

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| MARCO TEÓRICO | 6 |
| El bucle microbiano | 6 |
| El bacterioplancton | 7 |
| Métodos de estudio | 11 |
| METODOLOGÍA | 17 |
| Área de muestreo | 17 |
| Fase de Campo | 19 |
| Fase de Laboratorio | 20 |
| Fase de gabinete | 23 |
| RESULTADOS | 25 |
| Temperatura y coeficiente de extinción de la luz | 25 |
| Densidad bacteriana | 27 |
| Biovolumen bacteriano | 28 |
| Biomasa bacteriana | 29 |
| Morfometría celular | 33 |
| DISCUSIÓN | 36 |
| CONCLUSIONES | 45 |
| RECOMENDACIONES | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 47 |
| ANEXO A | 55 |
| ANEXO B | 56 |
| ANEXO C | 59 |

RESUMEN

Se estudió el bacterioplancton en tres lugares de la Bahía de Gaira (costa Caribe colombiana) en dos períodos climáticos contrastantes. Se estimó la densidad bacteriana total con la técnica de epifluorescencia y se midieron forma, tamaño y biomasa bacteriana aplicando análisis de imagen. Se encontraron diferencias significativas de densidad bacteriana entre épocas climáticas, sitios de muestreo y profundidades evaluadas. La densidad promedio fue de $4,4 \times 10^5$ células ml^{-1} con valores que oscilaron entre 7×10^4 células ml^{-1} en la época seca y $2,9 \times 10^6$ células ml^{-1} en la época lluviosa. En todo el estudio predominaron células cocoides y pequeñas; el 75% de las células mostraron biovolúmenes menores a $0,05 \mu\text{m}^3$ y el 60% fueron esféricas. El contenido de carbono (C) promedio por célula osciló entre 5,7 y 11,2 fg C, valor que se considera bajo incluso en aguas oligotróficas. Durante el periodo de muestreo el aporte total de la biomasa bacteriana al sistema fue de $0,9 \mu\text{g C l}^{-1}$ a $32 \mu\text{g C l}^{-1}$. Los resultados sugieren que la densidad y la biomasa bacterianas aumentan por el aporte de materiales proveniente de la descarga del río Gaira y de la Ciénaga Grande de Santa Marta en la época lluviosa. Es posible que la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos sean un factor importante en la dinámica de la comunidad bacteriana en la bahía. Es necesario profundizar en esta problemática para discernir la importancia del bacterioplancton de este sistema.

Palabras clave: Bacterioplancton, abundancia, biomasa, biovolumen, Caribe colombiano

INTRODUCCIÓN

A mediados de los años setenta, se descubrió la participación de las bacterias en los ciclos biogeoquímicos lo cual incrementó el interés general por estudiarlas. A partir de entonces se consolidaron las metodologías que permitieron estimar el papel de los microorganismos en el ciclo de los nutrientes. Con el fin explicar la función de los procariontes en el ecosistema acuático surgió la hipótesis del bucle microbiano (*microbial loop*), que plantea la interacción entre las comunidades microbianas del agua para reutilizar el carbono orgánico disuelto (COD) resultante de excreción, exudación y muerte del plancton (Azam *et al.*, 1983; Wilhelm & Suttle, 1999; Kirchman, 2000).

La mayor parte de la información sobre la participación de los microorganismos en las redes tróficas acuáticas proviene de la investigación realizada en sistemas de latitudes altas. En Colombia se han realizado algunos trabajos para evaluar la contaminación bacteriana por aguas residuales en la zona costera, especialmente en los sitios en los cuales hay vertimiento de aguas residuales y fluviales, utilizando indicadores como coliformes totales y fecales, enterococos y bacterias anaerobias sulfito reductoras (Bernier, 1977; Franco, 1983; Invemar, 2003; Invemar, 2005). Por otra parte, son escasos los estudios orientados hacia la participación de las bacterias en las cadenas tróficas y su importancia en el ecosistema marino, sin embargo, se reporta que las bacterias participan activamente en la degradación de materia orgánica y que se encontraron altos valores de abundancia y biomasa bacteriana en la Ciénaga Grande de Santa Marta (Steubing, 1971; Hoppe *et al.*, 1983; Gocke *et al.*, 2003; Gocke *et al.*, 2004)

En el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano se han estudiado los microorganismos en aguas continentales en colaboración con instituciones como Colciencias y el Fondo para la Promoción de la Ciencia y Tecnología del Banco de la República. Mediante tales trabajos se han validado metodologías novedosas en Colombia para el estudio de los microorganismos (Canosa & Pinilla, 1997; Canosa & Pinilla, 1999; Canosa *et al.*, 2000; Canosa & Pinilla, 2001; Canosa, 2003). En este contexto el grupo de investigación en Microbiología Acuática de la Universidad, conciente de la importancia de iniciar en el Programa de Biología Marina estudios microbiológicos en el ambiente marino decidió apoyar este trabajo de tesis, cuyo tema quedó adscrito a la línea de Participación de Microorganismos en Cadenas Tróficas. Para la realización del trabajo se utilizaron fondos, materiales y reactivos remanentes de los proyectos en ejecución o ya realizados. También se contó con el apoyo de la Decanatura y del profesor Andrés Franco quien dirige la línea de Investigación en Oceanografía en la Sede de Santa Marta.

Mediante la ejecución de este trabajo se pretendió una aproximación al estudio de las bacterias en la Bahía de Gaira al plantear las siguientes preguntas: 1. ¿Cuál es la densidad bacteriana en las aguas de la Bahía? 2. ¿Cuál es la biomasa del bacterioplancton en estas mismas aguas? 3. ¿Cómo se encuentra distribuido horizontal y verticalmente el bacterioplancton? 4. ¿El bacterioplancton presenta alguna variación temporal en densidad o biomasa bacterianas durante el periodo de muestreo? Al responderlas, el presente trabajo sirve como punto de partida para que el grupo de Microbiología Acuática de la Universidad continúe con estudios acerca del componente microbiano marino, como se dijo poco estudiado en el país, también para estimular la participación de otros grupos de investigación en la obtención y comparación de información concerniente a su densidad, biomasa, actividad, diversidad y

ecología microbiana. Finalmente, para generar un marco conceptual que permita renovar los enfoques y la perspectiva hasta ahora usada en el estudio de este importante recurso, el mar, y así en un futuro potenciar los procesos productivos manejados por el hombre.

MARCO TEÓRICO

El bucle microbiano

A comienzos de la década del 80 Azam *et al.*, (1983) propusieron un modelo para representar los flujos de materia y energía a través de los microorganismos planctónicos, denominado el bucle microbiano. A raíz del descubrimiento de una gran cantidad de virus en los ecosistemas acuáticos y de obtener evidencias de su participación en ese bucle, se incluyeron en el modelo que se muestra en la figura 1 (Thingstad *et al.*, 1993; Wommack *et al.*, 1999).

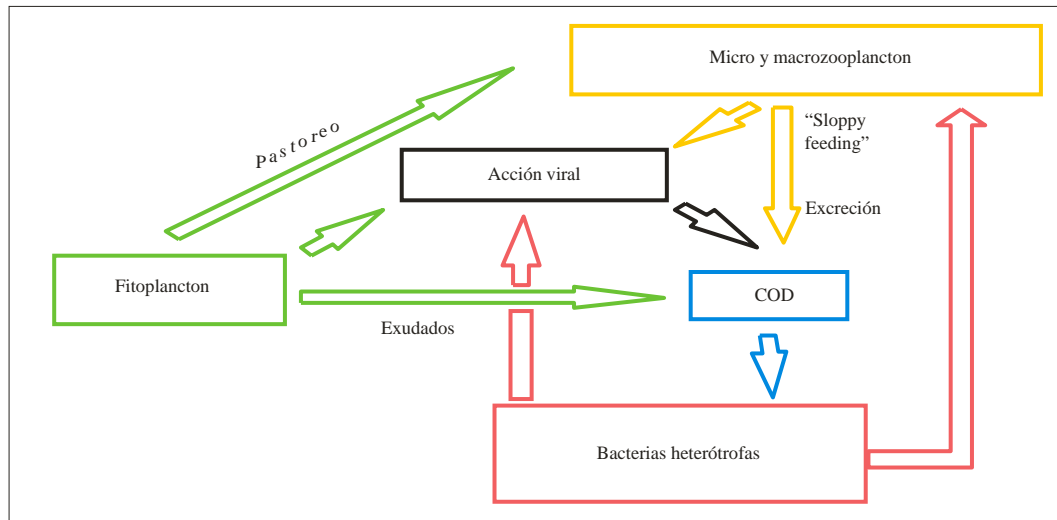


Figura 1. Representación esquemática del bucle microbiano. Las flechas indican la dirección del flujo de materia orgánica. COD: Carbono Orgánico Disuelto. Modificado de Wilhelm & Suttle (1999).

Se ha reportado que a través del bucle microbiano llega a moverse entre el 20 y el 50% del carbono sintetizado por los productores primarios en forma de carbono orgánico disuelto (COD) producido por excreción, babeo alimenticio

(*sloppy feeding*), y por muerte, como por ejemplo a causa de la lisis viral del plancton. Adicionalmente la escorrentía en sistemas costeros y lénticos puede subsidiar la reserva de carbono orgánico autóctono. Al ser asimilado por las bacterias el COD se convierte en biomasa particulada que se transfiere por pastoreo a los bacterívoros y a partir de ellos puede ser exportado del sistema o permanecer disponible constituyendo la comunidad bacteriana, favoreciendo su papel como mediadora en el ciclo de los nutrientes y materiales en el medio marino (Shiah & Ducklow, 1994; Bratbak *et al.*, 1998; Thingstad, 2000; Choi *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2003).

Las aproximaciones teóricas al funcionamiento del bucle han permitido predecir el efecto que las variables ambientales tienen sobre las poblaciones bacterianas. Por ejemplo, el estado trófico del ambiente traza un escenario que ocasiona en la comunidad bacteriana cambios en su composición taxonómica y en su estructura de tamaños que se refleja en propiedades como la cantidad de carbono por célula (Koch, 1996; Fukuda *et al.*, 1998). La interpretación de la información existente ha puesto en evidencia que a través de estos diminutos organismos fluye la energía aprovechada finalmente por las personas mediante la explotación de los recursos pesqueros.

El bacterioplancton

El bacterioplancton está constituido por los organismos procariotas presentes en la columna de agua que se mueven a merced de las corrientes. El estudio de este eslabón trófico requiere medir, en unidades que permitan interpretar la información en el contexto trófico, algunas características tales como el número de células presentes y la cantidad de materia orgánica que contienen.

La densidad bacteriana es apreciable, llegando a encontrarse en cantidades de más de 10^9 células l^{-1} , representando más biomasa que cualquier otro grupo, hasta 1 g de carbono m^{-2} , en la zona eufótica oceánica (Turley, 1993; Ford, 1993; Gasol *et al.*, 1997; Bratbak *et al.*, 1998). No obstante su papel como reservorios de carbono y como eslabones en el bucle microbiano, se sabe hoy que los diversos ensamblajes metabólicos de procariotas acuáticos son fundamentales, si no imprescindibles, en los procesos de remineralización gracias a que las técnicas moleculares han revelado la composición taxonómica y diversidad metabólica del bacterioplancton en aguas marinas y continentales. Es así como la información obtenida como consecuencia del desarrollo conceptual y técnico ha complementado los datos sobre la estructura del bacterioplancton y su variación espacial y temporal en relación con la dinámica del medio. (Hobbie, 1993; Pomeroy *et al.*, 1995; Fukuda *et al.*, 1998; Ducklow, 1999; Wilhelm & Suttle, 1999; Glockner *et al.*, 1999; Long & Azam, 2001).

La biomasa, parámetro básico en ecología microbiana, se refiere a la medida de algún material celular importante como por ejemplo, la cuantificación de macromoléculas como el ácido murámico, el ATP, algunos lípidos específicos, y el contenido de DNA o de proteínas. Dependiendo del enfoque del estudio se pueden utilizar igualmente las mediciones de peso seco, contenido de carbono, nitrógeno y/o fósforo (Lee, 1993; Norland, 1993; Fukuda *et al.*, 1998; La Ferla *et al.*, 2004; Makino & Cotner, 2004).

Usualmente la biomasa bacteriana se expresa como contenido de carbono, y aunque puede ser determinado directamente, por ejemplo usando microanálisis con rayos X o mediante la oxidación catalítica a alta temperatura, es estimada de forma rutinaria a partir de la cantidad de células bacterianas, densidad, y de la medida del volumen celular, biovolumen. Este último se obtiene fácilmente a partir de las dimensiones de organismos individuales observados a través del

microscopio. El procedimiento está basado en la tinción de las células con un colorante fluorescente, el recuento directo de bacterias, la determinación del tamaño celular y finalmente el cálculo del contenido de carbono mediante la aplicación de algún factor de conversión (Lee, 1993; Norland, 1993; Posch *et al.*, 2001).

Tamaño, densidad, biomasa, forma, dotación enzimática y requerimientos energéticos son propiedades bacterianas estrechamente relacionadas. Sin embargo, al referirse a los procariotas es conveniente aludir pródigamente al tamaño ya que su variación está directamente relacionada con la eficiencia de difusión de los nutrientes y desechos dentro y fuera de la célula, los procesos de síntesis de nuevas estructuras y aún de protección contra los predadores. Algunas de las formas vivientes más pequeñas que existen se encuentran en el espectro de tamaños de los procariotas acuáticos, hacen parte del picoplancton junto con los organismos cuyo diámetro está entre 0,2 y 2,0 μm , aunque algunos procariotas pueden alcanzar mayores dimensiones. Su tamaño está determinado por la cantidad mínima de material que debe contener una célula para mantenerse viva o activa, y la necesidad de almacenar reservas o defensas. (Koch, 1996; Kirchman, 2000; Jochem, 2001; Wu *et al.*, 2004).

La ventaja más grande que tiene el ser pequeño es su proporción superficie-volumen, la cual hace que sea muy eficiente el transporte de nutrientes requeridos en el interior de la célula. Además, algunos pueden formar fácilmente esporas o llegar a estados de dormancia o inactividad al disminuir las funciones vegetativas. La capacidad de evadir a predadores selectivos que no consuman organismos pequeños o disminuir la probabilidad de encuentro, favorece especialmente a los más pequeños entre los pequeños (Koch, 1996). Tales habilidades hacen de la comunidad del bacterioplancton un componente muy heterogéneo y variable en el ecosistema, exhibiendo cambios en su

estructura de tamaños, morfológica y taxonómica. Incluso las diferentes densidades bacterianas reportadas son expresión del aprovechamiento de los recursos disponibles y de la capacidad para eclipsar la mortalidad ya sea por predación o por lisis viral. (Pernthaler *et al.*, 1997; Šimek *et al.*, 1997; Hahn & Höfle, 1999; Jürgens *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 1999; Šimek *et al.*, 2001).

