27% de las células pertenecientes a Chlorophyta, de media para la estación 1, frente a 68,58 y 32,24% para la estación 2, respectivamente). De nuevo, en este caso, la dinámica del aporte de cada subgrupo a las clorofitas fue idéntica en ambas estaciones (datos no mostrados), consistiendo en un incremento de Mamiellales hasta el máximo de agosto, con un descenso en septiembre, y un aporte de *Micromonas* errático, con subidas y bajadas cada mes.

En cuanto al aporte del género *Micromonas* a los representantes del orden Mamiellales puede decirse que fue también errático teniendo para ambas estaciones una dinámica similar (datos no mostrados), pero siendo ligeramente mayor en la estación 1 salvo en septiembre (56,83% de las Mamiellales de media, en la estación 1, frente a 50,74% en la estación 2).

En general, y atendiendo a los valores medios de abundancia obtenidos para cada estación durante el verano de 2010 (Tabla 3.7. y gráficos circulares de la Fig. 3.43.), queda patente que la principal diferencia entre la comunidad picoplanctónica eucariota de cada sitio de muestreo estriba en el hecho de que en la estación 1, el género *Micromonas*, así como otras especies del orden Mamiellales y la división Chlorophyta, cuya identidad no fue posible determinar mediante las sondas empleadas en este estudio, tuvieron una abundancia relativa algo mayor que en la estación 2 (27,82%, 55,94 y 70,93% frente a 20,06%, 46,01 y 59,23% respectivamente). Mientras que en la estación 2, por el contrario, tuvieron más peso relativo especies de picoeucariotas no pertenecientes a la división Chlorophyta (29,07% para la estación 1 frente a 40,76 para la 2).

3.4. Discusión

3.4.1. Utilización de SDC para la creación de regiones que permitan estimar el picoplancton

Las distintas poblaciones observadas en cultivos tanto de *Hemiselmis* como de *Synechococcus* podrían deberse a diferencias en el tamaño de las células o en su composición pigmentaria. El primer caso parece ser el del cultivo control de *Hemiselmis* en el que se observaron dos poblaciones con valores claramente distintos de FS (datos no mostrados). Estas diferencias de tamaño podrían estar relacionadas con distintas fases del ciclo celular. En las criptofitas, géneros como *Cryptomonas* presentan dimorfismos dentro de una misma cepa posiblemente relacionados con distintas fases correspondientes a formas haploides y diploides (Hoef-Emden & Melkonian 2003) como es el caso de *Proteomonas sulcata* (Hill & Wetherbee 1986). Estos y otros ejemplos de dimorfismos similares han llevado a que se consideren todas las criptofitas como susceptibles de tener ciclos heteromórficos con fases haploides y diploides (Hoef-Emden et al. 2002, Medlin & Strieben 2010). En el segundo caso podrían estar las poblaciones de SDC de *Synechococcus* sp. o el cultivo empleado como control, que al no tratarse de cultivos clónicos, podría contener células de especies de *Synechococcus* con distintas PEs o cepas de una misma especie con PE con ratios ficorubilina/ficoeritrobilina (del inglés PUB/PEB) distintos. Éstos son los dos cromóforos o partes fotosensibles que pueden aparecer en las PEs del género *Synechococcus*, teniendo cada molécula de PE 5-6 de estas bilinas. Estos cromóforos aparecen en una combinación variable según la cepa (Ong & Glazer 1991) confiriéndoles señales de fluorescencia diferentes, y es posible, como se discute más adelante, que en su combinación diferencial radiquen los distintos ecotipos de este género.

Tanto los SDC en los que se observaron varias poblaciones de *Synechococcus* sp. como el cultivo control empleado en este estudio podrían contener más de un ecotipo de este alga a juzgar por las poblaciones observadas en los citogramas. Esto

podría ser indicativo de que en el estuario se mezclan cepas adaptadas al ambiente estuarino con otras de ambiente marino-costero, algo similar a lo que señalan Campbell y colaboradores (1998), que observan que en las estaciones más cercanas a la costa coexisten cepas sin PUB con cepas con un ratio PUB/PEB bajo. Esta posibilidad solo podría ser verificada mediante la observación en muestras naturales de ambas poblaciones, lo que no se ha dado en el presente estudio salvo en cultivos de SDC, por lo que no se puede descartar una posible alteración del ratio PUB/PEB de las poblaciones ocasionada por el cultivo en laboratorio. Esta alteración, para la cual algunas cepas de *Synechococcus*, y otras cianobacterias tienen capacidad, se conoce como adaptación cromática complementaria (Palenik 2001). Este fenómeno de compensación, se aprecia al someter a distintas intensidades lumínicas cultivos de una misma cepa de *Synechococcus*. En el presente estudio todas las placas de cultivos SDC se mantuvieron a una misma intensidad, pero podría ser que la disposición de las células en toda la columna de agua de los pocillos permitiera condiciones lumínicas locales diferentes dentro de un mismo pocillo, sobre todo en condiciones de alta densidad celular, dando lugar a una aclimatación diferencial de células de una única cepa.

Todo lo anterior hace arriesgado el supuesto de que en concreto la presencia de más de una población en los citogramas de SDC o de muestras naturales, corresponda con la presencia de más de una especie al menos para estos grupos de algas con PE en concreto.

Por otro lado, durante el presente estudio se ha observado al microscopio óptico que las células de *Micromonas* sp. tienden a agregarse en grupos tras la fijación con formaldehído al 1% de concentración final, y que solo a concentraciones mucho más bajas (del orden de 0,025%), podían fijarse sin agregación. Esta agregación es una señal inequívoca de que se da una alteración de estas células en el proceso de fijación. Ante la falta de un clasificador de células acoplado a los citómetros empleados en este estudio no se puede descartar que la población de células que habitualmente aparece en las muestras del estuario del Nervión en la región definida para *Prochlorococcus* spp., pueda tratarse, si no al completo al menos en parte, de células de algas picoeucariotas que se hayan visto afectadas por el fijador empleado.

3.4.2. Discrepancias entre citometría y epifluorescencia para la estima del picoplancton

En general los datos de abundancias obtenidos mediante epifluorescencia son mucho menores que los obtenidos mediante citometría. Esta tendencia se ha observado en otros estudios como por ejemplo en Masquelier y Vaultot (2008), aunque a diferencia de dicho estudio, los valores de abundancia obtenidos en el estuario del Nervión mediante citometría son cerca de 2 veces mayores en el caso de las cianobacterias con PE (Fig. 3.44.), frente a 3 de dichos autores, mientras que para los picofitoeucariotos sin PE la diferencia es 6 veces mayor a favor de la citometría, frente a algo más de 2 en su caso. Masquelier y Vaultot atribuyen la menor cantidad de células estimada mediante epifluorescencia al largo periodo de almacenamiento de las muestras antes de su examen (un año a -20°C en su caso) frente a muestras analizadas en fresco para citometría; y al empleo de filtros de $0,8\ \mu\text{m}$ para recolección de las células, que podría haber dejado pasar una parte significativa de cianobacterias con PE.

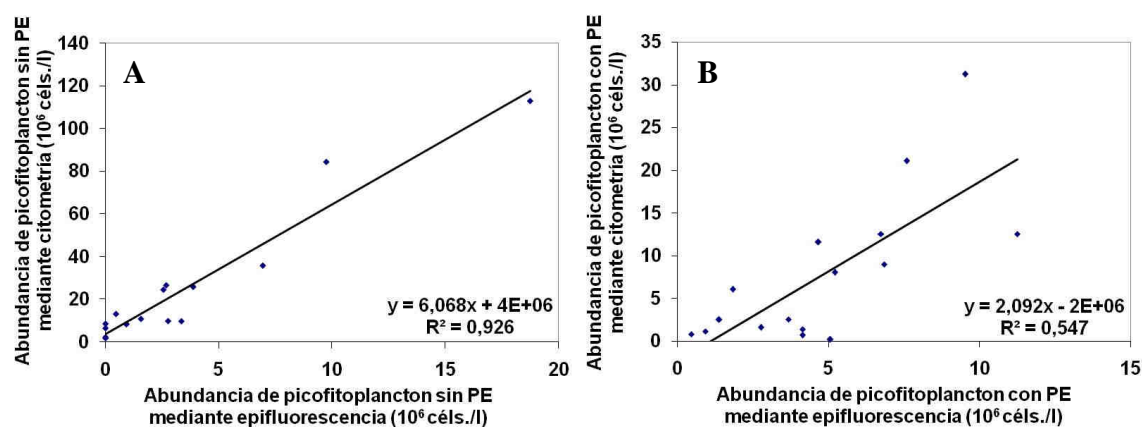


Fig. 3.44.: regresión lineal entre las estimaciones de abundancia realizadas mediante microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo. Se comparan las abundancias (en $10^6\ \text{cél.} \cdot \text{l}^{-1}$) tanto del picofitoplancton sin PE (A), como del picofitoplancton con PE (B), obtenidas para los veranos de 2008 y 2010 estimadas mediante citometría (eje de ordenadas) y microscopía de epifluorescencia (eje de abcisas).

En el presente estudio, a diferencia del citado, se emplearon filtros de $0,2\ \mu\text{m}$ en lugar de los de $0,8$, por lo que esa razón queda descartada. Las muestras de epifluorescencia se almacenaron generalmente durante 1-3 días antes de contarse, aunque algunas muestras del 2008 tardaran en contarse de 1-3 meses. Este tiempo parece suficiente para que al menos en estas muestras se pudiera dar una pérdida

aparente de células que, según Putland y Rivkin (1999), comienza a ser significativa para las cianobacterias almacenadas en glutaraldehído a partir de 2 meses. Aunque estudios realizados recientemente con muestras de mar filtradas y fijadas con formaldehído señalan que éstas pueden almacenarse tanto a temperatura ambiente como a -20°C hasta 99 días sin una pérdida aparente de células procariotas (Beardsley *et al.* 2008). Por lo tanto, parece que aún en el caso de que en algunas muestras haya podido darse cierta pérdida de células debido al tiempo de almacenamiento, ésta por sí sola no parece ser la responsable de unas diferencias tan amplias en los recuentos.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que estas diferencias pueden ser debidas al almacenamiento de las muestras para citometría, que según Sato y colaboradores (2006) puede afectar de manera distinta a cada población celular, de manera que en algunos casos las estimaciones de abundancia realizadas con esta técnica pueden aumentar, y en otros disminuir, respecto a las muestras frescas a medida que se prolonga el tiempo de almacenamiento. En principio, para el caso del formaldehído, parece que la tendencia es a disminuir a lo largo del tiempo con respecto a las densidades registradas en muestras frescas (Pan *et al.* 2005, Ozbay & Jackson 2010), por lo que posiblemente las mayores abundancias registradas no guarden relación con el tiempo de almacenamiento de las muestras de citometría.

Puede que finalmente esta diferencia se deba a la pérdida de fluorescencia ocasionada por el proceso de fijación que, según Van Leire y colaboradores (1989), se aprecia para las ficobilinas incluso en el mismo día del muestreo tras la fijación con formaldehído y en mayor medida con glutaraldehído y lugol. Esta pérdida aumenta rápidamente en muestras almacenadas, al parecer en frigorífico, hasta superar el 20% de filamentos de cianobacterias que dejan de ser fluorescentes en un solo día, y las muestras de epifluorescencia tardaron por lo general 1-2 días en procesarse, tiempo que estuvieron almacenadas en frigorífico, mientras que las muestras para citometría se congelaron y almacenaron en N_2 líquido el mismo día del muestreo. Esta pérdida de fluorescencia de las ficobilinas daría como resultado una subestimación de la abundancia del picofitoplancton con PE.

Por otro lado, según Masquelier y Vaultot (2008), el pequeño tamaño y lo efímero de la fluorescencia de sus pigmentos, que se perdería en apenas unos instantes,

impide que *Prochlorococcus* se pueda contar de una manera fiable mediante epifluorescencia, lo que, de tratarse de este género la población identificada como tal en los citogramas del estuario del Nervión, contribuiría a la subestimación de las algas sin PE realizada mediante microscopía. Además, al menos en el presente estudio la fluorescencia roja de los autótrofos sin PE detectados ha resultado ser mucho menos intensa que la naranja de las cianobacterias, por lo que los primeros fueron mucho más difíciles de contar, circunstancia que ha podido dar lugar a una subestimación de picofitoplancton sin PE en los recuentos de epifluorescencia, lo que explicaría que en algunas muestras analizadas al microscopio solo se llegaron a detectar cianobacterias.

3.4.3. Limitaciones de la técnica FISH aplicada a la caracterización de poblaciones picoplanctónicas

Comte y colaboradores (2006), en su trabajo sobre estructura y dinámica de la comunidad microbiana en el lago Bourget (Francia), afirman que una de las limitaciones de la técnica de FISH es el hecho de que la eficiencia de detección de las células diana varía ampliamente, tal y como ha sucedido en este estudio, y aduce tres posibles razones para la variabilidad en la detección: **(1)** el número de ribosomas por célula; **(2)** la penetración de las sondas en las células y la accesibilidad de las secuencias objetivo; y **(3)** la intensidad de la señal de la sonda, que de una manera más amplia se entiende aquí, como la relación señal/ruido que ofrece cada sonda hibridada, o dicho de otra manera, la relación entre fluorescencia específica e inespecífica, entendiendo esta última no solo como la producida por las sondas que se hibridan en objetivos inespecíficos sino también como la fluorescencia de fondo que puede quedar en el medio en el que se realiza la hibridación.

3.4.3.1. Número de ribosomas por célula

El número de ribosomas por célula a menudo guarda relación con la tasa de crecimiento de éstas, la cual a su vez está relacionada con la fase de ciclo celular y de una manera más amplia, con la fase de crecimiento de la población o el cultivo que integran dichas células. Generalmente, es en la fase de crecimiento exponencial de la población cuando más ribosomas contienen las células y, por lo tanto, permiten una

mayor señal fluorescente de las sondas (Amann *et al.* 1995, Simon *et al.* 1995), aunque existen excepciones a esa regla, según cita el primero de estos dos trabajos. Por ejemplo, algunas cepas de la bacteria *Vibrio* sp., que en ausencia de carbono exógeno en el medio son incapaces de crecer, mantienen una gran cantidad de ribosomas, lo que parece valerles para recuperar inmediatamente una alta actividad una vez reaparece el carbono en el medio (Flärdh *et al.* 1992). Esta relación entre contenido de ribosomas, estado de crecimiento y señal fluorescente constituye uno de los principales obstáculos para la aplicación del FISH tradicional al estudio de la diversidad taxonómica en muestras naturales. Esto es así debido a que en la variante tradicional se emplean generalmente sondas con una única marca fluorescente, o monomarcas, y al usarlas con las muestras naturales, según Wallner y colaboradores (1993), ``algunas células siempre tendrán un contenido tan bajo de ARNr que impida su detección. Por lo tanto se hacen necesarios métodos para aumentar la sensibilidad de los oligonucleotidos que tengan como objetivo el ARNr´´.

En el caso del presente estudio, el problema que supone el bajo contenido de ARNr que algunas células pudieran tener en las muestras naturales analizadas se ha solucionado gracias al empleo de la variante de FISH de amplificación de señal por tiramida (TSA-FISH). Variante ampliamente extendida desde su aparición en los años 90 (Schönhuber *et al.* 1997) que permite obtener una mayor señal fluorescente que el empleo de las sondas monomarca tradicionales, llegando incluso a conseguirse señales 10-20 veces más intensas. Gracias a esta amplificación de señal, cuyo mecanismo se explica más adelante, el TSA-FISH permite también la detección de células que estén en fase estacionaria de crecimiento (Schönhuber *et al.* 1997, Biegala *et al.* 2003).

Pese a todo el poder amplificador de esta técnica, todas las células no se marcan con la misma intensidad, lo que puede hacer que algunas células marcadas específicamente no tengan una señal tan intensa como el resto. Este hecho tiene especial relevancia a la hora de elegir un umbral de fluorescencia mediante el cual diferenciar las células marcadas específicamente de las marcadas inespecíficamente. Así si elegimos un umbral de fluorescencia demasiado bajo, estaremos contando células teñidas inespecíficamente y si, por el contrario, lo elegimos demasiado alto, estaremos subestimando la abundancia de las células objetivo de las sondas. En este punto entra en juego la ventaja en términos de reproducibilidad y de facilitación de recuento que

supone un método objetivo, como pueden serlo la citometría de flujo y el análisis de imagen de epifluorescencia aplicados a FISH. Por lo que el empleo de estas técnicas en combinación con la técnica de FISH resulta altamente recomendable.

3.4.1.2. Penetración de las sondas y accesibilidad de las secuencias objetivo

Estos dos problemas impiden la unión de las sondas empleadas con sus ARNr objetivos de distinta manera. Sus causas y posibles soluciones son explicados en profundidad en el trabajo de Amann y colaboradores (1995).

La penetración de las sondas viene determinada generalmente por el estado de permeabilidad de las células tras su fijación. Los problemas de penetración se entienden como la exclusión de moléculas de cierto tamaño, posiblemente por la pared celular, pues las membranas se suponen fácilmente permeables tras la fijación. Estos problemas pueden ser resueltos mediante cambios en los fijadores empleados o en los tiempos de fijación. Otros estudios proponen el empleo de detergentes en el tampón de hibridación o tratamientos químicos o enzimáticos específicos, como por ejemplo el de lisozimas para las paredes celulares bacterianas (Wallner *et al.* 1993, Amann *et al.* 1995, Biegala *et al.* 2002) o hemicelulasas y celulasas para las tecas de los dinoflagelados (Palacios & Marín 2008).

En cuanto a la accesibilidad de las secuencias objetivo, ésta depende de la estructura espacial de los ribosomas tras la fijación, de modo que, en palabras de Amann y colaboradores (1995) refiriéndose a células permeables para las sondas: ``cuando los problemas de complementariedad entre sonda y secuencia objetivo, y los relacionados con las condiciones de hibridación han sido descartados [...] la hibridación de la sonda se ve influenciada mucho más por interacciones ARN-ARN o ARN-proteína, puesto que los ARNr objetivos siguen formando parte de los ribosomas en las células fijadas''. Según el mismo trabajo, este tipo de problemas puede solucionarse de varias maneras: **(1)** añadiendo formamida en el tampón de hibridación (Amann *et al.* 1992a), que actúa como factor desnaturalizante que debilita los puentes de hidrogeno que dan lugar a las estructuras moleculares de mayor orden; y **(2)** diseñando sondas alternativas que tengan

como objetivo regiones más accesibles del ARNr objetivo. Parece posible que aparte de éstas también exista otra solución, (3) que sería la utilización de distintos fijadores, puesto que pueden afectar a la estructura espacial de los ribosomas en la célula fijada tal como afirman Amann y colaboradores (1992b).

Para la técnica de TSA-FISH en concreto, Schönhuber y colaboradores (1997) recomiendan su uso preferencialmente con especies bien definidas para las cuales existan protocolos óptimos de permeabilización, y no para la detección de grupos taxonómicos que engloben especies con diferentes paredes celulares. De ahí los problemas hallados en el presente estudio. Como se observa en el apartado de hibridaciones de control (páginas 65-68), se han detectado problemas de accesibilidad de las sondas en cepas de cf. *Nannochloris* y *Nannochloropsis* sp. que, pese a los cambios en el proceso de deshidratación de los filtros, no han podido ser solucionados, lográndose sólo el marcaje de algunas células. Este hecho implica que, al menos en lo tocante a estas microalgas, que aparecen con frecuencia en el estuario del Nervión, y posiblemente para algunas otras especies para las que no se han realizado pruebas, los resultados obtenidos en cuanto a abundancia relativa puedan estar algo subestimados. Por otro lado, se decidió, con objeto de mejorar la relación señal/ruido mediante el incremento en la permeabilización de las células, aumentar la concentración de SDS en los tampones de hibridación y de lavado de 0,01% a 0,1%, lográndose una mejor apreciación de las células marcadas tal y como señalan Wallner y colaboradores (1993).

3.4.3.3. Relación señal/ruido

El último, pero no por ello menos importante, de los principales problemas que limitan la efectividad de la técnica de FISH es el de la relación entre señal específica y ruido.

3.4.3.3.1. Soluciones para la amplificación de la señal específica

En relación a la fluorescencia específica, a parte de los problemas ya comentados, cabe mencionar que se han propuesto múltiples soluciones para su amplificación. Entre ellas podemos encontrar las siguientes: (1) el marcaje indirecto de

las secuencias objetivo, bien con sondas unidas a digoxigenina, detectadas luego mediante anticuerpos con marcas fluorescentes o enzimáticas (Zarda *et al.* 1991), bien con sondas marcadas con biotina, detectadas mediante avidina o estreptavidina marcadas de la misma manera que los anticuerpos anteriores (Amann *et al.* 1995); **(2)** el empleo de marcajes múltiples, ya sea con más de una sonda monomarca o con sondas con marcas múltiples; y **(3)** el empleo de sondas con marcas enzimáticas tales como la HRP como es el caso del presente estudio.

En general, las técnicas de marcaje indirecto requieren de una permeabilización enzimática o química de las células objetivo, debido a que las moléculas marcadoras tienen un tamaño considerablemente mayor que el de las sondas marcadas con fluorocromos (Amann *et al.* 1995). Además, en algunos casos apenas se han conseguido amplificaciones de señal significativas respecto a las sondas monomarca (Zarda *et al.* 1991) o las que llevan un marcaje enzimático directo (Amann *et al.* 1992b).

Por su parte, el empleo de sondas multimarca ha presentado problemas a la hora de realizar hibridaciones de alta astringencia, produciendo en general poca fluorescencia específica (Amann *et al.* 1995) y/o mucha inespecífica (Wallner *et al.* 1993). A su vez, el empleo de múltiples sondas con la misma especificidad se ve restringido por la disponibilidad limitada de sitios objetivo con esa característica (Amann *et al.* 1995), aunque hay casos en los que se ha aplicado con éxito como hicieron Amann y colaboradores (1990b), quienes las emplearon para identificar bacterias de la especie *Flabobacter intestinalis* en muestras de intestino ciego de ratón. Por otro lado, se han empleado sondas de distinta especificidad con taxones a nivel de especie pero en cultivos, para aumentar el marcaje fluorescente, como es el caso del trabajo de Amann y colaboradores (1990a), en el que se empleaban sondas específicas para eubacterias, para bacterias reductoras de sulfato y para el género *Desulfobacter*, con la especie *Desulfobacter hydrogenophilus*, aunque el aumento de fluorescencia resultó menos que aditivo y supuestamente causado por la unión inespecífica de las sondas resultante del aumento de concentración de éstas. Aun así, son empleadas habitualmente sondas de distinta especificidad para el marcaje de células pertenecientes a categorías taxonómicas amplias, como por ejemplo el conjunto de sondas EUK1209R, CHLO01 y NCHLO01 que se ha utilizado en varios estudios para la identificación de células eucariotas en muestras naturales (Not *et al.* 2004, Not *et al.* 2007, el presente estudio). Además, en

cuanto al empleo de múltiples sondas se refiere, también se ha logrado con éxito, al menos en cultivo, el uso de sondas competidoras no marcadas que reducen la fluorescencia inespecífica uniéndose en la misma zona del ARNr que las específicas pero con mayor afinidad por los objetivos inespecíficos de su competidora. De esta manera se ha logrado mejorar la relación señal/ruido de hibridaciones realizadas sobre cultivos de clorofitas y no clorofitas con las sondas competidoras específicas para estos tipos de algas, CHLO01 y NCHLO respectivamente, marcadas con FITC la primera y no la segunda, y viceversa, según se aplicaran sobre un cultivo de clorofitas o uno de no clorofitas respectivamente (Simon *et al.* 1995). Asimismo gracias al empleo de sondas competidoras se ha conseguido reducir el marcaje inespecífico de sondas diseñadas para los distintos clados correspondientes a especies crípticas que parece contener *Micromonas pusilla* (Foulon *et al.* 2008).

Por otro lado, uno de los métodos más utilizados durante los últimos años para la amplificación de señal enzimática ha sido el de TSA-FISH, en el cual las sondas marcadas con HRP se detectan gracias a la formación de un precipitado fluorescente, al reaccionar estas enzimas con una tiramida marcada con múltiples fluorocromos. Las tiramidas son compuestos fenólicos derivados de la tiramina que se forman al unirse éstas, mediante uniones amida, con radicales, como por ejemplo los citados fluorocromos. La enzima HRP puede dimerizar compuestos fenólicos como éstos gracias a su mecanismo de reacción. Este mecanismo conlleva la generación de radicales libres en dos pasos de reducción de un solo electrón cada uno, producidos tras la oxidación, en presencia de peróxido de hidrogeno, de los variados substratos que puede tener esta enzima, y dando, como resultado, un complejo perfil de productos de reacción, incluidos dímeros, trímeros y oligómeros (Veitch 2004). Cuando la tiramida es aplicada en bajas concentraciones, como las usadas en la reacción de amplificación de señal, la probabilidad de dimerización se reduce, mientras que los intermediarios altamente reactivos se unen a motivos ricos en electrones de las proteínas, tales como regiones ricas en tirosina, en o cerca del lugar de unión de la peroxidasa (Speel *et al.* 1999), lo que aumenta la exactitud del marcaje. La técnica de amplificación TSA-FISH puede llegar a ofrecer una fluorescencia de las células objetivo hasta 25 veces mayor que la de las no objetivo (Not *et al.* 2002). Aunque, al igual que en este estudio, en algunos casos se hace necesario un tratamiento enzimático para permeabilizar algunas células (Amann *et al.* 1992b, Biegala *et al.* 2002, Palacios & Marín 2008) en

general no deberían dar tantos problemas como las técnicas de marcaje indirecto, pues las sondas directamente marcadas con HRP son más pequeñas que, por ejemplo, los anticuerpos marcados con enzimas. Además, resulta más sencilla y específica, pues se evitan interacciones inespecíficas de intermediarios tales como anticuerpos o avidinas (Amann *et al.* 1995). Por estas razones y las explicadas anteriormente se eligió esta técnica para el estudio de la abundancia relativa de las clorofitas en el estuario del Nervión.

3.4.3.3.2. Soluciones para la reducción del ruido

Por último, en relación a la mejora de la relación señal/ruido, se encuentran las soluciones que reducen la fluorescencia inespecífica en las hibridaciones. Multitud de estudios demuestran que este fenómeno es algo habitual con lo que lidiar en los experimentos de FISH (Amann *et al.* 1990a, Wallner *et al.* 1993, Amann *et al.* 1995, Simon *et al.* 1995, Simon *et al.* 2000, Biegala *et al.* 2002, Not *et al.* 2002, Biegala *et al.* 2003, Biegala *et al.* 2005). Entre las principales causas de la fluorescencia inespecífica se encuentran:

(1) la unión de las sondas a secuencias no objetivo.

(2) substratos fluorescentes que quedan libres en el medio, sin ser lavados, o unidos a componentes celulares, probablemente proteínas de membrana (Wallner *et al.* 1993).

(3) algunos reactivos empleados en el TSA-FISH. Por ejemplo: lisozimas empleadas habitualmente para permeabilizar la pared celular bacteriana, que podrían unirse a las sondas (Biegala *et al.* 2002), supuestamente por actuar como proteína básica pudiendo unirse a moléculas con carga negativa (Jollés & Jollés 1984); o incluso el sulfato de dextrán, empleado en la amplificación de señal para reducir la fluorescencia inespecífica permitiendo una mejorada localización de los productos fluorescentes debido al aumento de la viscosidad del medio de amplificación, pero que también puede producir un fondo punteado fluorescente (Van Gijlswilk *et al.* 1996).

(4) el marcaje de partículas o restos celulares que no se tiñen con la tinción de contraste para DNA, que podrían ser restos de la alimentación del zooplancton o de alguna lisis vírica (Biegala *et al.* 2003) o incluso de células lisadas durante el procesado de las muestras.

(5) la propia autofluorescencia de las células, que en algunos casos podría llegar a eclipsar la de las sondas.

Las soluciones para la reducción de la fluorescencia causada por la unión inespecífica de las sondas van desde el diseño de sondas más específicas, como por ejemplo en Simon y colaboradores (2000), la sonda CHLO02 en sustitución de la CHLO01, hasta optimización de las condiciones de hibridación, sobre todo la duración de ésta, la astringencia, influenciada principalmente por la temperatura y la concentración de cationes monovalentes como Na^+ (Wallner *et al.* 1993), y la concentración de formamida.

Por su parte, los problemas relacionados con reactivos autofluorescentes de la hibridación o el exceso de substratos fluorescentes, se pueden minimizar optimizando la concentración de éstos, incrementando el tiempo de incubación (lo que favorece la hibridación específica) y/o variando el número y volumen de los diferentes lavados (Biegala *et al.* 2002). También puede ayudar a disminuir la fluorescencia inespecífica el empleo de agentes bloqueantes que se unan a los grupos reactivos de las proteínas evitando la unión de residuos fluorescentes a éstas, aunque su concentración debe ser optimizada o de lo contrario pueden no tener ningún efecto como en Wallner y colaboradores (1993).

En el presente estudio, se han empleado las condiciones de hibridación, concentración de reactivos y agentes bloqueantes que han resultado ser útiles en estudios previos realizados con las mismas sondas (Not *et al.* 2002, Not *et al.* 2004, Not *et al.* 2007). Aun así, la presencia de células marcadas inespecíficamente ha sido alta, lo que hace pensar que aún podrían optimizarse más esas condiciones, al menos en relación a la variante de aplicación empleada en este mismo estudio. En este sentido, gracias al empleo del detergente SDS en una concentración mayor a la empleada en los trabajos citados (0,1% frente a 0,01%) en los tampones de hibridación y lavado, se ha

logrado disminuir la señal inespecífica, haciendo posible la identificación clara de una población de células marcada de manera mucho más brillante que el resto, y que, se supone, estaría formada en su mayoría por células marcadas específicamente.

Por otro lado, se han observado lo que podrían ser restos celulares marcados con las sondas pero no con el fluorocromo DAPI. El número de éstos ha sido escaso, por lo que su posible influencia sobre los resultados finales, en caso de que, por error, hayan podido contarse como falsos positivos, no ha podido ser importante.

En cuanto a la autofluorescencia de las muestras, ha sido mínima pues los baños de alcohol a los que se han sometido los filtros han lavado todos los pigmentos hidrofóbicos, quedando reducida a la señal de los pigmentos hidrosolubles tales como las ficoeritrinas y cianinas de las cianobacterias y criptofitas, distinguibles por señales que van desde color anaranjado como el de *Sinnehococcus* sp. a amarillo o verdes azulados o blanquecinos mucho menos intensos que el conferido por las sondas. Por otro lado, se ha podido observar cierta autofluorescencia de amarillo a marrón o rojo, más o menos tenue, proveniente de partículas de sedimento de las muestras. Éstas se distinguían con facilidad gracias a tener prácticamente la misma señal con el juego de filtros para la observación del marcaje de DAPI como para el de la señal de las sondas.

3.4.4. Abundancia de los grupos picofitoplanctónicos

Los máximos de cianobacterias suelen tener lugar en verano tanto en ambientes de agua salada (Johnson & Sieburth 1979, Liu *et al.* 2002, Sieracki *et al.* 2004) como de agua dulce (Belykh & Sorokovikova 2003) y sus densidades suelen estar en el rango de 10^3 - 10^9 céls. \cdot l⁻¹. El estuario del Nervión no es una excepción como ha quedado demostrado en Urrutxurtu y colaboradores (2003) y Seoane y colaboradores (2005). En el presente estudio, las concentraciones alcanzadas por la población de picofitoplancton con PE, dominada por cianobacterias, entran dentro de ese rango y tienen unos máximos en los meses centrales del verano, coincidiendo con lo observado en los estudios citados.

Varios estudios establecen una correlación positiva entre la temperatura y la densidad celular de las poblaciones de cianobacterias (Miyazono *et al.* 1992, Li *et al.*

1998). Sin embargo no todas las comunidades de cianobacterias tienen sus máximos de abundancia en verano, puesto que diversos estudios contemplan máximas abundancias durante el invierno (Kuosa 1991, Campbell *et al.* 1997, Liu *et al.* 2007). Algunos estudios relacionan esta aparente contradicción en la estacionalidad de la abundancia de *Synechococcus* con la distancia a la costa a la que se encuentra la población muestreada. Así por ejemplo, Jiao y colaboradores (2005) observaron, tras realizar transectos, tanto en verano como en invierno, a través del Mar de la China Oriental, que, en general, en las estaciones cercanas a la costa la abundancia de *Synechococcus* es mayor durante el verano, mientras que en las estaciones más oceánicas la abundancia suele ser mayor durante el invierno. El mismo estudio achaca esta diferencia en la estacionalidad de las poblaciones de *Synechococcus* a las diferentes limitaciones de una y otra población en cuanto a temperatura y nutrientes. En su caso, las abundancias de las poblaciones más costeras comprenderían *Synechococcus* con un ratio PUB/PEB más bajo a tenor de la distribución de poblaciones planteada por Campbell y colaboradores (1998). Estas poblaciones estarían más limitadas por la temperatura y bien adaptadas a crecer en escasez de nutrientes, alcanzando sus máximos en verano, cuando los nutrientes son mínimos pero la temperatura es máxima. Por su parte, las poblaciones oceánicas, con un ratio PUB/PEB mayor, estarían más limitadas por los nutrientes. Así, en invierno la temperatura no sería lo suficientemente baja para limitar su crecimiento y la concentración de nutrientes sería mayor, debido al aumento de la mezcla de las aguas. En una línea similar Zwirgmaier y colaboradores (2008) establecen una filodistribución de los distintos clados dentro del género *Synechococcus* que adscribe algunos de éstos a las zonas costeras de las regiones biogeográficas oceánicas, en concreto los clados I-IV en latitudes por encima de los 30° y el clado II en las regiones tropical y subtropical. Esta distribución apoya la idea anterior de distintos ecotipos repartidos entre las regiones costeras y oceánicas.

En el presente estudio, como ya se ha comentado, los cultivos de control de *Synechococcus* sp. y algunos SDC podrían contener más de un ecotipo de este alga a juzgar por las subpoblaciones que contienen, lo que quizás sea indicativo de que en el estuario se mezclan cepas adaptadas al ambiente estuarino con otras de ambiente marino-costero. Sin embargo la ausencia de subpoblaciones similares en muestras naturales impide asegurarlo.

Por otro lado, el picofitoplancton sin PE también llega a variar en ese rango de concentraciones comprendido entre 10^3 - 10^9 céls. \cdot l⁻¹ (Miyazono *et al.* 1992, Sieracki *et al.* 2004, Masquelier & Vaultot 2008) alcanzando mayores densidades en las zonas costeras que en mar abierto. En cuanto a la estacionalidad de su abundancia, cabe destacar que existen estudios que contemplan importantes abundancias en cada una de las estaciones del año (Kuosa 1991, Campbell *et al.* 1997, Jiao *et al.* 2005, Le *et al.* 2010) por lo que resulta simplista una aproximación basada en la temperatura para explicar la estacionalidad de este grupo.

El picofitoplancton sin PE está compuesto por un lado por algas procariotas y algas eucariotas. Estas últimas comprenden una gran diversidad de especies, incluyendo taxones aún no cultivados ni descritos, tal y como afirman recientes estudios (Díez *et al.* 2001a, Romari & Vaultot 2004, Marie *et al.* 2006, Not *et al.* 2008, Vaultot *et al.* 2008, Viprey *et al.* 2008, Worden & Not 2008) y su estacionalidad puede estar relacionada con una sucesión de especies a lo largo del año (Jiao *et al.* 2005, McDonald *et al.* 2007) dentro de una misma zona, lo que explicaría en parte los máximos observados en distintas épocas del año.

Las principales algas procariotas sin PE son los integrantes del género *Prochlorococcus*, que constituye uno de los más importantes productores primarios y de biomasa en ecosistemas oceánicos oligotróficos (Partensky *et al.* 1999a) a escala mundial junto con el género *Synechococcus*. Este género suele ser más abundante en la época estival y en ambientes oligotróficos de mar abierto (Campbell *et al.* 1997, Jiao *et al.* 2005), aunque también se ha registrado en zonas costeras, e incluso en plumas estuarinas en aguas de salinidad tan baja como 1,2 (Vaultot *et al.* 1990). Pese a que ha sido imposible diferenciar las posibles células de este género mediante epifluorescencia, en el presente estudio se ha detectado, mediante citometría de flujo, una población que podría tratarse de *Prochlorococcus* en las estaciones exteriores del estuario del Nervión, donde la salinidad es siempre superior a ese valor. Aún así, la abundancia de esta población ha sido habitualmente escasa, aunque puntualmente, en septiembre de 2010 en la estación 1, llegaron a alcanzar un máximo que superaba la abundancia de *Synechococcus* y se acercaba casi a la mitad de la densidad alcanzada por los picofitoeucariotas sin PE.

Atendiendo a los datos obtenidos mediante citometría de flujo, los picofitoeucariotas sin PE son el grupo más abundante en el exterior del estuario del Nervión durante el verano, predominando en casi todas las muestras. En ambientes oceánicos los picofitoeucariotas, incluyendo aquéllos con PE, que en el presente estudio tienen una importancia numérica mínima, suelen aparecer generalmente en menor número que *Prochlorococcus* y en menor o similar número que *Synechococcus* (Campbell *et al.* 1997, Le *et al.* 2010), aunque debido a su mayor tamaño su contribución a la biomasa de la comunidad picoplanctónica puede llegar a ser incluso mayor que la combinada entre los géneros de cianobacterias (Grob *et al.* 2007b). En cambio, en ambientes costeros y estuáricos la situación suele ser diferente, siendo en ocasiones las eucariotas sin PE el grupo más abundante de toda la comunidad fitoplanctónica, como ocurre por ejemplo en Bec y colaboradores (2005). También puede llegar a ser el grupo que mayor aporte de biomasa presenta entre el picoplancton, como en Pan y colaboradores (2007), donde se observa que su biomasa es mayor que la de las cianobacterias en las zonas con mayor concentración de nutrientes del estuario del río Changjiang en China.

Esta distribución de la abundancia puede estar relacionada con la distinta tolerancia a las temperaturas y la necesidad de nutrientes. Zubkov y colaboradores (1998) observaron, en un transecto realizado en otoño de 1996 a través del océano Atlántico, que *Synechococcus* y los picofitoeucariotas dominaban en ambientes más mesotróficos, mientras que *Prochlorococcus* lo hacía en los ambientes más oligotróficos. El estuario del Nervión está considerado como un ambiente eutrófico por lo general (García-Barcina *et al.* 2006), aunque durante las épocas de menor aporte fluvial, como suele serlo el verano, la concentración de nutrientes en la parte más exterior de éste puede ser más favorable a las formas picoplanctónicas, que debido a su pequeño tamaño pueden mantener tasas de crecimiento mayores en condiciones de escasez de nutrientes, pues su reducido tamaño no supone un impedimento para la difusión de éstos hacia su interior (Chisholm 1992). Por su parte Bec y colaboradores (2005), observaron una correlación positiva de la tasa de crecimiento, tanto de cianobacterias como picofitoeucariotas, en relación a la temperatura, mientras que para la irradiancia esta correlación fue solo positiva para las picofitoeucariotas. Además de estos factores fisicoquímicos, el mismo trabajo hace hincapié en que la presión herbívora también puede afectar de distinta manera a estas poblaciones de picoplancton,

pues en su caso se detectaron mayores tasas de pérdidas por herbivorismo de microzooplancton para los picofitoeucariotas que para las cianobacterias.

Todas esas características diferenciales pueden ser las responsables de que la comunidad picofitoplanctónica esté dominada por eucariotas en aguas superficiales y de escasa turbiedad, como lo son las estaciones exteriores del estuario del Nervión durante los meses de verano, cuando el aporte fluvial de turbiedad y nutrientes es menor, pudiendo la concentración de estos últimos llegar a ser limitante (Butrón *et al.* 2009), mientras que la temperatura del agua y la irradiancia son habitualmente mayores.

3.4.5. Abundancia relativa de las clorofitas en la fracción picoplanctónica

Diversos estudios hacen referencia a la frecuente presencia e incluso papel predominante de las algas pertenecientes a la división Chlorophyta, y en especial las de la clase Prasinophyceae, como componente del picoplancton eucariota, tanto en ambientes oceánicos como en costeros y estuáricos (Johnson & Serburth 1982, Díez *et al.* 2001b, Díez *et al.* 2001a, Biegala *et al.* 2003, Not *et al.* 2004, Romart & Vaultot 2004, Díez *et al.* 2004, Worden 2006, Vaultot *et al.* 2008). Atendiendo a los resultados que se derivan de este estudio respecto a la abundancia relativa de las clorofitas en la comunidad picoplanctónica eucariota en el estuario del Nervión, cabe afirmar que las clorofitas, con una abundancia relativa media para ambas estaciones muestreadas de casi 2/3 (65,08%) de los eucariotas, tienen un papel predominante en la composición de dicha población, al menos durante la época estival, a la que se limita la recogida de muestras empleadas para el TSA-FISH. Dentro de la división Chlorophyta, siendo un 72,91% de éstas, las algas más abundantes detectadas fueron las prasinoficeas del orden Mamiellales, entre las que destacó *Micromonas* sp. llegando a ser el 53,78 % de las algas pertenecientes a dicho orden.

Los datos de abundancia relativa de las clorofitas y sus distintos subgrupos en las estaciones exteriores del estuario del río Nervión, pese a representar un lapso de tiempo muy puntual y limitado, de junio a septiembre de 2010 en concreto, y por esta razón, debiendo tratarse con reservas, indican una mayor importancia numérica de las

clorofitas en la comunidad picoplanctónica eucariota hacia la parte más exterior del estuario. Esta circunstancia es contraria a lo que Biegala y colaboradores (2003) observaron para un transecto a través de la bahía de Morlaux hacia uno de sus estuarios, en el que la abundancia de las clorofitas crecía hacia las estaciones más estuarinas. Teniendo en cuenta que el citado transecto corresponde más bien a la bahía, con la salinidad de la estación más interior rondando el 34,5 y que en el presente estudio la salinidad de las estaciones muestreadas varió entre 21-33,5 (datos no mostrados), parece lógico pensar que nos encontramos ante estaciones más estuáricas que las de dicho estudio. Por lo tanto, y sabiendo que tanto *Micromonas* sp. como las prasinofíceas en general, son un grupo de algas mayoritariamente marino (Graham & Wilcox 2000), cabe suponer que el internarse en el estuario las aleje de su ambiente óptimo de crecimiento, lo que explicaría su mayor abundancia en la estación exterior.

Asimismo, aunque el papel del género *Micromonas* haya sido importante en términos de abundancia relativa, llegando incluso a suponer en varias ocasiones hasta el 30% del total del picoplancton eucariota, no se puede asegurar que, en este caso en concreto, haya sido la especie dominante de dicha comunidad, como se ha registrado en estudios previos realizados en el canal de La Mancha (Not *et al.* 2004), pues cabe la posibilidad de que otras especies de clorofitas, o incluso de algas eucariotas de otras divisiones, marcadas con las sondas de nivel taxonómico alto empleadas en este estudio, alcancen mayores abundancias que *Micromonas* sp.

3.5. Conclusiones

3.5.1. Interpretación de las poblaciones detectadas mediante citometría de flujo

La interpretación de los datos obtenidos en los citogramas puede ser complicada en ocasiones, no ofreciendo una gran resolución taxonómica y pudiendo inducir a error.

En el presente estudio se han observado lo que podrían ser poblaciones heteromórficas tanto para las picofitoeucariotas con PE como para el género *Synechococcus*, lo que impide establecer una correspondencia absoluta entre el número de poblaciones observadas en las muestras analizadas mediante citometría y el número real de especies de estos taxones presentes en dichas muestras. En cuanto a las poblaciones de *Synechococcus* cabe la posibilidad de que correspondan a cepas de distintos ecotipos que convivirían en un ambiente de transición marítimo-estuario como es el extremo exterior del estuario del Nervión, o bien que sean fruto de un fenómeno de adaptación cromática complementaria ocurrido durante el cultivo.

Asimismo, se ha identificado mediante citometría de flujo una población celular que podría estar compuesta por algas del género *Prochlorococcus*. Este género no se ha observado con anterioridad en el estuario del Nervión, por lo que a falta de la confirmación de su presencia en cultivos, o por otros medios, queda por esclarecer si dicha población podría estar formada por alguna especie de picroalga eucariota, como por ejemplo el género *Micromonas*, cuyas células al fijarse con formaldehído al 1% de concentración final tienden a agregarse y a sufrir una alteración de sus propiedades ópticas que las hace caer, al menos en parte, dentro de los límites de la región establecida para la posible población de *Prochlorococcus*.

3.5.2. Discrepancias entre citometría y epifluorescencia para la estima del picoplancton

En cuanto a las discrepancias observadas en los recuentos de epifluorescencia y citometría, parece que la causa de las menores abundancias estimadas mediante la primera de estas dos técnicas se halle en una combinación de los siguientes factores: (1) el tiempo de almacenamiento previo al procesado de estas muestras, que fue mayor para las de epifluorescencia, pudiendo significar una mayor pérdida de fluorescencia en éstas; (2) el tiempo y las condiciones de almacenamiento tras el procesado, que fue mayor para las muestras de citometría aunque éstas se almacenaron en N₂ líquido, lo que pudo hacer que pese a todo se acabaran conservando mejor que las de

epifluorescencia, conservadas a -20°C ; y por último, (3) la subestimación en las muestras analizadas mediante epifluorescencia del picofitoplancton sin PE respecto a la que tiene, cuya fluorescencia era mucho más intensa que la de las clorofilas en las células fijadas.

3.5.3. Aplicación del TSA-FISH para la estimación de la abundancia del picofitoplancton

El TSA-FISH empleado en este estudio presenta dificultad para la reproducibilidad de los recuentos realizados mediante microscopía debido a la subjetividad del observador a la hora de detectar las células marcadas específicamente. Resulta pues recomendable el uso de técnicas como la citometría de flujo, con umbrales de detección objetivos y dotados de robustez estadística por la fácil replicabilidad de sus análisis.

Debido a los problemas que se han observado en cuanto a la permeabilidad de cultivos de cf. *Nannochloris* y *Nannochloropsis* sp. aislados del propio estuario, parece necesario el empleo de una permeabilización extra, preferiblemente enzimática, para evitar la subestimación de grupos de microalgas que pudieran tener una importancia significativa en la comunidad.

El aumento de la concentración de SDS de 0,01% a 0,1% en los tampones de lavado e hibridación ha permitido aumentar notablemente la relación señal/ruido y tanto las partículas celulares como la autofluorescencia de las muestras no han producido un ruido de fondo importante. Sin embargo, la fluorescencia inespecífica detectada ha sido notable, lo que hace necesarias ulteriores optimizaciones del protocolo para facilitar la detección de células marcadas específicamente.

Pese a las limitaciones que como técnica cuantitativa presenta tal y como ha sido aplicada en este estudio, esta variante de TSA-FISH es útil para generar caracterizaciones, al menos de una manera semicuantitativa, de las poblaciones picoplanctónicas. Esto hace que sea válida para estudiar la contribución relativa al

número de individuos que especies o grupos de algas para los cuales existen sondas específicas realizan al total de la comunidad fitoplanctónica. Para grandes grupos como la división Chlorophyta es probable que con protocolos que dependen exclusivamente de baños de etanol para la permeabilización de las células algunos grupos de algas queden subestimados, aún en el caso de que se empleen sondas específicas para éstos. Esto se debe a que no todas las especies que comparten una secuencia específica de nucleótidos presentan la misma permeabilidad a una sonda para dicha secuencia.

Cabe señalar la necesidad de lograr un protocolo de TSA-FISH lo más universal posible para el recuento de fitoplancton. Este protocolo debería cumplir 3 premisas fundamentales: (1) realizar el recuento de muestras preferentemente mediante citometría de flujo; (2) ser capaz de minimizar al máximo la pérdida de células debida al tratamiento de las muestras; y (3) incluir el empleo de tratamiento enzimático para la permeabilización de células con pared. Teniendo en cuenta estas premisas, el protocolo de Biegala y colaboradores (2003) para realizar un TSA-FISH cuantitativo mediante citometría de flujo parece un punto de partida adecuado, pues mediante el empleo de surfactantes y sonicación, posibilita porcentajes de recuperación del 90 ± 18 % de las células analizadas. Estos porcentajes, o mejores, si se consiguen en el futuro, permitirían, de una manera relativamente sencilla, una estimación precisa de las concentraciones originales de las poblaciones fitoplanctónicas, yendo más allá de los porcentajes de abundancia relativa. Dichos porcentajes, pueden llegar a ser muy fiables, como se desprende de Not y colaboradores (2002), donde se corresponden, casi idealmente, los porcentajes relativos obtenidos experimentalmente con los porcentajes nominales para mezclas de cultivos de *Bolidomonas pacífica* y *Ostreococcus tauri*. Sin embargo, estos porcentajes no dejan de ser una medida semicuantitativa, mientras que en la actualidad, para la adecuada gestión de los cada día más amenazados ecosistemas acuáticos, resultan indispensables las medidas cuantitativas, precisas y fiables, y la continua monitorización de las poblaciones fitoplanctónicas. Por tanto, el diseño de un protocolo para TSA-FISH que permita cumplir las citadas premisas, de manera sencilla y rápida, resulta algo prioritario para la aplicación rutinaria de esta técnica a los estudios medioambientales. Esta necesidad adquiere especial relevancia socio-económica y medioambiental si se pretende emplear TSA-FISH para la monitorización y el control de los efectos de las especies potencialmente nocivas.

3.5.4. La comunidad picofitoplanctónica del estuario del Nervión y la importancia relativa que las clorofitas tienen en ella

En cuanto a la abundancia de los distintos grupos de algas picoplanctónicas hallados en el estuario del Nervión durante el verano de los años 2008 a 2010, cabe decir que entran dentro de los rangos descritos para la zona y en la bibliografía en general, tanto en lo referente a las algas sin PE, entre las que predominan según los datos de citometría, los picoeucariotas, como entre las algas con PE, entre las que predominan las cianobacterias del género *Synechococcus*. Estos dos grupos son los más abundantes alcanzando en el verano densidades de hasta $1,04 \cdot 10^8$ y $2,98 \cdot 10^7$ céls. \cdot l⁻¹, respectivamente.

Como hipótesis de trabajo se plantea que este predominio de las formas eucariotas sobre las cianobacterias podría estar relacionado con las condiciones ambientales que se dan en el verano en las estaciones exteriores del estuario. En éstas, parece posible que durante la época estival lleguen a darse condiciones de escasez de nutrientes, ya sea, como se ha planteado en el capítulo anterior, a causa de floraciones previas que agoten los recursos, ya sea debido a una reducción en los aportes fluviales por la reducción del caudal del río. Dicha escasez de nutrientes podría favorecer el crecimiento de las algas picoplanctónicas frente a formas mayores, mientras que la habitualmente mayor irradiancia favorecería a las algas eucariotas frente a las cianobacterias del género *Synechococcus*. Es posible que ambas poblaciones desempeñen un papel importante en la producción primaria de este estuario, al menos durante algunos meses de verano, en tanto que las menos abundantes eucariotas con PE y quizás el género *Prochlorococcus*, cuya presencia queda aún por confirmar, tengan un papel secundario.

Finalmente, entre las algas eucariotas cabe destacar, al menos durante los meses estivales, el papel de las clorofitas, que constituyen una importante proporción de las algas picoplanctónicas en la parte exterior del estuario del Nervión, llegando a suponer de media casi 2/3 de dicha población. Entre estas algas destacan las pertenecientes al orden Mamiellales, que llegan a ser más de 2/3 de las clorofitas, y en especial cabe mencionar el género *Micromonas* como el más importante de este orden, llegando a ser

algo más de la mitad de las Mamiellales. Además, la importancia de estas algas crece ligeramente hacia el exterior del estuario debido, posiblemente, a su carácter principalmente marino.

CAPÍTULO 4

TAXONES DE ALGAS VERDES DEL
ESTUARIO DEL RÍO NERVIÓN

4.1. Introducción

Estudios previos realizados en el estuario del Nervión y en estuarios próximos han profundizado en la taxonomía de las especies de algunos de los principales grupos algales que componen la comunidad fitoplanctónica de la zona. Inicialmente, aunque aún hoy se continua trabajando en ellos, se estudiaron los grupos con especies de mayor tamaño como son diatomeas (Trigueros *et al.* 2000, Trigueros 2001, Trigueros *et al.* 2002, Orive *et al.* 2010) y dinoflagelados (Trigueros 2000, Trigueros 2001, Laza-Martínez *et al.* 2011). Posteriormente, el análisis de pigmentos para la caracterización de las poblaciones fitoplanctónicas puso de manifiesto la importancia relativa de otros grupos nanoplanctónicos tales como criptofitas y haptofitas en el estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006), en cuya taxonomía se profundizó mediante el uso de cultivos celulares y microscopía óptica y electrónica (Seoane 2005, Laza-Martínez 2009, Seoane *et al.* 2009a, Seoane *et al.* 2009b, Laza-Martínez en prensa).

Las algas verdes (clorofíceas, prasinofíceas y euglenofitas principalmente) constituyen otro de los grupos dominantes en el estuario, siendo la clorofila *b* el pigmento auxiliar mayoritario en la fracción picoplanctónica (Seoane *et al.* 2006). En esta fracción, el ratio clorofila *b/a* alcanza valores similares a los de cultivos de prasinofíceas (Latasa *et al.* 2004, Seoane *et al.* 2006), haciendo patente la importancia de este grupo entre las algas verdes picoplanctónicas.

La importancia relativa de las algas verdes en el picoplancton del estuario del Nervión así como los grandes grupos que lo componen se detallan en anteriores apartados de este trabajo. Sin embargo, las algas verdes también cuentan con representantes que alcanzan importantes densidades en las fracciones nano- y microplanctónicas de este estuario, como por ejemplo los géneros *Pyramimonas*, *Tetraselmis*, *Chlamydomonas*, y *Eutreptiella* (Seoane *et al.* 2005, Seoane *et al.* 2006). Pese a su notable importancia, la identificación precisa de las especies que componen este grupo de algas no había sido materia de estudio hasta la fecha, de ahí el interés de su estudio para completar el conocimiento de la comunidad fitoplanctónica.

Atendiendo a esta necesidad, en este apartado se detallan las características morfológicas de 26 cepas de algas verdes aisladas en el estuario del Nervión. Todas

ellas se han analizado al microscopio óptico, empleándose también, en los casos de difícil identificación, la microscopía electrónica. Las características de las cepas consideradas como pertenecientes a la misma especie se han unido en el apartado correspondiente a dicha especie, mencionándose, aún así, las particularidades destacables de cada una de ellas. Al final de cada uno de estos apartados se adjunta una breve discusión acerca de las razones por las que se considera cada una de las algas como perteneciente a una especie en concreto. Asimismo, cada uno de los géneros a los cuales pertenecen las especies identificadas cuenta con un apartado previo, en el que se introducen sus particularidades morfológicas, reproductivas y/o de ultraestructura, además de detalles relacionados con su diversidad y distribución geográfica.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Aislamiento de cepas y condiciones de cultivo

Las cepas analizadas en este estudio, así como su procedencia e información acerca de las condiciones de salinidad y temperatura del agua de la que fueron aisladas, se relacionan en la Tabla 4.1. Independientemente del medio original empleado para su aislamiento, todos los cultivos han sido mantenidos en medio f/2 (basado en Guillard & Rither 1962, apéndice D) a una temperatura de 17 °C y con una intensidad lumínica de entre unos 30-80 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ suministrada en régimen de 14 h: 10 h o 12 h: 12 h (luz:oscuridad).

