



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina

**PROFESOR PATROCINANTE
DR. STEFAN WOELFL
INSTITUTO DE ZOOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

**PROFESOR CO- PATROCINANTE
DR. FRANCISCO ENCINA
ESCUELA DE CS. AMBIENTALES
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO**

**“DETERMINACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD PRIMARIA Y CULTIVO DE
STENTOR ARAUCANUS Y *STENTOR AMETHYSTINUS* PROVENIENTES DE LAGOS
NORD PATAGÓNICOS (39°S- 42° S), BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Título de Biólogo Marino.

**JOVITA SOLEDAD MANCILLA CATALAN
VALDIVIA – CHILE
2007**

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT 1040898. Quisiera agradecer a mi profesor patrocinante Dr. Stefan Woelfl por permitirme trabajar en su laboratorio, como también por el apoyo brindado durante todo el proceso de tesis, pero principalmente por compartir los conocimientos necesarios para la realización de esta tesis, sin duda el paso por el laboratorio de limnología fue una gran escuela que agradezco profundamente. También me gustaría agradecer a Don Raúl por la buena disposición durante esos largos viajes a terreno a Caburgua y por tanto trabajo de taller que no sabía como hacer, pero gracias a el pude cumplir de buena forma. A Don Edwin, muchas gracias por la buena onda y las gratas conversaciones mientras calentaba mi comida y en tantos otros momentos, siga disfrutando de sus asados y de Colo-Colo, como decía la Ana.

Amigos BIMAS, gracias por los buenos momentos entre carretes, terrenos, clases, etc, no con todos hubo una relación estrecha pero cada uno de ustedes formó parte importante de todos estos años en la U. Algunos pasaron a ser mi familia en Valdivia, como mis amigas gallinas *Fer* y *Pollona*, gracias por todas las entretenidas historias vividas, por prestarme un hombro donde llorar y por alegrarme en esos momentos tristes, que no fueron menos durante los años que vivimos juntas y que espero sean muchas más las historias que vivamos juntas durante los años que vienen; junto a ustedes conocí a un grupo de amigas increíbles (Miriam, Pame, Pita y Pliset) que a pesar de la distancia aún nos mantenemos unidas, quizás no con todas, pero las demás están en el corazón. *Carlos*: gallo, no me cabe duda alguna que la vida en la U habría sido un poco aburrida sin tus dramas, siempre con problemas por resolver, a pesar de ello cada vez que te necesité ahí estuviste y aún lo sigues estando, regio ya seremos ricos y famosos y viviremos la vida loca. *Ana*, tan regia estupenda siempre, pusiste el toque de glamour en mi vida, como olvidar nuestras comidas con la Flash (que nos abandonó y se fue a España) y las conversaciones profundas sobre temas importantes como la moda y la farándula internacional, gracias por el apoyo durante la tesis, no tengo duda que seguiremos siendo amigas, los mails y el teléfono todo lo pueden, si uno quiere.

A mi familia, solo me queda decirles que los quiero mucho y darles las gracias por ayudarme siempre. A mis hermanos *José* y *Jaqui*, gracias por cuidarme, contenerme y apoyarme desde niña, ustedes permitieron que no notara el vacío dejado por nuestro papá cuando yo era muy pequeña. *Alex*, *Benja*, *Maca*, mis sobrinitos hermosos que adoro y son un motivo más de alegría en mi vida.

OSITO HERMOSO, gracias por cruzarte en mi camino y hacerme tan feliz, conocerte me hizo descubrir lo grande que es dar amor y recibir por igual (cosa que tenía medio olvidada), hemos pasado por momentos de alegría y tristeza y de todos ellos hemos sabido sacar lo bueno, sin tu apoyo constante no habría podido terminar este proceso con éxito, gracias por ser como eres y estar a mi lado durante ya más de 4 años y que sé serán muchos más.

Para el final he dejado a la persona más importante en mi vida, **MAMITA LINDA** admiro la fortaleza con la que afrontaste la pérdida de mi papá y nos transformaste a mis hermanos y a mi en las personas que hoy somos, gracias por apoyarme siempre en cada cosa que quise emprender y sin cuestionamientos de ningún tipo, solo espero que sientas que todo el esfuerzo hecho valió la pena.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. ABSTRACT.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	9
3.1. Mixotrofia.....	9
3.2. Descripción de <i>Stentor</i>	10
3.3. Distribución Biogeográfica de <i>Stentor</i>	11
3.4. Producción Primaria de <i>Stentor</i>	12
3.5. Hipótesis.....	14
3.6. Objetivo (s) General (s).....	14
3.7. Objetivo (s) Específico (s).....	14
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	15
4.1. Área de Recolección de Muestras.....	15
4.2. Recolección de Muestras.....	16
4.3. Cultivos Stock.....	16
4.4. Alimentación de Cultivos Stock.....	17
4.5. Tasa de Crecimiento.....	18
4.6. Aclimatación de <i>Stentor</i>	19
4.7. Producción Primaria.....	19
4.8. Alcalinidad.....	23
4.9. Clorofila <i>a</i>	25
4.10. N° asimilación.....	26

4.11. Análisis Estadísticos.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Cultivos Stock de <i>Stentor</i>	28
5.2. Producción Primaria de <i>Stentor</i>	32
5.3. Contenido Específico de Chl <i>a</i> de <i>Stentor</i>	38
5.4. Número de Asimilación de <i>Stentor</i>	40
6. DISCUSIÓN.....	46
6.1. Cultivos Stock de <i>Stentor</i>	46
6.2. Producción Primaria de <i>Stentor</i>	48
7. CONCLUSIONES.....	54
8. BIBLIOGRAFÍA.....	55
9. ANEXO.....	61

1. RESUMEN

El objetivo de este estudio es conocer la tasa fotosintética de dos ciliados mixotróficos bajo distintas condiciones ambientales (temperatura y luz), para a futuro poder estimar la relevancia de la nutrición autotrófica para el balance energético de estos ciliados.

La hipótesis a probar es que la tasa fotosintética de ambas especies de *Stentor* presentan un aumento que se relaciona significativamente con la intensidad lumínica y la temperatura.

Durante Agosto del 2005 hasta Enero del 2006 se intentó obtener cultivos stock de ambas especies de *Stentor* y así determinar las condiciones óptimas para su cultivo en laboratorio. Desde Marzo del 2006 a julio del 2006 se investigó la influencia de la luz y la temperatura sobre la producción primaria de *Stentor araucanus* y *Stentor amethystinus*.

Los cultivos stock de ambas especies de ciliados mostraron bajas densidades de individuos (2–4 ind/ml), bajas tasas de crecimiento ($0.018 - 0.037 \mu d^{-1}$), un tiempo generacional lento (3-8 días) y una rápida disminución de individuos, dejando en claro que el manejo de *Stentor* bajo condiciones de laboratorio aún no es óptimo. Siendo *Stentor araucanus* la especie más susceptible a las variaciones en las condiciones de cultivo probadas.

Para la determinación de la producción primaria de *Stentor* se utilizó el método de ^{14}C (Steeman Nielsen, 1952), se realizaron tres réplicas para cada tratamiento. La tasa fotosintética promedio de *S. araucanus* y *S. amethystinus* fue de 2.43 ± 2.0 y 1.10 ± 1.0 ng C ciliado $^{-1} h^{-1}$, respectivamente. El contenido específico de Chl *a* fue de 0.60 ± 0.07 ng Chl *a* ind $^{-1}$ para *S. araucanus* y de 0.66 ± 0.05 ng Chl *a* ind $^{-1}$ para *S. amethystinus*, llevando a números de asimilación de 4.07 ± 3.46 y de 1.68 ± 1.51 [ng C (ng Chl *a* $^{-1}$) h $^{-1}$]. La producción primaria de ambas especies de *Stentor* aumentó con el consecuente aumento en la temperatura de incubación;

así como también las curvas de respuesta a la luz indicaron que se alcanzaron altas tasas fotosintéticas con altas intensidades de luz. Estos resultados obtenidos bajo condiciones controladas en el laboratorio, se reflejan en la distribución vertical de estas especies en la columna de agua descrita por algunos autores que sustentan estos datos.

2. ABSTRACT

The objective of this study is to know the rate photosynthetic of two mixotrophic ciliate under different environmental conditions (temperature and light), to estimate the relevance of autotrophic nutrition for the energetic balance of these ciliated.

The hypothesis to try is that rates photosynthetic of both *Stentor* species present an increase that relates significantly with the photon fluxes and temperature.

During August 2005 to January 2006 it was tried to culture both *Stentor* species in order to determine the optimal culture conditions in the laboratory. The influence of light and temperature on primary production of *Stentor araucanus* and *Stentor amethystinus* was analyzed from March to July 2006.

Both species showed under culture conditions low densities (2–4 ind/ml), low growth rates ($0.018 - 0.037 \mu d^{-1}$), a slow doubling time (3-8 days) and rapid decrease of population size. Therefore, the handling conditions in the laboratory for *Stentor* were not yet optimal. *Stentor araucanus* was very susceptible to varying cultivation conditions.

The method of ^{14}C was utilized for the determination of *Stentor* primary production (Steeman Nielsen, 1952), three replies for each treatment came true. The average photosynthetic rates of *S. araucanus* y *S. amethystinus* was 2.43 ± 2.0 and 1.10 ± 1.0 ng C ciliate $^{-1} h^{-1}$, respectively. Individual Chl *a* content was 0.60 ± 0.07 ng Chl *a* ind $^{-1}$ for *S. araucanus* and 0.66 ± 0.05 ng Chl *a* ind $^{-1}$ for *S. amethystinus*, resulting in assimilation numbers of 4.07 ± 3.46 and 1.68 ± 1.51 [ng C (ng Chl *a* $^{-1}$) h $^{-1}$]. The primary production of both *Stentor* species increased with the temperature. Also, the light response curves indicated that the ciliate achieved its highest photosynthetic rates at high photon fluxes. These results, which were obtained under controlled

laboratory conditions, are consistent with the vertical distribution patterns of *Stentor* in the water column as described by some authors.

3. INTRODUCCION

Los ciliados cumplen un rol importante en el flujo de energía, a través de los ecosistemas pelágicos, ya que son consumidores de bacterias, pico y nanoplancton autotrófico, diatomeas, dinoflagelados y protistas heterotróficos, y ellos son depredados por consumidores tales como zooplancton y peces planctívoros (Pierce & Turner, 1992). Algunas especies de ciliados están capacitadas para llevar a cabo la función fotosintética y a la vez nutrirse de otros organismos, por lo que presentan ventaja comparativa, pudiendo combinar los dos tipos de alimentación y sobrevivir en circunstancias adversas, este tipo de nutrición es denominada mixotrofia.

3.1. MIXOTROFÍA.

La mixotrofia puede ser definida como un tipo de “nutrición mixta”, la cual combina modos de nutrición autotrófica y heterotrófica (Jones, 1994). Esta puede ser vista como una estrategia adaptativa, que provee una alta flexibilidad en el medio ambiente planctónico (Jones, 1994) y puede mejorar el acceso a nutrientes escasos (Nygaard & Tobiesen, 1993) confiriéndole una importancia ecológica. Muchos organismos planctónicos han desarrollado diferentes estrategias de modos de nutrición mixotrófica (Jones, 2000). Una de ellas la tienen los ciliados mixotróficos que son capaces de obtener energía y/ o nutrientes de modo heterotrófico, por medio de la ingestión y posterior digestión de partículas atrapadas dentro de vacuolas alimenticias y utilización de compuestos derivados orgánicos; así como también del modo autotrófico, a través de la utilización de la energía lumínica y nutrientes orgánicos. De esta manera los ciliados mixotróficos pueden sobrevivir en sistemas pobres en nutrientes y ser importantes en sistemas

acuáticos desde el trópico hasta las zonas polares como productores primarios y secundarios (Stoecker, 1992, 1998).

La capacidad fotosintética puede ser adquirida por el secuestro de cloroplastos de la presa ingerida (Tartar, 1961) como es el caso de algunos ciliados oligotrichos y algunos heliozoos o por la posesión de células fotosintéticas mediante endosimbiosis (Reisser *et al.*, 1985; Stoecker & Silver, 1987; Perris *et al.*, 1994) como algunas especies de ciliados del género *Stentor* (*S. polymorphus*, *S. pyriformis*, *S. araucanus*, *S. tartari* y *S. amethystinus*) que aparentemente tienen una asociación estable con algas verdes simbiotes del género *Chlorella*, según sus características fisiológicas y ultraestructurales (Reisser, 1984; Foissner & Woelfl, 1994).

3.2. Descripción de *Stentor*.

Stentor es un ciliado heterotricho que se caracteriza por la forma de los macronúcleos, el color de los gránulos de pigmentos corticales que dan el color característico a cada especie y por la presencia o ausencia de algas simbiotes, su tamaño varía desde 100 μm a sobre 400 μm , su forma es altamente variable debido a la contractibilidad del cuerpo, pueden ser sedentarios o de vida libre (Foissner & Woelfl, 1994). Se alimenta de microalgas, bacterias, flagelados y de otros ciliados. Se han realizado variados intentos de cultivo de estos ciliados heterotrichos bajo diversas condiciones de laboratorio, donde se han obtenido bajas densidades, crecimiento lento y una rápida disminución de individuos. Algunos datos de literatura existentes, son principalmente para *S. amethystinus*. Laude (1995) realizó cultivos con variados tipos de alimento, obteniendo buenos resultados con leche. Individuos sin alimento y con luz sobrevivieron aprox. un mes, contrario a lo encontrado por Prosenz (1994) donde individuos sin alimento murieron dos días después de ser sometidos a estas condiciones. Esto indica que el manejo de *Stentor* bajo

condiciones de laboratorio aún no es fácil. Lo que podría explicarse por la alimentación mixotrófica que poseen algunas especies de *Stentor*, como por ejemplo *Stentor araucanus* y *Stentor amethystinus*.

