

LAS CIANOBACTERIAS COMO INDICADORAS DE LA CALIDAD DEL AGUA EN
EL EMBALSE DE BETANIA (CUENCA ALTA DEL RÍO MAGDALENA).

NATALIA BEATRIZ COMBA GONZÁLEZ

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
BOGOTA 2009

LAS CIANOBACTERIAS COMO INDICADORAS DE LA CALIDAD DEL AGUA EN
EL EMBALSE DE BETANIA (CUENCA ALTA DEL RÍO MAGDALENA).

NATALIA BEATRIZ COMBA GONZÁLEZ

Trabajo de Grado

Directora

AMPARO CANOSA DE BARRERO

Microbióloga, M. Sc.

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA

BOGOTA 2009

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del Presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

BOGOTÁ, 2009

"A un ser humano se le puede quitar todo excepto una cosa, la última de sus libertades: elegir su actitud frente a cualquier circunstancia, elegir su camino..."

VICTOR FRANKL

Para Violeta, mis padres, mis hermanos (Leo y Diana)
y mis amigos...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres por su apoyo durante este largo camino. A mi mamá, amiga y compañera, gracias por estar ahí siempre, su ejemplo de valentía ante los problemas, amor a su familia y consagración al trabajo, influyó de manera determinante en mi formación personal y profesional, ella es y será por siempre lo más importante en mi vida. A Leo y Diana por su ayuda, comprensión y cariño incondicional. A mi familia samaria que tanto quiero (doña Martha, don Rafael, Anita, Gabriel, Bibiana y Bienve), a todos ellos gracias.

Este trabajo de grado no habría sido posible sin la colaboración de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, especialmente de la facultad de Ciencias Naturales y el Programa de Biología Marina responsables de la consultoría dentro de la que éste se enmarca.

De manera muy especial agradezco a la Profesora Amparo Canosa de Barrero, por quien siento un cariño muy especial ya que desde un comienzo y sin conocerme me abrió las puertas de su laboratorio y me permitió trabajar, aprender a su lado y desarrollar este proyecto que hoy termina. Mil y mil gracias por apoyarme siempre ya que con sus clases, enseñanzas y sobre todo con su ejemplo de vida, reafirmó en mí el interés por continuar en el interesante mundo de la Microbiología.

No puedo dejar de mencionar a mis compañeras de laboratorio, Liliana López, Pilar Martínez y Dora Morales quienes durante mi ausencia, colaboraron en la toma de las muestras en la represa de Betania. También fueron importantes Arturo, Lorena, Laura y por supuesto mis queridos profesores: Rafael Barragan (ahora “compañero”), Johanna Santamaría, Ingrid Torres y Consuelo Correa,

excelentes seres humanos de los que tanto aprendí. De manera muy especial quiero agradecer a la profesora Liliana Salazar López, su importante ayuda en lo referente a la identificación de las cianobacterias, además de su constante interés durante el desarrollo de este trabajo.

Bueno y como olvidar a Jennica y a Diani mi grandes amigas, personas muy valiosas a las que tanto quiero, mis compañeras de aventuras, en los buenos y malos momentos, a ellas se suman Richard, José, Andrea, Juanito, Camilo, Lorenita y Samantha y por supuesto Diego, Omar Andrés, Daniel y Juan Felipe, que aunque ya no están compartieron conmigo esta experiencia y enriquecieron mi vida con todas su enseñanzas.

A todos ellos y a quienes no mencioné no me resta más que decirles GRACIAS!!!!.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	5
Características generales de las cianobacterias	5
Factores que promueven el desarrollo de las poblaciones de cianobacterias	7
Efectos del desarrollo de cianobacterias en el agua	8
Estudio de las cianobacterias	11
Las cianobacterias y la bioindicación	13
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS	16
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
Hipótesis	18
METODOLOGÍA	20
Área de estudio	20
Fase de campo	21
Fase de laboratorio	25
Enumeración de las cianobacterias	25
Composición de cianobacterias	27
Aislamiento y cultivo de cianobacterias en el laboratorio	28
Detección de Microcistinas	29
Fase de gabinete	31
RESULTADOS	34

Variación temporal y espacial de la abundancia de cianobacterias	34
Composición de cianobacterias.	41
Estructura de la comunidad de cianobacterias	45
Aislamiento y cultivo de cianobacterias en el laboratorio	48
Presencia de microcistinas	50
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
Variación temporal y espacial de la abundancia de cianobacterias	52
Composición de cianobacterias	56
Aislamiento y cultivo de cianobacterias en el laboratorio	60
Detección de microcistinas	61
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Sitios de muestreo en el embalse de Betania con información acerca de ubicación geográfica y producción piscícola	22
Tabla 2.	Sitios de toma de muestras microbiológicas en el embalse de Betania (Huila)	23
Tabla 3.	Composición química del medio Bristol	28
Tabla 4.	Géneros de cianobacterias identificados en el embalse de Betania	43
Tabla 5.	Especies de cianobacterias aisladas en cultivos de muestras de agua tomadas en las zonas de estudio en el embalse de Betania	48
Tabla 6.	Especies de cianobacterias aisladas e identificadas en medio de cultivo a partir de las muestras de agua del embalse de Betania	49
Tabla 7.	Concentración de microcistinas para muestras de agua del embalse de Betania tomadas en febrero de 2008	50
Tabla 8.	Concentración de microcistinas detectadas en cultivos de cianobacterias aisladas del embalse de Betania	51
Tabla 9.	Comparación de las densidades promedio de cianobacterias encontradas en el embalse de Betania en este estudio respecto a otras en el mismo embalse y en fechas anteriores y en otros embalses con características tróficas similares	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en el embalse de Betania	23
Figura 2. Imagen que describe la toma superficial de muestras de agua en el embalse de Betania	24
Figura 3. Variaciones espacio temporales de las densidades de cianobacterias en el embalse de Betania	35
Figura 4. Fotografía que permite observar en parte la palizada encontrada en el mes de octubre en el embalse de Betania en el que se encontraron las mayores densidades de cianobacterias	36
Figura 5. Densidades promedio del número total de células de organismos autótrofos y heterótrofos en el embalse de Betania	37
Figura 6. Densidades promedio del total de células y de cianobacterias en el embalse de Betania	38
Figura 7. Densidades promedio de los organismos autótrofos presentes en el embalse de Betania	39
Figura 8. Relación entre las densidades promedio de autótrofos y de cianobacterias en el embalse de Betania	40
Figura 9. Densidades promedio de organismos heterótrofos en el embalse de Betania	40
Figura 10. Densidades promedio de heterótrofos y de cianobacterias en el embalse de Betania	41
Figura 11. Fotografías de los géneros de cianobacterias identificadas con microscopio de epifluorescencia teñidos con primulina e irradiadas con luz azul, aumento final 1000	42
Figura 12. Principales géneros de cianobacterias identificados en el embalse de Betania	43

Figura 13. Densidad promedio de los principales grupos del plancton autótrofo identificados en el embalse de Betania	44
Figura 14. Densidades promedio de los principales grupos del plancton autótrofo en el embalse de Betania de acuerdo a la época de muestreo	45
Figura 15. Curvas de rarefacción mostrando el número esperado de géneros en función del tamaño de la muestra	46
Figura 16. Fenograma elaborado a partir de la Matriz de Similaridad de Bray-Curtis que representa las similitudes encontradas entre sitios y época de muestreo	47
Figura 17. Concentración de microcistinas (ppb) en el embalse de Betania y en cultivos mantenidos <i>in Vitro</i>	51

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo para la determinación de microcistinas en muestras de agua utilizando la técnica ELISA.

ANEXO 2. Densidades totales de células, de cianobacterias, de organismos autótrofos y de heterótrofos. Valores promedio, máximos y mínimos obtenidos durante el muestreo en las cuatro zonas definidas en este estudio en el embalse de Betania.

ANEXO 3. Diferencias estadísticas entre las densidades de cianobacterias de acuerdo al sitio y época de muestreo. Resultados de correlaciones entre las densidades de cianobacterias con el total de células, de autótrofos y de heterótrofos, teniendo en cuenta todos los datos y considerando por separado los sitios y las épocas de muestreo.

ANEXO 4. Valores correspondientes a promedio, máximo y mínimo de las densidades de los principales grupos del plancton autótrofo presentes en las zonas de muestreo, para todo el periodo de estudio.

ANEXO 5. Índices empleados para evaluar la estructura de la comunidad de cianobacterias en el embalse de Betania.

ANEXO 6. Fotografías de los morfotipos de cianobacterias presentes en los cultivos aislados de muestras de agua del embalse de Betania.

ANEXO 7. Datos necesarios para obtener la concentración final de microcistinas con la técnica ELISA en algunas muestras de agua de la quinta salida y a partir de cultivos de cianobacterias aisladas del embalse de Betania.

ANEXO 8. Gráficas de calibración correspondientes a concentración de microcistinas vs. absorbancia de cada una de las pruebas realizadas con la técnica ELISA, en algunas muestras de la quinta salida y en los cultivos de cianobacterias aisladas del embalse de Betania.

RESUMEN

Se estudiaron durante un período de ocho meses las cianobacterias como indicadores de la calidad del agua del embalse de Betania. Se realizaron cinco muestreos en once sitios con diferentes características ambientales en el cuerpo principal y en dos de los ríos que llegan a una de las colas del embalse. Se utilizó la técnica de conteo directo por epifluorescencia para determinar las densidades y composición de las cianobacterias. Las densidades para todo el periodo de estudio estuvieron entre 1676 y 127271 células mL⁻¹ con un promedio de 36147 células mL⁻¹. Además, se encontraron mayores densidades de cianobacterias en las muestras tomadas en los proyectos piscícolas que se desarrollan en jaulas en la hidroeléctrica, especialmente de los géneros *Synechococcus* sp., *Microcystis* sp. y *Chroococcus* sp. Lo anterior parece estar relacionado con las condiciones eutróficas del embalse y la baja proporción N:P (de 5:1 a 1:1), ello debido al aporte continuo de fósforo por las zonas de producción piscícola. Si ello es así, las cianobacterias verán favorecido su crecimiento y además su medición será una herramienta útil en la detección de los cambios de la calidad del agua del embalse. Adicionalmente, en algunos casos la concentración de microcistinas, determinada con el método ELISA, estuvo por encima del valor permitido por la Organización Mundial de la Salud (WHO 1998) lo que resulta preocupante dado que estas son causantes de mortalidades masivas de peces, fenómeno presentado con anterioridad en el embalse.

PALABRAS CLAVES: Cianobacterias, embalse de Betania, epifluorescencia, ELISA, microcistinas.

ABSTRACT

Cyanobacteria populations from Betania's Dam were studied as water quality indicators. Samples were collected during five samplings events distributed along an eight months period. In this study a total of eleven sites were sampled. Nine of the samplings sites were located on the main water body of the dam and the other two were on main tributary rivers. Epifluorescence microscopy was used to determinate the densities and the composition of the cyanobacteria community. Results showed densities between 1.7×10^{-3} and 1.3×10^{-5} cell. ml⁻¹. Highest cyanobacteria numbers were found at the fishery production site with *Sychooccus* sp., *Microcystis* sp., and *Chroococcus* sp. as the most common genera. These high density numbers may be the result of the eutrophic conditions present in the dam and the low N:P ratio (5:1- 1:1) which results from the fishery activity at this place. This study shows a tendency of high numbers of cyanobacterias in places with fishery production therefore the data presented in this study suggest the group of microorganism could be used as water quality indicator. Additionally, microcystin concentration determinate by ELISA was highest than the standards referred by the World Health Organization (WHO 1988). This result sends a warning to the community living from the fishery activities in Betania because microcystins are toxic and may cause the death of the fishes living in these waters.

KEY WORDS: cyanobacteria, Betania, Dam, epifluorescence microscopy, ELISA, microcystins.

INTRODUCCIÓN

En el grupo de organismos procariotas fotosintéticos, las cianobacterias se destacan por su amplia distribución, presentar altas tasas de crecimiento y su capacidad para sobrevivir en ambientes en los que compuestos como el carbono y el nitrógeno son limitantes (Subramanian & Uma 1999).

Por ser productores primarios juegan un papel fundamental en las redes tróficas y además contribuyen en el ciclo de nutrientes ya que muchas especies por ejemplo, fijan nitrógeno. Así mismo, las cianobacterias se han utilizado para el tratamiento de aguas residuales, la biofertilización de suelos, como bioindicadores de eutrofización y bioacumulación de sustancias recalcitrantes o tóxicas, entre otros (Plinski & Jozwiak 1999).

Sin embargo en altas densidades, las cianobacterias pueden tener efectos nocivos sobre la calidad del agua. De manera directa a través de la producción de toxinas, e indirectamente al disminuir la concentración de oxígeno en la columna de agua, lo que puede ocasionar la muerte de los organismos aerobios que allí se desarrollen. Entonces, cuando estos microorganismos alcanzan sus picos de abundancia, lo que se conoce como florecimientos o “blooms”, originan efectos perjudiciales para el ecosistema, varios informes muestran que además de su relación con la muerte masiva de peces pueden causar pérdida de biodiversidad y bioacumulación de toxinas a través de la cadena alimenticia, procesos que generalmente ocurren en aquellos cuerpos de agua, que se han fertilizado para la producción piscícola o por la actividad agrícola (Vasconcelos 2001, Silveira & Feliciano 2003).

Cada vez más se reconoce que para establecer la influencia ya sea directa o indirecta de la presencia y desarrollo de las cianobacterias en cuerpos de agua lénticos, es necesario conocer aspectos relacionados con su persistencia, abundancia y diversidad (Chorus & Bartram 1999). En muchos países la abundancia de cianobacterias y los niveles de cianotoxinas, son factores usados para evaluar la calidad del agua. Densidades mayores a 20,000 células mL⁻¹ y niveles de microcistinas superiores a 1 ppb, no están permitidos en sistemas artificiales y naturales (World Health Organization 1998).

A pesar de lo anterior la información referente al grupo de las cianobacterias es limitada, según Codd *et al.* 2005, gran parte de los resultados de la investigación de la última década no se ha publicado y por ende todavía no están disponibles los datos más recientes. Con el auge de la acuicultura en lagunas costeras, lagos, estuarios y embalses, hay una enorme inversión de dinero en busca de desarrollos tecnológicos que garanticen la protección del proyecto en términos de la calidad del agua y la consecuente disminución de las mortandades de peces (Ramírez & Viña 1998).

En el caso particular de los embalses, es fundamental la realización de estudios que permitan conocer su dinámica desde una perspectiva no solo hídrica y fisicoquímica sino biológica, ya que estos ambientes artificiales además de cumplir con una gran variedad de funciones poseen condiciones propias con hábitats lénticos y lóticos que promueven el desarrollo de una gran variedad de organismos acuáticos. Los embalses son lugares artificiales de almacenamiento de agua que se utilizan muchas veces para la generación de energía eléctrica, el control de caudales e inundaciones, como reservorios de agua para consumo humano y actualmente en Colombia están siendo aprovechados para la producción pesquera (INCODER 2005).

La experiencia en el manejo y desarrollo de programas de aprovechamiento pesquero en embalses es escasa. Los pocos estudios y acciones que se han desarrollado en este sentido han obedecido a intereses aislados y muchas veces no se les ha dado la orientación adecuada, además, los impactos ambientales generados por estas grandes transformaciones son muy graves debido a los trastornos producidos, en especial los que repercuten en las poblaciones de peces y en su productividad (Ramírez & Viña 1998, Guillot *et al.* 1992).

El embalse de Betania en Colombia, sitio propuesto para la realización de este trabajo, se constituye como un ecosistema de creciente importancia en el conjunto de cuerpos de agua colombianos. Dentro de las consecuencias del impacto ambiental generado por la construcción de esta represa en el año 1987 y de los proyectos piscícolas que allí se desarrollan, se sabe de la pérdida sustancial de especies de peces migratorios aguas arriba de la presa; junto con la desaparición del bocachico, (*Prochilodus magdalenae*) y el pávalo (*Ichthyoelephas longirostris*) (INCODER 2005).

Se han reportado también mortandades de tilapia (*Oreochromis niloticus*), como las ocurridas en el año 2003, hacia la entrada del río Yaguará; y en febrero de 2007 en las zonas de mayor producción piscícola (INCODER, CAM & ICA 2007), probablemente a causa de la disminución del nivel del agua debido a la operación de la hidroeléctrica y por las condiciones climáticas. Además, aparentemente la entrada de contaminantes y de materia orgánica al embalse contribuyó también a los bajos niveles de oxígeno encontrados.

En Betania se han llevado a cabo algunas investigaciones sobre el fitoplancton y el zooplancton. En la mayoría se reporta una abundancia representativa de cianobacterias (Duque & Donato 1988, Herrera & Guillot 1991, Ramírez 1993, Montoya & Ramos 1993). Sin embargo, no se conoce ningún estudio en el que se

hayan valorado las cianobacterias en la bioindicación de la calidad del agua y su relación con el extenso cultivo de peces que allí se realiza.

Recientemente varios grupos de investigación del programa de Biología Marina de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, llevaron a cabo una consultoría para el Ministerio de Agricultura y el INCODER denominada “Actualización y ajuste del Plan de Ordenamiento de la Pesca y la Acuicultura (POPA) y formulación de un plan de contingencia para emergencias en los proyectos piscícolas en el embalse de Betania” (Rueda-Delgado *et al.* 2007) en la cual se realizaron estudios para actualizar el POPA y formular un plan para prevenir la mortalidad en los cultivos de peces, por el impacto ambiental que dicha actividad genera en las aguas del embalse.

Dentro de las actividades del grupo de Microbiología Acuática se consideró la realización de este trabajo de grado en el cual se pretendió cuantificar las poblaciones de cianobacterias y determinar su posible papel como indicadores de calidad de agua, así como su potencial como productoras de toxinas. Para ello se valoraron estos microorganismos bajo diferentes condiciones temporales y espaciales, con el fin de aportar nuevos elementos a su conocimiento en un ecosistema léntico como el embalse de Betania, que además de usarse para la generación de energía eléctrica, se emplea en actividades de acuicultura.

MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Características generales de las cianobacterias

El grupo de las cianobacterias (del griego *kuano*, azul), comprende procariontas que poseen clorofila *a* y realizan fotosíntesis oxigénica asociada con los fotosistemas I y II (Chorus & Bartram 1999). Se diferencian de los demás procariontas fototróficos (bacterias verdes y púrpuras), en los mecanismos de fotosíntesis, la estructura y composición del aparato fotosintético, los requerimientos nutricionales y el crecimiento fisiológico (Stayner 1977). A pesar de la gran diversidad de cianobacterias, los trabajos realizados con este grupo se han centrado en unos pocos representantes, lo que puede deberse en parte a dificultades técnicas respecto a su conteo, aislamiento y purificación cuando se tratan de cultivar (Ferris & Hirsch 1991).

Dado que poseen células procariontas, las cianobacterias, no poseen organelos típicos, esto es con membranas que los aíslan del medio circundante. Así mismo el “núcleo” no posee membrana nuclear, presentan una gruesa pared de peptidoglicano y sus pigmentos fotosintéticos se encuentran almacenados en los tilacoides, los cuales, permanecen libres en el citoplasma, cerca de la periferia celular. Su coloración puede variar desde azul - verdoso hasta rojo - violeta, dado que el verde generado por la clorofila *a*, casi siempre es enmascarado por las ficobilinas, los carotenoideos (beta - caroteno) y otros pigmentos accesorios (Stayner 1977).

Poseen una gran diversidad morfológica por lo que tradicionalmente se han organizado en los siguientes cinco grupos: unicelulares que se reproducen por fisión binaria, unicelulares que se reproducen por fisión múltiple y generalmente

forman colonias, filamentosas con células diferenciadas llamadas heterocistos, filamentosas sin heterocistos y las filamentosas con verdaderas ramificaciones (Madigan *et al.* 2009). Las formas unicelulares van desde esféricas hasta ovoides o cilíndricas, mientras que las coloniales son generalmente irregulares, formadas por células unidas por una matriz mucilaginosa secretada durante el crecimiento de las mismas (Marín 2003).

Para asegurar su sobrevivencia las cianobacterias han desarrollado gran variedad de mecanismos adaptativos en términos bioquímicos, físicos y bióticos, que les permiten dominar bajo condiciones de elevado estrés ambiental. Entre otros mecanismos adaptativos se incluyen estrategias cuando hay limitaciones lumínicas, la fijación de nitrógeno, el almacenamiento de nutrientes y de metabolitos esenciales en su citoplasma, la producción de mucílagos para prevenir la desecación y promover la movilidad por deslizamiento, la presencia de vesículas de gas para regular la flotabilidad y la captura de metales del medio como Fe y Cu con estructuras especializadas llamadas sideróforos (Paerl 1994).

Como estrategia ante la limitación de luz solar las cianobacterias poseen ficobiliproteínas, una serie de pigmentos asociados a la clorofila *a*, dentro de los que se incluyen la aloficocianina y la ficocianina (azules) y la ficoeritrina (roja), estos pigmentos les permiten absorber luz en las regiones verde, amarilla y naranja del espectro (500 - 650 nm), radiaciones que no pueden ser usadas por otras especies fitoplanctónicas (Daniel *et al.* 1994). Estos microorganismos, también se caracterizan por presentar un buen balance energético, por lo que requieren de poca energía para el funcionamiento de sus células, lo cual les confiere cierta ventaja, en especial en aquellos cuerpos de agua con alto grado de turbidez, ya sea por crecimiento de otros organismos planctónicos, o por el aporte continuo de sedimentos (Fay 1992).

Una de las más importantes actividades metabólicas de las cianobacterias es la fijación de nitrógeno, por medio de la cual se convierte el nitrógeno dimolecular (N_2) en amonio (NH_4), con intervención de la enzima glutamina sintetasa. El proceso ocurre en el heterocisto, una célula con especializaciones a nivel estructural y bioquímico que facilitan la fijación de nitrógeno en condiciones anaeróbicas, aunque las cianobacterias se encuentren en ambientes aerobios. Para la mayoría de las especies, el amonio producido, es finalmente usado junto con otros minerales, luz solar, agua y CO_2 para los procesos de crecimiento y metabolismo (Chorus & Bartram 1999).

Factores que promueven el desarrollo de las poblaciones de cianobacterias

Según Paerl (1994) ciertas condiciones que se dan al interior del medio acuático pueden favorecer el crecimiento de las cianobacterias como por ejemplo los procesos de eutrofización, las altas temperaturas superficiales ($>20^\circ C$), la presencia de una fuerte estratificación en la columna de agua, así como un incremento en el tiempo de residencia de la misma, ambientes alcalinos (con bajas concentraciones de carbono inorgánico) y sistemas poco profundos sometidos a largos periodos de exposición a la radiación solar.

Además, algunas cianobacterias pueden crecer en presencia de abundante materia orgánica y la mayoría requiere de altas concentraciones de fósforo y nitrógeno para su desarrollo. También es importante señalar que cuando en el agua se presenta una baja relación nitrógeno : fósforo (por exceso de fósforo y limitación por nitrógeno) se favorece la aparición de cianobacterias y en especial de aquellas especies capaces de fijar nitrógeno, éstas pueden entonces competir e incluso excluir a los otros microorganismos que allí se desarrollen (Plinski & Jozwiak 1999).

Un aspecto generalmente indeseado del desarrollo de las cianobacterias en los ecosistemas acuáticos bajo determinadas condiciones ambientales de temperatura y de nutrientes, es la formación de grandes tapetes de células que flotan en la superficie denominadas florecimientos (Campos *et al.* 2005). El término florecimiento, no solo hace mención al desarrollo de cianobacterias sino que, en un contexto más amplio indica el crecimiento exponencial fitoplanctónico, en el cual hay dominio de una o dos especies, que encuentran ventajas competitivas sobre otras y se desarrollan hasta alcanzar densidades iguales o superiores a 2×10^4 células. mL⁻¹ (Pizzolon 1996). Las floraciones pueden ser generadas por diatomeas, algas verdes, dinoflagelados o cianobacterias y solo resultan visibles en el momento en el que las células suben y se acumulan en la superficie formando una película viscosa.

Efectos del desarrollo de cianobacterias en el agua

Efectos ambientales. El fenómeno de eutrofización favorece la formación de florecimientos de cianobacterias con una serie de efectos negativos en el cuerpo de agua, razón por lo cual son frecuentemente utilizados como bioindicadoras de calidad. Adicionalmente más del 50 % de estos florecimientos en aguas continentales pueden estar formados por especies que sintetizan metabolitos de elevada toxicidad muchos de los cuales son fuertemente olorosos (De León 2002).

En general las floraciones, por su alta productividad primaria, consumen grandes cantidades de oxígeno durante la respiración lo que sumado a procesos de descomposición, sedimentación y degradación de la biomasa celular en el fondo, agotan el oxígeno disponible creando condiciones anóxicas que causan la muerte de algunos organismos acuáticos, en especial de peces que casi siempre son los más sensibles. También el desarrollo de cianobacterias favorece alteraciones en

el pH del agua debido al consumo de carbono, el cual puede volverse limitante para el desarrollo de otros organismos fitoplanctónicos (Pizzolon 1996).

Otra consecuencia de la formación de floraciones de cianobacterias es su asociación con microorganismos patógenos. Este fenómeno se ve favorecido por interacciones entre cianobacterias, microalgas y microorganismos como bacterias, hongos y ciliados a través de los agregados de las vainas de los filamentos de las especies de las cianobacterias que conforman el florecimiento. Si bien tales asociaciones son mutuamente beneficiosas entre los microorganismos planctónicos, son nocivas cuando algunos de los asociados son patógenos por ejemplo para los peces, se ha encontrado también que por efectos mecánicos ocurre la colmatación de las branquias en animales de diferentes tallas, lo que impide el intercambio gaseoso y mortalidad por asfixia (De León 2002).

Producción de toxinas. Ahora está bastante documentada la problemática ambiental generada por los florecimientos de cianobacterias, ya que algunos géneros producen toxinas o cianotoxinas, que se han considerado como los compuestos más tóxicos y preocupantes en las masas de agua tanto por su elevada distribución como por su alta toxicidad (Forjan *et al.* 2008; Jakobowski 2008; Avendaño & Arguedas 2006; Campos *et al.* 2005; Bernard *et al.* 2004). Las cianotoxinas son metabolitos secundarios que se generan y acumulan durante la producción de fotopigmentos. Ante condiciones ambientales desfavorables las cianobacterias mueren y liberan sus contenidos al agua mediante procesos de autólisis celular (Pérez *et al.* 2008).