Las cepas del año 2006 y anteriores se mantenían en cultivo en el laboratorio de fitoplancton al comienzo de este estudio. Para su aislamiento se establecieron cultivos en medio Erd-Schreider modificado (apéndice D) mediante la técnica de diluciones seriadas (3 diluciones y 3 réplicas por dilución) (Thronsen 1978) y de esos cultivos primarios mediante pipeteo bucal se obtuvieron sus inóculos originarios. Esta técnica de aislamiento consiste en succionar una única célula de un cultivo, valiéndose de una pipeta de vidrio de punta aguzada que por su extremo opuesto a la punta está conectada a un tubo de goma por el cual succiona el operador. Mientras se maneja la pipeta, el cultivo, contenido en una

Tabla 4.1.: cepas analizadas en este estudio. Junto al nombre de cada cepa se muestran: el lugar de origen, la fecha de recolección, la salinidad y temperatura del agua del que se obtuvieron y la salinidad a la que se han mantenido en cultivo.

| Cepa | Taxón | Lugar de origen | Fecha de recolección | Salinidad en origen | Temperatura en origen (°C) | Salinidad en cultivo |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------------|----------------------|
| CGA01 a, N.C. | <i>Eutreptiella epharpygea</i> | Puerto deportivo de Getxo | Noviembre de 2003 | | | 30 |
| CGA02 a | <i>Eutreptiella epharpygea</i> | Puerto deportivo de Getxo | Febrero de 2007 | | | 30 |
| CGA03 a | <i>Eutreptiella gymnastica</i> | Puerto deportivo de Getxo | Febrero de 2008 | | | 30 |
| CGA04 | <i>Eutreptiella gymnastica</i> | Estuario del Nervión, Estación 1 | 23/04/2008 | 25,42 | 13,8 | 30 |
| CGA05 | <i>Eutreptiella gymnastica</i> | Estuario del Nervión, Estación 2 | 23/04/2008 | 14,89 | 13,7 | 15 |
| CGA06 a | <i>Mamiella gilva</i> | Puerto de Zierbana | 16/09/2007 | | | 35 |
| CGA07 a, N.C. | <i>Nephroselmis pyriformis</i> | Estuario del Nervión, Estación 0 | Julio de 2006 | | | 35 |
| CGA08 N.C. | <i>Nephroselmis pyriformis</i> | Estuario del Nervión, Estación 2 | 12/03/2007 | | | 30 |
| CGA09 a, N.C. | <i>Pyramimonas orientalis</i> | Estuario de Urdaibai | 26/05/2006 | | | 30 |
| CGA10 a, N.C. | <i>Pyramimonas norrisii</i> | Estuario del Nervión, Estación 0 | Julio de 2006 | | | 35 |
| CGA11 N.C. | <i>Pyramimonas grosii</i> | Estuario del Nervión, Estación 1 | 12/03/2007 | | | 30 |
| CGA12 ^b | <i>Pyramimonas orientalis</i> | Estuario del Nervión, Abra exterior | 04/10/2007 | | | 30 |
| CGA13 ^b | <i>Pyramimonas orientalis</i> | Estuario del Nervión, Abra exterior | 04/10/2007 | | | 30 |

a: aislada, cultivada y cedida para análisis por cortesía de Aitor Laza Martínez.

b: aislada de una muestra recogida por cortesía de Guillermo Aravena Cuevas.

N. C.: No Clónico.

Tabla 4.1. (Cont.): cepas analizadas en este estudio.

| Cepa | Taxón | Lugar de origen | Fecha de recolección | Salinidad en origen | Temperatura en origen (°C) | Salinidad en cultivo |
|--------------|---|----------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------------|----------------------|
| CGA14 | <i>Pyramnomonas orientalis</i> | Estuario del Nervión, Estación 2 | 17/09/2008 | 32,55 | | 30 |
| CGA15 | <i>Pyramnomonas reclusa</i> | Estuario del Nervión, Estación 2 | 17/09/2008 | 32,55 | | 30 |
| CGA16 c, N C | <i>Pyramnomonas propulsa</i> | Estuario del Nervión, Estación 1 | Agosto de 2006 | 33,84 | | 30 |
| CGA17 a | <i>Othocostisellopsis unicoloris</i> | Puerto deportivo de Getxo | 30/8/05 | | | 30 |
| CGA18 a, N C | <i>Othocostisellopsis variabilis</i> | Estuario del Nervión, Estación 0 | Julio de 2006 | | | 35 |
| CGA19 a | <i>Othocostisellopsis unicoloris</i> | Puerto deportivo de Getxo | 07/06/2008 | | | 30 |
| CGA20 a, N C | cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. | Puerto deportivo de Getxo | 05/06/2004 | | | 15 |
| CGA21 a, N C | cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. | Puerto deportivo de Getxo | 12/06/2004 | | | 30 |
| CGA22 a, N C | cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. | Estuario del río Barbedán | 29/05/2006 | | | 15 |
| CGA23 | cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. | Estuario del Nervión, Estación 5 | 25/04/2007 | 9,63 | 18,3 | 15 |
| CGA24 | cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. | Estuario del Nervión, Estación 5 | 25/04/2007 | 9,63 | 18,3 | 15 |
| CGA25 | <i>Chlamydomonas</i> cf. <i>concordis</i> | Estuario del Nervión, Estación 3 | 19/06/2007 | 28 | | 30 |
| CGA26 | cf. <i>Chlamydomonas</i> sp. | Estuario del Nervión, Estación 2 | 17/09/2008 | 32,55 | | 30 |

a: aislada, cultivada y cedida para análisis por cortesía de Aitor Laza Martínez.

c: aislada, cultivada y cedida para análisis por cortesía de Sergio Seoane Parra. N. C.: No Clónico.

placa de pocillos o simplemente una gota extraída sobre un porta, se observa al microscopio invertido para localizar las células de interés.

Para las cepas del 2007 y 2008 las diluciones seriadas se hicieron, en la mayoría de los casos, directamente en medio *f/2* (apéndice D), o bien realizado partiendo de agua de la propia muestra pasteurizada como para la elaboración del medio Erd-Schreider modificado, o bien partiendo de agua marina de otros lugares filtrada y autoclavada para su esterilización, a la que después se le añadían los componentes del medio.

Salvo que se especifique otra cosa, todas las cepas son, en principio, clónicas, y han sido aisladas mediante la técnica de pipeteo bucal. Algunas cepas no clónicas, por el contrario, se obtuvieron únicamente a partir de diluciones seriadas tras las que se lograron cultivos monoalgales (ver Tabla 4.1.).

4.2.2. Microscopía óptica

Para la observación de los caracteres morfológicos de las células se empleó un microscopio Leica DMRB (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemania) equipado con óptica para contraste de fases y epifluorescencia. Se emplearon objetivos PL FLUOTAR de 40X y 100X para las imágenes de 400X y 1000X respectivamente. Con el objetivo de 100X se empleó aceite de inmersión de baja fluorescencia Nikon 50 tipo A (Nikon Corporation, Tokio, Japón), aplicado directamente sobre el cubreobjetos que iba estabilizado sobre el portaobjetos por cuatro puntos a los que se aplicaba grasa de silicona antes de añadir la muestra a observar. La toma de las microfotografías se llevó a cabo gracias a una cámara Nikon Digital Side DS-U2. Para la toma de medidas de las principales dimensiones de células, escamas y pelos, así como para el tratamiento de imagen se empleó el software NIS Elements D 2.3 Service Pack 3 (Laboratory Imaging s.r.o., Praga, República Checa). Para el tratamiento de imagen también se empleó el software Adobe Photoshop® CS 8.0.1. (Adobe Systems Inc., San Jose, EE.UU.).

Para la ralentización o inmovilización de las células con objeto de facilitar la toma de fotografías se empleó en ocasiones, siguiendo a Reize y Melchonian (1989), una solución de agarosa de temperatura de gelificación ultrabaja SeaPrep[®] (Lonza Rockland Inc., Rockland, EE. UU.). La agarosa se preparaba al 2% (m/V) disuelta en medio de cultivo a la misma salinidad de los cultivos a observar, y era mezclada en una proporción de 1:1 (V/V) con dichos cultivos, de manera que la concentración final fuera de un 1%. La disolución del producto se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y la mezcla de agarosa y cultivo se dejaba gelificar durante 3-10 min en el frigorífico antes de su observación al microscopio.

Para las tareas de aislamiento mediante pipeteo bucal se empleó un microscopio invertido Nikon ECLIPSE TE2000-V equipado con óptica para epifluorescencia y objetivos de 10X Plan Fluor y de 20X y 40X Plan Fluor ELWD.

4.2.3. Protocolos de microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM)

- **1^{er} Protocolo (basado en Seoane 2005)**: empleado para la observación de todo tipo de escamas en general.

1. **Fijación**: se añadieron 1,5 ml de cultivo en un eppendorf, se mezclaron con una gota de Os O₄ al 1% (m/V) y se dejaron reposar hasta el día siguiente (≈ 24h).
2. **Montaje**: se emplearon rejillas de cobre para microscopía electrónica o bien cubiertas con una película de formvar o con una de carbono (Electron Microscopy Science, Hatfield, EE.UU.). Se colocaron 2 de éstas por especie como mínimo para cada preparación, por si a alguna se le rompía el recubrimiento, sobre un pedazo de Parafilm[®] (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, EE.UU.), identificándose cada rejilla sobre el plástico. Después se añadió una gota (≈ 30 µl) del cultivo sobre cada rejilla y se dejó secar.
3. **Lavado**: una vez secas las rejillas se procedió a su lavado en agua destilada con la intención de quitar los cristales de sal que hubieran quedado. Se sumergió cada

rejilla y se agitó muy suavemente 3 veces consecutivas en un vaso de precipitado, cambiándose el agua cada vez que se introducía una rejilla de una especie diferente. Después se dejaron secar.

4. **Contrastado:** una vez secas, las rejillas se pusieron con las caras portadoras de las células sobre gotas de acetato de uranilo (2%) durante 20 min.
5. **Lavado:** para eliminar el exceso de acetato de uranilo, las rejillas se lavaron de nuevo como en el paso 3. Después, se dejaron secar, a temperatura ambiente y se guardaron en un desecador hasta su observación al microscopio electrónico de transmisión, que se llevó a cabo a la mayor brevedad posible. En este estudio se emplearon un microscopio Philips CM120 (Koninklijke Philips Electronics N.V., Amsterdam, Holanda) equipado con una cámara Olympus SIS Morada (Olympus Corporation, Tokio, Japón) y un Philips 208S equipado con la misma cámara.

- **2º Protocolo (Marin & Melkonian 1994):** empleado especialmente, aunque no de manera exclusiva para la observación de pelos flagelares.

1. **Fijación y montaje:** se añadieron 4 µl de cultivo celular a un volumen igual de fijador previamente puesto sobre una rejilla para microscopía electrónica. El fijador empleado fue una disolución de 5% de glutaraldehído en el medio de cultivo de las células. La mezcla se dejó fijar durante 5 min y después se removió el líquido sobrante mediante papel secante.
2. **Contrastado:** a cada rejilla se le añadieron o bien 4 µl de agua destilada y 4 µl de acetato de uranilo acuoso al 2%, o en lugar de lo anterior, 8 µl de acetato de uranilo al 1%, y se dejó contrastar la muestra durante 90 s, tras lo cual se secó la rejilla absorbiendo el líquido con papel secante.
3. **Lavado (opcional):** en los casos en los que se deseaba tener un contraste negativo de las muestras se dejaron secar completamente las rejillas de manera que ya estaban listas para su observación al microscopio. Si por el contrario, se quería obtener un contraste positivo se realizaba un último lavado de las rejillas con 4 µl de agua destilada que era secada inmediatamente con papel absorbente.

4.2.4. Protocolo de microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM; adaptado de Novarino *et al.* 2002)

1. **Fijación:** los cultivos a analizar se fijaron de manera instantánea con lugol (10 μ l por cada 1,5 ml de muestra).
2. **Montaje:** para la concentración de los cultivos por sedimentación se emplearon unos viales de 15 ml de plástico, previamente identificados, a los que se les cortó el fondo y se les puso, entre el tapón y la boca, un cubreobjetos circular pretratado durante 5-10 min con poly-l-lysine al 0.1% (m/V, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EE.UU.), de manera que al enroscarse el tapón quedara la parte tratada del cubreobjetos hacia el fondo cortado. Se colocaron los viales boca abajo, con la parte cortada y la cara tratada del porta hacia arriba, a modo de columna de sedimentación, se le añadieron, mediante una pipeta Pasteur, 1,5-10 ml de muestra fijada y se dejaron sedimentar durante 16-24 h como mínimo, tapando la parte cortada del tubo con Parafilm[®] para que no se evaporara la muestra ni le cayera polvo.
3. **Lavado:** una vez terminada la sedimentación se desechó el medio fijado sobrante con las pipetas Pasteur correspondientes, reutilizando las usadas en el paso anterior. Tras esto, se desarmaron los montajes de sedimentación y se trasladaron los cubres, mediante pinzas, a placas de pocillos debidamente identificadas en las que se realizaron los pasos siguientes, dejando siempre la cara con las células hacia arriba y reservando una calle para cada cubreobjetos. En el primer pocillo, se lavó cada uno los cubres durante 20 min con 2 ml de medio de cultivo a la misma salinidad que el correspondiente cultivo sedimentado y esterilizado mediante filtración en jeringa.
4. **Postfijado:** antes de pasar al segundo pocillo se dispusieron los cubres en la cara interna de la tapa de la placa, ocupando el espacio correspondiente a cada pocillo utilizado para lavar el lugol, y se añadió, mediante una micropipeta, Os O₄ sobre cada uno de ellos hasta cubrirlo por completo (\approx 50 μ l por cubre). Se dejaron fijar

durante unos 30 min y pasado este tiempo se recogió el Os O₄ con una pipeta y se desechó en un Eppendorf.

5. **Lavado:** se pasaron los cubres al siguiente pocillo de sus respectivas calles, dónde se lavaron, 3 veces, con 2 ml de agua destilada durante 5 min cada vez, utilizando para ayudarse en el manejo de los portas un punzón como complemento a las pinzas.
6. **Deshidratación:** una vez lavados los cubres se pasaron al siguiente pocillo dando inicio a una serie de baños de etanol de graduación ascendente para deshidratar las células, realizándose cada baño en un pocillo distinto. La serie comprendía de 4-6 pasos/pocillos según lo sensibles a la deshidratación que fueran las células. Las graduaciones en cada paso fueron las siguientes: 30, 50, 70, 90, 95, 98% y, finalmente, 2 baños de alcohol absoluto. Los cubres se mantuvieron en cada baño un mínimo de 5 min, a excepción de los baños de alcohol absoluto en los que se mantuvieron un mínimo de 10 min. Los pasos de 95 y 98% solo se realizaron con células bastante sensibles a la deshidratación (por ejemplo algas sin pared celular).

Tras la deshidratación en alcohol, y como sustitución a la técnica de punto crítico del CO₂, los cubres se sometieron a 2 baños de 1 ml de Hexametildisilazano (HMDS) de 5 min de duración cada uno (también en pocillos separados).

Finalmente se depositaron los cubres en una placa de pocillos limpia y debidamente identificada, y se guardaron en un desecador hasta el montaje de las muestras sobre los soportes para SEM, también llamados stabs.

7. **Montaje:** para el montaje en los stabs, primero se identificaron éstos debidamente y se les puso, en la cara que no lleva agujero, una gotita de cemento conductor de carbón Leit-C (Agar Scientific Ltd., Stansted, Reino Unido), extendiéndose hasta cubrir la superficie donde iba a ir el cubre, y luego se colocó éste sobre el pegamento por la cara que no lleva las células. En los casos en los que en el stab cupiera más de un cubre se repitió la operación con cada uno y se identificaron por separado tanto en los laterales del stab como en la cara que es observable al microscopio para facilitar la orientación durante la observación al microscopio. Se

puso también un poco de pegamento cubriendo ligeramente los laterales de cada cubre, para mejorar el agarre.

Para terminar se guardaron los stabs con los cubres montados en el desecador hasta el día siguiente o, al menos, hasta haberse evaporado el solvente del adhesivo de montaje, puesto que a la hora de dorar las muestras se las somete al vacío y si quedara algo de líquido, éste se evaporaría dificultando el dorado, el pegado y/o la integridad del cubre.

8. **Contrastado:** se cubrieron las muestras con una fina capa de oro que reflejara los electrones mediante un recubridor de oro Fine coat ion sputter JFC-1100 (JEOL Ltd., Tokio, Japón) y se guardaron en desecador hasta su observación en el microscopio electrónico de barrido, que en este estudio fue un Hitachi S-4800 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón).

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. *Eutreptiella* da Cunha

El género *Eutreptiella* da Cunha está compuesto por protistas de vida libre con perfil generalmente ovoide, fusiforme o clavado, pero que gracias a su capacidad para realizar un tipo de movimiento por arrastre llamado metabolia o movimiento euglenoide, pueden cambiar de forma con relativa facilidad (Butcher 1961, Walne & Kivic 1990). Su membrana plasmática es desnuda careciendo tanto de pared como de escamas, aunque está reforzada interiormente por un periplasto llamado película. La película es una estructura compleja de soporte celular compuesta por la membrana plasmática, de tres capas lipídicas en este género, bandas proteínicas, microtúbulos de soporte y cisternas tubulares del retículo endoplasmático (Sommer 1965, Leander & Farmer 2000). En estudios realizados con especies del género afín *Euglena* se ha observado que esta película interviene en los cambios de forma necesarios para la generación del movimiento euglenoide (Suzaki & Willianson 1986, Leander & Farmer 2000). En *Eutreptiella* este tipo de movimiento es habitual entre las distintas especies y es, en general, vigoroso. Además, la naturaleza de las bandas de la película y, en

Eutreptiella en concreto, el número de éstas por cada 10 μm , tiene importancia taxonómica (Walne *et al.* 1986, Leander & Farmer 2000, Leander & Farmer 2001).

Los euglenoides fotótrofos suelen tener gran cantidad de cuerpos mucíferos bajo la película, posiblemente relacionados, entre otras funciones, con la metabolía (Leander & Farmer 2000), y el género *Eutreptiella* no es una excepción en este sentido (Walne *et al.* 1986).

Los flagelos, como en el resto de euglenofitas, se insertan en el final de una cavidad flagelar en la que se pueden diferenciar 3 partes: la apertura al exterior, llamada citostomo, la parte central, llamada canal o garganta y la parte final abultada, conocida como reserva (Sommer 1965, Walne & Kivic 1990, Wotowski & Hindák 2005). Tienen de 2 a 4 flagelos con longitudes diferentes. Son heterodinámicos, los cortos agitándose de manera más rígida y los largos con ondulaciones, y uno de ellos porta un abultamiento llamado cuerpo paraflagelar, que forma el aparato fotosensible de la célula junto con un estigma extraplástidial que aparece a la misma altura que dicho cuerpo pero en el citoplasma cercano a la membrana del canal (Butcher 1961, Walne & Kivic 1990, Marin *et al.* 2003). Otra característica de los flagelos de este género, que comparten con el resto de las euglenofíceas, es el hecho de ser esticonemáticos, o lo que es lo mismo, portar una sola hilera de pelos, que además pueden ser de más de un tipo distinto (Butcher 1961, Walne & Kivic 1990, Stonik 2007).

Los cloroplastos, de tres membranas como en el resto de euglenoides fotótrofos (Walne & Kivic 1990), pueden variar según la especie, de manera que pueden ser desde uno solo, con forma de placa lobulada o reticulada, hasta 10 o más, de menor tamaño y con formas que van desde discoideas hasta placas, hojas, o bandas más alargadas (Butcher 1961, Walne *et al.* 1986). Estos plastos, cuando aparecen en gran número, pueden en ocasiones estar organizados en clústeres o grupos en torno a un agregado formado por los pirenoides de cada uno.

Los pirenoides pueden tener una cubierta compuesta por gránulos de paramilón (α -1,3 glucano), que es la sustancia de reserva típica de las euglenophyceas (Marin *et al.* 2003). El paramilón también suele aparecer en gránulos de distintas formas y tamaños esparcidos por el citoplasma. Además del paramilón, al menos algunas

especies, también pueden tener vacuolas de crisolaminarina (β -1,3 y β -1,6 glucano) como material de reserva (Thronsen 1973).

A diferencia de otros euglenoides, el género *Eutreptiella* lo forman exclusivamente protistas fototróficos y no se conocen células incoloras, no fotosintéticas, entre sus integrantes. Tras la revisión de Marin y colaboradores (2003), el género queda compuesto por 10 especies principalmente marinas, pero que también aparecen comúnmente en los estuarios, como es el caso, por ejemplo, de la especie *E. gymnastica*, que es capaz de crecer sin problemas en un rango de salinidad de 5 a 35 (Thronsen 1973, Walne *et al.* 1986). La especie tipo es *Eutreptiella marina*, descrita superficialmente por da Cunha (1914) y más ampliamente por Norris (1964). La reproducción, como en el resto de euglenofitas, es asexual y por una división celular longitudinal que comienza por la parte anterior y se extiende hacia la parte posterior (Wotowski & Hindák 2005).

En cuanto a su distribución, son cosmopolitas habiéndose hallado especies de este género en Nueva Zelanda (Norris 1964), Reino Unido (Butcher 1961), EE. UU. y Dinamarca (Walne *et al.* 1986), Brasil (da Cunha 1914), Noruega, Bélgica, Holanda, el mar Adriático, Japón (Thronsen 1973 y sus referencias), las costas del este de Rusia (Stonik 2007), y hasta en el Ártico (Thronsen 1993). En ocasiones pueden protagonizar floraciones en las que llegan a alcanzar altas densidades (Stonik 2007).

En el presente estudio se han analizado 5 cepas aisladas del estuario del Nervión adscritas al género *Eutreptiella*, 2 de ellas pertenecientes a la especie *E. eupharyngea* y las otras 3 a la especie *E. gymnastica*.

4.3.1.1. *Eutreptiella eupharyngea* Moestrup & Norris

Se han analizado 2 cepas pertenecientes a esta especie: CGA01 y CGA02.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células biflageladas, acrocontas y heterocontas, con un flagelo más largo que otro. El extremo anterior (esto es, el que va primero en el sentido habitual del movimiento, en contraposición al posterior que es el contrario) suele ser ovalado o truncado, en la cepa CGA01, mientras que suele ser truncado, pudiendo también ser redondeado o elíptico en la cepa CGA02. A veces, en este extremo puede observarse una pequeña incisión. Se trata del citostomo o inicio de la cavidad celular que alberga los flagelos, (Lám. 1, Fig. 4; Lám. 2, Fig. 2). Esta cavidad puede llegar a extenderse hasta casi 3/4 de su longitud total al menos en la cepa de Febrero 07 (Lám. 3, Fig. 4). El extremo posterior suele ser acuminado o cónico (Lám. 1, Fig. 2). El aspecto general de la célula nadadora es algo ahusado aunque con el extremo anterior como se ha explicado (Lám. 1, Figs 1 y 3). El cuerpo celular, en reposo, suele tener una curva más o menos marcada sobre la parte central, lo que da a la célula una forma de S o la apariencia de llevar joroba (Lám. 1, Fig. 2; Lám. 2, Figs. 2 y 4). Las células que realizan el movimiento euglenoide tienen la forma cambiante típica de este movimiento debido a las ondas de presión que deforman su citoplasma, estrechándolo en algunas zonas y alargándolo o abultándolo en otras (Lám. 2, Figs. 1 y 3).

- **Dimensiones:** tienen una longitud, incluyendo las células que están realizando el movimiento euglenoide, de 14-75 μm y una anchura de 5-12 μm , con un flagelo corto de 7-21 μm de longitud y uno largo de 20-59 μm (Tablas 4.2.-4.3.).

- **Cloroplasto:** las células tienen multitud de pequeños cloroplastos con forma de banda o de disco más o menos alargado, de color verde hierba con algunos tonos de amarillo y textura lisa, repartidos por toda su longitud (Lám. 2, Fig. 3).

Tabla 4.2.: principales dimensiones de la cepa CGA01 de *Eutreptiella eupharyngea*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=55) | Anchura (n=55) | Flagelo Corto (n=21) | Flagelo Largo (n=20) |
|--------|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| Medias | 30,11 | 8,87 | 13,37 | 32,92 |
| Rangos | 14-75 | 5-12 | 7-21 | 20-59 |
| Menor | 13,92 | 5,12 | 7,09 | 19,89 |
| Mayor | 74,75 | 11,54 | 21,15 | 58,63 |

Tabla 4.3.: principales dimensiones de la cepa CGA02 de *Eutreptiella eupharyngea*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=29) | Anchura (n=29) | Flagelo Corto (n=13) | Flagelo Largo (n=13) |
|--------|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| Medias | 30,03 | 9,47 | 13,52 | 42,09 |
| Rangos | 17-55 | 6-12 | 9-17 | 25-57 |
| Menor | 17,3 | 5,51 | 8,87 | 25,49 |
| Mayor | 54,56 | 12,16 | 17,17 | 56,52 |

- **Estigma:** un único estigma amarillo que suele estar posicionado cerca del canal, habitualmente hacia la parte anterior de la célula, aunque puede aparecer hacia la mitad de la célula, y tiene forma redondeada, algo alargada o cilíndrica (Lám. 2, Fig. 1). En algunas células se han observado, esparcidos por toda su longitud, 1 ó más gránulos redondeados de distintos tamaños, y de pigmentación similar al de los estigmas, amarilla, anaranjada, o más oscura, que quizás pudieran ser vacuolas de digestión (Lám. 1, Fig. 1; Lám. 2, Fig. 1). En algunas células no se ha podido apreciar ni estigma ni gránulos pigmentados.

- **Pirenoide:** en la cepa CGA01 se han podido observar 2 pirenoides en algunas células, aunque solo tras emplear una tinción de azocarmin G (Lám. 2, Fig 4),

mientras que en la cepa CGA02 no se ha podido observar pirenoide alguno. Situados cada uno a medio camino del centro hacia la parte anterior y la posterior de la célula, respectivamente, ambos aparecen rodeados de al menos 2 grandes gránulos en forma de taza.

- **División celular:** solo se ha podido observar en la cepa CGA01. En ésta, una célula madre da 2 células hijas que se mantienen nadando unidas hasta que finaliza la citocinesis, que comienza por la zona anterior de la célula y se extiende hacia la parte posterior (Lám. 2, Fig. 5).

- **Movimiento:** para la cepa CGA01 se han registrado tramos más o menos rectos pero con una pequeña ondulación seguidos de trayectorias curvadas o cambios de dirección importantes (90-180°), estos últimos describiendo curvas cerradas sin necesidad de detención de la marcha. También pueden moverse lentamente describiendo tirabuzones o girar sobre si mismas. El movimiento euglenoide se repite en ciclos de unos 10 seg. En cuanto a la cepa CGA02 se ha observado que los avances se realizan con rotación de la célula alrededor de su eje longitudinal. También pueden realizar el movimiento euglenoide incluso durante la natación y nadar tramos cortos hacia atrás para maniobrar e invertir el sentido de la marcha. Durante el movimiento euglenoide las células pueden llegar incluso a doblar su tamaño.

- **Otras características destacables:**

- Algunas células muestran algo similar a una zona circular clara de exclusión de cloroplastos que podría tratarse de un orgánulo, posiblemente el núcleo, apreciado sobre el contraste negativo que le dan los plastos (Lám. 1, Fig. 4; Lám. 2, Fig. 2).

- En las puntas de los flagelos largos de algunas células se pueden apreciar los restos de lo que podría ser una hilera de grandes pelos tapizando una única cara (Lám. 3, Fig. 2).

- Al menos en algunas células la película estriada de fibras que les permite realizar el movimiento euglenoide es bastante conspicua (Lám. 3, Fig. 3) y en 2 células de la cepa CGA01 pudo contarse el número de estrías de la película por 10 μm , siendo éste de 22 (en una célula estirada) y 30 (en una relajada) respectivamente.

- En algunas células, gracias a la tinción con azocarmin G, pudieron observarse multitud de gránulos, supuestamente de paramilón, esparcidos por todo el citoplasma. Estos gránulos tienen formas de ovaladas a cilíndricas y un tamaño de 2-3 μm (Lám. 3, Fig. 1).

- **Especie propuesta:** a pesar de que el rango de tamaños se sale un poco por lo bajo del referido en la descripción original de la especie (Walne *et al.* 1986), 14-74 μm frente 35-70 μm , el resto de características morfológicas observadas apuntan a que se trata de *Eutreptiella eupharyngea*. Por ejemplo: los pirenoides con cubierta de grandes gránulos, en este caso parecían ser 2 y con forma de taza, un número de estrías de la película en 10 μm entre 18-25; y el tamaño y la forma de los gránulos de paramilón esparcidos por el citoplasma, pequeños y elongados, de unos 2-3 μm .

La cubierta del pirenoide podría llevarnos a confundirla con *E. gymnastica* o *E. cornubiense*, que tiene 2 gránulos similares, pero el tamaño de las células y la forma característica de S que se ha podido observar en algunas células (Lám. 1, Fig. 2; Lám. 2, Figs. 2 y 4) señalan hacia *E. eupharyngea*.

En cuanto a la distribución de esta especie nerítica cabe destacar que ha sido encontrada además de en el estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2006, este estudio), en aguas de Dinamarca y EE. UU. (Walne *et al.* 1986), en Japón (Thronsen 1993) y en la costa del este de Rusia, siendo frecuente formadora de floraciones (Stonik 2007), en el estrecho de Kattegat (Thronsen *et al.* 2007b) y finalmente en el Mar de Barents, al norte de Noruega y Rusia (Rat'kova & Wassmann 2002, Rat'kova & Wassmann 2005).

LÁMINA 1

Fig. 1: célula nadadora con el extremo anterior ovalado y el posterior acuminado en la que se pueden apreciar al menos 2 grandes gránulos pigmentados.

Fig. 2: una célula fijada con lugol, con el extremo anterior truncado y el posterior acuminado que muestra la característica joroba en el centro y los 2 flagelos.

Fig. 3: célula nadadora fijada con lugol con el extremo anterior truncado y el posterior cónico. Obsérvese la diferencia de longitud entre el flagelo largo y el corto.

Fig. 4: el inicio de la faringe en la parte anterior y la zona clara central de exclusión de cloroplastos en células que han perdido sus flagelos.

Todas las Figs. obtenidas a 1000X. Figs. 1 y 3-4 con la escala de la Fig. 1. Figs. 1 y 3-5 corresponden a la cepa CGA01 y Fig. 2 a la cepa CGA02.

LÁMINA 1

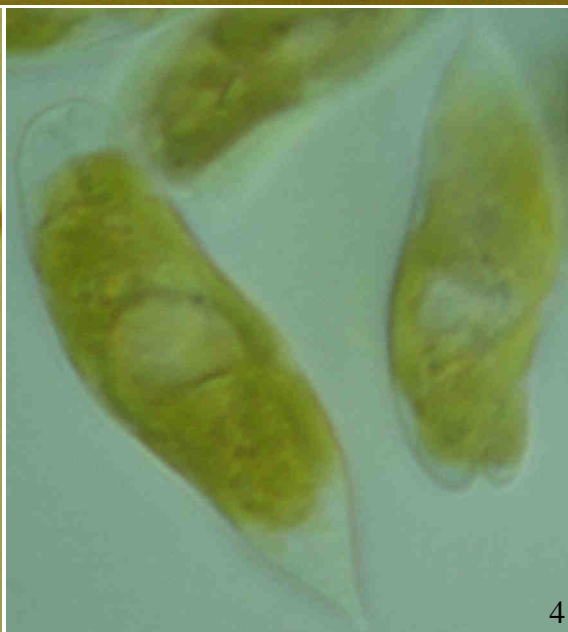
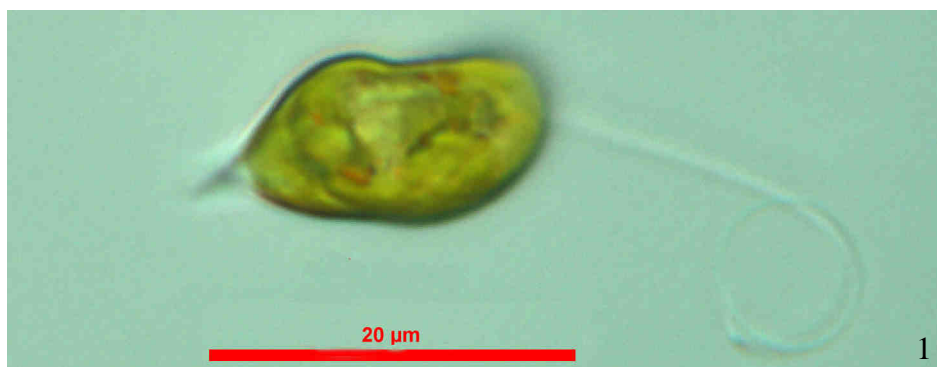


LÁMINA 2

Fig. 1: células euglenoides. Nótese que la célula inferior muestra un estigma en la parte anterior y pequeños gránulos pigmentados extendidos por el resto del cuerpo celular.

Fig. 2: curva en forma de joroba característica de *E. eupharyngea* y la zona clara central en una célula sin flagelos.

Fig. 3: célula euglenoide en la que se puede apreciar la forma de banda de los cloroplastos.

Fig. 4: tinción con azocarmin G en la que se observa una célula que muestra la característica curva en forma de S y dos pirenoide (flechas) rodeados de 2 gránulos en forma de taza.

Fig. 5: un par de células en división fijadas con lugol y apunto de separarse.

Todas las Figs. obtenidas a 1000X. Fig. 4 obtenida mediante óptica de campo oscuro. Figs. 1-4 con la escala de la Fig. 1. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA01.

LÁMINA 2

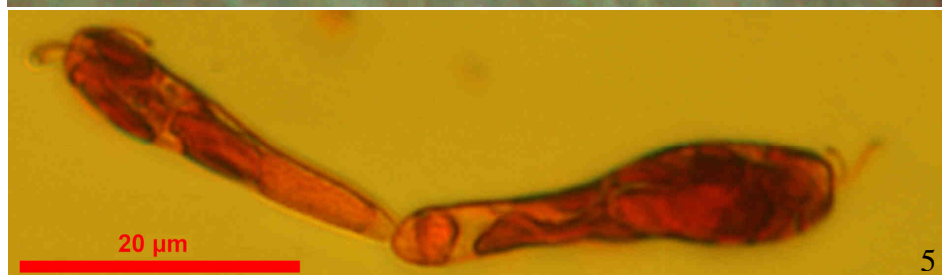
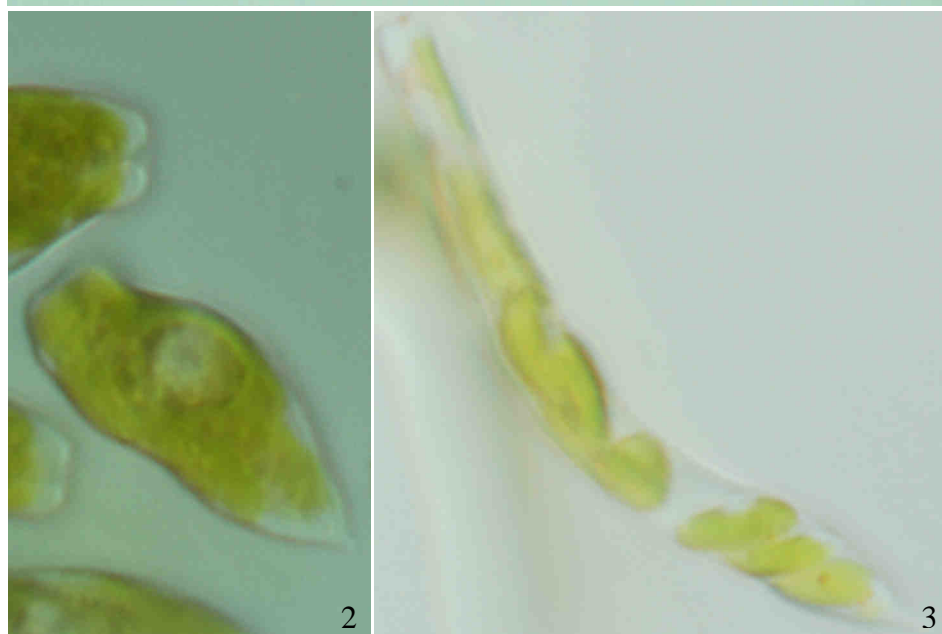
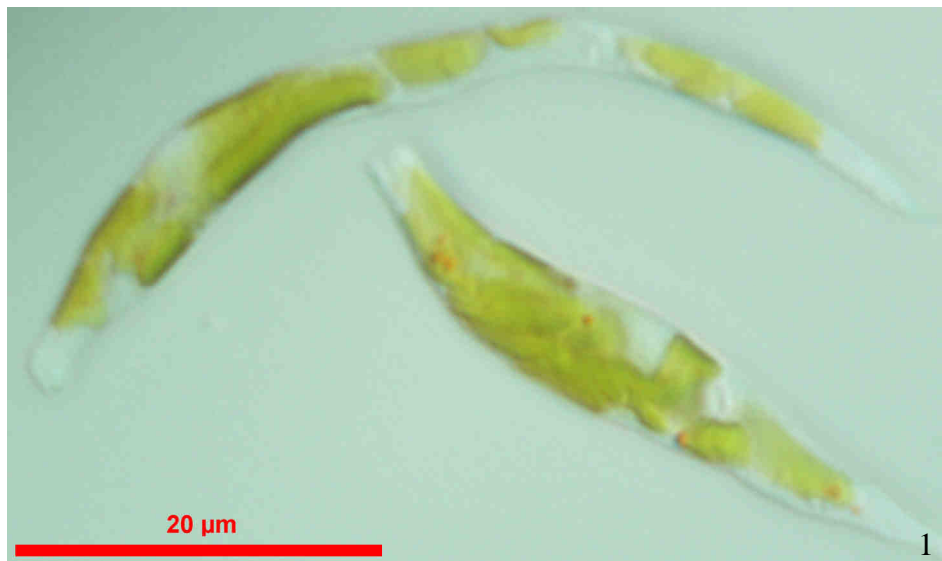


LÁMINA 3

Fig. 1: célula teñida con azocarmin G que muestra un citoplasma repleto de pequeños gránulos, posiblemente de paramilón.

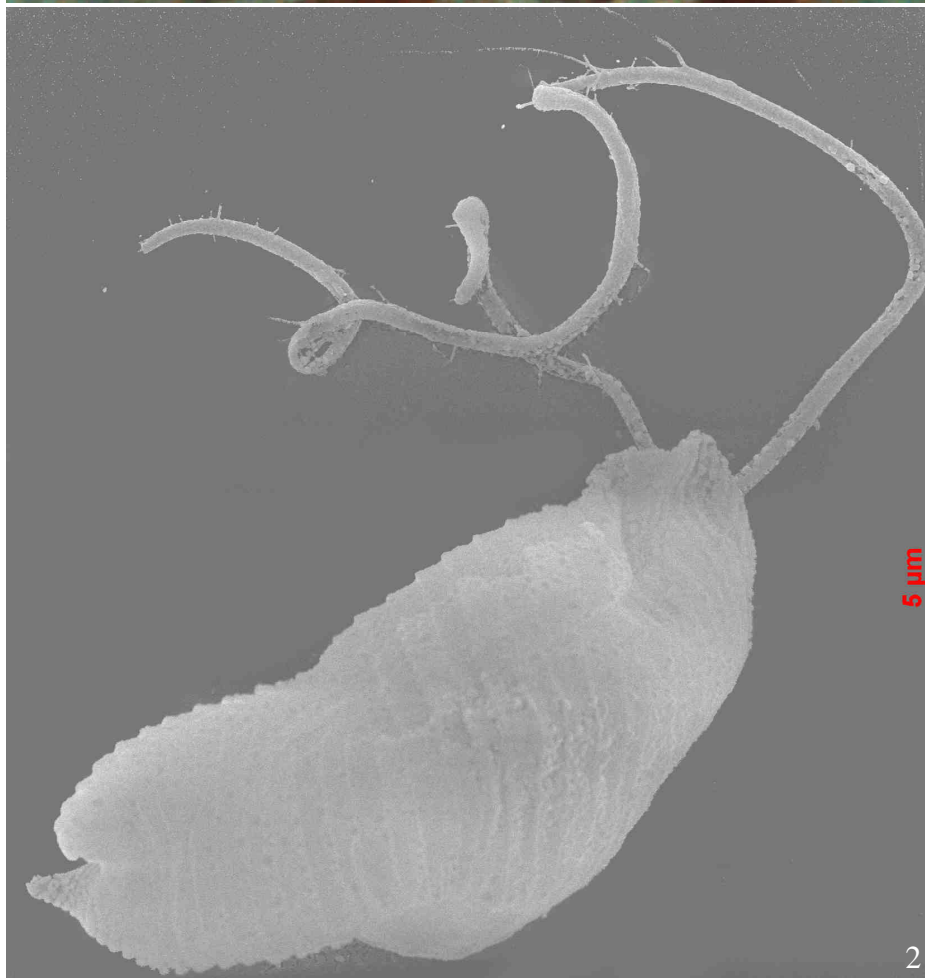
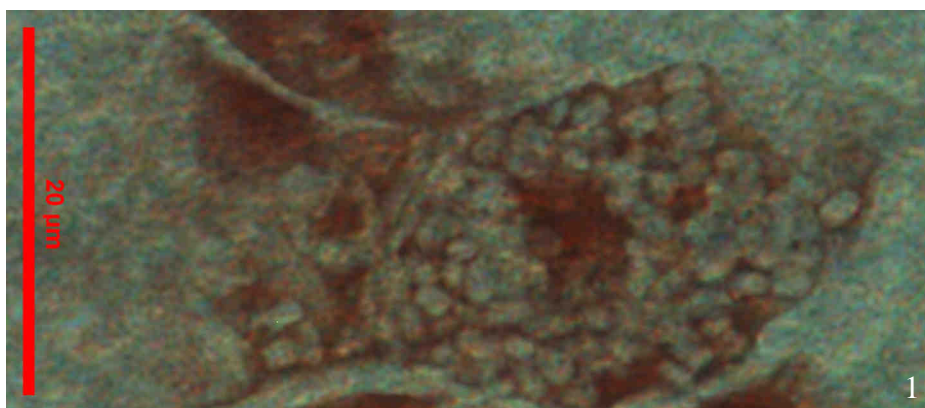
Fig. 2: célula en la que además de las estrías que recorren la membrana plasmática, aún se pueden apreciar algunos pelos, o los restos de ellos, en ambos flagelos. La bifurcación en el extremo antiapical de la célula podría deberse a un artefacto de la fijación o la preparación de la muestra para SEM.

Fig. 3: célula en la que se aprecia la película estriada que envuelve su periferia.

Fig. 4: célula con una prolongada cavidad que va desde el extremo anterior hasta más allá de su mitad. Las flechas marcan el inicio y el final.

Todas las Figs. obtenidas a 1000X excepto la Fig.2. Figs. 1 y 3 obtenidas mediante óptica de contraste de fases y la Fig. 2 mediante SEM. Figs. 3-4 con la escala de la Fig. 3. Figs. 1-2 corresponden a la cepa CGA01, Figs. 3-4 a la cepa CGA02.

LÁMINA 3



4.3.1.2. *Eutreptiella gymnastica* Throndsen

Se han analizado 3 cepas que han sido adscritas a esta especie: CGA03, CGA04 y CGA05.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células biflageladas, heterocontas, con un flagelo más largo que otro, y acrocontas. Las células que no están realizando el movimiento euglenoide tienen una forma más o menos elíptica o ahusada en vista amplia (por su cara más ancha, empleado en adelante en contraposición a vista estrecha, esto es, por su cara estrecha). La parte anterior puede ser algo roma, redondeada, ovalada, elíptica o truncada. El extremo posterior, por su parte, suele ser cónico, lanceolado o acuminado (Lám. 4, Figs. 1-6). En vista frontal son circulares por lo que se puede concluir que semejan cilindros con una base redondeada y la otra aguzada.

- **Dimensiones:** 12-40 μm de longitud, incluyendo las células realizando el movimiento euglenoide, por 5-15 μm de ancho. Flagelo corto de 6-19 μm de longitud y el largo de 13-41 μm (Tablas 4.4.-4.6.).

Tabla 4.4.: principales dimensiones de la cepa CGA03 de *Eutreptiella gymnastica*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=36) | Anchura (n=36) | Flagelo Corto(n=20) | Flagelo Largo (n=29) |
|--------|--------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|
| Medias | 22,94 | 8,86 | 11,66 | 23,61 |
| Rangos | 16-40 | 6-15 | 7-19 | 16-34 |
| Menor | 16,47 | 6,13 | 7,15 | 15,76 |
| Mayor | 40,38 | 14,78 | 18,83 | 34,33 |

Tabla 4.5.: principales dimensiones de la cepa CGA04 de *Eutreptiella gymnastica*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=36) | Anchura (n=36) | Flagelo Corto (n=26) | Flagelo Largo (n=23) |
|--------|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| Medias | 17,74 | 9,21 | 8,36 | 19,94 |
| Rangos | 13-27 | 5-13 | 6-11 | 13-39 |
| Menor | 13,01 | 5,45 | 5,84 | 13,1 |
| Mayor | 27,20 | 13,34 | 11,24 | 38,92 |

Tabla 4.6.: principales dimensiones de la cepa CGA05 de *Eutreptiella gymnastica*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=27) | Anchura (n=27) | Flagelo Corto (n=22) | Flagelo Largo (n=23) |
|--------|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| Medias | 19,06 | 8,37 | 10,44 | 26,64 |
| Rangos | 12-32 | 6-11 | 8-16 | 16-41 |
| Menor | 12,46 | 6,43 | 7,8 | 16,22 |
| Mayor | 31,55 | 11,2 | 15,93 | 41,43 |

- **Cloroplasto:** las células pueden tener un único cloroplasto grande que parece más o menos reticulado, bien perforado con algunas aberturas o con varios lóbulos no muy profundos, o también pueden tener varios pequeños plastos discoides o en forma de placa o cinta alargada (Lám 4, Figs. 1-5; Lám. 5, Figs 1-2 y 4-5). En la cepa CGA04 solo se pudo observar un único plasto. Su color es verde con tonos amarillentos. En cualquier caso, no suelen ocupar toda la longitud celular, dejando a menudo algún espacio sin cubrir hacia los extremos, por lo general hacia la parte posterior.

- **Estigma:** por lo general un único estigma amarillo que suele aparecer en la mitad anterior de la célula, y tiene forma redondeada, algo alargada o cilíndrica, (Lám. 4, Fig. 1, 3 y 5; Lám. 5, Fig. 4).

- **Pirenoide:** un único pirenoide, no siempre visible, que suele aparecer en la zona media de la célula en posición parietal (Lám. 4, Figs. 2; Lám 5, Fig. 6). Tiene forma redondeada pudiendo llegar a ser también hexagonal en las cepas CGA04 y CGA05, y hasta octogonal en esta última, y posee un tono azulado que contrasta sobre el verde del cloroplasto (Lám. 4, Figs. 3-4, Lám. 5, Figs. 6-7 y 9). Algunas veces el pirenoide muestra una línea divisoria central que lo parte por la mitad (Lám. 4, Figs. 2, 5 y 7). En cuanto a la cubierta pirenoidal, en ocasiones son apreciables 1-2 gránulos en forma de bóveda o de taza, con más o menos curvatura, que rodean el pirenoide prácticamente en su totalidad (Lám. 4, Figs. 2, 5 y 7; Lám. 5, Figs. 6-7 y 9-10). En algunas células, quizás en proceso de división, se han llegado a apreciar 2 pirenoides (Lám. 5, Fig. 11).

- **División celular:** solo se ha podido observar en la cepa CGA05, pero es la típica descrita para las euglenofitas (Wotowski & Hindák 2005). En ésta, una célula madre da 2 células hijas que se mantienen nadando unidas hasta que finaliza la citocinesis, que comienza por la zona anterior de la célula y se extiende hacia la parte posterior (Lám. 5, Fig. 3).

- **Movimiento:** las células pueden moverse mediante los flagelos, realizando el movimiento euglenoide (Lám. 4, Fig. 7) o bien una combinación de ambos. Cuando utilizan los flagelos, generalmente el largo lo agitan estando enroscado alrededor de la célula, mientras que el corto se agita extendido (Lám. 4, Fig. 1). El movimiento mediante los flagelos normalmente lleva unida una rotación en torno al eje longitudinal de la célula, que puede llegar a ser relativamente rápida. Esta rotación también puede darse con la célula detenida al menos en la cepa CGA03. Suelen realizar tramos largos, más o menos rectos y, en ocasiones, ondulados, seguidos de cambios de dirección, incluso mayores de 90°, realizados sin detenerse y girando de manera cerrada. Y también son capaces de nadar describiendo tirabuzones o girar en torno a un punto delante de su extremo anterior o sobre si mismas. En la cepa CGA05 el movimiento suele ser, en general, más pausado, incluso el euglenoide, y sus tramos rectos suelen carecer de ondulaciones. Por otro lado, en la cepa CGA04 el movimiento euglenoide puede ser bastante rápido, realizándose un ciclo completo en 10 segundos.

- **Otras características destacables:**

- Algunas células muestran gránulos translúcidos, posiblemente de paramilon, la sustancia de reserva de las euglenofitas, de 1-2 μm de longitud con forma más o menos cilíndrica extendidos por toda la célula (Lám. 4, Fig. 7; Lám. 5, Fig. 1).

- En la cepa CGA05 se ha podido determinar el número de estrías en la membrana por cada 10 μm en número de 17-21 (Lám. 5, Fig. 12).

- **Especie propuesta:** *Eutreptiella gymnastica*, aunque las dimensiones no concuerdan del todo, habiéndose observado algunas células y flagelos mas cortos o largos de lo comentado para esta especie por Walne y colaboradores (1986) (16-40 μm de longitud en este estudio frente a 17-38 μm) si que coinciden, en longitud al menos, con las registradas por Stonik (2007).

El hecho de poder tener un único cloroplasto reticulado o muchos discoides, unido a la naturaleza de la cobertura pirenoidal, el tamaño de los gránulos de paramilón (1-2 μm) y su distribución por todo el citoplasma, también señalan hacia la especie *Eutreptiella gymnastica* (Walne *et al.* 1986, Stonik 2007) pese a que Throndsen (1973) comenta que ningún tilacoide penetra la matriz del pirenoide y en la bibliografía no se hace referencia a un pirenoide partido en ningún momento. Serían necesarios cortes citológicos para confirmar la presencia de ese tilacoide.

Esta especie nerítica ha sido observada durante otros años en el estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2006), en el mar Báltico, las costas de Finlandia (Olli *et al.* 1996, Toming & Jaanus 2007), el Ártico, los mares de White y Barents (Rat'kova & Wassmann 2002, Rat'kova & Wassmann 2005), ha producido floraciones con relativa frecuencia en las costas de Korea del Sur (Lee & Lim 2006) y Rusia (Stonik 2007), en el estrecho de Korea y el mar del Japón respectivamente, y también en las costas de Noruega (Throndsen *et al.* 2007b).

LÁMINA 4

Fig. 1: aspecto general de una célula nadadora con el extremo anterior truncado y el posterior ligeramente lanceolado. El flagelo largo se agita enroscado alrededor del cuerpo mientras que el corto está extendido hacia el anterior de la célula. El cloroplasto parece ligeramente lobulado y aparece un estigma en la mitad anterior izquierda hacia el centro de la célula.

Fig. 2: pirenoide en situación parietal en una célula con extremo anterior truncado y posterior lanceolado. El recuadro muestra una ampliación (2X) del pirenoide en la que se aprecia como se encuentra partido por la mitad. El cloroplasto es similar al de la Fig.1

Fig. 3: célula con el extremo anterior redondeado que tiene un cloroplasto sin apenas lobulación y un amplio pirenoide central sin cubierta aparente (igual que en la Fig. 4). Nótese el estigma cercano al pirenoide, hacia el extremo anterior.

Fig. 4: cloroplasto que no llega ni al extremo anterior ni al posterior.

Fig. 5: célula con pirenoide aparentemente partido y cubierto por 2 gránulos, un cloroplasto aparentemente perforado y un estigma desenfocado (punto oscuro) hacia el extremo anterior.

Fig. 6: célula nadadora que ha perdido sus flagelos con extremo anterior elíptico y posterior acuminado.

Fig. 7: célula en la que se observa un pirenoide, en apariencia partido y con una cubierta compuesta por 2 gránulos con forma de bóveda, ampliado en el recuadro (2X). También pueden observarse varios gránulos cilíndricos, posiblemente de paramilón, repartidos por el citoplasma (flecha).

Fig. 8: células realizando el movimiento euglenoide.

Todas las figuras obtenidas a 1000X. Figs. 1-4 con la escala de la Fig. 1 y Figs. 6-8 con la de la Fig.6. Las Figs. 1-4 corresponden a la cepa CGA04, la Fig. 5 a la cepa CGA05, y las Figs. 6-8 a la cepa CGA03

LÁMINA 4



LÁMINA 5

Fig. 1: célula en la que se pueden apreciar pequeños gránulos de paramilon por todo el citoplasma.

Fig. 2: detalle del plasto reticulado de la célula en la Fig. 1.

Fig. 3: división celular (400X).

Fig. 4: aspecto general de una célula nadadora con un único cloroplasto reticulado y un prominente estigma.

Fig. 5: señal de autofluorescencia de una célula con múltiples cloroplastos discoides.

Figs. 6-7: pirenoides con forma hexagonal (Fig. 6) y octogonal (Fig. 7).

Fig. 8: detalle del posicionamiento parietal del pirenoide.

Fig. 9: cubierta pirenoidal compuesta por 2 gránulos rodeando un pirenoide más o menos hexagonal.

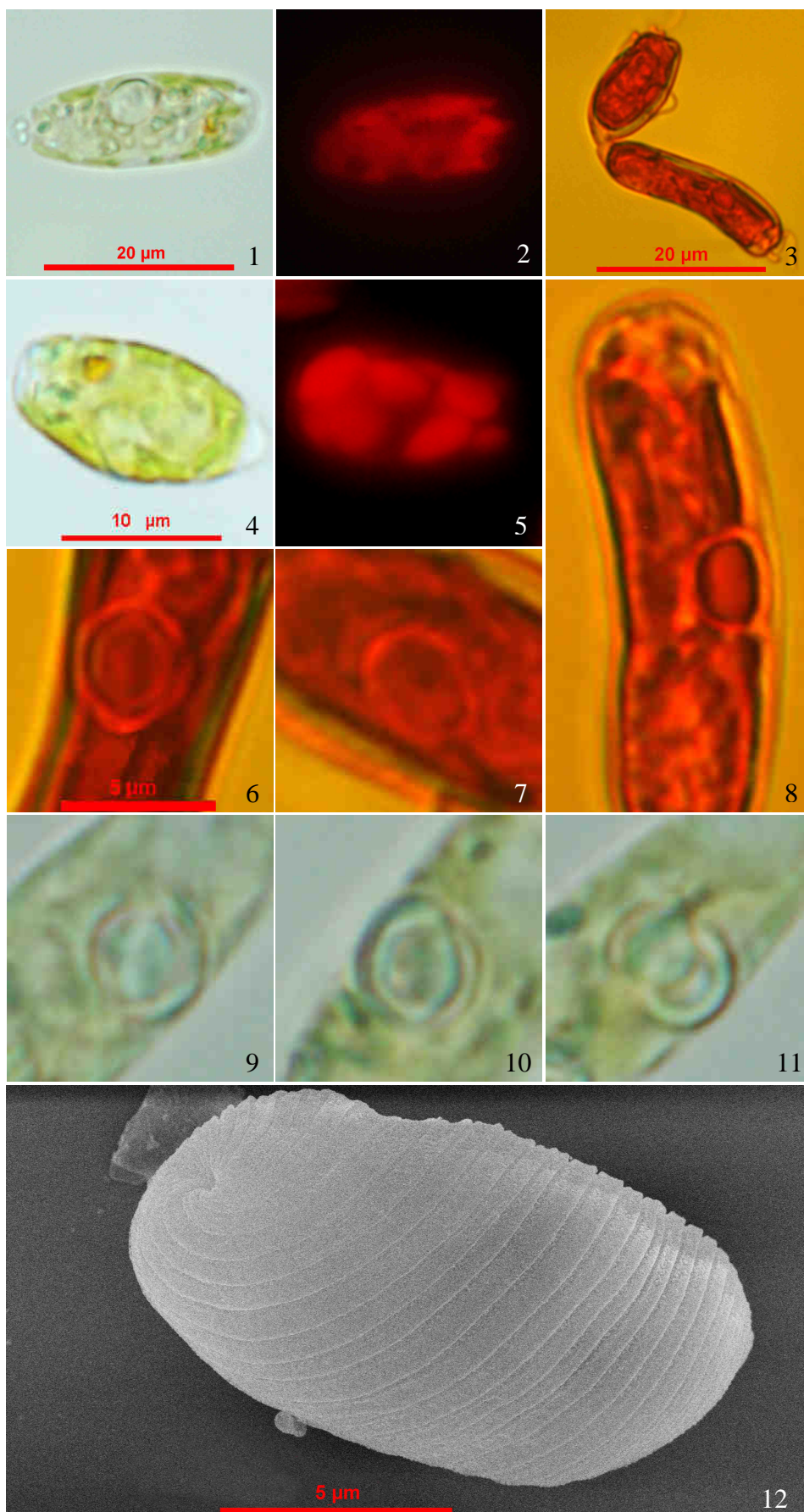
Fig. 10: detalle de un pirenoide cubierto en apariencia por un único gránulo.

Fig. 11: detalle de 2 pirenoides en una misma célula que posiblemente haya comenzado el proceso de duplicación de orgánulos previo a la división celular.

Fig. 12: célula sin flagelos en la que se pueden apreciar claramente las estrías de la membrana y la entrada de la faringe en su extremo anterior (a la izquierda de la imagen).

Todas las Figs., excepto las Figs. 3 y 12, obtenidas a 1000X. Figs. 2 y 5 obtenidas mediante epifluorescencia, Figs. 3 y 6-8 de cultivos fijados con lugol y Fig. 12 obtenida mediante SEM. Figs. 1-2 con la escala de la Fig.1, Figs. 4-5 con la escala de la Fig. 4. y Figs. 6-11, con la de la Fig. 6. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA05.