3.3. Distribución Biogeográfica de *Stentor*.

Ciliados mixotróficos, como *Stentor* y *Ophrydium*, en el hemisferio Sur, habitan los niveles epilimnéticos superiores de lagos temperados ultra/ oligotróficos, que a menudo son evitados por otros organismos planctónicos (Modenutti *et al.*, 2005), pudiendo contribuir substancialmente a la biomasa de ciliados y del zooplancton en sistemas eutróficos y oligotróficos en diversas latitudes (Bienert *et al.*, 1991; Laybourn-Parry *et al.*, 1994, 1997). Además, hay algunas evidencias que la biomasa de las algas endosimbiontes puede igualar o incluso exceder la biomasa del fitoplancton en lagos tropicales, subtropicales y lagos temperados (Hecky & Kling, 1981; Beavert *et al.*, 1988; Bienert *et al.*, 1991; Perris *et al.*, 1994; Laybourn-Parry *et al.*, 1997; Queimaliños *et al.*, 1999), pudiendo contribuir en una fracción importante a la concentración total de Clorofila *a* y conllevar un importante potencial fotosintético.

Grandes ciliados mixotróficos (ej. *Ophrydium*, *Stentor*) han sido descritos en plancton de lagos del hemisferio sur, incluyendo Nueva Zelanda (James *et al.*, 1995), Australia (Laybourn-Parry *et al.*, 1997) y América del Sur (Woelfl, 1995; Modenutti, 1997; Modenutti *et al.*, 1998b; Woelfl & Geller, 2002; Woelfl, 2007). Ciliados como *Stentor*, no son encontrados comúnmente en plancton de lagos del hemisferio norte, que tienden a tener comunidades de ciliados dominadas por taxas de pequeños ciliados, particularmente oligotrichos, peritrichos y scuticociliados (Laybourn-Parry, 1994).

Uno de los sistemas lacustres de América del Sur con gran abundancia de ciliados mixotróficos del género *Stentor* es el comprendido entre los paralelos 39° S y 42° S, en el área occidental Chilena y oriental Argentina, llamados Lagos de la Nord Patagonia o Lagos Araucanos según Thomasson (1963). Estos se caracterizan por poseer un origen glacial común, son profundos, monomícticos, templados, ultra-oligotróficos, muy transparentes, con bajo contenido de iones, nutrientes y baja productividad (Campos, 1984; Pedrozo *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1995). La comunidad planctónica de estos lagos consiste principalmente de diatomeas (*Aulacoseira*), algunos rotíferos y copépodos calanoídeos (Villalobos & Zuñiga; 1991; Soto & Zuñiga, 1991; Modenutti *et al.*, 1998a). En este sistema se ha registrado la presencia de dos especies de ciliados mixotróficos del género *Stentor*. *Stentor amethystinus*, la cual es considerada una especie cosmopolita y *Stentor araucanus*, que solo a sido descrita en lagos profundos y ultraoligotróficos de Sudamérica. Estos son ciliados grandes con un volumen celular vivo de $1.06-2.85 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ (Woelfl & Geller, 2002; Woelfl, 2007).

3.4. Producción Primaria de *Stentor*.

Datos de literatura sobre tasas fotosintéticas de estas dos especies en lagos Nord Patagónicos de Chile son escasos, solo existe información para un lago (Lago Pirehueico), donde se determinó que estos ciliados mixotróficos son importantes durante algunos periodos del año y que durante los blooms la tasa fotosintética de *Stentor* iguala o excede a los otros productores primarios sobre los 10 m. La pregunta crucial es hasta que punto la fotosíntesis de las algas endosimbiontes puede contribuir a la demanda de carbón del hospedero heterotrófico, desacoplando la mixotrofia del suministro de alimentos externos vía cadena alimenticia (Woelfl & Geller, 2002). Estudios en ciliados naturales que contienen algas del género *Chlorella* como

simbiontes en sistemas de agua dulce (Sand- Jensen et al., 1994; Finlay *et al.*, 1996; Laybourn-Parry *et al.*, 1997; Sand- Jensen *et al.*, 1997), indican que la fotosíntesis podría mantener al menos el metabolismo básico de los ciliados, pero no podría sostener un alto crecimiento solo en base a los simbiontes. Es por esto, que para estimar la relevancia de la nutrición autotrófica para el balance energético del ciliado, es necesario conocer su tasa fotosintética, bajo distintas condiciones ambientales.

3.5. Hipótesis.

- La tasa fotosintética de *Stentor* presenta un aumento que se relaciona significativamente con la intensidad lumínica y la temperatura.

3.6. Objetivo (s) General (s).

- Determinar las condiciones óptimas para el cultivo de *Stentor amethystinus* y *Stentor araucanus*, en laboratorio.
- Determinar la tasa fotosintética de *Stentor araucanus* y *Stentor amethystinus* en laboratorio, bajo distintas condiciones de luz y temperatura.

3.7. Objetivo (s) Específico (s).

- Determinar las tasas de crecimiento de ambas especies de *Stentor* en cultivos.
- Medir los parámetros físicos y químicos como temperatura, PAR (Light Photosynthetic Active Radiation), pH y alcalinidad del agua que intervienen en la determinación de la Producción primaria de *Stentor*.
- Determinar el contenido específico de Clorofila *a* de *Stentor araucanus* y *Stentor amethystinus*.
- Determinar el número de asimilación de *Stentor araucanus* y *Stentor amethystinus*.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. Área de Recolección de Muestras.

Se escogió el lago Caburgua ($39^{\circ} 07' \text{LS}$, $71^{\circ} 45' \text{LW}$) (Fig. 1), por poseer ambas especies de *Stentor* (*S.araucanus* y *S.amethystinus*) en abundancias similares. Este lago se ubica en la región precordillerana andina, perteneciendo al distrito de lagos Araucanos del Sur de Chile (Fig. 1). Este es un lago de origen glacial, oligotrófico, monomítico temperado con circulación invernal y estratificación de verano, su altura sobre el nivel del mar es de 505 m. Pertenece a la hoya hidrográfica del Río Toltén, siendo sus aguas vaciadas por el Río Caburgua como su principal efluente, que se une al efluente principal del lago Villarrica (Campos et al., 1987).



Figura1. Sitio de recolección de muestras: Lago Caburgua ($39^{\circ} 07' \text{LS}$, $71^{\circ} 45' \text{LW}$), IX Región, Chile.

4.2. Recolección de Muestras.

Las muestras de *Stentor* fueron colectadas desde Agosto del 2005 hasta Enero del 2006 para los experimentos de cultivo, mientras que las muestras de *Stentor* para los experimentos de producción primaria fueron recolectadas desde Marzo del 2006 a julio del 2006 con una red de plancton de 0.2 μm de apertura de malla, a profundidades de 10 y 20 mt. Siendo posteriormente depositadas en bidones de plástico de 5 L. Conjuntamente se tomaron muestras de agua desde la superficie del lago, las cuales fueron depositadas en bidones de plástico de 5 L. para ser utilizada en los cultivos y en las incubaciones de producción primaria. Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio de Limnología y Química de Aguas del Instituto de Zoología, Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

4.3. Cultivos Stock.

Los experimentos de cultivos de *Stentor araucanus* y *Stentor amethystinus* se llevaron a cabo, principalmente, en microcámaras de cultivo de 10 ml (Fig. 2) y en placas petri de 20 ml, usando agua de lago sin filtrar, filtrada (Filtros Millipore Millex-HV Hydrophilic PVDF 0.45 μm) y filtrada y esterilizada (150 °C x 20 min). Se usó como alimento *Cryptomonas* sp. en dos medios de cultivo diferentes (WC y F2), alimento artificial según APHA (1995) y medio de cultivo WC. Las temperaturas de incubación variaron entre los 10° y 17° C, la intensidad lumínica entre 55 y 370 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y el fotoperíodo entre 12 y 16 hrs. Luz. Para realizar estos cultivos los individuos de *Stentor* eran separados de la muestra original de terreno con ayuda de una micropipeta, bajo una lupa Leica MZ6 y dispuestos en los variados tratamientos de cultivo. Se realizaron alrededor de 562 cultivos con 2 réplicas más un control para cada uno de los tratamientos, con números

iniciales de individuos entre 3 y 10, dependiendo del volumen de cultivo. Todos los cultivos fueron mantenidos en una incubadora Mimet a las condiciones predeterminadas.

Se realizaron conteos diarios de los cultivos con ayuda de una lupa Leica MZ6, durante este periodo se efectuaban los recambios de agua y adición de alimento respectivos a cada tratamiento.

4.4. Alimentación de Cultivos Stock.

Las algas utilizadas como organismos presa (*Cryptomonas* sp.) fueron cultivadas en botellas de vidrio esterilizadas (150 °C x 20 min) usando el medio de cultivo WC y F2 (ver anexo), por separado, y mantenidas en una incubadora Mimet, a las condiciones de luz y temperatura óptimas para cada género de algas, con aireación constante durante todo el cultivo. La concentración de estas algas se monitoreo mediante conteos ocasionales con una cámara de Neubauer, cuando el cultivo se encontraba al comienzo de la fase estacionaria, se tomaba una alícuota de este cultivo para comenzar uno nuevo.

El alimento artificial utilizado para los cultivos, se preparó según el APHA, 1995, diluyendo 6.3 gr de pellets de harina de pescado, 2.6 gr de levadura molida y 0.5 gr de alfalfa molida en 500 ml de agua destilada. Se agitó durante una hora y se puso al refrigerador por otra hora más. El sobrenadante es el que se utilizó como alimento y el resto se eliminó.

El medio de cultivo WC usado como alimento para los ciliados fue el mismo utilizado para el cultivo de microalgas.

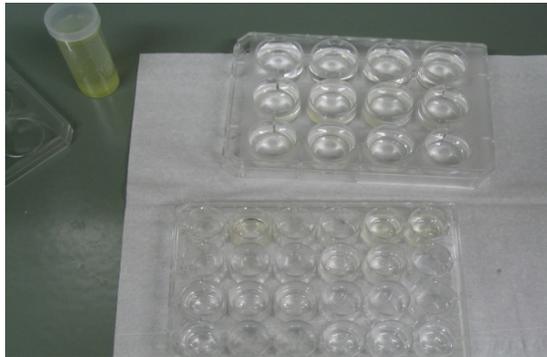


Figura 2. Microcámaras de cultivo.

4.5. Tasa de Crecimiento.

Para determinar la tasa de crecimiento de los ciliados se tomó como N final, el mayor número de individuos obtenidos durante el cultivo, cuando no existía crecimiento se tomó el número inicial de ciliados y el tiempo que se mantuvo ésta concentración. La tasa de crecimiento se calculó usando la fórmula:

$$\mu = \frac{\text{LN}(N_f) - \text{LN}(N_i)}{T}$$

Donde:

μ = Tasa de crecimiento (ind d^{-1}).

$\text{LN}(N_i)$ = Logaritmo natural del número inicial de ciliados.

$\text{LN}(N_f)$ = Logaritmo natural del número final de ciliados.

T = Tiempo (días).

4.6. Aclimatación de *Stentor*.

Los individuos de *Stentor* utilizados en cada incubación de Producción Primaria provenientes de terreno, fueron previamente aclimatados por dos días a la temperatura deseada. Para ello se seleccionaron aprox. 1000 individuos de cada especie de *Stentor* bajo una lupa Leica MZ6, con ayuda de una micropipeta. Estos fueron mantenidos en una botella plástica transparente con 500 ml de agua de lago sin filtrar, tapada con un orificio en la tapa para permitir el intercambio gaseoso. En una incubadora Mimmet, con aprox. $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperíodo de 12 hrs. luz y 12 hrs. Oscuridad. El agua de lago filtrada ($0.2 \mu\text{m}$) utilizada en cada incubación fue mantenida en una botella de vidrio de 1 L. en las mismas condiciones que los individuos de *Stentor*.

4.7. Producción Primaria.

Las tasas de producción primaria bajo condiciones de laboratorio de *Stentor araucanus* y *Stentor amethystinus* fueron medidas a diferentes niveles de irradiación lumínica (0, 8.5, 17.5, 40, 62.5, 134, 183, 214, 276.5, 361.5, 401.5 y $500 \mu\text{M fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y dos temperaturas $14^\circ (\pm 1^\circ\text{C})$ y $20^\circ\text{C} (\pm 1^\circ\text{C})$, usando la técnica del ^{14}C (Steeman Nielsen, 1952), realizando tres réplicas para cada tratamiento.

Para cada incubación fueron seleccionados 240 individuos de *Stentor*, previamente aclimatados, con ayuda de una micropipeta bajo una lupa Leica MZ6. Estos fueron incubados en botellas negras (Incubator flasks, Hydrobios, Alemania) con distintos porcentajes de transmisión de luz (0, 1.7, 3.5, 8, 12.5, 26.8, 36.6, 42.8, 55.3, 72.3, 80.3, 100 %) que permitieron los diferentes niveles de irradiación lumínica, cada una de las botellas contenían 60 ml de agua de lago filtrada sobre filtros de membrana de $0.2 \mu\text{m}$, 20 individuos de *Stentor* y $15 \mu\text{l}$ de ^{14}C (Fig.

3a). Estas botellas fueron fijadas a una rueda (Fig. 3b), la cual fue puesta en un acuario de 50 X 51X 21 cm. que contenía 50 lts de agua destilada y se mantuvo girando constantemente durante todo el tiempo que duró la incubación. La luz fue provista por dos paneles de luces fluorescentes (Fig. 3c). Después de 3 horas, se daba por terminada la incubación y los individuos de *Stentor* de cada botella eran separados con ayuda de una micropipeta, siendo posteriormente filtrados al vacío sobre filtros de membrana de 0.2 μm , estos filtros eran puestos en una rejilla de plástico, para una cómoda manipulación en los procesos siguientes (Fig.3d). Posteriormente se procedía a fotografiar cada filtro con una cámara digital CANON Powershot 7.0 y registrar el número de *Stentor* en cada uno de ellos, bajo una lupa Leica MZ6 (Fig. 3e y 4a).

Para remover el remanente de $^{14}\text{C-CO}_2$ de los filtros con *Stentor*, estos eran puestos por 1 hr. en HCl fumeante y ventilados por aprox. 1 hr más para evitar errores en la medición (Fig. 4b).

Para determinar la cantidad de ^{14}C añadido (como DPM); antes de filtrar la muestra y después de la incubación se extrajo 1ml de agua, el cual se vertió en un vial de centelleo junto con 20 μl de NaOH 1N y 2 ml de cóctel de centelleo (quickszint) (Fig. 4c).

Para determinar el carbón asimilado de *Stentor* (como DPM), cada uno de los ciliados fue cortado de los filtros con ayuda de un bisturí y agregados a un vial de centelleo con 2 ml de Filter Count (cóctel de centelleo) (Fig. 4c).