Se conocen tres grupos funcionales de cianotoxinas: hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas (Wiegand & Pflugmacher 2005). De las hepatotoxinas, las más estudiadas son las microcistinas, heptapéptidos cíclicos producidos por una variedad de cianobacterias que están relacionadas con fenómenos de mortandad

de peces y enfermedades crónicas por su acumulación en el hígado debidas a un consumo masivo, lo que frecuentemente se ha señalado como causa del mal sabor de algunas especies de tilapia (Palikova *et al.* 2004). Las microcistinas entonces son hepatotoxinas que inhiben la actividad de la fosfatasa, cuya toxicidad se estima que es cien veces mayor que la del cianuro (De Leon 2002).

En regiones tropicales y subtropicales, los principales géneros relacionados con la producción de microcistinas son *Microcystis*, *Anabaena*, *Radiocystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon* y *Cylindrospermopsis*, de los cuales los dos primeros son los que presentan el mayor número de especies tóxicas (Sant' Anna *et al.* 2008). Sin embargo se sabe que dentro de una misma especie pueden existir cepas productoras y no productoras como consecuencia de diferencias genéticas, metabólicas o por la influencia de factores ambientales sobre el cuerpo de agua (World Health Organization 1998).

Por lo expuesto, ahora es cada vez más frecuente en los estudios sobre las cianobacterias, la valoración de su presencia desde una perspectiva de abundancia y composición, complementada con la realización de ensayos para evaluar su potencial como generadoras de cianotoxinas (Roset *et al.* 2001). En los primeros estudios llevados a cabo a mediados de los noventa, la toxicidad de las floraciones era determinada con ensayos en ratones (Chu *et al.* 1989). Sin embargo ésta metodología resultó ser inadecuada para medir concentraciones de microcistinas muy bajas. Actualmente, el desarrollo e implementación de mejores métodos analíticos, tales como la técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) permiten la cuantificación total e individual de cianotoxinas, debido entre otras cosas a su alta sensibilidad, especificidad y fácil operación (Roset *et al.* 2001).

Estudio de las cianobacterias

Determinación de la abundancia. Una buena información basada en identificación y determinación de abundancia de cianobacterias, es una herramienta invaluable cuando el estudio de la calidad del agua de determinado sitio es el objetivo. La identificación de grupos de cianobacterias con potencial para originar floraciones, es con frecuencia el mejor modo de detectar una zona susceptible de sufrir dichas proliferaciones (Chorus & Bartram 1999).

En los métodos tradicionales la cuantificación de las células se realiza con ayuda de diversas cámaras como Sedwick – Rafter, Palmer Maloney y Petroff – Hausser, todas para uso en microscopios compuestos comunes y la denominada Utermöhl para microscopios invertidos. El procedimiento que usa microscopía invertida y cámaras de sedimentación tipo Utermöhl, es de los más utilizados para la numeración del fitoplancton, ya que permite con ayuda de un tubo especial, la sedimentación de las células de la muestra. Con este método, la enumeración de los microorganismos se realiza con aumento de 40x en campos aleatorios siguiendo transeptos horizontales o verticales, hasta completar 400 células de la especie más frecuente (San't Anna & Azevedo 2006; Chorus & Bartram 1999).

Sin embargo, la estimación de la abundancia real de cianobacterias siguiendo las metodologías antes descritas es complicada, más si se tiene en cuenta que muchas células por acumularse en los bordes de la cámara pueden no ser cuantificadas, lo mismo sucedería cuando se presenten colonias formadas por cientos de células que además de presentar tamaños muy pequeños, muestren una distribución compacta (Bernard *et al.* 2004).

Ante estas limitaciones el método de microscopía de epifluorescencia es cada vez mas utilizado en la cuantificación de la abundancia y biomasa del picofitoplancton, del cual hacen parte las cianobacterias. La técnica se basa en la capacidad de ciertos compuestos como la clorofila *a*, de fluorescer cuando son estimulados con luz con una determinada longitud de onda. En el procedimiento los microorganismos de la muestra, deben ser retenidos por un filtro de policarbonato, lo que posteriormente permite la identificación y conteo de las células en su superficie. Las cianobacterias retenidas en el filtro son identificadas por su autofluorescencia, tamaño y forma cuando, con ayuda del microscopio de epifluorescencia, al ser estimuladas con luz azul y/o ultravioleta. También es posible usar marcadores fluorescentes, que permiten contar diferencialmente el picoplancton autótrofo y el heterótrofo (MacIsaac & Stockner 1993). Una ventaja adicional de esta técnica es que permite con la ayuda de una retícula determinar los tamaños de la fracción del plancton de interés para el estudio (picoplancton y nanoplancton de 0,2 μm a 20 μm).

Aislamiento y cultivo. Como complemento a las observaciones microscópicas, el cultivo y aislamiento de cianobacterias se constituye en una herramienta útil para identificar de forma mas completa ciertas características fisiológicas y genéticas de las cepas de interés. A una mayor escala, la implementación de cultivos de cianobacterias aisladas de las poblaciones naturales se realiza con fines nutricionales, toxicológicos o biotecnológicos (Sánchez 2001).

Para el cultivo de cianobacterias en el laboratorio se recomienda la utilización de medios de cultivo selectivos para autótrofos constituidos principalmente por compuestos inorgánicos, algunos minerales y ciertas vitaminas esenciales para su crecimiento, luz constante y temperaturas entre 20 y 25 ° C son comúnmente empleadas (Soeder 1980). En los casos en los que se requiera mantener las

cepas vivas durante prolongados periodos de tiempo, es necesaria la realización de pases (repiques) con una frecuencia que dependerá de la especie en cultivo.

Para Ferris & Hirsch 1991, las limitaciones más frecuentes para cultivar cianobacterias se deben a los requerimientos nutricionales de las distintas cepas, los posibles errores de las técnicas utilizadas para el aislamiento y subsiguiente purificación, así como la aparición de otros microorganismos autótrofos y bacterias heterótrofas que dificultan la obtención de cultivos puros. Cuando se trata de producciones a gran escala, se emplean cultivos abiertos y en la mayoría de los casos fotobiorreactores, construidos con tubos de plástico transparente o translucido dispuestos en paralelo y de manera helicoidal. La ventaja de los fotobiorreactores radica en que permiten un mejor control de las condiciones del cultivo al evitar la pérdida de agua por evaporación y prevenir posibles contaminaciones por otras especies.

Además de la importancia académica, las cianobacterias producidas en los cultivos se utilizan como alimento de peces, ya que contienen gran parte de los aminoácidos esenciales, en la producción de biocombustibles y en los procesos de biofertilización de suelos, entre otros (Garbisu *et al.* 1999).

Las cianobacterias y la bioindicación

Se considera como indicador biológico acuático a aquella población de individuos de una determinada especie cuya presencia y abundancia señalan algún proceso o estado del sistema en el cual esta habita. En la mayoría de los casos, los indicadores biológicos se asocian directamente con calidad de agua, sin que esto implique que no puedan también utilizarse en todo lo relacionado con procesos ecológicos (Pinilla 2000).

En términos de calidad de aguas, la detección de cambios a partir de la dinámica de las comunidades fitoplanctónicas se constituye en un dato confiable y de bajo costo debido a que no requiere de equipos muy sofisticados. Se basa en que los organismos reflejan los cambios que se han presentado en un recurso hídrico, a diferencia de los parámetros fisicoquímicos que solo muestran las situaciones puntuales en el momento de la muestra. Es así como la presencia y abundancia de determinados grupos, permite una aproximación al estado trófico de un cuerpo de agua, así como a dilucidar posibles causas de tal estado y podría ser útil para prevenir posteriores problemas y aproximarse al uso potencial del recurso (Biggs & Kilroy 2000).

Dentro los grupos fitoplanctónicos, el de las cianobacterias es de los más utilizados en la bioindicación, debido a su amplia distribución y al hecho de ser responsables de gran parte de la biomasa, productividad y ciclo de nutrientes en los sistemas acuáticos. Las cianobacterias tienen la capacidad de responder fácilmente a cualquier tipo de perturbación ambiental, así como a cambios físicos, químicos y bióticos que puedan presentarse en el sistema (Paerl *et al.* 2003).

En cuerpos de agua eutroficados, como consecuencia del aporte continuo de nutrientes, así como en aquellos con limitación por nitrógeno, resulta común la aparición de floraciones de cianobacterias, compuestas por especies capaces de fijar nitrógeno, las cuales exhiben cambios a nivel morfológico (aparición de heterocistos o de aquinetos de resistencia) que pueden ser utilizados como indicios del estado del sistema (Jakobowski 2008). De igual manera, la presencia de espumas en la superficie del agua formadas por la acumulación de miles de células incapaces de distribuirse de manera homogénea a lo largo de la columna, alerta sobre condiciones adversas para las demás poblaciones, en especial si se trata de peces altamente sensibles a los impactos generados por las poblaciones

de cianobacterias, en especial de aquellas potencialmente tóxicas (Chorus & Bartram 1999).

De esta manera, las poblaciones de cianobacterias presentan las cualidades propias de un indicador biológico y pueden no solo ser empleadas en la bioindicación de la calidad del agua, sino también de ciertas características tales como estratificación, turbulencia, presencia de determinados iones, entre otros, factores fácilmente detectados a través del uso de especies adaptadas a tales condiciones (Pinilla 2000).

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

En la actualidad, la mayoría de la normatividad mundial en materia de calidad de aguas contempla la obligatoriedad de detectar y cuantificar las poblaciones de cianobacterias y las toxinas que algunas especies pueden producir en ecosistemas lénticos, tales como los embalses (Roset *et al.* 2001). En Colombia no se encuentra contemplada dicha normativa en la legislación existente, sin embargo, su aplicación parecería fundamental para controlar fenómenos indeseables como por ejemplo mortandad de peces, cuando la calidad del agua es alterada por contaminación de estos ecosistemas.

En el caso del embalse de Betania, sitio en el que se cultiva en jaulones y de manera intensiva la tilapia, con una producción entre 3000 a 6000 toneladas (INCODER 2005), se tienen registros de mortandades atribuidas a una baja disponibilidad de oxígeno. Para señalar un evento significativo, en febrero de 2007, se produjo la muerte de más de 1000 toneladas de peces situación que se atribuyó a una disminución en el nivel del agua resultado en parte de una condición climática (casi tres meses de sequía) y de la operación de la hidroeléctrica de Betania. Además, estos factores junto con el ingreso de tierra y lodo generado por la erupción del volcán Nevado del Huila contribuyeron a los bajos niveles de oxígeno que nuevamente se señalaron como los responsables de la mortandad (INCODER CAM & ICA 2007).

Falta por aclarar el efecto ejercido por las técnicas de cultivo de tilapia sobre la calidad del agua del embalse, particularmente en la determinación de cómo los residuos de alimentos podrían influir de manera directa o indirecta en la ocurrencia de las mortandades. Lo anterior debido a que el incremento en la cantidad de

materia orgánica y el exceso de nutrientes particularmente fósforo (que hace parte del alimento), promueven el afloramiento de cianobacterias en el espejo de agua, las cuales generan alteraciones en factores, como el pH y el oxígeno disuelto, además de la producción de toxinas perjudiciales para algunos animales e incluso para el hombre (Roset *et al.* 2001).

Considerando la poca información disponible sobre la presencia de este grupo en el embalse de Betania y como una gran parte de los géneros de cianobacterias allí reportados son típicos de aguas contaminadas, resulta importante realizar este estudio, el cual servirá como punto de partida para la implementación de acciones que mejoren la calidad del agua en el embalse de Betania.

Con el presente trabajo se pretendió dar respuesta a los siguientes interrogantes:

¿Es posible determinar diferencias temporales y espaciales en cuanto a la abundancia y composición de las poblaciones de cianobacterias en el embalse de Betania?. ¿Pueden estas diferencias ser aprovechadas como índices de la calidad del agua?

¿Podrían floraciones de cianobacterias ser consideradas como potencialmente peligrosas e incidir en las actividades piscícolas que se realizan en Betania?

¿La realización de un estudio *in vitro* con cepas de cianobacterias aisladas del embalse podría brindar información sobre su toxicidad potencial?

Objetivo general

Establecer a través de la abundancia, composición y presencia de cepas potencialmente productoras de microcistinas, la utilidad de las cianobacterias en la valoración de las condiciones ambientales en el embalse de Betania con el fin de proponer su uso como bioindicadoras de la calidad del agua y de los riesgos para la actividad acuícola que allí se realiza.

Objetivos específicos

- Determinar la abundancia de las cianobacterias en las aguas del embalse de Betania.
- Evaluar la composición de cianobacterias en particular aquellas que se consideran potencialmente tóxicas.
- Establecer los cambios temporales y espaciales en las poblaciones de cianobacterias, en términos de composición y abundancia de especies.
- Aislar y cultivar en el laboratorio cianobacterias del embalse e indagar acerca de su potencial tóxico.

HIPÓTESIS

Considerando que en el país no hay normatividad respecto a niveles permisibles de cianobacterias en aguas continentales utilizadas en actividades piscícolas y son pocos los trabajos que analizan su importancia en la valoración de las condiciones ambientales en un cuerpo de agua, con el presente trabajo se

pretende obtener información en una propuesta que privilegia a las cianobacterias como indicadores de calidad de agua en embalses.

Para responder la primera pregunta de investigación se propone la siguiente hipótesis:

Hay una clara relación entre la abundancia y composición de cianobacterias y las condiciones de calidad de agua en el embalse de Betania de acuerdo a escalas temporales y espaciales.

Para responder a las dos siguientes se plantea:

La composición específica de las cianobacterias en el embalse brinda información contundente acerca de su potencial tóxico.

A través del comportamiento *in vitro* de cepas de cianobacterias es posible predecir su potencial tóxico *in situ*.

METODOLOGÍA

Área de estudio

La cuenca de captación y el embalse de Betania se sitúan en el valle superior del río Magdalena entre las cordilleras central y oriental a 35 Km. de la ciudad de Neiva (Departamento del Huila). El embalse registra patrones de comportamiento espaciales y temporales que no son homologables a ningún sistema natural, su presa es de 91 m de altura, ocupa un área aproximada de 7400 ha en la cota normal de operación, con una profundidad promedio de 32,77 m, un nivel promedio de 557,16 metros sobre el nivel del mar (msnm), con un caudal de entrada de 463,26 m³/ seg. y uno de descarga de 338, 6 m³/ seg. El tiempo de residencia de las aguas es en promedio de 50 días (INCODER 2005).

El embalse tiene forma de herradura, con dos zonas bien diferenciadas a causa de las aguas de los ríos que lo conforman: una comúnmente conocida como subembalse del Magdalena, en la que confluyen los ríos Guarapas, Suaza, Páez y Magdalena, caracterizada por ser angosta, de paisaje escarpado, más profunda y con un mayor caudal aferente; la otra el subembalse del Yaguará formada por el río Yaguará, más ancho, menos profundo, con zonas litorales y con menor caudal que el Magdalena (INCODER 2005).

Longitudinalmente se presenta una zona ribereña (ubicada en entrada de los ríos), una zona de transición (parte media) y una zona lacustre. Verticalmente y a causa de la estratificación térmica y química propia del embalse están la zona limnética (con altos valores de productividad y oxígeno), la de aguas profundas (con condiciones hipóxicas) y la litoral (con presencia de macrófitas flotantes) (INCODER 2005).

El clima de la región, está regido por la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT), que corresponde a la zona donde se encuentran los vientos alisios de ambos hemisferios junto con los vientos de la corriente del occidente, que solo presentan incidencia hacia las estribaciones del Nevado del Huila, esta zona marca dos épocas, lluvias altas (invierno) con dos picos en los meses de abril y noviembre (Herrera & Guillot 1991) y lluvias bajas (verano). La temperatura promedio anual es de 28 °C y la precipitación media mensual es menor de 1400 mm.

Dentro de las actividades productivas para la zona del embalse se encuentran la piscicultura, la ganadería, la agricultura y aquellas que involucran el uso del subsuelo para extraer oro, todas promueven la entrada de contaminantes, ya sea fertilizantes o metales pesados al agua del embalse y al río Magdalena (Ramírez 1993).

La actividad piscícola es una de las más importantes en la economía regional. La tilapia cultivada representa el 58 % de la producción acuícola departamental. Los cultivos se realizan en jaulones de diferente tamaño y capacidad (INCODER 2005). La totalidad de los cultivos se encuentran localizados en las ensenadas o zonas litorales, las cuales se caracterizan por presentar altos valores de productividad.

Fase de campo

Sitios de muestreo. Los muestreos realizados para este estudio se llevaron a cabo en los mismos sitios utilizados para la ejecución de la Consultoría en la que se enmarca el trabajo (Rueda-Delgado *et al.* 2008). Como información, para la definición de los sitios de muestreo se tuvo en cuenta una zonificación propuesta para el sub embalse del Magdalena y aspectos hidrodinámicos propios del sub embalse.

Tabla 1. Sitios de muestreo en el embalse de Betania con información acerca de ubicación geográfica y producción piscícola (Modificado de Rueda-Delgado *et al.* 2008).

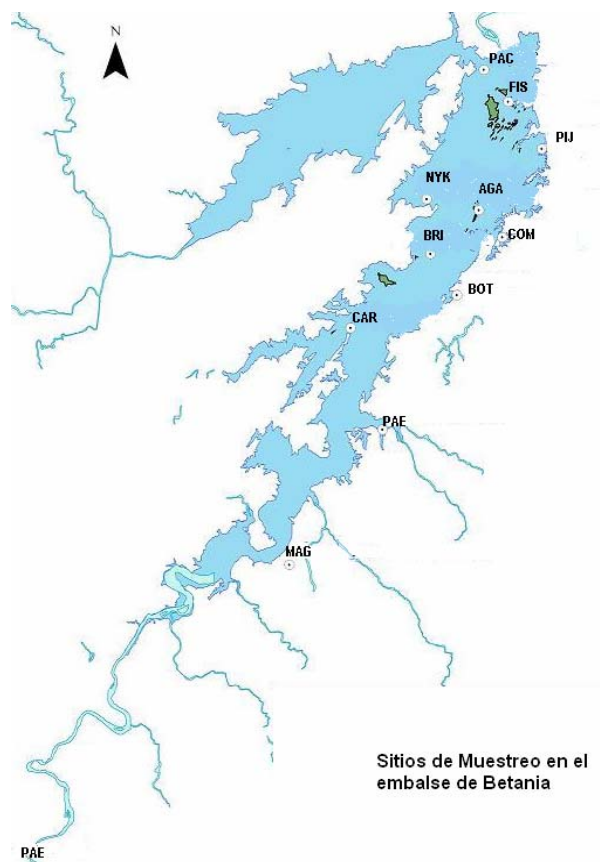
Sitios de Muestreo		Observaciones
No.	Nombre	
1	Bahía los Pijaos 75°25'15.3" W, 2°40'47.8" N	Producción piscícola mediana en área permitida
2	Comepez 75°25'58.1" W, 2°39'8.8" N	Producción alta en área permitida
3	Botero 75°26'47.1" W, 2°38'4.2" N	Producción mediana en área permitida
4	Puente Amarillo 75°28'7.51" W, 2°35'33.8" N	Cola del embalse, entrada de aguas residuales del municipio de Hobo
5	Caraguaja 75°28'42.3" W, 2°39'13" N	Producción poca en área permitida
6	Las Brisas 75°27'28" W, 2°38'50.5" N	Producción mediana en área permitida
7	New York 75°27'19.9" W, 2°39'51.7" N	Producción alta en área permitida
8	Pacandé 75°26'55.2" W, 2°40'30.6" N	Producción alta. Se considera como no apta para esta actividad
9	Las Islas (Fish flow) 75°25'52" W, 2°41'40.5" N	Producción mediana. Zona profunda del embalse
10	Aguas Abiertas 75°26'45.7" W, 2°41'08" N	Se considera como zona de control con perspectivas de uso
11	Herradura del Río Magdalena 75°29'48.2" W, 2°33'2.5" N	Aguas que ingresan al sistema de Betania.
12	Río Páez 75°35'25.6" W, 2°27'29.8" N	

De esta manera, la toma de muestras de agua se llevó a cabo en 13 estaciones ubicadas en los sitios descritos en las tablas 1 y 2 y en la figura 1. Diez se localizaron en las bahías donde se encuentran los proyectos piscícolas, nueve de ellas fueron constantes y la última estación fue diferente para cada salida de campo, se determinó de acuerdo a condiciones particulares que pudieran brindar información adicional acerca del posible estado del embalse. Los otros tres puntos de muestreo se ubicaron en lugares que podían ejercer alguna influencia en la

calidad del agua, una de ellas situada en inmediaciones de la cola del Magdalena en el sector conocido como Puente Amarillo, donde entran las aguas residuales del municipio de Hobo y las otras dos en la entrada del río Magdalena (en la zona denominada la Herradura) y en el río Páez, específicamente en donde éste entra al Magdalena.

Tabla 2. Sitios de toma de muestras microbiológicas en el embalse de Betania (Huila).

No.	NOMBRE
1	Bahía los Pijaos (PIJ)
2	Bahía Comepez (COM)
3	Bahía Botero (BOT)
4	Sector Puente Amarillo (PAM)
5	Bahía Caraguaja (CAR)
6	Bahía Las Brisas (BRI)
7	Bahía Nueva York (NYK)
8	Piscícola Pacandé (PAC)
9	Las Islas (Fish Flow) (FIS)
10	Aguas Abiertas (AGA)
11	Herradura R. Magdalena (MAG)
12	Río Páez (PAE)
13	1 muestreo: Ecopez (ECO) 2 muestreo: La Española (LES) 3 y 4 muestreo: Cueva del Amor (CAM) 5 muestreo: Puerto Mómico (MOM)



Entre paréntesis simbología utilizada para cada sitio

Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en el embalse de Betania. Tomado de Canosa *et al.* 2008.

Periodicidad del muestreo. Durante el desarrollo del trabajo de grado, se realizaron cinco salidas de campo al embalse de Betania, las cuatro primeras se llevaron a cabo en los meses de julio, septiembre, octubre y noviembre del año 2007 y la última en el mes de febrero de 2008. Cabe anotar que aunque dentro del proyecto se tenía contemplada la realización de un muestreo cuando el embalse presentara su nivel más bajo, esto no fue posible debido principalmente a factores climáticos. Es así como, en orden descendiente el nivel más alto del embalse se presentó durante el mes de julio, seguido por febrero, octubre, noviembre y septiembre.

Recolección de muestras. Se tomaron muestras de agua superficial por duplicado (original y réplica), en tubos Falcon estériles de 50 mL, rotulados y protegidos de la luz con papel aluminio (figura 2). Una de las muestras sin fijar se utilizó para el cultivo de las cepas de cianobacterias. La otra muestra se fijó en campo con gluteraldehído bufferado (GTA-B) al 1% de concentración final y se empleó para cuantificar las poblaciones de cianobacterias por el método de epifluorescencia. Ambas fueron almacenadas bajo refrigeración hasta su posterior análisis en el laboratorio.



Figura 2. Imagen que describe la toma superficial de muestras de agua en el embalse de Betania

Fase de laboratorio

Enumeración de las cianobacterias

Para obtener los datos de abundancia de las cianobacterias se empleó la técnica directa de conteo por epifluorescencia de acuerdo a la metodología sugerida por Caron (1983), ya validada en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (Canosa 2007). Este método permite obtener conteos de las poblaciones autótrofas y heterótrofas del pico y nanoplancton dependiendo de lo que se esté buscando. En este trabajo, se reportarán las densidades de microalgas y cianobacterias entendidas como comunidad autótrofa o fitoplanctónica y la de heterótrofos, eucariotas del plancton.

Se utilizó como fluorocromo primulina que tiñe el citoplasma y las membranas de los organismos en estudio con la ventaja de no enmascarar la auto fluorescencia de la clorofila a. Se usaron filtros Nucleopore de 0,2 μm de diámetro de poro y 25 mm de diámetro. Se probaron diferentes volúmenes de la muestra a filtrar, de tal manera que se obtuviera un número de células por campo fácilmente contable. Durante la filtración se usó una presión de vacío entre cinco y diez pulgadas de mercurio.

Luego de filtrada la muestra, el filtro se enjuagó con porciones de 1 mL de una solución de Triz- HCl 0,1 M pH 4 (solución de enjuague), para arrastrar posibles microorganismos adheridos en las paredes del túnel de filtración. Seguidamente se llevó a cabo la tinción, añadiendo 2 mL de primulina a una concentración final de 250 $\mu\text{g/L}$, el cual se dejó actuar durante 20 minutos (sin vacío). Transcurrido dicho tiempo, se removió el colorante y se procedió a enjuagar con 2 mL de solución de enjuague.

El montaje de los filtros se llevó a cabo sobre una lámina portaobjetos colocando aceite de inmersión de baja fluorescencia entre lámina y laminilla cubreobjetos. Las preparaciones fueron almacenadas en refrigeración y a oscuras hasta su conteo.

Durante el conteo de las cianobacterias se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Uso de un microscopio de epifluorescencia Olympus B-Max- 60 (Olympus Corporation, Lake Success, New York, USA) con filtros de excitación para luz azul y luz ultravioleta.
- Elegir al azar treinta campos en cada filtro. Un número de microorganismos contados en cada filtro mayor a 200. Tener en cuenta las células del picoplancton y del nanoplancton, con tamaños entre 0,2 y 20 μm (se usó una retícula ocular, en la cual y para el objetivo de 100 X, cada cuadrado equivale a 10 μm).
- Para diferenciar los organismos heterótrofos de los autótrofos se utilizaron características propias de cada grupo. La fracción total del plancton se determina con luz ultravioleta ya que en este rango la primulina tiene su máximo de excitación y las células coloreadas se observan de un intenso brillo color azul blancuzco, mientras que al cambiar el filtro de excitación hacia la luz azul, se identifican las autótrofas, por la observación de una coloración roja típica de la clorofila a, luego de ser estimulada con esta longitud de onda.