Teóricamente el límite inferior de volumen bacteriano oscila entre $0,02 \mu\text{m}^3$ y $0,6 \mu\text{m}^3$, aunque se reconoce que existen procariotas de menos de $0,01 \mu\text{m}^3$ (Koch, 1996; Sommaruga & Psenner, 1995). Para sobrevivir deben contar con el espacio celular físico que les permita albergar en sus genes la cantidad de información requerida, o disponer de un mecanismo para optimizar el que haya (Koch, 1996; Psenner & Sommaruga, 1992). Los microorganismos en este rango de tamaño tienen que afrontar restricciones físicas que no es habitual contemplar, a pesar de lo cual se reporta que han llegado a dominar los ambientes oligotróficos contando entre sus representantes al organismo más abundante sobre la tierra, revelando que contribuyen significativamente a la biomasa total en los océanos, aunque no debe considerarse una regla general (Eguchi *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1998; Biddanda *et al.*, 2001; Simu & Hagström, 2004).

En el otro extremo del espectro, el de las células procariotas mayores, la limitación la impone la velocidad de difusión de materiales (nutrientes o desechos). Estos microorganismos han compensado esa desventaja impuesta por el tamaño con estrategias tales como una mayor cantidad de agrupaciones funcionales de transporte, permeasas, ya que el principal mecanismo de entrada y salida de sustancias en las bacterias es el transporte activo. Modificar la forma también puede resolver el problema y esta es la razón por la cual se cree que muchas bacterias tienen formas bacilares, filamentosas o fusiformes, ya que de esta manera incrementan la relación superficie-volumen al hacerse lo

más estrechas posible aunque sean largas y anchas. Entonces, si se logra el transporte de partículas con la suficiente velocidad por unidad de área superficial, puede entenderse que se encuentren procariotas con dimensiones tan extremas como 600 μm x 80 μm (Koch, 1996; Kirchman, 2000; Vrede *et al.*, 2002).

Al ser grande, un microorganismo consigue escapar de sus perseguidores por ser mayor que ellos o si resulta difícil de ingerir, de esta forma se puede modificar la estructura de tamaños de la comunidad bacteriana al tiempo que se altera la composición taxonómica. Habilidades menos efectivas en la evasión de predadores como la elasticidad y cualidades bioeléctricas en la superficie celular también han sido estudiadas (Psenner & Sommaruga, 1992; Fernández *et al.*, 1999; Koch, 1996; Hahn y Höfle, 1999; Jürgens *et al.*, 1999; Matz y Jürgens, 2001; Wu *et al.*, 2004). Es comúnmente aceptado que las células bacterioplanctónicas con los mayores tamaños se encuentren en los ambientes más productivos, generalmente cerca de la costa y en sistemas estuarinos, en donde generalmente el carbono no es el factor limitante. La disponibilidad de nutrientes inorgánicos, por otro lado, no resulta determinante ya que se han reportado diferentes tamaños bajo un mismo régimen de nutrientes (Fukuda *et al.*, 1998; Vrede *et al.*, 2002)

Métodos de estudio

La ecología microbiana evalúa los microorganismos en su ambiente o hábitat natural, y aunque este tema ha sido hasta ahora poco estudiado en Colombia, a nivel mundial se reconoce que en el medio acuático los procariotas son responsables de la mayoría de las acciones en los ciclos del carbono y del nitrógeno a través de su interacción con el ambiente (Ford, 1993; Hobbie, 1993,

Fukuda *et al.*, 1998). Ratificar tal afirmación ha sido posible gracias a la evolución de las técnicas utilizadas ya que “el entendimiento de los procesos microbianos en el ambiente será tan bueno como nuestros métodos, quizás en ningún otro campo científico como en este los dogmas han sido completamente modificados por la nueva información resultante del mejoramiento de la tecnología” (Paul, 1993).

Históricamente el principal obstáculo en el avance del conocimiento sobre las poblaciones bacterianas naturales estuvo relacionado con las metodologías, todas ellas desarrolladas *in vitro* y con deducciones formuladas a partir de métodos de cultivo que brindaban resultados en unidades formadoras de colonias. Se sospechaba que los cultivos sub-estimaban la densidad de las bacterias en el agua y con el uso de técnicas de fluorescencia se demostró que los números eran superiores, a partir de entonces se trabajó intensamente para desarrollar procesos que permitieran discernir el papel de los microorganismos en el ciclo de los nutrientes en el ecosistema acuático (Hobbie, 1993; Bratbak & Heldal, 1995; Canosa & Pinilla, 2001). Ahora se está entendiendo de que manera los procariontes cumplen su función particularmente gracias a descubrir que son capaces de sortear, en una escala sutil, las condiciones típicas del ambiente acuático.

La investigación microbiológica no es sencilla ya que los mecanismos de control no actúan por separado, además los microorganismos también son influenciados por una gran variedad de factores como la temperatura o la salinidad (Shiah & Ducklow, 1994; Vrede *et al.*, 1999; Jochem, 2001). En este contexto es necesaria una aproximación ecológica preliminar para abordar la problemática de la comunidad bacteriana en el ecosistema marino, a través del conocimiento de su densidad, biovolumen y biomasa en un determinado lugar, lo cual permitiría constituir una línea base que conduciría a formular

explicaciones y modelos para esclarecer las complejas interacciones entre los organismos que coexisten, a través del bucle microbiano, en el ecosistema estudiado.

La técnica de epifluorescencia. Mucha de la información disponible acerca de la densidad de bacterias en aguas naturales se debe al desarrollo de la técnica de epifluorescencia, originalmente propuesta para detectar anticuerpos fluorescentes en medicina. Esta técnica aprovecha la propiedad de algunas sustancias, llamadas fluorocromos, de emitir luz en una determinada longitud de onda al ser estimuladas por radiación de una longitud de onda diferente.

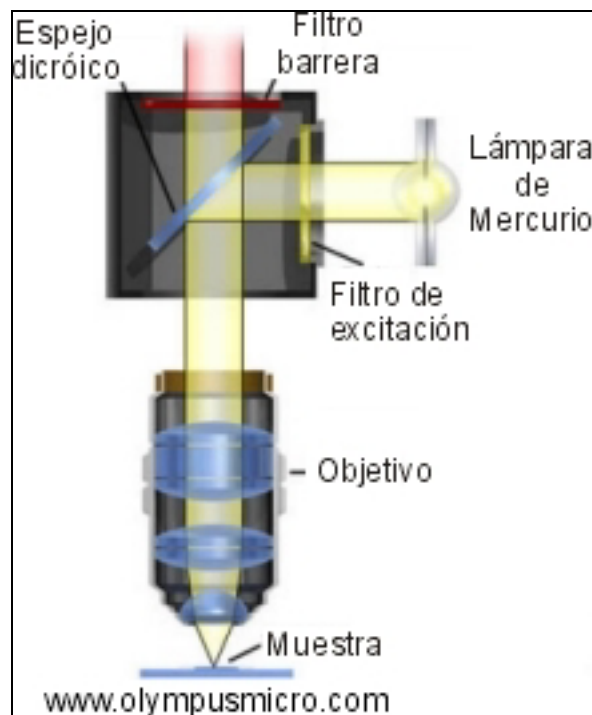


Figura 2. Representación del principio de la epi-iluminación en el funcionamiento del microscopio de epifluorescencia.

La fluorescencia se visualiza con la ayuda del microscopio de epifluorescencia en el cual luz llega al espécimen por encima, al contrario de un microscopio corriente (figura 2). Para el conteo rutinario de bacterias del agua se usan fluorocromos con afinidad para los ácidos nucleicos como la naranja de acridina (3,6-tetramethyl-diaminoacridina) y el DAPI (4'6-diamido-2-fenilindol) (Turley, 1993; Kepner & Pratt, 1994).

En el procedimiento un volumen de la muestra de agua teñida con el fluorocromo se filtra para concentrar las bacterias en una superficie que permita su conteo, por lo cual la eficiencia de este procedimiento fue potenciada con la aparición de los filtros de policarbonato con superficie plana y diámetro de poro preciso, que permitieron una selección más confiable del tamaño de las partículas retenidas y una mejor observación. Los comúnmente usadas son de 0,2 μm de diámetro de poro.

El análisis de imágenes. El análisis de imagen es la ciencia de realizar medidas densitométricas y geométricas de imágenes de cualquier tipo. Normalmente el recuento y medición de las células bacterianas es un trabajo realizado directamente por el observador, sin embargo no deja de ser un método dispendioso aligerado en gran medida gracias al desarrollo que desde los años cincuenta tuvo el análisis de imagen, permitiendo realizar esta labor de forma más eficiente y precisa (Sieracki *et al.*, 1985; Blackburn *et al.*, 1998). En el campo de la microbiología las técnicas de análisis de imagen se utilizan para mejorar la calidad de la imagen y determinar el número, forma y tamaño de las células, dicho proceso lo realiza mucho mejor el computador que el observador humano.

El procedimiento de automatización se logra cuando la imagen obtenida a través del microscopio es digitalizada mediante una cámara y un sistema de

archivo digital. Después la imagen es procesada buscando diferenciar los objetos del fondo, para luego ser transformada en una de dos tonos de gris, binaria, sobre la cual se analizan los parámetros y características de los objetos individuales. Se pueden realizar afinamiento y diferentes pasos de transformación, lo cual le confiere al método ventajas como sensibilidad, especificidad e información adicional sobre una gran variedad de parámetros morfométricos (Psenner, 1993; Blackburn *et al.*, 1998; Canosa, 2001). Además de obtener información sobre el largo, el ancho, la redondez y otras medidas de las bacterias, a través de fórmulas se puede calcular el biovolumen de células individuales en la muestra. En la actualidad el procedimiento más usado combina la técnica de epifluorescencia con el análisis de imagen automatizado.

Determinación de biomasa. Mediante técnicas como el análisis de imágenes se ha descubierto que la combinación de propiedades exhibidas por los procariontes acuáticos se traduce en cambios de biovolumen y biomasa que modelan y son modelados por las redes tróficas. Se han descrito varios procedimientos para determinar la biomasa, uno de los más habituales se usó para la realización de este trabajo, el cual aprovecha las mediciones del biovolumen de bacterias individuales, el método asume que existe una proporción entre la cantidad de carbono y el biovolumen de un organismo. En la tabla 1 se muestran los diferentes factores de conversión utilizados al momento, su uso depende de particularidades propias de cada experimento como la técnica utilizada para determinar la cantidad de carbono, los organismos evaluados e incluso las condiciones de crecimiento. El conteo directo por epifluorescencia, la determinación de las dimensiones bacterianas con análisis de imágenes y finalmente el cálculo del contenido de carbono, integran el procedimiento que constituye actualmente una herramienta básica en ecología microbiana acuática que, sin embargo, requiere seleccionar el fluorocromo y el

factor de conversión más apropiado si se pretende obtener datos confiables y comparables (Posch *et al.*, 2001).

Tabla 1. Modelos propuestos en los cuales se relaciona biomasa y biovolumen. (Norland, 1993; Fukuda *et al.*, 1998; Posch *et al.*, 2001)

| Modelo | Características |
|----------------------|--|
| Proporción constante | La relación entre biomasa y biovolumen no depende del tamaño. Factor de conversión muy general. $m = CV$ |
| Biomasa constante | Opuesto al de proporción constante, no hay relación biomasa-biovolumen. Apropiado para relacionar número de células con biomasa. $20 \text{ fg C célula}^{-1}$.** $m = C$ |
| Alométrico | La proporción peso/volumen depende del tamaño (mayor proporción p/v en bacterias pequeñas). Se debe tener en cuenta el tamaño de las bacterias que están siendo evaluadas al aplicar los factores elegidos. $m = CV^a$ |

m: biomasa; **C:** factor de conversión; **V:** volumen; **a:** factor de escala

** : valor de carbono por célula comúnmente utilizado, aunque hay datos que van de 2.45 a 260 fg C célula⁻¹

Los modelos propuestos y diferentes factores de conversión representan la relación empírica entre biomasa y biovolumen, la cual ha permitido definir al carbono como componente de aproximadamente el 50% del peso seco de las bacterias, esto quiere decir que la proporción carbono/biovolumen no debe superar los $0,5 \text{ pg C } \mu\text{m}^{-3}$, no obstante es suficiente para que el bacterioplancton constituya entre el 5 y el 70 % del carbono orgánico presente en la zona fótica marina (Moriarty, 1979; Lee, 1993; Norland, 1993; Wilhelm & Suttle, 1999).

METODOLOGÍA

Área de muestreo

La Bahía de Gaira se encuentra en el sector de Santa Marta (Magdalena) en el Caribe colombiano (figura 3). Las características ambientales de este sector han sido descritas en numerosos estudios en los que se reconoce el efecto de las estrabaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta y de las condiciones hidrológicas de la región durante el ciclo anual (Blanco, 1988; Ramírez, 1990; Díaz *et al.*, 1991; Franco, 2005).

A continuación se describen de manera breve los efectos del ciclo climático en la zona de la Bahía. El primero hace referencia a una relativa estratificación de la columna de agua durante la mayor parte de la época lluviosa de mayo a noviembre, lo que conlleva a un agotamiento de los nutrientes inorgánicos, particularmente nitritos y nitratos; el segundo factor se refiere a la influencia de los fuertes vientos alisios regionales de diciembre hasta abril, durante la época seca que generan una pequeña surgencia de aguas sub-superficiales en el sector de Santa Marta.

Los vientos también conducen a la homogenización de la columna de agua y si bien se manifiestan en toda la región, la intensidad y duración de sus efectos a nivel climático y oceanográfico se hacen mayores en el tramo norte de la costa Caribe colombiana y van decreciendo en dirección sur (Invemar, 2003; Franco, 2005).