Tanto el agua como los filtros fueron medidos en un contador de centelleo Beckman LS 5000CE por 15 min. cada vial.

Para determinar la tasa fotosintética de *Stentor* a cada nivel de irradiación lumínica se usó la fórmula:

$$PP = [(DPM_{\text{asimilado}/Stentor}/DPM_{\text{añadido}})] * (DIC/1000) * (1.06/Tiempo) * 1000$$

Donde:

PP = Producción Primaria de *Stentor* (ngC ind⁻¹ h⁻¹).

DPM_{asimilado/ Stentor} = Destellos por minuto de cada filtro/ N° *Stentor* en cada filtro.

DPM_{añadido} = Destellos por minuto del agua de incubación.

DIC = Carbono Inorgánico Disuelto (mg DIC m⁻³).

1.06 = Factor de discriminación del isótopo.

Tiempo = Horas de incubación.

Factores 1000 = Conversión de ng a µg.

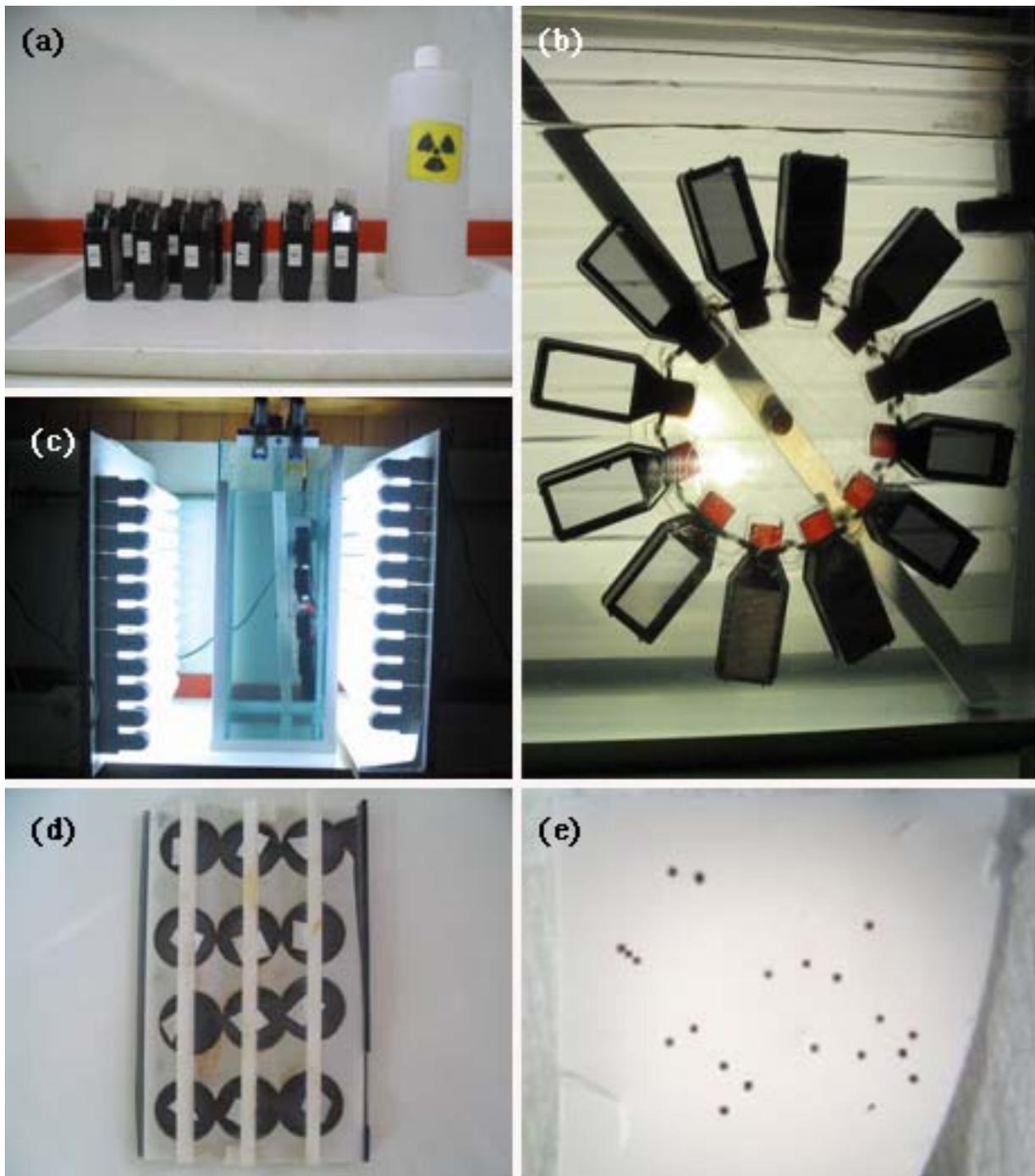


Figura 3. (a) Botellas de incubación con distintos niveles de irradianza. (b) Rueda con Botellas de incubación. (c) Incubación de producción primaria. (d) Rejilla de plástico con los doce filtros de $0,2 \mu\text{m}$ con individuos de *Stentor*. (e) Filtro de $0,2 \mu\text{m}$ con individuos de *Stentor amethystinus*.

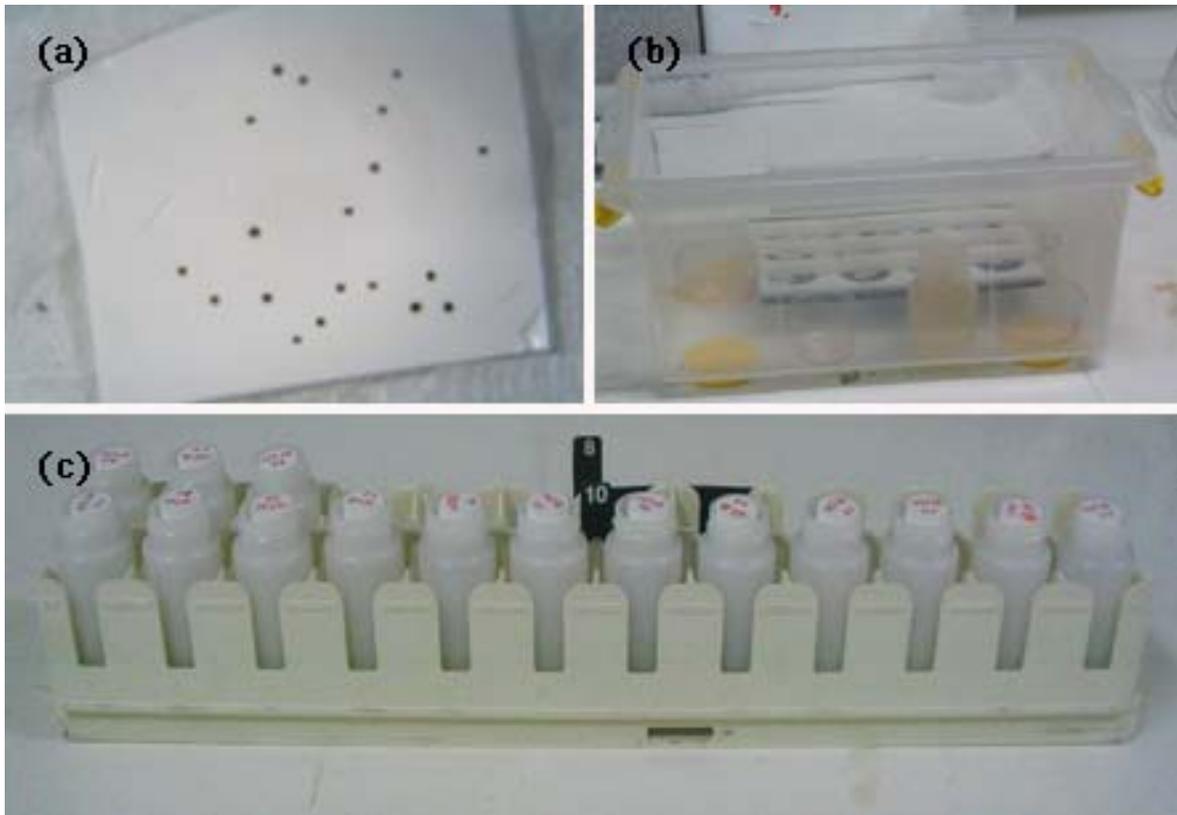


Figura 4. (a) Filtro de 0,2 μm con individuos de *Stentor araucanus*. (b) Filtros en HCl fumeante. (c) Viales de centelleo con filtros con *Stentor* y agua de incubación.

4.8. Alcalinidad.

La alcalinidad se determinó usando el método de titulación de Gran, para lo cual se tomaron 100 ml. de agua de lago filtrada por filtros de membrana de 0.2 μm y aclimatada y se procedió a titular con HCl 0,1 N hasta pH 4.25, ya que a este pH todo el carbono inorgánico disuelto está en forma de CO_2 . Se registraron cuatro valores bajo pH 4.25. Adicionalmente se registró la temperatura y el pH inicial de la muestra de agua.

Para establecer el punto final de titulación de forma precisa, lo primero fue determinar la función Gran, la cual es una medida del número de moles de H^+ agregados a la muestra de agua, después que el punto final de titulación ha sido alcanzado y se calcula con la fórmula:

$$F_1 = (V_{\text{orig}} + V_{\text{titr}}) \{H^+\} = (V_{\text{orig}} + V_{\text{titr}}) (10^{-\text{pH}})$$

Donde:

F_1 = Función Gran.

V_{orig} = Volumen de la muestra de agua filtrada (ml).

V_{titr} = Volumen de ácido agregado a la muestra (ml).

$10^{-\text{pH}}$ = Antilogaritmo del pH.

Una vez obtenida la función Gran, se graficó F_1 v/s Volumen de ácido agregado a la muestra (L) y se realizó una regresión lineal. Luego mediante la ecuación de la recta se determinó el interfecto en Y ($X = 0$) que corresponde al volumen final de titulación (V_{end}).

Para calcular la alcalinidad total se utilizó la fórmula:

$$AT = [(Concentración\ del\ ácido * V_{\text{end}}) / (V_{\text{orig}})] * 1000$$

Donde:

AT = Alcalinidad total (meq L^{-1}).

V_{end} = Volumen final de titulación (L).

V_{orig} = Volumen de la muestra (L).

La alcalinidad de los carbonatos se calculó empleando la fórmula:

$$AC = AT - (D/10000)$$

Donde:

AC = Alcalinidad de los carbonatos (meq L⁻¹).

AT = Alcalinidad total (meq L⁻¹).

D = Factor de corrección, que corresponde a la fuerza iónica del agua.

Para obtener el DIC, se usó la fórmula:

$$DIC = AC * F * 12 * 1000$$

Donde:

DIC = Carbono Inorgánico Disuelto (mg DIC m⁻³)

AC = Alcalinidad de los carbonatos (meq L⁻¹)

F = Factor de corrección, que corresponde a la cantidad de carbono presente como CO₂ libre.

4.9. Clorofila *a*.

La determinación del contenido de clorofila *a* se realizó según el APHA 10200H. Para lo cual, en cada incubación de Producción Primaria, se separaron 50 individuos de *Stentor* aclimatados, bajo una lupa Leica MZ6 con ayuda de una micropipeta. Posteriormente los individuos fueron fijados en 3 ml de acetona al 90% en frascos de plástico oscuros y mantenidos por 24 hrs. a 4°C. Luego de este tiempo el contenido de cada frasco era tomado con una jeringa y

filtrado a través de un filtro de membrana de 0,2 μm y medido en un espectrofotómetro (Shimadzu Seisakusho Ltd.,Tokio, Japón) a 750, 664, 647 y 630 nm.

El contenido de clorofila *a* de *Stentor* se determinó con la fórmula:

$$\text{Chl } a = ([11.85 (664-750) - 1.54 (647-750) - 0.08 (630-750)] \text{ VA/VM})/\text{N}^\circ \text{ Stentor}$$

Donde:

Chl *a* = Contenido de clorofila *a* por individuo (ng Chl *a* ind⁻¹)

VA = Volumen de Acetona (ml)

VM = Volumen de la muestra (L)

De las tres réplicas realizadas por cada incubación de producción primaria, una fue eliminada por presentar un valor significativamente mayor o menor a la media de los valores obtenidos.

4.10. N° de asimilación.

Para obtener el N° de asimilación de *S. araucanus* y *S. amethystinus* se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ ass} = \text{PP} / \text{Chl } a$$

Donde:

N° ass = N° asimilación de *Stentor* [ng C (ng Chl *a*⁻¹) h⁻¹].

PP = Producción Primaria de *Stentor* (ngC ind⁻¹ h⁻¹).

Chl *a* = Contenido de clorofila *a* por individuo (ng Chl *a* ind⁻¹).

4.11. Análisis Estadísticos.

Para determinar la significancia de la luz y la temperatura sobre la producción primaria de *Stentor*, como también la significancia de la Chl *a* y de la asimilación, se usó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (nivel de significancia $P < 0.05$), con el programa estadístico Statgraphic Plus 5.1 y para realizar los distintos gráficos se usó el programa Sigmaplot 8.0. En todos los análisis estadísticos la normalidad y homocedasticidad fueron puestas a prueba, dando una distribución no normal aún luego de ser normalizados los datos.

5. RESULTADOS

5.1. Cultivos Stock de *Stentor*.

Para el caso de *S. araucanus* pocos tratamientos fueron efectivos, ya que solo algunos fueron capaces de lograr un incremento de la población por sobre el 100 %. La tendencia general de las curvas fue la de declinar desde un comienzo o luego de alcanzar un peak. Los resultados más importantes se observaron en cultivos realizados en placas petri con agua de lago filtrada y esterilizada, usando alimento artificial, como alimento principal y bajo condiciones de temperatura de 16° C, luminosidad de 250 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y fotoperíodo de 15:9 (Fig. 5). Este resultado es ratificado por la tasa de crecimiento promedio que presenta el alimento artificial (0.018 ± 0.01) en comparación con los otros tipos de alimento utilizado (Fig. 6). El crecimiento fue muy lento con un tiempo generacional de siete días aproximadamente. La densidad inicial de los cultivos fue de 1 ind/ml y la densidad máxima que se alcanzó a obtener antes de producirse una disminución de *Stentor* en los cultivos fue de 2 ind/ml. En general, los organismos lograron sobrevivir alrededor de un mes en el tratamiento apropiado y mostraron ser muy susceptibles independiente de las condiciones en las que se conserve el cultivo.