- La densidad de células se determinó con la fórmula:

$$\text{Número de células por mL} = \frac{N * F * D}{V}$$

N: número promedio de células por campo

F: Veces que cabe el área de la retícula en el área de filtración del filtro.

Área de filtración= $\pi r^2 = \pi \times (8,5)^2 = 226,98 \text{ mm}^2$. Área retícula = 0,01 mm^2 . (F= Área de filtración/ Área retícula = 226,98/ 0,01 = 22698)

D: Inverso de la dilución si la hay. A excepción de los datos de la quinta salida (muestras procesadas sin fijar) el factor fue de 37,5/ 35= 1,0714.

V: Volumen filtrado de muestra

Composición de cianobacterias

Para la identificación de las cianobacterias en las muestras de agua del embalse, se tuvieron en cuenta características como tamaño, agrupación y morfología. Se usaron diferentes claves taxonómicas para estudiar además la composición de los organismos del fitoplancton (Sant'Anna & Azevedo 2006, Komarek & Anagnostidis 1998 y 2005). Debido a las dificultades que se encuentran para determinar hasta el nivel de especie los miembros de este grupo, particularmente cuando se observan aumentados 1000 veces, en este trabajo, la identificación se realizó hasta el nivel de género.

Adicionalmente, en junio de 2008, quien presenta este trabajo, asistió al Curso Internacional de Morfología, Taxonomía y Ecología de Diatomeas de Ambientes Acuáticos Continentales que se realizó en la ciudad de Tunja, con el fin de reforzar la identificación de microorganismos autótrofos presentes en las muestras de Betania.

Aislamiento y cultivo de cianobacterias en el laboratorio

Esterilización del material. Todo el material de vidrio usado para cultivar las cianobacterias se lavó con jabón y enjuagó dos veces, primero con agua de chorro y luego con destilada. Se esterilizó envuelto en papel kraft con los debidos controles y por calor seco a 140 °C, durante dos horas.

Medios de cultivo. El medio de cultivo Bristol es comúnmente empleado para organismos autótrofos como las cianobacterias (Sánchez 2001). En el laboratorio se preparó de acuerdo a la composición de la tabla 3. La composición de oligoelementos y vitaminas se indica más adelante.

Tabla 3. Composición química del medio Bristol

Componentes	(g / 1000 MI)
NaNO ₃	1
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,025
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄	0,075
KH ₂ PO ₄	0,075
NaCl	0,025
Solución Oligoelementos	5 MI
Solución de Vitaminas	5 MI
Agar	15 g

El medio Bristol puede ser utilizado en forma de caldo, por el contrario se puede usar adicionado con agar tal y como aparece en la tabla 3. En este trabajo se usó casi siempre en forma de caldo. Algunas cepas de cianobacterias requieren para crecer la presencia en el medio de ciertos metales y vitaminas, es por esto que dentro de los constituyentes del medio Bristol se encuentran dos soluciones, una

de oligoelementos compuesta por $ZnCl_2$, $MnCl_2$, Na_2MoO_4 , $CoCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4$ y Na_2 -EDTA y la otra de vitaminas específicamente tiamina y biotina.

Condiciones de cultivo. Se inoculó con pipeta estéril y en condiciones asépticas 1 mL de cada muestra a tubos de ensayo con 7 mL de medio Bristol. Se incubó a 25 °C con luz constante, hasta obtener crecimiento en cada uno de los medios sembrados. Una vez se detectó crecimiento de microorganismos, por turbidez, cambio de color y formación de sedimentos, natas o tapetes, se tomaron muestras que se observaron en el microscopio de luz para seleccionar aquellos cultivos en los cuales se desarrollaron cianobacterias. En los medios con crecimiento positivo se llevaron a cabo repiques a caldo y agar Bristol. A cada cultivo se le asignó un número y ahora hacen parte del cepario de Microalgas y Cianobacterias del Laboratorio de Microbiología de la Universidad

Detección de Microcistinas

En este trabajo se usó ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) competitivo directo para valorar las microcistinas en algunas muestras de aguas y de cultivo. En la tecnología ELISA se busca reconocer un antígeno o un anticuerpo. Los complejos antígeno anticuerpo reaccionan con un conjugado unido a una enzima que actuará sobre un sustrato que al ser modificado por la enzima origina cambio de color si el antígeno o el anticuerpo están presentes. En el sistema competitivo el cambio de color solo se da en ausencia del antígeno o el anticuerpo, este es el diseño empleado para la detección de microcistinas en aguas.

En una explicación breve del procedimiento, el antígeno (microcistina) se unirá con un anticuerpo específico que se encuentra fijo a una fase sólida en este caso la superficie de un tubo especial. En la prueba, se incubó la muestra (microcistina

desconocida) y los patrones también llamados calibradores (microcistina conocida) en diferentes concentraciones (0,4, 1 y 2,5 ppb) en los tubos que poseen los anticuerpos fijos. Luego se adiciona un conjugado, compuesto por un antígeno (microcistina) ligado a un enzima (peroxidasa), de manera que éste (el conjugado) compite con las microcistinas de la muestra por los sitios de unión a los anticuerpos ligados. Si no hay microcistinas en la muestra, los sitios de unión al anticuerpo quedarán libres y el conjugado (antígeno - enzima) se unirá.

Posteriormente, se adiciona el sustrato, que hará visible cualquier reacción que se haya dado originando un cambio de color por la reacción entre éste y la peroxidasa. Es así como en las muestras que no contienen microcistinas se producirá un intenso color azul. En las que se encuentran, pero en baja concentración, algunos de los anticuerpos se unirán a las moléculas del conjugado (los otros han reaccionado con el antígeno) por lo que actuarán en menor proporción sobre el sustrato originando un color azul menos intenso. En aquellas muestras con altas concentraciones de microcistinas, se impide que las moléculas del conjugado reaccionen puesto que todos los anticuerpos han reaccionado con el antígeno sin dejar alguno libre para unirse el conjugado, por lo anterior el sustrato adicionado no será cambiado lo que dará como resultado una solución incolora (Chu *et al.* 1989, Avendaño & Arguedas 2006).

Se utilizó un kit distribuido comercialmente por Envirologix Inc. (Portland, ME 04103). Debido a los costos de los reactivos, solo fue posible determinar la concentración de microcistinas en algunas muestras de agua (correspondientes a la quinta salida) y en ciertos cultivos de las cepas aisladas del embalse de Betania. En el procedimiento se siguieron las recomendaciones de la casa comercial y aunque se usó un procedimiento cualitativo (Qualitube™ Kit for Microcystin, Envirologix™) fue posible con ayuda de calibradores de concentración conocida y con espectrofotometría (espectrofotómetro Spectronic 7.0) construir

una curva patrón para obtener datos semicuantativos de la concentración de microcistinas en muestras que dieron resultados positivos. Para detalles metodológicos de la prueba, en el Anexo 1 se muestra el procedimiento técnico en forma de diagrama.

Con el fin de determinar la precisión de las pruebas realizadas, en aquellas que se efectuaron por duplicado (original y replica) se calcularon parámetros estadísticos descriptivos tales como Desviación Estándar (DS) y Coeficiente de Variación (CV), los cuales permitieron determinar la existencia o no de diferencias representativas entre pruebas.

Fase de gabinete

Manejo de datos. Para el análisis de los resultados obtenidos, los datos se organizaron en tablas de resumen con Microsoft EXCEL de Office XP. Además se obtuvieron gráficas de barras y de líneas para representar las diferencias temporales y espaciales en la abundancia de cianobacterias, de células totales, de autótrofos y de heterótrofos y en la concentración de microcistinas.

Análisis de datos. Para establecer cambios a nivel espacial y temporal de la abundancia de cianobacterias, de células totales y de microorganismos pertenecientes al nanoplancton autótrofo y al heterótrofo, se llevaron a cabo pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas dependiendo de si los datos cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Plus versión 5.1.

En la mayoría de los grupos los valores de número de células no presentaron una distribución normal, ni siquiera luego de realizadas las transformaciones pertinentes (Log X, Log (X+1) y raíz cuadrada, según el caso), razón por la que se

utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis en la cual se establecieron como tratamientos tanto la época como los sitios de muestreo. Debido a que se encontraron diferencias significativas a un nivel de significancia del 95 % tanto entre las épocas de muestreo como entre las estaciones, se realizó el test estadístico no paramétrico de Dunn, con el fin de determinar entre cuales grupos, estaciones o épocas se encontraban las diferencias (Zar 1999).

Para establecer posibles relaciones entre la abundancia de las poblaciones de cianobacterias y del nanoplancton autótrofo y heterótrofo se llevaron a cabo correlaciones de Pearson (paramétrica) y Spearman (no paramétrica), según el caso, además de análisis de regresión.

Utilizando los datos de abundancia de los géneros de cianobacterias presentes en las muestras analizadas, se calcularon índices ecológicos con el fin de determinar algunos atributos estructurales de la comunidad, utilizando el programa Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research (Primer 5.0). La riqueza (número de géneros) se evaluó mediante el índice de Margalef y la diversidad con los índices de Shannon-Wiener (H') y de Simpson (λ'). Para establecer la uniformidad en cuanto a la distribución de los microorganismos por género, se determinó la equiparabilidad a través del índice de Pielou (J') y para determinar el número de especies abundantes y muy abundantes, se utilizaron los números de Hill 1 y 2 (Ramírez, 2005).

Adicionalmente, para establecer diferencias temporales y espaciales en cuanto a riqueza de especies, se construyeron curvas de rarefacción en las que se determinó el número esperado de especies en función del tamaño de la muestra. Con los datos de diversidad se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas (Ludwing & Reynolds 1988).

Con el fin de establecer similitudes entre zonas con respecto a la composición de especies se realizó un análisis de agrupamiento para el cual se utilizó el índice de similaridad de Bray – Curtis que arrojó una matriz de similaridad a partir de la que se construyó un fenograma. La representación obtenida fue posteriormente validada a través de un Coeficiente de Correlación Cofenético cuyo resultado fue de 0,86, lo que significa que esta puede considerarse como una buena representación de la realidad (Crisci & López, 1983).

RESULTADOS

Variación temporal y espacial de la densidad de cianobacterias

En los párrafos siguientes se presenta la descripción de los resultados, la cual se enfocará en cuatro zonas para organizar de modo más claro y conciso los resultados obtenidos. Sin embargo vale la pena anotar que en la primera zona, correspondiente al embalse propiamente dicho, se encuentran los proyectos piscícolas y diez puntos de muestreo; en las zonas de Puente Amarillo, sitio de entrada de las aguas residuales del municipio de Hobo y en los ríos Páez y Magdalena, se consideró un solo punto de muestreo respectivamente.

Es así como en la zona correspondiente al embalse, la abundancia de cianobacterias para todo el periodo de estudio estuvo entre 1676 y 127271 células.mL⁻¹ con un promedio de 36147 células.mL⁻¹. En Comepez (COM) se encontró el mayor valor (47322 células.mL⁻¹) y el menor en Pacande (PAC) con 24602 células.mL⁻¹ (figura 3). Los valores numéricos encontrados se muestran en el Anexo 2. El análisis estadístico mostró diferencias espaciales (K=14,52 y p=0,026), debidas en gran parte a los datos encontrados en Las Islas Fish Flow (FIS) (ver Test de Dunn en Anexo 3).

En cuanto al sector de Puente Amarillo el promedio de cianobacterias fue de 31778 células.mL⁻¹, con valores mínimos y máximos de 2604 y 78795 células.mL⁻¹. En comparación a los otros sectores, los ríos Páez y Magdalena presentaron menores abundancias, entre 1554 y 32685 células.mL⁻¹, con promedios de 16094 y 13588 células.mL⁻¹ (figura 3, Anexo 2). En términos generales se presentó una tendencia hacia un aumento en la abundancia de cianobacterias a lo largo del eje ríos Páez-Magdalena-Embalse (figura 3 C).

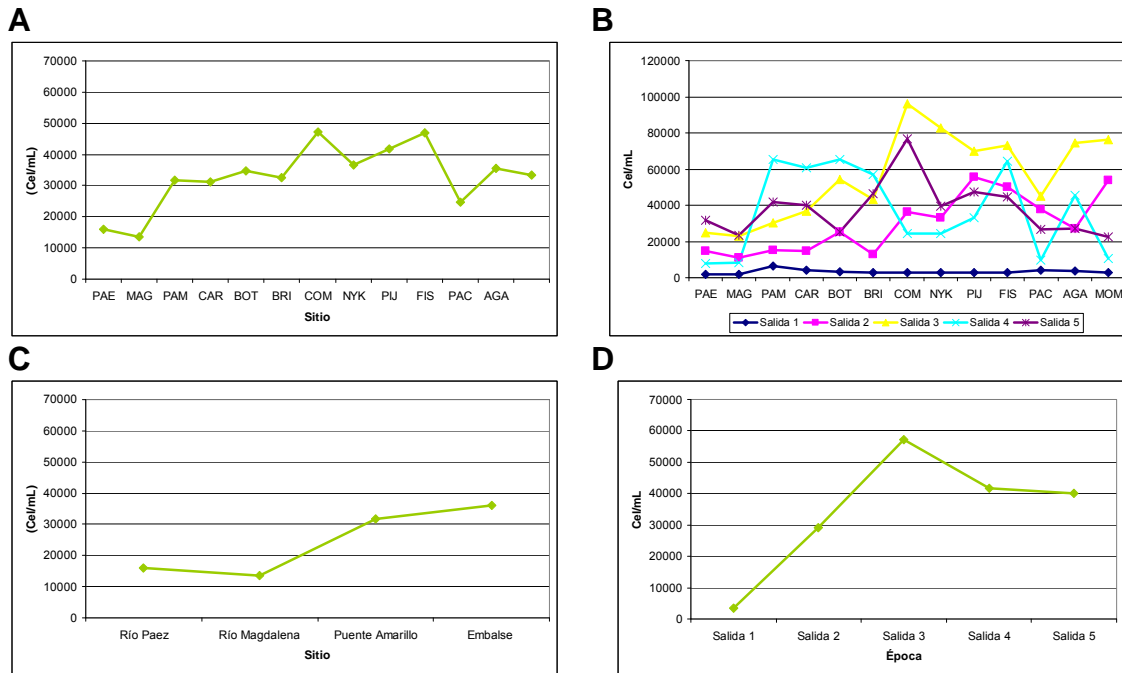


Figura 3. Variaciones espacio temporales de las densidades de cianobacterias en el embalse de Betania durante todo el periodo de estudio (julio, septiembre, octubre y noviembre de 2007 y febrero de 2008). (A) Promedio de densidades en los sitios de muestreo. (B) Densidades en cada sitio de muestreo y en cada salida. (C) Promedio de densidades de acuerdo a las cuatro zonas establecidas. (D) Promedio de densidades de acuerdo a la época de muestreo.

También se observaron diferencias en los conteos de las cianobacterias de acuerdo a la época de muestreo (figuras 3 B y D). En el mes de julio (primera salida) se registraron los menores valores, con una tendencia hacia el aumento hasta el mes de octubre (tercer muestreo) (Anexo 2). Con el Test no paramétrico de Dunn se determinó que las diferencias de las densidades de cianobacterias en una escala temporal fueron significativamente diferentes cuando se compararon con las del mes de julio ($p < 0.05$) (Anexo 3).

Los mayores conteos de cianobacterias se registraron en el mes de octubre (periodo de lluvias) con $65103 \text{ células.mL}^{-1}$, en esta época se produjo una gran palizada proveniente del río Magdalena con dirección a la presa, además de

aguas muy turbias y con espuma, se encontraron varios animales en descomposición (en su mayoría peces) y presencia anormal de chulos a orillas del embalse (figura 4). En contraposición, aunque en el mes de julio el embalse estaba lleno, no se observaron características ambientales como las descritas en octubre, lo que aparentemente se ve reflejado en las densidades encontradas en este período; como se mencionó, en el mes de julio se presentaron las menores densidades de cianobacterias (promedio de $3172 \text{ células.mL}^{-1}$ para el embalse, $6218 \text{ células.mL}^{-1}$ para Puente Amarillo, 1782 para el río Páez y 1958 en el Magdalena).



Figura 4. Fotografía que permite observar en parte la palizada encontrada en el mes de octubre en el embalse de Betania en el que se encontraron las mayores densidades de cianobacterias

Los datos de conteos de cianobacterias en este trabajo reflejan en parte las características de la técnica empleada. Es posible que en algunos casos, las densidades se hayan subestimado. En ocasiones el conteo real de cianobacterias con el microscopio de epifluorescencia puede ser complicado cuando se presentan masas formadas por agrupaciones o colonias, como las de *Microcystis* sp. El problema se relaciona con la distribución compacta de las células que forman los agregados, cuyo número puede alcanzar los miles en una matriz de tres dimensiones. De igual manera, factores como la presencia de gran cantidad

de materia orgánica en las muestras pueden generar cierta dificultad al enmascarar algunas formas en las cuales la clorofila *a* no brille intensamente bajo la irradiación con luz azul.

Relación entre la abundancia de cianobacterias y el número total de células.

El procedimiento de conteo usado en este trabajo de grado, permite obtener varios datos. La primulina tiñe todos los organismos mayores a $0,2 \mu\text{m}$ que se han retenido en el filtro, de esta manera, cuando se irradia con luz ultravioleta la preparación se logra el recuento de todas las células procariotas y eucariotas presentes. Al irradiar el mismo campo con luz azul es posible identificar solo los autótrofos. Al establecer un conteo diferencial se obtienen densidades de los heterótrofos presentes. Aunque es obvio, el interés de este trabajo no incluye el conteo de procariotas heterótrofos (Bacteria y Archaea) que fueron fácilmente identificables y excluibles por cuestiones de tamaño y forma.

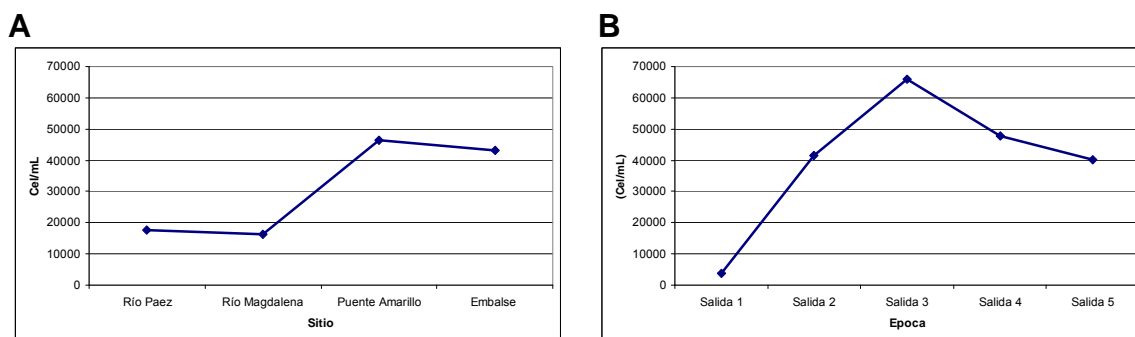


Figura 5. Densidades promedio del número total de células de organismos autótrofos y heterótrofos en el embalse de Betania para todo el periodo de estudio. (A) Variación espacial de acuerdo a las zonas de muestreo. (B) Variación temporal

El número total de células durante el estudio, en la zona correspondiente al embalse, fue en promedio de $43213 \text{ células.mL}^{-1}$, en Puente Amarillo de $46278 \text{ células.mL}^{-1}$ y de nuevo en los ríos se registraron los menores valores (figura 5 A,

Anexo 2). En la escala temporal, tanto en la primera salida como en la tercera se encontraron los conteos menores y los más altos (figura 5 B).

No se encontró una distribución normal de los datos obtenidos cuando se analizaron estadísticamente los resultados totales, lo que si sucedió cuando se estudiaron por separado en escalas espaciales y temporales, razón por la que se utilizaron pruebas paramétricas y no paramétricas. Sin embargo, cuando se compararon las densidades totales con las de cianobacterias se encontraron comportamientos muy similares (figura 6 A).

La correlación de Spearman mostró una relación positiva y significativa para densidades totales y de cianobacterias, cuando se agruparon todos los datos (r : 0,96). Así mismo, un análisis separado para sitios y épocas de muestreo, no reveló diferencias entre estas dos variables, (correlaciones de Pearson positivas) (Anexo 3). La regresión lineal mostró que la abundancia de cianobacterias explicó en un 95% ($R^2 = 0,9466$) la abundancia total de células, además, la grafica de dispersión (figura 6 B) evidencia la tendencia lineal de los datos y una relación directamente proporcional entre ambos grupos.

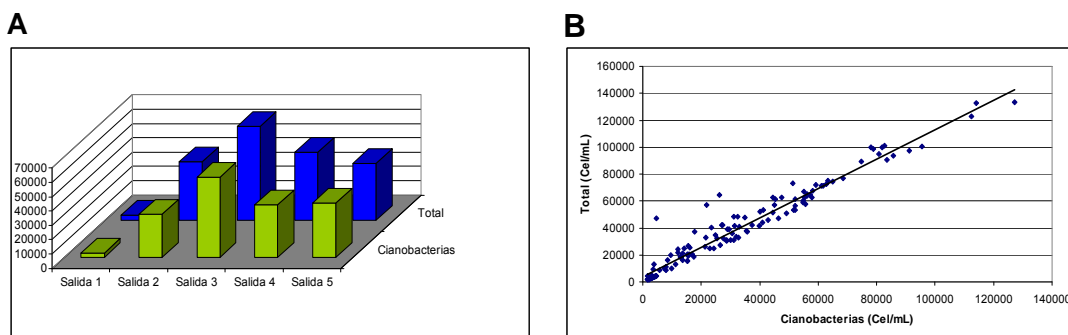


Figura 6. Densidades promedio del total de células y de cianobacterias en el embalse de Betania para todo el periodo de estudio. (A) Comparación entre ambos grupos. (B) Gráfico de dispersión relacionando densidades totales de células y de cianobacterias.

Relación entre las densidades de cianobacterias y el total de autótrofos. El conteo de organismos autótrofos en la zona del embalse fue muy similar al del número total de células, aunque con un promedio algo menor ($43028 \text{ células.mL}^{-1}$) (Anexo 2). En la escala espacial el sector de Puente Amarillo registró el mayor promedio ($45556 \text{ células.mL}^{-1}$) y en la escala temporal de nuevo la tercera salida, correspondiente al mes de octubre, se caracterizó por presentar las más altas densidades (figuras 7 A y B).

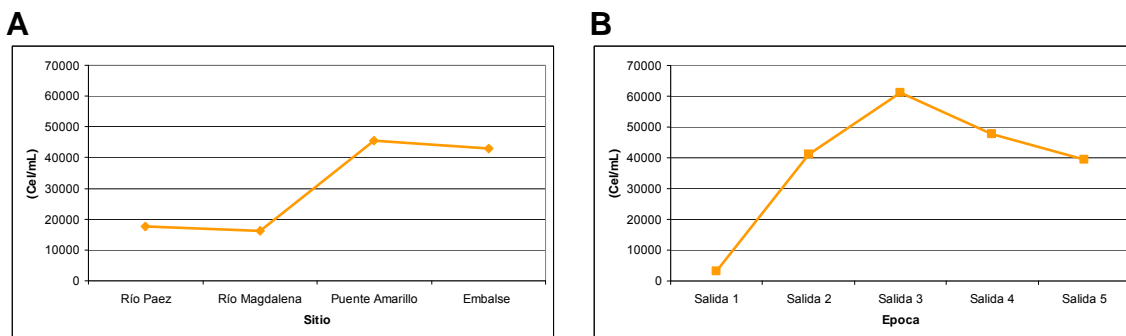


Figura 7. Densidades promedio de los organismos autótrofos presentes en el embalse de Betania para todo el periodo de estudio. (A) Variación espacial de acuerdo a las zonas de muestreo. (B) Variación temporal.

Las correlaciones entre las densidades de cianobacterias y autótrofos fueron positivas (tanto para los datos totales, como para el sitio y la época de muestreo) y no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (figura 8 A, Anexo 2). Por otra parte, la regresión lineal realizada indicó que los valores correspondientes a densidad de cianobacterias explicaron en un 89 % ($R^2=0,8933$) el comportamiento del número de autótrofos, lo que evidencia una relación directamente proporcional entre estos dos grupos (figura 8 B). De esta manera, es posible afirmar que las cianobacterias se constituyen como uno de los grupos más representativos e importantes dentro del plancton autótrofo presente en el embalse de Betania.

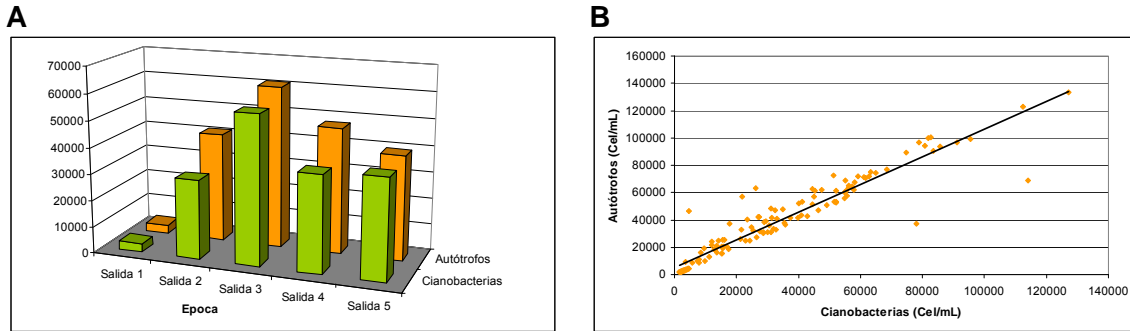


Figura 8. Relación entre las densidades promedio de autótrofos y de cianobacterias en el embalse de Betania. (A) Comparación entre ambos grupos. (B) Gráfico de dispersión correspondiente a la densidad de autótrofos en función de la densidad de cianobacterias

Relación entre la abundancia de cianobacterias y el número de heterótrofos.

Las densidades de heterótrofos en comparación con las de cianobacterias fueron considerablemente menores (figura 9 A). Por ejemplo, en el río Magdalena la densidad promedio de heterótrofos fue de 69 células.mL⁻¹ y en el Páez de 23 células.mL⁻¹, en la zona del embalse fue de 768 células.mL⁻¹ en tanto que el valor promedio más alto se registró en Puente Amarillo, 54841 células.mL⁻¹ (figura 9 A, Anexo 2). Así mismo, los mayores números de microorganismos eucariotas heterótrofos, se encontraron en los meses de febrero y julio, mientras que los muestreos realizados en las otras épocas se caracterizaron por tener una muy baja representatividad (figura 9 B).