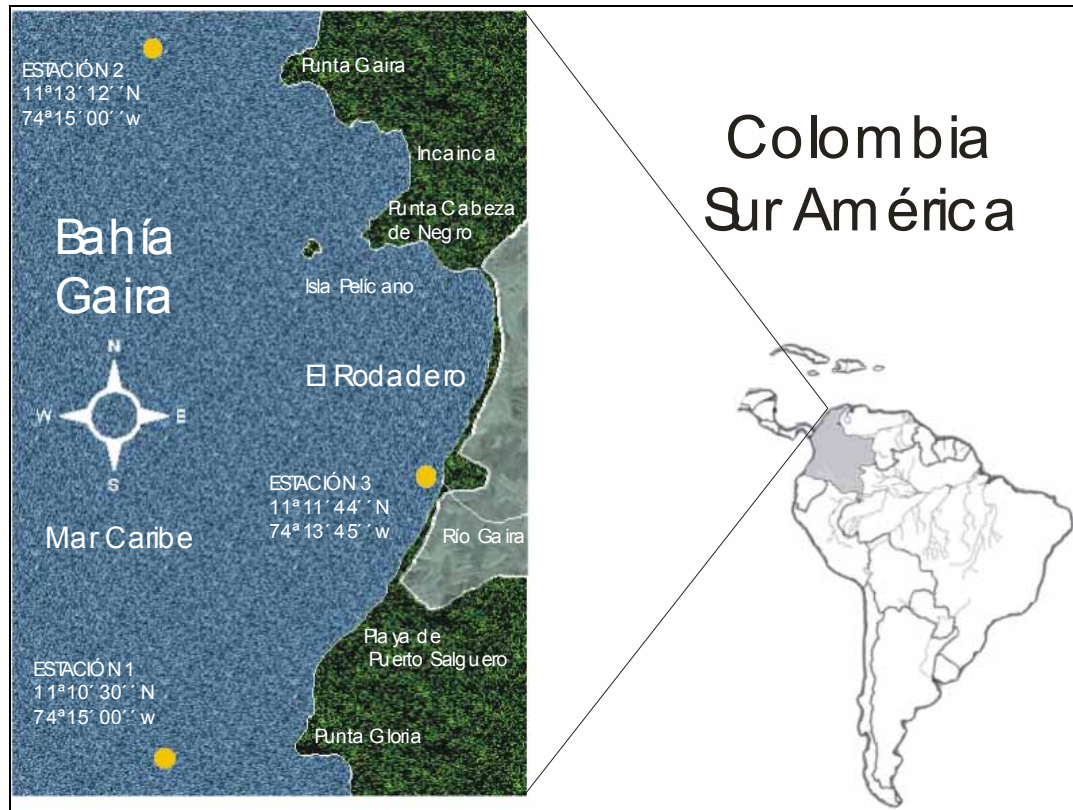


Figura 3. Mapa de la Bahía de Gaira. Los puntos amarillos muestran la posición de las estaciones de muestreo. Modificado de Plancha COL244, Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas Agustín Codazzi-CIOH.

Estaciones de muestreo. Para la realización del estudio se seleccionaron tres estaciones de muestreo intentando abarcar la totalidad de la Bahía de Gaira, desde Punta Gloria al sur hasta Punta Gaira al norte (figura 3). Las estaciones uno y dos, se localizaron sobre una línea paralela a la línea de costa que coincidió con el meridiano $74^{\circ} 15' 00''$ Oeste, después de la isobata de 50 m tratando de incluir en el muestreo toda la capa de mezcla. La estación tres fue ubicada frente a la desembocadura del río Gaira.

Fase de Campo

Se realizaron siete salidas de campo de manera simultánea con las programadas en la asignatura Proyecto de Investigación II, del programa académico de décimo semestre de la facultad de Biología Marina en la sede de Santa Marta. El periodo de muestreo estuvo comprendido entre agosto de 2003 y octubre de 2004. Se contó con el apoyo logístico y científico del Profesor Andrés Franco Herrera, director de la línea de investigación en Oceanografía de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. El desplazamiento hasta las estaciones y su ubicación se efectuó en lancha y con un sistema de posicionamiento global (GPS) facilitados por la misma Universidad.

En el lugar del muestreo se llenó un formato con datos tales como fecha y hora del muestreo, dirección de la corriente, procedencia del viento, nubosidad, profundidad a la cual desaparece el disco Secchi, color del agua y temperatura (Anexo A). El coeficiente de extinción de luz (k) se determinó con la ecuación: $k = 1.45/d$, en la que d es la máxima profundidad en metros a la que el disco Secchi es visible, y 1.45 es una constante (Tait, 1987). Con el valor obtenido para cada periodo climático se realizó el perfil de extinción de la luz.

Las muestras de agua superficial se tomaron en las tres estaciones a una profundidad de 0,5 m. En las estaciones uno y dos se tomaron además muestras a 42 m con botella Van Dorn de 6 l de capacidad, la temperatura del agua se midió una vez la botella muestreadora fue izada abordo con un termómetro de mano. En cada caso se recogieron aproximadamente 200 ml en frasco estéril oscurecido que se mantuvo bajo refrigeración con hielo. Cada muestra se tomó con duplicados.

Fase de Laboratorio

Manejo de las muestras. Los frascos con las muestras se transportaron refrigerados con hielo y en oscuridad al laboratorio ubicado en las instalaciones de la Universidad en El Rodadero. Siguiendo técnicas asépticas se fijaron las muestras con glutaraldehído buferado (GTA-B) prefiltrado hasta una concentración final de 2.5 %, este reactivo fue preparado un día antes del muestreo. Las muestras preservadas se mantuvieron refrigeradas a 4 °C en la oscuridad hasta su análisis.

Procesamiento de las muestras. Conteo total de bacterias. Las muestras fueron analizadas en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología en Bogotá. Se siguió el la técnica directa de epifluorescencia con el protocolo estandarizado y utilizado de rutina en el laboratorio (Canosa, 2001). Se empleó como fluorocromo la naranja de acridina (AO) a una concentración final de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El tiempo de exposición de la muestra con el fluorocromo fue de 5 minutos. Se filtró un volumen de muestra teñida utilizando un equipo de filtración y bomba de vacío, la presión máxima de filtración fue de 100 mm de Hg. Se usaron filtros GTTP Nucleopore negros de policarbonato de 0,2 μm de diámetro de poro. Para el montaje del filtro con la muestra se utilizó aceite de baja fluorescencia, las láminas debidamente marcadas se almacenaron congeladas (-20 °C) hasta el momento del análisis. Las láminas se observaron en un Microscopio de epifluorescencia Olympus B Max 60 con un filtro de excitación en la banda del azul (BP 450-480), filtro barrera (BA515) y un espejo dicroico (DM500). Algunos recuentos se obtuvieron de manera directa en tanto que otros se lograron con el sistema de análisis de imagen.

Análisis de imagen. La ventaja de los filtros preparados como se mencionó es que permiten además del conteo (número de bacterias) obtener información de

características morfológicas mediante un sistema de análisis de imagen. Para ello se adaptó al microscopio de epifluorescencia una cámara monocromática CCD de Cohu, Inc., que se conectó a un equipo de análisis de imagen conformado por computadora (Leica Imaging Systems), Monitor (Leica) y el programa Leica QWIN en ambiente Microsoft Windows 95.

A partir de los filtros se obtuvieron imágenes de varios campos tomados al azar recorriendo el mayor área posible y evitando los extremos. Cuando aparecieron partículas opacas, grumos o zonas muy brillantes, se descartaron los campos puesto que las bacterias en estas circunstancias no se pueden medir y contar correctamente. Se registraron sólo aquellas partículas con características claramente bacterianas teniendo en cuenta tamaño, forma, agrupación y color (naranja, rojizo y verde brillante).

Para obtener la información de largo, ancho, redondez, elongación y el biovolumen, se utilizó un QUIPS (Quantitative Interactive Programming System) en otras palabras una rutina de trabajo diseñada durante el desarrollo del proyecto (Anexo B). Para la determinación de biovolumen se midieron alrededor de 200 células por filtro. El programa utilizado no contemplaba una fórmula para el biovolumen bacteriano por lo que se utilizó la propuesta por Lee (1993) que asume que las células bacterianas son cilindros con extremos redondeados:

$$V = \pi ((3L-W)/3)(W/2)^2$$

Donde, (V) volumen; (L) longitud; (W) ancho.

Para calcular la biomasa bacteriana se utilizó el número de células ml^{-1} , el biovolumen de cada célula, y un factor de conversión que corresponde al modelo alométrico recomendado por Posch *et al.* (2001) denominado A1 en la tabla 2, adicionalmente se aplicaron otros modelos (tabla 2) y se compararon

los resultados obtenidos con el fin de ratificar la confiabilidad del factor en el que se basó la discusión.

Tabla 2. Factores de conversión utilizados para el cálculo de la biomasa bacteriana en muestras de agua de la Bahía de Gaira. Se utilizó A1 para la determinación de biomasa en este estudio.

| Factor | Referencia |
|---|---|
| A1 $120 \times v^{0,72}$ | Norland, 1993 |
| A2 $218 \times v^{0,86}$ | Loferer- Krossbacher <i>et al.</i> , 1998 |
| V1 $28 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ | |
| V2 $725 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ | |
| A3 $89,9 \times v^{0,59}$ | Simon & Azam, 1989 |
| C1 20 fg C cel^{-1} | Lee & Fuhrman, 1987 |

A: modelos alométricos; **V:** Modelos de proporción constante; **C:** Modelos de biomasa constante; **v:** biovolumen

Limitaciones del análisis de imagen. La variación en las determinaciones de abundancia, biomasa y forma causada por el uso de diferentes metodologías es un tema que ha sido abordado por varios autores (Fukuda *et al.*, 1998; Loferer-Krossbacher *et al.*, 1998; Zubkov *et al.*, 1999; Posch *et al.*, 2001; La Ferla *et al.*, 2004; Vrede *et al.*, 2002). La estimación de la biomasa mediante la técnica de análisis de imagen depende de la obtención de datos de biovolumen y del factor de conversión utilizado en el cálculo (Ducklow, 2000; Blackburn *et al.*, 1998; Sieracki *et al.*, 1985). A pesar de sus limitaciones, esta estimación es un recurso utilizado de rutina en muchos laboratorios ya que las mediciones realizadas aplicando una técnica estandarizada están sometidas al mismo error,

que en este caso se introduce al estimar el biovolumen a partir de medidas lineales de largo y ancho celular (Lee, 1993).

En el proceso de determinar la biomasa bacteriana además, es necesario elegir una constante de conversión adecuada. Hay varios factores calculados empíricamente mediante el uso de métodos que difieren tanto en las comunidades evaluadas como en sus condiciones de crecimiento, lo cual implica que no es correcto utilizar un único factor en todas las situaciones (Posch *et al.* 2001). La estimación directa de la biomasa celular podría ser una opción, sin embargo los métodos empleados presentan condiciones igualmente variables en las determinaciones y son además costosos. Consecuentemente, la solución más razonable es buscar un factor apropiado para el método de medición utilizado. Posch *et al.* (2001) proponen que para recuentos por epifluorescencia con análisis de imágenes, el criterio de selección debe ser el fluorocromo. En síntesis, al usar un procedimiento estandarizado, como el utilizado en este trabajo, los datos obtenidos son lo suficientemente confiables como para basar el análisis de las variables estudiadas en ellos.

Indicadores morfométricos. Además de la información referente a la densidad, biovolumen y biomasa del bacterioplancton, se pretendió obtener evidencia de la diversidad morfológica. Para ello se utilizaron los datos de redondez y de biovolumen como lo proponen Psenner & Sommaruga (1992).

Fase de gabinete

Con los datos de densidad, biovolumen y biomasa bacteriana se construyeron matrices, gráficas y tablas en el programa Microsoft Excel. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1. Se utilizaron pruebas no paramétricas así: Mann-Whitney para comparar entre

periodos climáticos por estación y profundidad, Kruskal-Wallis para comparar entre estaciones y Wilcoxon para comparar entre profundidades dentro de cada periodo climático.

RESULTADOS

Temperatura y coeficiente de extinción de la luz

Los valores de temperatura y el coeficiente de extinción de la luz cambiaron de acuerdo con las épocas climáticas. La temperatura osciló entre 25 °C y 28 °C, con aguas más cálidas en la época lluviosa con respecto a la seca. Se presentó una leve estratificación térmica durante el periodo de lluvias, mientras que en la época seca (diciembre-abril) se observó una columna de agua relativamente homogénea (figura 4). La temperatura más alta registrada en este trabajo se encontró en la desembocadura del río Gaira.

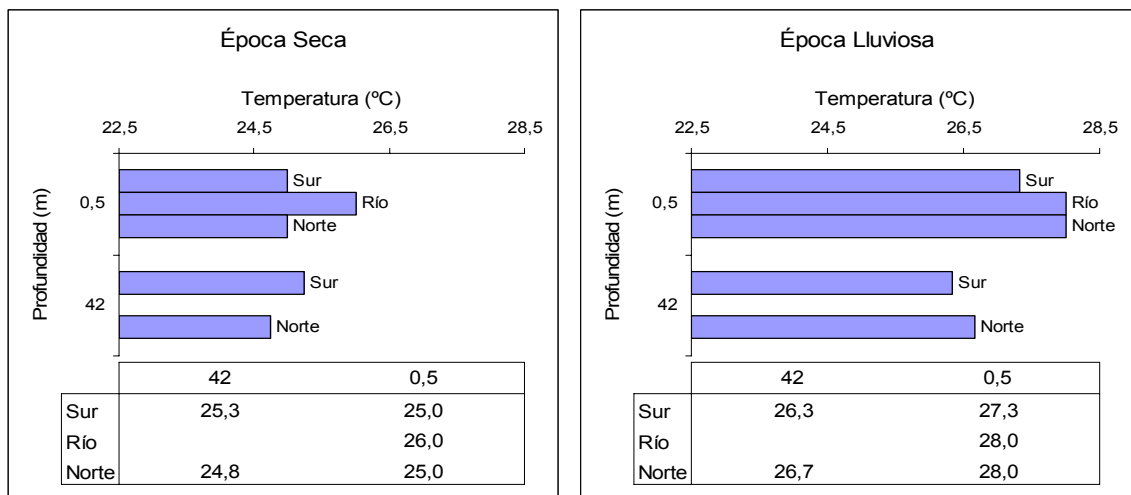


Figura 4. Variación vertical y horizontal de la temperatura discriminada en épocas climáticas. Sur: Punta Gloria; Río: río Gaira; Norte: Punta Gaira.

El coeficiente de extinción de luz (k) presentó valores que oscilaron entre 0,16 m^{-1} y 0,48 m^{-1} dependiendo de la época climática. La estación norte, presentó los valores más bajos, que se traducen en una zona eufótica más amplia. Se

observó una mayor variación temporal de la estación norte con respecto a la sur (tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio del coeficiente de extinción de la luz para las estaciones sur y norte durante el período de muestreo.

| | Seca | Lluviosa | |
|-------|------|----------|------------------|
| Sur | 0,28 | 0,48 | $K (m^{-1})$ |
| | 5 | 3 | Disco Secchi (m) |
| Norte | 0,16 | 0,29 | $K (m^{-1})$ |
| | 9 | 5 | Disco Secchi (m) |

El perfil vertical de extinción de la luz para cada época climática mostró que la profundidad máxima de la zona eufótica, a la cual llega el 1% de la radiación solar en superficie, obtenida al promediar los valores para las estaciones norte y sur fue de 21 m para la época seca, y de 12 m para el periodo lluvioso (figura 5).