LÁMINA 5



4.3.2. *Mamiella* (Parke & Rayns) Moestrup

Este género monoespecífico de prasinofíceas, está constituido por la especie *Mamiella gilva*, cuyas células están provistas de 2 flagelos con inserción lateral e iguales en longitud, subiguales u ocasionalmente desiguales. Descrita inicialmente como *Nephroselmis gilva* por Parke y Rayns (1964), fue renombrada como *Mamiella* por Moestrup (1984a). Las células tienen unas dimensiones aproximadas de 4-6,5 x 3-4,5 x 3-4 μm y los flagelos tienen de 2 y 1/2 a 3 y 1/2 veces la longitud celular, naciendo de la superficie cóncava y más estrecha de las células (Parke & Rayns 1964, Moestrup 1984a), la que sería la cara ventral, en contraposición a la cara dorsal o convexa, usando la terminología de Suda (2003) para el género afín *Nephroselmis*.

Al igual que otras prasinofíceas, las células *M. gilva* tienen una cubierta de escamas no mineralizadas. En el caso de esta especie la cobertura consiste en una sola capa de escamas, o puede que 2, no está muy claro, con forma de tela de araña, que recubren tanto el cuerpo celular como los flagelos. Estas escamas tienen una base formada por nervios radiales que parten de su centro hacia el exterior y nervios concéntricos que unen los radiales entre si, quedando los espacios entre ellos vacíos (Parke & Rayns 1964, Moestrup 1984a, LeRoi & Hallegraeff 2006). Sin embargo la naturaleza de las escamas de esta cobertura es diferente distinguiéndose 6 tipos de escamas.

Hay 2 tipos de escamas corporales: unas mayores, de tamaño similar a las flagelares (200-300 nm), y otras más pequeñas (100-200 nm) (LeRoi & Hallegraeff 2006). Según Moestrup (1984a), las escamas corporales menores difieren de las mayores, aparte del tamaño, en el patrón de nervios radiantes del centro de la escama hacia el exterior, pasando a doblarse de 4 a 8 en las pequeñas y de 8 a 16 en las mayores. El mismo trabajo afirma que las escamas menores podrían formar una capa interna cubierta por una capa de las más grandes. Parke y Rayns (1964), diferenciaban las escamas corporales de las flagelares en base a su forma, a parte de la presencia de espinas en estas últimas. Así, describen las flagelares como hexagonales, mientras que las corporales serían octogonales.

Las escamas flagelares, de unos 150-250 nm de diámetro, están provistas de una espina, como ya se ha dicho, de unos 150-230 nm de longitud. Estas espinas forman 8 líneas longitudinales alrededor de cada flagelo (Parke & Rayns 1964, Moestrup 1984a, LeRoi & Hallegraeff 2006) a diferencia de los géneros *Pyramimonas* o *Halosphaera* en los que escamas flagelares similares forman 9 líneas (Manton *et. al.* 1963). Sus nervios radiales se doblan en número desde el centro hacia la periferia, pasando de 7 a 14.

Por otro lado, según Marin y Melkonian (1994), y usando la propia terminología desarrollada en ese mismo trabajo, en los flagelos se pueden observar 3 tipos de pelos: **(1)** pelos T (pelos tipo *Tetraselmis*), compuestos por un filamento proximal por el que se unen al flagelo, un asta tubular lisa, un conjunto de subunidades distales esféricas o discoideas, y un filamento distal rematando el pelo; **(2)** pelos de punta flagelar con una estructura esencialmente igual a los anteriores; y **(3)** pelos P₁ (Pelos laterales tipo *Pterosperma*), mucho mayores que los pelos T, con un filamento proximal seguido de un asta más gruesa y recubierta de material globular y rematados por 2 grupos de subunidades, las centrales y las distales.

Entre las particularidades morfológicas de este género cabe destacar que tiene un cloroplasto parietal situado con la parte no lobulada hacia la parte convexa de la célula, o la dorsal según Suda (2003), y los 2 lóbulos extendidos hacia la cara ventral de la célula. El estigma, por su parte, se sitúa en el extremo dorsal del cloroplasto, en la zona no lobulada, en concreto en la superficie de la región que contiene el pirenoide, cuya cubierta la forma una placa casi continua de almidón (Moestrup 1984a, Parke & Rayns 1964). Finalmente, se ha observado la presencia de extrusomas en el citoplasma cercano a los lóbulos del cloroplasto (Moestrup 1984a). Éstos están repletos con una combinación de material granular y fibrilar.

En cuanto a su distribución, esta especie marina ha sido hallada con anterioridad en el estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2005). en las costas Inglesas (Parke & Rayns 1964), Tailandia, Dinamarca y Nueva Zelanda (Moestrup 1984a y referencias en ese mismo trabajo), en Australia, al sur de Tasmania (LeRoi & Hallegraeff 2006), rara vez en las costas noruegas (Thronsen *et al.* 2007a), en las aguas cercanas a California (Thomsen & Buck 1998) y también como *Mamiella* sp. en las costas japonesas ([NIES](#)

[Microbial Culture Colection](#), cepas NIES-2310 y NIES-2329) y en Canada (Smith & Hobson 1994).

Una única cepa de este género, aislada del puerto de Zierbana, en el estuario del Nervión, ha podido ser analizada en este estudio.

4.3.2.1. *Mamiella gilva* (Parke & Rayns) Moestrup

De esta especie solo se ha podido analizar una cepa, CGA06.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células biflageladas, con flagelos que se insertan lateralmente y van de tener prácticamente el mismo tamaño, a ser subiguales o incluso desiguales. En vista lateral las células pueden tener aspecto discoideo con el extremo ventral más o menos truncado (Lám. 6, Figs. 1-3 y 10; Lám. 7, Fig. 3). También hay células oblongas y algunas con la parte ventral ligeramente lobulada lo que les da una forma algo acorazonada (Lám. 6, Figs. 3 y 11; Lám. 7, Fig. 7). En vista ventral tienen forma circular, de rectángulo redondeado u ovalada (Lám. 6, Figs. 8 y 12; Lám. 7, Fig. 1).

- **Dimensiones:** en vista lateral tienen de 5-8 μm de longitud por 4-7 μm de altura. Los flagelos tienen de 11-29 μm de longitud (Tabla 4.7.).

Tabla 4.7.: principales dimensiones de la cepa CGA06 de *Mamiella gilva*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=27) | Altura (n=23) | Flagelos (n=48) |
|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| Medias | 5,98 | 5,51 | 19,53 |
| Rangos | 5-8 | 4-7 | 11-29 |
| Menor | 4,66 | 4,29 | 10,95 |
| Mayor | 7,88 | 7,35 | 28,92 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde con tonos amarillos y textura por lo general lisa. En cuanto a la lobulación, parecen tener 2 lóbulos principales que a su vez pueden dividirse en 2 cada uno hacia el extremo ventral de la célula. En algunas células solo aparece lobulado 1 y en otras los 2 por lo que pueden verse células con 3 y 4 lóbulos (Lám. 6, Figs. 5-9), quizás en células que han comenzado la duplicación de los orgánulos previa a la citocinesis. En

cualquier caso los lóbulos principales parecen partir desde la parte dorsal de la célula, pudiendo estar más o menos desarrollados, de forma que en algunas células llegan a ocupar toda su altura y en otras terminan hacia la mitad. Según lo oblonga que sea la célula los lóbulos pueden extenderse casi en paralelo hacia el extremo ventral o tender a separarse (Lám. 6, Figs. 3-4).

- **Estigma:** 1-2 estigmas amarillentos poco notorios y que no se aprecian en todas las células. Se pueden encontrar situados o bien en la mitad ventral o bien en la mitad dorsal, llegando incluso hasta el extremo dorsal de la célula, y pueden situarse parietal o centralmente, ya sea en los lóbulos del plasto o en la parte no lobulada de éste (Lám. 6, Figs. 5, 8, 10, y 12; Lám. 7, Fig. 1).

- **Pirenoide:** un único pirenoide difícil de apreciar y no visible en todas las células. Tiene una forma redondeada, elíptica u ovalada y una situación basal y central (Lám. 6, Figs. 8 y 11-12). En algunas células se han observado 2, posiblemente estadios previos a la división celular (Lám. 7, Figs. 1-2). La cubierta pirenoidal parece estar compuesta por 2 gránulos en forma de cúpula (Lám. 7, Fig. 2).

- **División celular:** en apariencia una célula madre da 2 células hijas que permanecen nadando unidas hasta que se completa la citocinesis. La duplicación de pirenoides parece darse antes de la citocinesis (Lám. 7, Fig. 1-2).

- **Movimiento:** pueden desplazarse lentamente avanzando con uno de los flagelos, el posterior, agitándose con ondulaciones hacia el lado contrario del avance, mientras que el otro, el anterior, que queda recurvado alrededor de la parte anterior y orientado sobre la cara dorsal de la célula hacia la parte posterior, se agita moviendo su mitad distal. Por lo general se desplazan describiendo grandes tirabuzones o amplias curvas. Pueden realizar tramos en zig-zag y otros describiendo círculos alrededor de un punto fijo en uno u otro sentido. El movimiento es, por lo general, no muy vigoroso y mientras se da pueden controlar la rotación del cuerpo celular en torno a su eje longitudinal, de manera que éste puede mantenerse estable, oscilar lateralmente o incluso rotar. En las preparaciones sus flagelos se quedan a menudo como enredados entre sí.

- **Escamas:** se han podido observar hasta 3 tipos de escama en esta cepa, todas ellas con un diseño en tela de araña: escamas corporales pequeñas, grandes y escamas flagelares con espina, que serían las equivalentes a las escamas limuloides de otras prasinofíceas.

Las **escamas corporales pequeñas** (Lám. 7, Fig. 4) tienen una forma más o menos octogonal oblonga, casi como si fueran rectángulos con las esquinas aplanadas. Tienen unas dimensiones medias de 196 nm de longitud (185-207 nm) y 146 nm de anchura (135-153 nm, n=5). Su estructura consta de 4 perforaciones centrales en torno al punto de unión de 8 radios que se extienden hacia la periferia de la escama. Esas perforaciones centrales están rodeadas por líneas concéntricas que uniendo los radios forman círculos de 8 perforaciones que se suceden hasta alcanzar el borde de la escama. En general, las perforaciones parecen ser más grandes hacia la periferia y una vez pasada la mitad de la escama, donde tienen su anchura máxima, se van estrechando mientras siguen alargándose. Este mismo patrón de distribución se repite en todos los tipos de escamas observadas.

Las **escamas corporales grandes** (Lám. 7, Fig. 5) son más o menos cuadradas, aunque algunas pueden tener las esquinas más o menos aplanadas, lo que les da una forma algo octogonal. Tienen unas dimensiones medias de 264 nm de lado (242-286 nm, n=8) y una estructura en forma de tela de araña similar a las escamas corporales pequeñas, pero en este caso en torno al punto de unión de los 8 radios principales tienen 8 perforaciones en lugar de 4, y éstos están rodeados por líneas concéntricas que dan como resultado círculos de 16 perforaciones que se suceden hacia la periferia. Los puntos de unión entre estas perforaciones forman otros 8 radios más sinuosos que los anteriores, que no llegan a confluir con los 8 principales en el centro de la escama. Por lo tanto, en total, este tipo de escamas tiene 16 radios.

Por su parte, algunas de las **escamas flagelares** (Lám. 7, Fig. 6) tienen una forma similar a las corporales pequeñas, de rectángulo con las esquinas aplanadas o de octágono oblongo, pero en este caso el papel de uno de los radios

principales lo hace una espina que sobresale del perímetro de la escama. Otras tienen una forma que se acerca más a un hexágono redondeado. En los casos en los que la espina es más gruesa los círculos de perforaciones de más hacia la periferia se cuentan en número de 13 y en los casos en los que es más estrecha, pueden distinguirse 14. Así, contando la espina, pueden apreciarse un total de 13 y 14 nervios radiales respectivamente. Estas escamas tienen una longitud media de 349 nm (330-383 nm) incluyendo la espina, y una anchura media de 245 nm (237-262 nm, n=4).

- Otras características destacables:

-Algunas células muestran 2-5 gránulos más amarillentos que el plasto en el espacio de citoplasma que queda entre los lóbulos de éste (Lám. 7, Fig. 3).

- **Especie propuesta:** en base a la morfología general, el movimiento, la división y las escamas se puede afirmar que nos encontramos ante la especie *Mamiella gilva* (Parke & Rayns 1964, Moestrup 1984a, LeRoi & Hallegraeff 2006). Los tamaños de las células son algo mayores que los de la descripción original (Parke & Rayns 1964) y la única posición descrita para el estigma en *Mamiella gilva* es la del extremo dorsal del cloroplasto y de la célula (Moestrup 1984a). Por otro lado, podría ser que los gránulos amarillentos observados fuesen extrusomas como los descritos en ese mismo trabajo. Estos cuerpos, según Moestrup (1984a) podrían observarse cerca de los lóbulos del cloroplasto por lo que también cabe la posibilidad de que los estigmas detectados en una posición no descrita anteriormente fueran extrusomas. Serían necesarios cortes citológicos o el empleo de tintes como el azocarmin G para la detección de los posibles extrusomas, y para asegurar la posición variable del estigma en la especie *Mamiella gilva*. Finalmente, existen diferencias en cuanto a la forma de las escamas flagelares respecto a lo comentado en la literatura. De modo que al menos algunas de las escamas descritas para esta cepa tienen una forma más o menos octogonal, en lugar de claramente hexagonal como se describe en Parke y Rayns (1964), y un número de radios periféricos de 13, contando la espina, en lugar de 14 como menciona Moestrup (1984a). Pese a todas estas diferencias y a falta de un examen citológico y/o genético que pueda arrojar algo de luz sobre esta cuestión, la cepa CGA06 queda adscrita dentro de la especie *Mamiella gilva*.

LÁMINA 6

Fig. 1: célula discoidea con los flagelos en posición natatoria. Nótese que el flagelo de la derecha que se recurva sobre la cara anterior de la célula ha sido captado mientras se agitaba, de ahí que en la imagen aparezca como doble.

Fig. 2: célula discoidea con la parte ventral algo truncada.

Fig. 3: parte ventral algo truncada y lóbulos del cloroplasto casi perpendiculares en una célula oblonga.

Fig. 4: señal de fluorescencia en vista lateral de una célula con un cloroplasto con los lóbulos divergentes.

Figs. 5-6: vista ventral de una célula con cloroplasto de solo 2 lóbulos (Fig. 5) y la señal de autofluorescencia de la misma célula en perspectiva (Fig. 6) donde se observa que no hay lobulación secundaria. Nótese el estigma cercano el centro de la célula en la Fig. 5

Fig. 7: señal de autofluorescencia en un plano casi ventral de un cloroplasto en el que uno de los lóbulos principales se ha bifurcado en su extremo ventral.

Figs. 8-9: vista ventral de una célula en la que se observan un pirenoide y un estigma centrales y se intuye un cloroplasto de 4 lóbulos (Fig. 8). Se aprecia mejor la lobulación al observar la señal de autofluorescencia de la misma (Fig. 9).

Fig. 10: célula con lo que parecen ser 2 estigmas, uno en cada lóbulo del cloroplasto

Fig. 11: célula con la parte ventral ligeramente lobulada en la que se aprecia claramente un pirenoide basal redondeado.

Fig. 12: vista ventral de una célula en la que pueden apreciarse la posición central del pirenoide ovalado y un estigma algo lateral.

Todas las Figs. obtenidas a 1000X Figs. 4, 6-7 y 9 obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. Figs. 2-12 con la escala de la Fig. 2. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA06.

LÁMINA 6

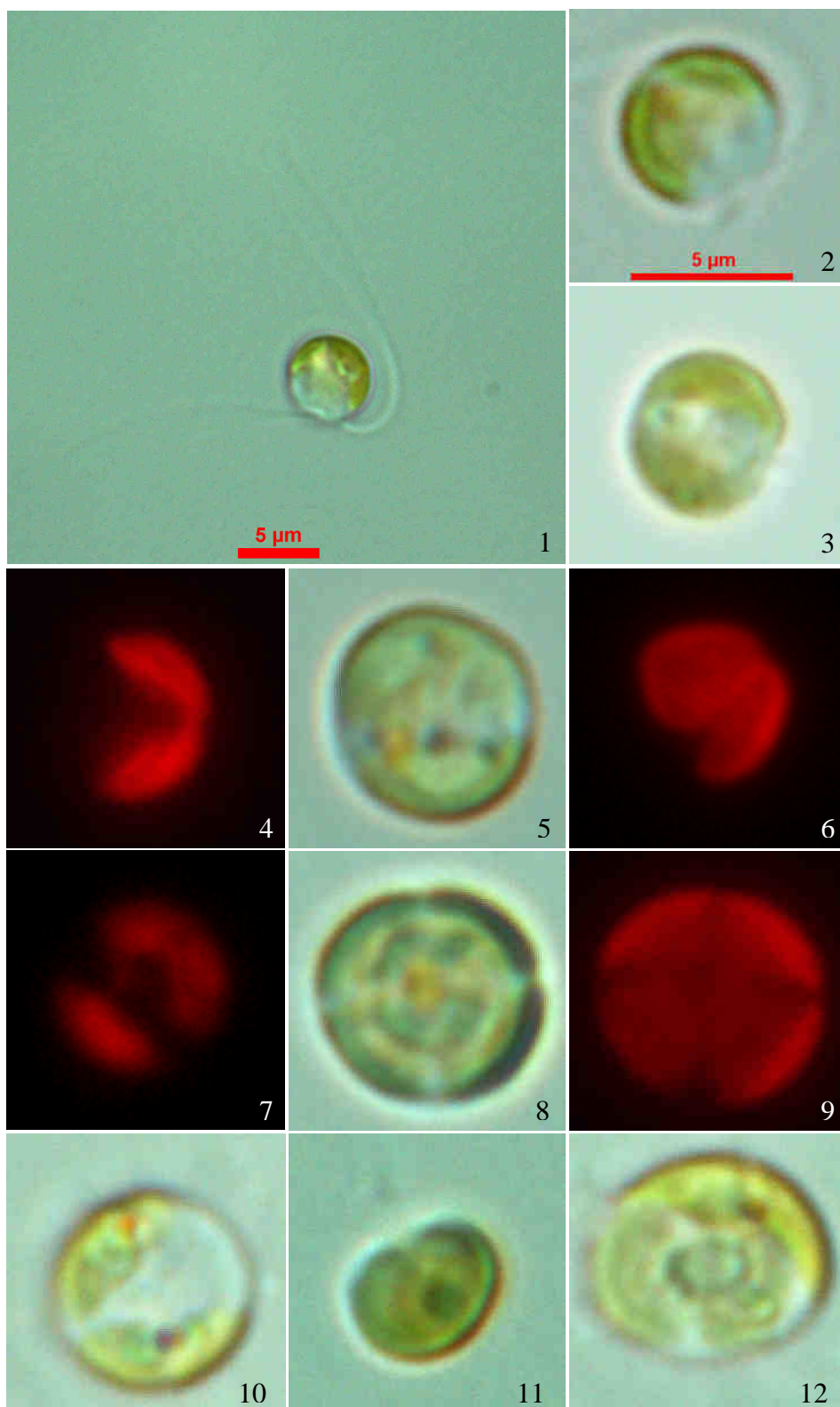


LÁMINA 7

Fig. 1: vista ventral de una célula en división con el pirenoide duplicado y lo que podrían ser 2 estigmas cada uno sobre el centro de los nuevos pirenoides.

Fig. 2: ampliación (2X) de una célula en división que ha duplicado sus pirenoides en la que se puede observar una cubierta pirenoidal compuesta por 2 gránulos en forma de cúpula o taza.

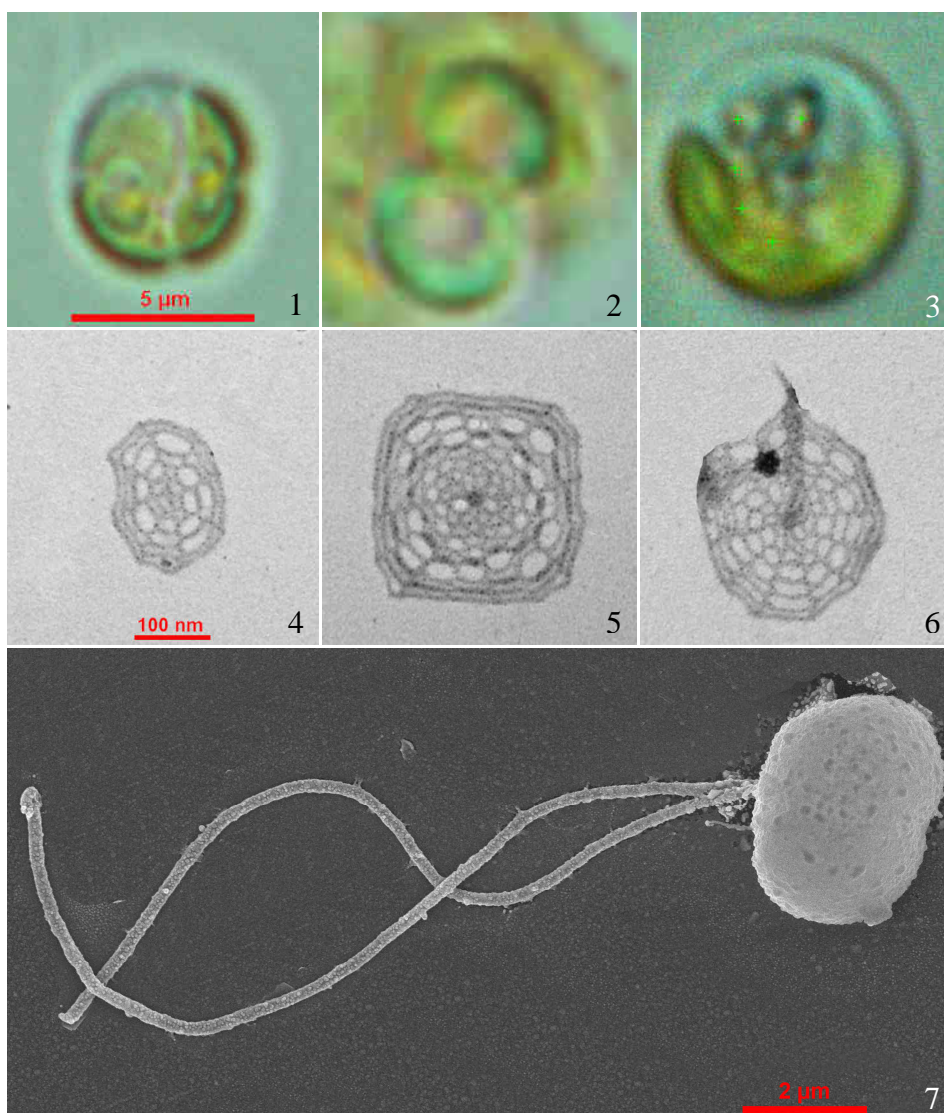
Fig. 3: célula en la que pueden observarse 5 gránulos (+) algo más amarillentos que el plasto en el citoplasma.

Figs. 4-6: diferentes tipos de escama: corporal pequeña (Fig. 4), corporal grande (Fig. 5) y flagelar con espina (Fig.6).

Fig. 7: célula oblonga en la que pueden apreciarse claramente los flagelos subiguales.

Figs. 1-3 obtenidas a 1000X, Figs. 4-6 obtenidas mediante TEM y Fig. 7 mediante SEM. Figs. 1 y 3 con la escala de la Fig. 1, la Fig. 2 es una ampliación a 2X de una foto con la misma escala que la Fig. 1 y las Figs. 4-6 tienen la escala de la Fig. 4. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA06.

LÁMINA 7



4.3.3. *Nephroselmis* Stein

El género *Nephroselmis* lo componen microalgas protistas que tienen en común las siguientes características (Inouye & Pienaar 1984, Bell 2008): **(1)** un cuerpo celular con forma de alubia más o menos aplanado y dos flagelos desiguales y heterodinámicos; **(2)** natación con el flagelo corto dirigido hacia delante y el largo arrastrado detrás; **(3)** la superficie flagelar cubierta por al menos 2 capas de escamas, siendo la segunda característicamente de escamas vara, también llamadas escamas hombre; **(4)** pueden tener un tercer nivel de escamas flagelares o escamas de cavidad flagelar; **(5)** 2 a 4, puede que 5 en *N. anterostigmatica* (Nakayama *et al.* 2007), niveles de escamas corporales, estando el segundo nivel habitualmente formado por escamas con forma de cruz de Malta o de molinillo de papel; y **(6)** un sistema de raíces flagelares consistente en solo 3 raíces microtubulares (una de ellas multicapa), y un rizoplasto, que es un conjunto de fibras estriadas que aparece como componente basal en los aparatos flagelares de multitud de especies de microalgas (Brugerolle & Mignot 2003).

En cuanto a la cobertura de escamas, hay que añadir a las particularidades ya comentadas que el primer nivel de escamas flagelares lo componen las escamas subyacentes pentagonales, comunes entre las prasinofíceas, como las que aparecen por ejemplo en los géneros *Pyramimonas* (Melkonian 1982) y *Tetraselmis* (Becker *et al.* 1990). El segundo nivel habitualmente lo componen escamas hombre de unos 30 nm de longitud (Bell 2008), a excepción de *N. rotunda* en la que el lugar de éstas lo ocupan escamas esteladas pequeñas de un tamaño similar (Manton *et al.* 1965). A parte de éstas y en estrecha relación con los flagelos, algunas especies de *Nephroselmis* pueden tener pelos en torno a la inserción flagelar, llamados pelos de cavidad (traducción libre de pit hairs), como por ejemplo *N. astigmatica* (Inouye & Pienaar 1984) o *N. pyriformis* (Manton *et al.* 1965), o también pueden tener otras escamas, llamadas escamas de cavidad, como en el caso de *N. astigmatica* (Inouye & Pienaar 1984). Por último también se han descrito 4 tipos de pelos flagelares en este género: pelos T, distribuidos en dos hileras a todo lo largo de los 2 flagelos; pelos P_i, que aparecen en una sola hilera en la parte central del flagelo corto (Marin & Melkonian 1994, Bell 2008); los pelos R, descritos por Suda (2003), que aparecerían en la parte basal del flagelo corto, aunque éstos son considerados como pelos de cavidad según trabajos posteriores (Yamaguchi *et*

al. 2010); y finalmente, pelos de punta flagelar, hasta el momento solo observados en *N. pyriformis* (Nakayama *et al.* 2007, Yamaguchi *et al.* 2010) y que podrían tomarse por pelos T especializados siguiendo la terminología desarrollada por Marin y Melkonian (1994).

En cuanto a las escamas corporales, la primera capa la componen las escamas subyacentes cuadradas comunes entre las prasinofíceas (Graham & Wilcox 2000). La segunda, como ya se ha comentado, suele estar formada por escamas con forma de cruz de Malta o de molinillo de papel (Inouye & Pienaar 1984, Bell 2008). La tercera y siguientes, de haberlas, suelen tener escamas esteladas de tamaño y formas variables, pudiendo ser uni-, bi- o multipolares y que tienen organizadas las espinas en distintos niveles (Bell 2008, Yamaguchi *et al.* 2010). Las escamas estelares mayores se pueden describir empleando una fórmula descrita por Bell (2008), y que tiene una expresión como la del ejemplo que sigue: 26: 1+1; 6/4. El primer número de la fórmula hace referencia al total de espinas por escama, 26 en este caso; el segundo término, al número y disposición de las espinas polares, siendo cada número separado por el símbolo + la cantidad de espinas en cada uno de éstos, en este caso tendríamos 2 polos con 1 espina cada uno, un 0 en este término significaría una espina multipolar; y el tercer término, hace referencia a los niveles en los que se organizan las espinas no polares, lo que viene indicado por el número que va delante de la barra, y al número de espinas por nivel, que es el que aparece tras la barra, en este caso serían 6 niveles de 4 espinas cada uno.

El cloroplasto tiene 2 membranas y puede o no ser lobulado, teniendo por lo general forma de taza y un pirenoide con cobertura de gránulos de almidón en forma también de taza (Bell 2008, Yamaguchi *et al.* 2010). Estas algas también tienen un estigma intraplastidial, a excepción de la especie *N. astigmatica* que, como su propio nombre indica, carece de estigma (Inouye & Pienaar 1984).

En cuanto a la reproducción, se da mediante división celular longitudinal con una citocinesis que sucede tras la duplicación de los flagelos y la partición de la cubierta pirenoidal y el núcleo (Inouye & Pienaar 1984). Según Heimann y colaboradores (1989) y Beech y colaboradores (1991), durante la división el flagelo corto o inmaduro crece hasta alcanzar el tamaño del otro y después se forman un par de flagelos cortos *de novo*, de manera que al dividirse las células hijas llevan cada una un flagelo largo proveniente

de la célula madre y uno corto nuevo. Únicamente se ha observado reproducción sexual en la especie *N. olivacea* (Suda *et al.* 1989, Bell 2008).

El género *Nephroselmis* fue descrito por Stein (1878) en base a su especie tipo, *N. olivacea*, pero desde entonces ha habido bastante controversia taxonómica entorno a él y a los géneros afines, si no sinonimos, *Heteromastix* Korshikov, *Bipedinomonas* Carter, *Anisomonas* Butcher, *Sennia* Pascher, y *Pseudoscourfeldia* Butcher, de los cuales solo se mantiene como género actualmente reconocido el último (Manton *et al.* 1965, Moestrup & Ettl 1979, Moestrup 1983, Inouye & Pienaar 1984, Moestrup 1984b, Tseng *et al.* 1994, Bell 2008). Comprende alrededor de 15 especies, la mayoría de ellas marinas, pese a que la especie tipo es de agua dulce, de las cuales solo 7 están confirmadas mediante descripciones detalladas acompañadas de observaciones de microscopía electrónica (Bell 2008). En la actualidad, y tras el trabajo de Nakayama y colaboradores (2007) se ha propuesto este género como único representante del orden Nephroselmiales, a la espera de la introducción en este orden de la familia Pycnococcaceae Guillard, que incluiría los géneros *Pseudoscourfeldia* y *Pycnococcus*. El mismo trabajo proponía el citado orden como el único dentro de la clase Nephrophyceae Cavalier-Smith (Chlorophyta) y sugiriendo cambiarle el nombre por el de Nephroselmidophyceae, más correcto.

Finalmente, en cuanto a su distribución, puede decirse que este género es cosmopolita (Moestrup 1983, Bell 2008, Yamaguchi *et al.* 2010), habiéndose encontrado especies de *Nephroselmis* al menos en las siguientes regiones: lagos y embalses de Dinamarca, EE. UU., y Reino Unido (Moestrup & Ettl 1979), las costas de California (Thomsen & Buck 1998) y Brasil (Bergesch *et al.* 2008), la antigua Checoslovaquia (Manton *et al.* 1965), Japón, Fiji y Sudáfrica (Inouye & Pienaar 1984, Nakayama *et al.* 2007, Yamaguchi *et al.* 2010), la República de Palaos y en el Pacífico (Nakayama *et al.* 2007), Australia (Suda 2003), China (Tseng *et al.* 1994), Suecia, Bélgica, Ucrania, Tailandia y el mar Adriático entre otros (Moestrup 1983, Bell 2008 y referencias en estos trabajos).

La única especie de *Nephroselmis* estudiada en el presente trabajo ha sido *N. pyriformis* de la cual se han analizado 2 cepas procedentes del estuario del Nervión.

4.3.3.1. *Nephroselmis pyriformis* (Carter) Ettl

Se han analizado 2 cepas adscritas a esta especie: CGA07 y CGA08.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células biflageladas, heterocontas, con un flagelo de mayor longitud que el otro, y con inserción lateral. En vista lateral, siguiendo la terminología de Suda (2003), pueden tener una forma que va de elíptica u ovalada a redondeada, pudiendo ser en ambos casos la parte ventral truncada (Lám. 8, Figs. 1 y 5). En general, las células son más altas que largas, pero en algunos casos las células con la zona ventral más aplanada pueden incluso llegar a ser más largas que altas. En vista anterior o posterior, en la que la célula presenta su anchura mínima, tienen una forma oblonga más o menos ovalada siendo generalmente truncadas por la parte ventral. En estas vistas puede observarse además, un aplanamiento lateral (Lám. 8, Figs. 2 y 3; Lám. 9, Fig. 1). Al menos en algunas células puede apreciarse un surco o una depresión ventral donde se insertan los flagelos, que deja a cada lado unas protuberancias citoplasmáticas (Lám. 8, Fig. 4).

- **Dimensiones:** en vista lateral las células tienen una longitud de entre 3-6 μm con una altura de 4-6 μm . La longitud de los flagelos es de 4-14 μm en el caso del corto y de 9-23 μm en el caso del largo (Tablas 4.8.-4.9.).

Tabla 4.8.: principales dimensiones de la cepa CGA07 de *Nephroselmis pyriformis*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=30) | Altura (n=32) | Flagelo Corto (n=33) | Flagelo Largo (n=29) |
|---------------|-----------------|---------------|----------------------|----------------------|
| Medias | 4,77 | 5,14 | 8,34 | 15,75 |
| Rangos | 4-6 | 4-6 | 4-11 | 9-20 |
| Menor | 3,59 | 3,78 | 4,36 | 9,38 |
| Mayor | 5,89 | 6,06 | 10,54 | 19,81 |

Tabla 4.9.: principales dimensiones de la cepa CGA08 de *Nephroselmis pyriformis* La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=30) | Altura (n=28) | Flagelo Corto (n=31) | Flagelo Largo (n=28) |
|---------------|-----------------|---------------|----------------------|----------------------|
| Medias | 4,16 | 4,77 | 9,28 | 16,23 |
| Rangos | 3-5 | 4-6 | 6-14 | 10-23 |
| Menor | 3,17 | 3,6 | 5,99 | 9,96 |
| Mayor | 5,02 | 6,09 | 13,72 | 22,73 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde, que va de tonalidades oscuras a brillantes con tonos de amarillo y textura lisa. En la cepa CGA08 puede llegar a tener color oliva. El cloroplasto es bilobado, con unos lóbulos que se extienden hacia el extremo ventral de la célula cubriendo 1/2-2/3 de la anchura total de ésta y que en ocasiones pueden ser de distinta longitud (Lám. 8, Figs. 1, 3 y 5).

- **Estigma:** un único estigma de color amarillo que se ha podido observar solo en algunas células de la cepa CGA08, situado cerca del extremo del lóbulo anterior del cloroplasto, a veces hacia la parte ventral de la célula y otras hacia la anterior (Lám. 8, Fig. 5).

- **Pirenoide:** un único pirenoide elíptico, ovalado o redondeado, que puede ocupar hasta 1/3, o hasta 1/2 en la cepa CGA08, de la altura celular. Se encuentra posicionado en la parte ventral de la célula de forma basal, en apariencia central, aunque en casos en los que los lóbulos del cloroplasto son de distinto tamaño puede aparecer ladeado en vista lateral. En algunas células es difícilmente visible o no aparece en absoluto (Lám. 8, Fig. 1). En la cepa CGA08, el pirenoide tiene, en apariencia, una cubierta completa, o casi completa y formada por una placa en forma de taza (Lám. 8, Fig. 5). En la cepa CGA07, en cambio, la cubierta parece estar compuesta por 2 gránulos de almidón en forma de cúpula (Lám. 8, Fig. 7).

- **División celular:** una célula madre da 2 células hijas que se mantienen nadando unidas hasta que finaliza la citocinesis (Lám. 8, Figs. 8-10).

- **Movimiento:** el desplazamiento se da intercalando prolongadas paradas con tramos largos y más o menos rectos en los que las células avanzan girando alrededor de su eje longitudinal, estos tramos comienzan con un impulso brusco en el caso de la cepa CGA08. También pueden girar de manera prolongada describiendo círculos en torno a un punto situado al lado contrario de la inserción de los flagelos. En posición de reposo, el flagelo anterior, corto, se encuentra a menudo vuelto sobre la cara anterior y, a veces, con el extremo orientado hacia la parte posterior mientras que el largo o posterior, se encuentra extendido por la parte de atrás de la célula. Pese a todo, al realizar tramos largos y rápidos, parece que ambos flagelos pueden orientarse hacia la parte posterior para impulsar a la célula.

- **Escamas:** se observaron hasta 6 tipos de escamas en esta especie: subyacentes cuadradas y pentagonales, escamas hombre, esteladas pequeñas, pelos T y pelos de punta flagelar.

Las **escamas subyacentes cuadradas** (Lám. 8, Fig. 11) tienen unos 47 nm de lado de media (40-54 nm, n=28).

Por su parte las **escamas esteladas pequeñas** (Lám. 9, Figs. 2-5) tienen una fórmula diferente para las 2 cepas que se han analizado. En la cepa CGA07 su fórmula es 8: 1+1: 2/3. De modo que estas escamas tienen 2 espinas polares, y entre ellas 2 niveles de espinas con 3 espinas cada uno. Tanto las polares como el resto de las espinas parecen tener los extremos más bien romos. Las escamas esteladas tienen una altura media de 44 nm (n=2), medida de punta a punta de espina polar, y un diámetro, en su parte más ancha, medida de punta a punta de espina no polar, de 47 nm (41-55 nm, n=5). Por su parte en la cepa CGA08 las escamas esteladas pequeñas parecen ser unipolares con una fórmula de 9: 1: 2/4 y tienen un diámetro medio de 45 nm (37-50 nm, n=20).

Las **escamas subyacentes pentagonales** (Lám. 8, Fig. 12) tienen una anchura, entendida como la altura del pentágono que forman, de aproximadamente 57 nm (50-65, n=8).

Las **escamas hombre** (Lám. 8, Figs. 13-14), tienen una longitud y anchura medias de unos 52 nm (45-59 nm) y 27 nm (20-36 nm, n=36), respectivamente.

Los **pelos T** (Lám. 9, Figs. 6-7 y 10) observados difieren básicamente en el número de subunidades distales que los componen, sin perjuicio de que existan pequeñas diferencias entre una y otra cepa en el tamaño de los otros componentes de los pelos T. Éstos tienen una longitud media, sin contar los filamentos proximal y distal, de unos 432 nm (384-466 nm, n=27) y una anchura de unos 15 nm (10-20 nm, n=40). En la cepa CGA07 no se ha podido apreciar filamento proximal ni distal alguno, sin embargo en los pelos de la cepa CGA08 se pudo observar un filamento proximal de unos 60 nm de longitud (43-80 nm, n=8). Los pelos de ambas cepas tienen astas de una longitud media de 283 nm (271-302 nm, n=29) en la que no se aprecia diferenciación entre la parte distal y la proximal, y que está surcado por un canal electrolúcido bastante conspicuo. Unidos al extremo distal del asta, se han observado 8-11 subunidades distales en los pelos de la cepa CGA07, mientras que el número ha sido de 14-15 en la cepa CGA08. En estas subunidades puede apreciarse la continuación del mismo canal que surca el asta. Las subunidades son más o menos esféricas en el caso de la primera cepa, aunque algo achaparradas en el eje del canal, con un diámetro medio de 13 nm (10-16 nm, n=21), mientras que en el caso de la segunda tienen forma entre casi cuadrada y discoidea, con 12 nm de largo (10-14 nm) y 16 de ancho (13-20 nm, n=20). Rematando estos pelos se ha podido observar, en un único pelo de la cepa CGA08, lo que posiblemente puede ser un filamento distal de unos 115 nm de largo.

La estructura de los **pelos de punta flagelares** (Lám. 9, Figs. 8-9) queda sin determinar completamente debido a la dificultad para observar sus subunidades y al escaso número de pelos encontrado, y para estar seguros de ella convendría revisar muchos más ejemplares. En la cepa CGA07, de cuyos pelos

de punta solo se han podido observar un par de astas, esta región tiene una longitud total de unos 812 nm (n=1), y está fragmentada por su extremo distal en 8 pedazos de diferente tamaño (no mostrado). Estos fragmentos tienen una forma redondeada los más pequeños, pero siendo más alargados que anchos, con una longitud de 18 nm (16-22 nm, n=6), mientras que los grandes son de forma oblonga con una longitud de 26 nm (21-32 nm, n=6). Ambos tipos de fragmento tienen una anchura media de 14-15 nm (12-17 nm, n=12). Por su parte en la cepa CGA08 los pelos de punta flagelar, de los que solo se han podido apreciar 2 ejemplares, tienen una longitud, sin contar los filamentos, de unos 1249 nm (1242-1255 nm) por una anchura de unos 17 nm (16-17 nm) y parecen tener un asta con el extremo distal fragmentado en 7 pedazos rematado por 26-28 subunidades distales, difícilmente observables puesto que no se contrastan con facilidad.

- Otras características destacables:

- En algunas células de la cepa CGA07 se han observado al menos un gránulo de color verdoso asociado a cada lóbulo de cloroplasto que podrían ser gotas lipídicas. Suelen aparecer más o menos al mismo nivel aunque no siempre, ya sea más hacia la mitad o hacia la parte ventral de la célula (Lám. 9, Figs. 6-7).

- **Especie propuesta:** debido al hecho de haber encontrado solamente un tipo de escamas esteladas y al reducido tamaño de las células, estas cepas pueden adscribirse a la especie *Nephroselmis pyriformis*. Por otro lado, el hecho de tener varios tipos de pelo T solo diferenciados por el número de subunidades distales y la ausencia en éstos de una región terminal del asta, serían características de *N. olivacea* (Marin & Melkonian 1994, Bell 2008). Sin embargo la circunstancia de que estas cepas tengan escamas tipo hombre, ausentes en *N. olivacea*, que los pelos de punta flagelar observados coincidan con los descritos para *N. pyriformis* por Nakayama y colaboradores (2007), y que en ese mismo trabajo no se mencione un asta fragmentada en los pelos de esta última, en contraposición al trabajo de Marin y Melkonian (1994), señalan a *N. pyriformis* preferentemente. Además, la presencia de una cubierta pirenoidal casi completa en forma de taza coincide con la descrita para esta misma especie por Yamaguchi y colaboradores (2010), aunque difiere de la esférica descrita previamente por Moestrup

(1983). Otra diferencia menor de ambas cepas analizadas relacionada con los pelos T, es que éstos tienen un asta algo más pequeña que los reportados en la literatura para *N. pyriformis*; 432 nm de media frente a 450-500 (Nakayama *et al.* 2007), aunque esta diferencia resulta de poca importancia al lado de las características comunes ya comentadas.

El hecho de haber observado en la cepa CGA08 el estigma posicionado hacia la cara anterior pero cerca, generalmente, de la cara ventral y el hecho de que la porción ventral no parece ser oblicua, parecen indicar que no se trata de la especie *N. anterostigmatica*, la cual además posee escamas diferentes a las de esta cepa (Nakayama *et al.* 2007).

Por su lado, el que la cepa CGA07 tenga una cubierta pirenoidal compuesta por dos gránulos la acercaría a la especie *N. olivacea* (Yamaguchi *et al.* 2010), pero el hecho de que la forma y disposición de los gránulos de la amilosfera suele ser variable respecto a las condiciones ambientales y fase de crecimiento de los cultivos (Izumo *et al.* 2007, Yamano & Fukuzawa 2009), y esté posiblemente relacionada con el estado de nutrición del alga, le resta peso a esta característica frente a la ya comentada particularidad de las escamas. Otra característica a resaltar es la presencia de posibles gotas lipídicas en el citoplasma de la célula de esta misma cepa, característica común en las células de *N. rotunda*, pero ésta posee escamas corporales esteladas de gran tamaño de las que no ha sido observada ninguna en este estudio, por lo que es improbable que se trate de esta especie. Por otro lado, el hecho de no haber llegado a observar ningún estigma señalaría hacia la especie *N. astigmatica*, puesto que es la única especie sin estigma conocida para el género *Nephroselmis*, aunque ésta tiene un tamaño bastante mayor (9-13,5 μm de largo) y grandes escamas esteladas de las que ninguna ha sido observada en esta cepa (Inouye & Pienaar 1984), por lo que dicha especie queda descartada. Sería aconsejable realizar cortes citológicos de las células de esta cepa para verificar la ausencia de estigma, que de confirmarse supondría que esta particularidad no sería un carácter exclusivo de *N. astigmatica*.

La distribución de esta especie puede considerarse global, pues incluye, según Moestrup (1983) y las referencias en ese mismo trabajo, las aguas costeras de Inglaterra, Noruega, Dinamarca, Islandia, México, EE. UU., Tailandia y Nueva Zelanda, siendo

una especie euriterma y eurihalina con rangos conocidos de temperatura de 2,3-28°C y salinidad de 3-36. Otros trabajos más recientes citan su presencia en las costas de California y Dinamarca (Thomsen & Buck 1998 y referencias en ese mismo trabajo), las costas de Brasil (Bergesch *et al.* 2008), Noruega y las aguas oceánicas cercanas (Thronsen *et al.* 2007a), Japón y aguas del océano Pacífico (Nakayama *et al.* 2007).

LÁMINA 8

Fig. 1: célula redondeada con parte ventral truncada y un pirenoide redondeado.

Fig. 2: vista anterior de una célula en la que el flagelo corto queda orientado hacia el lector y hacia arriba de la imagen.

Fig. 3: un lóbulo del cloroplasto más largo que el otro y el pirenoide ladeado en una célula redondeada con la parte ventral truncada.

Fig. 4: una célula en la que puede apreciarse el surco en la parte ventral (esquina superior derecha de la imagen).
Barra de escala = 2 μ m

Fig. 5: célula con estigma en uno de los lóbulos del cloroplasto y un pirenoide elíptico con cubierta casi continua en forma de taza, ambos detalles más perceptibles en la ampliación del recuadro (2X).

Figs. 6-7: la misma célula antes (Fig. 6) y después (Fig. 7) de haber perdido el color debido a la observación de su fluorescencia. En la Fig.6 se aprecian claramente 2 posibles gotas lipídicas, mientras que en la Fig. 7 se observan los 2 gránulos que forman la cubierta pirenoidal.

Figs. 8-10: células en división. En la Fig. 8, pese a que la célula ha perdido los flagelos debido a la observación, puede apreciarse como el pirenoide se ha dividido y el cloroplasto parece haber comenzado a hacerlo. En las Fig. 9-10 puede apreciarse un estado más avanzado de la división en el que la citocinesis parece ser incipiente por la zona dorsal, pero parece que el flagelo corto aún no se ha desarrollado completamente.

Fig. 11: escama subyacente cuadrada con protuberancia central.

Fig. 12: escama subyacente pentagonal sin protuberancia central. Barra de escala = 50 nm.

Figs. 13-14: un par de escamas hombre. En la de la Fig. 13 se aprecian mejor las protuberancias que semejan las extremidades y la cabeza.

Figs. 1-3 y 5-10 obtenidas a 1000X, Fig. 4 mediante SEM y Figs. 11-14 mediante TEM. Las Figs. 1-2 y 5 con la escala de la Fig. 1, Figs. 3 y 8-10 con la escala de la Fig. 10, Figs. 6-7 con la de la Fig. 6. y Figs. 13-14 con la escala de la Fig. 13. Figs. 3-4, 6-10 y 13-14 correspondientes a cepa CGA07 y Figs. 1-2, 5 y 11-12 a cepa CGA08.

LÁMINA 8

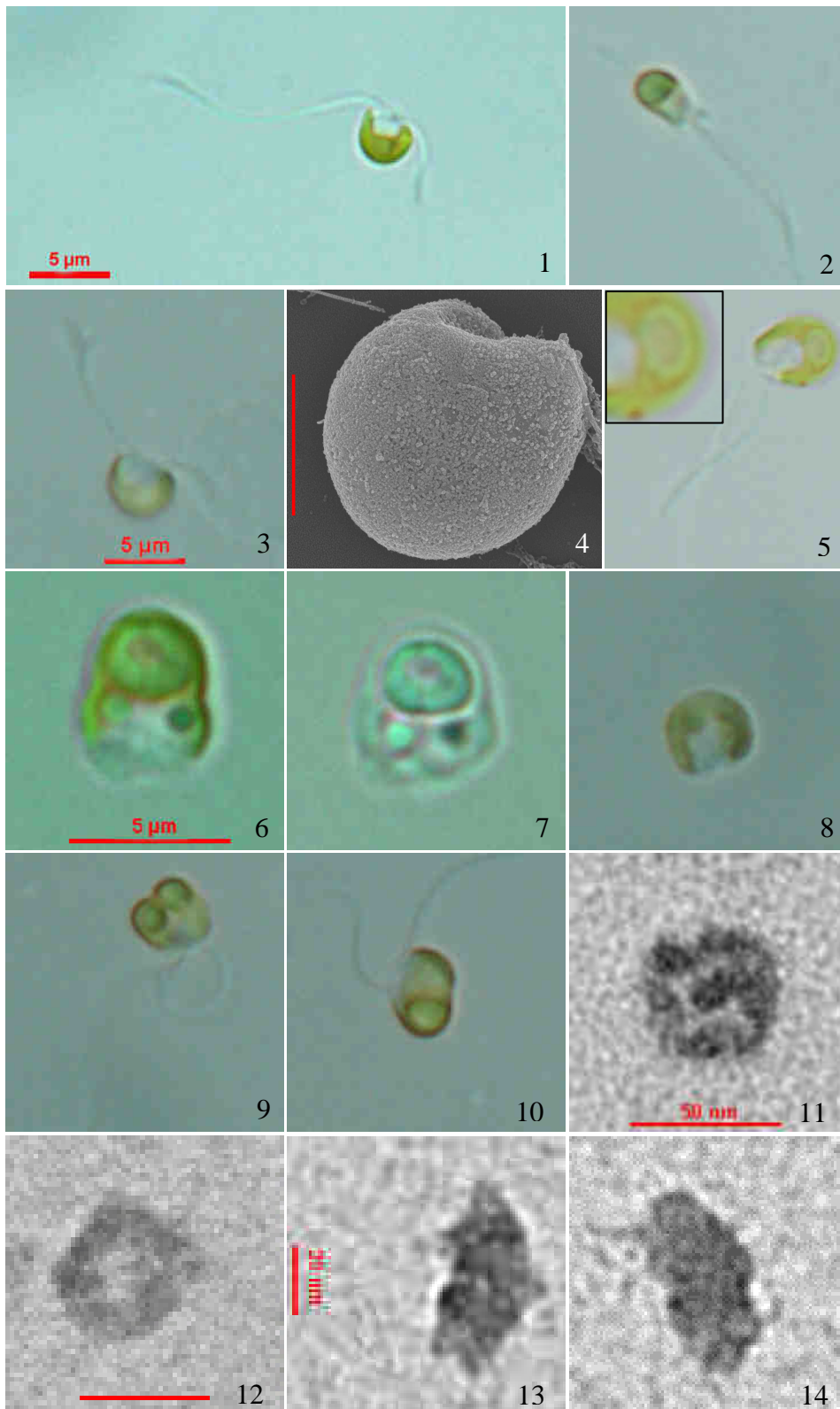


LÁMINA 9

Fig. 1: vista lateral izquierda de una célula en la que se infiere una parte ventral más aplanada y una dorsal más redondeada en base a la altura diferencial de sus respectivos extremos.

Figs. 2-3: escamas esteladas pequeñas. La Fig. 2 muestra un plano lateral o ligeramente oblicuo, con las espinas polares extendiéndose hacia izquierda y derecha, y la Fig. 3, una vista superior, con la única espina polar visible proyectándose hacia el lector.

Figs. 4-5: distintas vistas de escamas esteladas: vista distal (Fig. 4) y lateral (Fig. 5). En este caso en vista lateral puede apreciarse que estas escamas son claramente unipolares.

Fig. 6: detalle del extremo distal de un pelo T en el que se pueden apreciar las subunidades distales (SD), 15 en total, y un filamento distal (FD, acotado por flechas). Algo más arriba del final del filamento se aprecia una escama estelada.

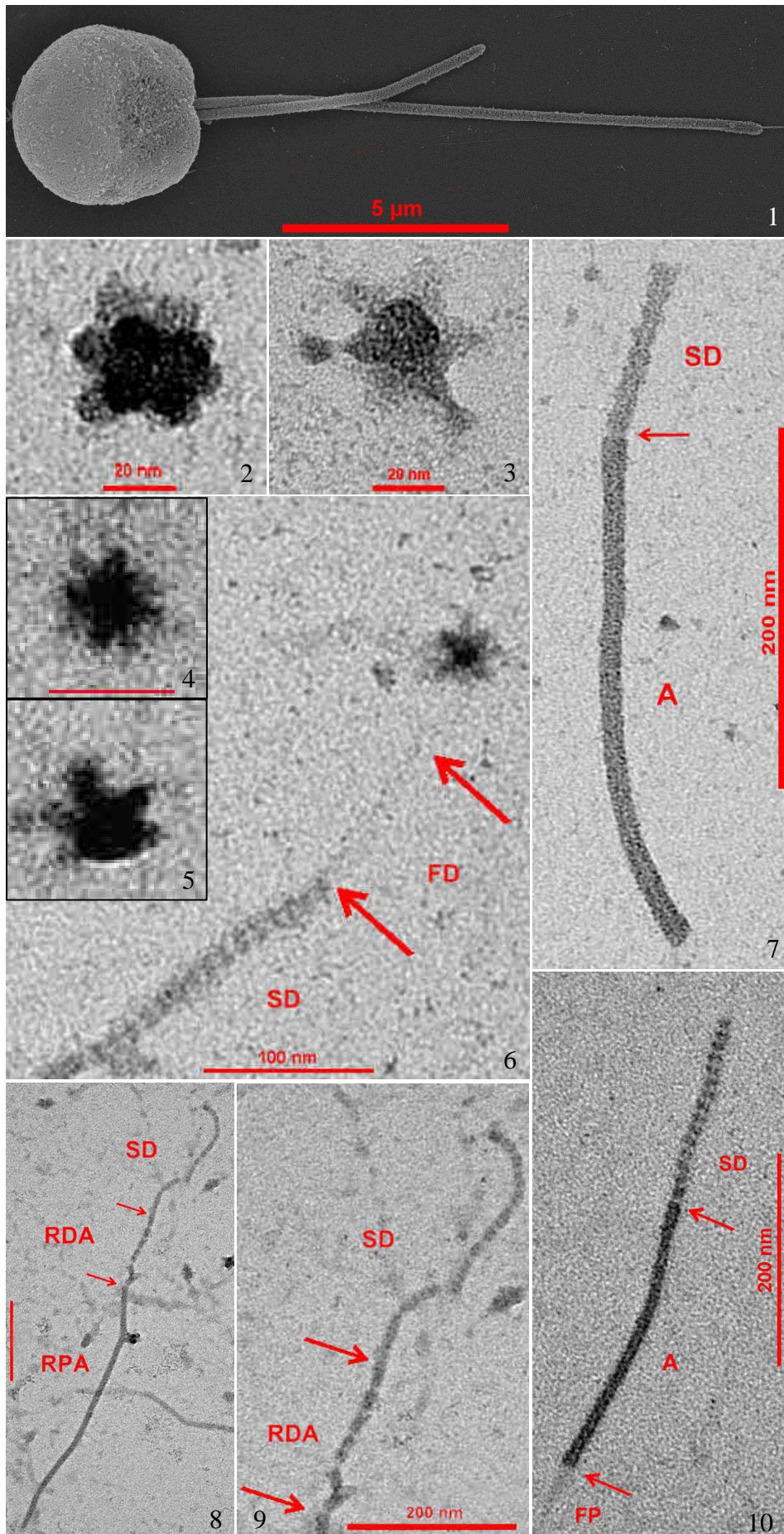
Fig. 7: pelo tipo T, en el que puede apreciarse claramente el canal electrolúcido que corre a través del asta (A), más regular y electrodensa, y las subunidades distales (SD), 8 en total. La flecha indica el límite entre el asta y las subunidades distales.

Figs. 8-9: en la Fig. 8 puede apreciarse un pelo de punta flagelar, en el que se observa una región proximal del asta (RPA) seguido de una región distal (RDA) compuesta por 7 fragmentos y acotada por flechas, y las subunidades distales (SD) rematando el pelo. Dispersas por la mitad derecha de la figura pueden observarse varias escamas hombre y esteladas pequeñas, más oscuras. Barra de escala = 200 nm. La Fig. 9 es una ampliación de la anterior en que se aprecian con más detalle tanto los fragmentos del asta como las subunidades distales.

Fig. 10: pelo T en el que se pueden diferenciar 3 de las 4 regiones observadas para este tipo de pelo. Estas son de abajo hacia arriba: el filamento proximal (FP), el asta (A) y las subunidades distales (SD, 15 en total): El filamento distal no se ha podido apreciar en este pelo. Las flechas marcan el límite entre el asta y cada una de las otras regiones.