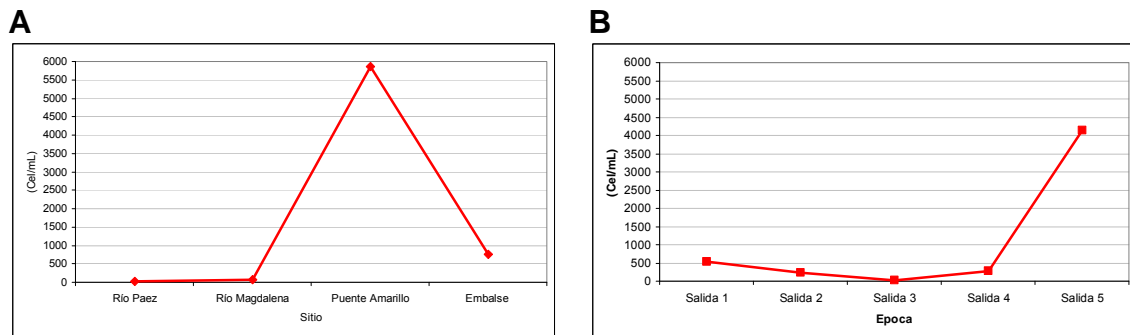


Figura 9. Densidades promedio de organismos heterótrofos en el embalse de Betania para todo el periodo de estudio. (A) Variación espacial de acuerdo a las zonas de muestreo. (B) Variación temporal.

No se encontraron relaciones entre la abundancia de cianobacterias y heterótrofos en ninguno de los casos, esto es, cuando se correlacionaron todos los datos (0,1097), en escalas temporal (-0,30) y espacial (0,49) (Sperman, Anexo 3). La regresión lineal obtenida, mostró que la abundancia de cianobacterias explicó en un muy bajo porcentaje (1,16 %, $R^2=0,0116$) la variación en el número de heterótrofos (figura 10 B).

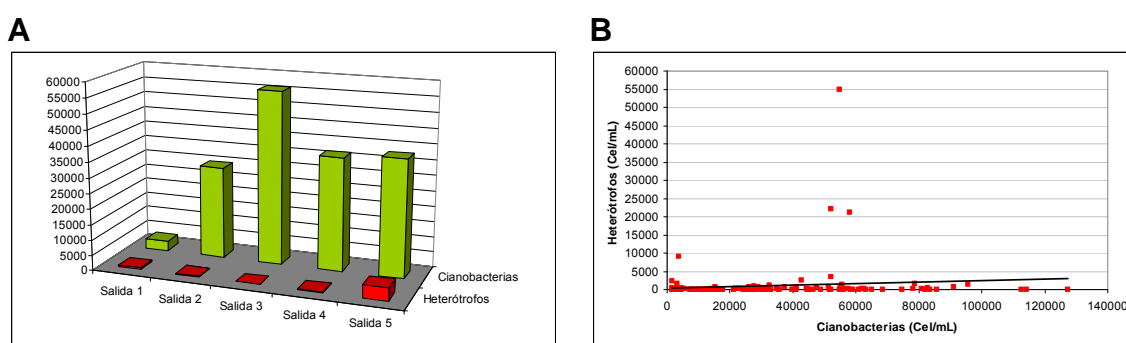


Figura 10. Densidades promedio de heterótrofos y de cianobacterias en el embalse de Betania. (A) Comparación entre ambos grupos. (B) Gráfico de dispersión correspondiente a la densidad de heterótrofos en función de la densidad de cianobacterias

Composición de cianobacterias

De acuerdo al análisis cualitativo de las muestras observadas en microscopía de epifluorescencia, se identificaron 8 géneros de cianobacterias en el embalse de Betania. En la figura 11 se muestran fotografías de cada uno de ellos. *Merismopedia* sp. (figura 11 A), *Synechococcus* sp. (figura 11 B), *Anabaena* sp. (figura 11 C), *Microcystis* sp. (figura 11 D), *Chroococcus* sp. (figura 11 E), *Gloeocapsa* sp. (figura 11 F) *Cilindrospermopsis* sp. (figura 11 G) y *Pseudoanabaena* sp. (figura 11 H). Los géneros de mayor representatividad en el embalse, esto es que se encontraron con mayor frecuencia y en casi todos los muestreos fueron *Synechococcus* sp., *Microcystis* sp. y *Chroococcus* sp. Los demás morfotipos reportados se registraron con menor frecuencia y algunos como

por ejemplo *Cylindrospermopsis* sp., aparecieron únicamente en una de las salidas de campo (figuras 12 A y B).

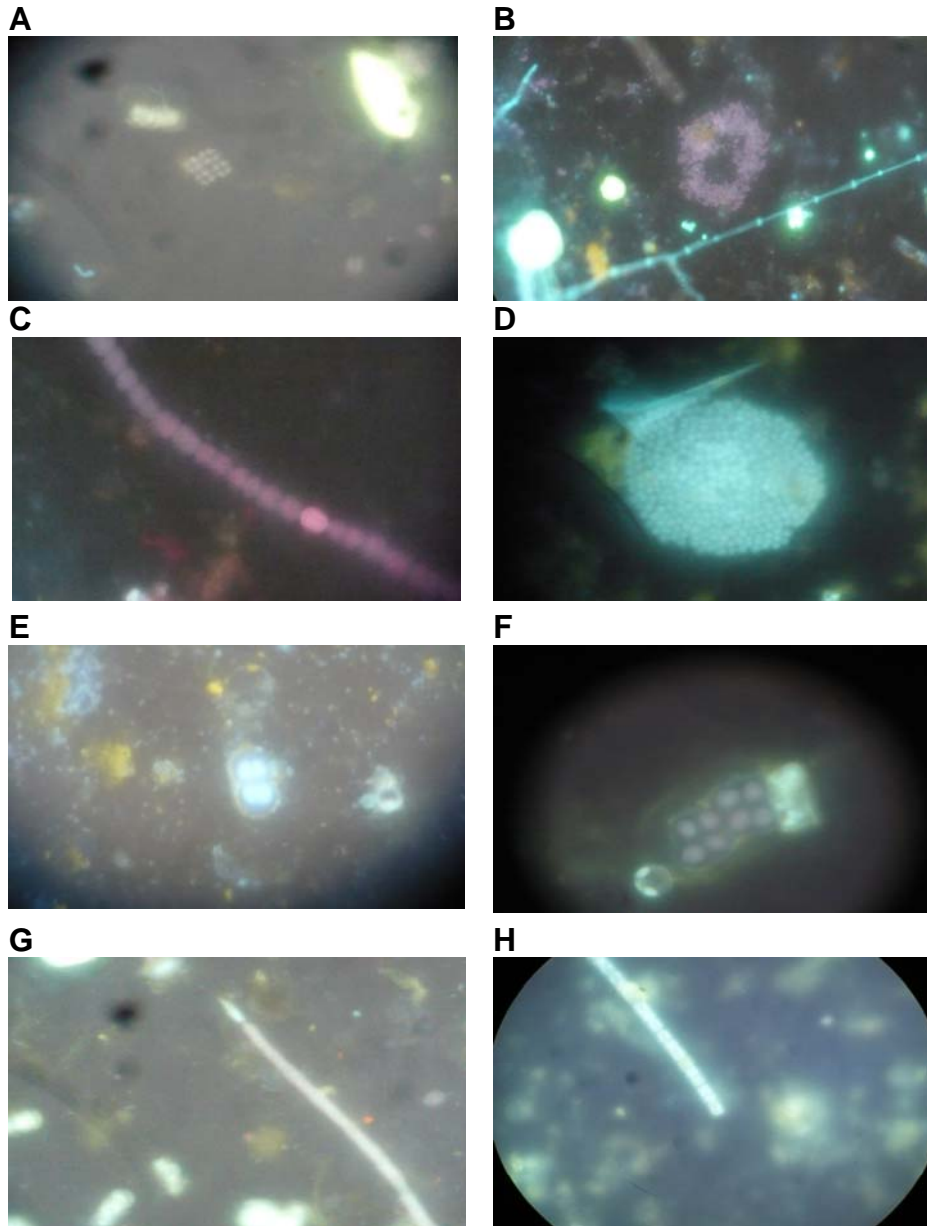


Figura 11. Fotografías de los géneros de cianobacterias provenientes del embalse de Betania, identificadas con microscopio de epifluorescencia teñidos con primulina e irradiadas con luz azul, aumento final 1000. (A) *Merismopedia* sp. (B) *Synechococcus* sp. (C) *Anabaena* sp. (D) *Microcystis* sp. (E) *Chroococcus* sp. (F) *Gloeocapsa* sp. (G) *Cylindrospermopsis* sp. (H) *Pseudoanabaena* sp. Fotos de: Comba (2008).

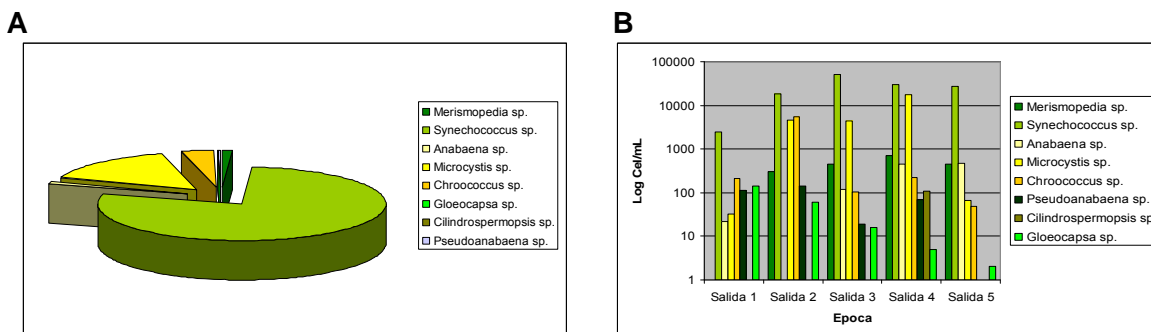


Figura 12. Principales géneros de cianobacterias identificados en el embalse de Betania. (A) Porcentaje de representatividad. (B) Con respecto a la época de muestreo.

En la tabla 4 se muestra un listado de los géneros identificados en este estudio, señalando su presencia en las cuatro zonas del embalse estudiadas.

Tabla 4. Géneros de cianobacterias identificados en el embalse de Betania

Morfotipo	Embalse		Ríos	
	Proyectos piscícolas	Puente Amarillo	Páez	Magdalena
<i>Merismopedia</i> sp. 1	X	X		
<i>Merismopedia</i> sp. 2	X			
<i>Synechococcus</i> sp.	X	X		
<i>Anabaena</i> sp.	X			
<i>Microcystis</i> sp.	X	X	X	X
<i>Chroococcus</i> sp.	X	X	X	X
<i>Gloeocapsa</i> sp. 1	X	X		
<i>Cilindrospermopsis</i> sp.	X			
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	X			

Otros organismos del plancton autótrofo. Dentro de los principales grupos taxonómicos presentes en los sitios muestreados además de cianobacterias, se encontraron euglenoides (Euglenophyceae), algas verdes (Chlorophyceae), desmidias (Zygnemaphyceae), diatomeas (Bacillariophyta) clamidomonas (Clamydophyceae) y dinoflagelados (Dinophyceae).

Los grupos representativos en las zonas del embalse y Puente Amarillo fueron cianobacterias y algas verdes, seguidos por euglenas, diatomeas y dinoflagelados (figuras 13 A y B, Anexo 4). En los ríos se detectaron menos organismos fitoplanctónicos, con preponderancia de las algas verdes y muy pocas cianobacterias. De todas formas, en el análisis con la totalidad de los resultados, las cianobacterias y algas verdes fueron los grupos más frecuentes. De acuerdo a la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis se encontraron diferencias espaciales entre estos y los otros grupos del plancton autótrofo identificados, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($K=79,45$, $p= 0$) (Test de Dunn).

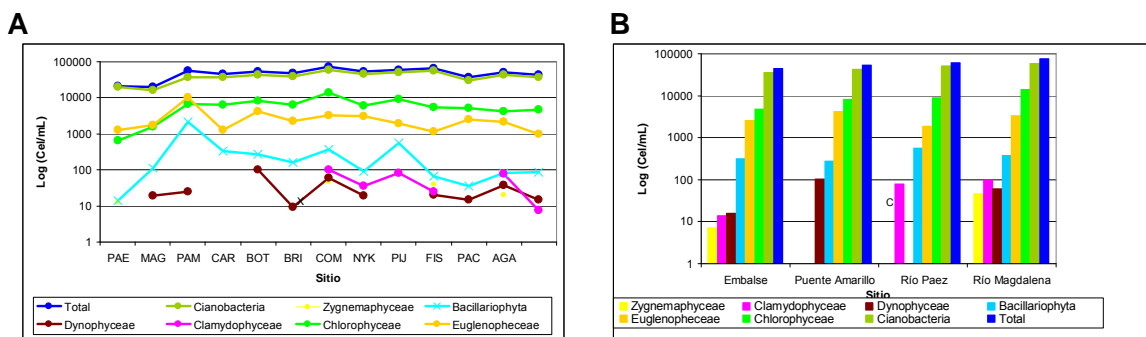


Figura 13. Densidad promedio de los principales grupos del plancton autótrofo identificados en el embalse de Betania (A) De acuerdo a los sitios de muestreo. (B) En las zonas de estudio.

En todos los muestreos se identificaron géneros de cianobacterias, de algas verdes como *Chlorella*, *Pediastrum*, *Eudorina* y *Pandorina*, euglenas como *Phacus*, diatomeas como *Ciclotella* y *Aulacoseira* y dinoflagelados del género *Ceratium*. Debido a la gran cantidad de sedimentos presentes en las muestras de agua en la primera salida, no fue posible contar células eucariotas autótrofas, por lo que solo se presentan datos de densidades de estos grupos a partir de la segunda salida (Anexo 4). Respecto a la abundancia por grupos, se encontraron densidades similares en el caso de las algas verdes hasta la quinta salida momento en el cual hubo una disminución (figuras 14 A, B, C y D), en contraste la

densidad de las euglenas disminuyó de manera gradual a lo largo del tiempo, mientras que la de las diatomeas se incrementó hasta la cuarta salida y luego disminuyó durante la quinta salida. Los valores registrados para el mes de noviembre (cuarta salida), fueron estadísticamente diferentes a los de las otras épocas (Kruskal Wallis, $p= 0,00053$) y se explican principalmente por variaciones con respecto a la abundancia de cianobacterias y diatomeas (Test de Dunn).

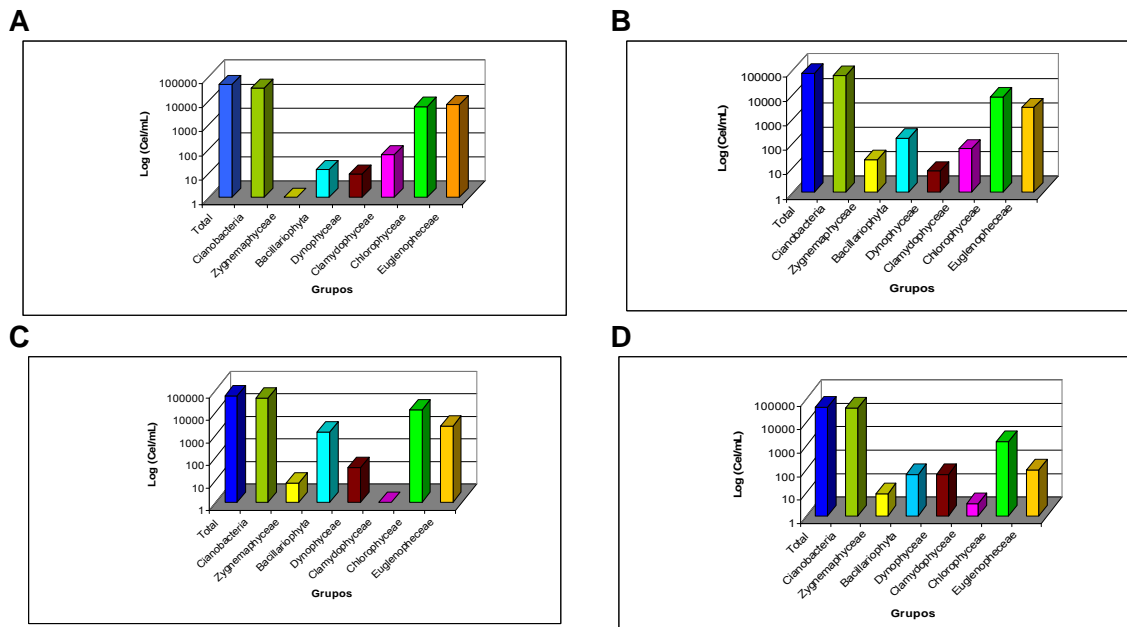


Figura 14. Densidades promedio de los principales grupos del plancton autótrofo en el embalse de Betania de acuerdo a la época de muestreo. (A) Segunda salida. (B) Tercera salida. (C) Cuarta salida. (D) Quinta salida.

Estructura de la comunidad de cianobacterias

Con el fin de evaluar la estructura de la comunidad de cianobacterias en los sitios estudiados en el embalse de Betania, se analizaron los parámetros de composición, abundancia y riqueza de los géneros encontrados. De acuerdo a las curvas de rarefacción realizadas, en el mes de noviembre (cuarta salida) se encontró el mayor número de especies (mayor riqueza), mientras que en julio

(primera salida) el menor (figura 15 A). Especialmente los sectores denominados Las Islas (FIS) y Río Páez (PAE), presentaron las mayores y menores riquezas, respectivamente (figura 15 B).

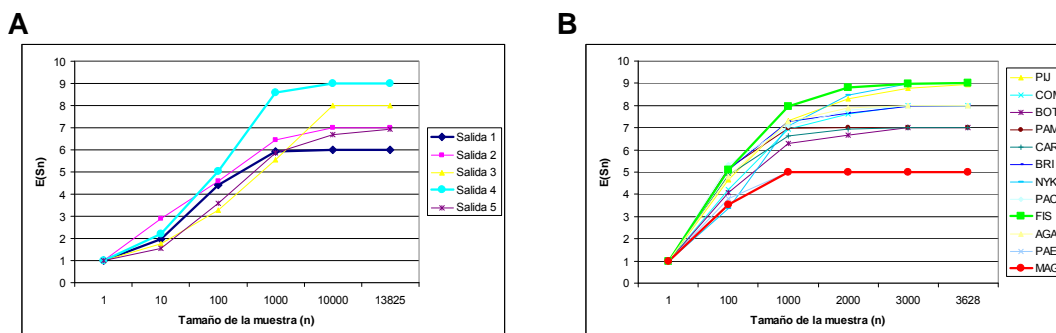


Figura 15. Curvas de rarefacción mostrando el número esperado de géneros en función del tamaño de la muestra. (A) Para los cinco salidas de campo. (B) Para cada uno de los sitios de muestreo.

La diversidad expresada mediante el índice de Shannon (H') fue en promedio más alta para los meses de septiembre y noviembre (Anexo 5), sin presentarse diferencias estadísticamente significativas entre las épocas de muestreo (Kruskal Wallis, $p= 0,1661$); especialmente, los sectores denominados Aguas Abiertas y Pacandé se destacaron por presentar altos valores de diversidad ($H'=1,20$ y $H'= 1,38$, respectivamente). El índice de Simpson (Λ'), como era de esperarse, mostró valores bajos en los meses en los que la diversidad fue alta y viceversa (Anexo 5); de igual manera las diferencias fueron estadísticamente representativas con respecto a los meses de muestreo (Kruskal Wallis, $p= 0,0022$).

En los meses de febrero y octubre se encontraron los índices de uniformidad más bajos, lo que indica que algunas especies de cianobacterias predominaron sobre otras, en tanto que los mayores índices se registraron en septiembre y noviembre (Anexo 5). El número de especies abundantes y muy abundantes fue muy similar para cada uno de los meses de muestreo (entre 1 y 2 especies), los menores porcentajes para las especies abundantes y muy abundantes fueron 31 y 83 %

(meses de febrero y noviembre), mientras que los mayores correspondieron a los meses de julio y septiembre (55%) y julio y octubre (89%).

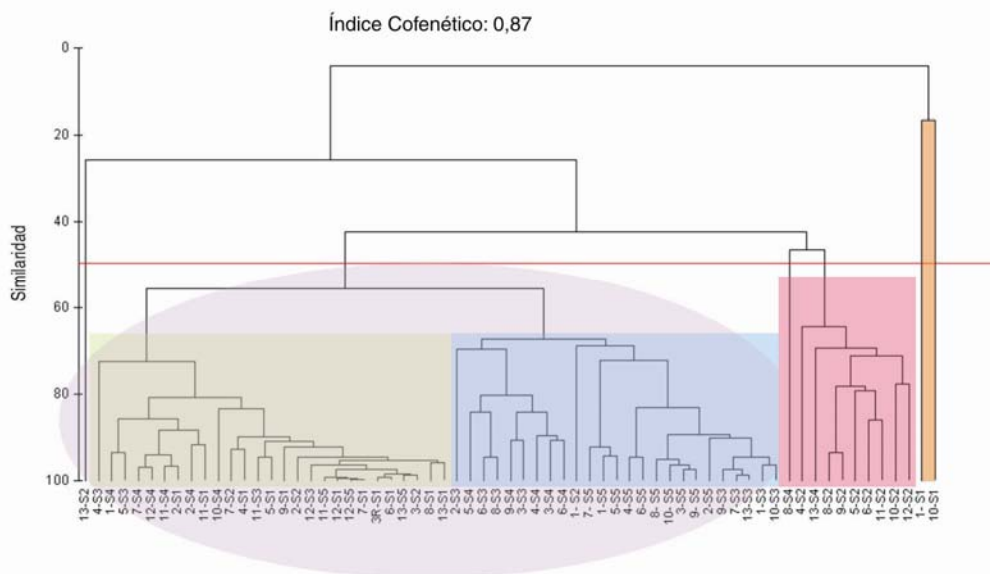


Figura 16. Fenograma elaborado a partir de la Matriz de Similaridad de Bray-Curtis que representa las similitudes encontradas entre sitios y época de muestreo. El nivel mínimo de similitud considerado fue del 50 %. (S1) Primera salida. (S2) Segunda salida. (S3) Tercera salida. (S4) Cuarta salida. (S5) Quinta Salida. (1) Bahía los Pijaos. (2) Bahía Comepez. (3) Bahía Botero. (4) Puente Amarillo. (5) Bahía Caraguaja. (6) Bahía Las Brisas. (7) Bahía Nueva York. (8) Piscícola Pacandé. (9) Las Islas Fish Flow (10) Aguas Abiertas. (11) río Magdalena. (12) río Páez. El color violeta representa el primer grupo, los cuadrados de color azul y amarillo, los subgrupos, el color rosado representa el segundo grupo y el naranja resalta dos sitios que no se relacionan con los demás.

El índice cofenético calculado (0,87) demuestra que el fenograma de similitud obtenido constituye una buena representación de la realidad. En el fenograma que se muestra en la figura 16, se hace evidente la formación de dos grandes grupos constituidos a su vez por varios subgrupos. El primer grupo relaciona sitios de muestreo en todas las épocas y sitios correspondientes a los meses de octubre, noviembre y febrero, en especial a los correspondientes a los puntos ubicados en los ríos Magdalena y Páez. En el segundo grupo predominan algunos sitios del

segundo muestreo, que se agrupan con dos sitios del cuarto muestreo. Finalmente, dos sitios de muestreo, correspondientes al mes de julio, parecen no estar relacionadas con los demás.










Aislamiento y cultivo de cianobacterias en el laboratorio

En los cultivos de cianobacterias obtenidos por inoculación de las muestras de agua del embalse se aislaron e identificaron 9 géneros. En la tabla 5, se presenta la lista de las especies con las zonas de estudio de las que fueron aisladas y en la tabla 6 se muestran fotografías de los morfotipos más representativos.

Tabla 5. Especies de cianobacterias aisladas en cultivos de muestras de agua tomadas en las zonas de estudio en el embalse de Betania para todas las épocas de muestreo

Morfotipo	Embalse		Ríos	
	Embalse	Puente Amarillo	Río Magdalena	Río Páez
<i>Chroococcus</i> sp.	X		X	X
<i>Phormidium</i> sp. 1				X
<i>Phormidium</i> sp. 2	X			X
<i>Phormidium</i> sp. 3			X	
<i>Phormidium</i> sp. 4			X	
<i>Pseudoanabaena</i> sp. 1		X		
<i>Pseudoanabaena</i> sp. 2	X	X	X	
<i>Pseudoanabaena</i> sp. 3	X	X		X
<i>Pseudoanabaena</i> sp. 4	X		X	
<i>Pseudoanabaena</i> sp. 5			X	
<i>Pseudoanabaena</i> sp. 6	X		X	
<i>Pseudophormidium</i> sp.	X			
<i>Leptolyngbya</i> sp.	X			
<i>Synechococcus</i> sp.			X	
<i>Microcystis</i> sp.	X			
<i>Anabaena</i> sp. 1	X			
<i>Anabaena</i> sp. 2			X	
<i>Anabaena</i> sp. 3	X			
<i>Anabaena</i> sp. 4	X			
<i>Anabaena</i> sp. 5			X	
<i>Anabaena</i> sp. 6			X	
<i>Anabaena</i> sp. 7			X	
<i>Borzia</i> sp.			X	

Tabla 6. Especies de cianobacterias aisladas e identificadas en medio de cultivo a partir de las muestras de agua del embalse de Betania para todo el periodo de estudio. Fotos de Comba (2008)

Especie	Morfortipos	Imagen
<i>Phormidium</i> sp.*	Cuatro	
<i>Anabaena</i> sp.	Siete	
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	Seis	
<i>Chroococcus</i> sp.	Uno	
<i>Pseudophormidium</i> sp.*	Uno	
<i>Leptolyngbya</i> sp.*	Uno	
<i>Microcystis</i> sp.	Uno	
<i>Synechococcus</i> sp.	Uno	
<i>Borzia</i> sp.*	Uno	

* Sólo se identificaron en los cultivos

Cabe señalar que cuatro de las cianobacterias aisladas en cultivo no se identificaron de manera directa con el método de epifluorescencia (tabla 6). Así mismo se encontró, en el análisis morfológico de las cepas desarrolladas en los cultivos, una gran variedad de morfotipos de *Pseudoanabaena* no identificados en las muestras analizadas para el conteo (Anexo 6).