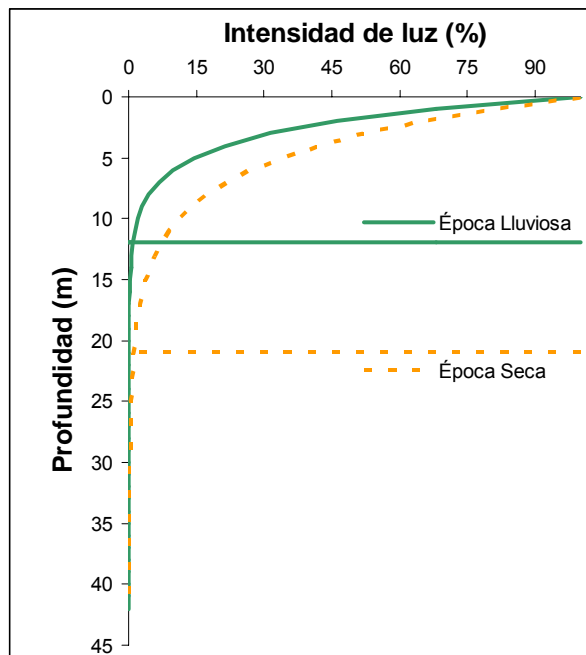


Figura 5. Perfil de extinción de luz en la columna de agua, discriminando entre periodos climáticos durante el período de muestreo. Se indica la profundidad de la capa fótica.

Densidad bacteriana

Los recuentos de las células procariotas en la Bahía de Gaira variaron entre $6,7 \times 10^4$ cél. ml^{-1} y $2,9 \times 10^6$ cél. ml^{-1} . Los valores más altos se observaron en la superficie, con un amplio rango de variación durante la época de lluvias. En general, las densidades fueron mayores en la época lluviosa con respecto a la seca (tabla 4). La diferencia entre épocas climáticas fue significativa para todas las estaciones (Mann-Whitney; $p < 0,05$).

Tabla 4. Densidad promedio, mínima y máxima de bacterias en la Bahía de Gaira discriminando épocas climáticas y profundidades. Incluye el rango de variación de los datos en cada caso.

| | | Época Seca | Época Lluviosa |
|-------------|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Profundidad | | Células $\text{ml}^{-1} \times 10^4$ | Células $\text{ml}^{-1} \times 10^4$ |
| 0,5 m | Promedio | 17,9 | 91,0 |
| | Mín-Máx | 6,7- 38,6 | 12,9 - 286,9 |
| 42 m | Promedio | 14,8 | 26,7 |
| | Mín-Máx | 8,8 - 28,0 | 13,1 - 91,5 |

En la figura 6 se muestra la variación vertical y horizontal en la densidad bacteriana para cada periodo climático. Los datos registrados en la época seca fueron muy similares en estas dos escalas, no obstante, la estación norte presentó menos bacterias con respecto a las otras dos estaciones (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$). Las diferencias entre profundidades no fueron significativas (Wilcoxon; $p > 0,05$).

Por otra parte, en la época de lluvias se observó un cambio importante en la densidad bacteriana entre la superficie y el fondo (Wilcoxon; $p < 0,05$); esta disparidad fue de casi 4 veces más células en la primera con respecto a la segunda. Horizontalmente, se observó una menor cantidad de bacterias en la desembocadura del río Gaira en comparación con las estaciones más alejadas

de la costa; sin embargo las diferencias no fueron significativas (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$). Se observó un aumento en la variación de los valores de densidad bacteriana en esta época climática con respecto al periodo seco, particularmente en la zona superficial (figura 6).

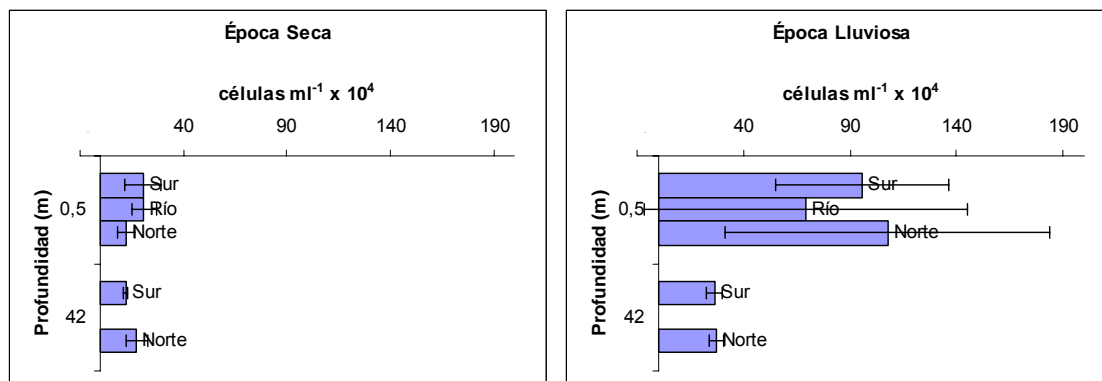


Figura 6. Variación vertical y horizontal de la densidad bacteriana de acuerdo a los períodos climáticos. Las barras de error representan la desviación estándar y corresponden a la variación entre meses.

Sur: Punta Gloria; Río: desembocadura río Gaira; Norte: Punta Gaira.

Biovolumen bacteriano

Tabla 5. Valores promedio de biovolumen bacteriano en la Bahía de Gaira discriminando entre épocas climáticas y profundidades.

| Profundidad | | Época Seca | Época Lluviosa |
|-------------|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | | $\mu\text{m}^3 \cdot \text{cel}^{-1}$ | $\mu\text{m}^3 \cdot \text{cel}^{-1}$ |
| 0,5 m | Promedio | 0,015 | 0,026 |
| | Mín-Máx | 0,002 - 0,418 | 0,001 - 48,659 |
| 42 m | Promedio | 0,037 | 0,034 |
| | Mín-Máx | 0,002 - 1,622 | 0,001 - 4,102 |

El biovolumen promedio osciló entre $0,015 \mu\text{m}^3$ y $0,04 \mu\text{m}^3$ (tabla 5), sin embargo se registraron morfologías filamentosas que alcanzaron los $48,6 \mu\text{m}^3$. La variación temporal encontrada con los recuentos solamente se evidenció, en

el caso del biovolumen, en las muestras tomadas en la superficie, en donde se presentaron las células más grandes para la época lluviosa sin embargo esas diferencias no fueron significativas (Mann-Whitney; $p > 0,05$).

El valor promedio de biovolumen permaneció constante a los 42 m. Las células presentes a mayor profundidad fueron siempre más grandes comparadas con las de la superficie, estas diferencias no fueron significativas (Mann-Whitney; $p > 0,05$). También la variación en el biovolumen fue mayor en la época lluviosa con respecto a la seca, pero en la estación sur, en el periodo de lluvias, el tamaño fue constante independiente a la profundidad, mientras que en la norte se presentaron células más grandes a 42 m (figura 7). Las diferencias entre estaciones no fueron significativas (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$).

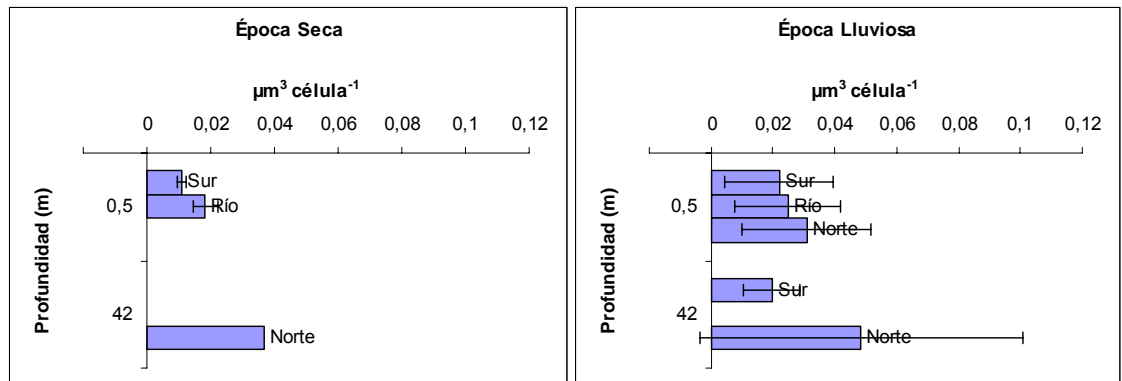


Figura 7. Variación vertical y horizontal de biovolumen bacteriano ($\mu\text{m}^3 \cdot \text{cél}^{-1}$) encontrado en la Bahía de Gaira discriminado por época climática.

Sur: Punta Gloria; Río: desembocadura río Gaira; Norte: Punta Gaira.

Biomasa bacteriana

Al utilizar distintos factores de conversión asumiendo diferentes relaciones entre la cantidad de carbono y el biovolumen o la densidad bacteriana se obtuvo un espectro de variación en los promedios que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Diferentes valores de biomasa bacteriana ($\mu\text{g C. l}^{-1}$) obtenidos con factores de conversión propuestos por varios autores.

| Factor | Promedio | Mín | Máx | Referencia |
|--|----------|------|-------|--|
| A1: $120 \times v^{0,72}$ | 7,29 | 0,88 | 32,07 | Norland, 1993 |
| A2: $218 \times v^{0,86}$ | 8,18 | 0,84 | 36,72 | |
| V1: $128 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ | 2,99 | 0,26 | 13,59 | Loferer-Krossbacher <i>et al.</i> , 1998 |
| V2: $725 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ | 16,93 | 1,47 | 76,97 | |
| A3: $89,9 \times v^{0,59}$ | 8,61 | 1,20 | 36,88 | Simon & Azam, 1989 |
| C1: 20 fg C cel^{-1} | 16,75 | 1,35 | 57,38 | Lee & Fuhrman, 1987 |

A1: Usado en este trabajo; **A:** factor alométrico; **V:** factor de proporción constante; **C:** factor de biomasa constante.

Los valores obtenidos con los factores que asumen una relación alométrica entre volumen y biomasa (A1, A2 y A3) permanecieron dentro de los límites de aceptación definidos al promediar los datos obtenidos con todos los factores (figura 8).

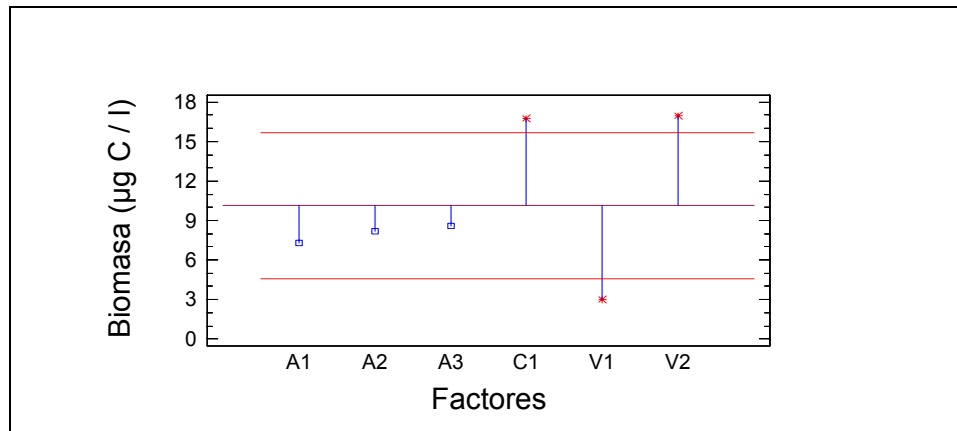


Figura 8. Valor de biomasa bacteriana (línea central) obtenido al promediar los datos resultantes de aplicar los diferentes modelos. Las líneas rojas señalan los límites de confianza

Los valores más extremos resultaron al aplicar el modelo que asume un contenido constante de carbono por célula (C1) y al aplicar una constante conservativa que asume un contenido constante de carbono por unidad de

volumen (V1), con C1 se obtuvieron los valores más altos de biomasa y con V1 los más bajos.

En este trabajo se usaron para la discusión los datos obtenidos con el modelo alométrico propuesto por Norland (1993) y Posch *et al.* (2001). Los datos registrados mostraron que la cantidad de carbono bacteriano aumentó de la época seca a la lluviosa, de 0,9 $\mu\text{g C l}^{-1}$ a 32,1 $\mu\text{g C l}^{-1}$ (Mann-Whitney; $p < 0,05$). El valor promedio más alto en la época seca se presentó a 42 m de profundidad, mientras que en la lluviosa los mayores valores de biomasa se registraron en la superficie (tabla 7). Las diferencias entre profundidades en las dos épocas fueron significativas (Mann-Whitney; $p < 0,05$).

Tabla 7. Valores promedio de biomasa bacteriana total discriminando entre épocas climáticas y profundidades incluyendo el rango de variación en cada caso.

| Profundidad | | Época Seca | Época Lluviosa |
|-------------|----------|------------------------|------------------------|
| | | $\mu\text{g C l}^{-1}$ | $\mu\text{g C l}^{-1}$ |
| 0,5 m | Promedio | 1,4 | 12,7 |
| | Mín-Máx | 0,9 - 1,7 | 2,3 - 32,1 |
| 42 m | Promedio | 3,1 | 4,5 |
| | Mín-Máx | 0,2 - 3,1 | 1,7 - 8,8 |

Aunque no hubo diferencias significativas entre los valores promedio de biomasa en los tres sitios de muestreo, se observó una mayor variación en la época lluviosa con respecto a la seca. La estación frente al río Gaira presentó los mayores valores de biomasa (figura 9).

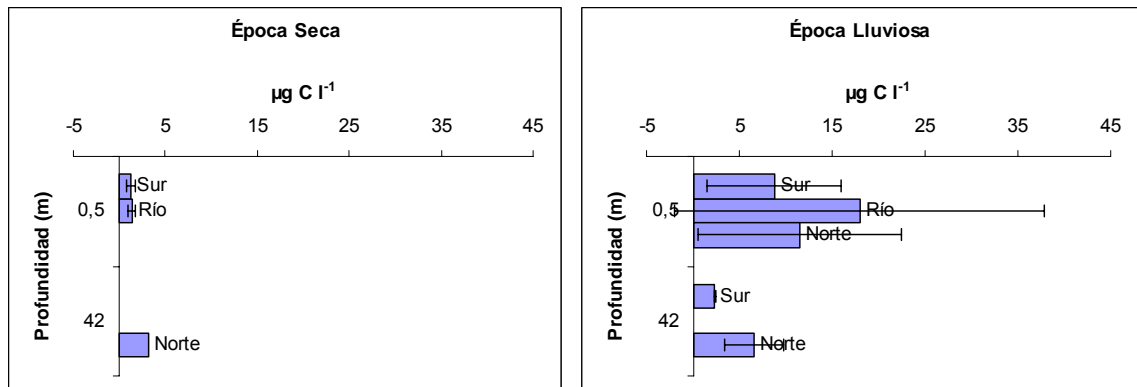


Figura 9. Variación vertical y horizontal de biomasa como cantidad de carbono por litro ($\mu\text{g C l}^{-1}$) discriminando entre periodos climáticos.
 Sur: Punta Gloria; Río: desembocadura río Gaira; Norte: Punta Gaira.

