

**VARIACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE LA ABUNDANCIA DEL
NANOPLANCTON HETERÓTROFO Y SU RELACIÓN CON LA
ABUNDANCIA Y EL VOLUMEN CELULAR DEL BACTERIOPLANCTON EN
EL EMBALSE DEL NEUSA.**

CRISTIAN HAKSPIEL SEGURA

**UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD BIOLOGÍA MARINA
BOGOTA
2005**

**VARIACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE LA ABUNDANCIA DEL
NANOPLANCTON HETERÓTROFO Y SU RELACIÓN CON LA
ABUNDANCIA Y EL VOLUMEN CELULAR DEL BACTERIOPLANCTON EN
EL EMBALSE DEL NEUSA.**

CRISTIAN HAKSPIEL SEGURA.

Trabajo de grado

Director

**JUAN PABLO NIÑO
Microbiólogo M. Sc.**

Codirectora

**AMPARO CANOSA
Microbióloga M. Sc.**

UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD BIOLOGÍA MARINA

BOGOTA

2005

AGRADECIMIENTOS

- Este trabajo de grado se realizó gracias al apoyo de **COLCIENCIAS** y la **Universidad Jorge Tadeo Lozano**, como parte del proyecto “Estructura y variación espacial y temporal de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa, un ecosistema acuático alto Andino”. Un agradecimiento especial al equipo humano del Grupo de Microbiología Acuática, línea de Participación de Microorganismos en las Cadenas Tróficas por haber hecho posible el desarrollo y conclusión de esta tesis.
- Agradezco a Dios por darme la oportunidad de vivir y terminar mi carrera. A mi mamá por su amor incondicional, su voz de aliento, su ejemplo, su sacrificio y más. A mis hermanos que fueron la motivación de todo.
- A COLCIENCIAS y a la Universidad Jorge Tadeo Lozano por el apoyo para el desarrollo de este trabajo de grado.
- A mis directores Amparo y Juan que además de ser personas a las que admiro mucho y que me ayudaron mucho en la realización de este trabajo, se convirtieron también en buenos amigos a los que más de una vez les comente mis problemas.
- A Camila que fue mi compañera de estudio, JAJAJAJA, mentiras, mi mejor amiga y confidente, con quien compartí muchos momentos (labores, juegos, canciones, lavadero, etc.).

- A todos los anteriores gracias por soportarme y levantarme el ánimo cuando mas lo necesite.
- A Sandrita, Nora, Rafa, Federico y la señorita Laura, que hicieron mi vida en laboratorio más agradable.
- También a los pasantes, que hubiera sido de mi vida sin ellos para amortiguar la carga de mis labores en el laboratorio.
- A mis compañeros de carrera y amigos
- Blue Shark: thank you for teach me a lot of things about the life, nice and bad thinks.
- Fueron casi dos años de mucho trabajo, conocimiento y experiencias personales que no cambiaría por nada en el mundo. Lo más importante fue como aprendí a levantarme y a superar tantas caídas con el apoyo de ustedes.
- Recordare con cariño el momento del tinto, el cuartito de epifluorescencia, las manos llenas de AO, las charlas con Amparo y Juan, mis embarradas y las de los monitores.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	4
Bucle microbiano	4
Protistos bacteriívoros y su efecto sobre la comunidad del bacterioplancton	5
Determinación de las interacciones bacterias – protozoos	9
Métodos directos	9
Métodos indirectos	9
Estimación de la abundancia bacteriana y de protozoos	10
Recuento de bacterias	11
Recuento de protozoos	11
Determinación de volumen celular bacteriano	13
Análisis de imagen	14
METODOLOGÍA	20
Área de estudio	20
Estaciones de muestreo	20
Periodicidad del muestreo	22
Muestras biológicas	23
Fase de Laboratorio	24
Recuento total de bacterias	24
Recuento y estimación de volumen celular con análisis de imagen	24
Adquisición de la imagen	25
Procesamiento de la imagen	26
Edición de la imagen en gris	26
Recuento y medición de caracteres	26
Estimación del biovolumen	27
Almacenamiento de los datos	27
Recuento total de protistos	27
Recuento total de protozoos nanoplanctónicos con cámara de sedimentación y microscopio invertido	28
Recuento total de nanoplancton heterótrofo por microscopía de epifluorescencia	30
Fase de gabinete	33
Manejo de datos	33

Análisis de datos	33
RESULTADOS	35
Hidrología	35
VARIABLES FÍSICAS Y QUÍMICAS	36
Temperatura	36
Oxígeno	37
pH	37
Nitrógeno	37
Fósforo	37
Variación espacial y temporal de la densidad bacteriana	36
Morfometría celular bacteriana	41
Abundancia de Protozoos	43
Comparación de las técnicas utilizadas para el recuento de nanoplancton heterótrofo	43
Variación espacial y temporal de la densidad de nanoplancton heterótrofo	45
Relación Abundancia Bacteriana vs Abundancia de Protozoos	46
Cociente Bacterias – Protozoos (CBP)	48
DISCUSIÓN	50
Comparación de las técnicas utilizadas para el recuento de nanoplancton heterótrofo	50
Abundancia del bacterioplancton y del nanoplancton heterótrofo	52
Relación de la abundancia bacteriana y las variables ambientales	54
Relaciones entre las densidades de bacterias y nanoplancton heterótrofo	57
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	76