Presencia de Microcistinas

La detección de microcistinas se realizó en muestras de agua y en cultivos provenientes del embalse de Betania. De las 13 muestras de agua tomadas en la quinta salida, en las cuatro zonas del embalse, 6 dieron positivas para presencia de microcistinas (Anexos 7 y 8). En la tabla 7 se muestran los valores obtenidos y se presentan las concentraciones de los controles positivos llamados calibradores a fin de comparar valores de concentración baja, media y alta.

Tabla 7. Concentración de microcistinas para muestras de agua del embalse de Betania (febrero de 2008).

Sitio	Concentración de microcistinas (ppb)
Nueva Cork	(-)
Piscícola Pacandé	(-)
Bahía Caraguaja	0,887
Bahía Botero	0,713
Embalse Bahía Comepez	0,808
Bahía Los Pijaos	1,400
Las Islas Fish Flow	0,104
Las Brisas	(-)
Aguas Abiertas	(-)
Puente Amarillo	0,337
Río Páez	(-)
Río Magdalena	(-)
Calibrador 1	0,4
Calibrador 2	1,0
Calibrador 3	2,5

Tabla 8. Concentración de microcistinas detectadas en cultivos de cianobacterias aisladas del embalse de Betania

Sitio original de aislamiento	Salida	Composición de cianobacterias en el cultivo	Concentración de microcistinas (ppb)
BOT	Primera	<i>Pseudoanabaena</i> sp., <i>Chroococcus</i> sp.	0,987
BOT	Primera		0,880
PAE*	Segunda	<i>Phormidium</i> sp 1., <i>Phormidium</i> sp 2., <i>Pseudoanabaena</i> sp. 3, <i>Chroococcus</i> sp.	0,070
PIJ	Segunda	<i>Microcystis</i> sp., <i>Chroococcus</i> sp.	0,739
MAG*	Tercera	<i>Chroococcus</i> sp.	0,070
CAR	Tercera	<i>Chroococcus</i> sp., <i>Pseudoanabaena</i> sp. 3	0,563
BOT	Cuarta	<i>Microcystis</i> sp., <i>Pseudoanabaena</i> sp. 2	0,634
PIJ	Quinta	<i>Pseudoanabaena</i> sp., <i>Phormidium</i> sp. 2, <i>Anabaena</i> sp.1	0,615

*Se resaltan en negritas las concentraciones de microcistinas correspondientes a los ríos, que estuvieron por debajo de los niveles detectados por la técnica ELISA

En 6 de los 12 cultivos analizados se pudieron detectar microcistinas. En la tabla 8 se muestran los valores de microcistinas detectadas en los cultivos anotando el origen del aislamiento inicial y la composición de cianobacterias. En ningún caso fue posible detectar presencia de microcistinas en las muestras de los ríos que entran a la cola principal del embalse, ni en los cultivos obtenidos al inocular muestras de dichas aguas. En la figura 17 se muestran dos gráficos que señalan niveles de microcistinas en las muestras de agua y en los cultivos.

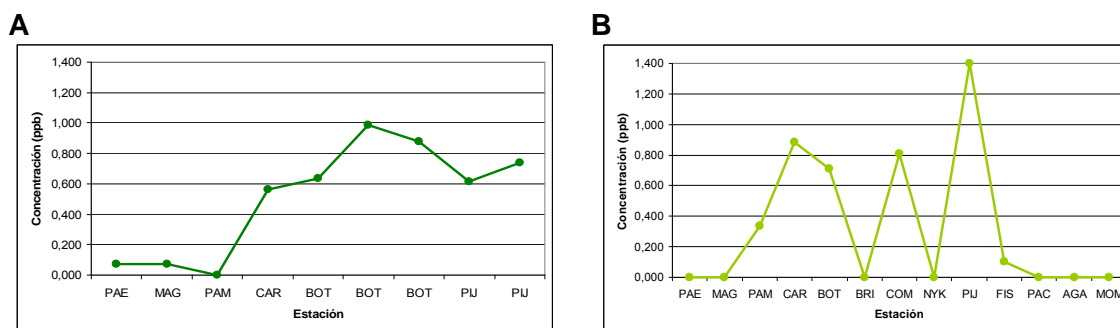


Figura 17. Concentración de microcistinas (ppb) en el embalse de Betania y en cultivos mantenidos *in Vitro*. (A) Niveles de microcistinas en las muestras de agua tomadas en diferentes sitios y en el quinto muestreo. (B) Niveles de microcistinas producidas por cianobacterias cultivadas indicando el origen del aislamiento.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Variación temporal y espacial de la abundancia de cianobacterias

El fenómeno de eutrofización señala el enriquecimiento de un ecosistema con nutrientes minerales especialmente fósforo y nitrógeno, que aunque puede ocurrir como un proceso natural (eutrofización natural), puede verse acelerado por entrada al sistema de contaminantes como por ejemplo desechos resultantes de las actividades humanas (eutrofización artificial) (Plinski & Jozwiak 1999). Este proceso se ha estudiado con detenimiento en algunos cuerpos de agua colombianos afectados por el fenómeno como es el caso del embalse de Betania.

En varios estudios (INCODER 2005 y 2007, Rueda-Delgado *et al.* 2008, Canosa *et al.* 2008) se propone que la rápida eutrofización que se está presentando en el embalse de Betania es el resultado de varios factores que afectan la calidad del agua de este ecosistema. Entre otros factores que favorecen el aumento del estado trófico del embalse, cabe señalar la entrada directa de las aguas residuales del municipio de Hobo en la zona de Puente Amarillo, la llegada de fosfatos por escorrentías procedentes de los cultivos agrícolas ubicados en zonas aledañas y de materia orgánica producida durante las labores de pastoreo del ganado, la entrada de cargas contaminantes de la cuenca alta del río Magdalena que son arrastradas por los ríos afluentes (Magdalena y Páez) y el impacto de la actividad piscícola en aumento en el embalse. El cultivo intensivo en jaulas, con más de 108 proyectos en marcha, aporta la mayor cantidad de la carga orgánica y de fósforo que entra al embalse, debido entre otras, a las malas prácticas de producción como el uso excesivo de alimento concentrado, la gran cantidad de heces de los peces que se depositan en los sedimentos y en general al aumento en los desperdicios producidos en las jaulas lo que rebasa en ciertas épocas del año la

capacidad de carga del embalse (Pizarro & Beltrán 2008, Rueda-Delgado *et al.* 2008).

Tabla 9. Comparación de las densidades promedio de cianobacterias encontradas en el embalse de Betania en este estudio respecto a otras en el mismo embalse y en fechas anteriores y en otros embalses con características tróficas similares

Autores	Lugar del estudio	Método	Células/mL*
Comba 2008	Embalse de Betania (2008) Embalse (E) Sector Puente Amarillo (PAM) Río Páez (PAE) Río Magdalena (MAG)	Conteo directo (epifluorescencia)	E: 1676- 127271 (36147) PAM: 2604- 78795 (31778) PAE: 1554- 32685 (16094) MAG: 1699- 31929 (13588)
Ramírez 1993	Embalse de Betania (1993) (Zona de convergencia del río Magdalena)	Cámara de Sedimentación	966-8246
Montoya & Ramos 1993	Embalse de Betania (1993) Brazo Magdalena (BM) Presa (P)	Cámara de Sedimentación	BM: 4100 P: 6378
Springe <i>et al.</i> 2000	Lago Mazais (Ciudad de Riga) Lago (L), Zona subterránea (ZS)	Cámara de Sedimentación	L: 888 ZS:16836
Ruibal <i>et al.</i> 2006	Embalse San Roque eutrófico (Provincia de Córdoba, Argentina)	Cámara de Sedimentación	4825 – 55956
Quirós 2004	Lagos y embalses eutróficos argentinos: Chaco- Pampa (CP), Patagonia andina (PA) Planicie Patagónica (PP) Oeste – noroeste (O)	Cámara de Sedimentación	CP: 8,5 – 12983 (1604) PA: 0,03 – 25710 (787) PP: 0,03 – 459 (40) O: 0,03- 1547 (166)

* Entre paréntesis valores promedio

Se ha reconocido en muchos reservorios que una de las consecuencias de la última fase del proceso de eutrofización, es el cambio de dominancia de las especies del plancton autótrofo que pasa a ser dominado por especies de cianobacterias, en un principio con formas coloniales que posteriormente dan paso a filamentosas (Dokulil & Teubner 2000). Estos hallazgos respaldan lo encontrado en el embalse de Betania, en donde a lo largo del tiempo, las poblaciones de cianobacterias han incrementado en número hasta convertirse en la actualidad en

uno de los grupos predominantes. En la tabla 9 se muestran de manera comparativa las densidades de cianobacterias obtenidas en Betania, con otras reportadas en el mismo embalse pero en fechas anteriores y en la literatura para sistemas similares, con la gravedad de que los conteos obtenidos en este trabajo son superiores a los ya reportados.

Rueda-Delgado y colaboradores (2008) encontraron un incremento notable en los niveles de fósforo en el embalse de Betania así como grandes variaciones en su concentración, con valores que van desde 0.03 a 0.5 mg /L dependiendo del nivel de las aguas y del lugar. De igual manera, las densidades de cianobacterias encontradas en este estudio muestran un aumento en los últimos 15 años entre 1,7 a 15 veces. Lo anterior señala una relación directa entre el incremento de cianobacterias en el embalse, los niveles de fósforo y las actividades que se dan al interior del mismo. La presencia de mayor cantidad de fósforo total en las zonas de producción piscícola, con respecto a los ríos afluentes, puede explicar las diferencias espaciales en cuanto a la abundancia de cianobacterias entre las dos zonas del embalse y los ríos (figura 3 B), ya que cuando el fósforo se encuentra en exceso, el nitrógeno es el nutriente limitante y por ende se presenta una baja relación nitrógeno- fósforo (N-total/ P-total), que para el embalse de Betania está en 5,1:1 a 1:1 (Rueda-Delgado *et al.* 2008). Análogamente, la relación N/P necesaria para el desarrollo de las algas es de 17-12/1 (Chiandani & Vighi 1974) lo que indica que en Betania la baja relación (N/P) es sin duda la causa inicial de los florecimientos de cianobacterias ya que favorece el crecimiento tanto de cepas capaces de fijar nitrógeno, como de aquellas con estrategias para sobrevivir en ambientes en los que el nitrógeno es escaso, excluyendo de esta manera a las demás especies propias del plancton autótrofo (Plinski & Jozwiak 1999).

Del mismo modo, la dominancia de cianobacterias, se ve favorecida por su peculiaridad de poseer células procariotas con varias características como son

mecanismos asexuales y altas tasas de reproducción, presencia de vesículas de gas para migrar desde el sedimento a la columna de agua con la consecuente ventaja competitiva de almacenar fósforo y bajos requerimientos energéticos que favorecen un rápido e intenso crecimiento permitiéndoles habitar en una amplia variedad de ambientes (Paerl 1994).

A pesar de que por razones del fenómeno de La Niña que se presentó durante la época de estudio (julio de 2007 a febrero de 2008), no se pudo muestrear en un período seco, si fue posible evaluar el embalse con diferentes niveles de llenado en respuesta a mayores lluvias y a operación de la Presa lo que explica las diferencias estadísticamente significativas en una escala temporal ($p < 0.05$) especialmente en el primer muestreo en el que se encontró el menor número de células de cianobacterias.

Los bajos conteos de cianobacterias hallados en el mes de julio son reales, sin embargo, se debe mencionar que algunas dificultades técnicas como la presencia de mucha materia particulada complicaron la obtención de los conteos. Al comparar estos resultados con aquellos obtenidos en la Consultoría en la que se enmarca el presente trabajo de grado, se corroboraron los resultados obtenidos. El grupo de Limnología de la Universidad reportó imposibilidad de realizar conteo de fitoplancton con estas muestras debido a “el elevado sedimento presentado en las muestras y la baja densidad observada” la técnica que utilizaron fue sedimentación de 20 mL de muestra y conteo con microscopio invertido (Rueda-Delgado *et al.* 2008).

Relación entre la abundancia de cianobacterias y el número total de células, de autótrofos y de heterótrofos. El predominio de las cianobacterias en las aguas del embalse es respaldado por los resultados obtenidos. Valores casi iguales de número total de células, de autótrofos y escasas densidades de

heterótrofos. Parecería ser que los protozoos del plancton no ocupan un nicho importante por ahora en este sistema. Sin embargo cabe señalar la importancia de este grupo como predadores de bacterias y de otros organismos fotosintéticos (Glaus 1988).

Composición de cianobacterias

Synechococcus, *Microcystis* y *Chroococcus*, por su tamaño se agrupan dentro de las picocianobacterias, fueron los géneros representativos del embalse de Betania, en términos generales, los mismos son comunes en otros reservorios y lagos eutróficos de la región tropical (Wacklin 2006). Desde una perspectiva temporal, estos géneros, pero particularmente *Synechococcus*, fueron frecuentes en los periodos de aguas altas, en especial en el mes de octubre (tercer muestreo), cuando se presentaron las peores condiciones ambientales reflejadas en el aspecto del agua (peces en descomposición, palizadas, aguas muy turbias y olores fuertes y desagradables), se sabe que las características genéticas de *Synechococcus* y otros relacionados les confieren la capacidad de crecer en condiciones ambientales como limitación por nutrientes e intensidad lumínica variable (Dokulil & Teubner 2000).

El éxito del grupo de las picocianobacterias, incapaces de fijar nitrógeno atmosférico en ambientes como el embalse de Betania en los que ocurre limitación por este compuesto, radica en las estrategias que utilizan para migrar a lo largo de la columna de agua en busca de zonas en las que el nitrógeno en forma de nitratos se encuentre disponible. *Microcystis* por ejemplo, presenta vesículas de gas para regular su flotabilidad, de modo que puede ascender hacia las capas superficiales; *Synechococcus* por su parte, compite con especies más grandes debido a su mayor relación superficie volumen y por ende puede captar mas cantidad de nutrientes del medio, así mismo, utiliza sus ficobiliproteínas como

fuentes de nitrógeno, el cual posteriormente almacena en ficobilisomas como reserva ante situaciones adversas (Schwarz & Forchhammer 2005).

Además de las cianobacterias mencionadas, hay otras con características morfológicas de tipo filamentoso que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en células especializadas llamadas heterocistos, que les confieren la posibilidad de iniciar el desarrollo de una comunidad de cianobacterias en aguas en las cuales la limitación por nitrógeno sea una constante. Se puede interpretar la presencia de *Anabaena* sp. con heterocistos formados en la mayoría de las muestras obtenidas para este estudio, como un claro respaldo a los hallazgos en los cuales una clara característica limnológica del embalse de Betania es la limitación por nitrógeno. Se puede afirmar que el proceso de fijación de nitrógeno es la principal estrategia exhibida por *Anabaena*, ya que le resulta muy difícil regular su flotabilidad en condiciones de turbulencia y vientos fuertes que mezclen las capas de agua, fenómeno que ocurrió durante el mes de septiembre y en el *Anabaena* estuvo ausente (Tucci & Sant'Anna 2003).

De otra parte, únicamente se identificó *Cylindrospermopsis* sp. en el cuarto muestreo, este hecho podría reflejar alguna condición ambiental en Betania que no fue medida en este estudio. Esta afirmación está relacionada con las características propias de los organismos de esta especie que además de oportunistas, solo requieren de fósforo disponible para establecerse, migran en la columna de agua, toleran bajas intensidades lumínicas, fijan nitrógeno atmosférico y se dispersan a través de aquinetos de resistencia (Tucci & Sant'Anna 2003), condiciones que posiblemente fueron acentuadas en el mes de noviembre en el embalse, las implicaciones de su presencia esporádica necesitarán ser valoradas en estudios futuros ya que es una de las cianobacterias con reconocida capacidad hepatotóxica.

No fue posible establecer un comportamiento sucesional de la comunidad de cianobacterias en el embalse de Betania, debido probablemente a limitaciones en el monitoreo de las aguas en aspectos como frecuencia y un rango más amplio de las condiciones climáticas que se pueden dar en la región. Lo anterior puede explicar que en el fenograma de similaridad (figura 16) no se evidenció una tendencia hacia la agrupación de los sitios de muestreo en términos espaciales y temporales, ya que con contadas excepciones, las cianobacterias registradas en este estudio fueron comunes en todas las épocas y sitios de muestreo, aunque los porcentajes de representatividad si se encontraron diferentes.

Principales grupos pertenecientes al plancton autótrofo. La composición del plancton autótrofo encontrada en el embalse de Betania fue similar a la descrita en otros estudios allí realizados (Duque & Donato 1988; Herrera & Guillot 1991; Montoya & Ramos 1993), sin embargo las abundancias obtenidas en el presente trabajo fueron superiores a las de años anteriores, lo cual sugiere que la comunidad fitoplanctonica ha experimentado un mayor crecimiento a lo largo del tiempo.

De acuerdo a las condiciones de disponibilidad de fósforo y limitación por nitrógeno en las aguas del embalse, es de esperar el predominio de cianobacterias. Sin embargo; cuando la disponibilidad de CO₂ aumenta, éstas ven reducidas sus poblaciones y favorecen el establecimiento de otros grupos como las algas verdes (Shapiro 1990), las cuales junto con diatomeas de los géneros *Aulacoseria* sp. y *Ciclotella* sp. se encontraron ampliamente distribuidas en las distintas zonas del embalse, es posible que al ser estrategias R crezcan de modo muy rápido y dispersen sus descendientes para que éstos puedan establecerse en una gran diversidad de nichos, aumentando sus probabilidades de sobrevivencia (Sant' Anna & Azevedo 2007, Shapiro 1990).

También la presencia constante de diatomeas como *Aulacoseira* sp. y algas verdes como *Pediastrum* sp. en el embalse de Betania podría ser utilizada en la bioindicación del fenómeno de la eutrofización. Se sabe que las especies de ambos géneros exhiben tolerancia a ambientes muy turbios y a pH básicos (Pinilla 2000). Además *Aulacoseira* sp. se ve favorecida por elevadas turbulencias, razón por la que se cree fue dominante durante el mes de septiembre, época de fuertes vientos que provocaron intensas mezclas entre las capas de agua del embalse (Rueda-Delgado *et al.* 2008). Acorde al tema de la bioindicación, en las muestras analizadas se encontraron frecuentemente fitoflagelados tipo euglenoides, los que generalmente son indicadores de alto contenido de materia orgánica y estratificación (Pinilla 2000).

Cuando se presentan eventos como florecimientos de algas en reservorios con características eutróficas, es frecuente encontrar dinoflagelados asociados a cianobacterias. Se sabe de la ocurrencia de procesos de sucesión en los cuales se forman picos máximos de biomasa que pueden estar constituidos por *Microcystis* sp. y/o *Ceratium* sp. (Burford 2005). En Betania, *Ceratium* sp., produjo floraciones en los meses de noviembre y febrero, que se explican en parte por su capacidad de crecer mixotróficamente bajo condiciones en las que la carga orgánica es alta y la disponibilidad de nutrientes es limitada. El establecimiento de las especies de *Ceratium*, y en general de dinoflagelados, en la columna de agua, puede llegar a ser importante en la medida en que favorecen el incremento del nitrógeno orgánico disuelto necesario para la producción primaria de los demás grupos presentes en el embalse, sin embargo, también constituyen riesgos para el sistema en términos de calidad de agua, dado que muchos dinoflagelados son productores potenciales de toxinas (Pomeroy & Wiebe 1988, Parra & Bicudo 1995, Slgge *et al.* 1999 y Burford 2005).

Aislamiento y cultivo de cianobacterias en el laboratorio

Fue posible aislar e identificar varias de las especies y morfotipos identificadas en la columna de agua en los cultivos realizados a partir de muestras del embalse de Betania, mostrando los característicos crecimientos en tapete o de densas agrupaciones en la superficie de los tubos con el medio de cultivo. Sin embargo, debe recalcarse que en estos cultivos se encontraron algunos géneros no identificados cuando se realizó el examen directo de la muestra.

La incapacidad de visualizar *Phormidium*, *Borzia*, *Leptolyngbia*, *Pseudophormidium* y algunos morfotipos de *Pseudoanabaena* directamente con epifluorescencia puede reflejar particularidades características comunes de esos grupos. Estas cianobacterias además de regular su flotabilidad, cuentan con una estrategia de estivación con formación de estructuras de resistencia (aquinetos o esporas) que almacenan gran cantidad de carbono y nutrientes para sobrevivir en épocas en las que estos son limitantes (Nixdorf *et al.* 2003). Por lo anterior, pueden persistir en una gran variedad de nichos a lo largo de un gradiente vertical, migrando desde los sedimentos bentónicos (*Phormidium* sp.) o desde ambientes con una constante mezcla de las capas de agua (*Pseudoanabaena* sp.) (Parra & Bicudo 1995, Pizzolon 1996, Salmaso 2000, Nixdorf *et al.* 2003). Se pueden explicar los hallazgos encontrados, especulando que los pocos filamentos presentes permanecen diluidos o como esporas o aquinetos en la columna de agua, por lo que, son difícilmente detectables al examen directo; si ello es así, al cultivarlos en presencia de los nutrientes y vitaminas propios de los medios de cultivo ven favorecido su crecimiento *in vitro* y son entonces fácilmente identificables.

Detección de microcistinas

Para responder otra de las preguntas formuladas en el inicio del presente trabajo de grado en la que se plantea si ¿Podrían floraciones de cianobacterias ser consideradas como potencialmente peligrosas e incidir en las actividades piscícolas que se realizan en Betania?, se presenta la siguiente argumentación como respaldo a la réplica positiva que se desprende de los resultados obtenidos.

Se sabe que las floraciones de fitoplancton son comunes en ecosistemas sobrealimentados, en los que la carga externa de nutrientes que entra es mayor que la que pueden mantener en circulación por lo que expulsan biomasa o nutrientes hacia las fronteras, orillas, sedimentos o interfases agua – aire (Ressom *et al.* 1994). En este sentido, las floraciones de cianobacterias pueden considerarse como una forma por la cual un sistema bajo tensión como en el caso del embalse de Betania se desprende del exceso de biomasa y de nutrientes. Así mismo, la gran cantidad de células de *Microcystis* encontradas permite afirmar que además de presentarse floraciones están constituidas por cepas productoras de cianotoxinas (microcistinas) que se pueden liberar al medio luego de lisis celular (Sant' Anna *et al.* 2008).

Las microcistinas liberadas son perjudiciales para el ecosistema ya que actúan en varios órdenes tróficos afectando tanto a los productores primarios, como a consumidores de niveles superiores. Al respecto se han reportado grandes mortandades de peces en muchos embalses del mundo (Forjan *et al.* 2008) y podría suponerse que algunos de los eventos en los cuales en el embalse de Betania se han y siguen reportando mortandades de peces (HIDROSFERA 2003, INCODER 2005), están fuertemente asociados con floraciones de cianobacterias tóxicas. También es necesario considerar que las variaciones en las condiciones fisicoquímicas del agua, resultantes del incremento en la actividad fotosintética

están asociadas con las mortandades de tilapia encontradas en este embalse. Por último vale la pena señalar que en el embalse en los pocos casos en los que fue posible valorar los niveles de microcistinas se encontró que superan en algunos casos el valor máximo aceptable estipulado por la Organización Mundial de la Salud de 1.0 ppb (Agujaro & Isaac 2003).

De otra parte se detectaron microcistinas en los cultivos de cianobacterias obtenidos del embalse lo que permite dar una respuesta afirmativa a la siguiente inquietud planteada ¿La realización de un estudio *in vitro* con cepas de cianobacterias aisladas del embalse podría brindar información sobre su toxicidad potencial? Ya otros estudios han mostrado que muchas especies de cianobacterias productoras de microcistinas tienen la misma habilidad *in vitro* (Moreno *et al.* 2001) por lo que esta podría ser una buena manera de indagar acerca de las potencialidades tóxicas de estos organismos cuando se produzcan floraciones en le agua. En el caso del embalse de Betania estudios como éste podrían ser aliados eficientes de las autoridades ambientales que pretenden el ordenamiento del embalse y prever potenciales mortandades en los proyectos piscícolas que allí se desarrollan. Adicionalmente, se sabe que las condiciones de cultivo favorecen la mayor producción de microcistinas ya que se favorece la agregación de las colonias, se incrementa el tamaño y volumen celular y resulta en una sobreproducción de pigmentos fotosintéticos, todos estos factores pueden beneficiar a la cianobacteria al permitirle ajustar su flotabilidad más rápidamente e incrementar la tasa de sedimentación de competidores pertenecientes a otros grupos (Jakobowski 2008).

CONCLUSIONES

Se presentan las conclusiones en este trabajo intentando dar respuestas a las inquietudes planteadas en el problema de investigación:

1. Si es posible determinar diferencias temporales y espaciales en cuanto a la abundancia y composición de las poblaciones de cianobacterias en el embalse de Betania y estas diferencias pueden ser usadas como índices de la calidad del agua.
 - Las cianobacterias fueron el grupo más representativo dentro del plancton autótrofo en el embalse y su densidad explicó las variaciones tanto en el total de células como en el número de autótrofos presentes. Las mayores densidades de cianobacterias se presentaron en los sitios de muestreo ubicados en los proyectos piscícolas. También se observaron diferencias en los conteos de las cianobacterias de acuerdo a la época.
 - De acuerdo a las curvas de rarefacción realizadas hay diferencias temporales y espaciales en el número de especies (riqueza). Especies de cianobacterias pertenecientes a *Synechococcus* sp., *Microcystis* sp. y *Anabaenas* sp. se encontraron ampliamente distribuidas en las distintas zonas del embalse probablemente porque cuentan con estrategias que les permiten crecer y proliferar en ambientes con las características eutróficas como Betania. Lo anterior permite aceptar que estos organismos son útiles en la

bioindicación y deberían ser utilizados para tal fin en este sitio específico.