Fig. 1 obtenida mediante SEM y Figs. 2-10 mediante TEM. Figs. 4-5 con la escala de la Fig. 4. Figs. 1-3 y 7 correspondientes a cepa CGA07 y Figs. 4-6 y 8-10 a cepa CGA08.

LÁMINA 9



4.3.4. *Pyramimonas* Schmarda

El género *Pyramimonas* lo forman algas unicelulares prasinofíceas, isocontas y acrocontas, con 4, 8 o incluso 16 flagelos alojados en una cavidad anterior. Sus tamaños van de los 2,7 μm que pueden llegar a tener las células de *P. virginica* (Pennick 1977), a los 42 μm de *P. cyrptoptera* (Daugbjerg & Moestrup 1992b) y tienen por lo general una forma piramidal invertida, con los flagelos en la base de dicha pirámide. Tienen una cubierta extracelular de escamas no mineralizadas, compuestas por polisacáridos ácidos y también, al menos en algunas escamas, glicoproteínas implicadas en la unión entre polisacáridos y entre éstos y la membrana plasmática (Becker *et al.* 1993).

Se conocen al menos 7 tipos de escamas repartidos en distintos niveles tanto por la superficie del cuerpo celular como cubriendo los flagelos.

Sobre el cuerpo se puede encontrar un primer nivel, que puede o no cubrir toda la célula, formado por las llamadas escamas subyacentes cuadradas, seguido de un segundo nivel en el que se encuentran las escamas caja, con forma de cubo al que le falta una cara, y un tercer nivel con las escamas corona, que suelen tener una estructura, más o menos abierta, que simula una corona o una cúpula (Pennick 1984). En algunas especies (subgénero *Vestigifera*), aparece otro tipo de escama corporal llamada escama huella o pisada, y que está repartida entre las escamas caja al parecer por toda la superficie celular, según se establece en Sym y Pienaar (1995) zanjando la controversia de si las había o no en la cavidad flagelar que se venía dando tras los trabajos de McFadden y colaboradores (1986), en el que no se apreciaban, y los de Sym y Pienaar (1991) y Daugbjerg y Moestrup (1992a), en los que sí.

Cubriendo los flagelos se puede encontrar un primer nivel de escamas subyacentes pentagonales, dispuestas en 20 líneas longitudinales helicoidales y 4 paralelas llamadas estas últimas líneas de Melkonian en honor a su descubridor (Melkonian 1982), Las líneas de Melkonian se extienden por parejas en laterales opuestos del flagelo. A este primer nivel, le sigue un nivel de escamas llamadas limuloides, que por su forma, redondeada por un extremo y con una espina central y otras auxiliares por el contrario, recuerdan al cangrejo herradura (género *Limulus*). Estas

escamas se distribuyen, imbricadas entre si, en 9 hileras longitudinales (Manton *et al.* 1963). Sobre éstas se encuentra un tercer nivel compuesto por 2 hileras longitudinales de escamas pelo que se extienden por laterales opuestos de los flagelos hasta las puntas, corriendo sobre las líneas de Melkonian (Pennick 1984, Hori & Moestrup 1987, Moestrup & Hill 1993). Siguiendo el trabajo de Marin y Melkonian (1994), estos pelos pueden ser: pelos laterales del tipo T o también pueden ser pelos del tipo Pt (pelos de punta flagelar del tipo *Pterosperma*), que consisten en un grupo de subunidades discoideas unidas entre si y con un diametro decreciente hacia la parte distal, hacia donde pueden empezar a fusionarse o estar rematados por un asta no tubular.

Tanto pelos como escamas, y sobre todo las escamas caja y corona, tienen especial relevancia taxonómica, hasta el punto de ser diagnósticas en la caracterización de las especies. De ahí la importancia primordial del empleo de la microscopía electrónica para la identificación de las especies de este género (Pennick *et al.* 1978, Marin & Melkonian 1994, Suda 2004, Stonik & Aizdaicher 2005).

En base a la naturaleza y disposición de las escamas, la estructura del pirenoide y la orientación del aparato flagelar y los estigmas respecto al núcleo y los lóbulos del cloroplasto, se diferencian de 5-6 subgéneros según los autores, que serían los siguientes: *Pyramimonas*, *Vestigifera*, *Trichocystis*, *Punctatae*, *Hexactis* y *Macrura*. Las características y especies pertenecientes a estos subgéneros así como la controversia en torno a ellos han dado pie a numerosos estudios sobre la materia (McFadden *et al.* 1986, McFadden *et al.* 1987, Sym & Pienaar 1993, Hori *et al.* 1995, Sym & Pienaar 1995, Sym & Pienaar 1997a, Sym & Pienaar 1997b, Sym & Pienaar 1999 y Pienaar & Sym 2002). Paralelamente a estos estudios con base morfológica, se han realizado estudios filogenéticos con el gen de la subunidad grande de la enzima RuBisCO (*rbcL*) codificado en los cloroplastos y el gen de la subunidad pequeña de los ribosomas (*SSU rDNA*), y las filogenias obtenidas a partir de éstos, coinciden en dar soporte al menos a 3 de los 4 subgéneros inicialmente establecidos por McFadden y colaboradores (1986) (Daugbjerg *et al.* 1994, Moro *et al.* 2002, Suda 2004), pero estos trabajos no incluyen las controvertidas especies *P. virginica* y *P. longicauda*, que han dado lugar a los subgéneros *Hexactis* y *Macrura* respectivamente (Hori *et al.* 1995) y no coinciden en cuanto a la validez del subgénero *Punctatae*, pese a que los dos más recientes y

completos lo dan por inválido al no ser monofilético. Por lo tanto, el debate en torno a la validez de estos subgéneros sigue abierto.

El género *Pyramimonas* está compuesto por unas 60 especies de algas prasinofíceas principalmente marinas, aunque también engloba algunas especies de agua dulce, como por ejemplo la especie tipo *Pyramimonas tetrarynchus* (McFadden *et al.* 1986, Throndsen 1993, Hori *et al.* 1995, Moro *et al.* 2002, Suda 2004, Stonik & Aizdaicher 2005). Un número importante de estas especies, sobre todo entre las de agua dulce, están solo descritas mediante microscopía óptica, lo que pone en entredicho su validez debido en gran medida a la amplia variabilidad de los caracteres morfológicos observables al microscopio óptico en estas prasinofíceas (Moestrup & Hill 1991, Hori *et al.* 1995, Suda 2004). Las algas de este género tienen reproducción asexual mediante mitosis con una división longitudinal, y en algunas especies se han llegado a observar quistes o células de resistencia, y hasta estados palmeloides (Parke 1949, Belcher 1966, Pearson & Norris 1975).

Excepto la especie *P. virginica*, con tamaño inferior a 5 μm , (Hori *et al.* 1995) y quizás alguna de las especies mayores, todas se consideran algas nanoplanctónicas. La mayoría de especies son planctónicas, mientras que se han descrito algunas bentónicas como por ejemplo *P. octopus* (Moestrup & Hill 1991, Throndsen 1993, Moestrup *et al.* 1987). Varias especies de *Pyramimonas* (p. e. *P. dissomata*, *P. grossii*, y *P. orientalis*) tienen una distribución geográfica lo suficientemente amplia como para ser consideradas cosmopolitas, mientras que otras se han encontrado restringidas a ambientes concretos como aguas frías (Daugbjerg & Moestrup 1992a, Daugbjerg & Moestrup 1992b, Daugbjerg & Moestrup 1993, Moro *et al.* 2002). En general, pueden encontrarse en casi todos los mares y habitualmente representadas por más de un taxón, aunque generalmente no contribuyen significativamente al total de la biomasa de los productores primarios, llegando a producir floraciones sólo unas pocas especies (Daugbjerg & Moestrup 1993).

Durante el presente estudio se consiguieron aislar e identificar a nivel de especie 8 cepas de este género procedentes del estuario del Nervión y del cercano estuario de Urdaibai. Estas cepas fueron adscritas a 5 especies diferentes: *P. grossii*, *P. moestrupii*, *P. propulsa*, *P. orientalis* (4 cepas) y *P. robusta*.

4.3.4.1. *Pyramimonas orientalis* Butcher

Se han aislado 4 cepas pertenecientes a esta especie: CGA09, CGA12, CGA13 y CGA14.

- Características destacables:

- Aspecto general: células con 4 flagelos, acrocontas e isocontas y que muestran gran variedad de formas. En vista amplia tienen una forma campanulada, ovalada o cuadrangular, pudiendo ser oblongas o no, y algunas células, sobre todo las que están en división, pueden llegar a tener formas incluso redondeadas (Lám. 10, Figs. 1, 4-5, 7-8 y 11-13). En vista frontal o anterior, tienen un aspecto casi cuadrado, mientras que en vista trasera son redondeadas (Lám. 10, Figs. 3 y 6). El extremo anterior suele ser truncado, aunque puede ser algo redondeado, mientras que el extremo posterior suele ser ovalado, pudiendo llegar a ser casi cónico, elíptico, redondeado o incluso truncado (Lám. 10, Figs. 1, 4-5, 7-8 y 11-13). Ambos extremos pueden llegar a tener formas irregulares con un lateral más largo que otro, y, a veces, el extremo anterior parece estar ligeramente lobulado en 4 (Lám. 10, Figs. 5 y 8; Lám. 11, Fig. 12) y mostrar el comienzo de la cavidad flagelar, de donde nacen los flagelos, en forma de muesca o invaginación (Lám. 10, Figs. 7-8 y 11; Lám. 11, Fig. 11). Dicha cavidad puede extenderse de 1/3-1/2 de la longitud celular (Lám. 10, Figs. 4, 8 y 13). También se ha observado alguna célula aplanada dorsoventralmente (Lám. 10, Fig. 2).

- Dimensiones: en vista amplia las células tienen una longitud de 5-12 μm y una anchura de 4-9 μm , con unos flagelos de 5-14 μm de longitud (Tablas 4.10.-4.13.).

Tabla 4.10.: principales dimensiones de la cepa CGA09 de *Pyramimonas orientalis*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=29) | Anchura (n=29) | Flagelos (n=47) |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 8,16 | 6,31 | 8,51 |
| Rangos | 6-10 | 5-8 | 5-11 |
| Menor | 5,93 | 4,56 | 4,95 |
| Mayor | 10,29 | 7,92 | 10,97 |

Tabla 4.11.: principales dimensiones de la cepa CGA12 de *Pyramimonas orientalis*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=24) | Anchura (n=25) | Flagelos (n=36) |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 7,43 | 5,79 | 8,54 |
| Rangos | 5-10 | 4-8 | 5-12 |
| Menor | 5,49 | 4,17 | 5,12 |
| Mayor | 10,46 | 8,34 | 11,96 |

Tabla 4.12.: principales dimensiones de la cepa CGA13 de *Pyramimonas orientalis*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=28) | Anchura (n=29) | Flagelos (n=43) |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 8,16 | 6 | 9,46 |
| Rangos | 6-12 | 4-9 | 7-14 |
| Menor | 6,08 | 4,41 | 6,59 |
| Mayor | 11,58 | 9,17 | 13,52 |

Tabla 4.13.: principales dimensiones de la cepa CGA14 de *Pyramimonas orientalis*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=16) | Anchura (n=16) | Flagelos (n=24) |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 7,63 | 5,99 | 9,59 |
| Rangos | 5-9 | 4-7 | 8-11 |
| Menor | 5,18 | 4,31 | 8,03 |
| Mayor | 9,49 | 6,86 | 11,17 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde entre mate y lima, con algunos tonos de amarillo y textura lisa. Tiene 4 lóbulos que se extienden parietalmente hacia la parte anterior, siendo distinguibles a lo largo de entre $1/3$ y algo más de $1/2$ de la longitud celular y dejando un espacio entre ellos que es llenado en parte por la cavidad flagelar (Lám. 10, Figs. 1, 4, 6 y 9-10). En algunas células se ha podido apreciar como, al menos uno de los senos entre lóbulos llega hasta el extremo posterior de la célula (Lám. 10, Figs. 2 y 9).

- **Estigma:** 1-2 estigmas de color amarillo, a veces 3 como en las cepas CGA09 y CGA13. Los estigmas pueden estar situados hacia la parte anterior, central de la célula, e incluso la parte posterior (no observado en la cepa CGA09), y cuando se observan varios, aparecen en plastos adyacentes, al mismo o a diferente nivel (Lám. 10, Figs. 1, 3, 7-8 y 11).

- **Pirenoide:** un único pirenoide, redondeado, elíptico u ovalado, situado en la parte posterior de la célula en posición parietal (Lám. 10, Figs. 1-2, 10 y 12-13). En una célula que posiblemente estaría comenzando a dividirse se ha llegado a observar una estructura que podría ser un pirenoide de grandes dimensiones en su mitad (Lám. 10, Fig. 14). Ocupa entre algo menos de $1/3$ y $1/2$ de la longitud total de la célula. En cuanto a la cubierta, ésta parece estar compuesta por una placa casi continua o un gránulo en forma de taza que casi se cierra por su boca (Lám. 10, Figs. 1 y 12). Sin embargo algunas células de la cepa CGA13 parecen

tener 2 gránulos con forma de cúpula (Lám. 10, Fig. 13) y en la cepa CGA12 no se ha podido apreciar cubierta de ningún tipo.

- **División celular:** una célula madre da, al menos, 2 células hijas que permanecen nadando unidas hasta que se termina la citocinesis, que comienza por la parte anterior de las células de manera que pueden apreciarse células unidas solo por la parte posterior. Antes de la citocinesis las células hijas pueden dividirse de nuevo dando como resultado conglomerados de forma irregular de varias células unidas por la membrana. Las células en división, en general, aunque no exclusivamente, se encuentran envueltas por una especie de membrana o mucílago que deja libres los flagelos y puede formar una especie de cola más o menos alargada y/o torcida (Lám. 10, Fig. 15). Tanto la formación de conglomerados como las células con cola no se han observado en la cepa CGA09.

- **Movimiento:** pueden nadar describiendo tirabuzones o en zigzag y el avance se da con rotación en torno al eje longitudinal de la célula. Suele observarse una alternancia de tramos rectos y curvos con intervalos en los que las algas giran alrededor de un punto fijo o sobre si mismas o sus flagelos. Las células de la cepa CGA09 raramente realizan tramos rectos avanzando por lo general en zigzag, y cuando los realizan, éstos son por lo general lentos. Las de las cepas CGA12, CGA13, CGA14 inician los tramos rectos con una brusca aceleración y, mientras que las de las dos primeras terminan con un tramo final ondulado en que la velocidad va disminuyendo progresivamente, las células de la cepa CGA14 terminan habitualmente con una súbita frenada.

- **Escamas:** se han observado 7 tipos de escamas distintas pertenecientes a esta especie: escamas caja, corona, subyacentes cuadradas y pentagonales, limuloides y pelos T y pelos P_t de punta flagelar, siendo estos 4 últimos tipos propios de los flagelos.

Las **escamas subyacentes cuadradas** (Lám. 10, Fig. 17) observadas tienen de media aproximadamente 42 nm de lado (36-49 nm, n=11). Tienen una zona central menos electrodensa en forma de cuadrado que se estrecha por la

parte central de cada lado de la escama, donde las paredes de ésta, más electrodensas, tienen un engrosamiento. No se ha podido observar en ellas protuberancia central alguna, pero los citados engrosamientos tienden hacia el centro de la escama dando una apariencia lobulada al cuadrado central.

Las **escamas caja** (Lám. 10, Fig. 18; Lám. 11, Fig. 1) tienen un aparente dimorfismo, siendo unas claramente cuadradas o ligeramente rectangulares y otras claramente rectangulares. Las cuadradas tienen de media unos 279 nm (234-332 nm, n=43) de lado, mientras que las rectangulares son algo mayores teniendo unas dimensiones medias de 305 nm (254-386 nm) x 256 nm (201-287 nm, n=12). Las escamas rectangulares se aprecian con menor frecuencia en todas las cepas de este género y no es totalmente descartable que se trate de escamas cuadradas vistas ligeramente en perspectiva sobre la membrana ondulada de la rejilla de microscopía electrónica. En las cepas CGA09 y CGA14, ambas formas tienen una base sin perforaciones en la que no se ha podido apreciar estriación alguna y con una pared también carente de perforaciones. En cambio en las cepas CGA12 y CGA13 sí que se han podido observar lo que parecen ser estrías. En las de la cepa CGA12 puede llegar a intuirse el dibujo de una estriación sobre la base en forma de líneas paralelas que aparecen delineando un cuadrado central. Por su parte, en las escamas de la cepa CGA13 (Lám. 11, Fig. 1) las líneas forman un cuadrado central dividido en 4 cuadrados iguales de menor tamaño por unas líneas más electrodensas que el resto y perpendiculares a los laterales de la escama que podrían constituir una protuberancia central en forma de cruz. Las estriaciones de los cuadrados menores no mantienen la misma orientación y parecen ir la mitad paralelas a 2 lados opuestos de la escama y la otra mitad a los otros 2. En cualquier caso sería recomendable emplear métodos de contraste con metalizado en ángulo para determinar con exactitud los detalles de las estriaciones de las cepas CGA12 y CGA13 y la presencia o ausencia de éstas en las cepas CGA09 y CGA14.

Las **escamas corona** (Lám. 11, Figs. 2-4) tienen una forma que semeja los puntales de una cúpula con base cuadrangular lobulada en 4, y que tiene alrededor de 247 nm de lado (199-305 nm, n=21). El marco cuadrangular de la base está reforzado por puntales radiales que se unen para formar una estructura

en forma de cruz. En el punto de unión de esos puntales radiales se asienta el puntal central de la escama, que parte de este punto y se extiende perpendicular a la base. Estos puntales radiales se unen entre sí en un punto ligeramente superior a la base misma (Lám. 11, Fig. 3), y se unen, a su vez, con la base, mediante bifurcaciones arqueadas con forma de semicírculo, dando forma a los 4 lóbulos citados. Cada punto de unión de estas bifurcaciones con el marco de la base está provisto de una espina, por lo que la base tiene un total de 8 espinas. Finalmente, de las esquinas de la base, a mitad del recorrido entre 2 espinas, parte de cada lóbulo un puntal arqueado que se junta con los de las otras 3 esquinas y con el puntal central en la cúspide de la cúpula formada por la escama. Tanto los puntales que forman la cruz central como los de las esquinas pueden estar ligeramente curvados de manera que simulen brazos de una espiral como por ejemplo en la cepa CGA13 (Lám. 11, Fig. 4).

Las **escamas subyacentes pentagonales** (Lám. 11, Fig. 5) cuentan con una protuberancia central y su longitud media, entendida como la altura del pentágono que forman, es de unos 53 nm (47-60 nm, n=15).

Las **escamas limuloides** (Lám. 11, Figs. 6-7) tienen una longitud media en la espina central de 312 nm (254-400 nm, n=26) y una anchura máxima de 188 nm (156-220 nm, n=36). Tienen 2 espinas auxiliares, una a cada lado de la central, y 4 crestas que parten de la espina central dividiendo la escama en 5-6 sectores (Lám. 11, Fig. 7), dependiendo hasta qué punto se extienda la espina hacia el extremo posterior de la escama, entendido de aquí en adelante como el que queda orientado hacia la parte proximal del flagelo en la posición natural de estas escamas, o lo que es lo mismo, justo el opuesto al extremo por el que se proyectan las espinas, que sería el anterior. En el extremo posterior, tienen 3 perforaciones, pudiendo tener alguna menor como por ejemplo en la cepa CGA14. 2 de las perforaciones son más alargadas y se encuentran pegadas al borde de la escama, y la restante es más redondeada y está situada pegada al extremo posterior de la espina central. Al menos por la cara proximal, entendida como la más cercana a la membrana celular en la posición natural de estas escamas, en contraposición a la cara o vista distal, que sería la opuesta, parece haber estrías que corren paralelas a la espina central, al menos 1 estría a cada

lado de ésta, en la cepa CGA12, y 2 en las cepas CGA09 y CGA13 (Lám. 11, Fig. 6).

Solo se pudieron observar **pelos T** en la cepa CGA12 (Lám. 11, Fig. 9). En éstos se han podido distinguir las siguientes regiones: un filamento proximal de unos 119 nm de largo (102-135 nm, n=8); un asta compuesta por una región proximal de unos 165 nm de longitud (146-183 nm, n=14) y una anchura de 15 nm (14-18 nm, n=15), y una región distal de 588 nm de largo (577-595 nm, n=6) por 15 nm de ancho (14-18 nm, n=13) y 2 subunidades distales (Lám. 11, Fig. 8) con forma que va de esférica a discoidea y entre 11 y 17 nm de diámetro (n=6). No se ha podido apreciar filamento distal alguno. La longitud media de estos pelos flagelares, sin contar el filamento distal, es de 910 nm (895-923 nm, n=6).

Finalmente, también se observó, en preparaciones de la cepa CGA13, el asta de un **pelo de punta flagelar del tipo P_t** (Lám. 11, Fig. 10) de unos 770 nm de largo por 19 nm de ancho en su región proximal y unos 7 nm en su región distal, que es mucho más fina. No se pudieron apreciar subunidades proximales.

- Otras características destacables:

-En algunas células se aprecian al menos un gránulo de color verdoso asociado a cada lóbulo de cloroplasto que podrían ser gránulos de almidón. Éstos suelen aparecer más o menos al mismo nivel, ya sea más hacia el centro o hacia el anterior de la célula. (Lám. 10, Figs. 12 y 14). Se ha descartado que se trate de tricocistos tras observar que no emitían señal fluorescente alguna en células fijadas y teñidas con el fluorocromo DAPI, capaz de marcar estos orgánulos (Coleman 1983).

-En cultivos viejos algunas células muestran algo similar a grandes vesículas (incluso casi de la longitud del cuerpo celular), pero que podrían ser la forma de ventosa que adopta, al entrar en contacto con el cubreobjetos, la membrana o una capa mucilaginoso que cubriera las células (Lám. 10, Fig. 16).

- **Especie propuesta:** parece tratarse de la especie *P. orientalis*, pese a que las dimensiones de las células son algo mayores que las de la descripción original de la especie, rangos de 5-12 x 4-9 μm en este estudio, frente 4,5-6 x 4-5 μm , y que los estigmas son amarillos en lugar de rojos (Butcher 1959). Otros trabajos, sin embargo, citan células con tamaños similares a los de las descritas en el presente estudio (Sym & Pienaar 1995 y referencias en ese mismo trabajo, Daugbjerg 2000). Por su parte, la arquitectura de las escamas sugiere que se trata de *P. orientalis* (Pennick 1978, Pennick 1984, McFadden *et al.* 1986, Pienaar & Sym 2002), pese a que no se han podido distinguir estriaciones en las escamas caja de algunas cepas, los patrones de estrías de las escamas limuloides sólo se han podido entrever en otras, y no todos los pelos flagelares han sido completamente caracterizados. Sería necesario realizar un metalizado en ángulo de las escamas o estudiarlas mediante criofractura y grabado para poder apreciar con claridad los patrones de estrías de las distintas escamas, tal y como hacen trabajos como el de McFadden y colaboradores (1986). Por otro lado, las escamas subyacentes cuadradas descritas para esta especie, así como para el resto de especies en el subgénero *Vestigifera*, son del tipo 1 *sensu* McFadden y colaboradores (1986) (Sym & Pienaar 1995). Estas escamas tienen 4 perforaciones u hondonadas en su placa basal separadas por una cruz, lo que les da un aspecto cuadrículado. Dichas perforaciones no han podido ser apreciadas en las preparaciones realizadas durante este estudio, pero sí que parecen entreverse 4 lóbulos en la base de las escamas observadas, que quizás podrían corresponder a las citadas hondonadas (Lám. 10, Fig. 17).

Otra característica a destacar es la cola o extremo posterior irregular observado en varias cepas. Esta cola es un rasgo común del subgénero *Vestigifera* según Sym y Pienaar (1995), y en ella pueden observarse a veces glóbulos rojos, que pueden llegar a confundirse con estigmas. Dichos glóbulos son vacuolas con perfil estelado o cruciforme y un contenido electrodense (Sym & Pienaar 1995) y según McFadden y colaboradores (1986), su presencia es lo que hace indistinguible *P. orientalis* de *P. pluriloculata*, también descrita por Butcher (1959), por lo que estos dos taxones se pueden considerar sinónimos, predominando el nombre del primero. En el presente estudio no se han llegado a observar como tal, ninguno de estos glóbulos rojos, pero es posible que en alguna de las ocasiones en las que se han identificado 3 estigmas (cepas CGA09 y CGA13) al menos 1 de ellos se haya podido tomar como tal siendo uno de estos glóbulos, y más teniendo en cuenta que en principio la posición de los estigmas

para esta especie es la de la mitad o parte anterior de la célula (Butcher 1959, McFadden *et al.* 1986), apareciendo en el presente estudio alguno en la parte posterior (Lám. 10, Fig. 11). Sería necesario realizar un análisis de la ultraestructura de estos cuerpos pigmentados mediante cortes citológicos para determinar su naturaleza.

Finalmente, otra característica de estas cepas que las relaciona con el subgénero *Vestigifera*, y la especie *P. orientalis*, es la morfología del cloroplasto, en el que uno de los senos llega hasta el extremo posterior de la célula (Sym & Pienaar 1995).

McFadden y colaboradores (1996) en su revisión del género citan diversos estudios en los que se constata la presencia de este alga en los siguientes lugares: las costas del Reino Unido y Noruega (también en Thronsen *et al.* 2007a), el Ártico, Dinamarca, el Mediterráneo, la costa oeste de EE. UU., Nueva Zelanda, la Columbia Británica, Israel, Egipto, Finlandia y Groenlandia. Además, Pienaar y Sym (2002) la citan también en la costa sur de África entre Namibia y Mozambique; Smith y Hobson (1994) en Canada, y Bergesch y colaboradores (2008) en Brasil, por lo que puede concluirse que se trata de una especie cosmopolita.

LÁMINA 10

Fig. 1: una célula ovalada con un amplio pirenoide, también ovalado, en posición parietal. El recuadro muestra un detalle (2,083X) de la zona del pirenoide, pudiéndose apreciar la posible cubierta pirenoidal en forma de una placa casi continua.

Fig. 2: vista antiapical de la misma célula que en la Fig. 1, en la que se puede observar la posición claramente parietal del pirenoide y la compresión dorsoventral. También se observa como uno de los senos entre lóbulos llega hasta el extremo posterior.

Fig. 3: vista apical de una célula no comprimida dorsoventralmente donde se aprecia la inserción de los 4 flagelos y 2 estigmas en un mismo lateral.

Fig. 4: célula con anterior truncado y parte posterior ovalada, cavidad flagelar y unos lóbulos del plasto que ocupan más o menos 1/2 de la longitud celular.

Fig. 5: célula con el extremo posterior redondeado y los laterales desiguales.

Fig. 6: vista apical de una célula con perfil cuadrado en la que se aprecia la lobulación del plasto.

Fig. 7: 2 estigmas en lóbulos adyacentes.

Fig. 8: célula con parte posterior elíptica, 2 estigmas situados a distinta altura en el mismo lóbulo, y laterales algo desiguales.

Fig. 9: señal de autofluorescencia del cloroplasto de una célula en la que se aprecia la lobulación del plasto, que puede llegar hasta la parte posterior de la célula.

Fig. 10: lobulación del plasto observada mediante epifluorescencia. Puede inferirse la situación de un pirenoide redondeado en la parte posterior de la célula por el hueco que este deja en la señal de autofluorescencia.

Fig. 11: célula con 1 supuesto estigma en la parte posterior y 2 en la media. Recuadro: ampliación a 2X. Todos tienen una tonalidad similar pero el posterior más pequeño podría tratarse de uno de los glóbulos rojizos de los que se habla en la bibliografía (ver discusión sobre la especie).

Fig. 12: vista amplia de una célula con la parte posterior más o menos elíptica, en la que se aprecian los posibles gránulos de almidón en la parte anterior de la célula y la posición parietal del pirenoide en la posterior. El recuadro muestra una ampliación (2X) del pirenoide en la que se puede apreciar su cubierta en forma de taza.

Fig. 13: célula con pirenoide cubierto por 2 gránulos con forma de cúpula. Nótese la posición parietal del pirenoide. Barra de escala = 5 μ m.

Fig. 14: célula oblonga, casi ovalada, y que parece estar en proceso de división. Muestra un estigma en la parte posterior y al menos un posible par de gránulos de almidón en la anterior. También parece tener un posible pirenoide de grandes dimensiones hacia la mitad anterior.

Fig. 15: células en división y como envueltas por una membrana o mucilago que forma colas.

LÁMINA 10

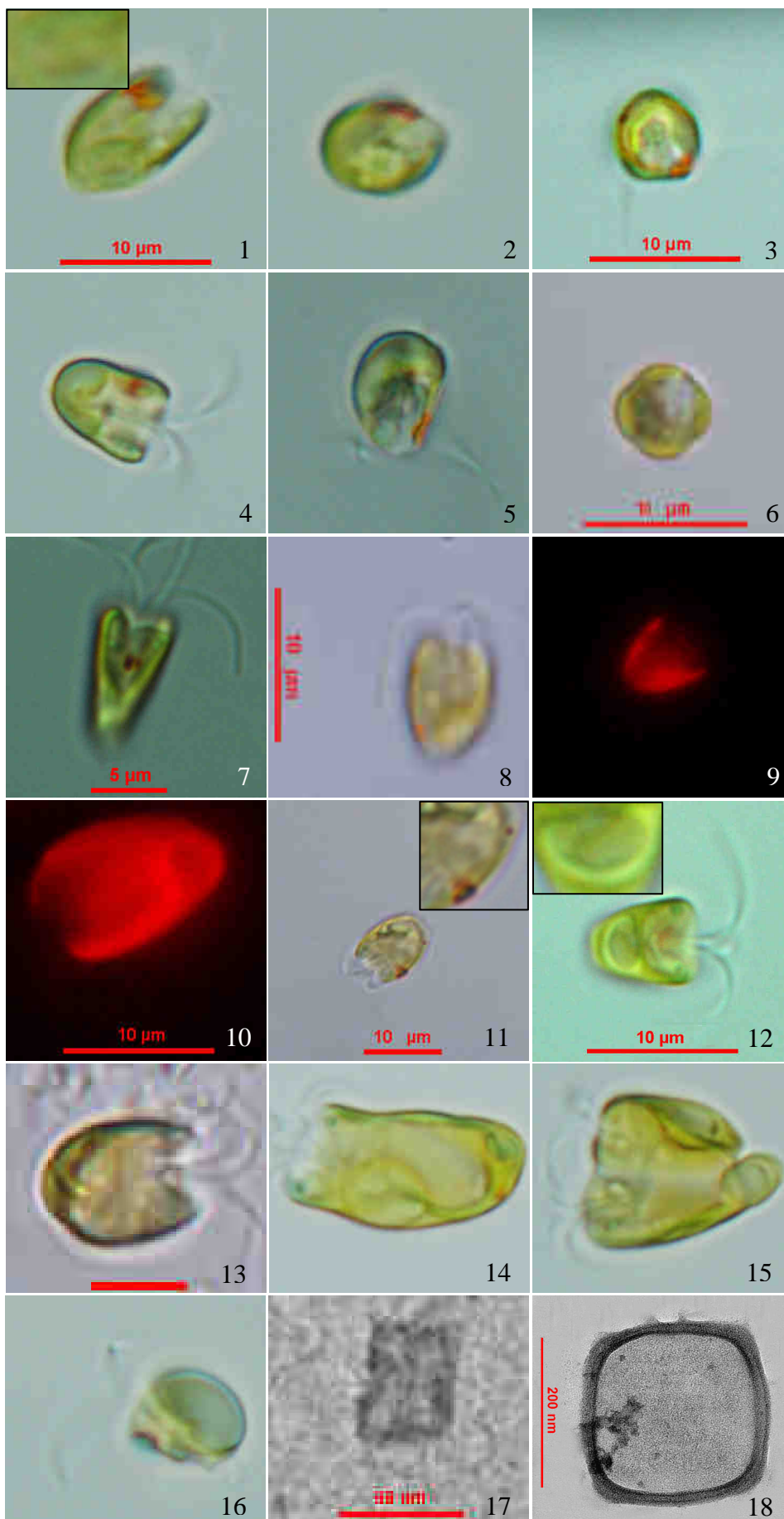


LÁMINA 10

Fig. 16: célula pegada al cubreobjetos mediante una posible capa mucilaginosa exterior.

Fig. 17: escama subyacente cuadrada.

Fig. 18: vista distal una escama caja cuadrada en cuya base se intuye tenuemente un dibujo cuadrado de estrías.

Figs. 1-16 obtenidas a 1000X, Figs. 9-10 mediante epifluorescencia y Figs. 17-18 mediante TEM. Figs. 6, 8, 11 y 13 en falso color desplazado hacia el rojo y el azul. Figs. 1-2 con la escala de la Fig. 1, Figs. 3-5 y 16 con la de la Fig. 3, Figs. 9 y 12 con la escala de la Fig. 12, y finalmente, Figs. 10 y 14-15 con la escala de la Fig. 10. Figs. 1-5 y 16 correspondientes a la cepa CGA09, Figs. 6, 10, 14-15 y 18 correspondientes a la cepa CGA12, Figs. 7, 11, 13 y 17 correspondientes a la cepa CGA13 y Figs. 8-9 y 12 correspondientes a la cepa CGA14.

LÁMINA 11

Fig. 1: escama caja, vista desde la cara distal, en la que se puede apreciar el patrón de estrías de su base.

Fig. 2: vista distal en perspectiva de una escama corona. Barra de escala = 200 nm.

Fig. 3: perspectiva de una escama corona a la que se aplicó un baño de oro para aumentar su contraste. Nótese la elevación de la cruz central respecto al marco exterior de la base.

Fig. 4: vista distal de una escama corona en la que puede apreciarse una ligera curvatura en espiral de la mayoría de los puntales arqueados. Barra de escala = 200 nm.

Fig. 5: escama subyacente pentagonal en la que puede verse claramente la protuberancia central.

Figs. 6-7: escamas limuloides vistas desde la cara distal (Fig. 6) y proximal (Fig. 7), respectivamente.

Fig. 8: detalle de las subunidades distales (números) del pelo mostrado en la Fig. 9. Barra de escala = 50 nm.

Fig. 9: pelo T sin filamento distal. Pueden observarse de abajo a arriba las siguientes regiones: filamento proximal (FP), región proximal del asta (RPA), región distal del asta (RDA) y subunidades distales (SD). Las flechas marcan los límites entre regiones. Barra de escala = 200 nm.

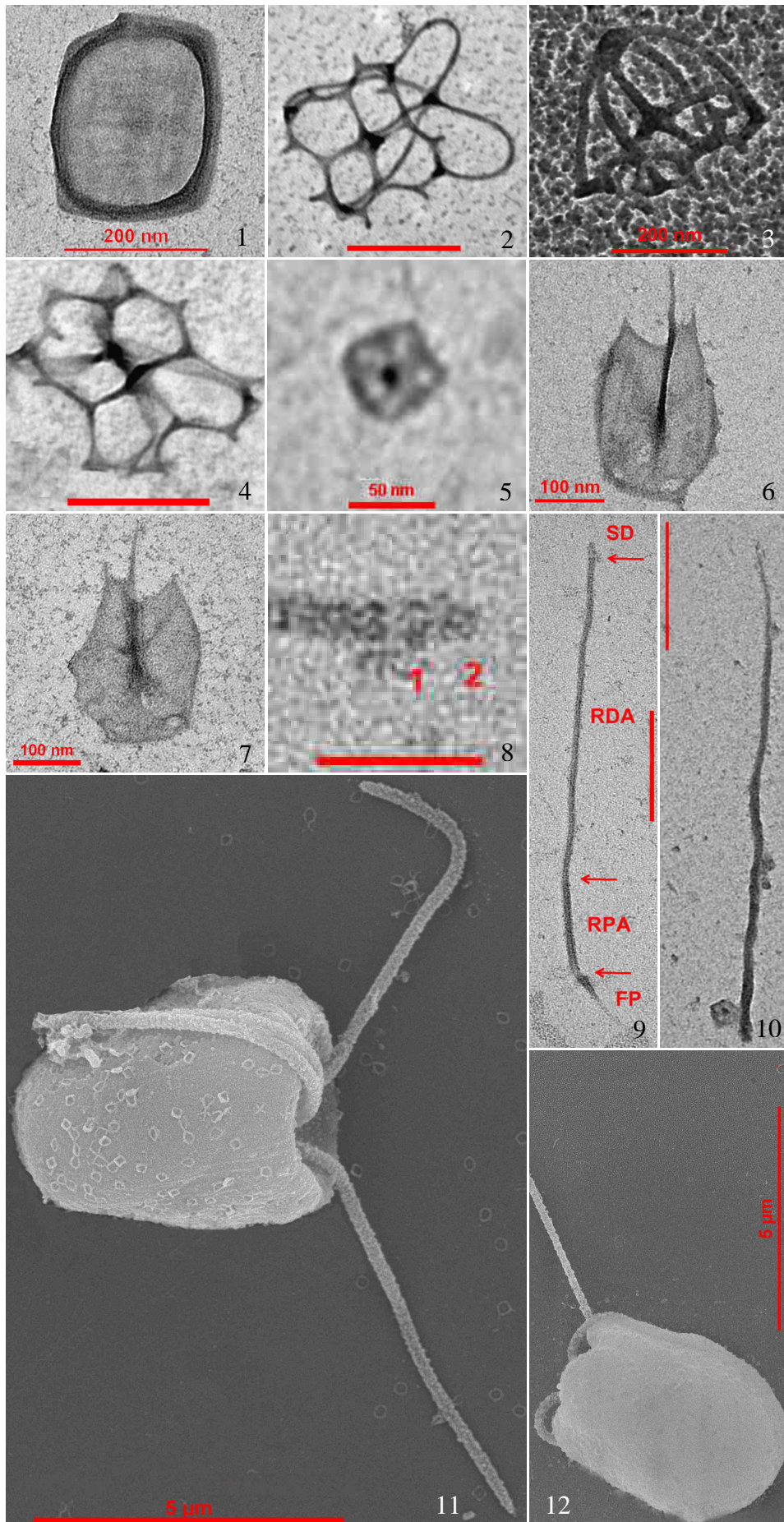
Fig. 10: asta de un pelo P_1 de punta flagelar junto con una escama subyacente pentagonal cerca de su extremo proximal (parte inferior de la imagen). No se pudieron observar subunidades discoideas de estos pelos. Barra de escala = 200 nm.

Fig. 11: una célula en la que se pueden observar el comienzo de la cavidad flagelar y escamas caja y corona adheridas a su superficie.

Fig. 12: célula en la que puede apreciarse un extremo anterior claramente lobulado.

Figs. 1-10 obtenidas mediante TEM y Figs. 11-12 mediante SEM. Figs. 4 y 11 correspondientes a la cepa CGA09, Figs. 8-9 correspondientes a la cepa CGA12, Figs. 1, 3, 5-7 y 10 correspondientes a la cepa CGA13 y Figs. 2 y 12 correspondientes a la cepa CGA14.

LÁMINA 11



4.3.4.2. *Pyramimonas moestrupii* McFadden

La única cepa analizada perteneciente a esta especie ha sido la CGA10.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células de cuatro flagelos, isocontas y acrocontas, con una parte anterior truncada o ligeramente redondeada y una posterior, hacia la que la célula puede ir estrechándose, de elíptica a cónica (Lám 12, Figs. 1-3). En vista apical las células pueden ser redondeadas o casi cuadradas y en vista antiapical son redondeadas (Lám 12, Fig. 4). La parte anterior y la posterior de la célula pueden llegar a ser irregulares (Lám 12, Fig. 8), con un lateral más largo que el otro. Los flagelos se encuentran alojados en una cavidad flagelar, que puede llegar a ocupar hasta casi 1/2 de la longitud celular (Lám 12, Figs. 1-4). Algunas células, sobre todo las que están en división pueden llegar a tener formas irregulares (Lám 12, Fig. 9).

- **Dimensiones:** en vista amplia las células tienen de 6-11 μm de longitud por 4-6 μm de anchura. Flagelos de una longitud de 6-11 μm (Tabla 4.14.).

Tabla 4.14.: principales dimensiones de la cepa CGA10 de *Pyramimonas moestrupii*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=29) | Anchura (n=29) | Flagelos (n=57) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 7,78 | 5,54 | 7,59 |
| Rangos | 6-11 | 4-6 | 6-11 |
| Menor | 5,58 | 4,47 | 5,64 |
| Mayor | 11,07 | 6,42 | 10,93 |

- **Cloroplasto:** de color verde con tonos amarillentos y textura lisa, con 4 lóbulos que se pueden separar cerca de la mitad de la célula o en la parte posterior, y se extienden parietalmente hasta el extremo anterior de la misma, o

casi, dejando entre ellos un espacio que se llena en parte por la cavidad flagelar (Lám 12, Figs. 1-8).

- **Estigma:** 1-2 estigmas de color amarillo, generalmente en la parte conspicuamente no lobulada del cloroplasto, pero también se pueden encontrar hacia la mitad de la célula en un mismo lóbulo. Pueden estar situados hacia la parte anterior, el centro, o incluso la parte posterior de la célula, y ambos a la misma o a distintas alturas (Lám 12, Figs.1-3, 5-6 y 8).

- **Pirenoide:** un único pirenoide, no apreciable en todas las células, situado en su parte posterior en posición aparentemente parietal (Lám 12, Figs. 2 y 5). Puede llegar a llenar prácticamente la mitad de la longitud celular y tiene una cubierta compuesta por una placa en forma de taza (Lám 12, Figs. 7-8).

- **División celular:** una célula madre da, al menos, 2 células hijas que se mantienen nadando unidas hasta que finaliza la citocinesis. Antes de que la citocinesis se haya completado las células hijas pueden dividirse de nuevo dando como resultado conglomerados de forma irregular de varias células unidas por la membrana (Lám 12, Fig. 9).

- **Movimiento:** tramos largos ondulados y sin grandes cambios de dirección seguidos de paradas. En ocasiones, las células también pueden realizar tramos con muchas curvas y giros alrededor de un mismo punto con poco desplazamiento.

- **Escamas:** se han observado 4 tipos de escama: escamas caja, corona, limuloides y pelos T.

Las **escamas caja** (Lám 12, Fig. 10) de esta cepa tienen unos 342 nm de lado (313-378 nm, n=13). Tienen una base de la que sobresale una protuberancia central en forma de cuadrado con los lados convexos y las esquinas orientadas hacia las paredes de la escama. Las diagonales del cuadrado formado por las protuberancias miden unos 83 nm (61-104 nm, n=5). El interior de la protuberancia, como se ha podido observar al menos en algunas escamas, está

hueco y tabicado de forma que queda partido en 4 conductos. Por otro lado, la base de la escama cuenta con multitud de perforaciones divididas en 2 grupos. Uno de estos grupos lo forman las perforaciones ovaladas y oblongas situadas anexas a la pared de la escama y que se encuentran orientadas con la dimensión más larga en perpendicular a dicha pared. El otro grupo lo componen perforaciones de distintos tamaños, aunque mas redondeadas en general, que se concentran formando un cuadrado alrededor de la protuberancia central. Entre ambos grupos queda un espacio cuadrado de la base libre de perforaciones.

Las **escamas corona** (Lám 12, Figs. 11-12) tienen una base de unos 299 nm de lado (283-318 nm, n=3) y una altura de unos 338 nm (n=1). Su forma semeja los puntales de una cúpula con base cuadrangular lobulada en 4. El marco cuadrangular de la base está reforzado por puntales radiales que se unen en el centro de ésta con el puntal central de la escama, que parte de este punto y se extiende perpendicular a la base. Estos puntales radiales se unen entre sí en un punto ligeramente por encima de la base misma, y se unen a su vez con la base, mediante bifurcaciones arqueadas con forma de semicírculo, dando forma a los 4 lóbulos citados. Cada punto de unión de estas bifurcaciones con el marco de la base está provisto de una espina por lo que la base tiene un total de 8 espinas. Además, de cada una de estas bifurcaciones, más o menos en su nacimiento o en un punto cercano, parte un pilar arqueado que se extiende perpendicular a la base de la escama hasta unirse con los otros 3 y el central en la cúspide de la cúpula formada por la escama. Cada uno de los pilares arqueados está provisto de 2-3 dientes que pueden estar orientados en planos distintos.

Las **escamas limuloides** (Lám 12, Figs. 13-14) tienen una longitud teniendo, en cuenta la espina central, de unos 330 nm (293-354 nm) y una anchura máxima de unos 196 nm (179-208 nm, n=11). Tienen 2 espinas auxiliares y 4 crestas que parten de la espina central dividiendo la escama en 5-6 sectores, dependiendo hasta que punto se extienda la espina central hacia el extremo posterior de la escama. Además de estas crestas parecen tener otras 2 más que corren paralelas a la espina principal, también tienen al menos 1 ó 2, puede que más, perforaciones en el extremo posterior, y otra más junto a la espina principal.

Los **pelos T** observados (Lám 12, Fig. 15) tienen una longitud total media, sin contar el filamento distal, raramente observable, de 767 nm (727-1024 nm, n=10), y en ellos se pudieron distinguir las siguientes regiones: un filamento proximal de unos 82 nm de longitud media (50-122 nm, n=10), que quizás podría ser algo más largo teniendo en cuenta que en el extremo proximal tiene muy poco contraste; un asta dividida en dos regiones, una proximal, claramente acanalada y algo más larga y gruesa, con 490 nm de longitud (440-524 nm) y 21 nm de anchura (17-29 nm, n=12), y una región distal de unos 386 nm de largo (357-418 nm, n=11) por 16 nm de ancho (12-20 nm, n=12); y finalmente, rematando el pelo, se ha podido apreciar en un único ejemplar, lo que parece ser un filamento distal de unos 163 nm de largo.

- Otras características destacables:

-En algunas células se aprecian al menos un gránulo de color verdoso por cada lóbulo de cloroplasto que podrían ser tricocistos o gránulos de almidón. Suelen aparecer más o menos al mismo nivel aunque no siempre, ya sea más hacia la mitad o hacia el anterior de la célula.

- **Especie propuesta:** las escamas observadas coinciden en forma, aunque con ciertas diferencias, y difieren en tamaño con las de la descripción original de *P. norrisii* (Sym & Pienaar 1991), la cual fue posteriormente considerada como sinónimo de la especie *P. moestrupii* (Sym & Pienaar 1995). En particular, las escamas corona difieren ligeramente en forma, puesto que en esta cepa los pilares arqueados parten más o menos del punto donde nace la bifurcación de los puntales centrales de la base, mientras que en la descripción de la especie lo hacen de un punto de unión de estas bifurcaciones con el marco exterior, justo sobre uno de los dientes que se encuentran en estos puntos. Por otro lado, uno de los pelos T observados mostraba lo que podría ser un filamento distal, que no se comenta en la descripción de la especie, pero que podría haberlo, puesto que éstos son en general difícilmente observables, y el citado trabajo es anterior a los de Marin y colaboradores (1993) y Marin y Melkonian (1994) tras los que comienza a desarrollarse una taxonomía de los pelos flagelares de las prasinofíceas. En la descripción de la especie apenas si se hace mención a la morfología de sus pelos, a

excepción de su tamaño y disposición respecto al resto de escamas flagelares, por lo que tampoco se menciona nada acerca de un asta con 2 regiones, tal y como ha podido observarse en este estudio.

Sym y Pienaar (1995) comentan los evidentes parecidos entre *P. norrisii*, la especie descrita por ellos mismos (Sym & Pienaar 1991), y *P. moestrupii*, descrita por McFadden y colaboradores (1986). Así, acaban concluyendo que las diferencias entre las escamas caja de las distintas cepas aisladas para ese trabajo le restan importancia taxonómica a las características de la protuberancia central de estas escamas, por lo que deberían tomarse esas dos especies como sinónimos, teniendo preferencia el nombre más antiguo. Por lo tanto, esta cepa en cuestión pertenecería a la especie *P. moestrupii*.

Esta especie ha sido hallada con anterioridad en las costas de Nueva Zelanda y en la costa sur de África, entre Namibia y Mozambique (McFadden *et al.* 1986, Sym & Pienaar 1991, Sym & Pienaar 1995), así como en Australia (colección [SCCAP](#), cepa K-0265).

LÁMINA 12

Fig. 1: célula con anterior truncado y parte posterior cónica. Se intuye un estigma en la parte central.

Fig. 2: célula con el extremo anterior truncado y el posterior ovalado, con un estigma en la parte posterior. Nótese la cavidad flagelar, que llega casi a ocupar 1/2 de la longitud celular, y el pirenoide parietal.

Fig. 3: célula casi ovalada con parte anterior ligeramente redondeada y posterior ovalada. Estigma en la parte posterior.

Fig. 4: vista apical en la que puede apreciarse la inserción de los flagelos de una célula con perfil entre redondo y cuadrado.

Fig. 5: Pirenoide en posición parietal de una célula con 1 estigma en su mitad anterior, en uno de los lóbulos del cloroplasto.

Fig. 6: 2 estigmas en la parte posterior de una célula.

Figs. 7-8: células en las que puede apreciarse una cubierta pirenoidal compuesta por una placa casi continua con forma de taza, más fácilmente distinguible en las ampliaciones de los recuadros de 4X en la Fig. 7 y de 2X en la Fig. 8. En la Fig. 8 pueden verse a su vez: un estigma hacia la parte media-posterior de la célula y en la parte anterior, 2 de los gránulos que aparecen asociados a los lóbulos del cloroplasto en algunas células. Barra de escala de la Fig. 8: 10 μm .

Fig. 9: células en división.

Fig. 10: vista distal de una escama caja.

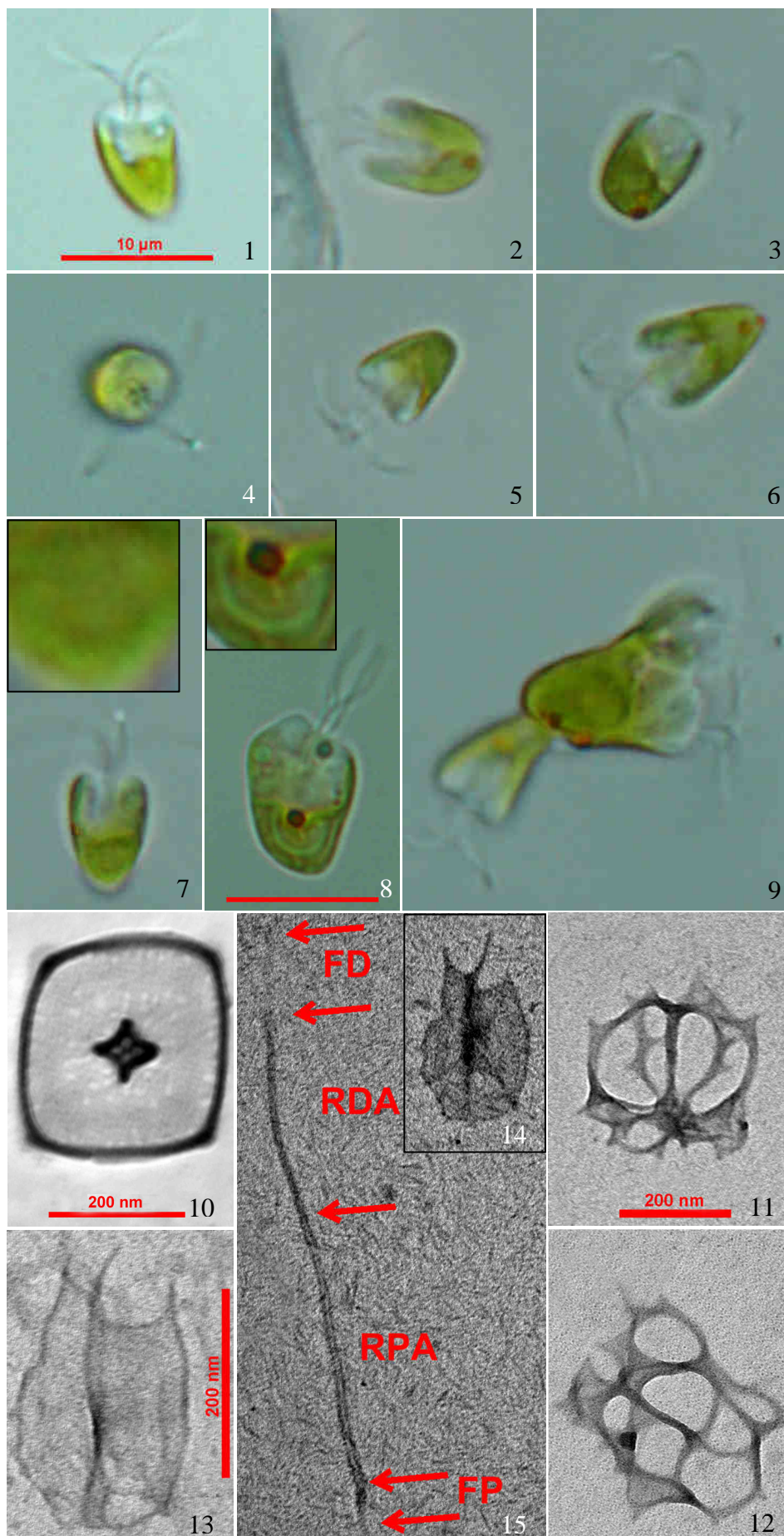
Figs. 11-12: escamas corona, en vista lateral (Fig. 11) y en una perspectiva cercana a la vista distal (Fig. 12).

Figs. 13-14: escamas limuloides en vista proximal. En la Fig. 11 se aprecian mejor las perforaciones que aparecen en el extremo posterior, mientras que en la Fig. 12, más contrastada, se aprecian mejor las distintas crestas que tienen estas escamas.

Fig. 15: pelo T en el que pueden observarse, delimitadas por flechas y de abajo arriba, sus distintas regiones. filamento proximal (FP), región proximal del asta (RPA), región distal del asta (RDA) y filamento distal (FD).

Figs. 1-9 a 1000X. Figs. 1-7 y 9 con la misma escala que la Fig. 1. Figs. 11-12 y 14-15 con la escala de la Fig. 11. Figs. 10-15 obtenidas mediante TEM. Todas las Figs. correspondientes a la cepa CGA10.

LÁMINA 12



4.3.4.3. *Pyramimonas grossii* Parke

La cepa CGA11 pertenece a la especie *P. grossii*.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células de 4 flagelos, isocontas y acrocontas. Los flagelos parten de una cavidad que puede extenderse hasta 1/3 de la longitud celular. Las células tienen formas que van desde redondeadas a ovaladas o elipsoides en vista amplia, pero con la parte anterior truncada y, a veces, con 1 ó 2 pequeñas invaginaciones que corresponden con la lobulación anterior del citoplasma (Lám. 13, Figs. 1-6). Los laterales son planos o ligeramente convexos. La parte posterior puede ser redondeada, elíptica o incluso cónica dándoles a algunas células una apariencia piramidal invertida. En vista anterior tienen forma redondeada o ligeramente cuadrilobada, de manera que los lóbulos del citoplasma dan cobijo a los del cloroplasto.

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen de 6-10 μm de longitud por 5-8 μm de anchura y unos flagelos de 5-8 μm (Tabla 4.15.).

Tabla 4.15.: principales dimensiones de la cepa CGA11 de *Pyramimonas grossii*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=35) | Anchura (n=39) | Flagelos (n=19) |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 8,34 | 6,38 | 6,7 |
| Rangos | 6-10 | 5-8 | 5-8 |
| Menor | 6,23 | 5,04 | 5,16 |
| Mayor | 9,93 | 7,81 | 8 |

- **Cloroplasto:** de color verde claro con tonos amarillentos y textura más o menos lisa. Profundamente lobulado con 4 lóbulos que se extienden siendo conspicuamente diferenciables a lo largo de 2/3 de la longitud celular, comenzando en el tercio posterior de la célula, donde se aloja el pirenoide, y

llegando hasta la parte anterior (Lám. 13, Figs. 3-7 y 9-10). El espacio entre los lóbulos solo se llena en parte por la cavidad flagelar.

- **Estigma:** un único estigma anaranjado situado en la parte anterior de la célula, en la cara externa de uno de los lóbulos del cloroplasto (Lám. 13, Figs. 1, 6-7 y 9).

- **Pirenoide:** los plastos llevan un único pirenoide con forma elíptica, bastante llamativo, que llega a alcanzar $1/3$ de la longitud celular. Se encuentra situado en posición basal y aparece como partido por la mitad, debido a los tilacoides que presumiblemente lo surcan (Lám. 13, Fig. 7). Tienen una cubierta compuesta por 2 gránulos con forma abovedada que lo encapsulan.

- **División celular:** una célula madre da, al menos, 2 células hijas que se mantienen nadando unidas hasta que finaliza la citocinesis (Lám. 13, Fig. 8).

- **Movimiento:** tramos generalmente largos y más o menos rectos entre paradas, combinados con avances en una misma dirección acompañados de ondulaciones o giros. También pueden girar sobre si mismos sin apenas desplazamiento.