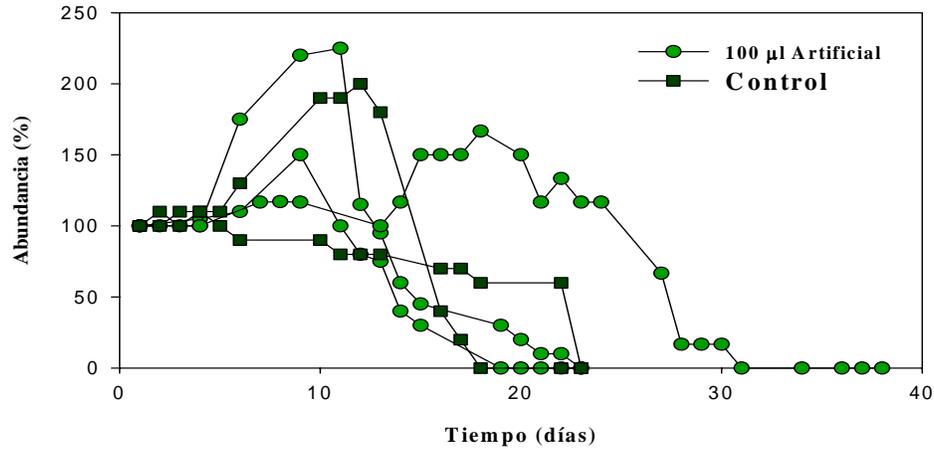


Figura 5. Abundancia (%) de *S. araucanus* en experimentos de cultivo.

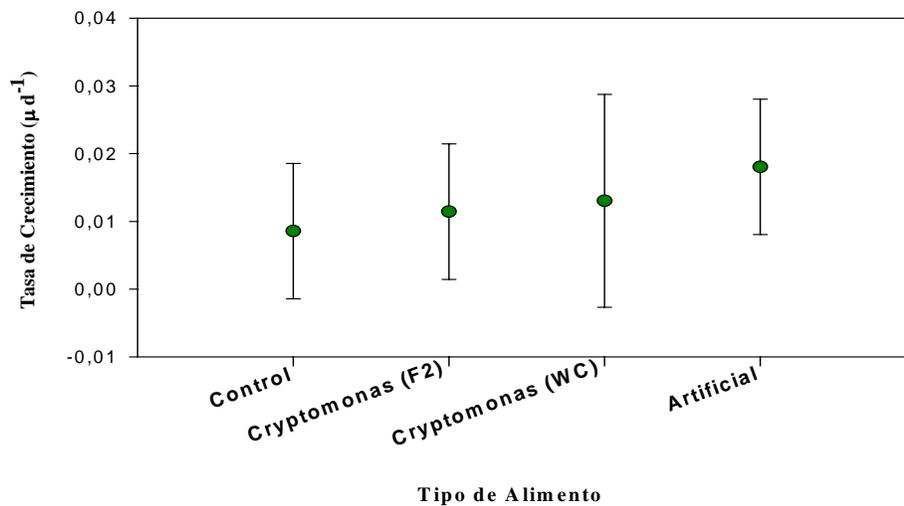


Figura 6. Tasa de Crecimiento promedio de *S. araucanus* con los distintos tipos de alimentos usados. Se muestra X + DS.

Se llevaron a cabo más tratamientos de cultivo de *S. amethystinus* debido a que ésta especie presentó más resistencia frente a las condiciones de laboratorio. En general la tendencia de las curvas de crecimiento fue similar a las de *S. araucanus*, mostrando un peak alrededor de los diez días y declinando posteriormente. El crecimiento fue lento con un tiempo generacional

de 3-8 días. La densidad inicial de los cultivos fue de 1 ind/ml y la densidad máxima que se alcanzó a obtener antes de producirse una disminución de *Stentor* en los cultivos fue de 3-4 ind/ml. En general, los organismos lograron sobrevivir alrededor de un mes en el tratamiento apropiado.

Se obtuvieron dos tratamientos medianamente efectivos, el primero realizado en microcámaras de cultivo con agua sin filtrar usando *Cryptomonas* sp. en medio de cultivo F2, como alimento principal y bajo condiciones de temperatura de 13°C, luminosidad de $55 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y fotoperíodo de 12:12. El segundo fue efectuado en placas petri con agua filtrada y esterilizada, usando alimento artificial, como alimento principal y bajo condiciones de temperatura de 16° C, luminosidad de $338 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y fotoperíodo de 15:9 (Fig. 7), este último mostró ser más efectivo que el primero, ya que mostró resultados constantes en cada réplica realizada, densidades máximas mayores que el primero y un tiempo generacional menor. El alimento artificial además presentó la mayor tasa de crecimiento promedio (0.0372 ± 0.04), seguido por *Cryptomonas* sp. en medio de cultivo F2 (0.0325 ± 0.05) confirmando los resultados obtenidos (Fig. 8).

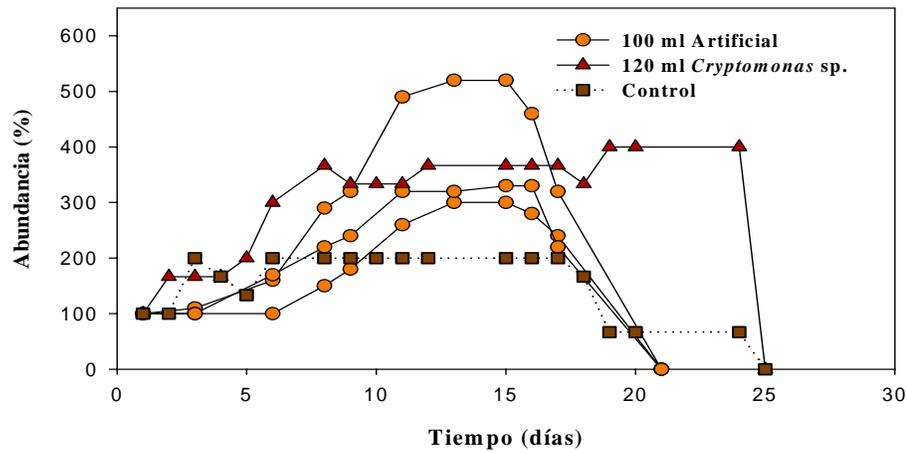


Figura 7. Abundancia de *S. amethystinus* en experimentos de cultivo.

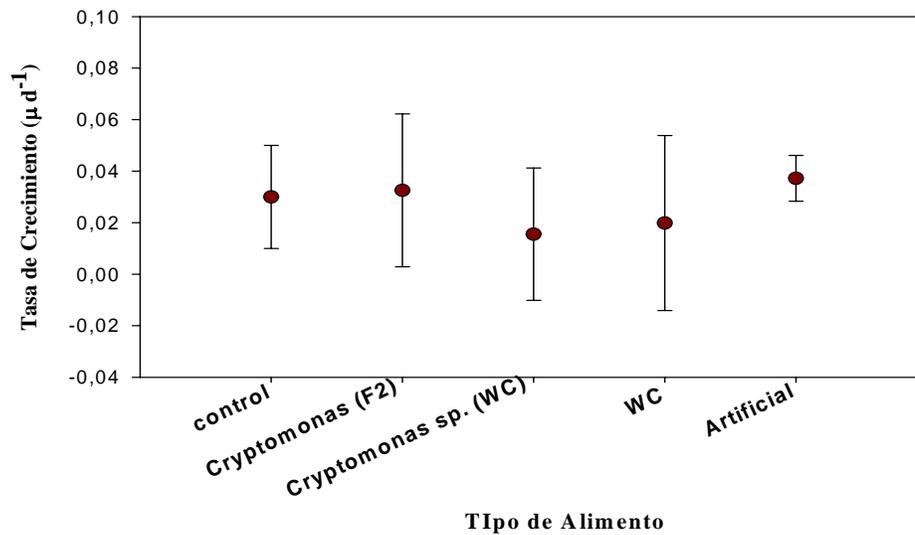


Figura 8. Tasa de Crecimiento promedio de *S. amethystinus* con los distintos tipos de alimentos usados. Se muestra X + DS.

Se observó una relación inversamente proporcional entre la concentración de alimento suministrado y la abundancia de los individuos, ya que a medida que se aumentó la concentración de alimento la abundancia de los individuos fue menor, independiente del tratamiento utilizado.

Tanto *S. araucanus* como *S. amethystinus* pueden sobrevivir más tiempo cuando no son sometidos a pruebas y solo son mantenidos en bidones plásticos con agua de lago sin filtrar, en una incubadora. Fue por ello que se utilizaron los ciliados traídos directamente desde terreno para las mediciones de producción primaria luego de pasar por un periodo de aclimatación.

5.2. Producción Primaria de *Stentor*.

S. araucanus tuvo una producción primaria promedio de 2.43 ng C ciliado⁻¹ h⁻¹. Los mayores valores de producción primaria se alcanzaron entre los 214 y 500 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Fig. 9) siendo su $P_{\text{máx}}$ 8.75 ng C ciliado⁻¹ h⁻¹ a los 214 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, en el tratamiento a 20°C.

La producción primaria de *S. araucanus* incrementó con los doce niveles de intensidad lumínica utilizados, sin alcanzar niveles de saturación. Esta presentó una relación estadísticamente significativa con los niveles de irradiación lumínica (Kruskal- Wallis, $P = 0.0$) (fig. 9). Para determinar que tratamientos difirieron unos de otros, se realizó un test de rangos múltiples el que arrojó que los 0, 8.5 y 62.5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ fueron los que presentaron diferencia con 8 niveles de intensidad lumínica, mientras que los 183, 214 y 276.5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ solo exhibieron diferencias significativas con 5 niveles de luz (Tabla 1).

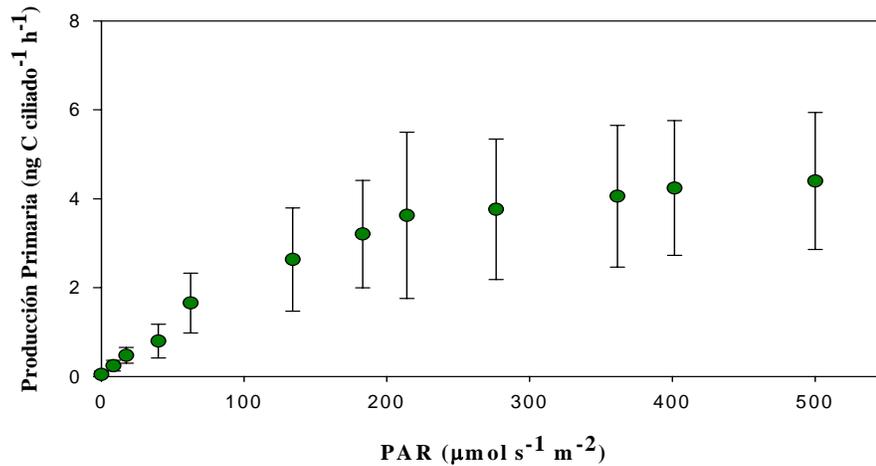


Figura 9. Curva de Producción Primaria promedio (N = 216) v/s luz de *S. araucanus*. Se muestra X + DS.

Tabla 1. Diferencias significativas entre los 12 niveles de intensidad lumínica usados para *S. araucanus*.

	0	8,5	17,5	40	62,5	134	183	214	276,5	361,5	401,5	500
0	X				*	*	*	*	*	*	*	*
8,5		X			*	*	*	*	*	*	*	*
17,5			X		*	*	*	*	*	*	*	*
40				X	*	*	*	*	*	*	*	*
62,5					X	*	*	*	*	*	*	*
134						X				*	*	*
183							X					
214								X				
276,5									X			
361,5										X		
401,5											X	
500												X

* Denota una diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza.

La producción primaria de *S. araucanus* también presentó una relación estadísticamente significativa con ambos niveles de temperatura utilizados (Kruskal- Wallis, $P = 0.089$). A los

14°C exhibió valores de 0.03 ± 0.01 a 3.60 ± 1.25 ng C ciliado⁻¹ h⁻¹, mientras que a los 20°C fue de 0.06 ± 0.1 a 5.20 ± 1.5 ng C ciliado⁻¹ h⁻¹ (Fig. 10). Siendo significativamente más alta la tasa fotosintética de *S. araucanus* a los 20°C que a los 14°C (Tabla 3).

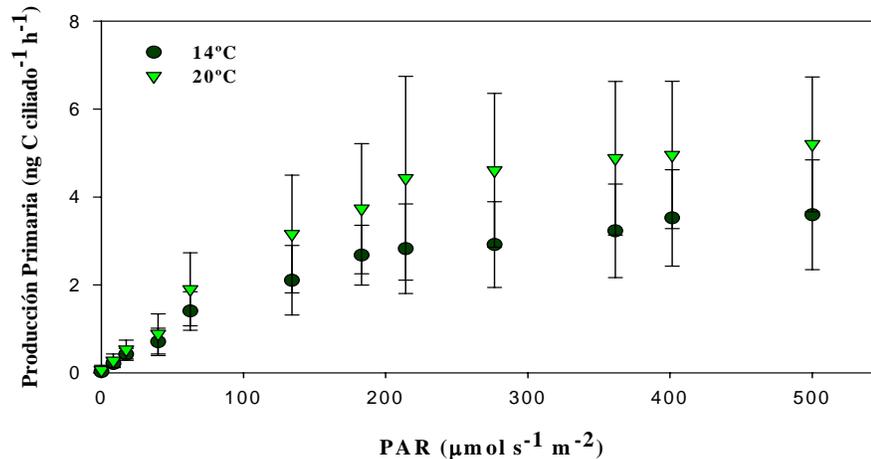


Figura 10. Producción Primaria de *S. araucanus* a 14°C y 20°C v/s intensidad lumínica. Se muestra X + DS.

S. amethystinus tuvo una tasa fotosintética promedio de 1.10 ng C ciliado⁻¹ h⁻¹. Entre los 276.5 y 500 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ se observaron los mayores valores de producción primaria (Fig.12), siendo su $P_{\text{máx}}$ 3.24 ng C ciliado⁻¹ h⁻¹ a los 361.5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, en el tratamiento a 20°C.