- Los principales grupos taxonómicos encontrados además de las cianobacterias, fueron Chlorophyceae, Euglenophyceae, Bacillariophyta, Dinophyceae, Zygnemaphyceae y Clamydophyceae siendo los cuatro primeros los de mayor representatividad. De acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis se encontraron diferencias espaciales entre estos y los otros grupos del plancton autótrofo identificados, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0$) (Test de Dunn).

2. Las floraciones de cianobacterias se deben considerar como potencialmente peligrosas y pueden impactar en las actividades piscícolas que se realizan en el embalse de Betania

- Los niveles de microcistinas encontrados en algunas de las muestras de agua del embalse estuvieron por encima del valor permitido por la Organización Mundial de la Salud (1 ppb). La estabilidad y solubilidad de estas hepatotoxinas en el agua advierten sobre el peligro potencial para la salud de los peces que allí se cultivan y en general sobre riesgos ambientales a los que se tendrán que enfrentar las autoridades encargadas de la gestión y el manejo de este recurso.

3. Se podría obtener información pertinente sobre la toxicidad potencial de cepas de cianobacterias aisladas del embalse a partir de su estudio *in vitro*
 - El aislamiento y mantenimiento en medios de cultivo de cepas de cianobacterias se constituyó como una herramienta útil para determinar su potencial tóxico y detectar la presencia de géneros no observados en los conteos directos por epifluorescencia.

RECOMENDACIONES

Considerando los pocos estudios disponibles sobre la presencia de este grupo en el embalse de Betania y como una gran parte de los géneros de cianobacterias que se encontraron son típicos de aguas contaminadas y tienen potencialidades tóxicas resulta prioritario continuar estudiando esta comunidad para la implementación de acciones que mejoren la calidad del agua en el embalse de Betania.

A continuación se señalan aspectos importantes para complementar los resultados encontrados en este trabajo:

- Es urgente diagnosticar a tiempo para establecer medidas de control ante la presencia de floraciones de cianobacterias en el embalse de Betania, en la medida en que éstas pueden tener consecuencias muy graves para los peces allí cultivados.
- Resulta necesaria la realización de continuos monitoreos, en especial durante el nivel más bajo del embalse o durante los períodos secos con el fin de conocer en estas condiciones la dinámica de la comunidad de cianobacterias.
- Debido al constante estado de evaluación y cambio en la taxonomía del grupo de las cianobacterias se hace necesaria la obtención de cultivos puros, aislados de las poblaciones naturales a fin de determinar las características fisiológicas y genéticas, como complemento de las observaciones microscópicas de las cepas de interés.

- Se recomienda continuar en la búsqueda y mejoramiento de metodologías que contribuyan a optimizar datos de densidades y desagregación de las formas coloniales entre otros.
- Acopiar información sobre detección, fisiología y activación de formas de estivación como aquinetos que permitan valorar su presencia y efecto potencial.
- Ante la evidencia internacional de los riesgos para la salud humana y animal de la presencia de cianotoxinas en las aguas dulces se debe insistir para que en la legislación colombiana se encuentre normatividad respecto a presencia, niveles permitidos y gestión cuando se sospechen floraciones de cianobacterias en los cuerpos de agua.

BIBLIOGRAFÍA

AGUJARO L & ISAAC R. 2003. Florações de cianobacterias potencialmente toxicas nas bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí- Estado de São Paulo-avalia- çao dos mananciais em relação a eutrofiçazão. In: 22th Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Associação Brasileira Engenharia Sanitaria e Ambientall, São Paulo, Brasil.

AVENDAÑO A & ARGUEDAS C. 2006. Microcistinas en plantas de tratamiento de agua para consumo humano en un ambiente tropical: el Área Metropolitana de Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 54 (3): 711- 716.

BERNARD C, MONIS P & BAKER P. 2004. Disaggregation of colonies of *Microcystis* (Cyanobacteria): efficiency of two techniques assessed using an image analysis system. Journal of Applied Phycology. 16:117-125.

BIGGS B & KILROY C. 2000. Stream Periphyton Monitoring Manual. NIWA for ministry for the environment. New Zeland.

BURFORD M. 2005. Relative uptake of urea and ammonium by dinoflagellates or cyanobacteria in shrimp mesocosms. Hydrobiologia 549:297-303.

CAMPOS V, LISPERGUER S, WECKESSER J, VERA A, MUÑOZ D. 2005. Cianobacterias y riesgos potenciales de toxicidad en aguas continentales de Chile. Boletín Microbiológico 20: 73-81.

CANOSA A. 2007. Manual de Técnicas del Laboratorio de Microbiología. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá (Mecanografiado).

CANOSA A, LÓPEZ L, MORALES D, MARTÍNEZ P & COMBA N. 2008. Capítulo IV. Línea base microbiológica para el ajuste del POPA del embalse de Betania. En: Meneses T, Alvarado E, Galvis I & Molina B. (eds). Estudios Limnológicos para el Ordenamiento Piscícola del Embalse de Betania. Informe Final (Mecanografiado).

CARON D. 1983. Technique for enumeration of the heterotrophic and phototrophic nanoplankton using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. Applied and Environmental Microbiology. 46 (2): 491-498.

CODD G, AZEVEDO S, BAGCHI N, BURCH D, CARMICHAEL W, HARDING R, KAYA K & UTKILEN C. 2005. Cyanonet: A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management. Technical Documents in Hydrology. No 76. UNESCO.

CRISCI J & LÓPEZ M. 1983. Introducción a la teoría práctica de la taxonomía numérica. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

CHIANDANI G. & VIGHI M. 1974. The N: P ratio and testes with *Selenastrum* to predict eutrofication in lakes. Water Research.

CHORUS I & BARTRAM J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E y FN Spon. London.

CHU F, HUANG X, WEI R & CARMICHAEL W. 1989. Production and characterization of antibodies against microcystins. Applied and Environmental Microbiology. 55 (8): 1928- 1933.

DANIEL E, CANFIELD Jr & SHIREMAN J. 1994. Factors influencing the abundance of blue- green algae in southern waters. Journal of the World Aquaculture Society. 14: 65- 68.

DE LEON L. 2002. Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. En: Perfil Ambiental del Uruguay 2002. Domínguez A & Prieto R (eds). Nordan- Comunidad. Montevideo.

DOKULIL M & TEUBNER K. 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. Hydrobiologia. 438: 1-12.

DUQUE S & DONATO J. 1988. Estudio del fitoplancton durante las primeras etapas de llenado del embalse de la central hidroeléctrica de Betania, Huila-Colombia. Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. 1 (2): 189-194.

FAY P. 1992. Oxygen relation of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiological Reviews. 56 (2): 45-58.

FERRIS M & HIRSCH C. 1991. Method for isolation and purification of cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology. 57(5): 1448-1452.

FORJAN E, DOMINGUEZ M, VILCHEZ C, MIGUEL R, COSTA C & REIS M. 2008. Cianoalerta: estrategia para predecir el desarrollo de cianobacterias tóxicas en embalses. *Ecosistemas*. 17 (1): 35- 47.

GARBISU C, BLANCO A, ALKORTA I, LLAMA M & SERRA J. 1999. Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y Ciencia*.

GLAUS K. 1988. Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. 159: 89-97. In Berman T. (edit). *The Role of Microorganisms in Aquatic Ecosystems*. Junk Publishers. Neterlands.

GUILLOT G, GONZALEZ E, CALA P, ACOSTA J.1992. Plan de Manejo y Desarrollo Pesquero Piscícola del Embalse de Betania. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.

HERRERA J & GUILLOT G. 1991. Estudio bioecológico del zooplancton del Embalse de Betania, Huila- Colombia. Informe final. (Mecanografiado).

HIDROSFERA LTDA. 2003. Estudio de la capacidad de carga del embalse de Betania. CAM- BETANIA S.A. Informe Final. (Mecanografiado).

INCODER. 2005. Plan de Ordenamiento de la pesca y la acuicultura en el embalse de Betania. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

INCODER, CAM & ICA. 2007. Informe sobre la crisis que se presentó en la piscicultura que se desarrolla en Betania y estado del arte de esta apuesta productiva promisoría.

JAKOBOWSKI S. 2008. Ecological factors controlling Microcystin concentrations in the Bay of Quinte, Maumee Bay, and three Grand River reservoirs. Thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science in Biology. Ontario.

KOMÁREK J. & ANAGNOSTIDIS K. 1998. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl H, Gärtner G, Heynig H & Mollenhauer D. (eds): *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm.

KOMÁREK J. & ANAGNOSTIDIS K. 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil 2nd Part: Oscillatoriales. In: Büdel B, Krienitz L, Gärtner G & Schagerl M. (eds): *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2*, Elsevier/Spektrum, Heidelberg.

LUDWING J & REYNOLDS J. 1988. Statistical Ecology. Jonh Wiley & Sons. New York.

MACLSAAC E & STOCKNER J. 1993. Enumeration of Phototrophic Picoplankton by Auto fluorescence Microscopy. In: Kemp P, Sherr B, Sherr E & Cole J. (eds). Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publisher: 553-556.

MADIGAN M, MARTINKO J, DUNLAP P & CLARK D. 2009. Brock Biology of Microorganisms. Twelfth edition. Pearson education. San Francisco.

MARIN R. 2003. Físicoquímica y Microbiología de los Medios Acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Primera edición. Editorial Díaz de Santos. España.

MONTOYA S & RAMOS A. 1993. Productividad primaria y biomasa fitoplanctónica en el Embalse de Betania. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

MORENO I, CAMEÁN AM, PEREIRA C & FRANCA S. 2000. Diferencias en el crecimiento y producción de microcistinas de tres cepas distintas de *Microcystis aeruginosa* aisladas del Río Guadiana. Revista de Toxicología. 18. (003):176- 177.

NIXDORF B, MISCHKE U & RÜCKER J. 2003. Phytoplankton assemblages and steady state in deep and shallow eutrophic lakes- an approach to differentiate the habitat properties of Oscillatoriales. Hydrobiologia. 502: 111-121.

PAERL H. 1994. Ecology of freshwater bloom- forming blue- green algae. Journal of the World Aquaculture Society. 14: 18- 64.

PAERL H, DYBLE J, MOISANDER P, NOBLE R, PIEHLER M, PINCKNEY J, STEPPE T, TWOMEY L & VALDES L. 2003. Microbial indicators of aquatic ecosystem, change: current applications to eutrophication studies. Microbiology Ecology. 46: 233- 246.

PALIKOVA M, NAVRATIL F, STERBA F, TICHY B & MARSALEK L. 2004. Histopathology of Carp (*Cyprinus carpio*) larvae exposed to cyanobacteria extract. Acta Veterinaria Brunensis. 73: 253- 257.

PARRA O & BICUDO C. 1995. Introducción a la Biología y Sistemática de las Algas de Aguas Continentales. Editorial Andes. Santiago de Chile.

PEREZ D, SORACI A & TAPIA M. 2008. Cianobacterias y cianotoxinas: rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua. *Acta Veterinaria*. 28 (1): 48-56.

PINILLA G. 2000. Indicadores Biológicos en Ecosistemas Acuáticos Continentales de Colombia. Compilación bibliográfica. Centro de Investigaciones Científicas Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogota D.C.

PIZARRO V & BELTRAN L. 2008. Capítulo III. Capacidad de Carga 6 modelo WASTE ajustado a microzonas para el ajuste del POPA del embalse de Betania. En: Meneses T, Alvarado E, Galvis I & Molina B. (eds). Estudios Limnológicos para el Ordenamiento Piscícola del Embalse de Betania. Informe Final (Mecanografiado).

PIZZOLON L. 1996. Importancia de las cianobacterias como factor de toxicidad en las aguas continentales. *Interciencia*. 21(6): 239- 245.

PLINSKY M & TOMASZ T. 1996. Dynamic of Heterocystous cyanbacteria growth in the brackish water. In: Yasumoto T, Oshima Y & Fukuyo Y (Eds). Harmful and Toxic Algal Blooms. UNESCO.

PLINSKI M & JOSWIAK T. 1999. Temperature and N: P ratio as factors causing blooms of algal green algae in the Gulf of Gdansk. *Oceanología*. 41(1): 73-80.

POMEROY L & WIEBE J. 1988. Energetics of microbial food webs. *Hydrobiología*. 159: 7-18.

QUIROS R. 2004. Cianobacterias en lagos y embalses de Argentina: década del 80. Documento N° 2: Serie de documentos de Trabajo del área de sistemas de producción acuática. Departamento de Producción Animal. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.

RAMÍREZ M. 1993. Contribución al estudio del fitoplancton en el embalse de Betania – Huila. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.

RAMÍREZ A & VIÑA G. 1998. Limnología Colombiana: Aportes a su conocimiento y estadísticas de análisis. Primera Edición. Editorial Panamericana. Bogotá. D.C.

RAMÍREZ A. 2005. Ecología aplicada, Diseño y Análisis Estadístico. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. D.C.

RESSOM R, SOONG F, FITZGERALD J, TUCZYNOWICZ L, EL SAADI O, RODER D, MAYNARD T & FALCONER I. 1994. Health effects of toxic cyanobacteria (Blue- green algae). National Health and Medical Research Council. Looking Glass Press. Australia.

ROSET J, AGUAYO S & MUÑOZ M. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas: Una revisión. Revista de Toxicología.18: 65-71.

RUEDA-DELGADO- G, GUTIÉRREZ F, CANOSA A, PIZARRO V, SALAZAR L, NUÑEZ L, FLORES C, GARZÓN F, RUIZ E & BELTRÁN L. 2007. Actualización y ajuste del Plan de Ordenamiento de la Pesca y la Acuicultura (POPA) y formulación de un plan de contingencia para emergencias en los proyectos piscícolas en el embalse de Betania. Proyecto de Investigación. Programa de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Jorge Tadeo Lozano.

RUEDA-DELGADO- G, RUIZ E, RODRIGUEZ O, DUQUE S, CUBILLOS C, LEON P, PERDOMO W, SANCHEZ S, MORALES D, HERMOSILLA S, MARINER K, BETANCOURT B, MORALES R & RAMIREZ A. 2008. Capítulo I. Línea base limnológica para el ajuste del POPA del embalse de Betania. En: Meneses T, Alvarado E, Galvis I & Molina B. (eds). Estudios Limnológicos para el Ordenamiento Piscícola del Embalse de Betania. Informe Final (Mecanografiado).

RUIBAL A, RODRIGUEZ M, RUIZ M, CREMA N, BUSTAMANTE, M & ANGELACCIO C. 2006. Evaluación preliminar del impacto de cianobacterias tóxicas en la salud de las poblaciones de Perilago. Instituto Nacional del Agua-Centro de la región Semiárida. Primer Congreso sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua. Argentina.

SALMASO N. 2000. Factors affecting the seasonality and distribution of cyanobacteria and chlorophytes: a case study from the large lakes of the Alps, with special reference to Lake Garda. Hydrobiologia 438: 43-63.

SÁNCHEZ G. 2001. Aislamiento de Microalgas y Cianobacterias: técnicas y métodos. Memorias II curso teórico práctico. Microalgas y Cianobacterias: Aislamiento, cultivo y fisiología. Santa Marta.

SANT'ANNA C & AZEVEDO M. 2006. Identificação e ilustração dos principais gêneros. Em: Sant'Anna C, Azevedo M, Aguajaro L, Carvalho M, Carvalho L & Souza R. Manual lustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. 109 pp.

SANT'ANNA C., AZEVEDO M., WERNER C., DOGO C., RIOS F & DE CARLVALHO L. 2008. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. Algological Studies. Stuttgart. 126: 251-265.

SCHWARZ R & FORCHHAMMER K. 2005. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. Microbiology. 151: 2503- 2514.

SHAPIRO J. 1990. Current belief regarding dominance by blue- greens: the case for the importance of CO₂ and pH. Verhandlungen internationale Vereinigung Limnologie. 24:38- 54.

SIGGE D, GLENN R, ANDREWS M, BELLINGER E, BUTLER R, EPTON H & HENDRY R.1999. Biological control of cyanobacteria: principle and possibilities. Hydrobiologia. 396: 161-172.

SILVEIRA C & FELICIANO S. 2003. Cianobacterias Tóxicas: Impactos na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. 1° Edição. Brasil.

SOEDER C. 1980. Massive cultivation of microalgae: Results and prospects. Hydrobiologia 72: 197-209.

SPRINGE G, DRUVIETIS I & JUHNA T. 2000. Development of potentially toxic cyanobacteria and bacteria during artificial recharge of groundwater. In: Hallegraeff G, Blackburn S, Bolch C & Lewis R. (eds). Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 503- 505.

STAYNER R. 1977. The position of cyanobacteria in the world of phototrophs. In: Rosowski J & Parker B. (eds). Selected papers in phycology II. Phycological Society of America: 647- 649.

SUBRAMANIAN G & UMA L. 1999. The role of cyanobacteria in environmental management. Bulletin de l' Institut Océanographique.19: 599-605.

TUCCI A & SANT'ANNA C. 2003. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo. Brasil. Revista Brasileira Botânica. 26(1): 97-112.

VASCONCELOS V. 2001. Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects. Limnética. 20 (1): 45-58.

WACKLIN P. 2006. Biodiversity and Phylogeny of Planktic Cyanobacteria in temperate Freshwater Lakes. Prima Oy. Helsinki.

WIEGAND C & PFLUGMACHER S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. Toxicology and Applied Pharmacology. 203: 201- 218.

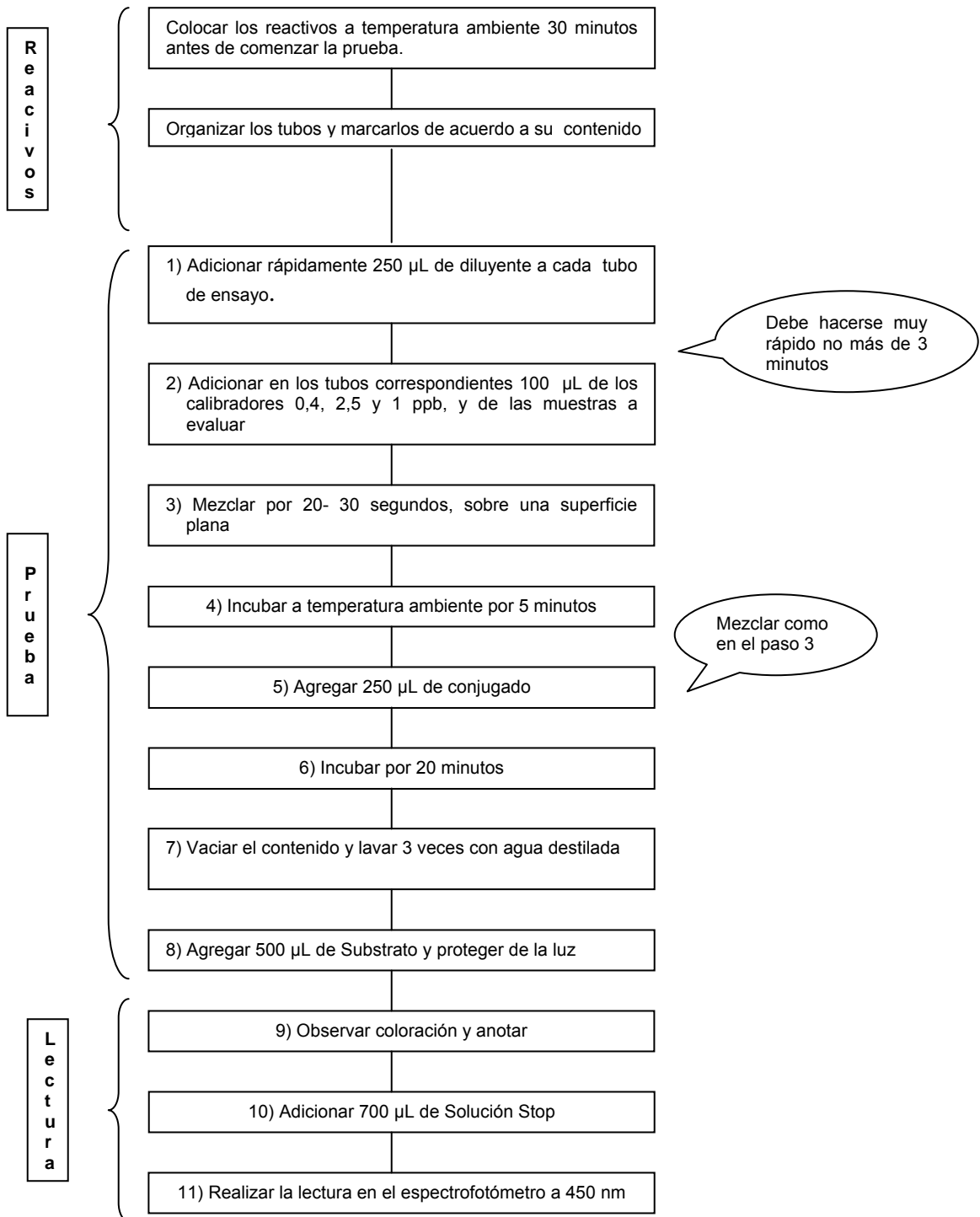
WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1998. Guidelines for drinking water quality. Second edition. Geneva.

ZAR, H. J. 1999. Biostatistical Analysis. Fourth edition. Department of Biological Sciences. Northern Illinois University. Prentice Hall. New Jersey.

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo para la determinación de microcistinas en muestras de agua utilizando la técnica ELISA



Anexo 2

En el anexo 2 se presentan en forma de tablas las densidades totales de células, las de cianobacterias, las de organismos autótrofos y las de heterótrofos, así como los valores promedio, máximos y mínimos obtenidos durante el muestreo en las cuatro zonas definidas en este estudio en el embalse de Betania. En la tabla 1 se muestran los resultados correspondientes a las densidades y en la tabla 2 los valores promedios, máximos y mínimos.

Tabla 1. Densidades de cianobacterias, autótrofos y heterótrofos obtenidos en los zonas de muestreo (original y replica) y durante todo el periodo de estudio

Salida	Grupo	Muestra	Embalse										Ríos		Puente Amarillo
			PIJ	COM	BOT	CAR	BRI	NYW	PAC	FIS	AGA		MAG	PAE	PAM
1	Cianobacterias	Original	3830	3104	3226	4589	3032	1676	4021	2250	4352	3518	2217	1554	2604
		Réplica	1743	2432	2837	3883	2067	3777	4237	3312	3398	2161	1699	2010	9832
		Promedio	2787	2768	3032	4236	2550	2727	4129	2781	3875	2840	1958	1782	6218
1	Total	Original	13011	4655	3243	4589	3094	1676	4021	2250	4352	3518	4352	2217	2709
		Réplica	4175	2432	2837	3922	2067	3777	4237	3312	3398	2161	1907	2010	9832
		Promedio	8593	3544	3040	4256	2581	2727	4129	2781	3875	2840	3130	2114	6271
1	Autótrofos	Original	3830	3104	3226	4589	3032	1676	4021	2250	4352	3518	2217	1554	2604
		Réplica	1743	2432	2837	3883	2067	3777	4237	3312	3398	2161	1699	2010	9832
		Promedio	2787	2768	3032	4236	2550	2727	4129	2781	3875	2840	1958	1782	6218
1	Heterótrofos	Original	9181	1552	16	0	62	16	0	0	0	106	0	0	0
		Réplica	2432	0	0	39	0	0	0	0	0	0	439	0	0
		Promedio	5807	776	8	20	31	8	0	0	0	53	220	0	0
2	Cianobacterias	Original	56178	55124	21335	13202	12908	52113	44383	55529	32426	74782	8593	13662	26143
		Réplica	54881	17672	29048	15909	13054	14227	31412	44991	21431	33034	13627	15402	4661
		Promedio	55530	36398	25192	14556	12981	33170	37898	50260	26929	53908	11110	14532	15402
2	Total	Original	65419	68597	25867	18240	18707	61088	62622	62622	48639	89374	16213	16165	64244
		Réplica	60150	36965	39046	20266	18240	24927	41546	56948	33135	40938	20965	20469	47220
		Promedio	62785	52781	32457	19253	18474	43008	52084	59785	40887	65156	18589	18317	55732

Las cianobacterias como indicadoras de la calidad del agua en el embalse de Betania

2	Autótrofos	Original	65419	66797	25756	18153	18707	61088	62420	61204	47423	89374	16213	16165	63433
		Réplica	60150	36965	38371	20165	18240	24684	41343	56948	32983	40938	20965	20469	46815
		Promedio	62785	51881	32064	19159	18474	42886	51882	59076	40203	65156	18589	18317	55124
2	Heterótrofos	Original	0	486	111	87	0	0	203	1419	1216	0	0	0	811
		Réplica	0	0	676	101	0	243	203	0	152	0	0	0	405
3	Cianobacterias	Original	112518	114139	40208	61090	41181	83496	30642	65014	62744	127271	17024	22860	16172
		Réplica	27076	78146	68581	12038	45234	81875	59177	80902	85766	24968	28575	26346	44585
		Promedio	69797	96143	54395	36564	43208	82686	44910	72958	74255	76119,5	22800	24603	30379
3	Total	Original	122894	132622	51881	71402	53340	90630	35831	74579	72310	133108	20266	24563	25414
		Réplica	41991	99709	76849	24319	61285	99709	71661	94683	93386	34533	31159	27022	51557
		Promedio	82443	116166	64365	47861	57313	95170	53746	84631	82848	83821	25713	25793	38486
3	Autótrofos	Original	122894	68597	51881	71402	53340	90630	35831	74579	72147	133108	20266	24563	25414
		Réplica	41991	36965	76849	24319	61285	99709	71661	94521	93386	34533	31159	27022	51557
		Promedio	82443	52781	64365	47861	57313	95170	53746	84550	82767	83821	25713	25793	38486
3	Heterótrofos	Original	0	0	0	0	0	0	0	0	151	0	0	227	0
		Réplica	0	151	0	0	0	0	0	151	0	0	0	0	0
		Promedio	0	76	0	0	0	0	0	76	76	0	0	114	0
4	Cianobacterias	Original	34858	27238	82686	58204	57394	23347	3486	37452	29345	9639	5715	7904	51395
		Réplica	31007	21725	47504	63230	56259	25292	15443	91116	61771	11889	11219	7344	78795
		Promedio	32933	24482	65095	60717	56827	24320	9465	64284	45558	10764	8467	7624	65095
4	Total	Original	47828	42478	101168	67446	64365	40532	9241	42478	39073	19544	8674	11054	73282
		Réplica	48233	56907	62744	75066	64041	32426	26386	97602	71013	21617	12970	9728	98737
		Promedio	48031	49693	81956	71256	64203	36479	17814	70040	55043	20581	10822	10391	86010
4	Autótrofos	Original	47666	42478	100682	67446	64203	40370	9160	41667	38911	19455	8471	11054	72634
		Réplica	48233	56745	62095	75066	63879	32426	25535	96791	70850	21509	12905	9728	96953
		Promedio	47950	49612	81389	71256	64041	36398	17348	69229	54881	20482	10688	10391	84794
4	Heterótrofos	Original	151	0	454	0	151	151	76	757	151	83	189	0	605
		Réplica	0	151	605	0	162	0	794	757	151	101	61	0	1665
		Promedio	76	76	530	0	157	76	435	757	151	92	125	0	1135
5	Cianobacterias	Original	52206	95651	35513	55563	52206	27591	17351	49028	46455	31172	15283	31172	28751
		Réplica	42723	57986	15463	24173	41058	51600	35863	39747	7944	29107	31929	32685	54841