- **Escamas:** se han podido diferenciar al menos 6 tipos de escamas: escamas subyacentes cuadradas, escamas caja, corona, subyacentes pentagonales, limuloides y pelos T, siendo las 3 últimas propias de los flagelos.

Las **escamas subyacentes cuadradas** (Lám. 13, Figs. 14-15) tienen 52 nm (45-64 nm, n=14) de lado, y las hay de 2 tipos. Unas sin un ornamento claro, aparte de un marco electrodenso externo, al que tienden a pegarse las partículas de acetato de uranilo, y que parece indicar una diferencia de grosor entre su periferia y el interior (Lám. 13, Fig. 14). Otras, tienen protuberancias formando un dibujo en aspa inscrito dentro del cuadrado de su forma (Lám. 13, Fig. 15)

Las **escamas caja** (Lám. 13, Fig. 12) muestran un aparente dimorfismo, siendo la mayoría cuadradas o ligeramente rectangulares, con lados de 260 nm (237-298 nm, n=17), mientras que otras, más escasas, son claramente

rectangulares con una longitud algo superior a las cuadradas, 282 nm (267-294 nm) y una anchura algo inferior, de unos 244 nm de media (235-258 nm, n=3). Las escamas rectangulares se aprecian con menor frecuencia y no es totalmente descartable que se trate de escamas cuadradas vistas ligeramente en perspectiva sobre la membrana ondulada de la rejilla de microscopía electrónica. Ambas formas tienen un marco exterior engrosado, que puede ser dentado, estando los dientes orientados bien hacia el interior de la escama o bien hacia el exterior. Tienen una placa central perforada por entre 20 y 32 poros, que habitualmente están distribuidos formando un mosaico de la siguiente manera: 8 se encuentran formando una roseta en torno al centro no perforado de la placa; esta roseta está rodeada por otros 8 poros, que forman un cuadrado, teniendo forma redondeada los 4 que ocupan las esquinas y más oblonga los de los lados de dicho cuadrado. Los poros restantes forman un cuadro alrededor del resto y limitan con el marco de la escama, 4 de éstos son de mayor tamaño que el resto, aunque a veces pueden estar partidos en más de un poro, y ocupan las esquinas, mientras los lados de este cuadrado externo se componen por 1-4 poros cada uno, llegando a veces a no apreciarse ninguno y ser totalmente sólidos, esto también puede ocurrir con al menos los poros laterales del cuadrado interno, o incluso con alguno del rosetón central.

Las **escamas corona** (Lám. 13, Figs.16-17) tienen una forma que semeja los puntales de una cúpula con base entre cuadrada y redondeada, está ligeramente lobulada en 4 y que tiene alrededor de 271 nm de lado (236-294 nm, n=5) por 263 nm de altura (224-328nm, n=12). Cada uno de sus lóbulos porta 3 dientes pequeños y 1 más largo que pueden estar orientados de distinta manera. Además, de cada lóbulo parte un puntal arqueado que se fusiona con los otros 3 en la cúspide de la cúpula formada por la escama. Estos puntales portan a su vez 2 dientes cada uno, de los cuales los distales son más largos y habitualmente superan en altura la zona de unión de los propios puntales formando entre los 4 una esvástica apreciable en vista distal.

Las **escamas limuloides** (Lám. 13, Fig.13) tienen una longitud, medida en la espina central, de 291 nm (243-432 nm) y una anchura de 163 nm (147-180 nm, n=11). La parte que sobresale de la espina central puede llegar a ser del

mismo tamaño que el cuerpo de la escama. Aparte de la espina central tienen 2 auxiliares, 1 a cada lado de ésta. También muestran varias perforaciones, 2 más grandes en el extremo posterior (el de abajo en la Fig. 13 de la Lám. 13), una redondeada y la otra, más alargada, con forma de coma invertida; y 2-4 perforaciones más pequeñas y redondeadas que se extienden hacia la zona medial por el lado de la perforación redondeada mayor. También parecen tener 4 crestas que parten de la espina central y dividen la escama en 5-6 sectores, dependiendo de hasta qué punto se extienda la arista de la espina central hacia el margen de la escama por la parte posterior.

Las **escamas subyacentes pentagonales** (Lám. 14, Fig. 4) cuentan con una protuberancia central y su longitud media, entendida como la altura del pentágono que forman, es de unos 55 nm (51-63 nm, n=5).

Los **pelos T** (Lám. 14, Figs. 1-3) están compuestos, comenzando por su extremo más cercano a la superficie flagelar, por un filamento proximal de unos 124 nm de longitud (110-139, n=7), seguido de un asta con 2 regiones bien diferenciadas: una proximal más ancha, de unos 798 nm de longitud (731-837 nm, n=12) por 19 nm de anchura (15-24 nm, n=15), y una región distal más estrecha y electrolúcida de unos 217 nm de longitud (138-255 nm) por 12 nm de anchura (10-16 nm, n=9) que termina en un engrosamiento final. Al asta le siguen 2 subunidades distales más o menos discoideas con una longitud de 12-13 nm y una anchura de 16-18 nm (n=2) y rematando los pelos puede observarse en ocasiones un filamento distal de unos 162 nm de longitud (138-210 nm, n=7). La longitud total de los pelos T, sin contar el filamento distal, observable con poca frecuencia, es de unos 1148 nm (1065-1196 nm, n=6).

- Otras características destacables:

- Presencia de hasta 8 (2 por lóbulo) gránulos en el citoplasma que rodea la cavidad flagelar, presumiblemente tricocistos (Lám. 13, Figs. 5-6, 8 y 10-11), situadas en la parte anterior de la célula, junto a la cara interna de los lóbulos del cloroplasto. Estos orgánulos si presentaban fluorescencia en células teñidas con DAPI (Lám. 13, Figs. 10-11), tinción que se emplea para marcar tricocistos

(Coleman 1983). Además, en preparaciones para microscopía electrónica ha quedado confirmada la presencia de tricocistos, al aparecer estos descargados radiando de las células (Lám. 14, Fig. 5) y en ocasiones hasta manteniendo una forma espiralada que da una idea del empaquetamiento de estas estructuras en el interior de las células (Lám. 13, Fig. 18).

- **Especie propuesta:** esta cepa pertenecería a la especie *Pyramimonas grossii*, puesto que aunque los tamaños de las células no se superpongan del todo a las previamente descritas en la bibliografía (Parke 1949, Butcher 1959, Pennick & Clarke 1976, McFadden *et al.* 1986, Sym & Pienaar 1993) las escamas observadas al microscopio electrónico sí se corresponden en forma y tamaño, aunque con matices. Por ejemplo, las escamas corona, en el caso de esta cepa portan una espina grande en cada lado del marco tal y como aparece en Manton y colaboradores (1963), McFadden y colaboradores (1986) y Sym y Pienaar (1993), pero difieren bastante de las mostradas como dibujo en Pennick y Clarke (1976) y Pennick (1984), en los que no aparece esta espina grande y en su lugar aparecen 4 puntales formando una cruz basal. Pese a esta diferencia la escama mostrada en la Fig. 14 de Pennick y Clarke (1976) parece ser idéntica a las descritas en este estudio. Algo similar ocurre con las escamas limuloides, para las que las descritas en esta cepa coinciden con las mostradas en la Fig. 18 de Sym y Pienaar (1993) mientras que difieren de las de los trabajos de Pennick y Clarke (1976) y Pennick (1984), que solo muestran 2 perforaciones, circunstancia quizás debida al empleo del metalizado, que podría enmascarar las perforaciones más pequeñas.

En cuanto a las escamas subyacentes, cabe mencionar que Manton y colaboradores (1963) y McFadden y colaboradores (1986) hablan de escamas sin ningún tipo de ornamento apreciable, iguales a uno de los dos tipos de escama observados en el presente estudio, mientras que tanto Sym y Pienaar (1993) como LeRoi y Hallegraef (2006) muestran unas escamas más parecidas al segundo tipo. Sym y Pienaar (1993) aportan una reconstrucción tridimensional de estas escamas mostrando una superficie central estriada que no llega a corresponder del todo con lo observado en este estudio, y aluden a artefactos de las técnicas de criofractura y metalizado como posibles razones para que McFadden y colaboradores (1986) no pudieran distinguir ningún dibujo ni protuberancia en el centro de las escamas subyacentes de las especies del subgénero *Trichocystis* que analizaron. Dado que en el presente estudio no se han

empleado tales métodos y aun así se han podido observar dos tipos de escama, parece probable que los dos tipos de escama subyacente, la del interior completamente liso y la de la ornamentación, pudieran tratarse de la misma, solo que vista en un caso por la cara distal (la del centro con dibujos) y en otro por la proximal (la del centro liso). Podrían incluso ser la misma escama vista por la misma cara, puesto que las imágenes mostradas de una y otra se obtuvieron empleando protocolos para TEM distintos. La Fig. 14, se obtuvo empleando el primero de los protocolos descrito en el apartado de material y métodos de este mismo capítulo, mientras que para la Fig. 15 se empleó el segundo de los protocolos, que ofrece más contraste en general, lo que podría haber permitido observar dibujos en la base de escamas que con el primer protocolo parecieran sin ornamento alguno. Serían necesarios cortes citológicos para confirmar estas hipótesis.

Por otro lado, los pelos T descritos para esta cepa son idénticos a los caracterizados para *P. grossii* por Marin y Melkonian (1994), hecho que reafirma la identificación.

Finalmente cabe destacar el hecho de que para esta especie se describen hasta 5 tricocistos por célula solamente (Sym & Pienaar 1993). En nuestro caso sólo se pudo confirmar la presencia de 2 gránulos teñidos con DAPI en varias células fijadas, pese a que en alguna célula viva y sin teñir llegaron a observarse hasta 8 gránulos compartiendo posición en la parte anterior de la célula. Puede que alguno de éstos, o incluso todos, fueran sin más gránulos de almidón, o siendo tricocistos, que al menos parte de ellos se disparara en el proceso de fijado, como ciertamente ocurre tal y como refleja la Fig. 23, en la que es evidente que si el número de filamentos fuera de uno por tricocisto en esta cepa el número de 5 se quedaría corto, aunque para estar seguro de la naturaleza de todos estos gránulos sería recomendable realizar cortes de las células.

En cuanto a su distribución esta especie puede considerarse cosmopolita, puesto que se ha encontrado en el Reino Unido (Parke 1949, Butcher 1959, Manton *et al.* 1963, Pennick & Clarke 1976), Nueva Zelanda (Norris 1964), Noruega, el Mediterráneo, Dinamarca, Japón, el Ártico, las costas del sur de África (McFadden *et al.* 1986, Sym & Pienaar 1993, Pienaar & Sym 2002, Throndsen *et al.* 2007a), Brazil (Bergesch *et al.* 2008), Australia (LeRoi & Hallegraeff 2006), EE. UU. (Thomsen & Buck 1998) y Canada (Smith & Hobson 1994).

LÁMINA 13

Fig. 1: vista anterior de la célula en la que se aprecian los flagelos plegados, el estigma antero-lateral, y la lobulación del plasto.

Figs. 2-4: variedad de formas en esta cepa que incluye células redondeadas (Fig.2), con la parte posterior cónica (Fig.3) o con la parte posterior elíptica (Fig. 4).

Figs. 5-6: células con una lobulación del citoplasma de la parte anterior en la que pueden apreciarse los posibles tricocistos. En la Fig. 6 aparece una célula con lo que podrían ser al menos 8 de estos orgánulos.

Fig. 7: célula en la que se aprecia el pirenoide partido. En el recuadro se muestra la cobertura del pirenoide de otra célula. Las flechas señalan los 2 gránulos que lo componen.

Fig. 8: células en división.

Fig. 9: lobulación del plasto y posicionamiento de los supuestos tricocistos junto a la parte interior de los lóbulos.

Figs. 10-11: La Fig. 10 muestra una célula fijada con formaldehído y teñida con DAPI, en color real, en la que pueden apreciarse 2 tricocistos en la parte anterior (flechas). La Fig. 11 muestra la señal de fluorescencia del DAPI de la misma célula, que es más intensa en la zona del núcleo y en los 2 tricocistos. Barra de escala de 5 μ m.

Fig. 12: escama de tipo caja.

Fig. 13: escama limuloide en vista distal.

Figs. 14-15: escamas subyacentes sin ornamentación (Fig. 14) y con un aspa circunscrita (Fig.15). Barras de escala de 50 nm.

Figs. 16-17: escamas corona en vista distal (Fig.16) y lateral (Fig. 17).

Fig. 18: tricocisto eyectado en el que puede apreciarse una disposición espiralada que supuestamente guardaría relación con la forma de empaquetamiento que dentro de la célula deben tener estos orgánulos antes de ser extruidos.

Figs. 1-11 obtenidas a 1000X, Fig. 11 obtenida mediante microscopía de epifluorescencia y Figs. 12-18 mediante TEM. Figs. 1-9 en falso color desplazado hacia el rojo y el azul y con la escala de la Fig. 1. Figs. 10 y 11, por un lado con la escala de la Fig.10 y Figs. 12-13, por otro, con la de la Fig.12. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA11.

LÁMINA 13

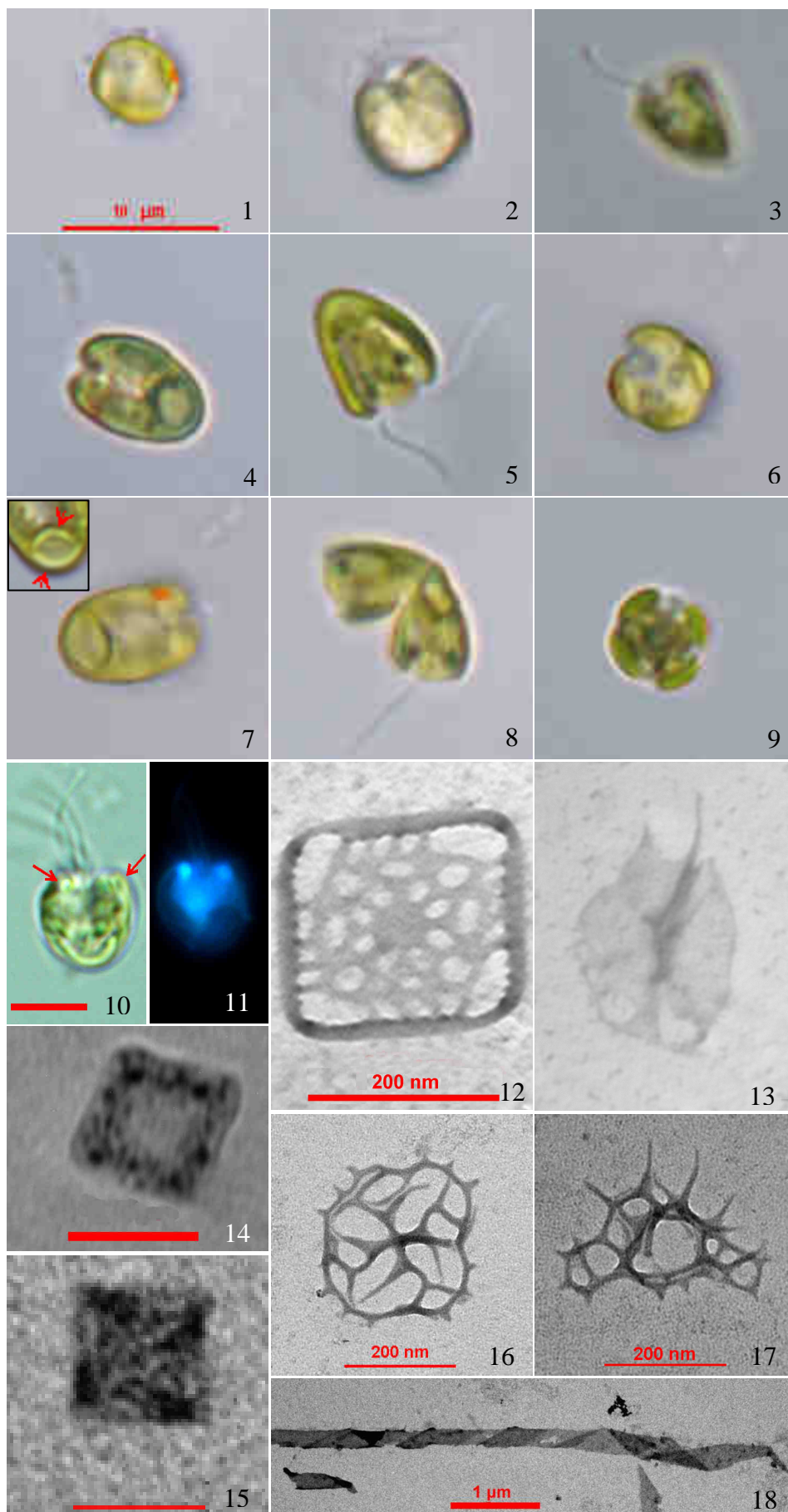


LÁMINA 14

Fig. 1: pelo T en el que pueden apreciarse las distintas regiones que lo componen. Estas son, de derecha a izquierda y separadas mediante flechas: filamento proximal (FP), región proximal del asta (RPA), región distal del asta (RDA), subunidades distales (SD) y filamento distal (FD).

Fig. 2: detalle de las subunidades distales (números) y del engrosamiento final de la región distal del asta del pelo mostrado en la Fig. 1. La escala de esta Fig. es 2 veces mayor que la de la Fig. 3.

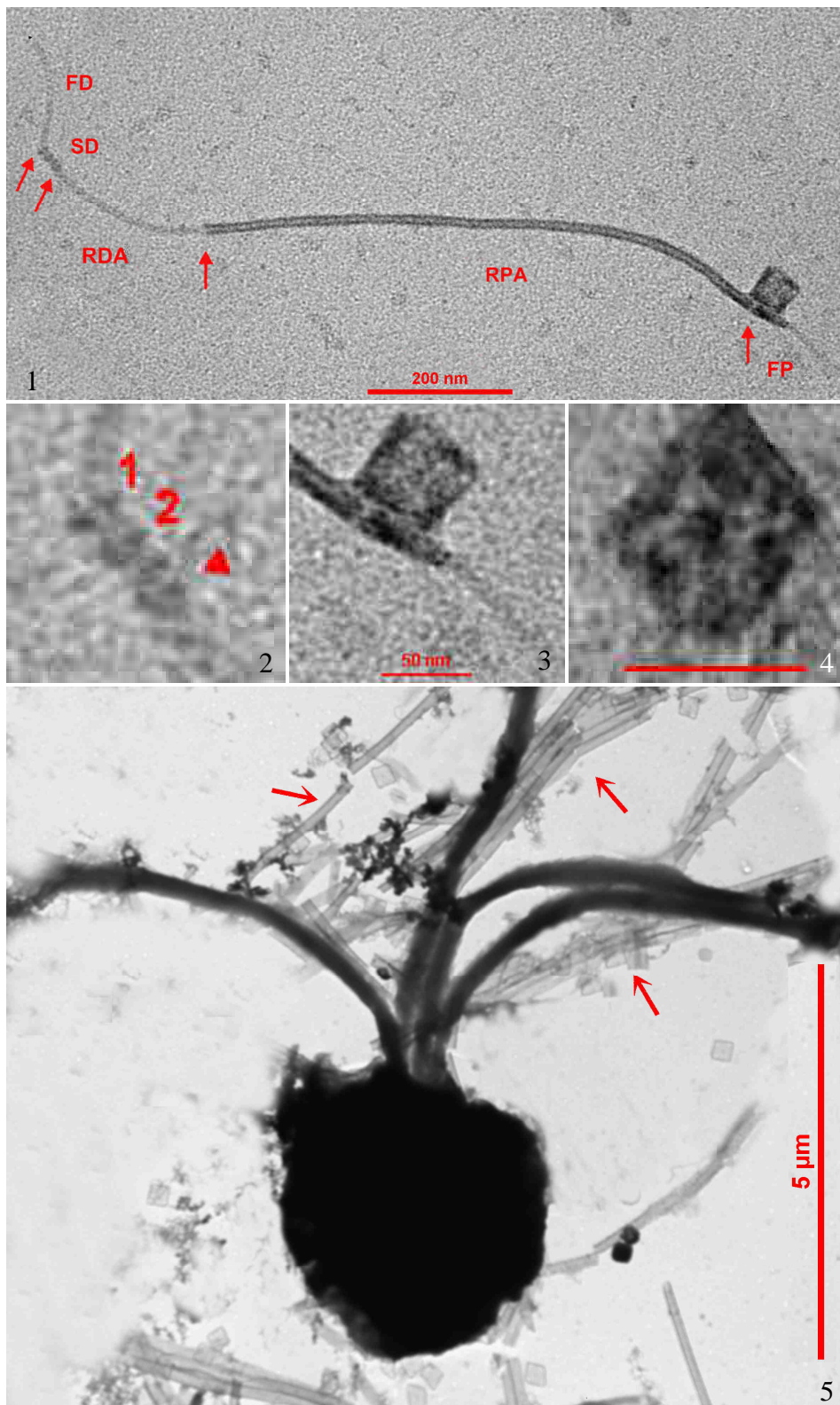
Fig. 3: detalle del filamento proximal del pelo de la Fig.1.

Fig. 4: escama subyacente pentagonal. Barra de escala de 50 nm.

Fig. 5: célula completa con tricocistos disparados (flechas rojas).

Todas las Figs. obtenidas mediante TEM. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA11.

LÁMINA 14



4.3.4.4. *Pyramimonas robusta* Pienaar & Sym

Una única cepa, la CGA15, perteneciente a esta especie ha sido aislada y analizada durante este estudio.

- Características destacables:

- Aspecto general: células con 4 flagelos, isocontas y acrocontas. Los flagelos se alojan en una cavidad del citoplasma que puede llegar a ocupar de 1/3 a 1/2 de la longitud celular. En vista amplia tienen, por lo común, una forma oblonga que va de elíptica a obovada, con una parte anterior que puede ser elíptica o truncada, unos laterales convexos y una parte posterior de elíptica a redondeada (Lám. 15, Figs.1-4). En vista posterior las células tienen un aspecto redondeado (Lám. 15, Fig. 2) mientras que en vista anterior, el contorno de la célula puede ser redondeado, cuadrado o con una compresión dorsoventral que confiere, al menos a la parte anterior de las células, un aspecto romboideo, llegando en ocasiones incluso a apreciarse una clara lobulación de la parte anterior del citoplasma (Lám. 15, Figs. 5-8). En estos lóbulos, cuando aparecen, se alojan los lóbulos del cloroplasto.

- Dimensiones: en vista amplia las células tienen una longitud de 6-12 μm y una anchura de 5-10 μm , con unos flagelos de 10-18 μm de largo (Tabla 4.16.).

Tabla 4.16.: principales dimensiones de la cepa CGA15 de *Pyramimonas robusta*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=25) | Anchura (n=34) | Flagelos (n=35) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 9,25 | 7,47 | 14,53 |
| Rangos | 6-12 | 5-10 | 10-18 |
| Menor | 6,56 | 5,23 | 10,22 |
| Mayor | 11,94 | 10,34 | 18,14 |

- **Cloroplasto:** de color verde con tonos de amarillo y textura con escasa rugosidad. El cloroplasto ocupa la longitud total de la célula y tiene cuatro lóbulos que se separan desde la parte posterior a una altura variable según la célula, pudiendo éstos abarcar conspicuamente separados de 1/2 a 3/4 de la longitud total de la célula. Los lóbulos se extienden parietalmente dejando en medio un espacio llenado en parte por la cavidad flagelar (Lám. 15, Figs.1-10).

- **Estigma:** un único estigma amarillo situado en un lateral de un lóbulo en la parte anterior o media de las células (Lám. 15, Figs. 1-2 y 8-9).

- **Pirenoide:** un único pirenoide con forma de esfera o elipse irregular situado en la parte posterior de la célula en posición basal y ligeramente excéntrica. Puede llegar a ocupar de 1/4-1/2 de la longitud celular con una cubierta compuesta por al menos 2 grandes gránulos (Lám. 15, Figs. 2 y 10).

- **División celular:** una célula madre da, al menos, 2 células hijas que se mantienen nadando unidas hasta que finaliza la citocinesis (Lám. 15, Fig.11).

- **Movimiento:** tramos en los que las células se mantienen apenas sin desplazamiento girando alrededor de un punto intercalados con desplazamiento en línea más o menos recta. Tienen tendencia a pegarse con mucha facilidad por la parte anterior al cubreobjetos de la preparación.

- **Escamas:** se han logrado observar al menos 3 tipos de escamas: escamas caja, corona y limuloides.

Las **escamas caja** (Lám. 15, Figs. 12-13) tienen un aparente dimorfismo siendo la mayoría claramente cuadradas o ligeramente rectangulares pero llegándose a apreciar alguna claramente rectangular. Las cuadradas tienen unos 311 nm (269-360 nm, n=11) de lado, mientras que las rectangulares tienen unos 314 nm de largo (312-317 nm) por 270 nm (269-282 nm, n=2) de ancho. Las escamas rectangulares se aprecian con menor frecuencia y no es totalmente descartable que se trate de escamas cuadradas vistas ligeramente en perspectiva sobre la membrana ondulada de la rejilla de microscopía electrónica. Ambas

tienen una base sin perforaciones aparentes, en cuyo centro se observa en vista distal una protuberancia en forma de aspa y 4 protuberancias oblongas, menos conspicuas, hacia las esquinas. Los brazos del aspa están ligeramente desviados en el sentido de las agujas del reloj respecto a las líneas imaginarias que unen los dientes opuestos que se encuentran en el centro de cada una de las 4 paredes de la escama en su margen distal. Estos dientes se hayan habitualmente orientados hacia el interior de la escama dando una apariencia lobular a su apertura. Los lóbulos de la apertura pueden ser más o menos lanceolados. También se han observado escamas que además de los anteriores cuentan con otros 4 dientes en el margen distal de la pared, uno en cada esquina, sumando un total de 8 dientes.

Las **escamas corona** (Lám. 15, Fig. 14) tienen una base cuadrada de aproximadamente 344 nm de lado (327-369 nm) y un alto de 330 nm (267-392 nm, n=3). Muestran un puntal central que parte de una cruz basal que se comunica con el marco exterior para formar la base de la escama. Este puntal central a su vez converge con los cuatro puntales arqueados laterales que, partiendo de las esquinas de la base, dan forma de cúpula a la escama. El punto de unión entre los puntales arqueados y el central se encuentra algo por debajo de la cúspide de la cúpula de manera que los puntos mas altos de los puntales quedan por encima de él. A su vez el punto de unión entre los brazos de la cruz basal también está ligeramente elevado respecto al marco exterior y el propio marco tiene una forma arqueada, en visión lateral, en los puntos en los que se une con los pilares arqueados. Algunas escamas muestran un número indeterminado de dientes en el marco exterior de la base, orientados proximalmente.

Las **escamas limuloides** (Lám. 15, Fig. 15) tienen una media de 371 nm de largo (332-447 nm), medida en la espina central, y 227 nm (177-284 nm, n=15) de ancho. Portan 3 espinas auxiliares, 2 al lado derecho de la principal en vista proximal y una al lado izquierdo, y tienen 5 crestas que las dividen en 6-7 sectores, dependiendo hasta que punto se extienda la espina central hacia el extremo posterior de la escama. Además, también en el extremo posterior, tienen varias perforaciones, una de ellas cercana al final de la espina central y otras (al menos 2) pegadas al borde de la escama.

- **Otras características destacables:**

- Paralelo a cada uno de los lóbulos corre una fila de vesículas (*puncta*), que van desde la parte anterior de la célula hasta la parte posterior donde convergen detrás del plasto (Lám. 15, Fig. 10). Los *puncta* son vesículas con un contenido globular electrodensito que se excitan bajo la observación prolongada al microscopio (McFadden *et al.* 1987, Pienaar & Sym 1997). Se desconoce su función.

- **Especie propuesta:** por el tamaño, los *puncta*, la natación, la posible cubierta pirenooidal y las escamas observadas al microscopio se trata de *P. robusta*. En cuanto a las escamas existen algunas discrepancias con respecto a la descripción de la especie realizada por Pienaar y Sym (1997). En general todas las escamas observadas tienen tamaños medios mayores que los de la descripción: las escamas caja tienen unos 311 nm de lado, frente 239 nm; las escamas corona tienen unas dimensiones de 344 x 330 nm (longitud x altura), frente a 250 x 285 nm; y las escamas limuloides, tienen 371 x 227 nm frente a 348 x 212 nm. En cuanto a la forma, las escamas observadas son básicamente idénticas, a excepción del pequeño detalle de que en las escamas corona observadas para esta cepa el marco de la base no es tan plano como se representa en las ilustraciones del citado trabajo, si no que está arqueado por la zona de unión de los pilares arqueados laterales.

Esta especie, hasta donde llega el conocimiento del autor, ha sido solamente encontrada con anterioridad en zonas de rompiente de las costas de Sudáfrica (Pienaar & Sym 1997).

LÁMINA 15

Fig. 1: célula con la parte anterior truncada y la posterior elíptica en la que puede apreciarse un estigma hacia su mitad.

Fig. 2: vista casi antiapical de una célula en la que se puede apreciar la posición basal del pirenoide. El recuadro muestra un detalle del pirenoide (2X) donde se distinguen 2 grandes gránulos formando la cubierta pirenoidal.

Fig. 3: célula redondeada en la que se aprecian claramente los laterales convexos.

Fig. 4: célula elíptica.

Fig. 5-8: vista anterior de distintas células. En la Fig. 5 se muestra una célula con la parte anterior casi cuadrada en la que se puede apreciar la situación parietal de los lóbulos del cloroplasto. En la Fig. 6, la célula que aparece tiene una sección transversal casi redondeada con la inserción de los flagelos patente en su centro. La Fig. 7 muestra una célula claramente comprimida dorsi-ventralmente y con el citoplasma de la parte anterior lobulado y romboide en sección transversal. La Fig. 8 muestra una célula con sección cuadrada en la que se puede ver la posición lateral del estigma dentro de su lóbulo portador.

Fig. 9: célula con el estigma en la parte anterior.

Fig. 10: célula con 2 filas de *puncta* visibles corriendo paralelas a los lóbulos y laterales.

Fig. 11: células en división.

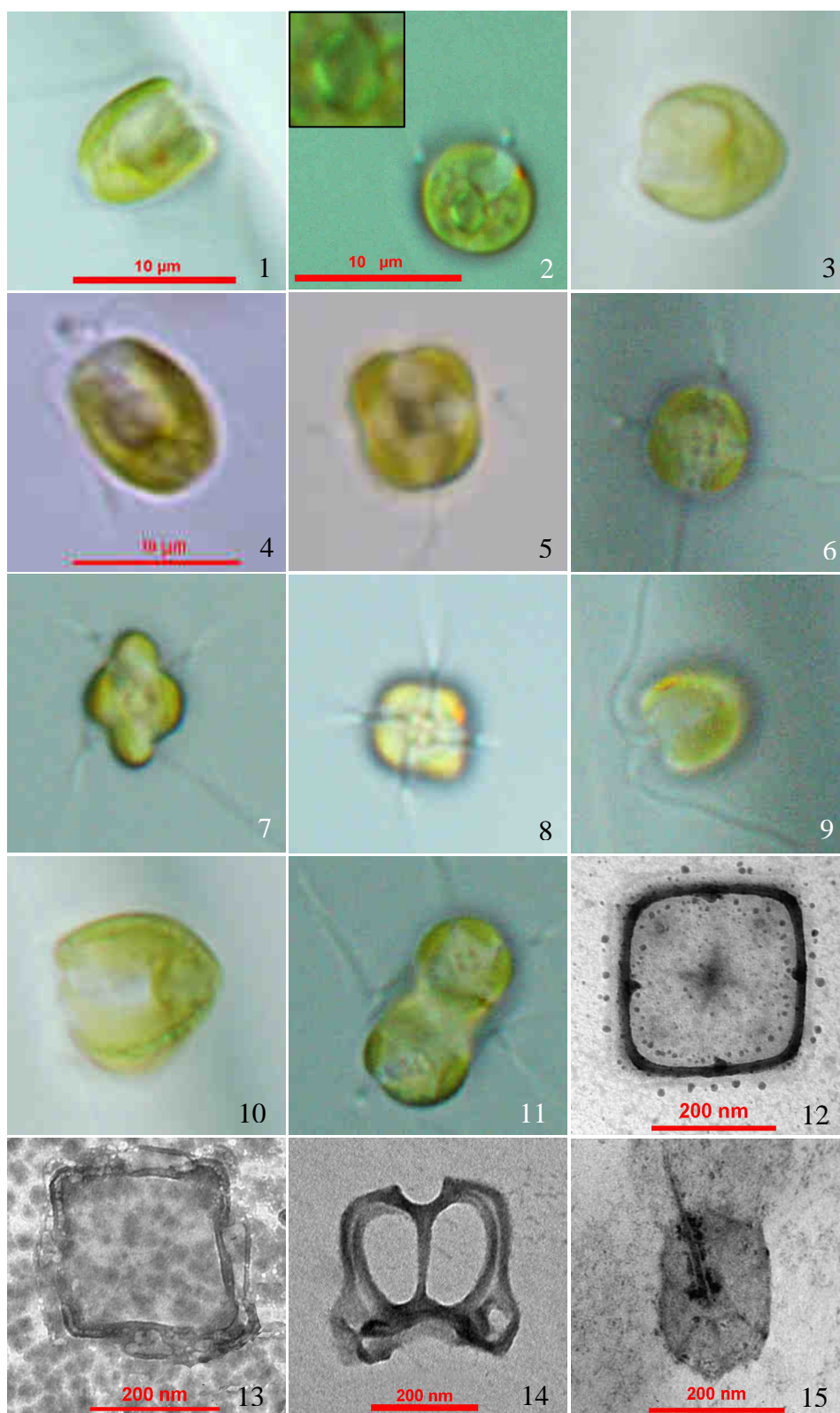
Fig. 12-13: cara distal (Fig. 12) y proximal (Fig. 13) de una escama caja. La escama de la Fig. 13 está contrastada con una fina capa de carbono.

Fig. 14: vista lateral de escama corona.

Fig. 15: vista proximal de la escama limuloide.

Figs. 1-11 obtenidas a 1000X y Figs. 12-15 obtenidas mediante TEM. Figs. 4-5 y 8 en falso color. Figs. 1, 3 y 6-11 con la escala de la Fig. 1, Figs 4-5 con la de la Fig. 4. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA15.

LÁMINA 15



4.3.4.5. *Pyramimonas propulsa* Moestrup & Hill

Solo una cepa perteneciente a esta especie ha podido ser analizada, concretamente la cepa CGA16.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células con 8 flagelos, acrocontas e isocontas, con forma, en vista amplia, campanulada o piramidal, con un extremo anterior truncado y uno posterior que puede ser cónico, elíptico o incluso algo ovalado, y que a veces puede ser algo irregular (Lám. 16, Figs. 1-2 y 4). Los laterales suelen ser planos o escasamente convexos, aunque en algunas células inmediatamente después del extremo anterior pueden volverse cóncavos (Lám. 16, Figs. 4; Lám. 17, 1 y 4). En vista apical, las células tienen un perfil rectangular con los extremos redondeados, octogonal, o superficialmente lobulado en forma de trébol de 4 hojas (Lám. 16, Figs. 5-7). En vista antiapical, las células tienen un perfil circular o cuadrangular redondeado (Lám. 16, Figs. 8-9). Se observa una cavidad flagelar en la parte anterior de la célula que profundiza alrededor de 1/3 de la longitud celular (Lám. 16, Fig 1).

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen una longitud de 12-18 μm y una anchura de 7-12 μm , con unos flagelos de 14-29 μm de longitud (Tabla 4.17.).

Tabla 4,17.: principales dimensiones de la cepa CGA16 de *Pyramimonas propulsa*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=24) | Anchura (n=28) | Flagelos (n=41) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 15,15 | 9,38 | 21,58 |
| Rangos | 12-18 | 7-12 | 14-29 |
| Menor | 12,44 | 6,96 | 13,63 |
| Mayor | 17,96 | 11,89 | 29,07 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde más o menos claro con tonos amarillos y marrones, y textura lisa o escasamente rugosa. El cloroplasto se encuentra lobulado desde la parte posterior (Lám. 16, Figs. 8-9) dando 4 lóbulos que se extienden, paralelos a la membrana plasmática y dejando un espacio entre sí que los hace claramente distinguibles, a lo largo de alrededor de $2/3$ de la longitud total de la célula (Lám. 16, Fig. 1-3). El espacio que queda entre los lóbulos es llenado en parte por la cavidad flagelar. Cerca del extremo anterior de algunas células los 4 lóbulos se vuelven a lobular dando 2 cada uno con lo que en vista apical pueden observarse células con 4 y con 8 lóbulos (Lám. 16, Figs. 2, 5-7 y 10-11). En los casos en los que el citoplasma está lobulado por la parte anterior, los lóbulos del citoplasma alojan a los del cloroplasto (2 del cloroplasto por cada 1 del citoplasma en el caso de las células con 8 lóbulos plastidiales).

- **Estigma:** 1-2 estigmas de color amarillo, con forma más o menos de píldora y situados, en lóbulos adyacentes cuando aparecen 2, hacia la parte central de la célula, donde los lóbulos del cloroplasto comienzan a ser distinguibles en vista amplia. No son visibles en todas las células (Lám. 16, Figs. 2-4 y 10; Lám. 17, 1).

- **Pirenoide:** un único pirenoide redondeado, elíptico o con forma irregular, que puede llegar a extenderse de $1/3$ hasta casi $1/2$ de la longitud celular y se encuentra situado en posición basal central (Lám. 16, Figs. 2 y 8-9; Lám. 17, 1 y 3). No es apreciable en todas las células y gracias a la tinción con azocarmín G se puede observar una cubierta pirenoidal compuesta por al menos 4 gránulos (Lám. 17, Fig. 2).

- **División celular:** una célula madre da, al menos, 2 células hijas que permanecen nadando unidas hasta que termina la citocinesis (Lám. 17, Fig. 4), éstas, a su vez, pueden seguir dividiéndose sin haber terminado la citocinesis dando lugar a pequeñas colonias informes.

- **Movimiento:** tramos largos y sin cambios bruscos de velocidad, a veces ondulando, y otras, totalmente rectos. Los tramos largos están intercalados con cambios importantes de dirección que pueden realizar sin detenerse. Tienen

tendencia a pegarse por los flagelos y la zona apical al cubreobjetos. Los avances se realizan con rotación en torno al eje longitudinal de la célula.

- **Escamas:** se han podido identificar 3 tipos de escamas en esta cepa: Escamas caja, corona y limuloides.

Las **escamas caja** (Lám. 17, Fig. 5) consisten en una base sólida cuadrada o rectangular, con lados de 235 nm (219-249 nm, n=4) de media en las cuadradas y algo mayor en el único ejemplar de escama rectangular que pudo observarse, de 310 x 265 nm. No es totalmente descartable que la escama rectangular observada se tratara en realidad de una escama cuadrada vista ligeramente en perspectiva sobre la membrana ondulada de la rejilla de microscopía electrónica. Las bases de las escamas caja, parecen tener unos 8 radios ligeramente marcados que las dividen en otros tantos sectores de idéntica superficie. La base está perforada por unos 24 poros, en general, que forman una roseta de 8 alrededor del centro (uno por sector) quedando los otros 16 bordeando el extremo de la base (2 por sector). El límite exterior de la base es dentado, con un par de dientes por sector. Allí donde los radios alcanzan el límite exterior surgen puntales perpendiculares a la base que se unen en la parte alta de la escama formando un cuadrado también dentado.

Las **escamas corona** (Lám. 17, Fig. 6) tienen un marco dentado, cuadrado o rectangular, con unas dimensiones medias, incluyendo los dientes, de 311 nm (283-337 nm, n=5) de lado en el caso de las cuadradas y 351 nm (341-358 nm) de largo y 275 nm (255-292 nm, n=3) de ancho, en el caso de las rectangulares. Estas últimas al igual que las escamas caja son menos frecuentes y no es totalmente descartable que se trate de escamas cuadradas vistas en perspectiva. Los dientes pueden estar orientados en el plano del marco o de manera perpendicular a el, lo que sería hacia la membrana plasmática en su posición natural. De cada uno de sus lados parten 2 puntales que sustentan una estructura en forma de cúpula, quedando entre los puntales un total de 8 vanos. La cúpula posee una protuberancia central orientada hacia su lado cóncavo.

Las **escamas limuloides** (Lám. 17, Fig. 7) tienen una longitud media, en la espina central, de 364 nm (325-416 nm) y una anchura de 202 nm (187-220 nm, n=7). Tienen 3 espinas auxiliares y una estructura en forma de tela de araña con 6 nervios radiales que nacen de la parte posterior de la espina principal partiendo la escama en 8 sectores. Por cada uno de estos sectores hay una perforación central formando una roseta en torno al punto donde nacen los nervios y, rodeando la roseta, se extienden hacia el exterior de la escama formando círculos concéntricos de perforaciones, otros nervios que completan la estructura de tela de araña.

- **Otras características destacables:**

- Al menos en algunas células se pueden apreciar multitud de vesículas o gránulos de tonalidad oscura siguiendo la línea de los lóbulos del plasto (Lám. 16, Fig 3) y en otras un granulo rematando cada uno de los lóbulos del cloroplasto (Lám. 16, Figs. 12-13; Lám. 17, Fig. 2).

- En algunas células se puede ver una especie de vesícula clara o isla citoplasmática en el extremo posterior que no ocupa el cloroplasto (Lám. 16, Figs. 1 y 3-4; Lám. 17, Figs. 1 y 3).

- **Especie propuesta:** tanto las escamas y la morfología general observable al microscopio óptico corresponden a la especie *P. propulsa*, aunque existen algunos aspectos que no coinciden del todo con la descripción formal de la especie publicada por Moestrup y Hill (1991). Entre éstos se encuentra la longitud (algo menor) de las células de esta cepa, que tienen un rango de 12-18 μm mientras que las de la descripción original lo tienen de 17-21 μm . Por otro lado, se da la circunstancia de que las células de la cepa analizada tienen una cubierta pirenoidal con 4 gránulos y, al menos algunas células, 2 estigmas, en lugar de una cubierta pirenoidal compuesta por multitud de pequeños gránulos y un único estigma como se detalla en el citado trabajo.

En cualquier caso, el tamaño suele ser variable entre cepas, para casi todas las especies y en especial en el género *Pyramimonas* (Sym & Pienaar 1995), y en trabajos posteriores se ha observado que cepas de *P. propulsa* aisladas en Sudáfrica tienen

habitualmente 2 estigmas y una cubierta pirenoidal formada por unos pocos gránulos (Sym & Pienaar 1997a). Este trabajo también habla sobre la presencia de pequeños gránulos de almidón en la parte anterior de los lóbulos del cloroplasto y cuerpos osmoflicos que recuerdan a los *puncta* unidos a la membrana de las células, que podrían corresponderse con los pequeños gránulos o vesículas observados en esta cepa (Lám. 16, Figs. 3 y 12-13; Lám. 17, Fig. 3). En el mismo trabajo, se habla también de diferencias en la extensión de los senos de los cloroplastos, siendo 2 de ellos más largos, de manera que pueden llegar hasta el extremo posterior de la célula y formar un continuo, que podría llegar a observarse al microscopio óptico como la pequeña isla citoplasmática que se ha podido apreciar en algunas células (Lám. 16, Figs. 1 y 3-4; Lám. 17, Figs. 1 y 3). Todas estas similitudes sugieren la pertenencia de esta cepa a la especie *P. propulsa*.

En general la naturaleza de la cubierta pirenoidal, al tratarse de material de reserva, está sujeta al estado nutricional de las células, y los estigmas, en principio, pueden duplicarse en una misma célula como paso previo a la división de ésta. Por esta razón, la relevancia taxonómica que tiene el número y forma de los gránulos de la cubierta pirenoidal, así como el número de estigmas, ha de ser tomada en cuenta con ciertas reservas, y la determinación de estos caracteres debe de reflejar estas circunstancias, y hacerlo solo tras la observación de un buen número de células de cultivos en distintas fases de crecimiento, para así poder expresar de la mejor manera posible la variabilidad natural que estos rasgos pueden mostrar en cualquier especie. En *P. propulsa* en concreto, el número y naturaleza de los gránulos de la cubierta pirenoidal ya ha sido considerado como de escasa utilidad taxonómica por ser un rasgo relacionado con el desarrollo de las algas y no valer para diferenciar entre esta especie y *P. amyliifera* (Sym & Pienaar 1997a), con la que comparte muchas características incluyendo escamas caja y limuloides prácticamente idénticas (Pennick 1978, Moestrup & Hill 1991).

En cuanto a la distribución de esta especie ha sido hallada en bastantes casos identificada como *P. aff. amyliifera*, en Australia, Japón, Suráfrica, Italia, Francia (Moestrup & Hill en 1991 y referencias en ese mismo trabajo, Sym & Pienaar 1997a, LeRoi & Hallegraeff 2006) y en el estrecho de Kattegat, entre el mar Báltico y el del Norte (Thronsen *et al.* 2007a) por lo que este estudio sería su primera cita en España.

LÁMINA 16

Fig. 1: una célula con el extremo posterior elíptico en el que puede observarse una vesícula o isla citoplasmática clara en la parte posterior. Nótese también la cavidad flagelar que se extiende hasta 1/3 de la longitud celular.

Fig. 2: célula en la que se distingue la posición medial del estigma y la lobulación terminal del plasto, además de entreverse un pirenoide irregular.

Fig. 3: la misma célula que en la Fig. 1, pero en este caso se notan los gránulos de tonalidad oscura que cubren los lóbulos del cloroplasto. Barra de escala de 10 μm .

Fig. 4: célula algo campanulada y con ambos laterales cóncavos en la que el cloroplasto no llega a ocupar el extremo posterior.

Fig. 5: vista apical de una célula con lobulación secundaria del cloroplasto y con el citoplasma ligeramente lobulado lo que le da una forma como de trébol de cuatro hojas. Nótese la inserción de los flagelos formando una cruz

Fig. 6: vista apical de una célula con lobulación secundaria del cloroplasto y perfil octogonal.

Fig. 7: vista apical de una célula con solo 4 lóbulos y perfil cuadrangular con los extremos redondeados.

Fig. 8: vista antiapical de una célula con perfil redondeado y un pirenoide irregular.

Fig. 9: vista antiapical de una célula con perfil cuadrangular con extremos redondeados y un pirenoide irregular.

Figs. 10-11: célula en la que pueden apreciarse 2 estigmas situados en lóbulos adyacentes y la bifurcación final del extremo de uno de los lóbulos (Fig. 10), mas claramente perceptible observando la señal de fluorescencia del cloroplasto (Fig. 11)

Figs. 12-13: señal de epifluorescencia de una célula teñida con DAPI (Fig. 12) en la que se aprecia un gránulo en el extremo anterior de cada uno de los lóbulos del cloroplasto, que pueden observarse con más detalle en la ampliación a 2X (Fig. 13).

Figs. 1-13 obtenidas a 1000X y Figs. 11-13 obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. Todas las Figs. con la misma escala que la Fig. 1 excepto la Fig. 3 y la Fig. 13. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA16.

LÁMINA 16

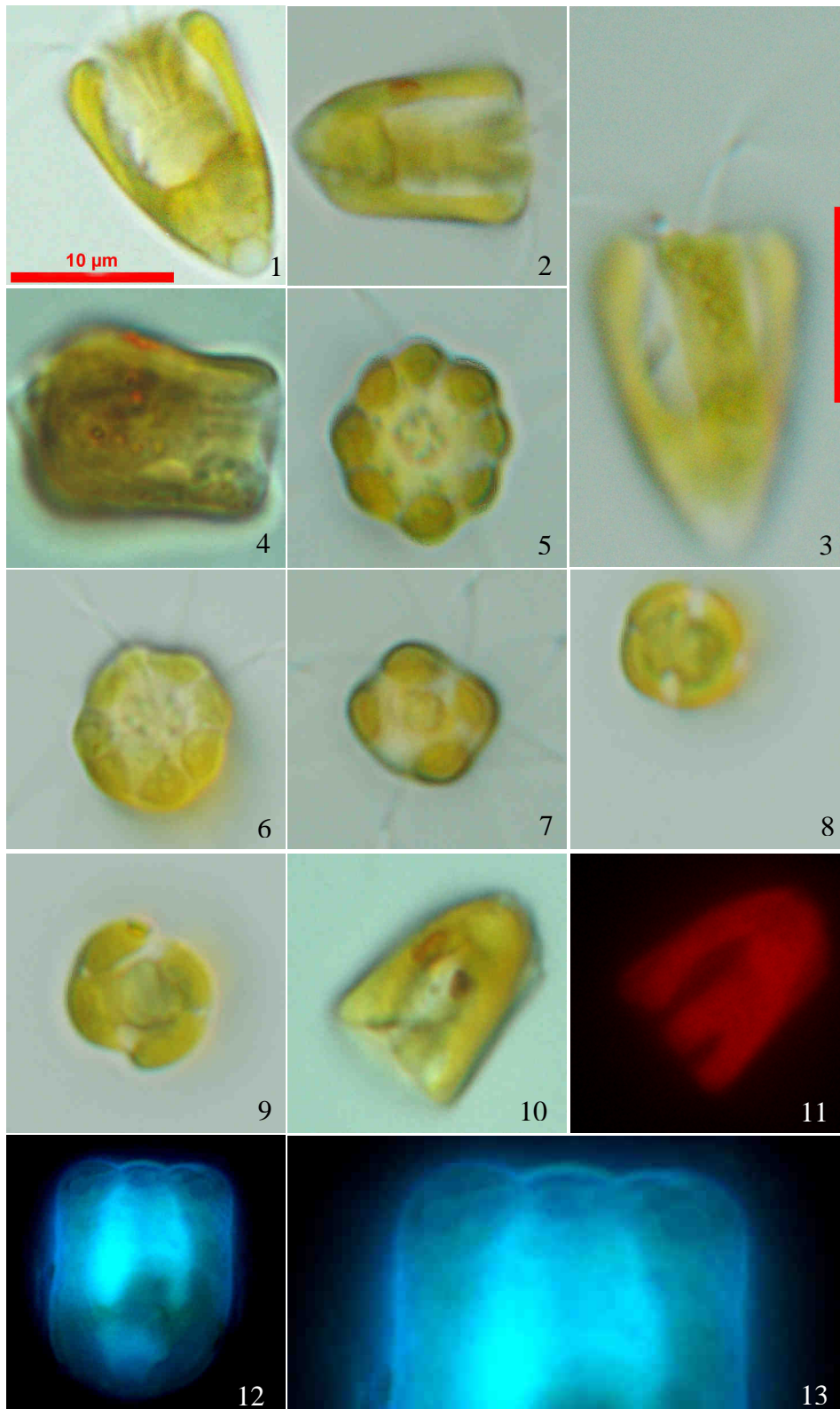


LÁMINA 17

Fig. 1: célula con pirenoide redondo.

Fig. 2: tinción con azocarmine G de una célula en la que se pueden observar los gránulos de las puntas de los lóbulos del cloroplasto, en el extremo anterior, y los 4 gránulos que conforman la cubierta pirenoidal, en la parte posterior.

Fig. 3: célula con pirenoide elíptico y una vesícula o isla citoplasmática terminal clara.

Fig. 4: células en división.

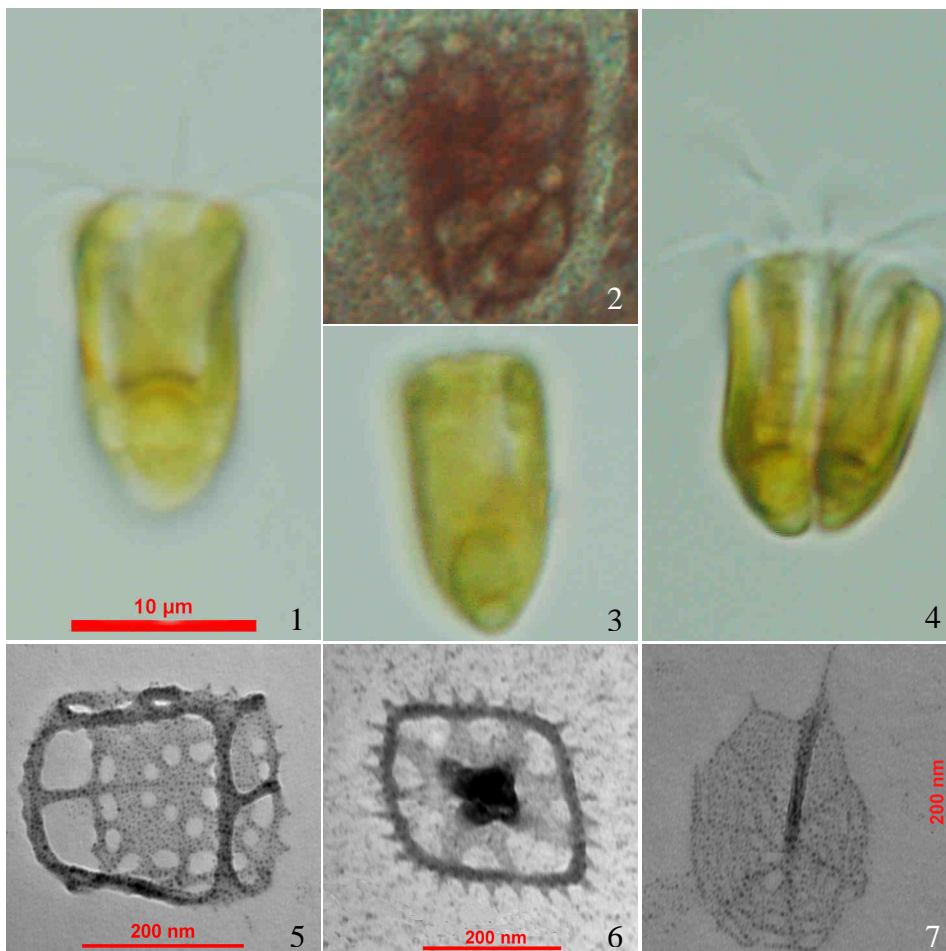
Fig. 5: escama caja en vista distal.

Fig. 6: escama corona en vista proximal.

Fig. 7: escama limuloide en vista distal.

Figs. 1-4 obtenidas a 1000X, Fig. 2 mediante contraste de fases y Figs.5-7 mediante TEM. Figs. 1-4 con la escala de la Fig. 1. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA16.

LÁMINA 17



4.3.5. *Oltmannsiellopsis* Chihara & Inouye

El género *Oltmannsiellopsis*, descrito por Chihara y colaboradores (1986), lo constituyen microalgas verdes unicelulares o coloniales, acrocontas, isocontas y con 4 flagelos, que carecen tanto de pared celular como de escamas o pelos flagelares. Las colonias, en los casos que se dan, pueden tener, según la especie, de 2 a 4, o incluso más células que nadan unidas por los laterales formando una línea en la que todos sus polos apicales y flagelos están orientados hacia el mismo lado. Las células suelen tener una forma que va de ovoidea a elipsoidea, pudiendo estar dorsoventralmente comprimidas, una longitud de 9-30 μm y una anchura de 5-10 μm según la especie (Hargraves & Steele 1980, Chihara *et al.* 1986). Dependiendo de la especie, sus flagelos pueden insertarse en una pequeña depresión en forma de caldera (Lokhorst & Star 1993). Estas algas tienen un único cloroplasto con forma de taza con 2 a 4 lóbulos, un único estigma y un pirenoide rodeado por multitud de gránulos de almidón. Tienen una reproducción asexual mediante fisión binaria longitudinal y no se les conoce reproducción sexual alguna.

Hay tres especies descritas dentro de *Oltmannsiellopsis*: *O. viridis* (la especie tipo), *O. geminata* y *O. unicellularis* (Chihara *et al.* 1986). La especie tipo fue inicialmente descrita como *Oltmannsiella viridis* y relacionada en ese mismo género con *Oltmannsiella lineata*, especie que también forma colonias similares de 2 a 8 células, de tamaño parecido pero biflageladas (Hargraves & Steele 1980). Una vez ya reclasificada dentro del género *Oltmannsiellopsis* por Chihara y colaboradores (1986), se paso a estudiar con mas detalle el aparato flagelar de las algas de ese género, y a la luz de sus peculiaridades, entre las que destaca el hecho de tener unos cuerpos basales de los flagelos, componentes principales de la base de dicho aparato, ordenados en ángulo contrario al sentido de las agujas del reloj, se comenzó a cuestionar la pertenencia de este género a la familia Dunaliellaceae (Lokhorst & Star 1993) en la que estaba adscrito. Más tarde, se cuestiono la pertenencia de *Oltmannsiellopsis* al propio orden Dunaliellales (Chlorophyceae), que en principio comprendía las clorofitas flageladas sin pared, y se erigió, dentro de la clase Ulvophyceae, un nuevo orden, Oltmannsiellopsidales, con una única familia, Oltmannsiellopsidaceae, para albergar este género, dando por invalidó el orden Dunaliellales, que sería un grupo polifilético. Todo

esto en base a un análisis filogenético del 18S ADNr (Nakayama *et al.* 1996). Esta nueva ubicación dentro de la clase Ulvophyceae es, a día de hoy y hasta donde alcanza el conocimiento del autor, en la que se mantiene, aunque se sigue estudiando su posición filogenética en estudios evolutivos como los de Pombert y colaboradores (2006a) y Pombert y colaboradores (2006b), con la intención de aclarar las relaciones entre la clase Ulvophyceae y el resto de linajes de clorofitas.