S. amethystinus exhibió una relación estadísticamente significativa con las dos temperaturas de incubación usadas (Kruskal- Wallis, $P = 0.0008$). Su tasa fotosintética fue significativamente mayor a los 20 °C que a los 14°C (Tabla 3). A los 14° C la producción primaria fue de 0.02 ± 0.02 a 1.53 ± 0.98 y a los 20°C fue de 0.02 ± 0.01 a 2.52 ± 0.41 (Fig. 11).

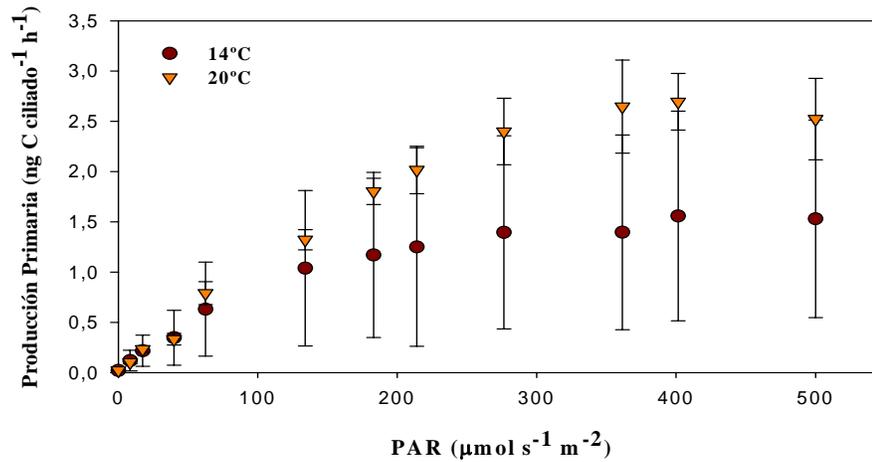


Figura 11. Producción Primaria de *S. amethystinus* a 14°C y 20°C v/s intensidad lumínica. Se muestra X + DS.

S. amethystinus también presentó una relación estadísticamente significativa con los diferentes niveles de PAR (Kruskal- Wallis, $P = 0.0$), ya que al igual que *S. araucanus* su producción primaria aumentó con los doce tratamientos de PAR utilizados, sin alcanzar niveles de saturación (Fig. 12). De igual forma se efectuó un test de rangos múltiples, siendo los 0, 8.5 y 17.5 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ los que presentaron el mayor número de diferencias, 7 en total y 134 y 183 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ los niveles de PAR que exhibieron el menor número de diferencias con solo 4 tratamientos (Tabla 2).

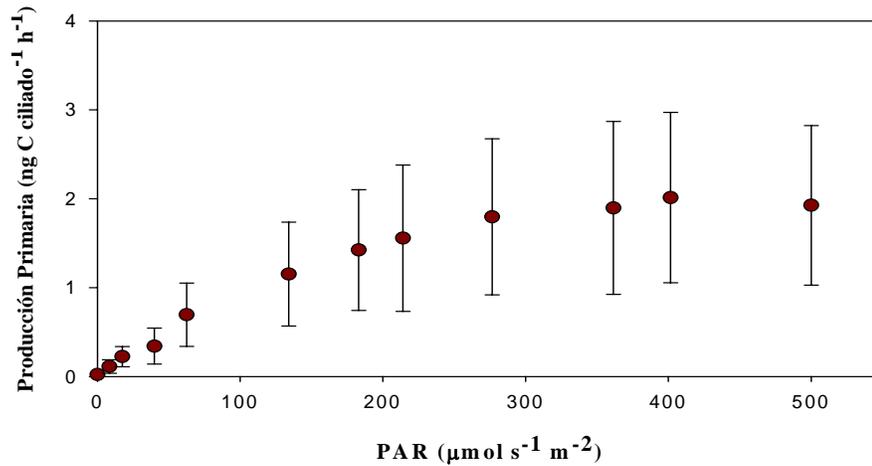


Figura 12. Curva de Producción Primaria promedio (N = 180) v/s luz de *Stentor amethystinus*. Se muestra X + DS.

Tabla 2. Diferencias significativas entre los 12 niveles de intensidad lumínica usados para *Stentor amethystinus*.

	0	8,5	17,5	40	62,5	134	183	214	276,5	361,5	401,5	500
0	X					*	*	*	*	*	*	*
8,5		X				*	*	*	*	*	*	*
17,5			X			*	*	*	*	*	*	*
40				X			*	*	*	*	*	*
62,5					X			*	*	*	*	*
134						X					*	
183							X					
214								X				
276,5									X			
361,5										X		
401,5											X	
500												X

* Denota una diferencia estadísticamente significativa al 95% de confianza.

Al comparar ambas especies, *S. araucanus* presentó una tasa fotosintética significativamente mayor que *S. amethystinus* tanto a 14 °C (Kruskal- Wallis, $P = 1.46\text{E}-8$) como

a 20° C (Kruskal- Wallis, $P = 0.00001$), siendo la producción de *S. araucanus* un poco más del doble de la de *S. amethystinus* tanto a 14°C como a 20°C (Fig. 13 y 14).

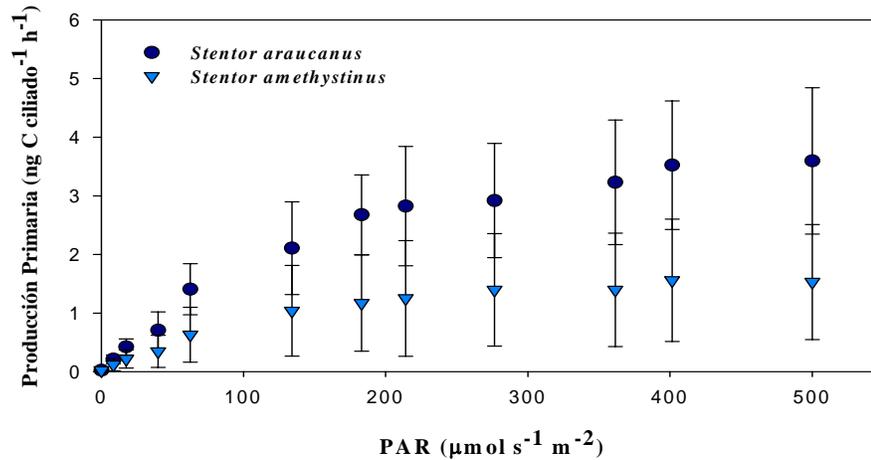


Figura 13. Producción Primaria a 14°C de ambas especies de *Stentor* v/s Luz. Se muestra X + DS.

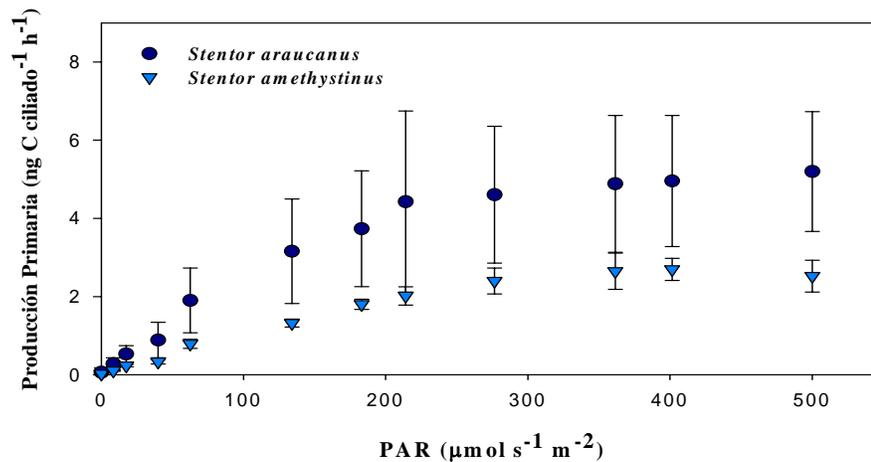


Figura 14. Producción primaria a 20°C de ambas especies de *Stentor* v/s Luz. Se muestra X + DS.

Tabla 3. Producción Primaria, contenido de Chl *a* y N° de Asimilación de ambas especies de *Stentor*, a las dos temperaturas y los doce niveles de luz.

	<i>Stentor araucanus</i>		<i>Stentor amethystinus</i>	
	14°C	20°C	14°C	20°C
PP (ng C ciliado ⁻¹ h ⁻¹)	1.99 ± 1.5	2.84 ± 1.9	0.89 ± 0.8	1.41 ± 1.0
PP Promedio (ng C ciliado ⁻¹ h ⁻¹)	2.43 ± 2.0		1.10 ± 1.0	
Chl <i>a</i> (ng Chl <i>a</i> ind ⁻¹)	0.63 ± 0.08	0.58 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.66 ± 0.07
Chl <i>a</i> Promedio (ng Chl <i>a</i> ind ⁻¹)	0.60 ± 0.07		0.66 ± 0.05	
Asimilación (ng C (ng Chl <i>a</i> ⁻¹))	3.15 ± 2.4	4.98 ± 4.06	1.38 ± 1.38	2.13 ± 1.59
Asimilación Promedio (ng C (ng Chl <i>a</i> ⁻¹))	4.07 ± 3.46		1.68 ± 1.51	

5.3. Contenido Específico de Clorofila *a* de *Stentor*.

El contenido individual de Chl *a* de *S. araucanus* alcanzó los 0.63 (± 0.08) ng Chl *a* ciliado⁻¹ a los 14°C, mientras que a los 20°C alcanzó los 0.58 (± 0.04) ng Chl *a* ciliado⁻¹ (Tabla 3), no existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre los dos niveles de temperatura utilizados (Kruskal-Wallis test: $P = 0.52$).

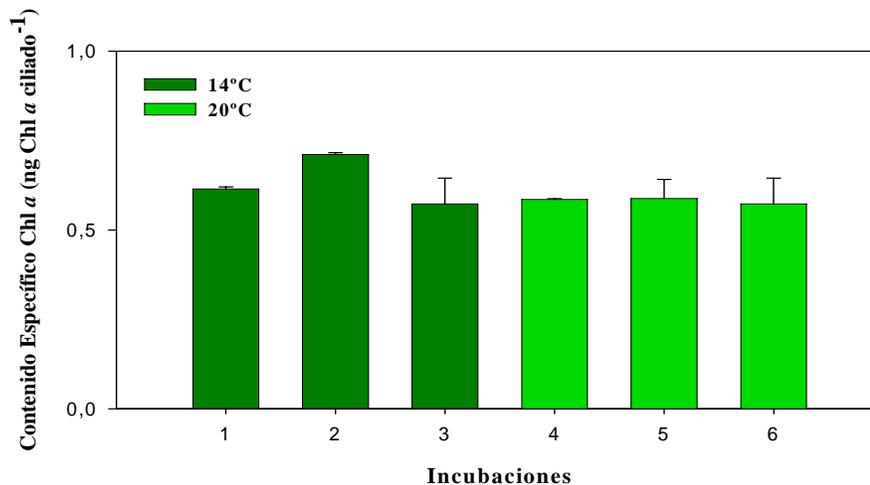


Figura 15. Contenido específico de Chl *a* de *S. araucanus* en las seis incubaciones realizadas.

S. amethystinus tuvo un contenido específico de Chl *a* igual tanto a los 20°C como a los 14°C, alcanzando valores promedio de 0.66 (\pm 0.05) ng Chl *a* ind⁻¹ y 0.66 (\pm 0.07) ng Chl *a* ind⁻¹, respectivamente (Tabla 3). Por lo que no existió una relación estadísticamente significativa entre las temperaturas usadas (Kruskal-Wallis test: $P = 0.76$).

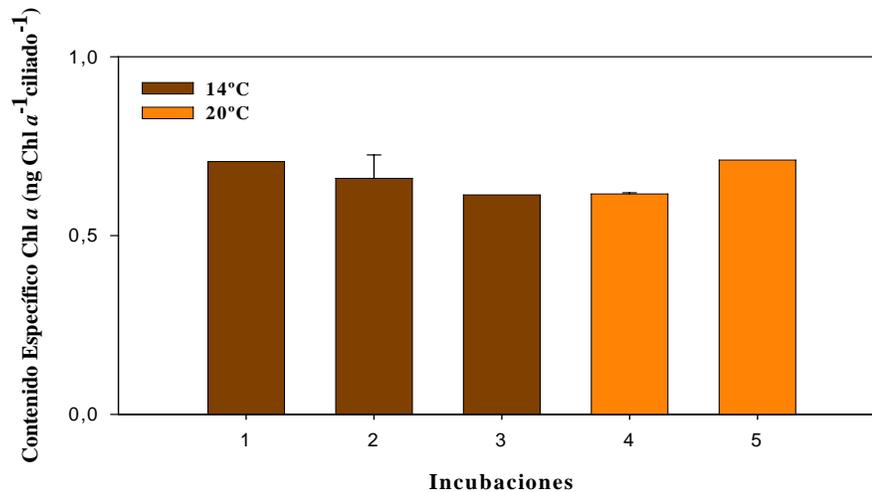


Figura 16. Contenido específico de Chl *a* de *S. amethystinus* en las cinco incubaciones realizadas.

A los 14°C, *S. amethystinus* presentó un contenido específico de Chl *a* que no fue significativamente mayor que el de *S. araucanus* (Kruskal-Wallis test: $P = 0.50$), al igual que a los 20°C (Kruskal-Wallis test: $P = 0.07$). Pero en general el contenido individual de Chl *a* de *S. amethystinus* fue superior que el de *S. araucanus* en las incubaciones realizadas (Fig. 17).

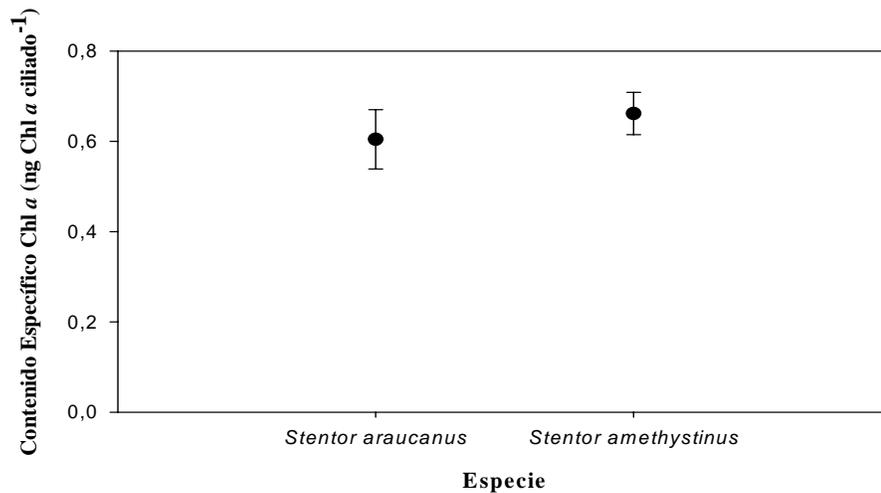


Figura 17. Chl *a* promedio de ambas especies de *Stentor* utilizadas en las incubaciones de producción primaria. Se muestra X + DS.