Las cianobacterias como indicadores de la calidad del agua en el embalse de Betania

5	Cianobacterias	Promedio	47465	76819	25488	39868	46632	39596	26607	44388	27200	30140	23606	31929	41796
5	Total	Original	56291	100545	38067	57785	53492	32383	18512	50919	47212	31021	15586	31172	30690
		Réplica	45699	62597	19341	24627	44186	53315	37256	41310	8575	15473	33442	32685	59099
		Promedio	50995	81571	28704	41206	48839	42849	27884	46115	27894	23247	24514	31929	44895
5	Autótrofos	Original	52861	99233	38067	57738	53492	31525	18461	50919	47212	31021	15586	31172	30406
		Réplica	43076	62030	19341	24627	43580	53315	36720	41310	8575	15473	33442	32685	55913
		Promedio	47969	80632	28704	41183	48536	42420	27591	46115	27894	23247	24514	31929	43160
5	Heterótrofos	Original	3430	1312	0	47	22168	857	50	0	0	0	0	0	284
		Réplica	2623	21185	0	0	605	0	101	0	0	0	0	0	54841
		Promedio	3027	11249	0	24	11387	429	76	0	0	0	0	0	27563

Tabla 2. Valores correspondientes a promedio, máximo y mínimo de las densidades de cianobacterias, autótrofos y heterótrofos obtenidos en las zonas de muestreo, durante todo el periodo de estudio

Salida	Embalse			Herradura Río Magdalena			Río Páez			Puente Amarillo			
	Grupo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo
1	Cianobacterias	3172	4589	1676	1958	2217	1699	1782	2010	1554	6218	9832	2604
2	Cianobacterias	34682	74782	12908	11110	13627	8593	14532	15402	13662	15402	15402	4661
3	Cianobacterias	65103	127271	12038	22799	28575	17024	24603	26346	22860	30379	44585	16172
4	Cianobacterias	39444	91116	3486	8467	11219	5715	7624	7904	7344	65095	78795	51395
5	Cianobacterias	38135	95651	7944	23606	31929	15283	31929	32685	31172	41796	54841	28751
Total	Cianobacterias	36147	127271	1676	13588	31929	1699	16094	32685	1554	31778	78795	2604
1	Total	3836	13011	1676	2062	2217	1907	1782	2010	1554	6271	9832	2709
2	Total	43949	89374	18240	18589	20965	16213	18317	20469	16165	55732	55732	47220
3	Total	76836	133108	24319	25713	31159	20266	25792	27022	24563	38485	51557	25414
4	Total	51509	101168	9241	10822	12970	8674	10391	11054	9728	86009	98737	73282
5	Total	40232	100545	8575	24514	33442	15586	31929	32685	31172	44894	59099	30690
Total	Total	43213	133108	1676	16340	33442	1907	17642	32685	1554	46278	98737	2709
1	Autótrofos	3172	4589	1676	1958	2217	1699	1782	2010	1554	6218	9832	2604
2	Autótrofos	44446	89374	18153	18589	20965	16213	18317	20469	16165	55124	55124	46815
3	Autótrofos	76812	133108	24319	25713	31159	20266	25792	27022	24563	38485	51557	25414
4	Autótrofos	51258	100682	9160	10688	12905	8471	10391	11054	9728	84793	96953	72634
5	Autótrofos	39776	99233	8575	24514	33442	15586	31929	32685	31172	43159	55913	30406
Total	Autótrofos	43028	133108	1676	16292	33442	1699	17642	32685	1554	45556	96953	2604
1	Heterótrofos	665	9181	16	219	439	0	0	0	0	53	106	0
2	Heterótrofos	245	1419	0	0	0	0	0	0	0	608	608	405
3	Heterótrofos	23	151	0	0	0	0	113	227	0	0	0	0
4	Heterótrofos	235	794	0	125	189	61	0	0	0	1135	1665	605
5	Heterótrofos	2381	22168	0	0	0	0	0	0	0	27563	54841	284
Total	Heterótrofos	768	22168	0	69	439	0	23	227	0	5872	54841	0

Anexo 3

En este anexo se los resultados de algunas de las pruebas estadísticas realizadas. En la tabla 1 aparecen descritas las pruebas utilizadas para determinar las diferencias estadísticas entre las densidades de cianobacterias espacial y temporalmente. En la tabla 2 se muestran los resultados de correlaciones entre las densidades de cianobacterias con el total de células, de autótrofos y de heterótrofos, teniendo en cuenta todos los datos y considerando por separado los sitios y las épocas de muestreo

Tabla 1. Pruebas estadísticas utilizadas para determinar las diferencias entre las densidades de cianobacterias espacial y temporalmente

Variable	Tratamiento	Estadístico utilizado	Valor estadístico	Valor p	Resultado
Densidad de cianobacterias	Sitios de muestreo	Test de Kruskal Wallis	14,52	0,026	Diferencias entre sitios de muestreo
		Test de Dunn	< 0,05	< 0,05	Diferencias par el sitio Las Islas Fish Flow
Densidad de cianobacterias	Época de muestreo	Test de Kruskal Wallis	67,87	0	Diferencias entre épocas de muestreo
		Tets de Dunn	< 0,05	< 0,05	Las diferencias se presentan para mes de julio

Tabla 2. Correlaciones entre las densidades de cianobacterias con el total de células, de autótrofos y de heterótrofos, para todos los datos y por separado los sitios y las épocas de muestreo

Variable	Total vs. Cianobacterias	Autótrofos vs. Cianobacterias	Heterótrofos vs. Cianobacterias
Estaciones de muestreo	0,9741 ** (Correlación positiva)	0,9566 **	0,4945* (No hay correlación)
Época de muestreo	0,9813** (Correlación positiva)	0,9730**	-0,30* (Correlación negativa)
Correlación General	0,9659* (Correlación positiva)	0,9585 *	0,1079* (No hay correlación)

Coefficiente Correlación: Sperman* y Pearson**

Anexo 4

En este anexo se presentan los valores correspondientes a promedio, máximo y mínimo de las densidades de los principales grupos del plancton autótrofo presentes en las zonas de muestreo, para todo el periodo de estudio

Salida	Grupo	Embalse			Puente Amarillo			Río Páez			Río Magdalena		
		Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo	Promedio	Máximo	Mínimo
2	Cianobacteria	34307	74782	12908	15402	26143	4661	14532	15402	13662	11110	13627	8593
3	Cianobacteria	65103	127271	12038	30379	44585	16172	14532	15402	13662	22799	28575	17024
4	Cianobacteria	39444	91116	3486	65095	78795	51395	7624	7904	7344	8467	11219	5715
5	Cianobacteria	38211	95970	7944	40213	51676	28751	31929	32685	31172	23606	31929	15283
Total	Cianobacteria	44119	127271	3486	37772	78795	4661	19672	32685	7344	16496	31929	5715
2	Zygnemaphyceae	0	0	0	0	0	0	51	101	0	0	0	0
3	Zygnemaphyceae	24	162	0	0	0	0	51	101	0	0	0	0
4	Zygnemaphyceae	8	162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Zygnemaphyceae	10	213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	Zygnemaphyceae	11	213	0	0	0	0	13	101	0	0	0	0
2	Bacillariophyta	15	111	0	0	0	0	0	0	0	145	210	81
3	Bacillariophyta	171	1362	0	81	162	0	0	0	0	51	101	0
4	Bacillariophyta	588	3138	0	8509	14749	2270	55	111	0	255	446	65
5	Bacillariophyta	53	404	0	99	151	47	0	0	0	0	0	0
Total	Bacillariophyta	203	3138	0	2172	14749	0	14	111	0	113	446	0
2	Dynophyceae	10	203	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Dynophyceae	8	162	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Dynophyceae	39	486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Dynophyceae	51	378	0	99	151	47	0	0	0	76	151	0
Total	Dynophyceae	28	486	0	25	151	0	0	0	0	19	152	0

Las cianobacterias como indicadoras de la calidad del agua en el embalse de Betania

2	Clamydophyceae	64	456	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Clamydophyceae	65	649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Clamydophyceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Clamydophyceae	3	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	Clamydophyceae	32	649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Chlorophyceae	4799	12970	760	13882	15808	11957	975	1520	429	2042	3354	730
3	Chlorophyceae	8617	17996	4215	2939	3769	2108	975	1520	429	2229	2331	2128
4	Chlorophyceae	13617	32912	3891	8106	8755	7458	769	875	663	1232	1492	973
5	Chlorophyceae	1352	3795	0	2369	3178	1560	0	0	0	832	1513	151
Total	Chlorophyceae	6956	32912	0	6824	15808	1560	637	1520	0	1584	3354	151
2	Euglenopheceae	4690	12322	608	25839	30197	21482	2760	3445	2074	5292	6809	3774
3	Euglenopheceae	2727	11146	0	5006	5472	4540	2760	3445	2074	633	811	456
4	Euglenopheceae	1715	9728	0	9610	11924	7296	1856	2156	1556	985	1256	713
5	Euglenopheceae	65	404	0	378	757	0	0	0	0	0	0	0
Total	Euglenopheceae	2245	12322	0	10208	30197	0	1250	3445	0	1727	6809	0

Anexo 5

Índices empleados para evaluar la estructura de la comunidad de cianobacterias en el embalse de Betania: (S) Riqueza. (N) Número de especies. (D) Riqueza de Margalef. (J') Uniformidad de Pielou. (H) Diversidad de Simpson. (Lambda') Diversidad de Shannon-Wiener. (N1) Número de Hill 1 especies abundantes. (N2) Número de Hill 2 especies muy abundantes. (N10') Numero de Hill 10' Proporción de especies abundantes en relación a el total de especies. (N21') Numero de Hill 21' Proporción de especies muy abundantes en relación a las especies muy abundantes.

Época	Sitio	S	N	D	J'	H'(loge)	Lambda'	N1	N2	N10	N21
SALIDA 1	PIJ	2,00	74,00	0,23	0,49	0,34	0,80	1,41	1,24	0,70	0,88
	COM	2,00	168,00	0,20	0,13	0,09	0,96	1,09	1,04	0,55	0,95
	PAM	5,00	240,00	0,73	0,40	0,64	0,71	1,90	1,40	0,38	0,73
	CAR	4,00	198,00	0,57	0,26	0,35	0,84	1,43	1,18	0,36	0,83
	BRI	2,00	200,50	0,19	0,08	0,06	0,98	1,06	1,02	0,53	0,96
	PAC	3,00	214,00	0,37	0,23	0,25	0,89	1,29	1,12	0,43	0,87
	FIS	4,00	238,00	0,55	0,31	0,43	0,79	1,54	1,27	0,39	0,82
	AGA	3,00	10,00	0,87	1,00	1,10	0,26	2,99	2,99	1,00	1,00
	MAG	2,00	224,00	0,18	0,25	0,18	0,92	1,19	1,09	0,60	0,91
		2,00	134,50	0,20	0,17	0,12	0,95	1,13	1,05	0,56	0,93
	Promedio	2,90	170,10	0,41	0,33	0,36	0,81	1,50	1,34	0,55	0,89
SALIDA 2	PIJ	5,00	640,00	0,62	0,51	0,82	0,51	2,26	1,96	0,45	0,87
	COM	3,00	224,50	0,37	0,07	0,08	0,97	1,08	1,03	0,36	0,95
	BOT	3,00	204,00	0,38	0,08	0,08	0,97	1,09	1,03	0,36	0,95
	PAM	3,00	76,00	0,46	0,51	0,56	0,66	1,76	1,51	0,59	0,86
	CAR	3,00	154,50	0,40	0,63	0,69	0,60	2,00	1,66	0,67	0,83
	BRI	5,00	142,00	0,81	0,53	0,86	0,50	2,35	1,98	0,47	0,84
	NYK	4,00	239,00	0,55	0,35	0,48	0,77	1,61	1,30	0,40	0,80
	PAC	4,00	187,00	0,57	0,74	1,02	0,41	2,77	2,45	0,69	0,88
	FIS	4,00	197,50	0,57	0,65	0,91	0,45	2,48	2,20	0,62	0,89
	AGA	4,00	150,50	0,60	0,87	1,20	0,33	3,34	2,97	0,83	0,89
	MAG	3,00	120,50	0,42	0,77	0,85	0,47	2,34	2,12	0,78	0,91
	PAE	5,00	171,50	0,78	0,63	1,01	0,44	2,75	2,27	0,55	0,82
		6,00	266,00	0,90	0,52	0,93	0,52	2,53	1,91	0,42	0,75
	Promedio	4,00	213,31	0,57	0,53	0,73	0,58	2,18	1,88	0,55	0,87
SALIDA 3	PIJ	4,00	430,50	0,49	0,11	0,15	0,95	1,16	1,06	0,29	0,91
	COM	4,00	593,00	0,47	0,51	0,71	0,51	2,03	1,94	0,51	0,96
	BOT	3,00	335,50	0,34	0,37	0,41	0,78	1,50	1,28	0,50	0,85
	PAM	6,00	204,00	0,94	0,53	0,94	0,52	2,57	1,91	0,43	0,74

Las cianobacterias como indicadoras de la calidad del agua en el embalse de Betania

SALIDA 3	CAR	5,00	206,50	0,75	0,34	0,55	0,72	1,73	1,38	0,35	0,80
	BRI	3,00	266,50	0,36	0,16	0,18	0,92	1,20	1,09	0,40	0,91
	NYK	2,00	459,50	0,16	0,03	0,02	0,99	1,02	1,01	0,51	0,98
	PAC	3,00	277,00	0,36	0,30	0,33	0,84	1,40	1,19	0,47	0,85
	FIS	4,00	450,00	0,49	0,05	0,07	0,98	1,07	1,02	0,27	0,95
	AGA	3,00	458,00	0,33	0,22	0,24	0,89	1,27	1,12	0,42	0,88
		2,00	469,50	0,16	0,02	0,02	1,00	1,02	1,00	0,51	0,99
	Promedio	3,54	377,27	0,44	0,24	0,33	0,83	1,45	1,27	0,42	0,89
SALIDA 4	PIJ	5,0	184,00	0,77	0,30	0,48	0,74	1,61	1,35	0,32	0,84
	COM	6,00	151,00	1,00	0,28	0,50	0,76	1,65	1,31	0,27	0,79
	BOT	5,00	401,50	0,67	0,23	0,37	0,85	1,45	1,17	0,29	0,81
	PAM	2,00	401,50	0,17	0,54	0,38	0,78	1,46	1,28	0,73	0,88
	CAR	4,00	372,00	0,51	0,58	0,81	0,53	2,24	1,87	0,56	0,83
	BRI	6,00	350,50	0,85	0,25	0,45	0,81	1,56	1,23	0,26	0,79
	NYK	5,00	150,00	0,80	0,14	0,22	0,92	1,25	1,08	0,25	0,87
	PAC	6,00	106,50	1,07	0,77	1,38	0,28	3,99	3,45	0,66	0,86
	FIS	6,00	396,00	0,84	0,36	0,65	0,67	1,92	1,49	0,32	0,78
	AGA	6,00	277,00	0,89	0,39	0,69	0,60	2,00	1,65	0,33	0,83
		3,00	109,50	0,43	0,35	0,38	0,81	1,47	1,23	0,49	0,83
	Promedio	4,91	263,59	0,73	0,38	0,57	0,71	1,87	1,56	0,41	0,83
SALIDA 5	PIJ	4,00	941,00	0,44	0,29	0,40	0,79	1,50	1,26	0,37	0,84
	COM	7,00	459,50	0,98	0,26	0,50	0,79	1,65	1,27	0,24	0,77
	BOT	3,00	539,00	0,32	0,16	0,18	0,93	1,19	1,08	0,40	0,90
	PAM	4,00	645,50	0,46	0,24	0,34	0,85	1,40	1,17	0,35	0,84
	CAR	4,00	887,00	0,44	0,19	0,26	0,90	1,29	1,11	0,32	0,86
	BRI	5,00	678,50	0,61	0,28	0,44	0,80	1,56	1,25	0,31	0,80
	NYK	4,00	785,00	0,45	0,10	0,14	0,94	1,15	1,06	0,29	0,92
	PAC	4,00	527,50	0,48	0,22	0,31	0,87	1,36	1,16	0,34	0,85
	FIS	5,00	528,50	0,64	0,14	0,22	0,92	1,25	1,09	0,25	0,88
	AGA	4,00	555,00	0,47	0,14	0,20	0,93	1,22	1,08	0,30	0,89
		4,00	205,00	0,56	0,07	0,09	0,97	1,10	1,03	0,27	0,94
	Promedio	4,36	613,77	0,53	0,19	0,28	0,88	1,33	4	0,31	0,86

Anexo 6

Se presentan fotografías de los morfotipos de cianobacterias presentes en los cultivos obtenidos de muestras de agua del embalse de Betania, para el segundo muestreo (figura 1), tercer muestreo (figura 2), cuarto muestreo (figura 3) y quinto muestreo (figuras 4 a y b). En cada figura se indica la procedencia original de cada uno de los morfotipos encontrados.

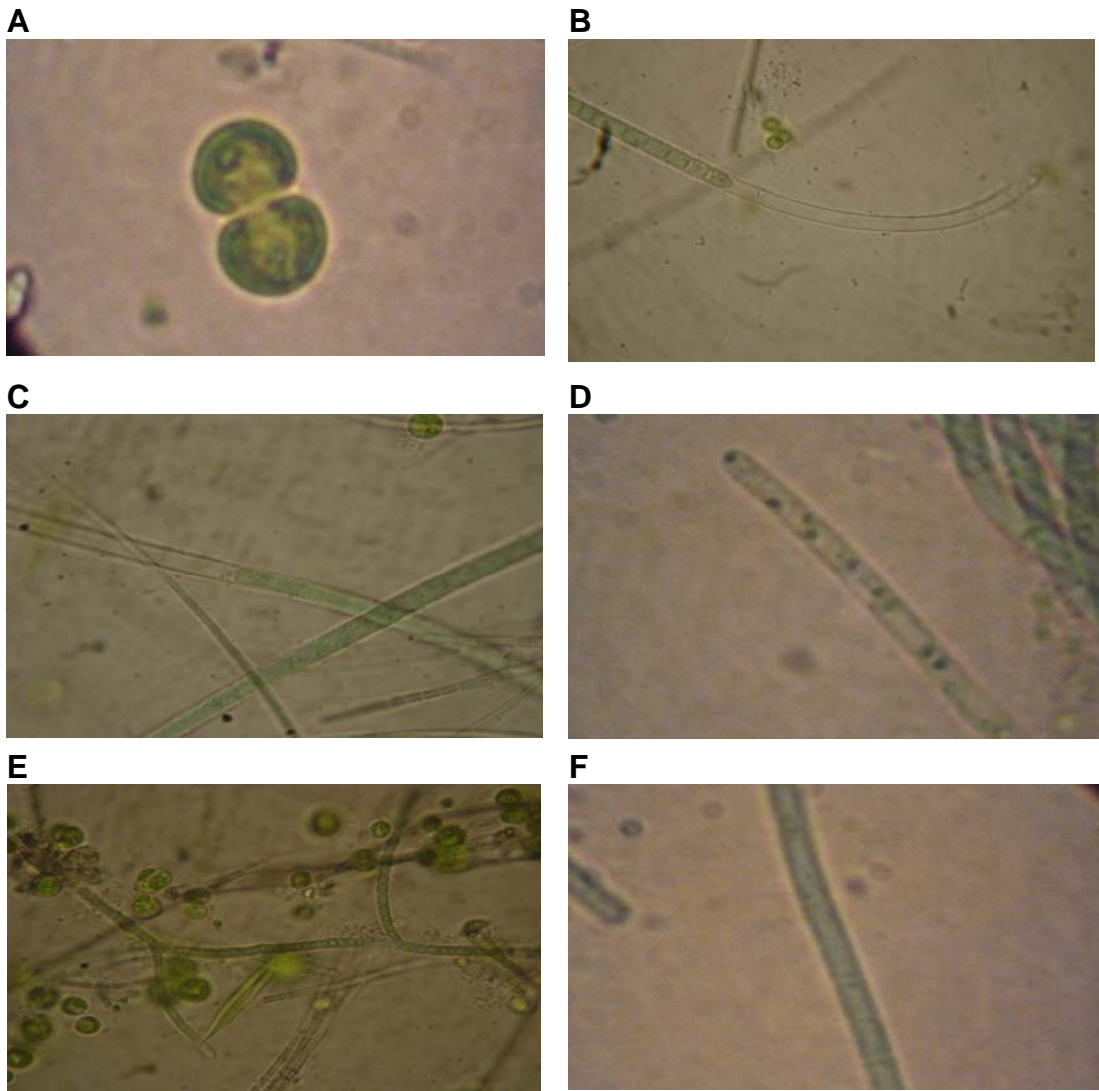


Figura 1. Fotografías de los morfotipos de cianobacterias encontrados en los cultivos correspondientes al segundo muestreo. (A). *Chroococcus* sp. (río Páez). (B). *Phormidium* sp. 1. (C) *Phormidium* sp. 2 (río Magdalena). (D). *Pseudoanabaena* sp. 1 (Puente Amarillo). (E). Nostocales (río Páez). (F). *Pseudoanabaena* sp. 2 (Puente Amarillo). Fotos de Comba (2008).

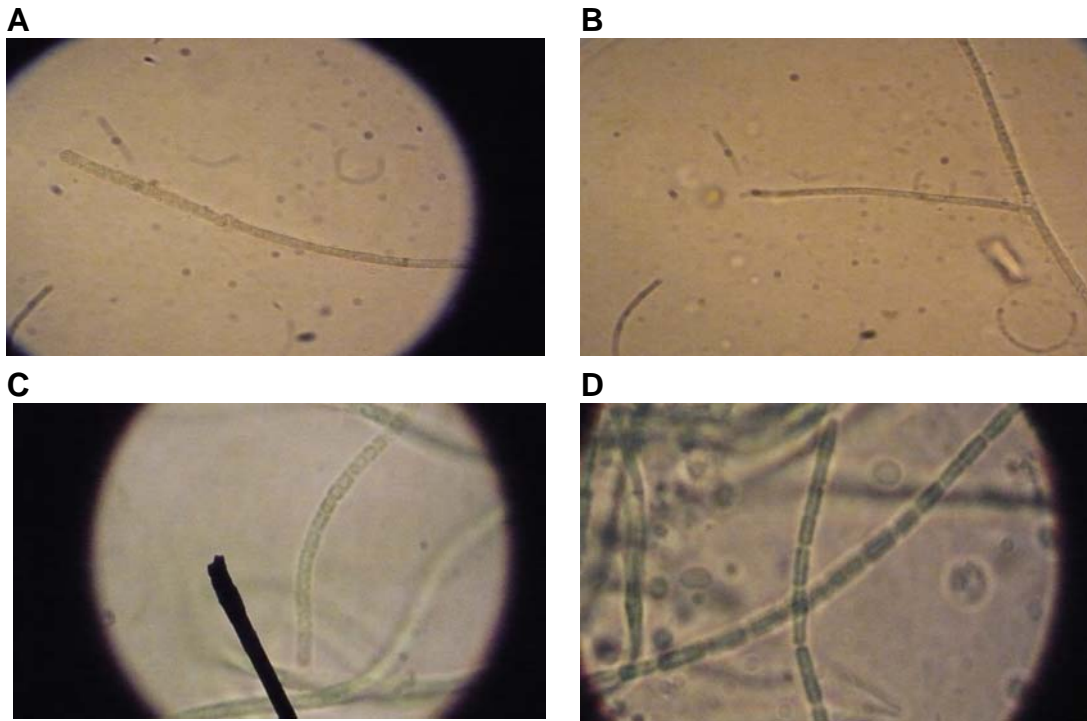


Figura 2. Fotografías de los morfotipos de cianobacterias presentes en los cultivos correspondientes al tercer muestreo. (A y B) Nostocales con falsas ramificaciones (Sector Cueva del Amor). (C) *Pseudoanabaena* sp. 4 (Bahía Caraguaja). (D). *Pseudoanabaena* sp. 3 (Bahía Caraguaja). Fotos de Comba (2008).