En cuanto a la distribución de este género de aguas costeras y salobres, cabe destacar que especies de *Oltmannsiellopsis* se han encontrado en el estuario del Nervión con anterioridad (Seoane *et al.* 2006, Laza-Martínez *et al.* 2007), en las aguas costeras de EE. UU. (Hargraves & Steele 1980) y en Japon (Chihara *et al.* 1986).

En este estudio se han analizado 3 cepas afiliadas al género *Oltmannsiellopsis*: 2 pertenecientes a *O. unicellularis* (CGA17 y CGA19) y 1 perteneciente a la especie *O. viridis* (CGA18).

4.3.5.1. *Oltmannsiellopsis unicellularis* Inouye & Chihara

Dos cepas pertenecientes a esta especie han podido ser analizadas, concretamente las cepas CGA17 y CGA19.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células con 4 flagelos, acrocontas e isocontas, con formas, en vista amplia, que pueden ser redondeadas, elípticas, ovaladas, y, en alguna ocasión, pueden estar lateralmente aplanadas por la parte anterior, lo que les da una forma ovada en vista amplia (Lám. 18, Figs. 1-6). Este aplastamiento anterior es más habitual en la cepa CGA19, en la que las células tienen forma por lo general ovada en vista amplia, parecida a un ánfora corta, siendo habitualmente sus células lateralmente aplanadas, u ocasionalmente cilíndricas, en su mitad anterior, y esféricas o cilíndricas en su mitad posterior. En algunas células la parte anterior puede ser truncada o incluso algo lanceolada, pero por lo general tanto ésta como la posterior suelen tener forma más redondeada. Los flagelos nacen en una pequeña depresión en el extremo anterior de la célula (Lám. 18, Fig. 1; Lám. 19, Fig. 1). Dichos flagelos se extienden, cuando están en relajación, por parejas que van en paralelo hacia la parte posterior de la célula, 2 por cada cara en vista amplia. En vista estrecha sobre todo, esta depresión puede no ser apreciable y parecer las células truncadas. Algunas células pueden llegar a ser completamente esféricas y las recientemente divididas suelen ser oblongas, con formas arriñonadas o plano-convexas, y se les van igualando sus laterales a medida que crecen (Lám. 18, Figs. 4 y 6).

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen una longitud de 8-18 μm y una anchura de 5-14 μm . Los flagelos tienen una longitud de 7-16 μm (Tablas 4.18.-4.19.).

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde más o menos brillante, con tonos de amarillo y textura rugosa o incluso muy rugosa (cepa CGA 19), que puede, o no, ocupar por completo la célula (en la cepa CGA 17 a veces no llega al extremo anterior), y puede, o no, tener lobulación conspicua (Lám. 18, Figs.

2-5). El plasto con lobulación conspicua tiene en general una forma como de pistacho entreabierto (Lám. 18, Fig. 7). Los lóbulos, que pueden ser más o menos largos dependiendo de la cepa, pueden ir de ser apenas conspicuos a

Tabla 4.18.: principales dimensiones de la cepa CGA17 de *Oltmannsiellopsis unicellularis*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=29) | Anchura (n=32) | Flagelos (n=24) |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 9,28 | 8,36 | 9,46 |
| Rangos | 8-11 | 6-11 | 7-11 |
| Menor | 7,82 | 6,38 | 7,26 |
| Mayor | 10,78 | 10,78 | 10,98 |

Tabla 4.19.: principales dimensiones de la cepa CGA19 de *Oltmannsiellopsis unicellularis*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=42) | Anchura (n=42) | Flagelos (n=27) |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 13,59 | 9,55 | 13,40 |
| Rangos | 10-18 | 5-14 | 10-16 |
| Menor | 9,84 | 5,42 | 10,32 |
| Mayor | 17,7 | 13,56 | 15,81 |

ocupar, los senos que quedan entre ellos, incluso más de 3/4 de la longitud celular. Aparte del tamaño, lóbulos algo mayores en la cepa CGA19, existen ciertas diferencias en cuanto a las características de la lobulación de los cloroplastos que distinguen a las cepas analizadas. La cepa CGA17 parece tener 2 lóbulos, que en algunas células pueden llegar a bifurcarse en 4 por la parte anterior, y en algunas ocasiones estar rematados por una lobulación secundaria irregular (Lám. 18, Figs. 7, 10 y 13). Además, en esa misma cepa se ha observado que el eje longitudinal del cloroplasto no tiene por qué ser paralelo al

de la célula, pudiendo los lóbulos quedar orientados en diagonal respecto a los flagelos (Lám. 18, Fig. 4). En el caso de la cepa CGA19 se han observado células con una lobulación irregular consistente en 2 lóbulos que sólo llegan a cubrir hasta cerca de la 1/2 de la longitud celular y otros 2 que se extienden más hacia el anterior (Lám. 18, Figs. 11-12). Además, al menos en algunas células, el cloroplasto rodea en la parte posterior una isla citoplasmática conspicua (Lám. 18, Figs. 8-9) y, en los casos en los que alguna célula ha llegado a sufrir su lisis tras la observación prolongada al microscopio, el cloroplasto parece disgregarse en multitud de laminillas (Lám. 18, Fig. 17).

- **Estigma:** 1, rara vez 2 estigmas amarillos, que suelen estar ubicados hacia la mitad de la célula, en la parte conspicuamente no lobulada del plasto en general (Lám. 18, Fig. 2). En los casos en los que aparecen 2, uno se encuentra al lado opuesto de la célula respecto del otro. Puede que las células con 2 estigmas estén en proceso de replicación de orgánulos para dividirse. En la cepa CGA19 no se ha podido observar estigma alguno.

- **Pirenoide:** un único pirenoide poco refractivo, difícil de apreciar, con forma redondeada, elíptica o algo irregular, y en situación basal, central o algo anterior (Lám. 18, Figs. 3-4 y 14). Puede llegar a ocupar desde cerca de 1/3 a casi 1/2 de la longitud celular y tiene una cubierta compuesta por multitud de pequeños gránulos que van de redondeados a lenticulares (Lám. 18, Fig. 14).

- **División celular:** una célula madre da 2 células hijas que permanecen nadando unidas hasta que termina la citocinesis (Lám. 19, Fig. 2).

- **Movimiento:** en la cepa CGA17 se ha observado que las células a veces realizan tramos largos y de natación relativamente rápida combinados con paradas en seco para cambios bruscos de dirección. Otras veces giran sobre si mismas con la parte posterior hacia el centro del giro. En ocasiones también pueden moverse marcha atrás, haciendo giros en espiral o en zig-zag. Por su parte, en la cepa CGA19 se ha detectado que estas células pueden realizar tramos más o menos rectos u ondulados, siendo capaces de realizar los cambios importantes de dirección sin detenerse y describiendo giros cerrados. Además,

los avances, cuando hablamos de células solitarias, van acompañados de rotación en torno al eje longitudinal de la célula, y en torno al punto de unión cuando se trata de células recién divididas que aún se mantienen unidas. También se pueden mover describiendo tirabuzones.

- Otras características destacables:

- En algunas células de la cepa CGA17 pueden apreciarse vesículas o gránulos en línea con la cara interna de los lóbulos del plasto (Lám. 18, Fig. 2, recuadro). Estas vesículas pueden guardar relación con las perforaciones o marcas redondeadas que se aprecian en la membrana citoplasmática de las células que se han podido observar al microscopio electrónico de barrido (Lám. 19, Fig. 1). En estas células se ha podido apreciar, a su vez, lo que parece una película de material mucilaginoso. Por el contrario, en muchas células de la cepa CGA19 se han podido observar lo que parecen vesículas de tamaño variable, extendidas por toda la célula, y que podrían tener relación con cuerpos mucilaginosos y hialinos que se observan cuando la célula sufre lisis debido a la observación prolongada al microscopio (Lám. 18, Fig. 16).

- En tubos de cultivos viejos de la cepa CGA19 se han llegado a ver grumos, formados por células en descomposición y algunas células vivas que supuestamente quedan adheridas al mucílago que segregan las otras células al morir (Lám. 18, Fig. 18).

- Especie propuesta: por la morfología de las células y la manera de dividirse parece tratarse de la especie *Oltmannsiellopsis unicellularis*. En cuanto a la morfología general puede decirse de las células que, pudiendo ser ovadas habitualmente, como está descrito para esta especie (Chihara *et al.* 1986), demuestran una gran variabilidad de formas. Por otro lado, los tamaños registrados en este estudio tienen un rango algo mayor que los referidos por el citado trabajo (8-18 μm x 5-14 μm , frente a 9-14 μm x 7-10 μm). En cuanto a detalles de la estructura celular, cabe destacar que pese a que en la bibliografía no se detalla ninguna isla citoplasmática como la observada, ésta podría ser el resultado de la continuación de los dos senos entre los principales lóbulos del cloroplasto. Por otro lado, las vesículas que se han podido observar en algunas células podrían ser los

cuerpos mucíferos a los que hacen referencia Chihara y colaboradores (1986). Estos cuerpos aparecerían en la región periférica de la célula y junto al núcleo, que se aloja en el espacio existente entre los lóbulos del cloroplasto, lo que estaría de acuerdo con la posición de los cuerpos observados en el presente estudio. Estos cuerpos contendrían material fibroso densamente empaquetado que se liberaría de la célula ante una agresión como el empleo de fijadores o la observación prolongada al microscopio, al igual que se ha podido constatar en este estudio. Además, al menos en la cepa CGA19 pueden aparecer grumos de células unidas por un material posiblemente mucilaginoso, característica que en el mismo trabajo se cita como propia de *O. unicellularis*. Finalmente, pese a que no se cita en la descripción original ningún detalle acerca de la estructura interna del cloroplasto, que pueda arrojar algo de luz en torno a las laminillas de las que parece estar formado a tenor de lo observado en células lisadas, sí que se menciona que la ultraestructura general de la célula es similar a la de *O. viridis*, de donde se puede deducir que es probable que estas laminillas sean las lamelas de múltiples tilacoides que citan Hardgraves y Steele (1980) cuando describen esta especie como *Oltmannsiella virida*.

En cuanto a su distribución, puede decirse que aparte de en el estuario del Nervión (Laza-Martínez *et al.* 2007), esta especie ha sido citada en el Mar del Japón (Chihara *et al.* 1986), donde fue hallada por primera vez, en aguas costeras de Japón ([NIES Microbial Culture Colection](#), cepa NIES-359) y en Australia (colección [SCCAP](#), cepa K-0250).

LÁMINA 18

Fig. 1: célula con forma de ánfora en la que se puede apreciar la invaginación anterior que alberga los flagelos.

Fig. 2: célula elíptica con plasto lobulado y vesículas o gránulos en la cara interna del lóbulo de la derecha como muestra la ampliación del recuadro (2X). Puede apreciarse un estigma amarillo hacia la mitad de la célula (asterisco).

Fig. 3: cloroplasto sin lobulación y un pirenoide basal en una célula ovalada.

Fig. 4: amplio pirenoide redondeado y basal que ocupa casi 1/2 de la longitud total de una célula redondeada en la que el cloroplasto esta algo desviado respecto al eje longitudinal de la célula.

Fig. 5: célula ovalada con parte anterior truncada.

Fig. 6: célula plano-convexa posiblemente recién dividida.

Fig. 7: señal de fluorescencia del cloroplasto de una célula en la que se observan 4 lóbulos.

Figs. 8-9: célula con una isla citoplasmática en el extremo posterior de su cloroplasto (Fig. 8) y su señal de autofluorescencia (Fig. 9).

Fig. 10: señal de fluorescencia del cloroplasto de una célula en vista anterior, en la que se aprecia la separación de 2 lóbulos que se inicia en la parte posterior de la célula.

Figs. 11-12: la Fig. 11 muestra una vista casi lateral de una célula ovada en la que se ven 3 lóbulos del cloroplasto, llegando el de más a la izquierda hasta cerca de 1/2 de la longitud celular. La Fig. 12 muestra la señal de autofluorescencia de la misma célula.

Fig. 13: vista anterior de una célula en la que se intuye una posible lobulación irregular del cloroplasto con lo que parecen ser pequeños lóbulos situados cerca de la membrana.

Fig. 14: vista casi antiapical de una célula en la que se puede observar un pirenoide con una cubierta compuesta por multitud de pequeños gránulos redondeados.

Fig. 15: célula con 4 grandes posibles vesículas de material hialino

Fig. 16: lisis de una célula en la que se observa la posible extrusión de las vesículas comentadas en la Fig. 15.

Fig. 17: lisis de una célula tras la observación prolongada al microscopio. Nótese como el cloroplasto parece estar formado por multitud de laminillas.

Fig. 18: células unidas por mucílago.

Todas las figuras obtenida a 1000X excepto la Fig. 18 que fue obtenida a 400X. Figs. 7, 9 10 y 12 obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. Figs. 1, 4, 6, 8-9, 11-12 y 14-17 con la escala de la Fig. 1 y Figs. 2-3, 5, 7, 10 y 13 con la de la Fig. 2. Las Figs. 2-3, 5, 7, 10 y 13 corresponden a la cepa CGA17 mientras que las Figs. 1, 4, 6, 8-9, 11-12 y 14-18 corresponden a la cepa CGA19.

LÁMINA 18

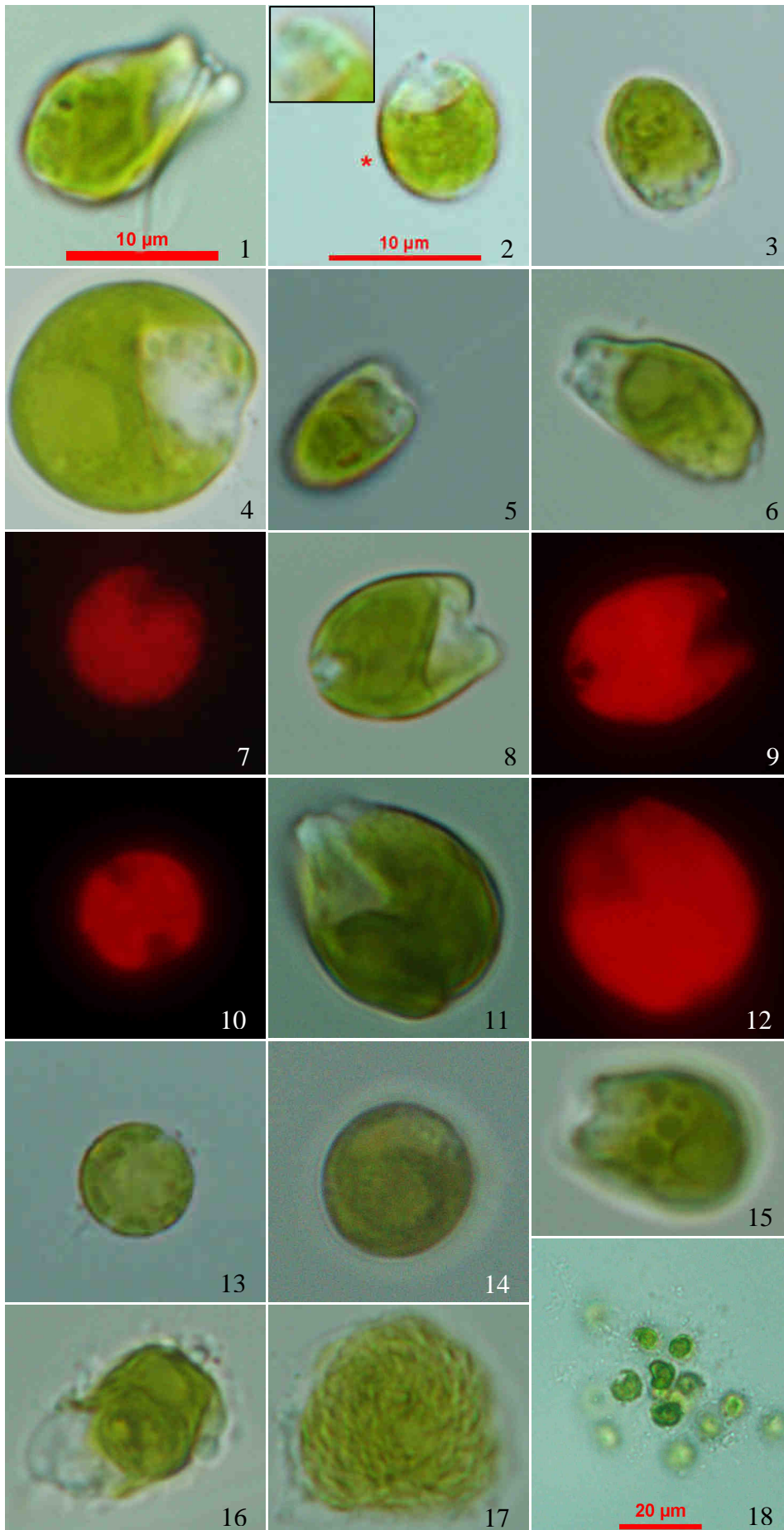
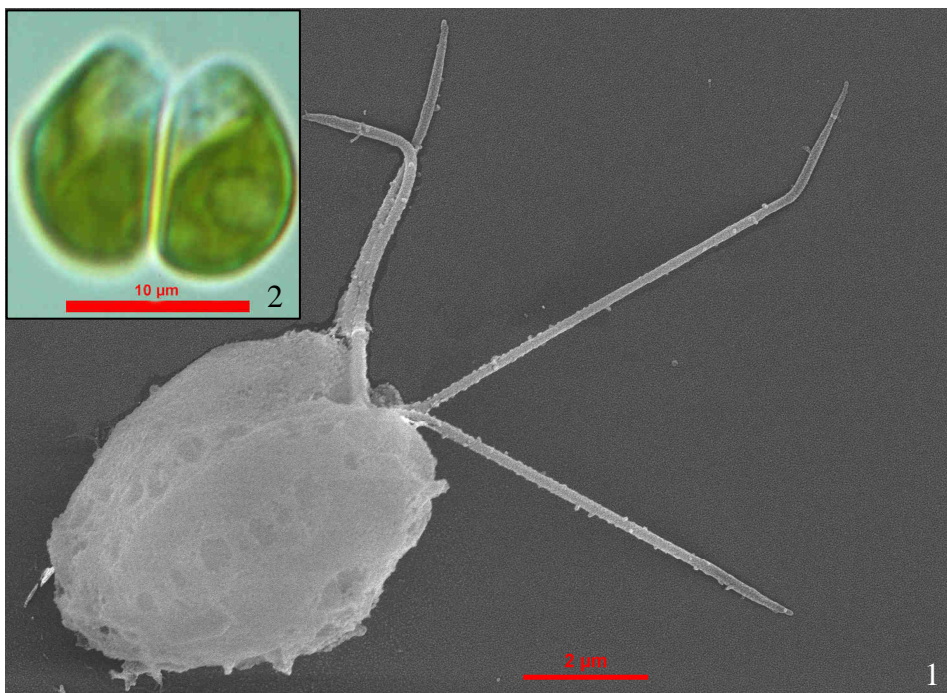


LÁMINA 19

Fig. 1: célula en la que se pueden apreciar los 4 flagelos que parten de una depresión en su extremo anterior y las marcas circulares en la membrana que podrían ser orificios producidos al excitarse las vesículas observadas en el interior de las células.

Fig. 2: células recién divididas que aún se mantienen unidas.

Fig. 2 obtenida a 1000X y Fig. 1 mediante SEM. La Fig. 1 corresponde a la cepa CGA17, y la Fig. 2 a la cepa CGA19.

LÁMINA 19

4.3.5.2. *Oltmannsiellopsis viridis* (Hadgraves & Steele) Inouye & Chihara

Solo se ha podido analizar una cepa de la especie *O. viridis*, en concreto la cepa CGA18.

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células con 4 flagelos, isocontas y acrocontas. En vista amplia, tienen por lo general forma oblonga que según donde se encuentre su anchura máxima puede ser casi obovada o piramidal invertida, ovalada, elíptica u ovada. Algunas células pueden llegar a tener una forma completamente redondeada y otras tener el extremo anterior truncado o ligeramente lobulado (Lám. 20, Figs. 1-6).

- **Dimensiones:** en vista amplia las células tienen de 10-15 μm de longitud y 5-12 μm de anchura. Sus flagelos comprenden longitudes de entre 9-14 μm (Tabla 4.20.).

Tabla 4.20.: principales dimensiones de la cepa CGA18 de *Oltmannsiellopsis viridis*. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=35) | Anchura (n=37) | Flagelos (n=31) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 12,45 | 7,65 | 11,41 |
| Rangos | 10-15 | 5-12 | 9-14 |
| Menor | 10,14 | 5,01 | 9,06 |
| Mayor | 15,49 | 11,83 | 14,32 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde brillante con tonos de amarillo y una textura escasamente rugosa, casi lisa. Tiene una lobulación consistente, al menos en las pocas células en las que se ha podido apreciar, en 4 lóbulos que se extienden siendo conspicuamente diferenciables a lo largo de 1/2-

2/3 de la longitud total de la célula (Lám. 20, Figs. 2-3 y 7). Dichos lóbulos son difíciles de apreciar y son claramente distinguibles solo en vista apical. En ocasiones pueden no llegar hasta el extremo anterior de la célula y en los casos en los que el citoplasma está lobulado, los lóbulos del citoplasma parecen albergar el final de los del cloroplasto.

- **Estigma:** 1-2 estigmas amarillos, que pueden estar posicionados o bien en la parte no lobulada del plasto, posterior de la célula, o bien en alguno de sus lóbulos, hacia el centro de la célula o incluso ligeramente hacia la parte anterior (Lám. 20, Figs. 2-3 y 8).

- **Pirenoide:** un único pirenoide con forma elíptica, ovalada o redondeada, en situación central en la parte posterior del plasto. El pirenoide puede llegar a ocupar desde algo menos de 1/3 a algo más de 1/2 de la longitud celular (Lám. 20, Figs. 2, 4 y 8). No se ha podido apreciar ninguna cubierta pirenoidal.

- **División celular:** se carece de observaciones.

- **Movimiento:** tramos más o menos rectos y de longitud variable, girando sobre el eje longitudinal de la célula, seguidos de detenciones para cambios amplios de dirección. Los conjuntos de células unidas por los laterales se desplazan girando alrededor de la célula/s central/es.

- **Otras características destacables:**

- Es muy común que las células aparezcan unidas por los laterales formando colonias de 2-5 individuos (Lám. 20, Fig 8).

- Algunas células parecen tener hileras de vesículas con escaso contraste junto a la membrana plasmática, tanto en su parte media como en la posterior (Lám. 20, Figs. 2, 5 y 8).

- **Especie propuesta:** teniendo en cuenta su parecido con otras cepas de *Oltmanselliopsis* analizadas anteriormente en este mismo estudio, nos encontraríamos

ante la especie *Oltmannsiellopsis viridis*, pues es la única de este género que forma colonias de más de 2 células (hasta nueve según Hardgraves & Steele 1980). En cuanto al tamaño, entra prácticamente en su totalidad dentro de lo comentado en la descripción original de la especie, aunque con una longitud desplazada hacia el margen inferior del rango y una anchura desplazada hacia el superior (10-15 μm x 5-12 μm las células frente a 12-30 μm x 5-9 μm) (Hardgraves & Steele 1980). Pese a la variedad de formas, en este caso también inesperada, la presencia de un cloroplasto con 4 lóbulos, así como la de un estigma (2 posiblemente en las células que estén a punto de dividirse) y el importante dato de las vesículas próximas a la membrana celular, inducen a pensar que nos encontramos ante la especie *O. viridis*. Estas vesículas serían los cuerpos mucíferos comentados por Chihara y colaboradores (1986) que según Hardgraves y Steele (1980) serían los responsables de la excreción de la película de polisacárido que constituiría la unión de las células que forman las colonias.

Esta especie ha sido citada con anterioridad en las costas de EE. UU. (Hardgraves & Steele 1980) y las de Japón (Chihara *et al.* 1986, [NIES Microbial Culture Collection](#), cepa N-360) y en el propio estuario del Nervión (Seoane *et al.* 2006, Laza-Martínez *et al.* 2007).

LÁMINA 20

Fig. 1: célula piramidal invertida con anterior truncado y ligeramente lobulado.

Fig. 2: 2 estigmas, uno en la mitad anterior y otro en la posterior, en una célula elíptica. Nótese las 2 hileras de vesículas que recorren la célula por los laterales.

Fig. 3: un pirenoide elíptico y un estigma adyacente en una célula ovalada.

Fig. 4: célula ovalada con anterior truncado y pirenoide ovalado.

Fig. 5: célula ovada en la que pueden apreciarse 3 vesículas en la parte posterior, paralelas a la membrana celular, en la parte que queda hacia arriba de la imagen.

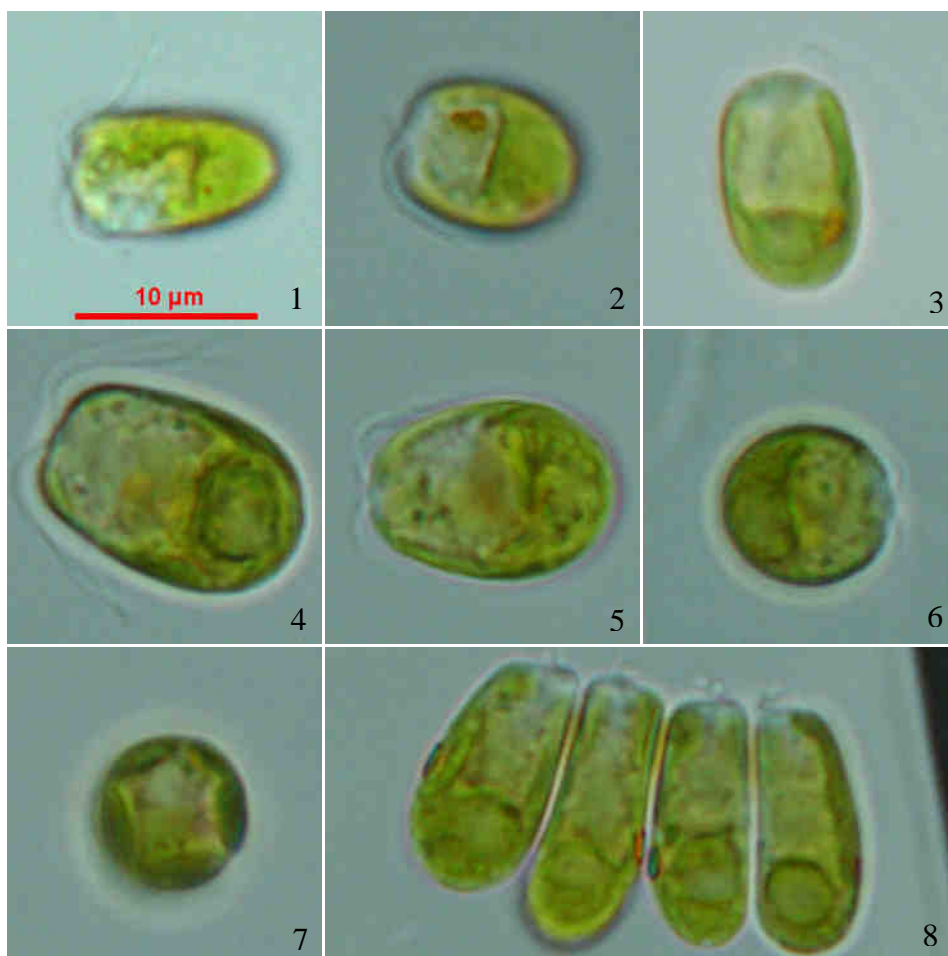
Fig. 6: un pirenoide que casi ocupa 1/2 de la longitud en una célula redondeada.

Fig. 7: vista apical de una célula en la que se pueden apreciar claramente los 4 lóbulos de su cloroplasto.

Fig. 8: colonia de 4 células. La primera de la derecha tiene un pirenoide redondeado. 2 de los 3 estigmas amarillos apreciables se ven en otro color al estar fuera de foco. Todas las células excepto la segunda comenzando por la izquierda cuentan con vesículas conspicuas en su extremo posterior.

Todas las figuras a 1000X y con la misma escala que la Fig. 1. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA18.

LÁMINA 20



4.3.6. *Chlamydomonas* Ehrenberg

En la más reciente de las revisiones de este género se enmendó la diagnosis del mismo para introducir en él a las clorofitas biflageladas que reúnen las siguientes características, entre otras (Pröschold *et al.* 2001): **(1)** los cuerpos basales flagelares orientados en el sentido de las agujas del reloj; **(2)** pared celular estrecha, con o sin papilla (abultamiento de la pared en la zona de inserción flagelar); **(3)** un único cloroplasto en forma de taza sin incisiones, lóbulos ni perforaciones; **(4)** un único pirenóide basal y un estigma anterior; **(5)** 2 vacuolas contráctiles apicales y un núcleo ligeramente anterior; **(6)** reproducción sexual mediante falsa división transversal que se da con rotación de 90° del protoplasma de la célula madre antes de la primera división; y **(7)** reproducción sexual por isogamia.

Este género, cuya especie tipo es *C. reinhardtii*, usada como organismo modelo en multitud de trabajos sobre citología y fisiología (Harris 2001, Merchant *et al.* 2007), lo componen más de 600 especies y está sujeto a una extensa y profunda revisión taxonómica (Pröschold *et al.* 2001). Dicha revisión se está llevando a cabo desde hace más de una década con estudios filogenéticos que complementan y/o enmiendan la principal división del género llevada a cabo por Ettl (1983), mediante la cual se diferencian 9 subgéneros o secciones caracterizadas en base al número y posición de los pirenoides. Estos estudios filogenéticos incluyen tanto análisis bioquímicos como genéticos. Entre los primeros destaca la clasificación establecida por Schlösser (1984), en base a familias de autolisinas del esporangio, que son las enzimas encargadas de la lisis de la pared celular de las llamadas autoesporas o esporas que estas algas forman al dividirse varias veces dentro de la pared celular materna, y que sirven para la reproducción asexual. Esta clasificación diferenciaba 15 grupos distintos dentro de *Chlamydomonas*. Grupos que a la postre, y en base a subsiguientes análisis genéticos del 18S ARNr, se ha demostrado que al menos algunos de ellos no son monofiléticos, o que incluso estaban compuestos por lo que finalmente resultaron ser distintas cepas de la misma especie (Buchheim *et al.* 1996, Buchheim *et al.* 1997). Por su parte y mediante el mismo tipo de análisis genéticos, quedó demostrado que el género *Chlamydomonas* no era monofilético (Buchheim *et al.* 1996), y más tarde varias de sus especies han sido transferidas a los géneros *Chloromonas*, *Lobochlamys* y *Oogamochlamys* (Pröschold *et*

al. 2001). En cualquier caso parece que aún queda un trabajo muy extenso de revisión en este género.

En cuanto a su distribución puede decirse de *Chlamydomonas* que es un género ubicuista (Pröschold *et al.* 2001), puesto que tiene representantes tanto de aguas dulces, como salobres y marinas (Butcher 1959, Ettl 1983), y además algunas especies son capaces de vivir tanto en la nieve y el hielo, incluso en el Ártico (Gradinger & Nürnberg 1996, Kviderová 2010), como en distintos suelos (Lund 1947) o en ambientes acuáticos termoacídicos tan extremos como manantiales de volcán (Pollio *et al.* 2005).

En el presente estudio se han logrado aislar y analizar 7 cepas que parecen pertenecer a este género, o cuando menos al complejo *Chlamydomonas-Chloromonas-Lobochlamys-Oogamochlamys*. En concreto, las cepas CGA20, CGA21, CGA22, CGA23, CGA24, CGA25 y CGA26. En cualquier caso, debido a la enorme variedad de especies que compone el género, la relativamente escasa literatura disponible para el autor en lo que a descripción de especies de *Chlamydomonas* se refiere, y el hecho de contar solamente con observaciones de microscopía óptica para la mayoría de las cepas, ha impedido clasificar estas especies más allá del nivel de género. La enorme cantidad de trabajo que supone su identificación precisa, en la que serían de gran ayuda el empleo de microscopía confocal, cortes citológicos análisis genéticos del 18S ARNr, para poder comparar las secuencias con las disponibles en las bases de datos públicas, hace que se presente aquí en fase inicial el trabajo de su identificación precisa, que se espera poder culminar en futuras investigaciones.

4.3.6.1. cf. *Chlamydomonas* sp. (CGA20)**- Características destacables:**

- **Aspecto general:** células biflageladas, isocontas y acrocontas con una forma, en vista amplia, más o menos esférica, elíptica, ovalada u ovada (Lám. 21, Figs. 1-3 y 5). Sin papila aparente (Lám. 21, Fig.16) al menos en la mayoría de las células, aunque algunas si parecen mostrarla (Lám. 21, Fig. 14).

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen una longitud de 6-8 μm , una anchura de 5-7 μm y unos flagelos 4-8 μm de largo (Tabla 4.21.).

Tabla 4.21.: principales dimensiones de la cepa CGA20 de cf. *Chlamydomonas* sp. 1. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=25) | Anchura (n=25) | Flagelos (n=21) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 6,53 | 5,60 | 5,82 |
| Rangos | 6-8 | 5-7 | 4-8 |
| Menor | 5,73 | 4,92 | 4,18 |
| Mayor | 8,05 | 6,62 | 8,12 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde lima brillante con ligeros tonos de amarillo y textura por lo general de rugosa a muy rugosa. Puede tener al menos hasta 6 lóbulos más o menos desarrollados que ocupan de menos de 1/3 a cerca de 1/2 de la longitud celular (Lám. 21, Figs 1, 5-7, 9-10 y 12-13). Algunas células no tienen lóbulos distinguibles, otras solo tienen 3, y otras 6 o puede que mas. Al menos en algunas células, el plasto parece estar compuesto como por una amalgama de vesículas, incluso en cultivos bastante jóvenes, que dan señal de fluorescencia roja.

- **Estigma:** 1, rara vez 2, estigmas de color amarillo, situados en los lóbulos del cloroplasto o en su defecto en la parte anterior de éste (Lám. 21, Figs. 1-6, 8-9, 11-12 y 14).

-
- **Pirenoide:** un único pirenoide situado en la parte posterior de la célula con forma redondeada, elíptica u ovalada. Su posición parece ser central aunque en algunas células aparece algo ladeado. Puede llegar a ocupar desde algo menos de 1/4 hasta cerca de 1/2 de la longitud total de la célula (Lám. 21, Figs. 2-5 y 14). La cubierta pirenoidal parece estar formada por un par de gránulos abovedados o en forma de taza (Lám. 21, Fig. 3).

 - **División celular:** tiene lugar dentro de la pared celular de la célula madre, y, en apariencia, con una rotación de unos 90° del citoplasma de ésta, dando como resultado 2-4 células hijas (Lám. 21, Figs. 11 y 15), que tras la eclosión de la pared aún permanecen por algún tiempo unidas hasta que concluye la citocinesis.

 - **Movimiento:** tramos más o menos rectos avanzando mientras rotan alrededor de su eje longitudinal. Pueden girar describiendo estrechos círculos alrededor de un punto o avanzar lentamente haciendo tirabuzones mientras también rotan sobre su eje longitudinal, o sin esta última rotación.

 - **Otras características destacables:**
 - Algunas células tienen 2 posibles vacuolas o gotas lipídicas cerca del pirenoide, hacia la parte anterior de la célula, cerca de donde comienza la lobulación del plasto o, en otros casos cerca de la inserción flagelar, (Lám. 21, Fig. 14).

 - **Especie propuesta:** en base al cloroplasto que en ocasiones parece estar formado por vesículas hace suponer que pudiera ser del tipo asteroideo, con lo que esta especie podría adscribirse al género *Chloromonas* (Pröschold *et al.* 2001).

LÁMINA 21

Fig. 1: célula ovada en la que no se diferencian los lóbulos del cloroplasto, al igual que en las Figs. 2-3 y 14, pero se puede apreciar claramente una gruesa pared celular, igual que en las Figs. 3 y 14.

Fig. 2: una célula ovalada con un estigma y un pequeño pirenoide.

Fig. 3: 2 estigmas y una cubierta pirenoidal aparentemente compuesta por 2 grandes gránulos abovedados en una célula redondeada.

Fig. 4: célula en la que se puede apreciar un pequeño pirenoide ladeado. Nótese la marcada rugosidad del plasto.

Fig. 5: célula con forma de elipse en la que se observan unos lóbulos del cloroplasto que se extienden de manera conspicua hasta ocupar 2/3 de su longitud total.

Figs. 6-7, 9-10 y 12-13: vistas apicales de células (izquierda) y señal de la autofluorescencia de sus plastos (derecha) que muestran diferentes patrones de lobulación: de 3 lóbulos (Figs. 6 y 7), de 5 o, probablemente, 6 (Figs. 9 y 10) y de 6 o 7, aunque la señal de fluorescencia parece indicar 3 (Figs 12 y 13).

Fig. 8: células con amplios pirenoides que llegan a ocupar hasta casi 1/2 de su longitud total.

Fig. 11: un par de células recién divididas que aún se mantiene dentro de la pared materna.

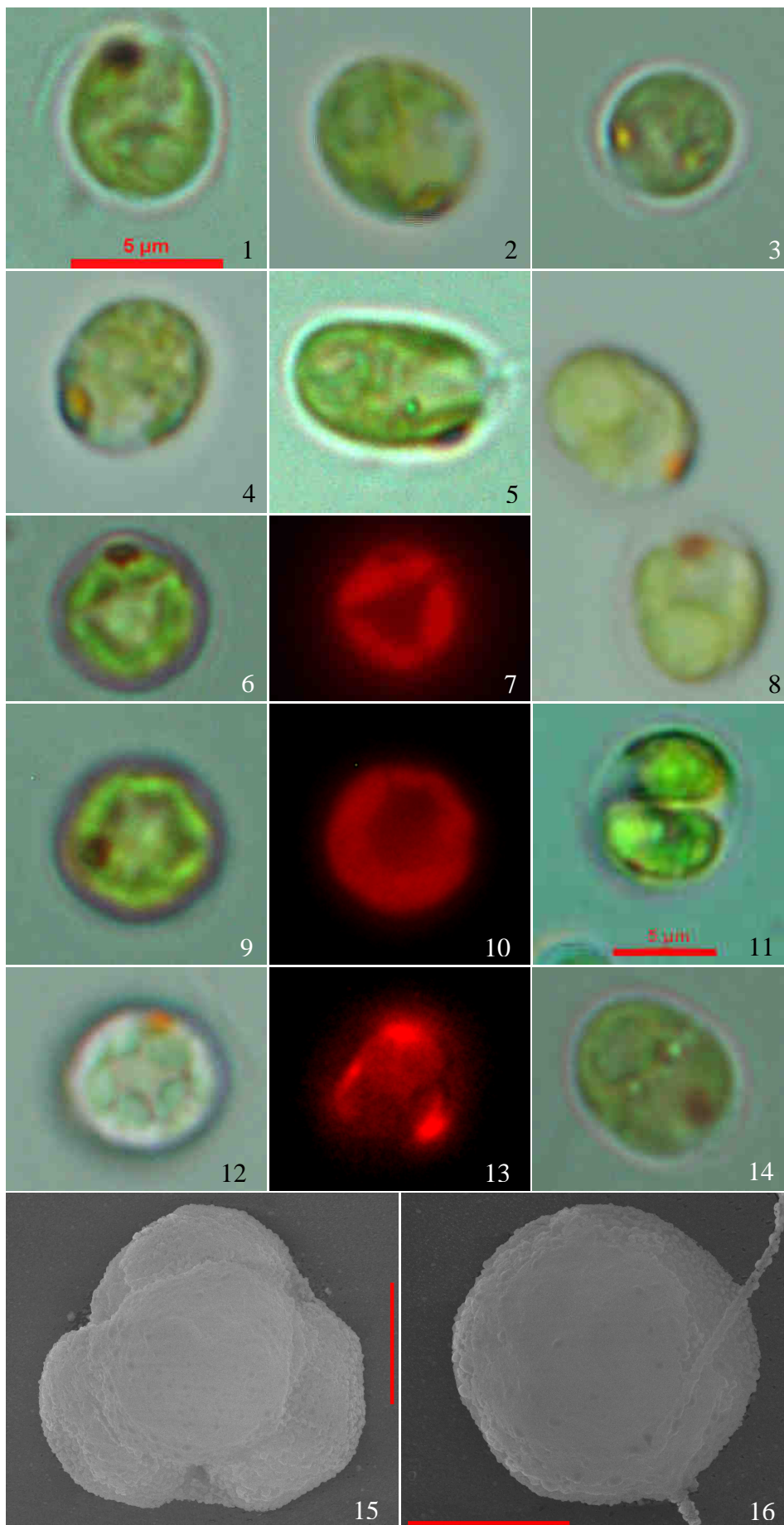
Fig. 14: célula en la que se aprecian 2 gránulos o gotas lipídicas en la parte central y una posible papila en el extremo anterior.

Fig. 15: 4 células en división aún dentro de la pared materna. Barra de escala = 2 μ m.

Fig. 16: vista cercana a la apical de una célula en la que se aprecia la carencia de papila en la zona de inserción flagelar. Barra de escala = 2 μ m.

Figs. 1-14 obtenidas a 1000X, excepto la Fig. 11 que fue obtenida a 400X. Figs. 7, 10 y 13 obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia y Figs. 15-16 mediante SEM. Figs. 1-10 y 12-14 con la escala de la Fig. 1. Todas las Figs. corresponden a la cepa CGA20.

LÁMINA 21



4.3.6.2. cf. *Chlamydomonas* sp. (CGA21)**- Características destacables:**

- **Aspecto general:** células biflageladas, acrocontas e isocontas. En vista amplia, las células tienen forma ovoide, ovalada o elíptica y algunas incluso algo obovada (Lám. 22, Figs. 1-4). Al menos en algunas células, los flagelos se insertan, de manera subterminal, en una pequeña aunque bien visible protuberancia anterior o papilla (Lám. 22, Figs. 3-4).

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen una longitud de 6-8 μm , una anchura de 5-7 μm y unos flagelos 4-8 μm de largo (Tabla 4.22.).

Tabla 4.22.: principales dimensiones de la cepa CGA21 de cf. *Chlamydomonas* sp. 2. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=19) | Anchura (n=19) | Flagelos (n=21) |
|---------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 6,77 | 5,88 | 5,96 |
| Rangos | 5-8 | 5-7 | 4-8 |
| Menor | 5,55 | 4,93 | 4,38 |
| Mayor | 8,28 | 7,41 | 7,92 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde lima con tonos de amarillo y textura por lo general rugosa. En algunas células, quizás decadentes, es rugoso hasta tal punto que parece estar compuesto por vesículas (Lám. 22, Figs. 7-8). Por lo general tiene 4 lóbulos que se extienden siendo conspicuamente distigibles alrededor de 1/3-3/4 de la longitud total de la célula (Lám. 22, Figs. 5-6). Algunas células, que quizás estén comenzando la división, parecen contar con más de 4 lóbulos difícilmente distinguibles entre ellos.

- **Estigma:** un único estigma de color amarillo situado en uno de los lóbulos del cloroplasto hacia la mitad o la parte anterior de la célula (Lám. 22, Figs. 1-5, 7 y 9-11), y que al verlo desenfocado su color tiende hacia el rojo.

-
- **Pirenoide:** un único pirenoide redondeado o algo ovalado, con forma más o menos irregular, y que puede llegar a abarcar entre 1/3 y casi 1/2 de la longitud celular. Está situado en posición basal-central y parece tener una cubierta compuesta por un número variable de gránulos: desde 2 placas en forma cúpula o taza, a 4 o más (Lám. 22, Figs. 1, 4-5, 9 y 10).

 - **División celular:** tiene lugar dentro de la pared celular de la célula madre, y en apariencia, con una rotación de ésta de 90° dentro de su propia pared, dando como resultado 2 células hijas (Lám. 22, Fig.11), que después de la eclosión aun permanecen unidas, por la parte posterior durante un tiempo.

 - **Movimiento:** el movimiento es relativamente lento (pocos cuerpos celulares por segundo) intercalando algunos tramos más o menos rectos con cambios de dirección realizados describiendo amplias curvas. El avance va acompañado de rotación en torno al eje longitudinal de la célula y en ocasiones avanzan realizando tirabuzones al mismo tiempo. Las células también pueden rotar en torno a su parte posterior, incluso vertiginosamente, tras detenerse en un punto.

 - **Otras características destacables:**
 - En algunas células pueden apreciarse como mínimo 2 y posiblemente hasta 4, gránulos o vacuolas cerca del pirenoide, en el espacio citoplasmático que queda entre los lóbulos del cloroplasto, cerca de donde comienza la lobulación de éste, o algo más hacia la parte anterior (Lám. 22, Fig. 10, y entrevistas en prácticamente el resto de figuras excepto las de epifluorescencia).

 - **Especie propuesta:** al igual que en la cepa CGA20, en este caso la posibilidad de que el plasto sea del tipo asteroideo es indicativo de que podría tratarse de una especie perteneciente al género *Chloromonas* (Pröschold *et al.* 2001), aunque se carece de evidencias suficientes para afirmarlo con seguridad.

LÁMINA 22

Fig. 1: célula ovada con pirenoide elíptico con una cubierta compuesta, en apariencia, por un par de grandes gránulos alargados o placas en forma de cúpula. Nótese el estigma amarillo que parece rojizo fuera de foco. El recuadro muestra una ampliación (1,5X) del pirenoide.

Fig. 2: una célula elíptica con estigma desenfocado, grandes lóbulos que alcanzan 2/3 de su longitud y un pirenoide redondeado cuya cubierta puede apreciarse mejor en la Fíg. 9.

Fig. 3: estigma amarillo y la papila anterior en la que se insertan los flagelos en una célula ovalada.

Fig. 4: célula obovada con papila y pirenoide redondeado con cubierta de 2 gránulos en forma de cúpula. El recuadro muestra una ampliación (1,5X) del pirenoide.

Figs. 5-6: vista apical en la que se observan los 4 lóbulos del cloroplasto de una célula y su pirenoide en posición central (Fig. 5) y señal de autofluorescencia de la misma (Fig. 6).

Figs. 7-8: célula con cloroplasto muy rugoso, casi como vesiculoso (Fig. 7) y señal de autofluorescencia de la misma (Fig. 8)

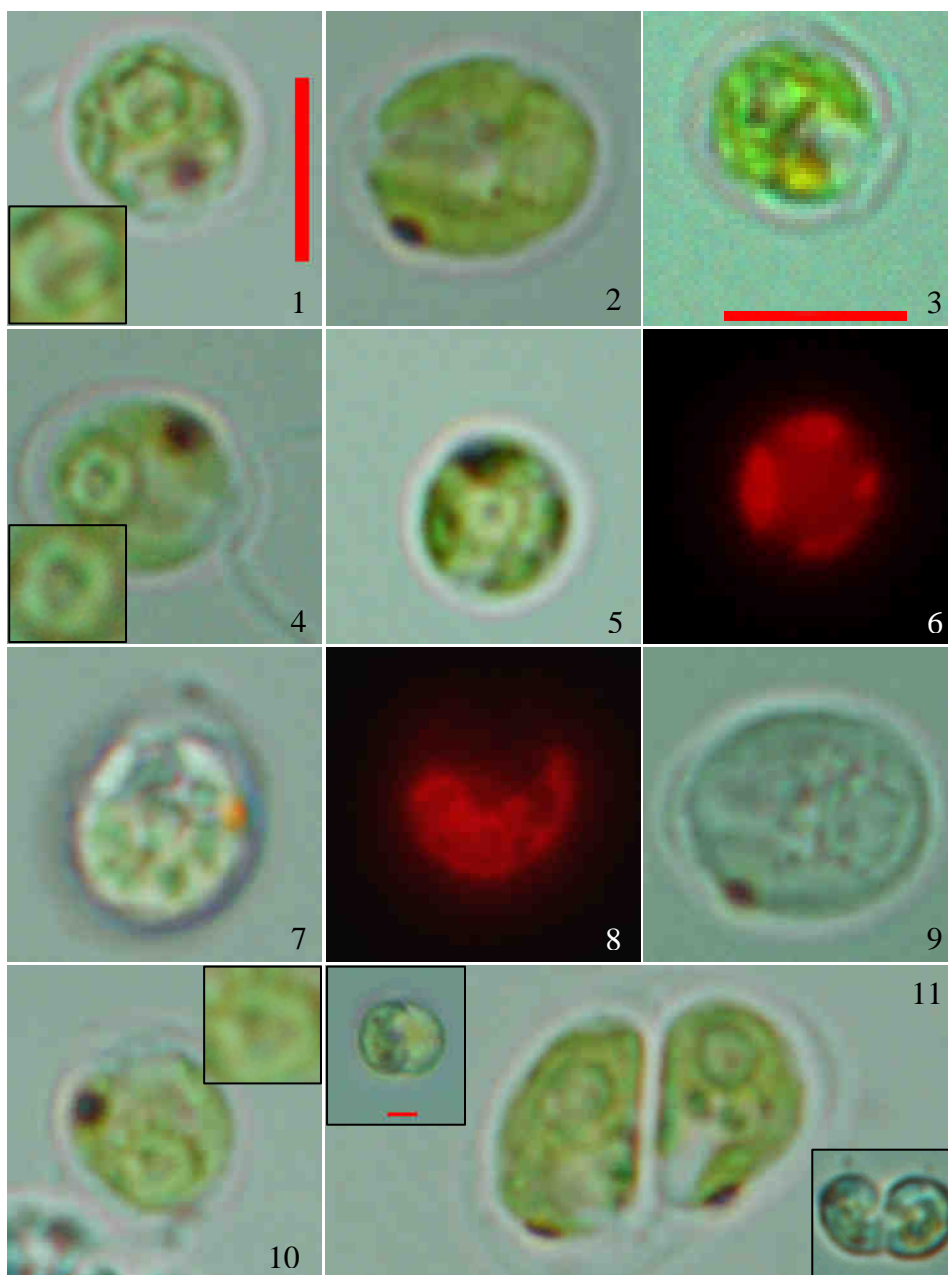
Fig. 9: la misma célula que en la Fig. 2 habiendo perdido el color verde de las clorofilas tras su observación mediante microscopía de epifluorescencia. Nótese el pirenoide redondeado y su cubierta compuesta de más de 2 placas.

Fig. 10: célula ligeramente obovada en la que junto al pirenoide con cubierta de varios gránulos se observan 3, puede que 4 gránulos, en el citoplasma que queda entre los lóbulos del cloroplasto. El recuadro muestra una ampliación (1,5X) de la zona del pirenoide.

Fig.11: células en división: el recuadro de la izquierda, muestra una fase inicial en la que apenas se diferencian las células hijas dentro de la pared materna, la imagen central muestra una fase intermedia, previa a la eclosión en la que las células hijas, claramente diferenciadas, cuentan con pirenoides y estigmas propios; el recuadro de la derecha corresponde a una fase posteclosión en la que las células hijas, con los flagelos ya desarrollados, aún se mantienen unidas por la parte posterior donde todavía no ha culminado la citocinesis.

Todas las figuras obtenidas a 1000X y Figs. 6 y 8 mediante microscopía de epifluorescencia. Todas las figuras excepto la Fig.3 y los recuadros de la Fig. 11, con la misma escala que la Fig. 1. Barras de escala = 5 µm, excepto en el recuadro de la izquierda de la Fig. 11 en el que es de 2 µm. Todas las figuras corresponden a la cepa CGA21.

LÁMINA 22



4.3.6.3. cf. *Chlamydomonas* sp. (CGA22)**- Características destacables:**

- **Aspecto general:** células biflageladas, acrocontas e isocontas, con una forma en vista amplia por lo general elíptica, pero que en algunos casos puede ser redondeada, ovalada o ligeramente ovada u ovovada (Lám. 23, Figs.1-3). Tienen una pared bastante gruesa y conspicua que al microscopio electrónico de barrido muestra una superficie arrugada o plegada y en la que a menudo puede observarse en su extremo anterior un abultamiento o papila, en cuya base se insertan los flagelos (Lám. 23, Figs. 3-4; Lám. 24, Figs. 4-5).

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen una longitud de 10-16 μm y una anchura de 8-14 μm , con unos flagelos de 10-18 μm de longitud (Tabla 4.23.).

Tabla 4.23.: principales dimensiones de la cepa CGA22 de cf. *Chlamydomonas* sp. 3. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=29) | Anchura (n=31) | Flagelos (n=28) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 13,10 | 10,67 | 14,74 |
| Rangos | 10-16 | 8-14 | 10-18 |
| Menor | 10,18 | 8,02 | 10,05 |
| Mayor | 15,86 | 13,51 | 18,48 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto verde brillante, casi lima, con tonos de amarillo y textura rugosa. Probisto, en apariencia, de 6 lóbulos, que se extienden paralelos a la membrana celular, siendo conspicuamente diferenciables desde algo más de 1/3 a algo menos de 2/3 de la longitud celular (Lám. 23, Figs 4-6).

- **Estigma:** un único estigma pardo-anaranjado, grande, vistoso y con forma de alubia o cilíndrica. Puede llegar a medir casi hasta 1/4 la longitud de la célula y está situado en el exterior de uno de los lóbulos del cloroplasto (Lám. 23, Figs. 1-5 y 7- 10; Lám. 24, Figs. 1-2).

-
- **Pirenoide:** un único pirenoide redondeado, elíptico u ovalado, que puede llegar a extenderse desde algo menos de 1/3 a 1/2 de la longitud celular (Lám. 23, Figs. 1-3; Lám. 24, Figs. 1-2). Por lo general tiene una posición basal central aunque en algunas células puede aparecer algo parietal (Lám. 23, Figs. 2-3). El pirenoide tiene una cubierta compuesta de varios gránulos con sección rectangular con los extremos redondeados (Lám. 23, Fig. 1).

 - **División celular:** La división celular tiene lugar dentro de la pared materna, comienza aparentemente como una división transversal real pero como resultado final da al menos 2 células hijas que han rotado 90° respecto a la situación de la célula madre dentro de la pared de ésta (Lám. 23, Figs. 8-10).

 - **Movimiento:** tramos más o menos rectos, intercalados con paradas para cambios de dirección importantes (>90°) para los que suelen girar sobre si mismas, incluso varias veces. Pueden realizar cambios de dirección importantes sin detener el avance y describiendo curvas muy amplias. Los avances se dan con rotación de la célula en torno a su eje longitudinal y a veces realizan tramos de poco desplazamiento con constantes paradas y cambios de dirección.

 - **Otras características destacables:**
 - En algunas células se han observado 2 ó más vacuolas, gránulos o gotas lipídicas alojadas entre los lóbulos del cloroplasto (Lám. 24, Fig. 3).

 - **Especie propuesta:** en base a las lobulaciones obserbadas en el plasto podría tratarse de una especie perteneciente al género *Lobochlamys* (Pröschold *et al.* 2001), aunque se carece de observaciones suficientes para afirmarlo con seguridad y no se ha detectado mucilago alguno cubriendo la pared celular, característica típica de dicho género.

LÁMINA 23

Fig. 1: una célula elíptica con un pirenoide de la misma forma, en posición basal y central, en el que se pueden apreciar claramente los gránulos que forman la cubierta pirenoidal.

Fig. 2: célula ovada con un gran estigma cilíndrico y un pirenoide redondeado en posición algo parietal.

Fig. 3: pueden verse, cada una con su respectivo estigma y pirenoide, algo parietal en algunas: 3 células redondeadas, a la derecha, quizás recién eclosionadas de la pared celular materna; y a la izquierda, una célula ligeramente obovada en la que puede apreciarse lo que parece una papila en el extremo anterior.

Fig. 4: célula en la que los lóbulos del cloroplasto llegan a ocupar cerca de 2/3 de su longitud total. Nótese la papila en el extremo anterior

Fig. 5: vista apical de una célula en la que se intuyen 6 lóbulos del cloroplasto, siendo portador, uno de ellos, del estigma.

Fig. 6: perspectiva apical de una célula en la que se aprecian claramente los 6 lóbulos del cloroplasto.

Fig. 7: célula con un estigma en forma de alubia y color pardo.

Figs. 8-10: distintas fases de la división celular. De izquierda a derecha: fase inicial con alargamiento de la célula madre y sin rotación aparente del citoplasma (Fig. 8), en la que ya se pueden intuir 2 estigmas (zonas marrones); comienzo de la citocinesis sin aparente rotación del citoplasma como puede verse por la orientación de los lóbulos del cloroplasto (Fig. 9); fase final de la citocinesis, en la que el citoplasma de las células hijas parece haber rotado cerca de 90° respecto al de la madre.