El aumento en el contenido de carbono celular que se registró en la época lluviosa con respecto a la seca no fue significativo (Kruskal-Wallis; $p > 0,05$). Sin embargo, el contenido de carbono por célula mostró una mayor variación en la época lluviosa con respecto a la seca, particularmente a 42 m (figura 10).

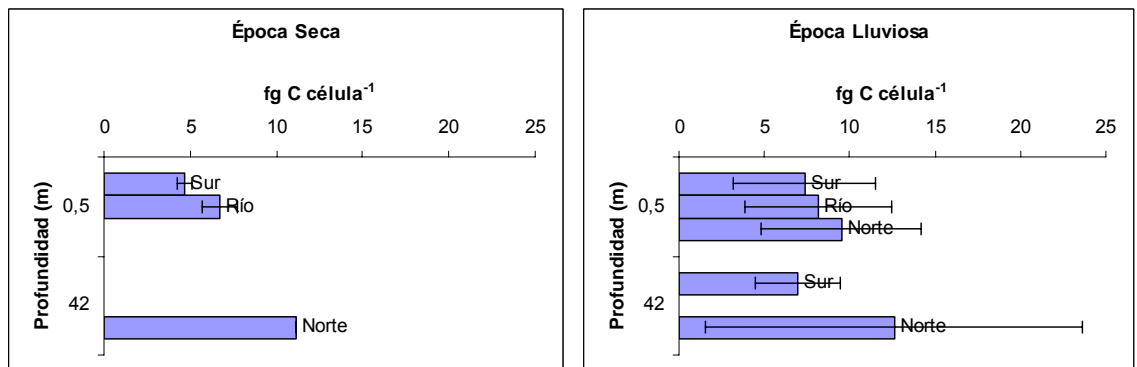


Figura 10. Variación vertical y horizontal de la cantidad de carbono por célula (fg C.célula^{-1}) discriminado por épocas climáticas.
 Sur: Punta Gloria; Río: desembocadura río Gaira; Norte: Punta Gaira.

Morfometría celular

Durante la época seca, el 40% de las bacterias medidas estuvieron entre 0,001 y 0,01 μm^3 y aproximadamente el 75% de las células tuvieron menos de 0,05 μm^3 (figura 11). Aunque fueron registradas células de hasta 48,7 μm^3 , únicamente el 5% fue mayor a 0,25 μm^3 . En la época de lluvias, la frecuencia de células con menos de 0,05 μm^3 fue similar (68%) y las más pequeñas (0,001-0,01 μm^3) representaron alrededor del 30% (figura 11). En esta época las células de más de 0,25 μm^3 fueron más importantes alcanzando valores hasta del 10%.

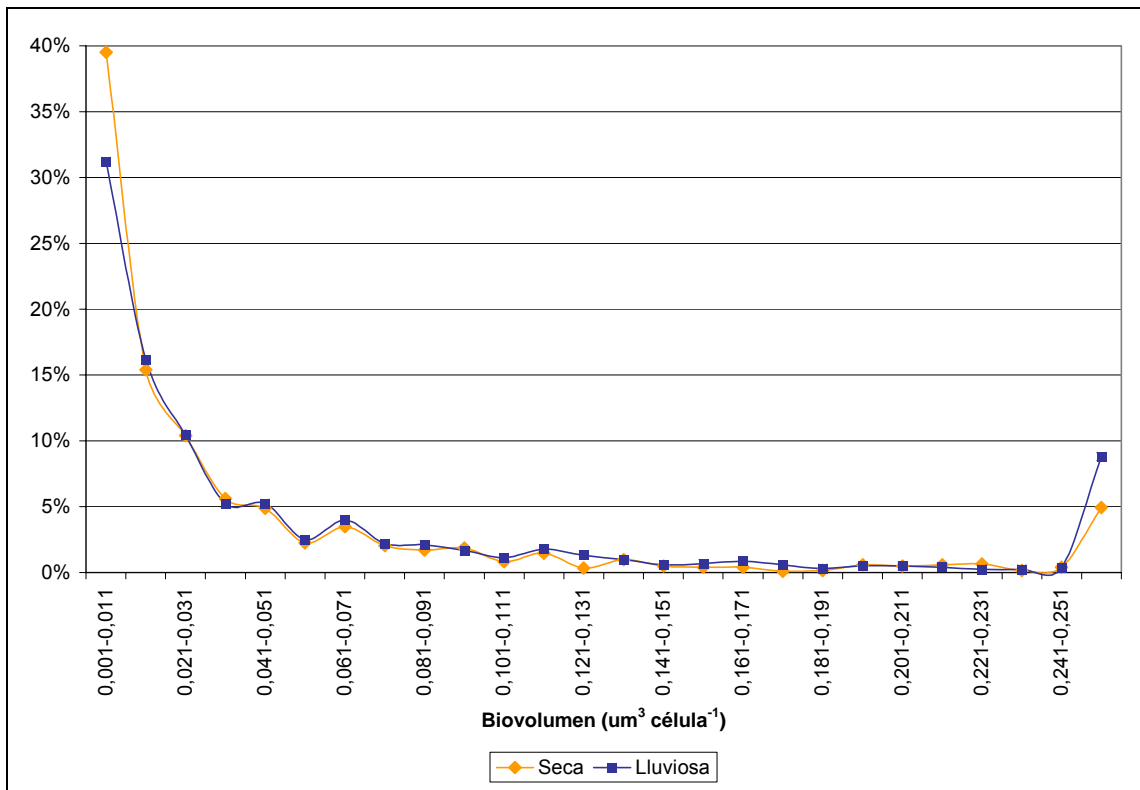


Figura 11. Frecuencia de tamaños bacterianos (μm^3) registrados durante los muestreos de época seca y de lluvias.

La redondez permaneció prácticamente invariable comparando los dos periodos climáticos. Aproximadamente el 60% de las células tuvieron una redondez de menos de 1,5 lo cual permite considerar que la mayoría fueron esféricas según Psenner & Sommaruga (1992), independientemente al periodo climático, la estación o la profundidad (figura 12).

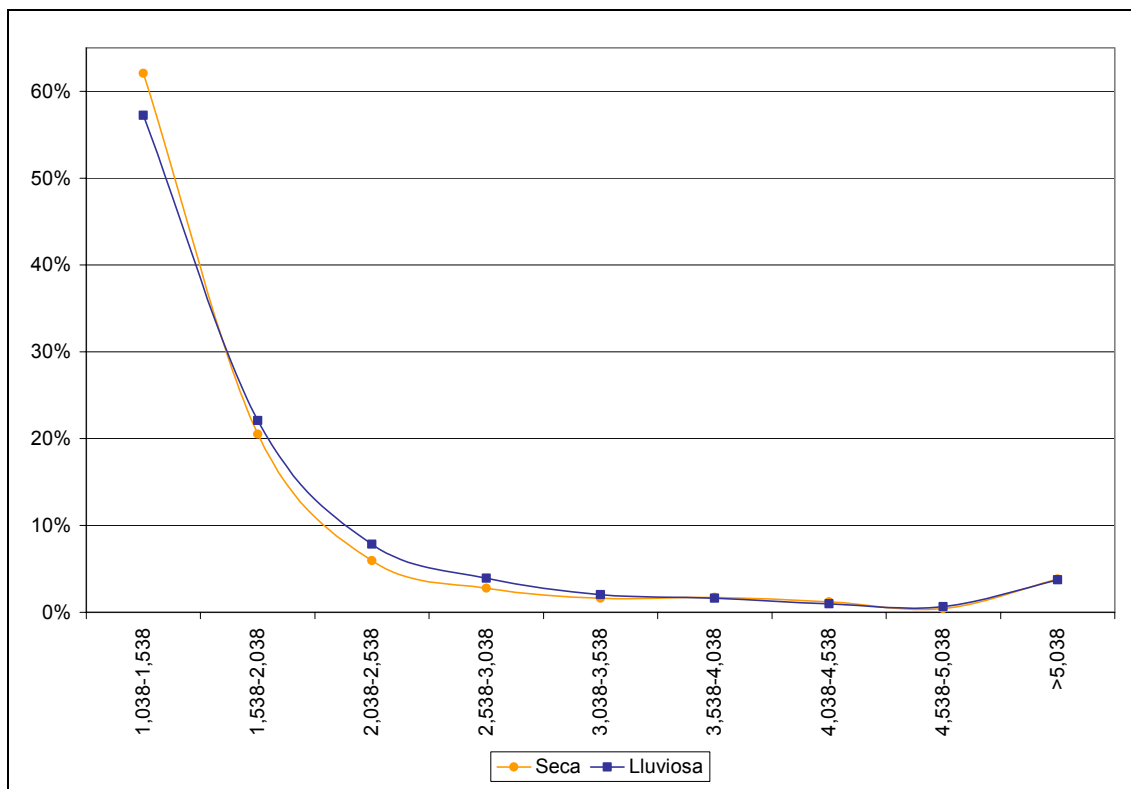


Figura 12. Frecuencia de intervalos de redondez registrados durante la época lluviosa (valores entre 1 y 1,5 son diagnósticos de células esféricas)

Aunque la mayoría de las células medidas para este trabajo mostraron forma y tamaño similares en las dos épocas del año, se observó una pequeña variación en la estructura morfológica del bacterioplancton cuando se graficaron los valores de redondez contra los de biovolumen celular. En la figura 13 se aprecia una tendencia al aumento de tamaño y elongación de las células, en la

dispersión de los puntos hacia la derecha y arriba. Lo anterior sugiere un aumento en la diversidad morfológica durante la época lluviosa.

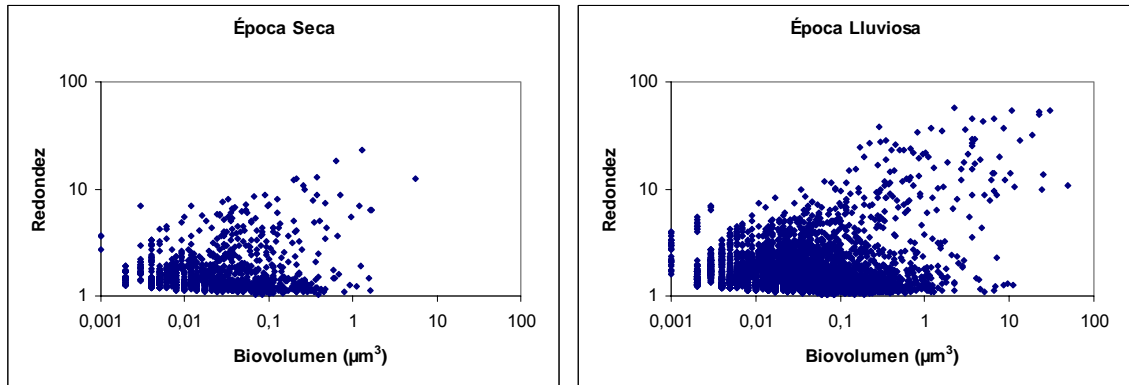


Figura 13. Gráficos de dispersión (escala logarítmica) de los valores de redondez y biovolumen celular en la época seca y en la época lluviosa.

DISCUSIÓN

Los datos de densidad bacteriana obtenidos en este trabajo, son similares a los reportados para otros sistemas marinos, incluso a los de zonas templadas para los cuales se cuenta con mayor información. Los valores encontrados en la Bahía de Gaira están dentro de los rangos reportados para diferentes ambientes que van desde completamente oligotróficos, como el Mar de los Sargazos (Ducklow, 1999), hasta hipereutróficos como la Ciénaga Grande de Santa Marta (Gocke *et al.*, 2004).

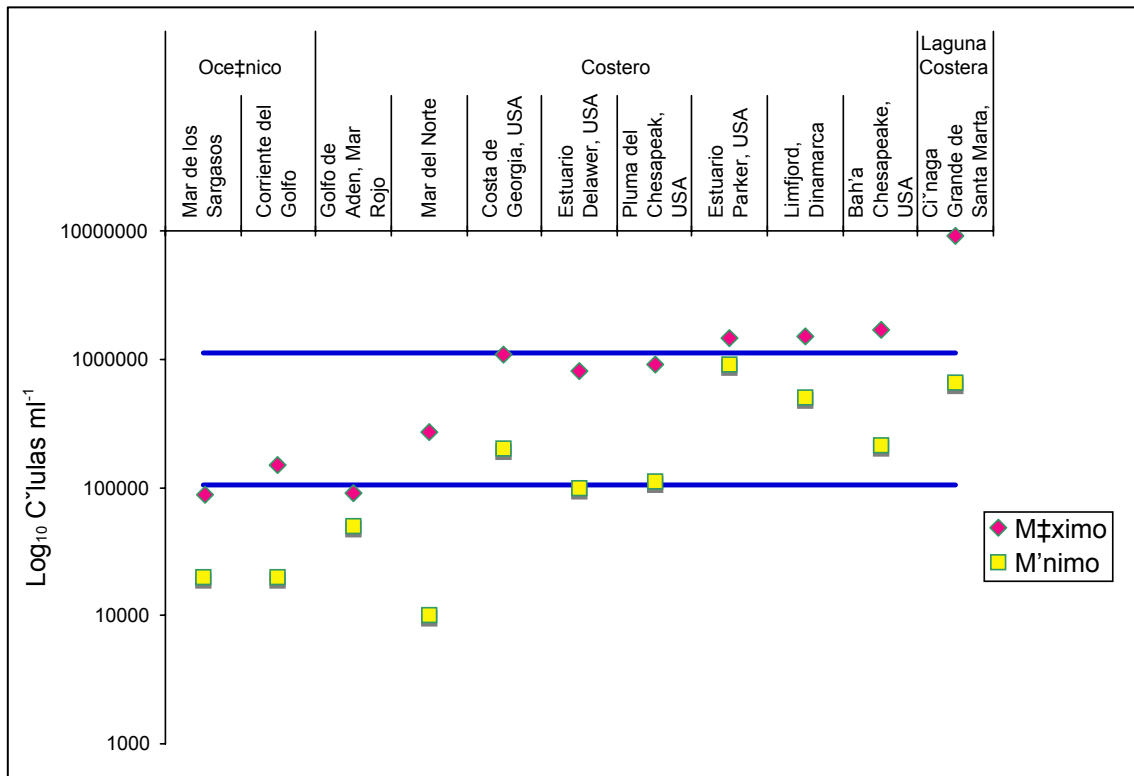


Figura 14. Rango de variación de las densidades bacterianas promedio reportados en la literatura. Las dos líneas horizontales representan los valores máximo y mínimo encontrados en el presente estudio. Los sistemas con los que se compara van de oligotróficos (izquierda) hasta hipereutrófico (derecha) (Sanders *et al.*, 1992; Shia & Ducklow, 1994; Gocke *et al.*, 2004).