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Bucle microbiano.	4
Figura 2. Elementos para recuento de nanozooplancton con microscopio invertido.	11
Figura 3. Microscopio de epifluorescencia.	12
Figura 4. Procedimiento general del análisis de imagen para la estimación de biovolumen bacteriano.	16
Figura 5. Embalse del Neusa, ubicación aproximada de las estaciones de muestreo.	21
Figura 6. Equipo empleado para la recolección de muestras en la columna de agua.	23
Figura 7. Imagen Monocromática de un campo de una preparación de bacterias teñidas con AO.	25
Figura 8. Representación de las cámaras de sedimentación empleadas para el conteo de nanozooplancton.	28
Figura 9. Imágenes de microorganismos eucariotas unicelulares por microscopía de epifluorescencia.	31
Figura 10. Datos hidrológicos e hidráulicos del embalse del Neusa durante los meses de muestreo.	35
Figura 11. Isolíneas de algunas variables fisicoquímicas en el embalse del Neusa entre julio de 2004 y abril de 2005.	36
Figura 12. Concentraciones de nitrógeno total y amonio en el embalse del Neusa.	38
Figura 13. Concentraciones de fósforo total y fosfatos en el embalse del Neusa.	38
Figura 14. Densidad de bacterias en el embalse del Neusa.	39
Figura 15. Densidad promedio por muestreo de bacterias en los diferentes sitios del embalse del Neusa.	40
Figura 16. Densidad promedio de bacterias de acuerdo a los meses de muestreo en el embalse del Neusa.	41
Figura 17. Gráficos de dispersión en escala logarítmica que muestran la relación biovolumen:redondez bacteriana de acuerdo a la época de muestreo en el embalse del Neusa.	42

Figura 18. Distribución de frecuencias relativas de biovolumen en el embalse del Neusa.	42
Figura 19. Valores promedio de biovolumen bacteriano en el embalse del Neusa.	43
Figura 20. Densidades promedio de nanoplancton heterótrofo obtenido con las técnicas de epifluorescencia y de la cámara de sedimentación.	44
Figura 21. Densidad de nanoplancton heterótrofo por sitios obtenida por recuento en cámara de sedimentación.	45
Figura 22. Densidad de nanoplancton heterótrofo en la escala vertical y épocas de muestreos obtenida con el método de cámaras de sedimentación en el embalse del Neusa.	46
Figura 23. Densidad promedio de bacterias y de nanoplancton heterótrofo en el embalse del Neusa.	47
Figura 24. Gráfico de dispersión con los datos de los cocientes de las densidades bacterianas y del nanoplancton heterótrofo en el embalse del Neusa y en el río Cubillos de acuerdo a los sitios de muestreo.	24
Figura 25. Cocientes Bacterias-Protozoos (CBP) promedio en el embalse del Neusa.	25

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Fechas de muestreo, profundidad y programación de procesamiento de las muestras del nanozooplancton.	22
Tabla 2. Correlaciones entre los recuentos de bacterias y nanoplancton heterótrofo de acuerdo a los sitios de muestreo, las épocas de muestreo en todos los sitios, la escala vertical y en la zona superficial por época de muestreo.	47
Tabla 3. Valores promedio, mínimos y máximos de recuentos de nanoplancton heterótrofo (células.ml ⁻¹) reportados en sistemas acuáticos marinos y continentales.	53

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A. El procedimiento general del cual se habló en el marco teórico fue organizado en una rutina de trabajo semiautomática y copia del quip.

Anexo B. Gráficas de concentraciones promedio de nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3) por periodo y sector de muestreo y estrato de la columna de agua.

Anexo C. Densidades máximas, mínimas y promedio de bacterioplancton en cada punto de muestreo durante el periodo de estudio.

Anexo D. Análisis estadísticos para las densidades promedio de bacterioplancton entre estaciones y muestreos.

Anexo E. Variación espacial de la densidad promedio bacterioplancton en cada muestreo

Anexo F. Variación temporal de la densidad promedio bacterioplancton en cada punto de muestreo.

Anexo G. Variación temporal de la relación biovolumen:redondez del bacterioplancton en cada punto de muestreo.

Anexo H. Variación espacial de la relación biovolumen:redondez del bacterioplancton en cada muestreo.

Anexo I. Valores máximos, mínimos y promedio de volumen celular bacteriano promedio (μm^3) en cada punto de muestreo durante el periodo de estudio.

Anexo J. Densidades máximas, mínimas y promedio de nanoplancton heterótrofo por el método de recuento con microscopia de epifluorescencia en cada punto de muestreo durante el periodo de estudio.