Todas las figuras obtenidas a 1000X y Fig. 6 mediante microscopía de epifluorescencia. Todas las Figs. con la misma escala que la Fig. 1 y correspondientes a la cepa CGA22.

LÁMINA 23

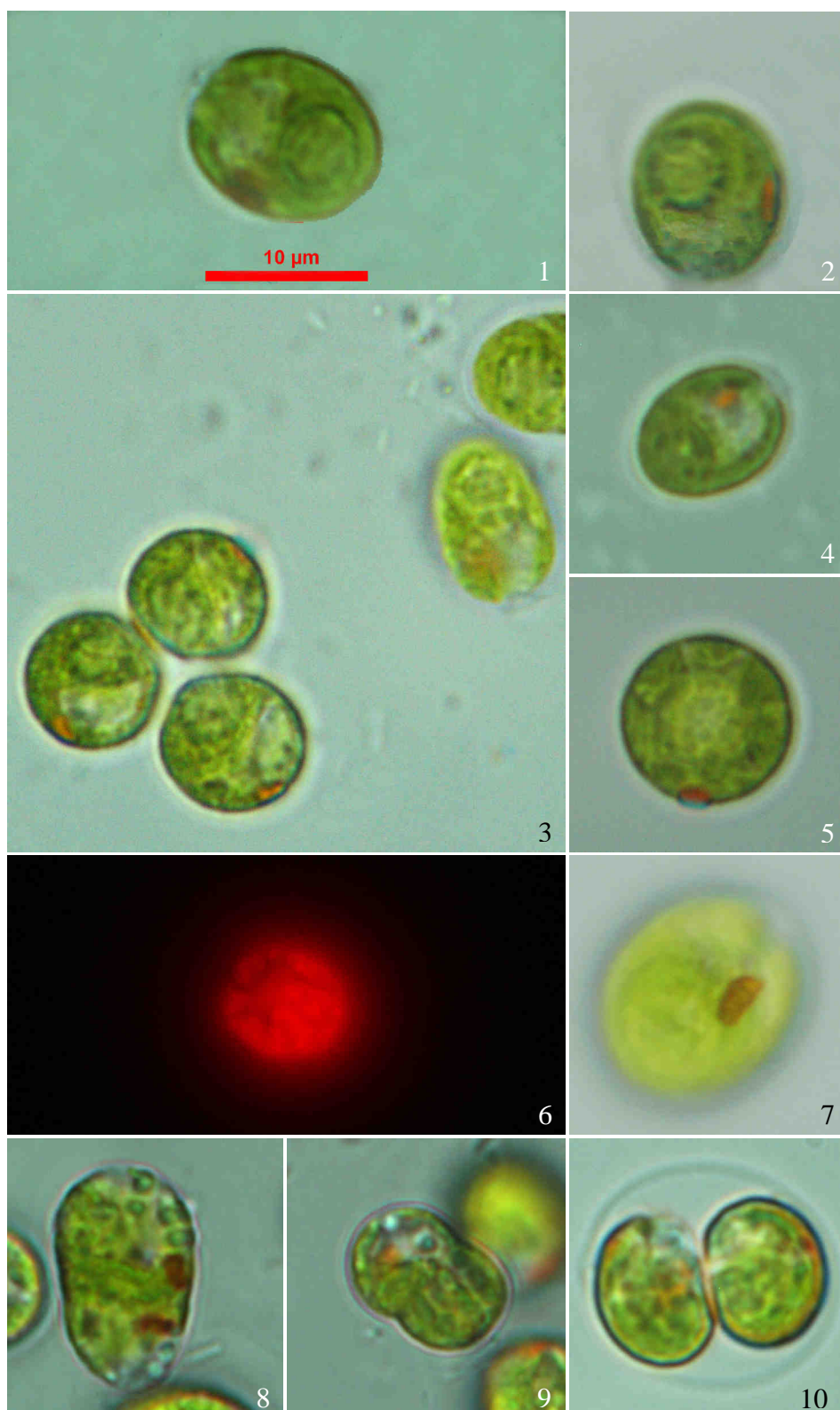


LÁMINA 24

Fig. 1: vista antiapical de una célula en la que se aprecia la situación basal y central de su pirenoide.

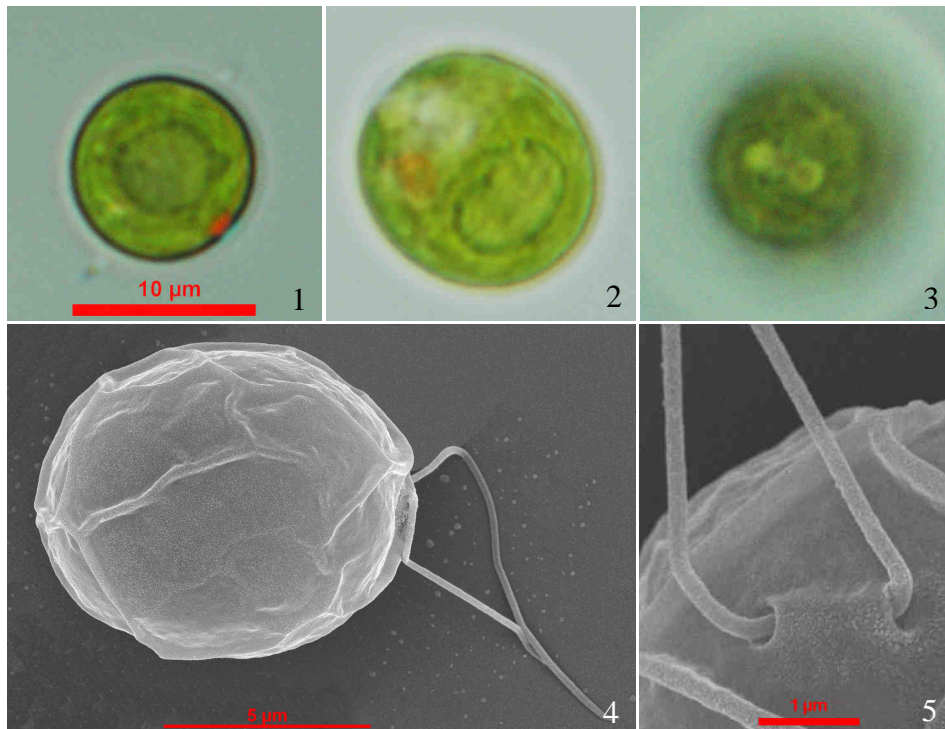
Fig. 2: célula elíptica con un amplio pirenoide ovalado.

Fig. 3: vista apical de una célula en la que se aprecian 2 posibles vacuolas, gránulos o gotas lipídicas.

Fig. 4: célula en la que pueden apreciarse pliegues en la pared celular y una pequeña papila en su parte anterior.

Fig. 5: detalle de la zona de inserción de los flagelos de una célula, que se limita a un par de pequeñas perforaciones en la base de la papila.

Figs. 1-3 obtenidas a 1000X y Figs. 4-5 mediante SEM. Figs. 1-3 con la escala de la Fig. 1. Todas la Figs. corresponden a la cepa CGA22.

LÁMINA 24

4.3.6.4. cf. *Chlamydomonas* sp. (CGA23)**- Características destacables:**

- **Aspecto general:** células biflageladas, acrocontas e isocontas, de ovadas a elípticas en vista amplia (Lám. 25, Figs. 1-4), mientras que en vista estrecha son casi plano-convexas pudiendo apreciarse una diferenciación dorsoventral. La cara plana se considera en este estudio como la ventral y en el mismo plano, pero al lado contrario de la célula tendríamos la cara convexa, considerada aquí como la dorsal. En cualquier caso en vista estrecha son casi lanceoladas debido a que la asimetría es pequeña.

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen 9-15 μm de longitud por 6-10 μm de anchura. Sus flagelos miden de 10-17 μm de longitud (Tabla 4.24.).

Tabla 4.24.: principales dimensiones de la cepa CGA23 de cf. *Chlamydomonas* sp. 4. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=28) | Anchura (n=28) | Flagelos (n=20) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 11,38 | 7,78 | 14,24 |
| Rangos | 9-15 | 6-10 | 10-17 |
| Menor | 8,86 | 5,6 | 10,33 |
| Mayor | 14,87 | 9,81 | 16,52 |

- **Cloroplasto:** de color verde brillante con tonos de amarillo y textura escasamente rugosa. A falta de confirmación mediante el microscopio de fluorescencia confocal o mediante cortes citológicos, el plasto parece tener forma de lámina ubicada en posición parietal rodeando la cara interna de la membrana celular, generalmente por la parte dorsal de la célula, y está provisto de 1-2 lóbulos, situados cerca del centro de la célula, que se extienden por los laterales hacia la cara ventral, en la que suele quedar un espacio libre de cloroplasto, con forma de canal. En el centro de la célula, rodeado casi en su totalidad por el cloroplasto, queda una isla citoplasmática, así como en la parte

anterior o apical de la célula y en la posterior o antiapical, donde a menudo no suele llegar el cloroplasto (Lám. 25, Figs. 1-4 y 7-8). Uno de los lóbulos mediales suele contener, al menos, algún pirenoide (Lám. 25, Figs. 7-8).

- **Estigma:** 1-3, de un color amarillo, muy conspicuos, llegando a alcanzar $1/3$ de la longitud celular. Tienen forma oblonga y con la misma curvatura que la pared celular. Aparecen posicionados, por lo general, en la parte posterior o medial de la célula, aunque en ocasiones pueden verse en la parte anterior. Pueden aparecer en laterales opuestos de la célula o en un mismo lado (Lám. 25, Figs. 1-4 y 6-7).

- **Pirenoide:** de 1-3, de tamaño variable pudiendo llegar a alcanzar casi $1/2$ de la longitud celular. En las células recién divididas o móviles a menudo solo 1, y más de 1 en las células en división o inmóviles. La naturaleza de la cubierta del pirenoide es difícil de determinar al microscopio óptico, de manera que en algunas células parece ser incompleta y estar compuesta por gránulos que aparecen en número y tamaño variables; mientras que en otras parece ser completa y tener puntualmente zonas de distinto grosor (Lám. 25, Figs. 1-3, 5 y 7).

- **División celular:** se da dentro de la pared celular materna, y, en apariencia, con una rotación del protoplasma de la célula madre de unos 90° , dando como resultado al menos 2, o incluso puede que más, células hijas (Lám. 25, Fig. 5).

- **Movimiento:** avances más o menos rectos rotando sobre el eje longitudinal de la célula, ya sea cubriendo tramos largos con curvas suaves o en tramos cortos. Entre tramo y tramo se detienen para girar alrededor de un punto hacia el que dirigen la inserción de los flagelos.

- **Otras características destacables:**

- En algunas células que no están en división la membrana celular aparece separada de la pared quedando un hueco, por lo general en la parte posterior de la célula (Lám. 25, Fig 6).

- En torno a las células en división es frecuente encontrar, a veces incluso con profusión, lo que parecen ser bacterias posiblemente adheridas a un mucilago que rodeara la pared de éstas (Lám. 25, Fig. 5).

- **Especie propuesta:** debido a la aparente lobulación del cloroplasto y al posible mucilago en torno a las células en división, este alga podría pertenecer al género *Lobochlamys* (Pröschold *et al.* 2001), pese a que en algunas células móviles se ha observado más de un pirenoide y no se han podido detectar indicios de mucilago sobre sus paredes. En cualquier caso, se carece de evidencias suficientes para afirmarlo con seguridad.

LÁMINA 25

Figs. 1-2: células en visión cercana a la ventral, mostrando las islas citoplasmáticas anteriores y posteriores y el número y tamaño variables de los pirenoides. Los pirenoides parecen tener en este caso una cubierta casi continua con zonas de distinto grosor.

Fig. 3: célula con pirenoides dotados de una cubierta de gránulos.

Fig. 4: célula con 2 estigmas en posición posterior.

Fig. 5: células dividiéndose dentro de la pared celular materna. Nótese cómo la de más a la izquierda esta recubierta por lo que parecen bacterias adheridas a su pared. En algunas células son apreciables gránulos alrededor del pirenoide mientras que en otras la cubierta parece casi continua.

Fig. 6: células con estigmas en la parte posterior en las que la pared celular aparece despegada de la membrana.

Figs. 7-8: vista ventral de 2 células en las que se distingue un lóbulo medial del plasto que contiene al menos un pirenoide. Este lóbulo, que va desde la parte dorsal hacia la ventral rodeando un lateral de la célula, en este caso el de arriba de las figuras, es difícilmente distinguible por microscopía óptica (Fig. 7) apreciándose mejor mediante epifluorescencia (Fig. 8). Nótese la posición anterior del estigma en la célula de la Fig. 7.

Todas las figuras obtenidas a 1000X y la Fig. 8 obtenida mediante epifluorescencia. Todas las Figs. con la escala de la Fig.1, excepto Figs. 7-8 que tienen la escala de la Fig 7. Todas las figuras corresponden a la cepa CGA23.

LÁMINA 25



4.3.6.5. cf. *Chlamydomonas* sp. (CGA24)**- Características destacables:**

- **Aspecto general:** células biflageladas, acrocontas e isocontas. Tienen forma elíptica tanto en vista amplia como estrecha, y un perfil circular en vista frontal (Lám. 26, Figs. 1-2, 4-5, y 7-8).

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen de 7-14 μm de longitud por 6-14 μm de anchura. Flagelos de 11-16 μm de longitud (Tabla 4.25.).

Tabla 4.25.: principales dimensiones de la cepa CGA24 de cf. *Chlamydomonas* sp. 5. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=21) | Anchura (n=31) | Flagelos (n=25) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 9,87 | 8,46 | 13,96 |
| Rangos | 7-14 | 6-14 | 11-16 |
| Menor | 7,17 | 6,09 | 10,83 |
| Mayor | 13,87 | 13,77 | 16,15 |

- **Cloroplasto:** tiene un color que combina distintos matices de verde, apagados y vivos, con tonos de amarillo y una textura más o menos rugosa. Algunas células parecen tener una lobulación profunda, con 2 lóbulos que se extienden hacia la parte frontal desde más o menos el centro de la célula, pero el citoplasma que queda entre los lóbulos tiene un color verde más claro que el del resto del plasto, lo que dificulta la apreciación de los lóbulos, de no ser usando microscopía de epifluorescencia, e incluso en este caso el espacio aparece con algo de rojo (fluorescencia de clorofilas). Este hecho hace suponer que realmente el cloroplasto sea en forma de taza y sin una lobulación distinguible (Lám. 26, Figs. 2-3, 5 y 7-8). El empleo de microscopía confocal podría aclarar si realmente se trata de un plasto lobulado o con forma de taza.

-
- **Estigma:** un único estigma amarillo. Aparece asociado a uno de los lóbulos por la parte anterior, o incluso media de la célula (Lám. 26, Figs. 1-2 y 6-8).

 - **Pirenoide:** un único pirenoide, con forma redondeada o elíptica en vista amplia, posicionado muy próximo al inicio de la posible lobulación del plasto, en situación medial, aunque en algunas células puede aparecer desplazado hacia un lateral. Puede llegar a ocupar hasta la mitad de la célula y tiene una cubierta cuya disposición es difícil determinar al microscopio óptico, puesto que algunas células parecen tener una cubierta de gránulos y otras una placa continua o casi, o incluso un par de grandes placas (Lám. 26, Figs. 2, 5 y 7-8).

 - **División celular:** tiene lugar dentro de la pared celular de la célula madre, y, en apariencia, con una rotación del protoplasma de ésta de unos 90° dentro de su pared, dando como resultado 2-4 células hijas (Lám. 26, Figs. 1 y 6).

 - **Movimiento:** tramos más o menos rectos y relativamente cortos intercalados con frecuentes paradas para cambios bruscos de dirección. En los tramos rectos no da la impresión de que nade rotando sobre su eje longitudinal.

 - **Otras características destacables:**
 - En algunas células pueden apreciarse un par de vacuolas, gránulos o gotas lipídicas en el espacio citoplasmático que queda entre los lóbulos, en el centro de la célula o cerca de los flagelos (Lám. 26, Fig. 4).

 - **Especie propuesta:** de confirmarse su morfología mediante microscopía confocal o cortes citológicos, el cloroplasto con forma de taza y sin lobulación, estriación, ni perforación alguna, y la presencia de un solo pirenoide, indicarían que nos encontramos ante una especie de *Chlamydomonas sensu stricto* (Pröschold *et al.* 2001).

LÁMINA 26

Figs. 1 y 6: células en división. En la Fig. 1 las células aún permanecen unidas tras la eclosión de la pared de la célula madre.

Figs. 2 y 3: muestran la misma célula en imagen de campo claro (Fig. 2) y de epifluorescencia (Fig. 3) permitiendo apreciar un plasto bilobado con el estigma amarillo en uno de sus lóbulos y un pirenoide elíptico central con una cubierta en apariencia casi continua, con una discontinuidad hacia la parte anterior de la célula.

Fig. 4: detalle de la inserción de los flagelos, que a diferencia de en el género *Dunaliella* se da en 2 puntos de la pared celular separados entre sí, y un par de vacuolas, gránulos o gotas lípidicas inmediatamente inferior a la inserción flagelar.

Figs. 5 y 7: células con pirenoide centrales redondeado (Fig. 5) y elíptico (Fig. 7) aparentemente cubiertos por gránulos, en el segundo caso el pirenoide abarca casi la mitad de la célula.

Fig. 8: un pirenoide excéntrico con posible cubierta de 2 grandes placas.

Todas las figuras obtenidas a 1000X y Fig. 7 obtenida mediante epifluorescencia. Figs. 1-6 con la escala de la Fig. 1 y Figs. 7-8 con la escala de la 7. Todas las figuras corresponden a la cepa CGA24.

LÁMINA 26



4.3.6.6. *Chlamydomonas cf. coccooides* (CGA25)

- Características destacables:

- **Aspecto general:** células biflageladas, isocontas y acrocontas, con una forma, en vista amplia, casi redonda, ovalada u ovada (Lám. 27, Figs. 1-5). En muchas células, sobre todo las de menor tamaño, la parte anterior termina afinándose y recorvándose hacia la posterior por la cara que consideraremos en este estudio como la ventral de la célula y forma como un pequeño pedúnculo, más o menos marcado, en cuyo extremo se insertan los flagelos de manera subterminal (Lám. 27, Fig. 6).

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen una longitud de 4-6 μm y una anchura de 3-6 μm . Sus flagelos tienen 4-7 μm de largo (Tabla 4.26.).

Tabla 4.26.: principales dimensiones de la cepa CGA25 cf. *Chlamydomonas* sp. 6. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=34) | Anchura (n=37) | Flagelos (n=24) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 5,02 | 4,38 | 5,07 |
| Rangos | 4-6 | 3-6 | 4-7 |
| Menor | 3,93 | 3,13 | 3,81 |
| Mayor | 6,25 | 5,63 | 6,61 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde brillante con ligeros tonos de amarillo y textura lisa o poco rugosa. Puede tener 2 lóbulos más o menos desarrollados que ocupen de menos de 1/3 a casi 1/2 de la longitud celular (Lám. 27, Figs. 2, 4 y 9). Algunas células no tienen lóbulos desarrollados y en éstas generalmente el plasto no llega a su extremo anterior (Lám. 27, Figs. 1, 3, 5 y 6).

- **Estigma:** 1-2 estigmas de color amarillo, situados en uno de los lóbulos del cloroplasto o en su defecto en la parte anterior de éste (Lám. 27, Figs. 3-4 y 7). Cuando aparecen 2 se encuentran localizados uno adyacente al otro.

- **Pirenoide:** un único pirenoide situado en la parte posterior de la célula con forma redondeada, elíptica u ovalada. El pirenoide es solo claramente visible desde la cara dorsal de la célula, y el hecho de que en células vistas en perspectiva aparezca algo descentrado indica una posible ubicación parietal (Lám. 27, Fig. 12). Puede llegar a ocupar desde algo menos de 1/4 hasta algo más de 1/3 de la longitud total de la célula (Lám. 27, Figs. 2, 4, 5 y 9). La cubierta pirenoidal parece estar compuesta por un número variable de gránulos, en número de 1-4 (Lám. 27, Figs. 10-12).

- **División celular:** tiene lugar dentro de la pared celular de la célula madre, en apariencia con una rotación del protoplasma de ésta de unos 90° dentro de su pared, dando como resultado 2 células hijas, que tras la eclosión de la pared aún permanecen por algún tiempo nadando unidas hasta que concluye la citocinesis (Lám. 27, Figs. 7-8).

- **Movimiento:** intercalan tramos más o menos rectos con otros con constantes cambios de dirección. Realizan paradas frecuentes para girar sobre si mismas o describiendo estrechos círculos alrededor de un punto. El avance de las células viene acompañado de rotación en torno a su eje longitudinal y los cambios de dirección importantes van a veces acompañados de frenazos y acelerones.

- **Otras características destacables:**

- En algunas células se aprecian 2 posibles vacuolas, gránulos o gotas lipídicas cerca del pirenoide o hacia la parte anterior de la célula (Lám. 27, Fig. 9).

- **Especie propuesta:** parece tratarse de la especie *Chlamydomonas coccoides* debido a su reducido tamaño, 4-6 µm x 3-6 µm, frente a 2,5-5 µm x 5 µm de la descripción original (Butcher 1959). La división celular dando 2 células hijas, la posición de estigma y pirenoide, y la parte anterior culminando en un apice señalan hacia la misma especie. Sin embargo, en la descripción original no se mencionan vacuolas y el plasto se describe como campanulado. Para poder afirmar con seguridad que se trata de esta

especie serían necesarios una observación más detallada al microscopio de epifluorescencia o al confocal, para conocer sin ninguna duda la morfología del cloroplasto, o cortes citológicos que valdrían, además de lo anterior, para esclarecer la naturaleza de las posibles vacuolas.

LÁMINA 27

Fig. 1: una célula casi redondeada con plasto sin lóbulos.

Fig. 2: célula redondeada con plasto lobulado y pirenoide redondeado.

Fig. 3: cloroplasto sin lobulación y con un estigma en la parte anterior en una célula ovalada.

Fig. 4: célula ovalada con lobulación, estigma en la parte anterior de uno de los lóbulos y pirenoide redondeado.

Fig. 5: célula ovada con plasto sin lóbulos y con un pequeño pirenoide.

Fig. 6: vista ventral de una célula en la que se puede apreciar el pedúnculo anterior donde se insertan los flagelos.

Fig. 7: células recién divididas que aún se encuentran dentro de la membrana de la célula madre.

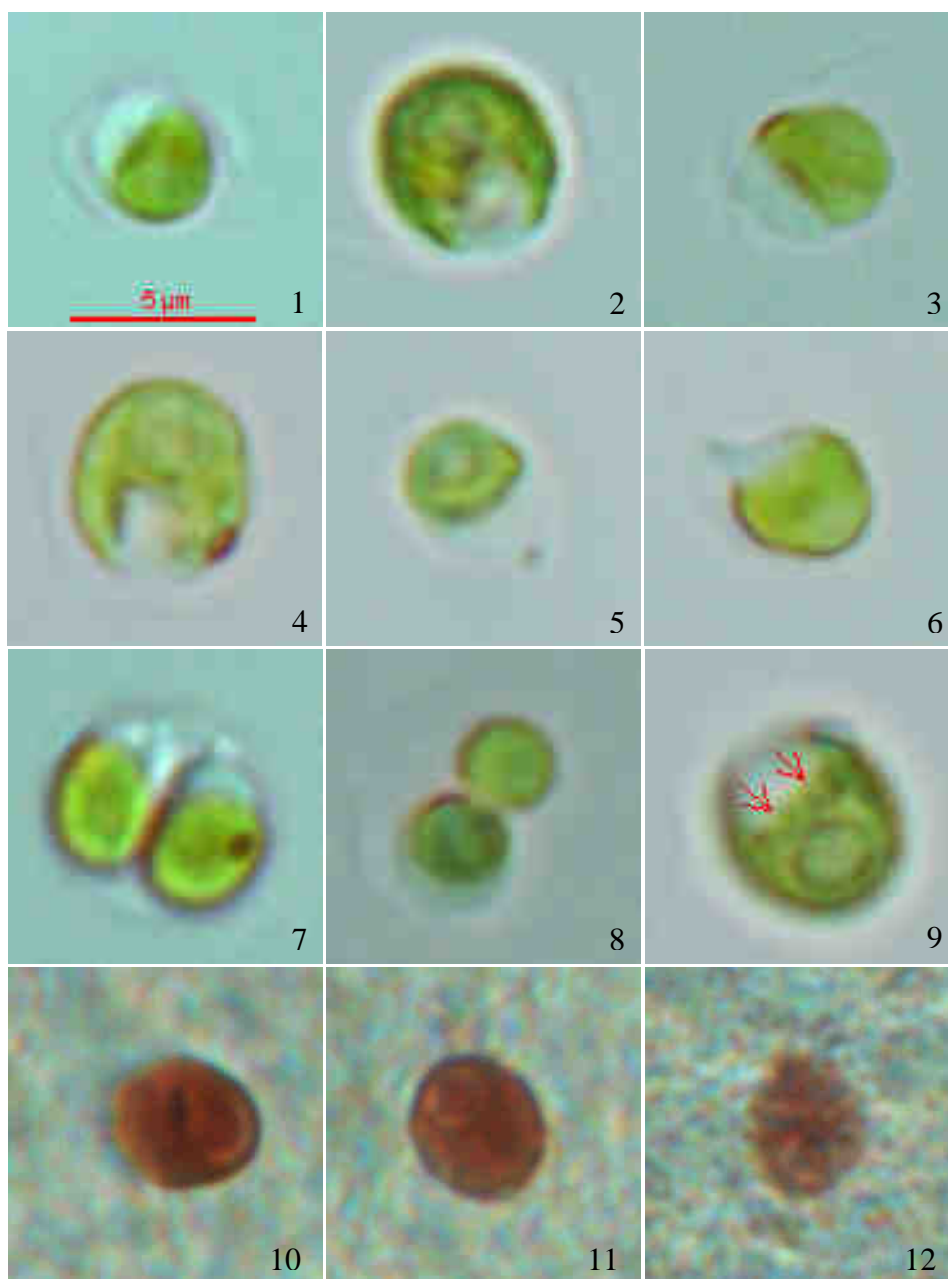
Fig. 8: vista antiapical de 2 células que tras la eclosión de la pared de la célula madre aún continúan nadando unidas.

Fig. 9: célula en la que se pueden observar un par de gránulos (flechas) cerca del gran pirenoide elíptico.

Figs. 10-12: células teñidas con azocarmín G en las que se pueden apreciar pirenoides con cubiertas compuestas en apariencia por un solo gránulo (Fig 10) y 4 (Fig. 11). En la Fig. 12 puede apreciarse una célula en ligera perspectiva en la que lo descentrado del pirenoide sugiere su localización parietal.

Todas las figuras obtenidas a 1000X y Figs. 10-12 mediante óptica de contraste de fases. Todas las Figs. con la escala de la Fig. 1 y correspondientes a la cepa CGA25.

LÁMINA 27



4.3.6.7. cf. *Chlamydomonas* sp. (CGA26)**- Características destacables:**

- **Aspecto general:** células biflageladas, acrocontas e isocontas, con formas en vista amplia, que van desde esféricas a ovaladas y ovadas. Algunas células pueden tener la parte anterior algo truncada o llegar a ser oblongas. No se ha apreciado papila alguna en la zona de inserción flagelar (Lám. 28, Figs. 1-3 y 6).

- **Dimensiones:** en vista amplia tienen una longitud de 5-7 μm y una anchura de 4-7 μm , con unos flagelos de 16-21 μm de longitud (Tabla 4.27).

Tabla 4.27.: principales dimensiones de la cepa CGA26 de *Chlamydomonas* sp 7. La unidad de medida es el μm para todas las dimensiones y parámetros indicados. Entre paréntesis se indica el número de medidas efectuadas.

| | Longitud (n=28) | Anchura (n=32) | Flagelos (n=33) |
|--------|-----------------|----------------|-----------------|
| Medias | 5,96 | 5,65 | 18,46 |
| Rangos | 5-7 | 4-7 | 16-21 |
| Menor | 4,62 | 4,33 | 15,55 |
| Mayor | 7,03 | 7,4 | 20,91 |

- **Cloroplasto:** un único cloroplasto de color verde oliva con tonos de amarillo y marrón y textura poco o nada rugosa, que proporciona a los cultivos densos un color marronáceo. El cloroplasto parece tener 2 lóbulos que pueden llegar a ocupar de 1/2-2/3 de la longitud celular completa (Lám. 28, Figs. 1-2 y 6). En algunas células los lóbulos no aparecen o están poco desarrollados y el cloroplasto no llega al extremo anterior de la célula (Lám. 28, Fig. 3). En otros casos en los que el cloroplasto llega hasta el final de la célula los lóbulos no se pueden distinguir o son difícilmente distinguibles (Lám. 28, Figs. 4-5 y 8-9).

- **Estigma:** 1-2 estigmas de color rojo o anaranjado que pueden encontrarse en la parte anterior o media de las células, no hallándose presentes en algunas (Lám. 28, Fig. 4).

-
- **Pirenoide:** un único pirenoide circular o elíptico que puede llegar a llenar desde cerca de 1/3 hasta 1/2 de la longitud total de la célula y ocupa una posición basal central o algo parietal (Lám. 28, Figs. 1 y 4-6). La cubierta del pirenoide parece estar compuesta por un número variable de gránulos pudiendo llegar a darle una forma más o menos poligonal (Lám. 28, Figs. 5 y 8).

 - **División celular:** tiene lugar dentro de la pared celular de la célula madre, y, en apariencia, con una rotación de su protoplasma de unos 90°. Una célula madre puede dar al menos hasta 4 células hijas que tras la eclosión pueden permanecer nadando unidas hasta finalizar la citocinesis (Lám. 28, Fig. 7).

 - **Movimiento:** tramos más o menos rectos que se intercalan unos con otros mediante cambios de dirección importantes para los que las células prácticamente se detienen. En ocasiones realizan giros alrededor de un punto ubicado tras el extremo antiapical de la célula.

 - **Otras características destacables:**
 - En muchas células se pueden observar al menos 2 posibles vacuolas, gránulos o gotas lipídicas en el citoplasma rodeado por los lóbulos del cloroplasto (Lám. 28, Figs. 5-6).

 - **Especie propuesta:** la aparente lobulación, que no es común a todas las células, podría ser causa de una observación en un plano más o menos interno de las células en las que se han conseguido distinguir 2 lóbulos, mientras que el plano de observación podría ser más superficial en el caso de las que apenas tendrían lóbulos desarrollados o no mostrarían lobulación alguna. Es por tanto necesaria una observación más detenida al microscopio óptico y de epifluorescencia, o incluso al confocal, para poder asegurar la pertenencia de esta cepa al género *Chlamydomonas sensu stricto* (Pröschold *et al.* 2001).

LÁMINA 28

Fig. 1: célula esférica con pirenoide basal central.

Fig. 2: célula elíptica más ancha que larga.

Fig. 3: célula con cloroplasto en el que no se aprecia lobulación y que no llega hasta el extremo anterior.

Fig. 4: 2 estigmas en la parte anterior de una célula en la que apenas se aprecia la lobulación.

Fig. 5: una célula en la que se aprecia claramente una cubierta pirenoidal de gránulos. Las flechas indican la posición de las posibles vacuolas, gránulos o gotas lipídicas.

Fig. 6: célula ovada con pirenoide elíptico ligeramente excéntrico. Nótese la ausencia de papila en la zona de inserción flagelar. Las flechas igual que en la Fig.5.

Fig. 7: células en división dentro de la pared materna.

Fig. 8: célula en la que puede observarse claramente la pared y un pirenoide con una cubierta compuesta por varios gránulos.

Fig. 9: señal de fluorescencia del cloroplasto de la célula de la Fig. 8 en la que se distinguen los 2 lóbulos.

Todas las figuras obtenidas a 1000X y Fig. 9 mediante microscopía de epifluorescencia. Todas las Figs. con la misma escala que la Fig. 1 y correspondientes a la cepa CGA26.

LÁMINA 28



CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES

Sobre los principales grupos de microalgas en la comunidad y la fracción picoplanctónica

1) El grupo principal de algas verdes en la zona exterior del estuario del Nervión es el de las clorofitas, siendo otros grupos como el de las euglenofitas de escasa relevancia en términos de abundancia relativa, tanto pigmentaria como celular.

2) La abundancia relativa de las clorofitas es mayor en la fracción picoplanctónica, en la que cabe destacar el papel predominante de las prasinofíceas sin prasinoxantina durante la primavera y el verano, y puntualmente también el de las clorofíceas.

3) A nivel de comunidad predominan las algas con fucoxantina tales como las diatomeas, principalmente, haptofitas y dictiocofíceas, seguidas en importancia por las algas con aloxantina, las criptofitas.

Sobre la interpretación de datos de citometría y epifluorescencia para la identificación y estimación de la abundancia del picoplancton

4) Se han observado lo que podrían ser poblaciones heteromórficas tanto para las picofitoeucariotas con ficoeritrina (PE) como para el género *Synechococcus*, lo que impide establecer una correspondencia absoluta entre el número de poblaciones observadas en las muestras analizadas mediante citometría y el número real de especies de estos taxones presentes en dichas muestras. Estas poblaciones heteromórficas podrían ser fruto de la presencia de distintas fases de un mismo ciclo vital, de diferentes ecotipos de un mismo taxón o el resultado de un proceso de adaptación cromática resultante del cultivo de las microalgas en laboratorio.

5) Se ha identificado mediante citometría de flujo una población celular que podría estar compuesta por algas del género *Prochlorococcus*, no observado

previamente en el estuario del Nervión. Su presencia queda por confirmar puesto que podría tratarse de una picroalga eucariota cuyas células hayan sufrido una alteración de sus propiedades ópticas debido al procesado de las muestras, según se desprende de observaciones realizadas sobre poblaciones en cultivo.

6) Las discrepancias observadas entre los recuentos de citometría y de epifluorescencia, con abundancias mucho menores para estos últimos, parecen ser debidas a la combinación de varios factores: (1) el tiempo de almacenamiento previo al procesado de las muestras; (2) el tiempo y las condiciones de almacenamiento tras el procesado; y (3) la subestimación en las muestras analizadas mediante epifluorescencia del picofitoplancton sin PE respecto al dotado con este pigmento.

Sobre la aplicación de la técnica TSA-FISH a la estimación de la abundancia del picoplancton

7) La técnica TSA-FISH empleada en este estudio presenta dificultad para la reproducibilidad de los recuentos realizados mediante microscopía, por lo que resulta recomendable el uso de la citometría de flujo, con umbrales de detección objetivos y dotados de mayor robustez estadística por la rapidez y fácil replicabilidad de sus análisis.

8) Se han observado deficiencias en la permeabilidad de cultivos de cf. *Nannochloris* y *Nannochloropsis* sp., por lo que parece necesario el empleo de una permeabilización extra, preferiblemente enzimática, para evitar la subestimación de grupos de microalgas que pudieran tener una importancia significativa en la comunidad.

9) El aumento de la concentración de SDS de 0,01% a 0,1% en los tampones de lavado e hibridación, ha permitido aumentar notablemente la relación señal/ruido. Sin embargo, la fluorescencia inespecífica detectada ha sido importante, lo que hace necesarias ulteriores optimizaciones del protocolo para facilitar la detección de las células marcadas específicamente.

10) Pese a las limitaciones que como técnica cuantitativa presenta tal y como ha sido aplicada en este estudio, esta variante de TSA-FISH es útil para generar caracterizaciones, al menos de una manera semicuantitativa, de las poblaciones picoplanctónicas.

11) Un protocolo de TSA-FISH para el recuento de fitoplancton que fuera lo más universal posible debería cumplir 3 premisas fundamentales: **(1)** realizar el recuento de muestras preferentemente mediante citometría de flujo; **(2)** ser capaz de minimizar al máximo la pérdida de células debida al tratamiento de las muestras; y **(3)** incluir el empleo de tratamiento enzimático para la permeabilización de células con pared. Así permitiría realizar de manera sencilla medidas cuantitativas, precisas y fiables, facilitando la continua monitorización de las poblaciones fitoplanctónicas.

Sobre la comunidad picofitoplanctónica del estuario del Nervión y la importancia relativa que las clorofitas tienen en ella

12) Entre las algas sin PE predominan los picoeucariotas, que durante el verano pueden llegar a alcanzar densidades de hasta $1,04 \cdot 10^8$ céls. \cdot l⁻¹, y entre las algas con PE lo hace el género *Synechococcus* con densidades de hasta $2,98 \cdot 10^7$ céls. \cdot l⁻¹.

13) Entre las picofitoeucariotas dominan las clorofitas, al menos durante los meses estivales, en los que llegan a suponer de media casi 2/3 de dicha comunidad. Entre éstas destaca el orden Mamiellales, al que pertenecen más de 2/3 de las clorofitas, y dentro de este orden el género *Micromonas* es el más importante llegando a ser algo más de la mitad de las Mamiellales. La importancia de estas algas es mayor hacia el exterior del estuario debido, posiblemente, a su carácter principalmente marino.

Sobre las especies nanoplanctónicas de algas verdes presentes en el estuario del Nervión y los alrededores

14) Se han aislado y/o analizado 26 cepas de algas verdes procedentes del estuario del Nervión o de otros estuarios cercanos. Estas cepas pertenecen al menos a 6

géneros y a 11 especies confirmadas: *Eutreptiella* (*E. eupharyngeae* y *E. gymnastica*), *Mamiella* (*M. gilva*), *Nephroselmis* (*N. pyriformis*), *Pyramimonas* (*P. orientalis*, *P. moestrupii*, *P. grossii*, *P. robusta* y *P. propulsa*), *Oltmannsiellopsis* (*O. unicellularis* y *O. viridis*) y cf. *Chlamydomonas* (7 cepas).

CAPÍTULO 6
REFERENCIAS

- Amann R. I., Binder B. J., Olson R. J., Chisholm S. W., Deveroux D. & Stahl D. A. 1990a.** Combination of 16S rRNA oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56 (6)**: 1919-1925.
- Amann R. I., Ludwig W. & Schleifer K.-H. 1995.** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59 (1)**: 143-169.
- Amann R. I., Krumholz L. & Stahl D. A. 1990b.** Fluorescence oligonucleotide probes of whole cell for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, **172 (2)**: 762-770.
- Amann R. I., Stromley J., Deveroux R., Key R. & Stahl D. A. 1992a.** Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58 (2)**: 614-623.
- Amann R. I., Zarda B., Stahl D. A. & Schleifer K.-H. 1992b.** Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58 (9)**: 3007-3011.
- Anderson P. & Fenchel T. 1985.** Bacterivory by microheterotrophic flagellates in seawater samples. *Limnol. Oceanogr.*, **30 (1)**: 198-202.
- Ansotegui A., Sarobe A., Trigueros J. M., Urrutxurtu I. & Orive E. 2003.** Size distribution of algal pigments and phytoplankton assemblages in a coastal-estuarine environment: contribution of small eukaryotic algae. *J. Plankton Res.*, **25**: 341-355.
- Ansotegui A., Trigueros J. M. & Orive E. 2001.** The use of pigment signatures to assess phytoplankton assemblage structure in estuarine waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **52**: 689-703.
- Beardsley C., Moss S. M. & Azam F. 2008.** Effect of storage temperature on prokaryotic cell counts and community composition analysis from fixed and filtered seawater samples. *Helgol. Mar. Res.*, **62**: 123-127.
- Bec B., Hussein-Ratremma J., Collos Y., Souchu P. & Vaquer A. 2005.** Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *J. Plankton Res.*, **27 (9)**: 881-894.

- Becker D., Becker B., Satir P. & Melkonian M. 1990.** Isolation, purification and characterization of flagellar scales from the green flagellate *Tetraselmis striata* (Prasinophyceae). *Protoplasma*, **156**: 103-112.
- Becker B., Marin M. & Melkonian M. 1993.** Structure, composition, and biogenesis of prasinophyte cell coverings. *Protoplasma*, **181**: 233-244.
- Beech P. L., Heiman K. & Melkonian M. 1991.** Development of the flagellar apparatus during the cell cycle in unicellular algae. *Protoplasma*, **164**: 23-37.
- Belcher L. H. 1966.** *Prasinochloris sessilis* gen. et sp. nov., a coccoid member of the prasinophyceae, with some remarks upon cyst formation in *Pyramimonas*. *Br. Phycol. Bull.*, **3 (1)**: 43-51.
- Bell T. G. 2008.** A taxonomic study of *Nephroselmis* Stein (Prasinophyceae, Chlorophyta). Dissertation for the Degree of Master of Science from the University of Witwatersrand, Johannesburg (Sudáfrica). Disponible en <http://wiredspace.wits.ac.za/handle/10539/6969> a 30 de marzo de 2011.
- Belykh, O. I. & Sorokovikova, E. G. 2003.** Autotrophic picoplankton in Lake Baikal: abundance, dynamics, and distribution. *Aquat. Ecosist. Health.*, **6 (3)**: 251-261.
- Bergesch M., Odebrecht C. & Moestrup Ø. 2008.** Nanoflagellates from coastal waters of southern Brazil (32°S). *Bot. Mar.*, **51**: 35-50.
- Biegala I. C., Cuttle M., Mary I. & Zubkov M. 2005.** Hybridisation of picoeukaryotes by eubacterial probes is widespread in the marine environment. *Aquat. Microb. Ecol.*, **41**: 293-297.
- Biegala I. C., Kennaway G., Alverca E., Lennon J.-F., Vaultot D. & Simon N. 2002.** Identification of bacteria associated with dinoflagellates (Dinophyceae) *Alexandrium* spp. using tyramide signal amplification-fluorescent *in situ* hybridization and confocal microscopy. *J. Phycol.*, **38**: 404-411.
- Biegala I. C., Not F., Vaultot D. & Simon N. 2003.** Quantitative assessment of picoeucaryotes in the natural environment using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69 (9)**: 5519-5529.

- Brugerolle G. & Mignot J.-P. 2003.** The rhizoplast of chryomonads, a basal body–nucleus connector that polarises the dividing spindle. *Protoplasma*, **222**: 13-21.
- Buchheim M. A., Buchheim J. A. & Chapman R. L. 1997.** Phylogeny of the VLE-14 *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) group: a study of 18S rRNA gene sequences. *J. Phycol.*, **33 (3)**: 1024-1030.
- Buchheim M. A., Lemieaux C., Otis C., Gutell R. R., Chapman R. L. & Turmel M. 1996.** Phylogeny of the Chlamydomonadales (Chlorophyceae): a comparison of ribosomal RNA gene sequences from the nucleus and the chloroplast. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **5 (2)**: 391-402.
- Burger-Wiersma T., Veenhuis M., Korthals H. J., Van de Wiel C. C. M. & Mur L. R. 1986.** A new prokaryote containing chlorophylls *a* and *b*. *Nature*, **320**: 262-264.
- Butcher R. W. 1959.** An Introductory account of the smaller algae of british coastal waters. I. Introduction and Chlorophyceae. *Fish. Invest. Lond. Ser.*, **4 (1)**: 1-74.
- Butcher R. W. 1961.** An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. VIII. Euglenophyceae – Euglenineae. *Fish. Invest. Lond. Ser.*, **4 (8)**: 1-17.
- Butrón A., Iriarte A. & Madariaga I. 2009.** Size-fractionated phytoplankton biomass, primary production and respiration in the Nervión–Ibaizabal estuary: A comparison with other nearshore coastal and estuarine ecosystems from the Bay of Biscay. *Cont. Shelf Res.*, **29**:1088-1102.
- Campbell L., Landry M. R., Constantinou J., Nolla H. A., Brown S. L., Liu H. & Caron D. A. 1998.** Response of microbial community structure to environmental forcing in the Arabian Sea. *Deep-Sea Res. Pt. II*, **45**: 2301-2325.
- Campbell L., Liu H., Nolla H. A. & Vulot D. 1997.** Annual variability of phytoplankton and bacteria in the subtropical North Pacific Ocean at Station ALOHA during the 1991-1994 ENSO event. *Deep-Sea Res. Pt. I*, **44 (2)**: 167-192.
- Cavalier-Smith T. 1981.** Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*, **14**: 461-481.
- Cearreta A. 1991.** Geomorfología de la ría de Bilbao. En: *Maitrise d'Océanographie*. Université de Bordeaux I - Universidad del País Vasco, Leioa (Epaña). pp. 1-10.

- Cearreta A., Irabien M. J., Leorri E., Yusta I., Croudace I. W. & Cundy A. B. 2000.** Recent antropogenic impacts on the Bilbao estuary, Northern Spain: geochemical and microfaunal evidence. *Est. Coast. Shelf Sci.*, **50**: 571-592.
- Chihara M., Inouye I. & Takahata N. 1986.** *Oltmannsiellopsis*, a new genus of marine flagellate (Dunaliellaceae, Chlorophyceae). *Arch. Protistenkd.*, **132**: 313-324.
- Chisholm, S. W. 1992.** Phytoplankton size. En: *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. Falkowski P. G. & Woodhead A. D. (Eds.). Plenum Press, New York (EE.UU.). pp. 213-338.
- Chisholm S. W., Frankel S. L., Goericke R., Olson R. J., Palenik B., Waterbury J. B., West-Johnsrud L. & Zettler E. R. 1992.** *Prochlorococcus marinus* nov. gen. nov. sp.: an oxyphototrophic marine prokaryote containing divinyl chlorophyll *a* and *b*. *Arch. Microbiol.*, **157**: 297-300.
- Coleman A. W. 1983.** The use of fluorescence microscopy to study cell structure, nuclear ploidy, cell cycles and plastid DNA. En: *Proceedings of the Joint US-China Phycology Symposium*. Tseng C. K. (Ed.). Science Press, Beijing, China. pp. 291-310.
- Collier J. L. 2000.** Flow cytometry and the single cell in phycology. *J. Phycol.*, **36**: 628-644.
- Comte J., Jacquet S., Viboud S., Fontvieille D., Millery A., Paolini G. & Domaizon I. 2006.** Microbial community structure and dynamics in the largest natural french lake (lake Bourget). *Microbial Ecol.*, **52**: 72-89
- Da Cunha A. M. 1914.** Contribuição para o conhecimento da fauna de Protozoários do Brazil. II. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, **6**: 169-179.
- Daugbjerg N. 2000.** *Pyramimonas tychoireta*, sp. nov. (Prasinophyceae), a new marine species from Antarctica: light and electron microscopy of the motile stage and notes on growth rates. *J. Phycol.*, **36**: 160-171.
- Daugbjerg N. & Moestrup Ø. 1992a.** Fine structure of *Pyramimonas cyclotreta* sp. nov. (Prasinophyceae) from Northern Foxe Basin, Arctic Canada, with some observations on growth rates. *Eur. J. Protistol.*, **28**: 288-298.

- Daugbjerg N. & Moestrup Ø. 1992b.** Ultrastructure of *Pyramimonas cyrtoptera* sp. nov. (Prasinophyceae), a species with 16 flagella from Northern Foxe Basin, Arctic Canada, including observations on growth rates. *Can. J. Bot.*, **70**: 1259-1273.
- Daugbjerg N. & Moestrup Ø. 1993.** Four new species of *Pyramimonas* (Prasinophyceae) from Arctic Canada including a light and electron microscopic description of *Pyramimonas quadrifolia* sp. nov. *Eur. J. Phycol.*, **28**: 3-16.
- Daugbjerg N., Moestrup Ø. & Arctander P. 1994.** Phylogeny of the genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta) inferred from the *rbcL* gene. *J. Phycol.* **30**: 991-999.
- Díez B., Massana R. Estrada M. & Pedros-Alio C. 2004.** Distribution of eukaryotic picoplankton assemblages across hydrographic fronts in the Southern Ocean, studied by denaturing gradient gel electrophoresis. *Limnol. Oceanogr.*, **49** (4): 1022-1034.
- Díez B., Pedros-Alio C., Marsh T. L. & Massana R. 2001a.** Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (7): 2942-2951.
- Díez B., Pedros-Alio C. & Massana R. 2001b.** Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (7): 2932-2941.
- Edler L. & Elbrächter M. 2010.** The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. En: *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. IOC Manuals and Guides, no. 55.. Karlson B., Cusack C. & Bresnan E. (Eds.). UNESCO, Paris (Francia). pp. 13-20.
- Eker-Develi E., Jean-François Berthon J.-F. & Van Der Linde D. 2008.** Phytoplankton class determination by microscopic and HPLC-CHEMTAX analyses in the southern Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **359**: 69-87.
- Ettl H. 1983.** Chlorophyta I. Phytomonadina. En: Ettl H., Gerloff J., Heynig H, Mollenhauer D. (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Bd. 9. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (Alemania). 807 pp.
- Flärdh K., Cohen P. S. & Kjelleberg S. 1992.** Ribosomes exist in large excess over the apparent demand for protein synthesis during carbon starvation in marine *Vibrio* sp. Strain CCUG 15956. *J. Bacteriol.*, **174**: 6780-6788.

- Foulon E., Not Fabrice, Jalabert F., Cariou T., Massana R. & Simon N. 2008.** Ecological niche partitioning in the picoplanktonic green alga *Micromonas pusilla*: evidence from environmental surveys using phylogenetic probes. *Environ. Microbiol.*, **10 (9)**: 2433-2443.
- Furuya K., Masato H., Yabushita Y. & Ishikawa A. 2003.** Phytoplankton dynamics in the East China Sea in spring and summer as revealed by HPLC-derived pigment signatures. *Deep-Sea Res. Pt. II*, **50**: 367-387.
- García-Barcina J. M., González-Oreja J. A. & De la Sota A. 2006.** Assessing the improvement of the Bilbao estuary water quality in response to pollution abatement measures. *Water Res.*, **40**: 951-960.
- Gasol J. M. 1999.** How to count picoalgae and bacteria with the FACScalibur flow cytometer. Disponible en <http://www.marbef.org/training/FlowCytometry/Lectures/Gasol2.pdf> a 25 de julio de 2011.
- Giovannoni S. J., DeLong E. F., Olsen G. J. & Pace N. R. 1988.** Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.*, **170**: 720-726.
- Gorostiaga J. M., Diez I., Santolaria A., Secilla A., Bustamante M., Tajadura J. & Pagola S. 2003.** Seguimiento del estudio oceanográfico del Abra de Bilbao y de su entorno. *Bentos de sustrato duro*. Informe Técnico, Consorcio de Aguas Bilbao Bizkaia.
- Gradinger R. & Nürnberg D. 1996.** Snow algal communities on arctic pack ice floes dominated by *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Proc. MIPR Symp. Polar Biol.*, **9**: 35-43.
- Graham L. E. & Wilcox L. W. 2000.** *Algae*. Ryu T, Tarabojkia L. & Dellas K. (Eds.) Prentice Hall, Upper Saddle River (EE. UU.). 718 pp.
- Greisberger S. & Teubner K. 2007.** Does pigment composition reflect phytoplankton community structure in differing temperature and light conditions in a deep alpine lake? An approach using HPLC and delayed fluorescence techniques. *J. Phycol.*, **43**: 1108-1119.
- Grob C., Ulloa O., Claustre H., Huot Y., Alarcón, G. & Marie D. 2007a.** Contribution of picoplankton to the total particulate organic carbon concentration in the eastern South Pacific. *Biogeoscience*, **4**: 837-852.

- Grob C., Ulloa O., William Li W. K. W., Alarcón G., Fukasawa M. & Watanabe S. 2007b.** Picoplankton abundance and biomass across the eastern South Pacific Ocean along latitude 32.5°S. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **332**: 53-62.
- Guillard R. R. L. & Ryther J. H. 1962.** Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.*, **8**: 229-239.
- Hansen G., Botes L. & Miguel De Salas. 2007.** Ultrastructure and large subunit rDNA sequences of *Lepidodinium viride* reveal a close relationship to *Lepidodinium chlorophorum* comb. nov. (= *Gymnodinium chlorophorum*). *Phycol. Res.*, **55**: 25-41.
- Haphey-Wood C. M. 1988.** Ecology of freshwater planktonic green algae. En: Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Sandgren C. D. (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge (EE. UU.). pp. 175-226.
- Hargraves P. E. & Steele R. L. 1980.** Morphology and ecology of *Oltmansielliella virida*, sp. nov. (Chlophyceae: Volvocales). *Phycologia*, **19 (2)**: 96-102.
- Harris E. H. 2001.** *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.*, **52**: 363-406.
- Hasle G. R. 1978.** The inverted microscope method. En: *Phytoplankton manual*. Monographics on oceanographic methodology 6. Sournia A. (Ed.). UNESCO, Paris (Francia). pp. 263-292.
- Heimann K., Benting J., Timmerman S. & Melkonian M. 1989.** The flagellar developmental cycle in algae: Two types of flagellar development in uniflagellate algae. *Protoplasma*, **153**: 14-23.
- Henley W. F., Hironaka J. L., Guillou L., Buckheim M. A., Buckheim J. A., Fawley M. W. & Fawley K. P. 2004.** Phylogenetic analyses of the ``*Nannochloris*-like`` algae and the diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, **43 (6)**: 641-652.
- Hibberd D. J. & Norris R. E. 1984.** Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova). *J. Phycol.*, **20 (2)**: 310-330.

- Hill D. R. A. & Wetherbee R. 1986. *Proteomonas sulcata* gen. et sp. nov. (Cryptophyceae), a cryptomonad with two morphologically distinct and alternating forms. *Phycologia*, **25**: 521-543.
- Hoef-Emden K., Marin B. & Melkonian M. 2002. Nuclear and nucleomorph SSU rDNA phylogeny in the Cryptophyta and the evolution of cryptophyte diversity. *J. Mol. Evol.*, **55**: 161-179.
- Hoef-Emden K. & Melkonian M. 2003. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist*, **154**: 371-409
- Hori T. & Moestrup Ø. 1987. Ultrastructure of the flagellar apparatus in *Pyramimonas octopus* (Prasinophyceae) I. Axoneme structure and numbering of peripheral doublets / triplets. *Protoplasma*, **138**: 137-148.
- Hori T., Moestrup Ø. & Hoffman L. R. 1995. Fine structural studies on an ultraplanktonic species of *Pyramimonas*, *P. virginica* (Prasinophyceae), with a discussion of subgenera within the genus *Pyramimonas*. *Eur. J. Phycol.*, **30**: 219-234.
- Inouye I. & Pienaar R. N. 1984. Light and electron microscope observations on *Nephroselmis astigmatica* sp. nov. (Prasinophyceae). *Nord. J. Bot.*, **4**: 409-423.
- Irigoien X., Meyer B., Roger Harris R. & Harbour D. 2004. Using HPLC pigment analysis to investigate phytoplankton taxonomy: the importance of knowing your species. *Helgol. Mar. Res.*, **58**: 77-82.
- Izumo A., Fujiwara S., Oyama Y., Satoh A., Fujita N., Nakamura Y., Tsuzuki M. 2007. Physicochemical properties of starch in *Chlorella* change depending on the CO₂ concentration during growth: comparison of structure and properties of pyrenoid and stroma starch. *Plant Sci.*, **172**: 1138-1147.
- Jeffrey S. W. & Wright S. W. 2006. Photosynthetic Pigments in marine microalgae: Insights from cultures and the sea. En: *Algal cultures, analogues of blooms and applications*. Subba Rao D. V. (Ed.) Science Publishers, Enfield (EE. UU.). pp. 33-90.
- Jiao N., Yang Y., Hong N., Ma Y., Harada S., Koshikawa H., Watanabe M. 2005. Dynamics of autotrophic picoplankton and heterotrophic bacteria in the East China Sea. *Cont. Shelf Res.*, **25**: 1265–1279.

- Johnson P. W. & Seiburth J. N. 1979.** Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.*, **24 (5)**: 928-935.
- Johnson P. W. & Seiburth J. N. 1982.** In-situ morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *J. Phycol.*, **18**: 318-327.
- Jollès P. & Jollès J. 1984.** What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell. Biochem.*, **63**:165-89.
- Konac E., Ergun M. A., Sahin F.I. & Ekmekci A. 2003.** Detection of p53 deletions using FISH technique in the HL-60, Daudi, Raji and K-562 cell lines. *Exp. Oncol.*, **25**: 33-35.
- Kuosa H. 1991.** Picoplanktonic algae in the northern Baltic Sea: seasonal dynamics and flagellate grazing. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **73**: 269-276.
- Kviderová J. 2010.** Characterization of the community of snow algae and their photochemical performance in situ in the Giant Mountains, Czech Republic. *Arct. Antarct. Alp. Res.*, **42 (2)**: 210-218.
- Latasa M., Scharek R., Le Gall F. & Gillou L. 2004.** Pigment suits and taxonomic groups in Prasinophyceae. *J. Phycol.*, **40**: 1149-1155.
- Laza-Martínez A. 2009.** Criptofitas del estuario del río Nervión-Ibaizabal. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco. 302 pp.
- Laza-Martínez A. Artículo en prensa.** *Urgorri complanatus* gen. et sp. nov. (Cryptophyceae), a red tide-forming species in brackish waters. *J. Phycol.*
- Laza-Martínez A., Orive E. & Miguel I. 2011.** Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *J. Phycol.*, **46 (1)**: 45-65.
- Laza-Martínez A., Seoane S., Zapata M. & Orive E. 2007.** Phytoplankton pigment patterns in a temperate estuary: from unialgal cultures to natural assemblages. *J. Plankton Res.*, **29**: 913-929.
- Le F., Ning X., Liu C., Hao Q. & Shi J. 2010.** Community structure of picoplankton abundance and biomass in the southern Huanghai Sea during the spring and autumn of 2006. *Acta Oceanol. Sin.*, **29 (1)**: 58-68.