Se puede afirmar entonces que la Bahía de Gaira presenta valores típicos de densidad bacteriana para zonas costeras; más altos que los de sistemas oceánicos oligotróficos y más bajos que los de estuarios muy productivos (figura 14). De acuerdo con los datos de densidad, es probable que las condiciones predominantes en la Bahía de Gaira correspondan a las de un sistema mesotrófico. Sin embargo, el análisis del contenido de carbono celular mostró que el promedio total estuvo entre los valores más bajos reportados para diferentes sistemas alrededor del mundo (tabla 8). Lo anterior implicaría la existencia de una limitación fuerte para la biosíntesis de la biomasa procariota en el ambiente estudiado, ya que bajas concentraciones de carbono celular sugieren ambientes con tendencia a la oligotrofia (figura 15).

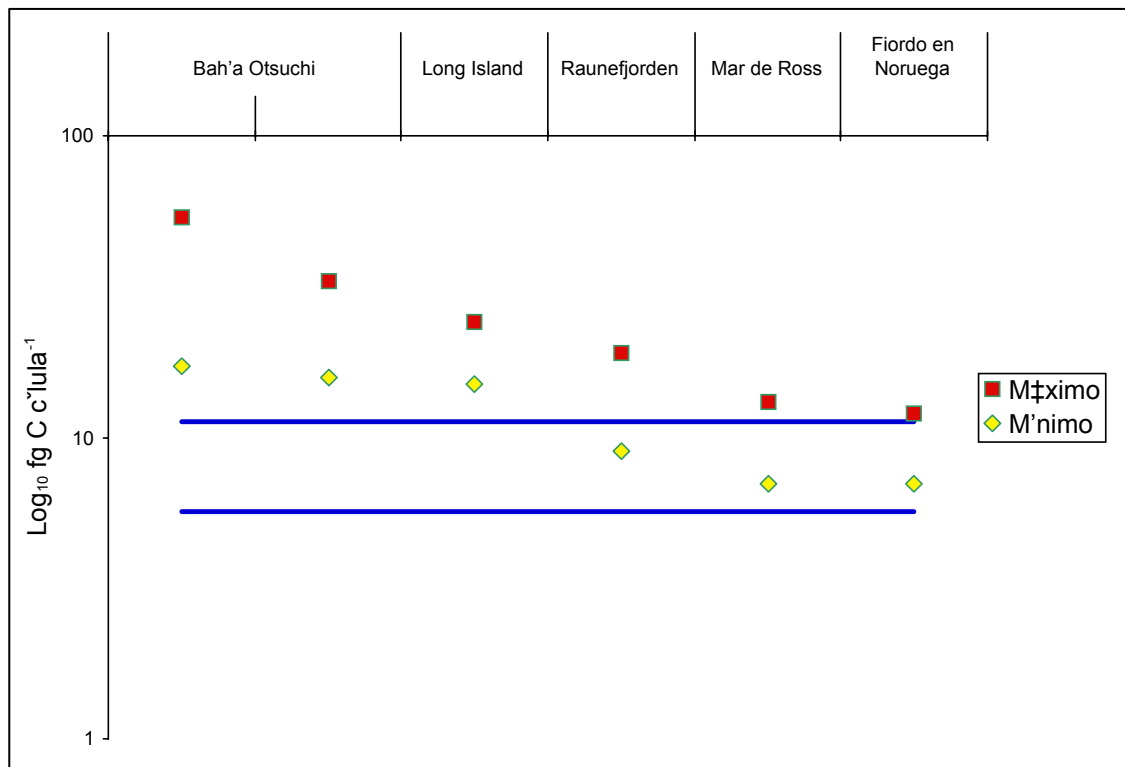


Figura 15. Representación del rango de variación promedio de contenido de carbono por célula registrado en este estudio (líneas continuas) comparado con los rangos reportados en la literatura (líneas punteadas).

La comparación de los valores de biomasa promedio, obtenidos con algunos de los diferentes factores propuestos en la literatura, permite asegurar que el modelo alométrico utilizado en este trabajo arroja valores confiables. Sin embargo no es correcto utilizar un único factor en todas las situaciones, al elegir uno en particular hay que tener en cuenta las condiciones en las cuales se calculó. En el caso de de este trabajo, para el recuento por epifluorescencia y análisis de imagen, el criterio de selección fue el fluorocromo.

El período climático implica la alternancia en la concentración y las fuentes de nutrientes resultantes de la escorrentía en la época lluviosa o a la surgencia en la época seca, tal variación fue evidenciada por los valores registrados de coeficiente de extinción de la luz. La variación temporal de la densidad de células obtenida sugiere un efecto importante de este ciclo climático sobre la dinámica de esta comunidad en la zona.

Tabla 8. Valores de biomasa reportados para diferentes sistemas indicando promedio, máximo (max) y mínimo (min).

| Sistema | Metodología | fgC. célula ⁻¹ | | |
|------------------------------|-------------|---------------------------|------------|-------------|
| | | Promedio | Min | Max |
| Raunefjorden | R-X | 9 - 19 | - | - |
| Bahía Otsuchi | CHN, CP | 17,3 -53,3 | - | - |
| Golfo de Méjico | CHN, MEF | 150 | - | - |
| Bahía Otsuchi | HTCO, MEF | 15,7 -33,1 | - | - |
| Bahía de Tokio | HTCO, MEF | 47,9 | - | - |
| Mar Mediterráneo | MEF | 19,19 | 1,4 | 240,3 |
| | LPS | 23,24 | 6,4 | 63 |
| Bahía Gaira, Colombia | MEF | 8,7 | 0,8 | 1967 |

R-X: microanálisis con rayos X; **CHN:** análisis del contenido de nitrógeno y carbono; **CP:** recuento de partículas; **MEF:** microscopía de epifluorescencia; **HTCO:** oxidación catalítica a alta temperatura; **LPS:** determinación de lipopolisacáridos.

Datos de: Fukuda *et al.*, 1998; La Ferla *et al.*, 2004.

Un modelador clave del ecosistema es el clima, en el caso de la Bahía de Gaira la variación hidro-climática es especialmente importante ya que podría conducir al cambio en las condiciones físicas y en los aportes de nutrientes. La cantidad y la proporción de los nutrientes disponibles en el ambiente y la capacidad de las células para asimilarlos generan cambios en la producción bacteriana (Church *et al.* 2000; La Ferla *et al.*, 2004; Koch, 1996; Psenner, 1993). Esto es particularmente cierto para los sistemas costeros que reciben periódicamente aportes de ríos que han lavado una cuenca considerable y por lo tanto tienen altas cargas de materiales en suspensión. El aumento de la abundancia y la biomasa bacteriana y el incremento en la turbidez del agua, detectada como un cambio en el coeficiente de extinción de la luz durante los meses de lluvia, sugieren que este podría ser el caso de la Bahía de Gaira. Un comportamiento similar fue reportado por Gocke *et al.* (2004) para la Ciénaga Grande de Santa Marta y Jochem (2001) para el Golfo de Méjico.

Es ampliamente aceptado que la comunidad bacteriana heterotrófica depende de la disponibilidad de sustratos orgánicos a tal punto que se convierten en un factor limitante llegando a ser uno de los mecanismos de control más importantes de la producción bacteriana (Shiah & Ducklow, 1994; Bratbak *et al.*, 1998; Thingstad, 2000; Psenner & Sommaruga, 1992; Cole *et al.*, 1982; Jochem, 2001; Eiler *et al.*, 2003; Simek *et al.*, 1997). Durante la época en la que se realizó este trabajo, se registró un aumento en la cantidad de clorofila *a* que coincidió con la llegada de las lluvias (Franco, 2005). Entonces, es razonable pensar que el incremento en la producción del fitoplancton y el aporte continental tanto de sustratos orgánicos como inorgánicos, durante el periodo lluvioso, conducirían a un incremento en la densidad de células y biomasa bacteriana.

El aumento coherente de la clorofila *a* y la densidad de células y biomasa total sugieren que existe un acople entre fitoplancton y bacterioplancton durante el periodo de lluvia en la Bahía de Gaira. Este acople podría ocurrir como consecuencia de la entrada de nutrientes inorgánicos provenientes del río Gaira y la Ciénaga Grande de Santa Marta que favorecería el desarrollo de la comunidad planctónica. Si este es el caso, se esperaría que en este sistema las células bacterianas asimilaran rápidamente los sustratos orgánicos disponibles, evitando así que los exudados de los productores primarios se pierdan. De esta forma se favorecería el reciclaje de materia en la columna de agua, a través del bucle microbiano, manteniéndola disponible para niveles tróficos superiores. Si este acople se diera, se presentaría dentro de la zona fótica, que durante el muestreo, en la época lluviosa abarcó el 25 % y en la seca el 50% de la columna de agua. Las células procariotas presentes por debajo de la profundidad definida por la zona fótica, dependerían entonces de la producción proveniente de la superficie. No se encontró evidencia suficiente para explicar por qué las células del fondo fueron en promedio más grandes durante todo el periodo de muestreo, el mayor tamaño podría indicar una respuesta de las bacterias a alguna variable no medida en es estudio.

Se ha documentado que los cambios en los aportes de nutrientes afectan también la estructura de tamaños de la comunidad bacteriana. Cuando los procariotas crecen en ambientes ricos, sin limitación por sustratos orgánicos, aparecen células grandes. Por otra parte, cuando las células están limitadas por carbono se presentan tamaños más pequeños y cuando es por nutrientes inorgánicos aparecen además formas elongadas (Fukuda *et al.*, 1998; Morita, 1993; Vrede *et al.* 2002). Lo expresado, apoyaría el hecho de que la dominancia de células bacterianas pequeñas en la bahía de Gaira es

consecuencia de una limitación por sustratos orgánicos, confirmada por el predominio de células esféricas durante todo el periodo de muestreo.

Aunque los datos obtenidos apoyan la idea de que los nutrientes tienen un efecto importante sobre la abundancia, biomasa y tamaño de las células del bacterioplancton en la bahía de Gaira, es necesario mencionar que la predación también puede ser un mecanismo de control clave en la distribución de tamaños y biomasa de la comunidad bacteriana. Cuando el control por predación es más importante que la disponibilidad del sustrato, las bacterias lo compensan haciéndose más activas, pequeñas y numerosas (Psenner & Sommaruga, 1992) lo anterior coincide con algunos de los resultados encontrados, especialmente en lo referente con la distribución de tamaños. Sin embargo, el control por disponibilidad de sustratos y por predación, actúan en forma conjunta modelando la estructura de tamaños de la comunidad bacteriana lo que hace difícil concluir satisfactoriamente sin tener estimados directos de estas variables. En consecuencia para evaluar si la comunidad procariota está siendo controlada por predadores protistas se debe plantear un diseño experimental que permita ver su efecto sobre la producción bacteriana, teniendo en cuenta no solamente tamaño y forma, sino también otras propiedades de los procariotas planctónicos que los hacen más o menos apetecidos por los predadores (Matz, & Jurgens, 2001; Pernthaler *et al.*, 1997; Simek *et al.*, 1997).

Los datos de biovolumen obtenidos podrían indicar cuál sería el mecanismo de control de la comunidad bacteriana en la Bahía de Gaira. Se sabe que el proceso de predación transforma la estructura de tamaños de la comunidad al ser consumidas las tallas objetivo de los predadores, mientras que las células pequeñas y las formas filamentosas de más de 3 μm de largo escapan a los predadores (Hahn & Höfle, 1999; Jürgens *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004; Simek *et al.*, 2001). La mayoría de las bacterias medidas en este trabajo fueron menores

a 0,25 μm de largo tanto en la época seca como la lluviosa. Lo anterior sugiere que las bacterias deben mantener una relación superficie:volumen grande para competir en un medio pobre en sustancias nutritivas, lo que refuerza la importancia de la limitación por sustratos en la Bahía.

Los estudios que intentan explicar el efecto de muchas variables sobre el bacterioplancton muestran que la comunidad es afectada no solo por la predación sino por la lisis viral (Malits *et al.*, 2004). Los cambios en densidad y tamaño pueden verse o no reflejados en la variación de la biomasa, dependiendo de si se logra establecer un balance entre la producción bacteriana y las tasas de predación y lisis viral; en cualquier caso, además de afectar las variables evaluadas, la interacción entre la disponibilidad de sustratos, la lisis viral y la bacteriovoria pueden finalmente tener un efecto sobre la composición taxonómica de la comunidad bacteriana (Psenner & Sommaruga, 1992; Makino & Cotner, 2004).

Gracias a tal interacción con los demás componentes de las redes tróficas microbianas las bacterias pueden ser consumidores activos de nutrientes inorgánicos, contenedores temporales de los mismos o sus liberadores pasivos. El primer caso se presenta en los ambientes oligotróficos, donde gracias a su mayor relación superficie:volumen pueden competir activamente con el fitoplancton por los escasos nutrientes. Aunque, dependen del carbono liberado por las algas a tal punto que un tercio de la producción microbiana puede ser nutrida por el fruto de la fotosíntesis, cuando se dan estas condiciones la productividad bacteriana puede superar notablemente la del fitoplancton (Rothaupt, 1992; Thingstad, 2000; Cole *et al.*, 1982). En el segundo caso, que ocurre cuando las bacterias no dependen de la disponibilidad de sustratos orgánicos pero hay limitación por nutrientes inorgánicos, las células del bacterioplancton se vuelven más nutritivas que las del fitoplancton porque

acumulan mayor cantidad de fósforo y otros nutrientes limitantes. Lo anterior genera comunidades procariotas con proporciones C:P menores que las del nanozooplankton lo que hace que cuando los predadores las consuman se libere el exceso de fósforo de la biomasa bacteriana, favoreciendo su propio crecimiento y el de las comunidades autotróficas. Finalmente pueden fertilizar el ambiente que las contiene al catabolizar especies orgánicas nitrogenadas como los aminoácidos liberando el exceso de nitrógeno al medio (Rothhaupt, 1982).