5.4. Número de Asimilación de *Stentor*.

El número de asimilación de *S. araucanus* fue mayor a los 20°C que a los 14°C con valores que fueron desde los 0.011 ± 0.19 a 8.92 ± 2.79 [$\text{ng C (ng Chl } a^{-1}) \text{ h}^{-1}$] y 0.04 ± 0.02 a 5.79 ± 2.32 [$\text{ng C (ng Chl } a^{-1}) \text{ h}^{-1}$], respectivamente (Fig.18). El valor más alto de asimilación fue de 15.29 [$\text{ng C (ng Chl } a^{-1}) \text{ h}^{-1}$] a los $214 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ en el tratamiento a 20°C. Al comparar los valores de producción primaria v/s N° de asimilación de *S. araucanus* se pudo ver que la asimilación casi dobló a la producción primaria, para las dos temperaturas usadas (Fig. 19 y 20).

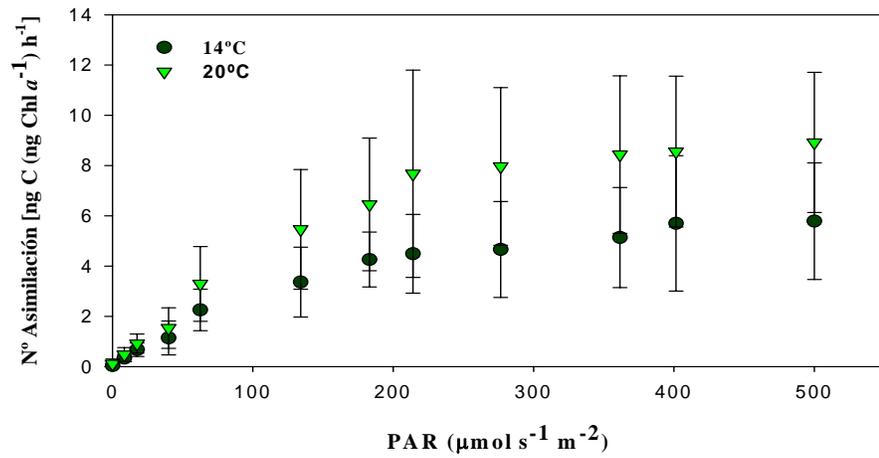


Figura 18. N° Asimilación promedio de *S. araucanus* para ambas temperaturas de incubación y 12 niveles de PAR. Se muestra X + DS.

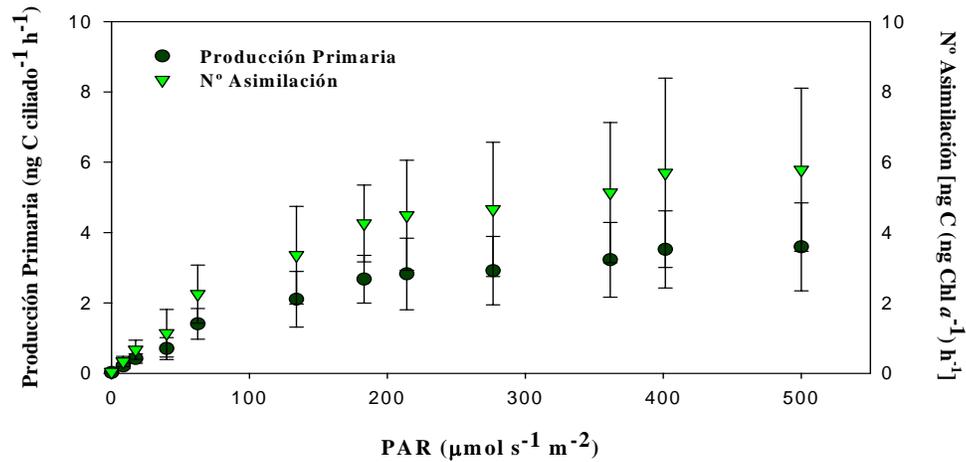


Figura 19. Comparación de producción primaria y asimilación de *S. araucanus* a 14°C y a los 12 niveles de PAR. Se muestra X + DS.

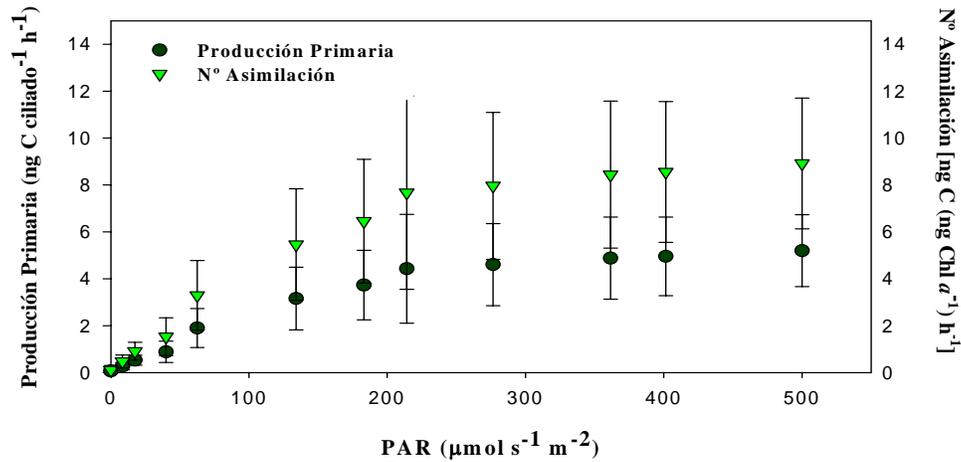


Figura 20. Comparación de producción primaria y asimilación de *S. araucanus* a 20°C y a los 12 niveles de PAR. Se muestra X + DS.

S. amethystinus tuvo una asimilación mayor a los 20°C que estuvo entre los 0.04 ± 0.01 y 3.80 ± 0.54 [$\text{ng C (ng Chl } a^{-1}) \text{h}^{-1}$], que a los 14°C que fue desde los 0.03 ± 0.03 a 2.38 ± 1.5 [$\text{ng C (ng Chl } a^{-1}) \text{h}^{-1}$] (Fig. 21). El valor más alto de asimilación fue de 5.25 [$\text{ng C (ng Chl } a^{-1}) \text{h}^{-1}$] a los $361.5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ a los 20°C. Al comparar la producción primaria con el Nº de asimilación de *S. amethystinus* se pudo ver que la asimilación fue mayor que la producción primaria por alrededor de 1.5 veces, tanto a los 14°C como a los 20°C (Fig. 22 y 23).

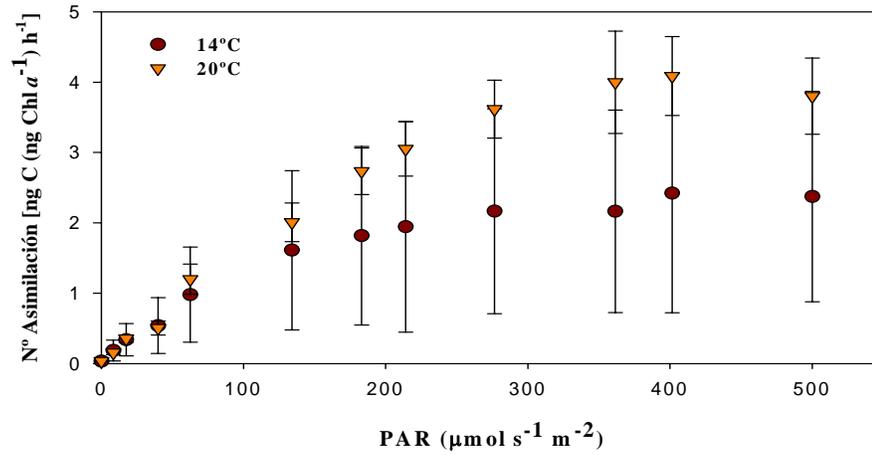


Figura 21. Nº Asimilación promedio de *S. amethystinus* para ambas temperaturas de incubación y 12 niveles de PAR. Se muestra X + DS.

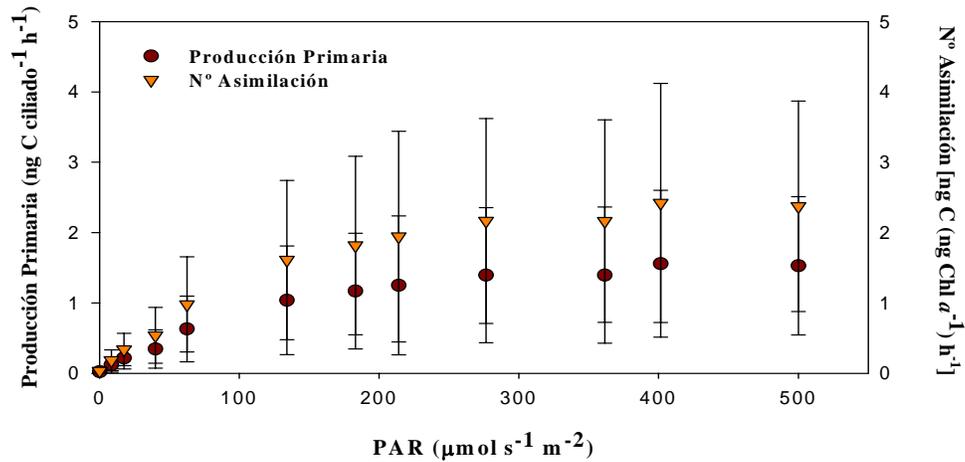


Figura 22. Comparación de producción primaria y asimilación de *S. amethystinus* a 14°C y a los 12 niveles de PAR. Se muestra X + DS.

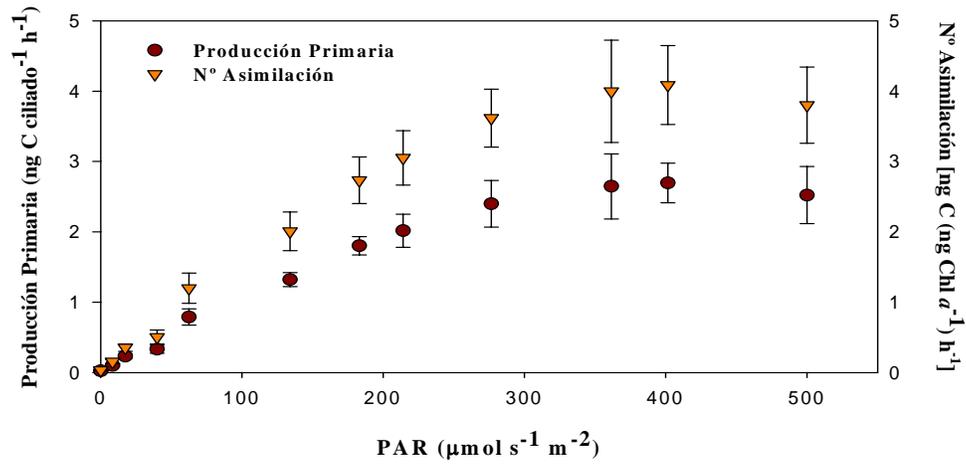


Figura 23. Comparación de producción primaria y asimilación de *S. amethystinus* a 20°C y a los 12 niveles de PAR. Se muestra X + DS.

S. araucanus presentó una mayor asimilación que *S. amethystinus* a ambos niveles de temperatura usados, duplicando su número a ambas temperaturas (Fig. 24 y 25).

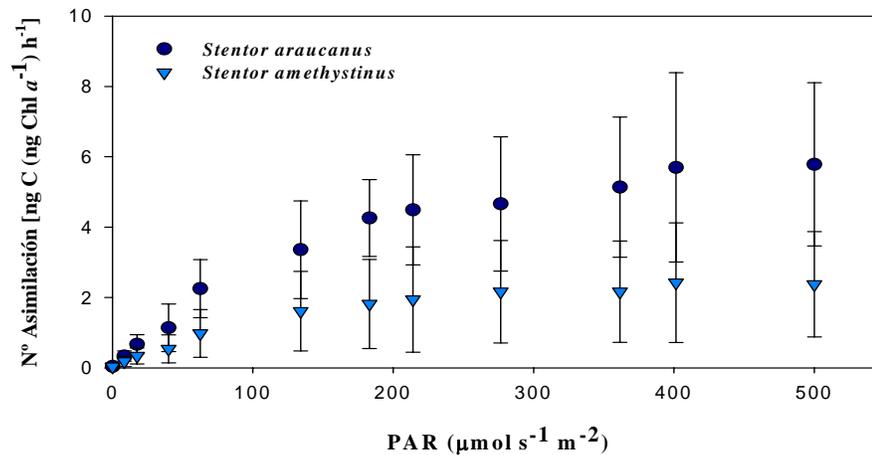


Figura 24. Asimilación de ambas especies de *Stentor* a 14°C v/s Luz. Se muestra X + DS.

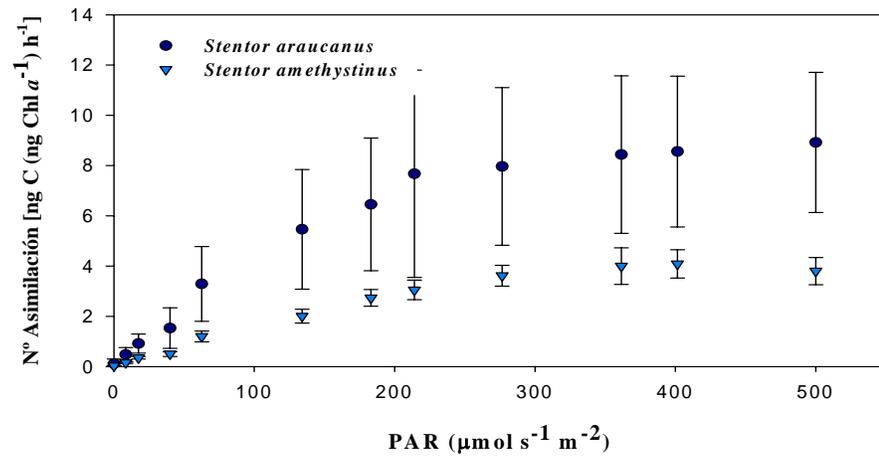


Figura 25. Asimilación de ambas especies de *Stentor* a 20°C v/s Luz. Se muestra X + DS.