- Leander B. S. & Farmer M. A. 2000.** Comparative morphology of the euglenoid pellicle. I. Patterns of strips and pores. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47 (5)**: 469-479
- Leander B. S. & Farmer M. A. 2001.** Comparative morphology of the euglenoid pellicle. II. Diversity of strip substructure. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48 (2)**: 202-217.
- Lee C. & Lim W. 2006.** Variation of harmful algal blooms in Masan-Chinhae bay. *ScienceAsia*, **32 (suplemento 1)**: 51-56.
- LeRoi J.-M. & Hallegraeff G. M. 2006.** Scale-bearing nanoflagellates from southern Tasmanian coastal waters, Australia. II. Species of Chrysophyceae (Chrysophyta), Prymnesiophyceae (Haptophyta, excluding *Chrysochroulina*) and Prasinophyceae (Chlorophyta). *Bot. Mar.*, **49**: 216-235.
- Lewin R. A. 1976.** Prochlorophyta as a proposed new division of algae. *Nature*, **261**: 697-698.
- Lewitus A. J., White D. L., Tymowski R. G., Geesey M. E., Hymel S.N. & Noble P. A. 2005.** Adapting the CHEMTAX method for assessing phytoplankton taxonomic composition in southeastern U.S. estuaries. *Estuaries*, **28 (1)**: 160-172.
- Li W. K. W. 1995.** Composition of ultraphytoplankton in the central North Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **122**: 1-8.
- Li W. K. W. 1998.** Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters. *Limnol. Oceanogr.*, **43 (7)**: 1746-1753.
- Lionard M., Muylaert K., Tackx M. & Vyverman W. 2008.** Evaluation of the performance of HPLC-CHEMTAX analysis for determining phytoplankton biomass and composition in a turbid estuary (Schelde, Belgium). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **76**: 809-817.
- Liu H., Chang J., Tseng C.-M., Wen L.-S. & Liu K. K. 2007.** Seasonal variability of picoplankton in the northern South China Sea at the SEATS station. *Deep-Sea Res. Pt. II*, **54**: 1602-1616.
- Liu H., Imai K., Suzuki K., Nojiri Y., Tsurushima N. & Saino T. 2002.** Seasonal variability of picophytoplankton and bacteria in the western Subarctic Pacific Ocean at station KNOT. *Deep-Sea Res. Pt. II*, **49**: 5409-5420.

- Lokhorst G. M. & Star W. 1993.** The flagellar apparatus in the marine flagellate algal genus *Oltmannsiellopsis* (Dunaiellales, Chlorophyceae). *Arch. Protistenkd.*, **143**:13-32.
- Lund J. W. G. 1947.** Observations on soil algae III. Species of *Chlamydomonas* Ehr. in relation to variability within the genus. *New Phytol.*, **47 (2)**: 185-194.
- Mackey M. D., Mackey D. J., Higgins H. W. & Wright, S. W. 1996.** CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **144**: 265-283.
- Manton I., Oates K. & Parke M. 1963.** Observations on the fine structure of the *Pyramimonas* stage of *Halosphaera* and preliminary observations on three species of *Pyramimonas*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **43**: 225-238.
- Manton I., Rayns D. G., Ettl H. & Parke M. 1965.** Further observations on the green flagellates with scaly flagella: the genus *Heteromastix* Korshikov. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **45**: 241-255.
- Marie D., Partensky F., Vaulot D, Brussaard C. 1999.** Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. *Current Protocols In Cytometry*, **10**: 1.11.1-11.11.15.
- Marie D., Simon N. & Vaulot D. 2005.** Phytoplankton cell counting by flow cytometry. En: *Algal culturing techniques*. Andersen R. (Ed.). Academic Press, London (Reino Unido).
- Marie D., Zhu F., Balagué V., Ras J. & Vaulot D. 2006.** Eukaryotic picoplankton communities of the Mediterranean Sea in summer assessed by molecular approaches (DGGE,TTGE,QPCR). *FEMS Microbiol. Rev.*, **55**: 403-415.
- Marin B., Palm A., Klingberg M. & Melchonian M. 2003.** Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist*, **154**: 99-145.
- Marin M., Matzke C. & Melkonian M. 1991.** Flagellar hairs of *Tetraselmis* (Prasinophyceae): ultrastructural types and intrageneric variation. *Phycologia*, **32 (2)**: 213-222.
- Marin M. & Melkonian M. 1994.** Flagellar hairs in Prasinophytes (Chlorophyta): ultrastructure and distribution on the flagellar surface. *J. Phycol.*, **30**: 659-678.

- Marin B. & Melkonian M. 1999.** Mesostigmatophyceae, a new class of streptophyte green algae revealed by SSU rRNA sequence comparisons. *Protist*, **150**: 399-417.
- Massana R., Terrado R., Forn I., Lovejoy C. & Pedrós-Alió C. 2006.** Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans. *Environ. Microbiol.*, **8 (9)**: 1515-1522.
- Masquelier S., Foulon E., Jouenne F., Ferréol M., Brussaard C. P. D. & Vaulot D. 2011.** Distribution of eukaryotic plankton in the English Channel and the North Sea in summer. *J. Sea Res.*, **66**: 111-122.
- Masquelier S. & Vaulot D. 2008.** Distribución of micro-organisms along a transect in the South-East Pacific Ocean (BIOSCOPE cruise) using epifluorescence microscopy. *Biogeosciences*, **5**: 311-321.
- Matsumoto T., Shinozaki F., Chikuni T., Yabuki A., Takishita K., Kawachi M., Nakayama T., Inouye I., Hashimoto T. & Inagaki Y. 2011.** Green-colored plastids in the dinoflagellate genus *Lepidodinium* are of core chlorophyte origin. *Protist*, **162 (2)**: 268-276.
- McDonall S. M., Sarno D., Scanlan D. J. & Zingone A. 2007.** Genetic diversity of eukaryotic ultraphytoplankton in the Gulf of Naples during an annual cycle. *Aquat. Microb. Ecol.*, **50**: 75-89.
- McFadden G. I., Hill D. R. A. & Wetherbee R. 1986.** A study of the genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae) from south-eastern Australia. *Nord. J. Bot.*, **6 (2)**: 209-234.
- McFadden G. I., Hill D. R. A. & Wetherbee R. 1987.** Electron microscopic observations on *Pyramimonas olivacea* N Carter (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, **26 (3)**: 322-327.
- Medlin K. & Strieben S. 2010.** Refining cryptophyte identification: matching cell fixation methods to FISH hybridisation of cryptomonads. *J. Appl. Phycol.*, **22**: 725-731.
- Medlin L. K., Metfies K., Mehl H., Wiltshire K. & Valentin K. 2006.** Picoeukaryotic plankton diversity at the Helgoland time series site as assessed by three molecular methods. *Microb. Ecol.*, **52 (1)**: 53-71.
- Melkonian M. 1982.** Effect of divalent cations on flagellar scales in the green flagellate *Tetraselmis cordiformis*. *Protoplasma*, **111**: 221-233.

- Merchant S. S., Prochnik S. E., Vallon O., Harris E. H., Karpowicz S. J., Witman G. B., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L. K., Maréchal-Drouard L., Marshall W. F., Qu L.-H., Nelson D. R., Sanderfoot A. A., Spalding M. H., Kapitonov V. V., Ren Q., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H., Lucas S. M., Grimwood J., Schmutz J., Chlamydomonas Annotation Team, JGI Annotation Team, Grigoriev I. V. Rokhsar D. S. & Grossman A. R. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, **318**: 245.
- Meuser J. E., Ananyev G., Wittig L.E., Kosourov S., Ghirardi M. L., Seibert M., Dismukes G. C. & Posewitz M. C. 2009. Phenotypic diversity of hydrogen production in chlorophycean algae reflects distinct anaerobic metabolisms. *J. Biotech.*, **142**: 21-30.
- Minge M. A., Salchian-Tabrizi K., Tørresen O. K., Takishita K., Probert I., Inagaki Y., Klaveness D. & Jakobsen K. S. 2010. A phylogenetic mosaic plastid proteome and unusual plastid-targeting signals in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Evol. Biol.*, **10**: 191.
- Miyazono A., Odate T. & Maita Y. 1992. Seasonal fluctuations of cell density of cyanobacteria and other picophytoplankton in Iwanai Bay, Hokkaido, Japan. *J. Ocenogr.*, **48**: 257-277.
- Moestrup Ø. 1983. Further studies on *Nephroselmis* and its allies (Prasinophyceae). I. The question of the genus *Bipedinomonas*. *Nord. J. Bot.*, **3**: 609-627.
- Moestrup Ø. 1984a. Further studies on *Nephroselmis* and its allies (Prasinophyceae). II. *Mamiella* gen. nov., Mamiellaceae fam. nov., Mamiellales ord. nov. *Nord. J. Bot.*, **4**: 109-121.
- Moestrup Ø. 1984b. On *Nephroselmis pyriformis* (N. Carter) Ettl. *Nord. J. Bot.*, **4**: 122.
- Moestrup Ø. & Ettl H. 1979. A light and electron microscopical study of *Nephroselmis olivacea* (Prasinophyceae). *Opera Bot.*, **49**: 1-40.
- Moestrup Ø. & Hill D. R. A. 1991. Studies on the genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae) from Australian and European waters: *P. propulsa* sp. nov. and *P. mitra* sp. nov. *Phycologia*, **30** (6): 534-546.
- Moestrup Ø. & Hill D. R. A. 1993. Reconstruction of the flagellar surface armour in *Pyramimonas mantoniae* sp. nov. and *P. mitra* Moestrup et Hill (Prasinophyceae). *Phycologia*, **32** (1): 59-67.

- Moestrup Ø., Hori T. & Kristiansen A. 1987.** Fine structure of *Pyramimonas octopus* sp. nov., an octoflagellated benthic species of *Pyramimonas* (Prasinophyceae), with some observations on its ecology. *Nord. J. Bot.*, **7**: 339-352.
- Moro I., La Rocca N., Valle D. V., Moschin E., Negrisola E. & Andreoli C. 2002.** *Pyramimonas australis* sp. nov. (Prasinophyceae, Chlorophyta) from Antarctica: fine structure and molecular phylogeny. *Eur. J. Phycol.* **37**: 103-114.
- Moroni M., Veronese S., Benvenuti S., Marrapese G., Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F., Gambacorta M., Siena S. & Bardelly A. 2005.** Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol.*, **6**: 279-286.
- Nakayama T., Suda S., Kawachi M. & Inouye I. 2007.** Phylogeny and ultrastructure of *Nephroselmis* and *Pseudoscourfieldia* (Chlorophyta), including description of *Nephroselmis anterostigmatica* sp. nov. and a proposal for Nephroselmidiales ord. nov. *Phycologia*, **46** (6): 680-697.
- Nakayama T., Watanabe S. & Inouye I. 1996.** Phylogeny of wall-less green flagellates inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol. Res.*, **44**: 151-161.
- NIES Microbial Culture Collection**, accesible en <http://mcc.nies.go.jp> a 3 de junio de 2011.
- Norris R. E. 1964.** Studies on phytoplankton in Wellington Harbour. *N. Z. J. Bot.*, **2**: 258-278.
- Not F., Latasa M., Marie D., Cariou T., Vaultot D. & Simon N. 2004.** A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the western English Channel. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70** (7): 4064-4072.
- Not F., Latasa M., Scharek R., Viprey M., Karleskind P., Balagué V., Ontoria-Oviedo I., Cumino A., Goetze E., Vaultot D. & Massana R. 2008.** Protistan assemblages across the Indian Ocean, with a specific emphasis on the picoeukaryotes. *Deep-Sea Res. Pt. I*, **55**: 1456-1473.
- Not F., Massana R., Latasa M., Marie D., Colson C. Eikrem W., Pedrós-Alió C., Vaultot D. & Natalie S. 2005.** Late summer community composition and abundance of photosynthetic picoeukaryotes in Norwegian and Barents Seas. *Limnol. Oceanogr.*, **50** (5): 1677-1686.

- Not F., Simon N., Biegala I. C. & Vaultot D. 2002.** Application of Fluorescent *In Situ* Hybridization coupled with Tyramide Signal Amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquat. Microb. Ecol.*, **28**: 157-166.
- Not F., Zapata M., Pazos Y., Campaña E., Doval M. & Rodríguez F. 2007.** Size-fractionated phytoplankton diversity in the NW Iberian coast: a combination of microscopic, pigment and molecular analyses. *Aquat. Microb. Ecol.*, **45**: 245-255.
- Novarino G., Oliva E. & Perez-Uz B. 2002.** Nanoplankton protist from the western Mediterranean Sea. I. Occurrence, ultrastructure, taxonomy and ecological role of the mixotrophic flagellate *Ollicola vangoorii* (Chryomonadidae = Chrysophyceae p.p.). *Sci. Mar.*, **66** (3): 233-247.
- Olli K., Heiskanen A.-S. & Seppälä. 1996.** Development and fate of *Eutreptiella gymnastica* bloom in nutrient-enriched enclosures in the coastal Baltic Sea. *J. Plankton Res.*, **18** (9): 1587-1604.
- Ong L. J. & Glazer A. N. 1991.** Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria I. Bilin types and locations and transfer pathways in *Synechococcus* spp. Phycoerythrins. *J. Biol. Chem.*, **266** (15): 9515-9527.
- Orive E., Franco J., Madariaga I. & Revilla M. 2004.** Bacterioplankton and phytoplankton communities. En: *Oceanography and marine environment of the Basque Country*. Borja A. & Collins M. (Eds.) Elsevier, Amsterdam, Paises Bajos. pp.: 367-393.
- Orive E., Laza-Martínez A., Seoane S., Alonso A, Andrade R. & Miguel I. 2010.** Diversity of *Pseudo-nitzschia* in the southeastern Bay of Biscay. *Diatom Res.*, **25** (1): 125-145.
- Ozbay G. & Jackson M. 2010.** Flow cytometry application in marine phytoplankton study: a case study investigating effects of formalin preservation on phytoplankton count and cell integrity. *J. Biotech Res.*, **2**: 79-100.
- Palacios L. & Marín I. 2008.** Enzymatic permeabilization of the thecate dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) yields detection of intracellularly associated bacteria via catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74** (7): 2244-2247.
- Palenik B. 2001.** Chromatic adaptations in marine *Synechococcus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (2): 991-993.

- Palenik B. & Haselkorn R. 1992.** Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll *b*-containing prokaryotes. *Nature*, 365: 265-267.
- Pan L. A., Zhang J. & Zhang L. H. 2007.** Picophytoplankton, nanophytoplankton, heterotrophic bacteria and viruses in the Changjiang Estuary and adjacent coastal waters. *J. Plankton Res.*, **29** (2): 87-97.
- Pan L. A., Zhang L. H., Zhang J., Gasol J. M. & Chao M. 2005.** On-board flow cytometric observation of picoplankton community structure in the East China Sea during the fall of different years. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **52**: 243-253.
- Parke M. 1949.** Studies on marine flagellates. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **28**: 255-288.
- Parke M. & Rayns D. G. 1964.** Studies on marine flagellates VII. *Nephroselmis gilva* sp. nov. and some other allied forms. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **44**: 209-217.
- Partensky F., Blanchot J. & Vaultot D. 1999a.** Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Bulletin de l'Institut Oceanographique, Monaco*, N° Especial **19**: 457-475.
- Pearson B. R. & Norris R. E. 1975.** Fine structure of cell division in *Pyramimonas parkeae* Norris and Pearson (Chlorophyta, Prasinophyceae). *J. Phycol.*, **11** (1): 115-124.
- Pennick N. C. 1977.** Studies on external morphology of *Pyramimonas* 4. *Pyramimonas virginica* sp. nov. *Arch. Protistenk.*, **119**: 239-246.
- Pennick N. C. 1978.** Studies on external morphology of *Pyramimonas* 5. *P. amyliifera* Conrad. *Arch. Protistenk.*, **120**: 142-147.
- Pennick N. C. 1984.** Comparative ultrastructure and occurrence of scales in *Pyramimonas* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Arch. Protistenk.*, **128**: 3-11.
- Pennick N. C. & Clarke K. J. 1976.** Studies on external morphology of *Pyramimonas* 3. *Pyramimonas grossii* Parke. *Arch. Protistenk.*, **118**: 285-290.
- Pennick N. C., Clarke K. J. & Belcher J. H. 1978.** Studies on external morphology of *Pyramimonas* 1. *Pyramimonas orientalis* and its allies in culture. *Arch. Protistenk.*, **120**: 304-311.

- Pernthaler J., Glöckner F. O., Schönhuber W. & Amann R. 2001.** Fluorescence in situ hybridization. En: *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*, **30**. J. Paul (Ed.), Academic Press Ltd, London (Reino Unido). pp.207-226
- Pienaar R. N. & Sym S. D. 1997.** *Pyramimonas robusta* sp. nov., a new punctate species, and a reappraisal of the subgenus *Punctatae*. *Can. J. Bot.*, **75**: 1965-1977.
- Pienaar R. N. & Sym S. D. 2002.** The genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae) from the southern African inshore waters. *S. Afr. J. Bot.*, **68**: 283-298.
- Pollio A., Cennamo P., Ciniglia C., De Stefano M., Pinto G. & Huss V. A. R. 2005.** *Chlamydomonas pitschmannii* Ettl, a little known species from thermoacidic environments. *Protist*, **156**: 287-302.
- Pombert J. F., Beauchamp P., Otis C., Lemieux & Turmel M. 2006a.** The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis viridis*: evolutionary trends of the mitochondrial genome in the Ulvophyceae. *Curr Genet*, **50**: 137-147.
- Pombert J. F., Lemieux C. & Turmel M. 2006b.** The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis viridis* reveals a distinctive quadripartite architecture in the chloroplast genome of early diverging ulvophytes. *BMC Biol.*, **4**: 3.
- Pröschold T., Marin B., Schlösser U. W. & Melkonian M. 2001.** Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas* Ehrenberg and *Chloromonas* Gobi, and description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist*, **152**: 265-300.
- Putland J. N. & Rivkin R. B. 1999.** Influence of storage mode and duration on the microscopic enumeration of *Synechococcus* from a cold coastal ocean environment. *Aquat. Microb. Ecol.*, **17**: 91-199.
- Ramalah N. & Furuya K. 2002.** Seasonal variations in phytoplankton composition and transparent exopolymer particles in a eutrophicated coastal environment. *Aquat. Microb. Ecol.*, **30**: 69-82.
- Rat'kova T. N. & Wassmann P. 2002.** Seasonal variation and spatial distribution of phyto- and protozooplankton in the central Barents Sea. *J. Marine Syst.*, **38**: 47-75.
- Rat'kova T. N. & Wassmann P. 2005.** Sea ice algae in the White and Barents seas: composition and origin. *Polar Res.*, **24 (1-2)**: 95-110.

- Reize I. B. & Melkonian M. 1989.** A new way to investigate living flagellated/ciliated cells in the light microscope: immobilization of cells in agarose. *Bot. Acta*, **102**: 145-151.
- Reul A., Muñoz M., Criado-Aldeanueva F. & Rodríguez V. 2006.** Spatial distribution of phytoplankton <13 mm in the Gulf of Cádiz in relation to water masses and circulation pattern under westerly and easterly wind regimes. *Deep-Sea Res. Pt. II*, **53**: 1294-1313.
- Reul A., Ródriguez J., Guerrero F., González N., Vargas J. M., Echevarría F., Rodríguez V. & Jiménez-Gómez F. 2008.** Distribution and size biomass structure of nanophytoplankton in the Strait of Gibraltar. *Aquat. Microb. Ecol.*, **52**: 253-262.
- Revilla M., Ansotegui A., Iriarte A, Madariaga I., Orive E., Sarobe A. & Trigueros J. M. 2002.** Microplankton metabolism along a trophic gradient in a shallow-temperate estuary. *Estuaries*, **25 (1)**: 6-18.
- Rho M.-C., Yasuda K., Matsunaga K. & Ohizumi Y. 1997.** A monogalactopyranosyl acylglycerol from *Oltmannsiellopsis unicellularis* (NIES-359). *Phytochemistry*, **44 (8)**: 1507-1509.
- Robertson K. L. & Thach D. C. 2009.** LNA flow-FISH: A flow cytometry-fluorescence in situ hybridization method to detect messenger RNA using locked nucleic acid probes. *Anal. Biochem.*, **390**:109-114.
- Rodríguez F., Varela M. & Zapata M. 2002.** Phytoplankton assemblages in the Gerlache and Bransfield Straits (Antarctic Peninsula) determined by light microscopy and CHEMTAX analysis of HPLC pigment data. *Deep-Sea Res. Pt. II*, **49**: 733-747.
- Romari K. & Vaultot D. 2004.** Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnol. Oceanogr.*, **49 (3)**: 784-798
- Saiz-Salinas J. I., Francés G. & Imaz X. 1996.** *Uso de bioindicadores en la evaluación de la contaminación de la Ría de Bilbao*. Servicio Editorial UPV., Leioa (España). 128 pp.
- Saldarriaga J. F., Taylor F. J., Keeling P. J. & Cavalier-Smith T. 2001.** Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *J. Mol. Evol.*, **53**: 204-213.

- Sato M., Takeda S. & Furuya K. 2006.** Effects of long-term sample preservation on flow cytometric analysis of natural populations of Pico- and Nanophytoplankton. *J. Oceanogr.*, **62**: 903-908.
- Sato M., Yoshikawa T., Takeda S. & Furuya K. 2007.** Application of the size-fractionation method to simultaneous estimation of clearance rates by heterotrophic flagellates and ciliates of pico- and nanophytoplankton. *J. Exp. Biol.*, **349**: 334-343.
- SCCAP Scandinavian Culture Collection of Algae & Protozoa**, accesible en <http://www.sccap.dk/collection/> a 24 de junio de 2011.
- Schenk P. M., Thomas-Hall S. R., Stephens E., Marx U. C., Mussgnug J. H., Posten C., Kruse O. & Hankamer H. 2008.** Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenerg. Res.*, **1**: 20-43.
- Schönhuber W., Fuchs B., Juretscho S. & Amann R. 1997.** Improved sensitivity of whole-Cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63 (8)**: 3268-3273.
- Schlösser U. G. 1984.** Species-specific sporangium autolysins (cell-wall-dissolving enzymes) in the genus *Chlamydomonas*. En: *Systematics of the green algae. The Systematic Association Special Volume 27*. Irvine D. E. G. & Jonh D. M. (Eds.). Academic Press, Londres (Reino Unido). pp. 409-418.
- Schlüter L., Møhlenberg F., Havskum H. & Larsen S. 2000.** The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll *a* ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **192**: 49-63.
- Schymura D., Forstner M., Schultze A., Kröber T., Swevers L., Iatrou K. & Krieger J. 2010.** Antennal expression pattern of two olfactory receptors and an odorant binding protein amplicated in host odor detection by the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Int. J. Biol. Sci.*, **6**: 614-626.
- Seoane S. 2005.** *Haptofitas del estuario del río Nervión-Ibaizabal: taxonomía, crecimiento e importancia relativa en el fitoplancton*. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco. 294 pp.
- Seoane S., Elkrem W., Arluzea J. & Orive E. 2009a.** Haptophytes of the Nervión River estuary, northern Spain. *Bot. Mar.*, **52**: 47-59.

- Seoane S., Elkrem W., Pienaar R. & Edvardsen B. 2009b.** *Chrysochromulina palpebralis* sp. nov. (Prymnesiophyceae): a haptophyte, possessing two alternative morphologies. *Phycologia*, **48** (3): 165-176.
- Seoane S., Laza A. & Orive E. 2006.** Monitoring phytoplankton assemblages in estuarine waters: The application of pigment analysis and microscopy to size-fractionated samples. *Estuar. Coast Shelf Sci.*, **67**: 343-354.
- Seoane S., Laza A., Urrutxurtu I. & Orive E. 2005.** Phytoplankton assemblages and their dominant pigments in the Nervion River estuary. *Hydrobiologia*, **549**: 1-13.
- Seoane S., Zapata M. & Orive E. 2009c.** Growth rates and pigment patterns of haptophytes isolated from estuarine waters. *J. Sea Res.*, **62**: 286-294.
- Sherr E. B. & Sherr B. F. 1983.** Double-staining epifluorescence technique to assess frequency of dividing cells and bacterivory in natural populations of heterotrophic microprotozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46** (6): 1388-1393.
- Sieracki M. E., Gobler C. J., Cucci T. L., Thier E. C., Gilg I. C. & Keller M. D. 2004.** Pico- and nanoplankton dynamics during bloom initiation of *Aureococcus* in a Long Island, NY bay. *Harmful Algae*, **3**: 459-470.
- Silva A., Mendes C. R., Palma S. & Brotas V. 2008.** Short-time scale variation of phytoplankton succession in Lisbon bay (Portugal) as revealed by microscopy cell counts and HPLC pigment analysis. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **79**: 230-238.
- Simon N., Campbell L., Örnólsdóttir E., Groben R., Guillou L., Lange M. & Medlin L. K. 2000.** Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by dot blot and fluorescent whole cell hybridization. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**(1): 76-84.
- Simon N., Lebot N., Marie D., Partensky F., Vaulot D. 1995.** Fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (7): 2506-2513.
- Smith L. A., Duncan A., Thomson G. B., Roberts K. J., Machin D. & McLeod G. 2004.** Crystallisation of sodium dodecyl sulphate from aqueous solution: phase identification, crystal morphology, surface chemistry and kinetic interface roughening. *J. Cryst. Growth*, **263**: 480-490.

- Smith P. J. & Hobson L. A. 1994.** Temporal variation in taxonomic composition of flagellated nanoplankton in a temperate fjord. *J. Phycol.*, **30**: 369-375.
- Sommer J. R. 1965.** The ultrastructure of the pellicle complex of *Euglena gracilis*. *J. Cell Biol.*, **24**: 253-257.
- Speel E. J. M., Hopman A. H. N. & Komminoth P. 1999.** Amplification methods to increase the sensitivity of In situ hybridization: play CARD(S). *J. Histochem. Cytochem.*, **47(3)**: 281-288.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. & Isambert A. 2006.** Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, **101 (2)**: 87-96.
- Stein F. R. 1878.** *Der organismus der infusionthiere. III. Der organismus der Flagellaten. I.* Wilhelm Engelmann, Leipzig, Alemania.
- Stockner J. G., Klut M. E. & Cochlan W. P. 1990.** Leaky filters: a warning to aquatic ecologists. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47 (1)**: 16-23.
- Stonik I. V. 2007.** Species of the genus *Eutreptiella* (Euglenophyceae) from Russian waters of East/Japan sea. *Ocean Sci. J.*, **42 (2)**: 81-88.
- Stonik I. V. & Aizdaicher N. A. 2005.** Studies on morphology of species from the genus *Pyramimonas* Schmarada (Prasinophyceae) new for the Far Eastern Seas of Russia. *Int. J. Algae*, **7 (3)**: 247-255.
- Suda S. 2003.** Light and electron microscopy of *Nephroselmis spinosa* sp. nov. (Prasinophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.*, **39**: 590-599.
- Suda S. 2004.** Taxonomic characterization of *Pyramimonas aurea* sp. nov. (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, **43 (6)**: 682-692.
- Suda S., Watanabe M. M. & Inouye I. 1989.** Evidence of sexual reproduction in the primitive green alga *Nephroselmis olivacea* (Prasinophyceae). *J. Phycol.*, **25**: 596-600.
- Suzaki T. & Williamson R. E. 1986.** Reactivation of euglenoid movement and flagellar beating in detergent-extracted cells of *Astasia longa*: different mechanisms of force generation are involved. *J. Cell Sci.*, **80**: 75-89.

- Sym S. D. & Pienaar R. N. 1991.** Ultrastructure of *Pyramimonas norrisii* sp. nov. *Br. Phycol. J.*, **26**: 51-66.
- Sym S. D. & Pienaar R. N. 1993.** Further observations on *Trichocystis*, a subgenus of *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, **32 (5)**: 338-350.
- Sym S. D. & Pienaar R. N. 1995.** Taxonomy of *Pyramimonas obovata* and other observations on the subgenus *Vestigifera* of *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.*, **43**: 17-32.
- Sym S. D. & Pienaar R. N. 1997a.** Further observations on the type subgenus of *Pyramimonas* (Prasinophyceae), with particular reference to a new species, *P. Chlorina*, and the flagellar apparatus of *P. propulsa*. *Can. J. Bot.*, **75**: 2196-2215.
- Sym S. D. & Pienaar R. N. 1997b.** *Pyramimonas robusta* sp. nov., a new punctate species, and a reappraisal of the subgenus *Punctatae*. *Can. J. Bot.*, **75**: 1965-1977.
- Sym S. D. & Pienaar R. N. 1999.** An additional punctate species of *Pyramimonas*, *P. formosa*, sp. nov., and its impact on the subgenera *Punctatae* and *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.*, **35**: 1313-1321.
- Tamigneaux E., Mingelbier M., Klein B., & Legendre L. 1997.** Grazing by protists and seasonal changes in the size structure of protozooplankton and phytoplankton in a temperate nearshore environment (western Gulf of St. Lawrence, Canada). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **146**: 231-247.
- Thomsen H. A. & Buck K. R. 1998.** Nannoflagellates of the central California waters: taxonomy, biogeography and abundances of primitive, green flagellates (Pedinophyceae, Prasinophyceae). *Deep-Sea Res. Pt. II*, **45**: 1687-1707.
- Thronsen J. 1973.** Fine structure of *Eutreptiella gymnastica* (Euglenophyceae). *Norw. J. Bot.*, **20**: 271-280.
- Thronsen J. 1978.** The dilution culture method. En: *Phytoplankton manual*. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology 6. Sournia A. (Ed.). Unesco, Paris (Fracia). pp. 218-224.
- Thronsen J. 1993.** The planktonic marine flagellates. En: *Marine phytoplankton: a guide to naked flagellates and coccolithophorids*. Thomas C. R. (Ed.). Academic Press, San Diego (EE. UU.) pp. 7-146.

- Throndsen J., Hasle G. R. & Tangen K. 2007a.** Chlorophyta. En: *Phytoplankton of Norwegian coastal waters*. Throndsen J. & Knispel A. (Eds.). Almater Forlag AS, Oslo Noruega. pp. 245-270.
- Throndsen J., Hasle G. R. & Tangen K. 2007b.** Euglenophyta - Euglenozoa. En: *Phytoplankton of Norwegian coastal waters*. Throndsen J. & Knispel A. (Eds.). Almater Forlag AS, Oslo Noruega. pp. 245-270.
- Toming K. & Jaanus A. 2007.** Selecting potential summer phytoplankton eutrophication indicator species for the northern Baltic sea. *Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol.*, **56** (4): 297-311.
- Trigueros J. M. 2000.** *Peridiniopsis salina* (Peridinales, Dinophyceae), a new species of brackish dinoflagellate from Urdaibai estuary, North Spain. *Phycologia*, **39** (2): 126-133.
- Trigueros J. M. 2001.** *Diatomeas y dinoflagelados del estuario de Urdaibai. Estudio morfológico y distribución de las especies dominantes*. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco. 164 pp.
- Trigueros J. M., Ansotegui A., Orive E. & Nó M. L. 2000.** Morphology and distribution of two brackish diatoms (Bacillariophyceae): *Cyclotella atomus* Hustedt and *Thalassiosira guillardii* Hasle in the estuary of Urdaibai (Northern Spain). *Nova Hedwigia*, **70** (3-4): 431-450.
- Trigueros J. M., Orive O. & Arluzea J. 2002.** Observations on *Chaetoceros salsugineus* (Chaetocerotales, Bacillariophyceae): first record of this bloom-forming diatom in a European estuary. *Eur. J. Phycol.*, **37**: 571-578.
- Tseng C. K., Chen J.-F., Zhang Z.-F. & Zhang H.-Q. 1994.** Light and electron microscope observations on *Nephroselmis goeae* sp. nov. (Prasinophyceae). *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, **12** (3): 201-207.
- Urrutxurtu I., Orive E. & De la Sota A. 2003.** Seasonal dynamics of ciliated protozoa and their potential food in an eutrophic estuary (Bay of Biscay). *Estuar. Coast Shelf Sci.*, **57**: 1169-1182.
- Utermöhl H. 1958.** Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.*, **9**: 1-38.

- Valderrama L. T., Del Campo C. M., Rodríguez C. M., De Bashan & Bashan Y. 2002.** Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Res.*, **36**: 4185-4192.
- Van Gijlswilk R. P. M., Wiegant J., Raap A. K. & Tanke, H. J. 1996.** Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol. *J. Histochem. Cytochem.*, **44(4)**: 389-92.
- Van Liere L., Breebaart L. & Dullemont Y. J. 1989.** Determining the relative number of prochlorophytes in lake phytoplankton using epifluorescence microscopy. *Br. phycol. J.*, **24**: 391-394.
- Vaulot D., Eikrem W., Viprey M. & Moreau H. 2008.** The diversity of small eukaryotic phytoplankton (<3 µm) in marine ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**: 795-820.
- Vaulot D., Partensky F., Neveux J., Mantoura R. F. C. & Llewellyn C. A. 1990.** Winter presence of prochlorophytes in surface waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.*, **35 (5)**: 1156-1164.
- Veitch N. C. 2004.** Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, **65**: 249-259.
- Vidussi F., Marty J. C. & Chiavérini J. 2000.** Phytoplankton pigment variations during the transition from spring bloom to oligotrophy in the northwestern Mediterranean sea. *Deep-Sea Res. Pt. I*, **47**: 423-445.
- Viprey M., Guillou L., Ferréol M. & Vaulot D. 2008.** Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach. *Environ. Microbiol.*, **10 (7)**: 1804-1822.
- Walne P. L., Moestrup Ø., Norris E. N. & Ettl H. 1986.** Light and electron microscopical studies of *Eutreptiella eupharyngea* sp. nov. (Euglenophyceae) from Danish and American waters. *Phycologia*, **25**: 109-126.
- Walne P. L. & P. A. Kivic. 1990.** Phylum Euglenida. 1990. En: *Handbook of the Protoctista; the structure, cultivation, habits and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants and fungi*. Margulis L., Corliss J.O., Melkonian M. & Chapman D.J. (Eds.). Jones and Bartlett Publishers. Boston (EE. UU.). pp. 270-287.

- Wallner G., Amman R. & Beisker W. 1993.** Optimizing fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-tageted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Citometry*, **14**: 136-143.
- Watanabe M. M., Suda S, Inouye I., Sawaguchi T. & Chihara M. 1990.** *Lepidodinium viride* gen. et sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyta), a green dinoflagellate with a chlorophyll *a* and *b* containing endosimbiont. *J. Phycol.*, **26 (4)**: 741-751.
- Worden, A. Z. 2006.** Picoeukaryote diversity in coastal waters of the Pacific Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.*, **43**: 165-175.
- Worden A. Z. & Not F. 2008.** Ecology and diversity of picoeukaryotes. En: *Microbial Ecology of the Oceans, Second Edition*. Kirchman D. L. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc., Chichester (Reino Unido). pp.: 159-205.
- Wotowski K. & Hindák F. 2005.** *Atlas of euglenophytes*. Zakry's B. & Makovinská J. (Eds.). VEDA Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, República Eslovaca. 136 pp.
- Wright S. W., Ishikawa A., Marchant H. J., Davidson S. T., van den Enden R. L. & Nash G. V. 2009a.** Composition and significance of picophytoplankton in Antarctic waters. *Polar Biol.*, **32**: 797-808.
- Wright S. W., Van Den Enden R. L., Pearce I., Davidson A. T., Scott F. J., Westwood K. J. 2009b.** Phytoplankton community structure and stocks in the Southern Ocean (30–80° E) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigment signatures. *Deep-Sea Res. Pt. II*, **57**: 758-778.
- Yamaguchi H., Suda S., Nakayama T., Pienaar R. N., Chihara M. & Inouye I. 2010.** Taxonomy of *Nephroselmis viridis* sp. nov. (Nephroselmidophyceae, Chlorophyta), a sister marine species to freshwater *N. olivacea*. *J. Plant. Res.*, **24 (1)**: 49-62.
- Yamano t. & Fukuzawa H. 2009.** Carbon-concentrating mechanism in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, revealed by transcriptome analyses. *J. Basic Microbiol.*, **49**: 42-51.
- Yang E. J., Choi J. K., Hyun J.-H. 2008.** Seasonal variation in the community and size structure of nano- and microzooplankton in Gyeonggi Bay, Yellow Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **77**: 320-330.

- Yao P., Deng C. M. & Yu Z. G. 2006.** Pigment signatures of some diatoms isolated from the China seas. *Acta Oceanol. Sin.*, **25**: 108-118.
- Zapata M., Edvardsen B., Rodríguez F., Maestro M. A. & Garrido J. L. 2001.** Chlorophyll c_2 monogalactosyldiacylglyceride ester (chl c_2 -MGDG). A novel marker pigment for *Chrysochromulina* species (Haptophyta). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **219**: 85-98.
- Zapata M., Rodríguez F. & Garrido J. L. 2000.** Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **195**: 29-45.
- Zarda B., Amann R., Wallner G. & Schleifer K.- H. 1991.** Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA targeted oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.*, **137**: 2823-2830.
- Zingone A., Borra M., Brunet C., Forlani G., Wiebe H. C. F. Kooistra W. H. C. F. & Procaccini G. 2002.** Phylogenetic position of *Crustomastix stigmatica* sp. nov. and *Dolichomastix tenuilepis* in relation to the Mamiellales (Prasinophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.*, **38**: 1024-1039.
- Zubkov M. V., Sleigh M. A., Tarran G. A., Peter H. Burkill P. H. & Leakey R. J. G. 1998.** Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 50° N to 50° S. *Deep-Sea Res. Pt. I*, **45**: 1339-1355.
- Zwirgmaier K., Jardillier L. Ostrowski M., Mazard S., Garczarek L., Vaultot D, Not F., Massana R., Ulloa O. & Scanlan D. J. 2008.** Global phylogeography of marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* reveals a distinct partitioning of lineages among oceanic biomes. *Environ. Microbiol.*, **10 (1)**: 147-161

APÉNDICES

Apéndice A: preparación de eluyentes para HPLC (Basado en Zapata *et al.* 2000)

- Se suelen preparar de 500 ml a 1 l de cada eluyente, según la cantidad de muestras a analizar. Como calculo aproximado puede usarse la estimación de 45ml de eluyentes por muestra a analizar. De esta manera habrá de sobra.

- Siempre que se pueda es preferible mezclar los componentes de los eluyentes en un matraz aforado, pues facilita la homogenización de éstos y la medida del volumen que preparamos es mas precisa.

- Todos los eluyentes, al igual que las muestras deben ser filtrados por filtros de 0,2 μm de diámetro de poro antes de añadirse a los depósitos del HPLC. Aparte, antes de filtrar los eluyentes ya preparados, o de añadir los filtrados a los depósitos conviene lavar tanto el montaje de filtración como los depósitos con parte del líquido que vayan a contener, por si pudiera quedar algo de contaminación de otras sustancias.

-Antes de volver a utilizar las bombas que hacen circular los eluyentes recién renovados es necesario purgarlas para eliminar cualquier burbuja que haya podido formarse mientras el filtro de admisión del circuito a estado al aire en el proceso de rellenado de los depósitos.

-Eluyente A:

Metanol : Acetonitrilo : Piridina (Aq., 0,025 M) en una proporción de 50:25:25.

-Eluyente B:

Metanol : Acetonitrilo : Acetona en una proporción de 20:60:20.

-Los eluyentes A y B se preparan con sus componentes tal como los suministra la casa. Es altamente recomendable, por no decir indispensable, para lograr unos cromatogramas sin alteraciones emplear componentes en grado de HPLC.

-Preparación de la piridina:

- Se añaden en un vaso amplio de precipitado 900ml de H₂O en grado HPLC y 2 ml de piridina.

- Se ajusta el pH de la disolución a 5.0 añadiendo gotitas de ácido acético glacial, mientras se mide el pH de forma continua con un pHmetro. Una vez ajustado el pH se le añade agua para HPLC hasta hacer 1 litro, se verifica el pH y se filtra por un filtro de 0,2 µm de ancho de poro.

Apéndice B: cultivo y procesado para extracción de pigmentos de cepas aisladas del estuario del Nervión para la obtención de sus ratios pigmentarios mediante HPLC

1. **Establecimiento de los cultivos:** se ponen a crecer los cultivos en medio f/2 (Guillard & Ryther 1962) a la intensidad de luz a la que se desee estudiar la composición pigmentaria (100 μ l de inóculo a densidad media interpretada según el color). En el presente estudio se cultivaron las algas empleadas para la obtención de ratios pigmentarios a una intensidad de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

A falta de un aparato que suministre una intensidad de luz constante, se calcula con un luxómetro la distancia respecto de la fuente de luz a la que han de quedar los tubos de ensayo con las algas (es importante que la luz incida sobre la mayor superficie posible del cultivo: en tubo de ensayo, un lateral; en matraz erlenmeyer, el fondo).

2. **Fotoaclimatación y medición de la fluorescencia:** se dejan crecer los cultivos al menos durante el tiempo suficiente para que sea necesario renovarlos (1 semana como mínimo), para su fotoaclimatación, y al renovarse se dejan crecer de nuevo en las condiciones lumínicas elegidas para el estudio, pero esta vez se va midiendo su fluorescencia, una vez cada 24 h a ser posible, mediante un fluorímetro. Es importante que en cada renovación se emplee la misma cantidad de inóculo para que el crecimiento del cultivo sea lo más regular posible.

La fluorescencia sirve como aproximación de la abundancia celular del cultivo. Para medirla con un fluorímetro estándar (Turner[®] Designs, modelo 10-AU, en el presente estudio), a no ser que el manual indique algo diferente, se enciende el aparato 30 min antes de realizar las medidas, para que se caliente su lámpara, con la zona de medida en oscuridad, como siempre que no se esté usando. Las medidas se realizarán siempre que se pueda en un ambiente que sea lo menos traumático, en términos de iluminación y temperatura sobre todo, para que las células se alteren lo menos posible.

Antes de medir su fluorescencia, los cultivos se pondrán al menos durante 10 min en oscuridad para descargar todos sus fotosistemas y que no estén saturados cuando se los irradie en el fluorímetro, lo que produciría mayor fluorescencia y daría una idea equivocada del estado de crecimiento. Pasados esos 10 min se irán exponiendo a la luz uno a uno los cultivos para la medición de su fluorescencia.

Antes de introducir el tubo en el fluorímetro tras tapar la boca con un pedazo de parafilm, se agita un par de veces suavemente para resuspender las células del fondo y se limpia con papel de cocina, baño o similar, para que no queden huellas en la parte que ocupa el cultivo. Se cierra la zona de carga de muestra del fluorímetro y una vez estabilizado el valor de fluorescencia que indica el aparato se registra. Se repite este proceso exponiendo un solo cultivo cada vez a la luz.

- 3. Representación de curvas de crecimiento:** los datos de fluorescencia obtenidos en forma de unidades de fluorescencia arbitraria se introducen en una hoja del programa Excel[®](Microsoft[©] Corporation, EE. UU.), o similar, y se representan en forma logarítmica natural o neperiana (eje ordenadas), frente al tiempo (abcisas). Tras varios días se puede apreciar una curva de crecimiento con una fase exponencial que delimitaremos con una regresión lineal de sus puntos, y anotaremos entre que valores de fluorescencia se da. Cuantos más días seguidos hayamos medido, mejor se podrá afinar la fase exponencial del cultivo. Una vez logrado esto se renuevan los cultivos, de nuevo con la misma cantidad de inóculo que antes y se dejan crecer hasta que la fluorescencia, que se medirá a diario, alcance valores correspondientes a la fase exponencial, a poder ser que queden por el medio de la línea de regresión que hemos calculado. La cantidad de cultivo que emplearemos en esta nueva renovación a de ser como mínimo de 9-27 ml, 1-3 tubos de ensayo, para poder obtener luego una cantidad suficiente de algas con la que poder realizar un extracto de pigmentos concentrado. Aunque cuanto mayor volumen se cultive mayores serán las posibilidades de conseguir extractos lo suficientemente concentrados para que se puedan cuantificar sin problemas los pigmentos minoritarios.

4. **Filtración de cultivos:** una vez que los cultivos alcanzan la fluorescencia adecuada se filtra la mayor cantidad de tubos posibles con un quitasato y a través de un filtro GF/F (Whatman International Ltd., Reino Unido) de 0,7 μm de luz de maya, manteniendo el montaje de filtración en luz reducida durante el proceso. La filtración se realizará a una presión no superior a 100 mmHg.

5. **Conservación de los filtros:** una vez realizado el filtrado se dobla el filtro por la mitad y se seca la mayor cantidad de agua que quede en el filtro, primero sobre el montaje de filtrado, gracias a la succión de la bomba, y después mediante papel absorbente, introduciéndolo en el extremo de una hoja doblada. Inmediatamente después se cubre con un papel de aluminio previamente rotulado con la identificación de la muestra y el volumen filtrado, que también se anotará en un cuaderno por si acaso, y tras esto se congela en N_2 líquido hasta su análisis.

6. **Extracción de los pigmentos:** el día del análisis se dejan descongelar los filtros a temperatura ambiente en el propio papel de aluminio. A partir de aquí la extracción sigue bajo luz atenuada tal y como se detalla en las páginas 28-29.

7. **Limpieza del material para la extracción y preparación de solventes y muestras para HPLC:** los viales y tapones así como todo el material de vidrio empleado para el HPLC puede ser lavado para volver a ser utilizado, preferiblemente bajo una campana de extracción, 3 veces con acetona al 95% y después otras 3 veces más con agua destilada para quitar los residuos de acetona. Los viales y tapones pueden lavarse por separado o bien juntos, añadiendo la acetona, cerrando el vial y agitando.

Apéndice C: disoluciones para TSA-FISH

- Disolución Stock de NaCl 5 M:

- Se disuelve el NaCl necesario, ya pesado, en agua destilada, en el 80% del volumen total que se quiera preparar. La disolución total lleva bastante tiempo de agitación y emplear agua caliente (>50°C, por ejemplo) se hace necesario debido a la concentración prácticamente saturante que se pretende obtener.
- Después se completa el volumen final de la disolución añadiendo agua destilada.
- Se suelen preparar 100ml, dependiendo de las necesidades, para lo cual hará falta disolver 29,22 g de NaCl como se ha explicado.

- Disolución Stock de EDTA 0,5 M, pH 8:

- Se añade el EDTA necesario, ya pesado, en agua destilada, en el 80% del volumen total que se quiera preparar. Al agitarse para disolverlo enseguida comenzará a precipitar dándole un color blanquecino y una consistencia viscosa a la disolución.
- Se ajusta el pH a 8 añadiendo NaOH sólido preferiblemente*, mientras se agita la disolución. Establecer el pH en 8 es necesario para que se dé la disolución del EDTA.
- Después se completa el volumen final de la disolución añadiendo agua destilada.

*: el empleo de NaOH sólido supone una menor variación de volumen a la hora de ajustar el pH y permite alcanzar con más seguridad el volumen final previsto para la disolución. Al ajustar el pH se ha de tener mucho cuidado al llegar a 6 pues en esta disolución pasa rápidamente de 6 a 12.

- Se suelen preparar 100 ml, dependiendo de las necesidades, para lo cual hará falta disolver 14,61 g de EDTA como se ha explicado.

-Disolución Stock de TRIS-HCl 1 M, pH 7,5:

- Partiendo de TRIS-HCl en polvo se añade la cantidad necesaria, ya pesada, en agua destilada, en el 80% del volumen total que se quiera preparar.

- Se ajusta el pH a 7,5 añadiendo NaOH sólido preferiblemente*, mientras se agita la disolución.

- Después se completa el volumen final de la disolución añadiendo agua destilada.

- Se suelen preparar 250ml, dependiendo de las necesidades, para lo cual hará falta disolver 39,4 g de TRIS-HCl como se ha explicado.

*: explicado en la página anterior.

- Tampón de hibridación:

- 40% (V/V) ** de formamida desionizada.
- 0,9 M ** de NaCl.
- 20 mM de TRIS-HCl, pH 7,5.
- 0,1% (m/V) de SDS (modificado para este estudio, originalmente 0,01%).
- 20% (V/V) de tampón de agente bloqueante [2% (m/V) final de agente bloqueante].
- Se filtra primero por filtros de 3 μm o mayores, puesto que es muy viscoso y finalmente por filtro de jeringa de 0,2 μm de diámetro de poro.
- Se almacena a -20°C .
- Se suelen preparar 10-50 ml según la cantidad de hibridaciones a realizar.

- Tampón de agente bloqueante:

- 10% (m/V) agente bloqueante disuelto en tampón de ácido málico, pH 7,5.

** : estas concentraciones aseguran la astringencia necesaria de la disolución para que las temperaturas de hibridación y de lavado estén por debajo de la de temperatura de fusión (T_m) de las sondas. Esto hace posible la unión entre estas y las hebras de los ARNr objetivos minimizando las uniones inespecíficas. Por tanto estas concentraciones, así como la temperatura de la reacción de hibridación y las de lavado, variarán en función de las sondas empleadas. En caso de que nos encontremos con la necesidad de variar la astringencia de la hibridación es preferible jugar con el contenido de formamida antes que con la temperatura de las reacciones o la concentración de NaCl, teniendo en cuenta que un aumento del 0,7% en la concentración de formamida (que reduce el T_m de los ácidos nucleicos alterando su carga y favoreciendo que se mantengan en estado unicitenario) equivale al efecto causado por un incremento de 1°C de la temperatura de reacción.

- Tampón de ácido málico:

- 100 mM de ácido málico.
- 150 mM de NaCl.
- Ajustar pH a 7,5 añadiendo NaOH, sólido preferiblemente*.

- Tampón de lavado:

- Su composición es igual a la del tampón de hibridación pero sin formamida, con una concentración de NaCl que le dé una astringencia equivalente y con EDTA (Tabla C.1.) cuando la concentración de formamida empleada sea >20% (V/V).
- 56 mM** de NaCl.
- 5 mM de EDTA.
- 20 mM de TRIS-HCl, pH 7,5.
- 0,1% (m/V) de SDS (modificado para este estudio, originalmente 0,01%).
- Se suele preparar 1 litro, aunque depende de la cantidad de hibridaciones a realizar.

* y **: explicados en las páginas anteriores.

| % Formamida | [NaCl] (M) | NaCl por 50mL (ml) |
|-------------|------------|--------------------|
| 0 | 0,900 | 9,000 sin EDTA |
| 5 | 0,636 | 6,300 sin EDTA |
| 10 | 0,450 | 4,500 sin EDTA |
| 15 | 0,318 | 3,180 sin EDTA |
| 20 | 0,225 | 2,150 sin EDTA |
| 25 | 0,159 | 1,490 con EDTA |
| 30 | 0,112 | 1,020 con EDTA |
| 35 | 0,080 | 0,700 con EDTA |
| 40 | 0,056 | 0,460 con EDTA |
| 45 | 0,040 | 0,300 con EDTA |
| 50 | 0,028 | 0,180 con EDTA |

Tabla C.1.: Preparación de tampones de lavado de astringencia equivalente a los de hibridación. Se muestran la concentración de formamida, en porcentaje V/V, a emplear en tampones de hibridación (columna de la izquierda), concentraciones de NaCl, en molares, en tampones de lavado de astringencia equivalente (columna central), y volúmenes, en ml de una disolución stock de 5 M, a añadir para lograr 50 ml de tampón de lavado.

- Tampón TNT:

- 0,1 M TRIS-HCl, pH 7,5.

- 0,15 M NaCl.

- 0,05% (V/V) Tween 20[®].

- Se suele preparar 1 litro aunque depende de la cantidad de hibridaciones a realizar.

- Mezcla TSA:

- Se prepara una mezcla de sulfato dextrano 40% (m/V, disuelto en agua a 70°C) y diluyente de amplificación de TSA-Direct kit (NEN Life Science Product Inc., Boston, MA, EE. UU.) en una proporción de 1:1.

- A esta solución se le añade fluoresceína-tiramida (suministrada en el mismo kit que el diluyente) en una proporción de 50:1, esto es, se le añade 1 ml de fluoresceína-tiramida a 50 ml de mezcla.

Apéndice D: preparación de medios de cultivo

- Medio Erd-Schreider Modificado:

- Filtrar 1 litro de agua del mismo lugar del agua con el que se realizará la inoculación mediante un filtro de 0,47 o 0,22 μm de tamaño de poro.

- Antes de la pasteurización se añade al agua:
 - 2 ml solución stock de nitrato (5 g de NaNO_3 diluidos en 100 ml de agua destilada).

 - 2 ml solución stock de fosfato (1 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ diluido en 100 ml de agua destilada).

 - 2 ml de extracto de tierra (ver más adelante).

 - 0,5 ml solución stock de Na_2FeEDTA (150 mg de Na_2FeEDTA diluidos en 100 ml de agua destilada).

- Extracto de tierra:

- Se mezcla tierra* pasada por tamiz de 1 mm de luz de maya y agua destilada en una proporción 1:1 (m/V) y se hace una infusión y se esteriliza mediante autoclave.

- El extracto se tamiza de nuevo a través de una red de nylon de 20 μm de ancho de poro y se esteriliza y se esteriliza de nuevo en el autoclave.

- Finalmente se elimina el exceso de partículas mediante centrifugación.

*: Preferiblemente la tierra debe ser humus proveniente de un bosque caducifolio basófilo lejos del efecto de pesticidas, herbicidas u otras fuentes de contaminación. En su defecto, también puede usarse tierra de jardín.

-Medio f/2 (basado en Guillard & Ryther 1962)

- Se filtra 1 litro de agua marina mediante un filtro de 0,47 o 0,22 μm de tamaño de poro.

- Se añade al agua:
 - 1 ml de solución stock de nitrato (7,5 g de NaNO_3 en 100 ml de agua destilada).

 - 1 ml de solución stock de fosfato (0,5 g de NaH_2PO_4 en 100 ml de agua destilada).

 - 1 ml solución stock de silicato (sólo si se cultivan diatomeas, 1,5-3 g $\text{Na}_2\text{SiO}_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada).

 - 2,5 ml de solución stock de germanio (solo cuando se quiera evitar la proliferación de las diatomeas en el cultivo, 0,1 g de GeO_2 en 100ml de agua destilada).

- Posteriormente se esteriliza en el autoclave (opcionalmente se puede substituir por una esterilización mediante filtración).

- Tras enfriarse se añaden 1 ml de solución stock de vitaminas (10 mg de tiamina, 0,1 mg de cianocobalamina y 0,1 mg de biotina en 100 ml de agua destilada) y 1 ml de solución stock de micronutrientes (ver más adelante).

-Solución stock de micronutrientes:

- Se disuelven en 99 ml de agua destilada:
 - 0,436 g de Na_2EDTA

 - 0,315 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- 0,001 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 0,0022 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 0,001 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- 0,018 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

- 1 ml de solución de molibdeno (0,063 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada).



*Este trabajo constituye una aproximación al conocimiento de la diversidad específica de las algas verdes y su importancia relativa en la comunidad fitoplanctónica del estuario del río Jverión. Mediante la quimiataxonomía de pigmentos, se ha observado que las algas verdes más abundantes son las clorofitas y que son dominantes en la fracción picoplanctónica de la parte exterior del estuario durante los meses de verano. En el total de la comunidad predominan las algas con fucoxantina y las criptofitas. En cuanto a la fracción picoplanctónica, estudiada mediante técnicas de epifluorescencia, citometría de flujo y FISH, se observa que entre las algas con ficoeritrina predominan las cianobacterias del género *Synechococcus* y entre las algas sin ficoeritrina, las picofitoeucariotas.*

*En este último grupo destacan las clorofitas, siendo más de 2/3 del total, dominando el orden Mamiellales, cuyo principal representante es el género *Micromonas*. Junto con estas conclusiones se discute en torno a la aplicabilidad de las citadas técnicas para el estudio del picoplancton y se proponen diversas medidas a tomar para una correcta interpretación de sus resultados y/o aplicaciones alternativas que mejorarían su rendimiento. Finalmente, se identifican 13 especies distintas entre las 26 cepas de algas verdes cuya morfología ha sido analizada mediante microscopía óptica y electrónica.*