Consecuentemente, la cantidad de carbono bacteriano en el ambiente da una idea de la importancia del bacterioplankton con respecto a otros componentes de las redes tróficas microbianas (Fukuda *et al.*, 1998; Lee, 1993; Valencia *et al.*, 2003). La tendencia de la biomasa bacterioplanctónica a igualar e incluso exceder la biomasa fitoplanctónica dependiendo de los factores de conversión utilizados ya ha sido expuesta en la literatura (Kirchman, 2000). En el caso de la Bahía de Gaira y teniendo en cuenta las propiedades bacterianas evaluadas y los valores de clorofila *a* reportados en la literatura para la zona (Franco, 2005), la cantidad de carbono bacteriano podría llegar a igualar la biomasa del fitoplancton. La comunidad bacteriana parece entonces preparada para aprovechar los periódicos pulsos productivos, con la potencialidad de llegar a ser tan importante como el fitoplancton.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que los procariotas planctónicos presentes en la Bahía de Gaira constituyen un stock de carbono orgánico particulado que representa hasta $32 \mu\text{g C l}^{-1}$ con densidades de hasta 10^6 células ml^{-1} todo ello influenciado por la dinámica hidrológica de la zona. De acuerdo al pequeño tamaño que exhibieron la mayoría de los organismos del bacterioplankton, menores de $0,05 \mu\text{m}^3$, parecería que esta comunidad cumple en la Bahía un papel potenciador de la red trófica pelágica, puesto que al

interactuar con los demás componentes del plancton, se constituirían como agentes importantes para evitar la pérdida del COD.

La necesidad latente de información sobre la participación del bacterioplancton en las redes tróficas marinas en Colombia es una invitación para que los grupos y las nuevas generaciones de investigadores dirijan sus esfuerzos y recursos al estudio de esta problemática. El presente trabajo presenta entonces evidencia suficiente de que la abundancia, biomasa y actividad de los procariotas planctónicos presentes en la Bahía Gaira podrían soportar parte importante de la productividad del sistema.

CONCLUSIONES

- Los valores de densidad de células y biomasa total se vieron afectados por la dinámica hidro-climática en la Bahía de Gaira. Las mayores abundancias y densidades registradas en los meses de lluvia sugieren que esto ocurre porque en esta época hay mayores aportes de nutrientes a la bahía, a través de las descargas del río y la Ciénaga Grande de Santa Marta.
- Los cambios en la diversidad morfológica, el predominio de células bacterianas esféricas y de tamaños menores a $0.05 \mu\text{m}^3$ encontradas en la bahía apoyan la idea de que la comunidad bacteriana está limitada por la disponibilidad de nutrientes, principalmente orgánicos.
- La comunidad procariota planctónica presente en la bahía se encuentra limitada por nutrientes ya que los valores de densidad de células y cantidad de carbono celular registrados, coinciden con los reportados en la bibliografía para zonas mesotróficas y oligotróficas respectivamente.
- Los altos valores de densidad y biomasa total registrados en la superficie durante la época lluviosa y los mayores valores reportados en las estaciones con más influencia continental durante la época seca, posiblemente se relacionaron con una mayor biomasa fitoplanctónica. Lo anterior señala que puede existir un acople entre el fitoplancton y el bacterioplancton en la bahía.

RECOMENDACIONES

- La variación espacial y temporal de la densidad y la biomasa bacterianas son consecuencia de los diferentes mecanismos de control que impactan al bacterioplancton. Debe hacerse un esfuerzo por discernir cuál es el factor más importante en la producción de carbono orgánico particulado en la forma de la comunidad bacteriana.
- En este trabajo se proponen algunas interacciones entre la comunidad bacteriana planctónica y los demás componentes de la red trófica microbiana. Debe emprenderse la exploración de tales interacciones y determinar la magnitud del flujo de materia y energía entre los microorganismos planctónicos, con el fin de aumentar la resolución de las observaciones que se han hecho al sistema de la Bahía de Gaira.
- La poca información microbiológica disponible para los sistemas marinos tropicales debe ser considerada una invitación para que los grupos de investigación profundicen en este tema, pues la idea que se tiene sobre el estado del bacterioplancton marino está en gran medida basada en la información proveniente de sistemas de latitudes altas.

BIBLIOGRAFIA

- Azam, F.; Fenchel, T.; Field, J. G. J.; Gray, S. L.; Meyer-reil, A. & Thingstad, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. Marine Ecology Progress Series. 10: 257-263.
- Bernier, I. 1977. Contaminación microbiológica en la Bahía de Cartagena. Tesis de grado. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá.
- Biddanda, B.; Ogdahl, M. & Cotner, J. 2001. Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. Limnology and Oceanography. 46(3):730-739
- Blackburn, N.; Hagstrom, A.; Wikner, J.; Cuadros-Hansson, R. & Bjornsen, P. 1998. Rapid Determination of Bacterial Abundance, Biovolume, Morphology, and Growth by Neural Network-Based Image Analysis. Applied and Environmental Microbiology. 64(9):3246-3255
- Blanco, J. 1988. Las variaciones ambientales estacionales en las aguas costeras y su importancia para la pesca en la región de Santa Marta. Caribe colombiano. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
- Bratbak, G. & Heldal, M. 1995. Viruses – the new players in the game; their ecological role and could they mediate genetic exchange by transduction? En: Molecular Ecology of Aquatic Microbes. Joint, I. NATO ASI Series. G 38.
- Bratbak, G.; Jacobsen, A. & Heldal, M. 1998. Viral lysis of *Phaeocystis pouchetii* and bacterial secondary production. Aquatic Microbial Ecology. 16: 11 –16.
- Canosa, A. & Pinilla, G. 1997. Indicadores bacteriológicos de eutrofización en tres embalses de Colombia (Sudamérica). Laboratorio de Microbiología. Centro de Investigaciones Científicas. Universidad de Bogotá

Jorge Tadeo Lozano. En: Séptima Conferencia Internacional Sobre Conservación y Gestión de Lagos.

- Canosa, A. & Pinilla, G. 1999. *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas* spp and *Vibrio* spp. as bacteriologicla indicators of eutrophication in colombian freshwaters. *Geotrópica*. 4: 14-27.
- Canosa, A. & Pinilla, G. 2001. Total bacterial populations in three lentic water bodies of the Colombian Andes using the epifluorescence technique. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*. 6: 169 – 174.
- Canosa, A. 2001. Manual Instructivo de Técnicas en el Laboratorio de Microbiología: Investigación y Docencia. Laboratorio de Microbiología. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá.
- Canosa, A. 2003. Distribución de virus y bacteriófagos y su relación con las bacterias y los coliformes en tres cuerpos de agua lénticos de la región central de Colombia. Informe final proyecto financiado por la Universidad Jorge Tadeo Lozano y la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República.
- Canosa, A.; Pinilla, G.; Díaz, J. & Vargas, A. 2000. Influencia del Ciclo Hidrológico sobre la Abundancia y biomasa del bacterioplancton en el Lago Boa y los Ríos Meta y Caquetá. Amazonía colombiana. Informe Final. COLCIENCIAS.
- Choi, K.; Dobbs, F. & Cowen, R. 2001. Short-term temporal and spatial dynamics of bacterioplancton near Barbados in the Caribbean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*. 25:43-53
- Church, M.; Hutchins, D. & Ducklow, H. 2000. Limitation of Bacterial Growth by Dissolved Organic Matter and Iron in the Southern Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2):455-466
- Cole, J.; Likens, G. & Strayer, D. 1982. Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria. *Limnology and Oceanography*. 27(6):1080-1090
- Díaz, J. M.; Blanco, J. & Guillot, G. 1991. Síntesis ecológico ambiental del sector costero. En: Perfil Ambiental del Caribe Colombiano. Santa Marta: CORPES. Documento de Trabajo número 9. 1: 1-6.

- Ducklow, H. 2000. Bacterial Production and Biomass in the Oceans. En: Microbial Ecology of the Oceans. Kirchman, D. Wiley-Liss. USA. 542 p.
- Ducklow, H. W. 1999. Minireview: The bacterial component of the oceanic euphotic zone. In press: FEMS Microbiology Ecology.
- Eguchi, M.; Nishikawa, T.; MacDonald, K.; Cavicchioli, R.; Gottschal, J. & Kjelleberg. 1996. Responses to Stress and Nutrient Availability by the Marine Ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. Strain RB2256. Applied and Environmental Microbiology. 62(4):1287-1294
- Eiler, A.; Langenheder, S.; Bertilsson, S. & Tranvik, L. Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations. Applied and Environmental Microbiology. 69(7):3701-3709
- Fernández, A.; Huang, S.; Seston, S.; Xing, J.; Hickey, R.; Criddle, C.; Tiedje, J. 1999. How Stable Is Stable? Function versus Community Composition. Applied and Environmental Microbiology. 65(8):3697-3704.
- Ford, T. E. 1993. Aquatic Microbiology. An Ecological Approach. Blackwell Scientific Publications. Boston
- Franco, A. 2005. Oceanografía de la ensenada de Gaira – El Rodadero, más que un centro turístico en el Caribe Colombiano-. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 56p.
- Franco, A. E. 1983. Análisis de la contaminación fecal del estuario del Río Gaira y la costa adyacente al Balenario el Rodadero. Santa Marta. Colombia. INVEMAR.
- Fukuda, R.; Ogawa, H.; Nagata, T. & Koike, I. 1998. Direct determination of carbon and nitrogen contents of natural bacterial assemblages in marine environments. Applied and Environmental Microbiology. 64(9): 3352 – 3358.
- Gasol, J.; del Giorgio, P. & Duarte, C. 1997. Biomass distribution in marine planktonic communities. Limnology and Oceanography. 42(6):1353-1363
- Glöckner, F.; Fuchs, B. & Amann, R. 1999. Bacterioplankton Composition of Lakes and Oceans: a first Comparison Based on Fluorescence *In Situ* Hybridization. Applied and Environmental Microbiology. 65(8):3721-3726

- Gocke, K.; Hernández, C.; Giesenhausen, H. & Hoppe, H. 2004. Seasonal variations of bacterial abundance and their relation to phytoplankton in the hypertrophic tropical lagoon Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. *Journal of Plankton Research*. 26(12):1429-1439.
- Gocke, K.; Mancera, J. & Vallejo, A. 2003. Heterotrophic microbial activity and organic matter degradation in coastal lagoons of Colombia. *Revista de Biología Tropical*. 51(1):85-98
- Hahn, M. W. & Höfle, M. G. 1999. Flagellate Predation on a Bacterial Model Community: Interplay of Size-Selective Grazing, Specific Bacterial Cell Size, and Bacterial Community composition. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(11):4863-4872
- Hobbie, J. 1993. Introduction. En: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Kemp, P.; Sherr, B.; Sherr, E. & Cole, J. Lewis Publishers.
- Hoppe, H.; Gocke, K.; Zamorano, D. & Zimmermann, R. 1983. Degradation of Macromolecular Organic compounds in a Tropical Lagoon (Ciénaga Grande, Colombia) and its Ecological Significance. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 68:811-824
- INVEMAR. 2003. Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia. IEAMCC_2002.pdf. [http:// www.invemar.org.co](http://www.invemar.org.co)
- INVEMAR. 2005. Red de vigilancia de la Calidad Ambiental Marina de Colombia –REDCAM-. <http://www.invemar.org.co>
- Jochem, F. J. 2001. Morphology and DNA content of bacterioplankton in the northern Gulf of Mexico: Analysis by epifluorescence microscopy and flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*. 25: 179-194
- Jürgens, K.; Pernthaler, J.; Schalla, S. & Amann, R. 1999. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3):1241-1250
- Kepner, R.; Pratt, J. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews*. 58 (4): 603-615.
- Kirchman, D. L.; 2000. *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss, Inc. Estados Unidos de America. 542p.

- Koch, Arthur L. 1996. What Size Should a Bacterium Be? A Question of Scale. *Annual Reviews of Microbiology*. 50:317-348
- La Ferla, R.; Giudice, A. & Maimone, G. 2004. Morphology and LPS content for the estimation of marine bacterioplankton biomass in the Ionian Sea. *Scientia Marina*. 68(1):23-31
- Lee, S. & Fuhrman, J. 1987. Relationship between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:1298-1303
- Lee, S. 1993. Measurement of Carbon and Nitrogen Biomass and Biovolume from Naturally Derived Marine Bacterioplankton. En: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Kemp, P.; Sherr, B.; Sherr, E. & Cole, J. Lewis Publishers. Boca Raton, p 303–307
- Loferer-Krossbacher, M.; Klima, J. & Psener, R. 1998. Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2): 688-694.
- Long, R. & Azam, F. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(11): 4975-4983.
- Makino, W. & Cotner, J. 2004. Elemental stoichiometry of a heterotrophic bacterial community in a freshwater lake: implications for growth - and resource - dependent variations. *Aquatic Microbial Ecology*. 34:33-41
- Malits, A.; Peters, F.; Bayer-Giraldi, M.; Marrasé, C.; Zoppini, A.; Guadayol, O. & Alcaraz, M. 2004. Effects of small-scale turbulence on bacteria: a matter of size. *Microbial Ecology*. 48:287-299
- Matz, C. & Jurgens, K. 2001. Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2):814-820.
- Matz, C. & Jürgens, K. 2001. Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2):814-820
- Moriarty, D. 1979. Biomass of suspended bacteria over coral reefs. *Marine Biology*. 53:193-200.