6. DISCUSIÓN

6.1. Cultivos Stock.

Se han realizado variados intentos de cultivo de *Stentor*, bajo diversas condiciones de laboratorio. Donde se han obtenido bajas densidades, crecimiento lento y una rápida disminución de individuos, demostrando que el manejo de *Stentor* bajo condiciones de laboratorio todavía no es óptimo.

Los datos existentes de cultivos de *Stentor*, son principalmente para *S. amethystinus*, que es una especie cosmopolita. Laude (1995) realizó cultivos con *S. amethystinus* usando variados tipos de alimento, obteniendo buenos resultados con leche. Individuos sin alimento y con luz sobrevivieron aprox. un mes, lo mismo que sucedió con nuestros individuos mantenidos en bidones plásticos con agua de lago sin filtrar y con luz, mientras que Prosenz (1994) encontró lo contrario: Individuos sin alimento murieron dos días después de ser sometidos a estas condiciones. Woelfl (2005) realizó en el 2004 y 2005 experimentos para cultivar *S. amethystinus* usando diferentes condiciones de alimentación, temperatura y luz, donde el resultado más importante fue, que *Stentor* crece relativamente lento con un tiempo generacional máximo de tres días y con una densidad máxima de 10-20 ind/ml, lo que es superior a lo encontrado en el marco de esta tesis donde la densidad máxima fue de 3-4 ind/ml y su tiempo generacional fue de aprox. 3-8 días, estos resultados coinciden con los de Laybourn-Parry *et al.*, (1997) que obtuvo un tiempo generacional ≈ 4 días. Para *S. araucanus* no existen datos de cultivo disponibles, con los cuales comparar los obtenidos en este trabajo, donde mostró una tasa generacional similar a la de *S. amethystinus*, mientras que su abundancia máxima fue inferior a lo exhibido por *S. amethystinus*. Es importante señalar que pocos tratamientos fueron efectivos en esta especie

demostrando una alta vulnerabilidad frente a leves cambios en las condiciones de cultivo utilizadas.

Según Modenutti *et al.*, (2000) la fracción disuelta del agua de lago juega un rol importante en la distribución de *Ophrydium naumanni*. Sus datos además soportan la idea de Modenutti (1997) quien indica que ciliados mixotróficos de gran tamaño, como *S. araucanus*, están restringidos a lagos con baja concentración de DOC ($< 0.6 \text{ mg C l}^{-1}$). El crecimiento de *O. naumanni* mostró una relación inversamente proporcional con la concentración de DOC. Si bien *S. araucanus* y *O. naumanni* presentan una distribución diferente en la columna de agua, su distribución dentro de los lagos Nord patagónicos es similar, por esto *S. araucanus* también puede estar influenciado por las concentraciones de DOC. Probablemente la limitación a bajas concentraciones de DOC es una consecuencia de la adaptación de estas especies a medio ambientes pobres en nutrientes y de baja productividad, como lo son los lagos Nord patagónicos (Modenutti *et al.*, 2000). Quizás esta adaptación a condiciones oligotróficas está asociada al gran tamaño de estos ciliados, puesto que, ciliados grandes tienen un bajo metabolismo por masa de cuerpo, y tasas de crecimiento más bajas que otros ciliados más pequeños (Modenutti *et al.*, 2000). Hasta ahora, aún no se conoce que tamaño y que concentración de DOC deben conjugarse en estos ciliados mixotróficos de gran tamaño.

Tartar (1961) presenta un método de cultivo que ha sido usado óptimamente para el cultivo de *S. coeruleus*, *S. polymorphus*, *S. roeselii* y *S. introversus*. Sin embargo, el cultivo de otras especies como *S. niger* y *S. multiformis* es llevado a cabo con grandes dificultades, lo que llama a explotar otros métodos de cultivo. También existen otras especies de ciliados mixotróficos que simplemente no se pueden cultivar, debido a su complejo modo de alimentación, este quizás sea el caso de *S. araucanus* y *S. amethystinus*.

6.2. Producción Primaria.

La luz es considerada como uno de los factores ecológicos más importantes que regulan los ecosistemas acuáticos (Huisman & Weissing, 1995; Mur & Schreurs, 1995). En este sentido, la fotosíntesis en organismos acuáticos es altamente afectada por la intensidad de la luz y particularmente por altas irradianzas de radiación fotosintéticamente activa (PAR: 400 – 700 nm) en las capas superiores de sistemas oligotróficos (Modenutti *et al.*, 2005). Previos estudios han demostrado que altos niveles de luz causan altas tasas fotosintéticas en ciliados mixotróficos de lagos Nord Patagónicos del género *Ophrydium* y *Stentor* (Woelfl & Geller, 2002; Modenutti *et al.*, 2004; Modenutti *et al.*, 2005). Nuestras curvas PI mostraron que la fotosíntesis incrementó con el respectivo incremento del flujo de luz hasta los $500 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, sin alcanzar un punto de saturación (solo en algunas réplicas se pudo observar una clara saturación), siendo la fotosíntesis máxima de ambas especies de *Stentor* alrededor de los mismos niveles de irradianza que otros ciliados mixotróficos del género *Stentor* de distintas latitudes (Tabla 4). Sin embargo, el $P_{\text{máx}}$ de *S. amethystinus* fue aproximadamente 0.7 veces más bajo que lo encontrado para esta especie en lagos Australianos (Laybourn-Parry *et al.*, 1997). Al comparar los resultados de este estudio con investigaciones realizadas en lagos Nord Patagónicos hallamos una situación diferente donde nuestros valores de fotosíntesis máxima son 6 a 4 veces superiores que las encontradas para *Stentor* y *Ophrydium* en lagos Argentinos (Tabla 5). Mientras que, las cantidades de fotosíntesis individual de ambas especies de *Stentor* están dentro del rango encontrado para lagos araucanos Chilenos por Woelfl & Geller (2002).

Considerando los 14°C usados en este estudio, equivalente al periodo otoño – invierno y los 20°C al periodo primavera – verano, podemos ver que los valores de producción primaria de *S. amethystinus* en lagos Australianos fue obtenida durante Otoño – Invierno, lo que equivaldría a

los 14°C, aun así nuestros valores de fotosíntesis son 1.2 veces inferiores a los obtenidos por Laybourn-Parry *et al.* (1997), mientras que en lagos Nord Patagónicos Argentinos Modenutti *et al.* (2005) realizó sus mediciones de fotosíntesis de *S. araucanus* durante el periodo de verano, lo que equivaldría a los 20°C en nuestro estudio, disminuyendo la diferencia encontrada entre los valores de producción primaria, siendo aún superiores nuestros valores por 1.9 veces. En el área chilena, Woelfl & Geller (2002), obtuvieron la fotosíntesis máxima de *Stentor* durante el periodo de Otoño (equivalente a 14°C), nuestros valores de *S. araucanus* como de *S. amethystinus*, se encuentran dentro del rango obtenido por los autores.

Nuestros datos de producción primaria presentan una alta desviación estándar la que está dada por la diferencia en los valores entre una réplica y otra. Para el caso de *S. araucanus*, generalmente la primera réplica es la que exhibe los valores más altos de las tres, siendo la tercera la de menor valor, lo que se puede deber al tamaño de los individuos utilizados en cada réplica, ya que instintivamente se tiende a elegir los de mayor tamaño primero por lo que en la tercera réplica estarían los individuos de menor tamaño. Con *S. amethystinus* sucede algo similar pero a menor escala por que las diferencias en las réplicas son menores y no existe una tendencia marcada a tener valores más altos en alguna de las 3 réplicas. Estas diferencias de tamaños residen principalmente en la especie de *Stentor* utilizada, puesto que *S. araucanus* es muy sensible a los cambios de condiciones de mantención, encontrándose los individuos de las últimas réplicas en peor estado que los individuos de las primeras réplicas, esto se ve sustentado por lo visto en experimentos de cultivo, donde esta especie redujo notablemente su tamaño durante los primeros días de cultivo. Con *S. amethystinus* no sucede lo mismo donde el cambio de tamaño de los individuos durante los primeros días de cultivo, es menor o inexistente, puesto que es una especie mucho menos sensible a los cambios, ya sea de temperatura, luz u otros.

Es importante considerar que las muestras de *Stentor* de este estudio, fueron recolectadas durante el Otoño, considerado un periodo de limitación de alimento en lagos andinos, donde la fotosíntesis se ve realizada, ya que solo con ella se cubrirían los requerimientos mínimos de energía del ciliado, siendo más importante el modo de nutrición autotrófico durante este periodo (Woelfl & Geller, 2002). Además el periodo Otoño-Invierno es cuando *Stentor* presenta las menores abundancias en la columna de agua (Woelfl & Geller, 2002; Woelfl, 2007) pero a la vez exhibe los valores más altos de fotosíntesis (Woelfl & Geller, 2002).

La directa relación de la fotosíntesis con la luz es sustentada por el patrón de distribución vertical en la columna de agua que presentan estos ciliados, ubicándose principalmente por sobre los 20 mt. (Modenutti, 1998b; Queimaliños *et al.*, 1999; Woelfl & Geller, 2002). Esta distribución se encuentra asociada a la parcial dependencia a la luz que impone el alga simbiote y a las diferentes respuestas de fotocomportamiento adquirido por el hospedador después de asociarse al simbiote (Beaver & Crisman, 1988). Observaciones realizadas por Foissner & Woelfl, 1994; Laybourn-Parry *et al.*, 1997; Modenutti, 1998b, demostraron que *S. araucanus* y *S. amethystinus* presentan fototaxis positiva, ya que son capaces de moverse hacia la luz. *Stentor* además contiene un pigmento sensitivo a la luz llamado stentorina el cual puede ser el responsable de la alta resistencia al UV-B (Modenutti *et al.*, 1998; Modenutti *et al.*, 2005). El color del ciliado, como también la pared celular y el citoplasma pueden causar una marcada atenuación de la luz dentro de la célula, proveyendo al simbiote un adecuado flujo de luz para la fotosíntesis (Laybourn-Parry *et al.*, 1997). Estos antecedentes junto con el tamaño de *Stentor* y su sustancial contenido de Chl *a* serían los responsables de los altos niveles de fotosíntesis observada.

El contenido específico de Chl *a* de ambas especies de *Stentor* estudiadas fue aprox. 4 veces superior a lo encontrado por Perris *et al.* (1994) para *S. viride* en un lago temperado eutrófico y aprox. 3 veces superior que lo encontrado para *O. naumanni* (Modenutti *et al.*, 2004). El contenido individual de Chl *a* de *S. amethystinus* tuvo un rango de 925 – 1,461 pg ciliado⁻¹ en lagos Australianos (Laybourn-Parry *et al.*, 1997), mientras que *S. araucanus* proveniente de un lago Nord patagónico Argentino alcanzó 1.06 ng Chl *a* ciliado⁻¹ (Modenutti *et al.*, 2005), siendo ambos aprox. 1 a 2 veces superior que lo encontrado para *Stentor* en este estudio. Sin embargo, nuestros valores son 2 veces superiores a lo reportado por Woelfl & Geller (2002) un lago Nord patagónico Chileno.

El número de asimilación promedio de *S. araucanus* fue de 4.07 [ng C (ng Chl *a*⁻¹) h⁻¹] y el de *S. amethystinus* de 1.68 [ng C (ng Chl *a*⁻¹) h⁻¹], siendo este último superior a lo reportado para esta misma especie en lagos australianos (Laybourn-Parry *et al.*, 1997), mientras que ambos valores también son superiores a lo encontrado por Woelfl & Geller (2002).

Tabla 4. Fotosíntesis máxima de ciliados mixotróficos del género *Stentor*, de distintas latitudes y niveles de irradianza a la cual se obtuvieron estos valores.

Especie	Producción Primaria (ng C ind ⁻¹ h ⁻¹)	Nivel de Irradianza ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Origen
<i>S. acutum</i>	0.03	500	Stoecker <i>et al.</i> (1988, 1989)
<i>S. amethystinus</i>	1.03 – 3.98	700	Laybourn- Parry <i>et al.</i> (1997)
<i>S. capitum</i>	0.083	500	Stoecker <i>et al.</i> (1988, 1989)
<i>S. conicum</i>	0.060	500	
	0.012	190	Jonsson (1987)
<i>S. chlorophilum</i>	0.098	500	Stoecker <i>et al.</i> (1988, 1989)
<i>S. reticulatum</i>	0.031	190	Jonsson (1987)
<i>S. viridis</i>	0.054	189	Perris <i>et al.</i> (1994)

Tabla 5. Fotosíntesis máxima de ciliados mixotróficos de lagos Nord Patagónicos y niveles de irradiación a la cual se obtuvieron estos valores.

Especie	Producción Primaria (ng C ind ⁻¹ h ⁻¹)	Nivel de Irradianza ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Origen
<i>Ophrydium naumanni</i>	0.832 – 1.094	18	Modenutti <i>et al.</i> (2004)
<i>S. amethystinus</i>	0.37 - 4.41	200 – 580	Woelfl & Geller (2002)
<i>S. araucanus</i>	0.32 – 3.5	150 - 305	
	1.436	600	Modenutti <i>et al.</i> (2005)

Los pocos datos sobre fotosíntesis de ciliados mixotróficos sugieren que ciliados oligotrichos lacustres con mixotrofia del tipo secuestro de cloroplastos son menos eficientes que especies que contienen algas endosimbiontes. El número de asimilación de la especie lacustre *S. viride* fue de 0.33 (Perris *et al.*, 1994), que es menos eficiente que otras especies marinas investigadas (Putt 1990; Stoecker *et al.*, 1987; Stoecker *et al.*, 1989). Sin embargo, tanto la fotosíntesis como el número de asimilación son probablemente subestimadas cuando provienen de una medición con ¹⁴C debido al flujo de carbón dentro del sistema hospedador/plastidio o hospedador/alga endosimbionte. Además, en organismos que poseen algas endosimbiontes, la contribución de carbón desde la fotosíntesis al metabolismo animal es difícil de evaluar, ya que la fotosíntesis puede ser almacenada dentro del alga o usada por esta para la mantención y crecimiento así como para el metabolismo del hospedero (Stoecker & Michaels, 1991). Adicionalmente, el endosimbionte puede adquirir una cierta cantidad, o todo, su requerimiento de fósforo y nitrógeno desde los productos de excreción del ciliado (Albers *et al.*, 1982). Así, las algas endosimbiontes son favorecidas por el ciclo de nutrientes dentro del ciliado. En este sentido, la fotosimbiosis es una estrategia ecológica para expandirse a habitats previamente inhabilitados para uno o ambos simbioses (Hausmann *et al.*, 2003). En lagos Nord patagónicos

los ciliados mixotróficos son especialmente favorecidos, ya que estos son medio ambientes pobres en nutrientes y con altos niveles de luz (Queimaliños *et al.*, 1999; Modenutti *et al.*, 2000; Woelfl & Geller, 2002), permitiendo un aumento en la fotosíntesis de organismos mixótrofos como *Stentor*.