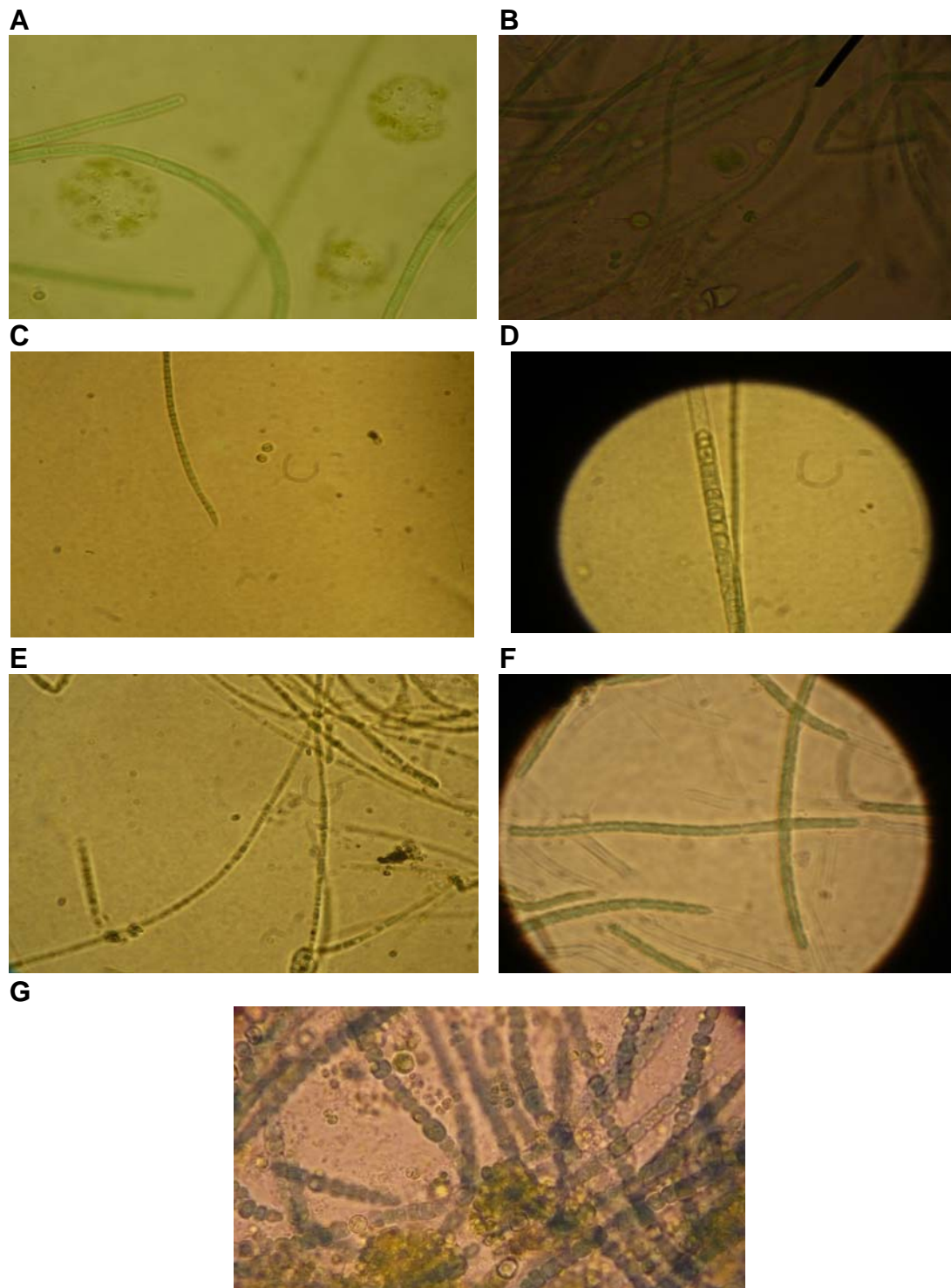


Figura 3. Fotografías de los morfotipos de cianobacterias presentes en los cultivos correspondientes al cuarto muestreo. (A). *Pseudoanabaena* sp. 2. (B). *Pseudoanabaena* sp. 4 (Comepez). (C). *Pseudoanabaena* sp. 5. (D). *Pseudoanabaena* sp. 6 (río Magdalena). (E). *Pseudophormidium* sp. (Botero). (F). *Leptolyngbya* sp. (Comepez). (G). *Anabaena* sp. 1 (Aguas abiertas). Fotos de Comba (2008).

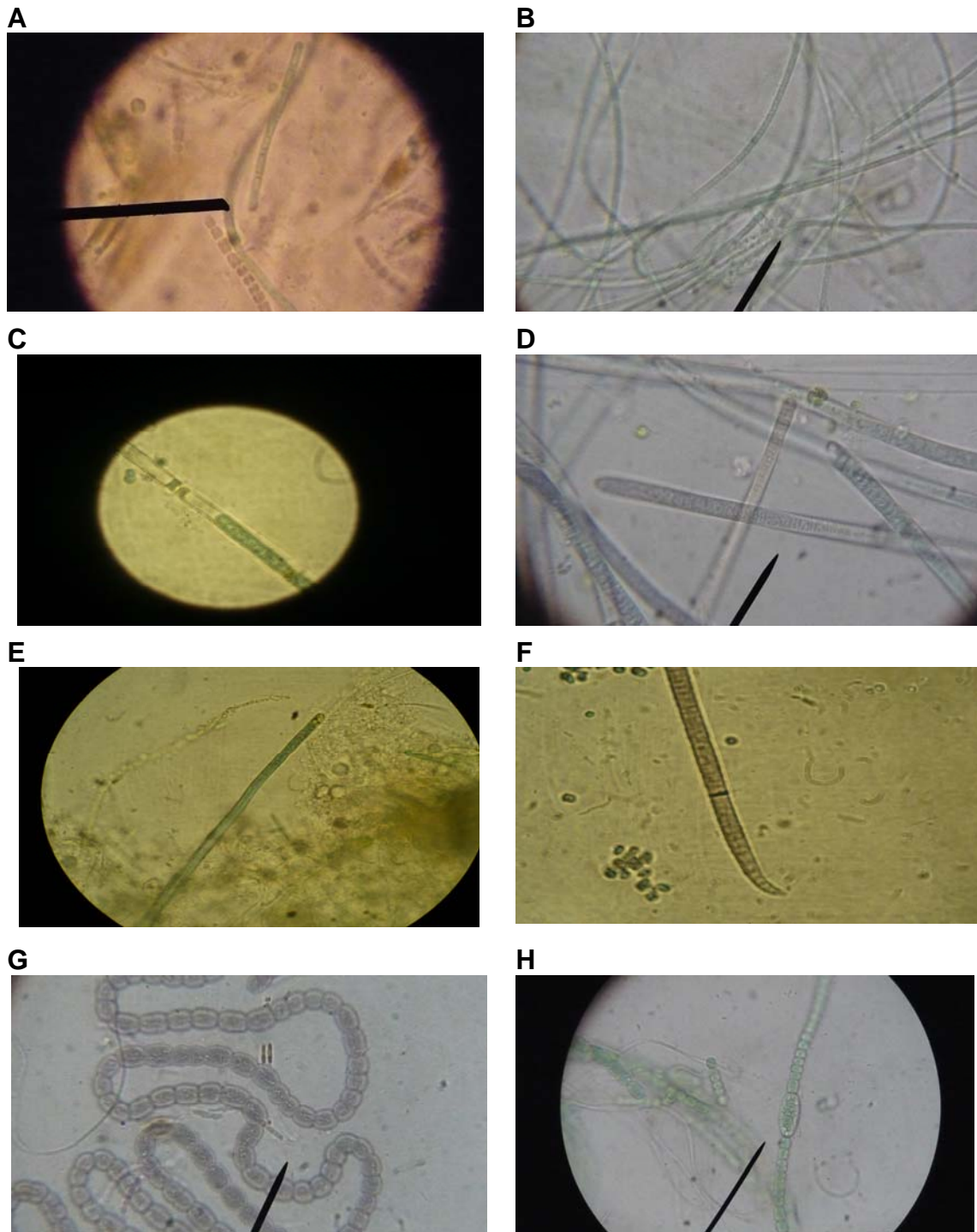


Figura 4. Fotografías de los morfotipos de cianobacterias presentes en los cultivos correspondientes al quinto muestreo. (A). *Pseudoanabaena* sp. 2. y *Pseudoanabaena* sp. 3 (Puente Amarillo). (B). *Pseudoanabaena* sp. 4 (Comepez). (C). *Pseudoanabaena* sp. 6 (Caraguaja). (D). *Phormidium* sp. 2 (Bahía los Pijaos). (E). *Phormidium* sp. 3. (F). *Phormidium* sp. 4. (G). *Anabaena* sp. 2 (río Magdalena). (H). *Anabaena* sp. 3 (Caraguaja). Fotos de Comba (2008).

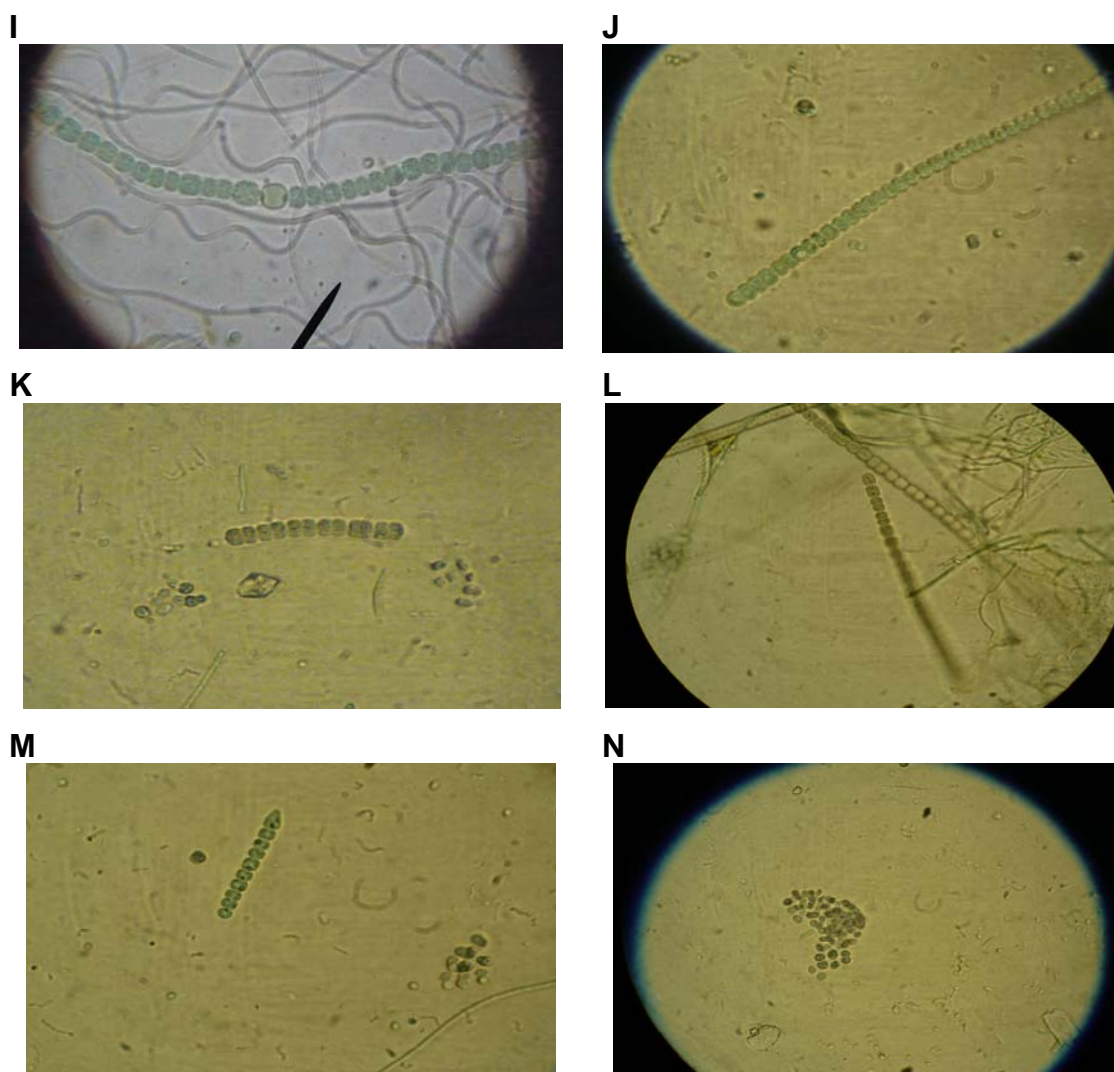


Figura 5. Fotografías de los morfotipos de cianobacterias presentes en los cultivos correspondientes al quinto muestreo. (I) *Anabaena* sp. 4 (Las Islas). (J). *Anabaena* sp. 5 (río Magdalena). (K). *Anabaena* sp. 6 (río Páez). (L). *Anabena* sp. 7 (Río Magdalena). (M). *Borzia* sp. (N). *Synechococcus* sp. (Río Magdalena). Fotos de Comba (2008)

Anexo 7

En este anexo se presentan las tablas que resumen datos necesarios para obtener la concentración final de microcistinas con la técnica ELISA en algunas muestras de agua de la quinta salida (tablas 1- 5) y en cultivos de cianobacterias aisladas del embalse de Betania (tablas 6- 9).

En todas las tablas las abreviaturas significan lo siguiente: (DO) Densidad óptica, % Bo (DO control negativo/ DO muestra), % Bo teórico (rango específico para cada calibrador), (MC) microcistinas, (ppb) Partes por billón, (DOP) Densidad óptica promedio, (DS) Desviación estándar y (CV) Coeficiente de variación (DS/ DOP).

Tabla 1. Datos correspondientes a la determinación final de microcistinas en la muestra 13

Contenido	Lectura DO	% Bo	%Bo teórico	Concentración MC (ppb)
Calibrador 0,4 ppb	0,38	71,70	60-85 %	0,4
Calibrador 2,5 ppb	0,172	32,45	12-35%	2,5
Calibrador 1 ppb	0,315	59,43	35-60 %	1
Control Negativo	0,53	100,00		0
Muestra 13	0,51	96,23		0

Tabla 2. Datos correspondientes a la determinación final de microcistinas en las muestras 6, 7 y 8

Contenido	DO	% Bo	%Bo teórico	Concentración MC (ppb)
Calibrador 0,4 ppb	0,44	81,48	60-85 %	
Calibrador 2,5 ppb	0,125	23,15	12-35%	
Control Negativo	0,54	100,00		
Muestra 6	0,575	106,48		0,00
Muestra 7	0,55	101,85		0,00
Muestra 8	0,72	133,33		0,00

Tabla 3. Datos obtenidos en la determinación final de microcistinas en las muestras 10,11, 12

Contenido	DO	% Bo	%Bo teórico	Concentración MC (ppb)
Calibrador 0,4 ppb	0,42	72,43	60-85 %	
Calibrador 2,5 ppb	0,18	31,03	12-35%	
Control Negativo	0,58	100,00		0,00
Muestra 10	0,71	122,41		0,00
Muestra 11	0,81	139,66		0,00
Muestra 12	0,8	137,93		0,00

Tabla 4. Datos correspondientes a la determinación final de microcistinas en las muestras 2,3 y 4

Contenido	DO	Concentración MC (ppb)
Calibrador 0,4 ppb	0,665	0,4
Calibrador 2,5 ppb	0,33	2,5
Cultivo (Muestra 5)	0,54	1,18369906
Muestra 2	0,6	0,807523511
Muestra 3	0,615	0,713479624
Muestra 4	0,675	0,337304075

Tabla 5. Datos correspondientes a la determinación final de microcistinas en las muestras 1,5 y 9

Contenido	DO	DOP	DS	% Bo	%Bo teórico	CV	Concentración MC (ppb)
Calibrador 0,4 ppb	0,72	0,72	0	98,63	60-85 %		
Calibrador 2,5 ppb	0,29	0,29	0	39,73	12-35%		
Calibrador 1 ppb	0,615	0,615	0	84,25	35-60 %		
Control Negativo	0,76	0,73	0,04	100		5,81	
Muestra 1	0,53	0,51	0,03	69,68		5,55	1,4
Muestra 5	0,62	0,605	0,02	82,88		3,51	0,88
Muestra 9	0,75	0,75	0	102,74		0,00	0,1

Tabla 6. Datos correspondientes a la determinación final de microcistinas en el cultivo 4 (tercera salida)

Contenido	DO	DOP	DS	% Bo	%Bo Teórico	CV	Concentración MC (ppb)
Calibrador 0,4 ppb	0,8	0,775	0,03	92,26	60-85 %	4,56	
Calibrador 2,5 ppb	0,31	0,335	0,03	39,88	12-35%	10,55	
Calibrador 1 ppb	0,54	0,56	0,03	66,67	35-60 %	5,05	
Control Negativo	0,82	0,84	0,03			3,37	
Cultivo 4 (tercera salida)	0,72	0,75	0,04			5,66	> 0,4

Tabla 7. Datos correspondientes a la determinación final de microcistinas en el cultivo 10 (cuarta salida)

Contenido	OD	DOP	(DS)	% Bo	%Bo Teórico	CV	Concentración MC (ppb)
Calibrador 2,5 ppb	0,19 0,21	0,2	0,01	25,97	12-35%	7,07	
Control Negativo	0,78 0,76	0,77	0,01			1,84	
Cultivo 10 (cuarta salida)	0,82 0,83	0,825	0,007	107,14		0,86	0

Tabla 8. Datos correspondientes a la determinación final de microcistinas en los cultivos 3 y 4 (primera salida), 1 (segunda salida), 5 y 11 (tercera salida) y 3 (cuarta salida)

Contenido	DO	DOP	DS	% Bo	%Bo Teórico	CV	Concentración MC (ppb)
Calibrador 2,5 ppb	0,19	0,19	0	21,11	12-35%	0,00	
Control Negativo	0,9	0,9	0			0,00	
Cultivo 3 (primera salida)	0,66 0,64	0,65	0,01	72,22		2,18	0,88
Cultivo 4 (segunda salida)	0,64 0,67	0,655	0,02	72,78		3,24	0,86
Cultivo 1 (segunda salida)	0,7 0,68	0,69	0,01	76,67		2,05	0,74
Cultivo 5 (tercera salida)	0,72 0,76	0,74	0,03	82,22		3,82	0,56
Cultivo 11 (tercera salida)	0,9 0,86	0,88	0,03	97,78		3,21	0,07
Cultivo 3 (cuarta salida)	0,7 0,74	0,72	0,03	80,00		3,93	0,63

Tabla 9. Datos correspondientes a la determinación final de microcistinas en los cultivos 3 y 4 (primera salida), 1 segunda salida), 5 y 11 (tercera salida) y 3 (cuarta salida)

Contenido	OD	ODP	DS	% Bo	%Bo teórico	CV	Concentración MC (ppb)
Control negativo	0,84	0,84	0			0,00	
Calibrador 1 ppb	0,45	0,45	0	53,57	35-60 %	0,00	
Cultivo 3 (primera salida)	0,46 0,45	0,455	0,007	54,16		1,55	0,98
Cultivo 12 (segunda salida)	0,82 0,78	0,8	0,02	95,24		3,54	0,10
Cultivo 1 (quinta salida)	0,62 0,58	0,6	0,03	71,43		4,71	0,61

Anexo 8

En este anexo se presentan las gráficas de calibración correspondientes a concentración de microcistinas (MC) vs. absorbancia (nm) de cada una de las pruebas realizadas con la técnica ELISA, en algunas muestras de la quinta salida (figura 1) y en los cultivos de cianobacterias obtenidos del agua del embalse de Betania (figura 2). En cada gráfica se muestra la ecuación lineal utilizada para determinar los niveles de microcistinas.

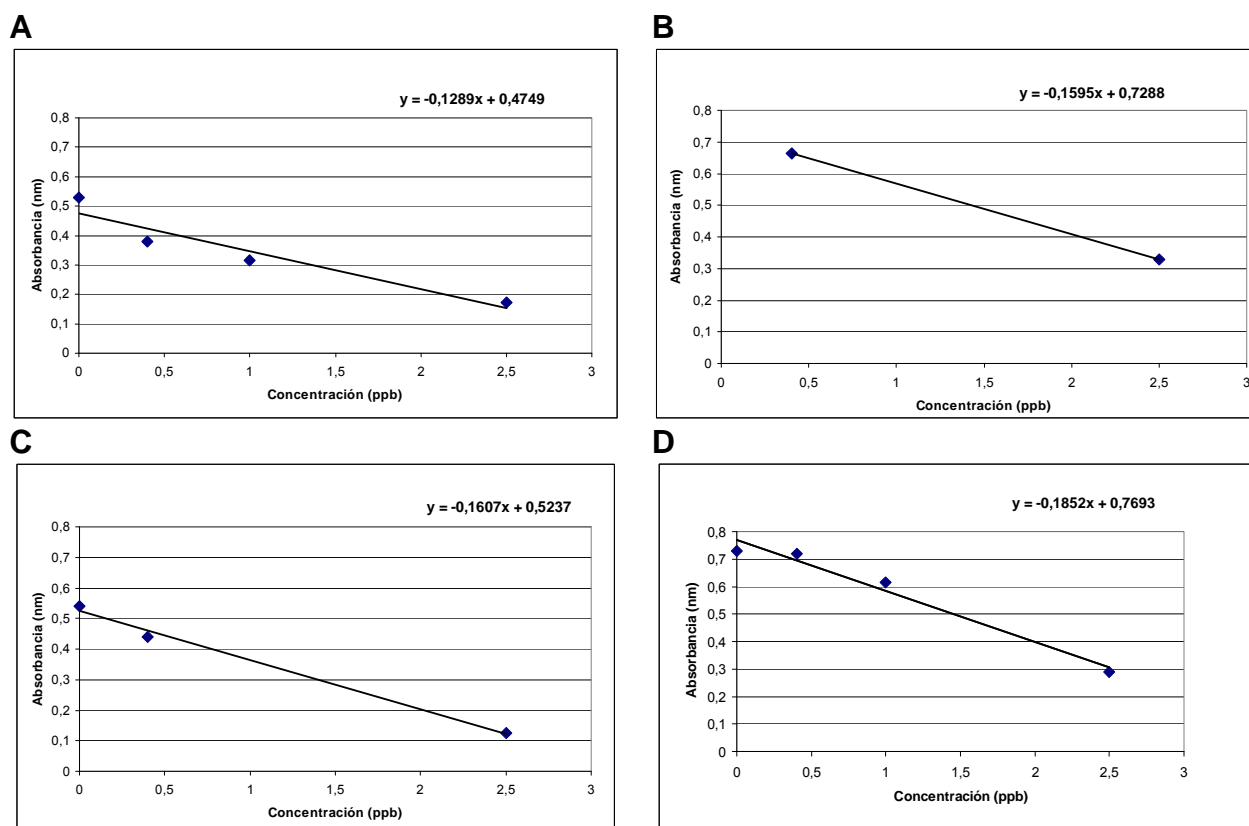


Figura 1. Gráficas de calibración utilizadas para determinar la concentración de microcistinas en las muestras de agua de la quinta salida. (A) Muestra 13. (B) Muestras 2, 3, 4. (C) Muestras 6, 7 y 8. (D) Muestras 1,5 y 9. (E) Muestras 10,11 y 12.

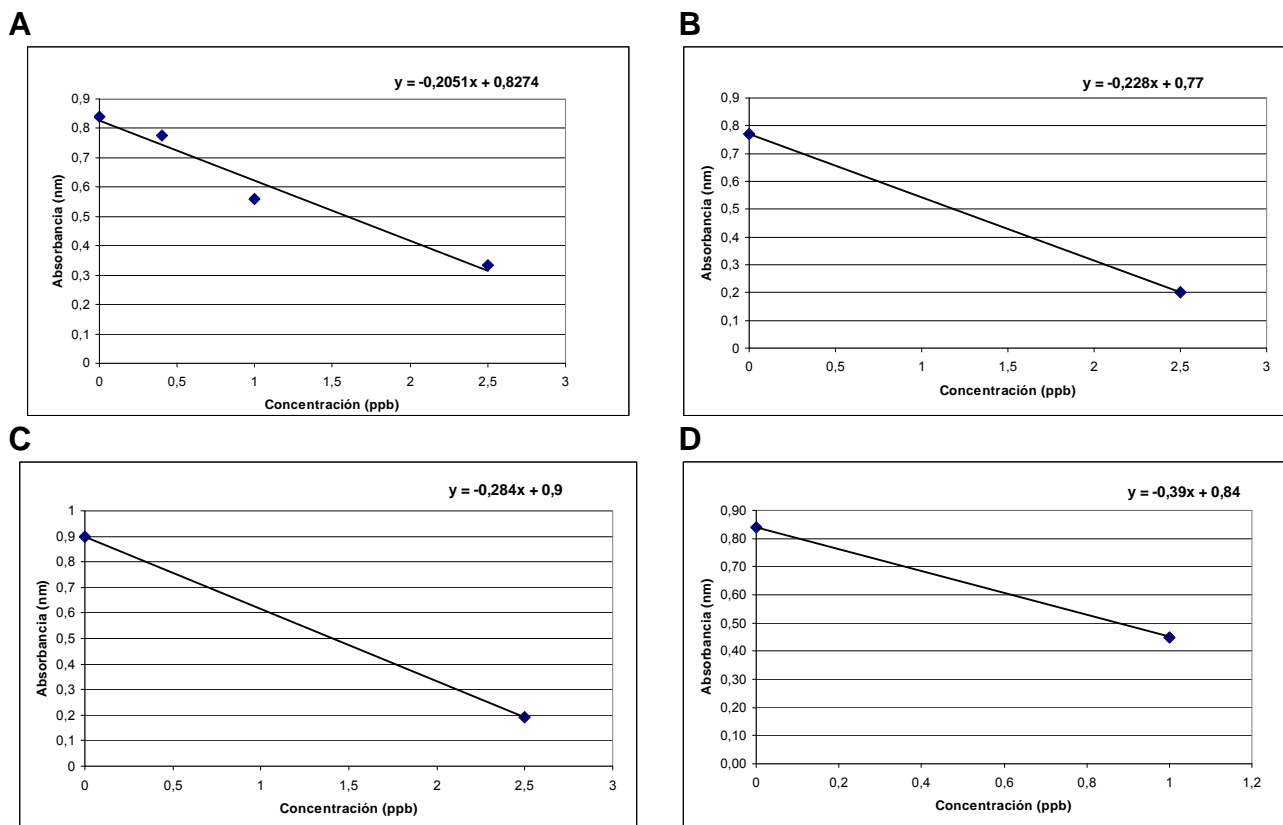


Figura 2. Gráficas de calibración utilizadas para determinar la concentración de microcistinas en los cultivos de cianobacterias aislados de agua del embalse de Betania. (A) Cultivo 4 (tercera salida). (B) Cultivo 10 (cuarta salida). (C) Cultivos 5 y 11 (tercera salida), 4 y 1 (segunda salida) y 3 (primera y cuarta salida). (D) Cultivo 3 (primera salida), 12 (segunda salida), 1 (quinta salida).