- Morita, R. 1993. Starvation-Survival Strategies in Bacteria. En: Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Kemp, P.; Sherr, B.; Sherr, E. & Cole, J. Lewis Publishers. Boca Raton. p 441-445
- Norland, S. 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria. En: Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Kemp, P.; Sherr, B.; Sherr E.; Cole, J. J Lewis Publishers. USA
- Paul, J. 1993. The advances and limitations of methodology. En: 1993. Aquatic Microbiology. An Ecological Approach. Ford, T. E. Blackwell Scientific Publications. Boston. p 15
- Pernthaler, J.; Posch, T.; Šimek, K.; Vrba, J.; Amann, R. & Psenner, R. 1997. Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. Applied and Environmental Microbiology. 63(2):596-601
- Pomeroy, L.; Sheldon, J.; Sheldon Jr, W. & Peters, F. 1995. Limits to growth and respiration of bacterioplankton in the Gulf of Mexico. Marine Ecology Progress Series. 117: 159 – 268.
- Posch, T.; Loferer-Kröbacher, M.; Gao, G.; Alfreider, A.; Pernthaler, J.; Psenner, R. 2001. Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. Aquatic Microbial Ecology. 25:55-63.
- Psenner, R. & Sommaruga, R. 1992. Are rapid changes in bacterial biomass caused by shifts from top-down to bottom-up control? Limnology and Oceanography. 37(5):1092-1100
- Psenner, R. 1993. Determination of Size and Morphology of Aquatic Bacteria by Automated Image Analysis. En: Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Kemp, P.; Sherr, B.; Sherr E.; Cole, J. J Lewis Publishers. USA
- Ramírez, G. 1990. Variación de los parámetros hidrográficos y su relación con el proceso de surgencia en la Bahía de Santa Marta. En: Estudio del Macrozoobentos de la Bahía de Santa Marta: Informe Final Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín. Santa Marta. 11-23.
- Rothhaupt, K. 1992. Stimulation of phosphorus-limited phytoplankton by bacterivorous flagellates in laboratory experiments. Limnology and Oceanography. 37(4):750-759

- Shiah, F. & Ducklow, H. 1994. Temperature and substrate regulation of bacterial abundance, production and specific growth rate in Chesapeake Bay, USA. *Marine Ecology Progress Series*. 103:297-308.
- Sieracki, M.; Johnson, P. & Sieburth, J. 1985. Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(4):799-810
- Šimek, K.; Perthaler, J.; Weinbauer, M. G.; Hornák, K.; Dolan, J. R.; Nedoma, J.; Mašín, M. & Amann, R. 2001. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6):2723-2733
- Šimek, K.; Vrba, J.; Pernthaler, J.; Posch, T.; Hartman, P.; Nedoma, J. & Psenner, R. 1997. Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(2):587-595
- Simon, M.; Azam, F. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*. 51:201-213
- Simu, K. & Hagström, Å. 2004. Oligotrophic Bacterioplankton with a Novel single-Cell Life Strategy. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4):2445-2451
- Sommaruga, R. & Psenner, R. 1995. Permanent presence of grazing-resistant bacteria in a hypertrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(9):3457-3459
- Steubing, L. 1971. contribución a la mineralización de materiales orgánicos en la Isla de Salamanca. *Mitt. Inst. Colombo-Alemán Invest. Cient.* 5:11-18. llevar a la u para revisarlo
- Tait, R.V. 1987. *Elementos de Ecología Marina*. Acribia. Zaragoza, España. 446p.
- Thingstad, T. 2000. Control of Bacterial Growth in Idealized Food Webs. En: *Microbial Ecology of the Oceans*. Kirchman, D. Wiley-Liss. USA.
- Thingstad, T. F.; Heldal, M.; Bratbak, G. & Dunas, I. 1993. Are viruses important partners in pelagic food webs? *Trends in Ecology and Evolution*. 8(6): 209 – 213

- Turley, C. M. 1993. Directs Estimates of Bacterial Numbers in Seawater Simples Without Incurring Cell Loss Due to Sample Storage. En: Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Kemp, P.; Sherr, B.; Sherr, E. & Cole, J. Lewis Publishers. USA
- Valencia, J.; Abalde, J.; Bode, A.; Cid, A.; Fernández, E.; González, N., Lorenzo, J. Teira, E. & Varela, M. 2003. Variations in planktonic bacterial biomass and production, and phytoplankton blooms off A Coruña (NW Spain). *Scientia Marina*. 67(2):143-157
- Vrede, K.; Heldal, M.; Norland, S. & Bratbak, G. 2002. Elemental Composition (C,N,P) and Cell Volume of Exponentially Growing and Nutrient-Limited Bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(6):2965-2971
- Vrede, K.; Vrede, T.; Isaksson, A. & Karlson, A. 1999. Effects of nutrients (phosphorus, nitrogen and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton – a seasonal study. *Limnology and Oceanography*. 44(7): 1616 – 1624
- Wilhelm, S. W. & Suttle, C. A. 1999. Viruses and nutrient cycles in the sea. *BioScience*. 49(10): 781 – 789.
- Wommac, E.; Ravel, J.; Hill, R.; Chun, J. & Colwell, R. Population dynamics of Chesapeake Bay virioplankton: total community analysis by pulsed gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(1):231-240.
- Wu, Q.L.; Boenigk, J. & Hahn, M.W. 2004. Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(1):332-339
- Zubcov, M.; Fuchs, B.; Eilers, H.; Burkill, P. & Amann, R. 1999. Determination of total protein content of bacterial cells by sypro staining and flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(7):3251-3257

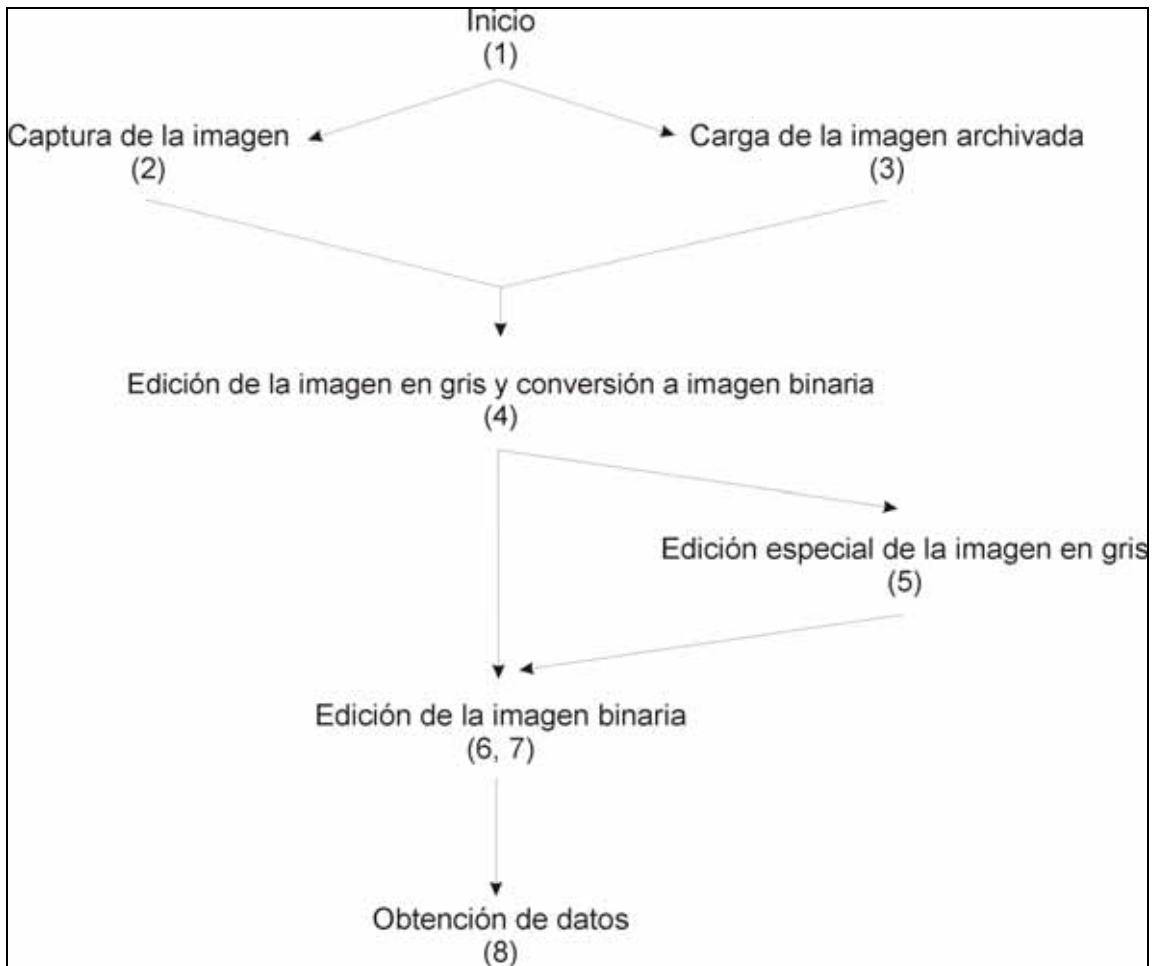
ANEXO A

FORMATO PARA EL REGISTRO DE DATOS EN CAMPO

| # Salida / Fecha | Estaciones | | | | |
|---------------------------|------------|---------|----------|---------|----------|
| | 1(0.5 m) | 1(42 m) | 2(0,5 m) | 2(42 m) | 3(0,5 m) |
| Hora | | | | | |
| Prof. Secchi | | | | | |
| Temperatura | | | | | |
| Nubosidad | | | | | |
| Dirección de la corriente | | | | | |
| Procedencia del viento | | | | | |
| Color del agua | | | | | |
| observaciones | | | | | |

ANEXO B

ESTRUCTURA DEL QUIPS PARA ABUNDANCIA Y BIOMASA



- (1) Es la primera parte del QUIPS. Se define el origen de la imagen a trabajar.
- (2) Despliega las opciones de captura. Da la posibilidad de ajustar el brillo de la imagen.
- (3) Permite abrir una imagen archivada.
- (4) Consta de una serie de algoritmos que buscan incrementar el contraste entre las bacterias y el fondo de la imagen.
 - a. Para disminuir el ruido de fondo a la imagen original se le hace: (Maxima; depth:218; operador: Octagon) – (WTopHat; cycles:2; operador: Octagon)
 - b. Delinear las bacterias a partir de la imagen resultante de “a”: (Gradient; cycles: 1; operador: Octagon)
 - c. Eliminar el fondo y resaltar: ((Imagen original)-((Histo EQ; de la imagen original) – (Imagen original)))*2
 - d. Restaurar los bordes originales: (b+c)
 - e. Remover el ruido de fondo y suavizar a partir de “d”: (Open; cycles: 1; operador: Octagon), (Close; cycles: 1; operador: Octagon), (Maxima; depth: 218; operador: Octagon)
 - f. Ensachar la imagen de “e”: (AutoContrast)
 - g. Expandir el contraste de las áreas oscuras: a la imagen resultante de “d” (WTopHat; cycles: 2; operador: Octagon), (Sq root)
 - h. (f-g)
 - i. Imagen lista para convertir a binaria, imagen detectada sirve como máscara. (h*2)
- (5) Conduce a eliminar fondos muy brillantes que de otra forma deformarían la forma de las células. Intenta rescatar los rasgos más brillantes de la imagen, las bacterias.
 - a. A la imagen original. (Imagen original)-(Minima; depth: 255; operador: Octagon)

- b. (Imagen "a")-(Minima; depth: 255; operador: Octagon)
 - c. A la imagen resultante de "b". (Delineate; cycles: 1; operador: Octagon), (Open; cycles: 2; operador: Octagon), (AutoContrast), (Close; cycles: 10; operador: Octagon)
 - d. Imagen lista para convertir a binaria, imagen detectada sirve como máscara.
- (6) Se detectan todas las formas bacterianas presentes en la imagen y las reduce a puntos, esta detección sirve como semilla. (Ult Erode; stepsize: 5; max cycles: 0; operador: Octagon), a continuación una secuencia de Open y Close con: cycles: 1; edge erode on; operador: Octagon.
- (7) En la segunda parte se eliminan los rasgos brillantes que no son bacterias comparando la imagen binaria resultante del proceso anterior con la imagen en gris original. A continuación se realiza una reconstrucción geodésica (GdsSkiz; operador: Octagon) a partir de la semilla con respecto a la máscara.
- (8) Se realiza la medición de objetos con un área mínima de 10 pixels ($0.03 \mu\text{m}^2$), teniendo en cuenta 64 ferets. Se determinan: área, largo, ancho, redondez, relación largo-ancho. Suponiendo que las bacterias son cilindros con extremos redondeados, se calcula el biovolumen y se graba esta información.

ANEXO C

RESUMEN DE LOS DATOS REGISTRADOS

| EpocaProfundidad Estación | | Abundancia (cel / ml) X 10 ⁵ | Biovolumen (um ³ /cel) | Biomasa | | Redondez |
|------------------------------|----------|--|--------------------------------------|------------|-----------|----------|
| | | | | (fg C/cel) | (µg C/ l) | |
| SecaSupSur | Promedio | 2,04 | 0,011 | 4,66 | 1,25 | 1,41 |
| | Máximo | 2,76 | 0,012 | 4,97 | 1,62 | 12,71 |
| | Mínimo | 0,79 | 0,010 | 4,36 | 0,88 | 1,05 |
| SecaFondoSur | Promedio | 1,20 | | | | |
| | Máximo | 1,27 | | | | |
| | Mínimo | 1,03 | | | | |
| SecaRio | Promedio | 2,09 | 0,018 | 6,70 | 1,46 | 1,37 |
| | Máximo | 2,88 | 0,021 | 7,43 | 1,70 | 10,66 |
| | Mínimo | 1,52 | 0,016 | 5,97 | 1,23 | 1,04 |
| SecaSupNorte | Promedio | 1,25 | | | | |
| | Máximo | 1,62 | | | | |
| | Mínimo | 0,77 | | | | |
| SecaFondoNorte | Promedio | 1,75 | 0,037 | 11,18 | 3,13 | 1,74 |
| | Máximo | 2,25 | 0,037 | 11,18 | 3,13 | 23,24 |
| | Mínimo | 1,06 | 0,037 | 11,18 | 3,13 | 1,04 |
| LluviasSupSur | Promedio | 9,60 | 0,022 | 7,35 | 8,75 | 1,42 |
| | Máximo | 14,17 | 0,048 | 13,46 | 19,34 | 57,74 |
| | Mínimo | 6,43 | 0,010 | 4,17 | 3,81 | 1,02 |
| LluviasFondoSur | Promedio | 2,64 | 0,020 | 6,95 | 2,37 | 1,41 |
| | Máximo | 3,03 | 0,028 | 9,14 | 2,48 | 21,48 |
| | Mínimo | 2,27 | 0,010 | 4,28 | 2,23 | 1,04 |
| LluviasRio | Promedio | 6,93 | 0,025 | 8,15 | 17,96 | 1,60 |
| | Máximo | 15,60 | 0,037 | 11,18 | 32,07 | 11,79 |
| | Mínimo | 1,49 | 0,013 | 5,11 | 3,85 | 1,04 |
| LluviasSupNorte | Promedio | 10,78 | 0,031 | 9,51 | 11,50 | 1,45 |
| | Máximo | 16,17 | 0,055 | 14,74 | 23,95 | 54,00 |
| | Mínimo | 5,39 | 0,015 | 5,75 | 5,28 | 1,04 |
| LluviasFondoNorte | Promedio | 2,70 | 0,049 | 12,62 | 6,61 | 1,38 |
| | Máximo | 2,96 | 0,086 | 20,43 | 8,82 | 23,26 |
| | Mínimo | 2,33 | 0,012 | 4,82 | 4,41 | 1,06 |