Se concluye que según los antecedentes expuestos aceptamos la hipótesis planteada, ya que *S. araucanus* y *S. amethystinus* presentaron un aumento estadísticamente significativo de su tasa fotosintética con los respectivos incrementos tanto de luz como de temperatura.

7. CONCLUSIONES

- El cultivo de ambas especies de *Stentor* aún no es viable bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio.
- *Stentor araucanus* es altamente susceptible a las variaciones en las condiciones de cultivo en la cual se mantuvieron.
- La producción primaria de *Stentor araucanus* y *Stentor amethystinus* se ve positivamente afectada con el aumento de la luz y la temperatura.
- *Stentor araucanus* tiene una tasa fotosintética mayor que *Stentor amethystinus* bajo las condiciones de luz y temperatura utilizadas.
- Ambas especies de *Stentor* tienen un contenido específico de Chl *a* similar.
- El número de asimilación de *Stentor araucanus* es altamente superior al de *Stentor amethystinus* bajo las condiciones de luz y temperatura utilizadas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Albers, D. W., Reisser, W. & Wiessner, W. (1982) Studies on the nitrogen supply of endosymbiotic chlorellae in green *Paramecium bursaria*. *Plant. Sci. Lett.*, 25, 85-90.
- APHA (1995) American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and waste water. 19th ed. New York.
- Beaver, J. R., Crisman, T. L. & Bienert, R. W. (1988) Distribution of planktonic ciliates in highly coloured subtropical lakes: comparison with clearwater ciliate communities and the contribution of myxotrophic taxa to total autotrophic biomass. *Freshwater Biology*, 20, 51-60.
- Bienert, R. W., Jr, Beaver, J. R. & Crisman, T. L. (1991) The contribution of ciliated protozoa to zooplankton biomass in an acidic, subtropical lake. *Journal of Protozoology.*, 38,352-354.
- Campos, H. (1984) Limnological study of Araucanian Lakes (Chile). *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 22, 1319-1327.
- Campos, H., Steffen, W., Parra, O., Domínguez, P. & Agüero, G. (1987) Estudios Limnológicos en el Lago Caburgua (Chile). *Gayana, Bot.*, 44 (1-4), 61-84.
- Finlay, B. J., Maberly, S. C. & Esteban, G. F. (1996) Spectacular abundances of ciliates in anoxic pond water: contribution of symbionts photosynthesis to host respiratory oxygen requirements. *FEMS Microbiology and Ecology.*, 20, 229-235.
- Foissner, W. & Wölfl, S. (1994) Revision of the genus *Stentor* with the new description of *Stentor araucanus* n. sp. *Journal of Plankton Research.*, 16, 255-289.
- Hecky, R. E. & Kling, H. J. (1981) The phytoplankton and protozooplankton of the euphotic zone of lake Tanganyika: Species composition, biomass, chlorophyll content, and spatiotemporal distribution. *Limnol. Oceanogr.*, 26, 548-564.

- Hausmann, K., Hülsmann, N. & Radek, R. (2003) Protistology. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- Huisman, J. & Weissing, F. J. (1995) Competition for nutrients and light in a mixed water column: a theoretical analysis. *Am. Nat.*, 146, 536-564.
- James, M. R., Burns, C. W. & Forsyth, D. J (1995) Pelagic ciliated protozoa in two monomictic, southern temperate lakes of contrasting trophic state: seasonal distribution and abundance. *Journal of Plankton Research.*, 17, 1479-1500.
- Jones, R.I. (1994) Mixotrophy in planktonic protist as a spectrum of nutritional strategies. *Marine and Microbial Food Webs.*, 8, 87-96.
- Jones, R. I. (2000) Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biology.*, 45, 219-226.
- Laude, U. (1995) Populationsentwicklung und Nahrungswahl von *Stentor amethystinus* (LEIDY 1880) im Experimentalgewässer Grobe Fuchskuhle. Tesis, Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei Neuglobsow/ Stechlinsee. Universität Berlin, 27pp.
- Laybourn-Parry, J. (1994) Seasonal successions of protozooplankton in freshwater ecosystems of different latitudes. *Mar. Microbial. Food. Webs.*, 8, 145-162.
- Laybourn- Parry, J., Perriss, S. J., Seaton, G. & Rohozinski, J. (1997) A mixitrophic ciliate as a major contributor to plankton photosynthesis in Australian Lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 1463-1467.
- Modenutti, B. E. (1997) Distribución de los Ciliados Planctónicos *Ophrydium naumanni* and *Stentor araucanus* en Lagos Oligotróficos Andinos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.*, 47, 79-83.
- Modenutti, B. E., Balseiro, E. G. & Queimaliños, C. P. (2000) Ciliate community structure in two

- South Andean lakes: the effect of lake water on *Ophrydium naumanni* distribution. *Aquat. Microb. Ecol.*, 21, 299-307.
- Modenutti, B. E., Balseiro, E. G., Queimaliños, C. P., Suarez, D. A. A., Dieguez, M. C. & Albarino, R. J. (1998a) Structure and dynamics of food webs in Andean lakes. *Lakes and Reservoirs: Research and Management.*, 3, 179-186.
- Modenutti, B. E., Balseiro, E. G. & Moeller, R. (1998b) Vertical distribution and resistance to ultraviolet radiation of a planktonic ciliate, *Stentor araucanus*. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 26, 1636-1640.
- Modenutti, B. E., Balseiro, E. G., Callieri, C., Bertoni, R. & Queimaliños, C. P. (2005) Effect of UV-B and different PAR intensities on the primary production of the mixotrophic planktonic ciliate *Stentor araucanus*. *Limnol. Oceanogr.*, 50(3), 864-871.
- Morris, D. P., Zagarese, H. E., Williamson, C. E., Balseiro, E. G., Hargreaves, B. R., Modenutti, B. E., Moeller, R. & Queimaliños, C. P. (1995) The attenuation of UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, 40, 1381-1391.
- Mur, L. R. & Schreurs, H. (1995) Light as a selective factor in the distribution of phytoplankton species. *Water Sci. Tech.*, 32, 25-34.
- Nygaard K. & Tobiesen. A (1993) Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 38, 273-279.
- Pedrozo, F., Chillrud, S., Temporetti, P. & Díaz, M. (1993) Chemical composition and nutrient limitation in rivers and lakes of northern Patagonian Andes (39.5° 42°S; 71°W)(Rep. Argentina). *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 25, 205-214.
- Perris, S. J., Laybourn-Parry, J. & Jones, R. I. (1994) Chlorophyll contents and photosynthetic rates of the freshwater mixotrophic ciliates *Stombidium viride* (Ciliophora: Oligotrichida).

- Archiv für Hydrobiologie.*, 130, 473-483.
- Putt, M. (1990) Abundance, chlorophyll content and photosynthetic rates of ciliates in the Nordic seas during summer. *Deep-Sea Res.*, 37, 1713-1731.
- Pierce, R. & Turner, J. (1992) Ecology of planktonic ciliates in marine food webs. *Reviews in Aquatic Sciences.*, 6(2), 139-181.
- Prosenz, B. (1994) Das Zooplankton des Neufelder Sees unter besonderer Berücksichtigung von *Stentor amethystinus*. Tesis, Universidad de Viena, 19pp.
- Quemaliños, C. P., Modenutti, B. E. & Balseiro, E.G. (1999) Symbiotic association of the ciliate *Ophrydium naumanni* with *Chlorella* causing a deep chlorophyll a maximum in an oligotrophic South Andean lake. *Journal of Plankton Research*, 21, 167-178.
- Reisser, W. (1984) The taxonomy of green algae endosymbiotic in ciliates and a sponge. *Br. Phycol. J.*, 19, 309-318.
- Reisser, W., Meier, R., Gortz, H. D. & Jeon, K.W. (1985) Establishment, maintenance, and integration mechanisms of endosymbionts in Protozoa. *Journal of Protozoology.*, 32, 383-390
- Sand- Jensen, K., Geertz- Hansen, O., Pedersen, O. & Skovgaard Nielsen, H. (1994) Size dependence of composition, photosynthesis and growth in the colony-forming freshwater ciliate, *Ophrydium versatile*. *Freshwater Biology.*, 31, 121-130.
- Sand- Jensen, K., Pedersen, O. & Geertz- Hansen, O. (1997) Regulation and role of photosynthesis in the colonial symbiotic ciliate *Ophrydium versatile*. *Limnology and Oceanography.*, 42, 866- 873.
- Soto, D. & Zuñiga, L. R. (1991) Zooplankton assemblages of Chilean temperate lakes: A comparison with North American counterparts. *Revista Chilena de Historia Natural.*, 64, 569-581.

- Steeman-Nielsen, E. (1952) The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil.*, 18, 117-140.
- Stoecker, D. (1992) “Animals” that photosynthesize and “plants” that eat. *Oceanus.*, 35(3)
- Stoecker, D. K. & Michaels, A. E. (1991) Respiration, photosynthesis and carbon metabolism in planktonic ciliates. *Mar. Biol.*, 108, 441-447.
- Stoecker, D.K., Michaels, A. E. & Davis, L. H. (1987) Large proportion of marine planktonic ciliates found to contain functional chloroplasts. *Nature.*, 326, 790-792.
- Stoecker, D., Silver, M., Michaels, A. & Davis, L. (1998) Obligate mixotrophy in *Laboea strobila*, a ciliate which retains chloroplasts. *Marine Biology.*, 99, 415-423.
- Stoecker, D.K., Silver, M.W., Michaels, A. E. & Davis, L. H. (1989) Enslavement of algal chloroplasts by four *Strombidium* spp. (Ciliophora, Oligotrichida). *Marine Microbial Food Webs.*, 3, 79-100.
- Tartar, V. (1961) The biology of *Stentor*. Department of Zoology, University of Washington. 400 pp.
- Thomasson, K. (1963) Araucarian Lakes. *Acta Phytogeographica Sueca.*, 47, 1- 139.
- Villalobos, L. & Zuñiga, L. R. (1991) Latitudinal gradient and morphological variability of copepods in Chile: *Boeckella gracilipes* DADAY. *Verh. Inter. Verein. Limnol.*, 24, 2834-2838
- Woelfl, S. (1995) Untersuchungen zur Zooplanktonstruktur einschliesslich der mikrobiellen Gruppen unter besonderer Berücksichtigung der mixotrophen Ciliaten in zwei Südchilenischen Andenfusseen. Ph. D. thesis, University of Konstanz, Konstanzer Dissertationen 497, Hartung Gorre verlag, Konstanz.
- Woelfl, S. & Geller, W. (2002) *Chorella*- bearing ciliates dominate in an oligotrophic North

Patagonian lake (Lake Pirehueico, Chile): abundance, biomass and symbiotic photosynthesis.

Freshwater Biology., 47, 231-242.

Woelfl, S. (2005) Informe avance FONDECYT: “Ciliados mixotróficos (*Stentor*): Su distribución e importancia como especie clave en la cadena alimenticia en lagos de la Nord Patagonia”

Woelfl, S. (2007) The distribution of large mixotrophic ciliates (*Stentor*) in deep North Patagonian lakes (Chile): First results. *Limnologica.*, 37, 28-36.

9. ANEXO

• Medio de cultivo WC.

	Solución stock (g/100 ml)	Solución de nutrientes
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36.8	1 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	37	1 ml
NaH CO ₃	12.6	1 ml
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	11.4	1 ml
NaNO ₃	85	1 ml
Na ₂ SiO ₃ · 5H ₂ O	21.2	1 ml
Solución de micronutrientes*		1 ml
Solución de vitaminas**		1 ml
TES buffer		0.115 g
Agua destilada		1000 ml

*Composición de la solución de micronutrientes.

	[g/1000 ml dist. H ₂ O]
Na ₂ EDTA	4.36
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.006
H ₃ BO ₃	1

** Composición de la solución de vitaminas.

	[g/1000 ml dist. H ₂ O]
Tiamina HCL	0.1
biotina	0.0005

• Medio de cultivo F2.

	Solución de nutrientes
Solución 1*	5 ml
Solución 2*	1 ml
Solución 3*	1 ml
Solución 4*	1 ml
Solución 5*	1 ml
Solución 6*	5 ml
Solución 7*	1 ml
Agua destilada	985 ml

*Composición de las soluciones.

	Reactivo	Cantidad (gr)	Agua destilada (ml)
Solución 1	NaNO ₃	12.75	500
Solución 2	MgCl ₂ . 2 H ₂ O	6.082	500
Solución 3	CaCl ₂ . 2 H ₂ O	2.205	500
Solución 4	ZnCl ₂	0.0001635	500
	H ₃ BO ₃	0.09276	
	CuCl ₂ . 2 H ₂ O	0.00001	
	FeCl ₃ . 6 H ₂ O	0.07988	
	CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0.000714	
	MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0.207690	
	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0.00363	
	Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	0.500	
Solución 5	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	350	500
Solución 6	K ₂ HPO ₄	0.522	500
Solución 7	NaHCO ₃	7.5	500

Una vez preparado el medio de cultivo se debe medir el pH (debe de ser entre 7.4 y 7.6) si no es así se ajusta con NaOH o HCl 0.1 N. Luego se filtra al vacío por filtros de 0.45 µm.

Mantener las 7 soluciones por separado y bajo refrigeración.