Anexo K. Densidades máximas, mínimas y promedio de nanoplancton heterótrofo por el método de recuento con cámara de sedimentación y microscopio invertido en cada punto de muestreo durante el periodo de estudio.

Anexo L. Variación espacial de la densidad promedio de nanoplancton heterótrofo por el método de recuento con cámara de sedimentación y microscopio invertido en cada muestreo.

Anexo M. Variación temporal de la densidad promedio de nanoplancton heterótrofo por el método de recuento con cámara de sedimentación y microscopio invertido en cada punto de muestreo.

Anexo N. Variación espacial de la densidad promedio de nanoplancton heterótrofo con el método de recuento por microscopia de epifluorescencia en cada muestreo.

Anexo O. Variación temporal de la densidad promedio de nanoplancton heterótrofo con el método de recuento por microscopia de epifluorescencia en cada punto de muestreo.

Anexo P. Variación temporal de la densidad promedio del nanozooplancton obtenida con cámara de sedimentación y microscopía de epifluorescencia en cada punto de muestreo.

Anexo Q. Variación temporal de la densidad promedio bacterioplancton y nanozooplancton en cada punto de muestreo.

Anexo R. Variación espacial de la densidad promedio bacterioplancton y nanozooplancton en cada muestreo.

Anexo S. Cocientes bacteria:protozoo en las estaciones de muestreo durante el periodo de estudio.

Anexo T. Coeficientes de variación entre replicas, muestreos y promedios de los recuentos de nanoplancton heterótrofo con microscopio invertido y con cámara de sedimentación y microscopio invertido.

RESUMEN

Se estudiaron las relaciones entre la abundancia del nanoplancton heterótrofo y la densidad y el biovolumen del bacterioplancton en las aguas del embalse del Neusa y uno de sus afluentes el río Cubillos, entre julio de 2004 y abril de 2005. La abundancia promedio de nanoplancton heterótrofo fue de 2.12×10^3 con la técnica con cámara de sedimentación y de 1.74×10^3 células. ml^{-1} con microscopia de epifluorescencia. La densidad bacteriana promedio fue de 2.10×10^6 bacterias. ml^{-1} . Se encontró un predominio de células de pequeño tamaño de formas redondeadas, con un promedio de biovolumen entre 0.001 y 0.041 μm^3 . Ambas comunidades se correlacionaron (Spearman = 0.37, $p < 0.01$), lo que mostró evidencias de que el nanoplancton heterótrofo controla a la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa; este control varió tanto en una escala espacial como temporal. La relación existente entre bacterias y nanoplancton heterótrofo encontrada en este trabajo, implicaría además una importante transferencia de materia a los niveles tróficos superiores.

Palabras clave: biovolumen, bacterioplancton y nanoplancton heterótrofo

INTRODUCCIÓN

Hasta hace unas décadas, se creía que la productividad de los ecosistemas acuáticos estaba sostenida exclusivamente por la producción primaria de la comunidad fitoplanctónica (Steele, 1974). Actualmente, gracias a los resultados obtenidos con la aplicación de modelos desarrollados para estimar el flujo de materia y energía dentro de las redes tróficas marinas y especialmente en lo relacionado con el flujo de carbono orgánico, se ha observado que el consumo de cada uno de los niveles constituidos por metazoarios heterótrofos excede la producción autótrofa (Scavia, 1988; Strayer, 1988); estos hallazgos mostraron una subestimación de los flujos energéticos y originaron gran variedad de interrogantes acerca de las vías y organismos que participan en la producción de carbono orgánico en las cadenas tróficas acuáticas.

Pomeroy (1974), propuso un nuevo modelo para explicar como funcionan las redes tróficas acuáticas, en el cual se considera al bacterioplancton como un componente central. A diferencia del modelo anterior, las bacterias que son abundantes en la zona eufótica y en aguas profundas, no solo cumplen un papel en los ciclos biogeoquímicos como mineralizadores, sino que desempeñan una función muy importante como reguladores de la productividad de los sistemas acuáticos. La mayoría de las predicciones de Pomeroy se han cumplido; aparentemente las bacterias introducen como biomasa la materia orgánica disuelta aportada por los productos de excreción y exudación de los demás niveles tróficos, que de otro modo, serían pérdida para el sistema (Azam *et al.*, 1983). Hoy se sabe que el bacterioplancton introduce como biomasa desde un 10% hasta un 50% de la productividad primaria (Wommack y Colwell, 2000).

Por lo anterior, se esperaría que la producción del bacterioplancton aumentara con el aporte continuo de carbono orgánico disuelto. No

obstante, se ha identificado que su abundancia expresada como el número de células por unidad de volumen poco varía entre diferentes ecosistemas acuáticos con características físicas, químicas, geológicas y tróficas diferentes (Canosa, 2003; Canosa y Pinilla, 1998 y 1999; Cole *et al.*, 1993; Pace y Cole, 1994). Estos resultados, sugieren que el tamaño y aún la actividad de las poblaciones bacterianas en el ecosistema acuático, no solo están reguladas por la disponibilidad de nutrientes, sino que otros factores tales como las interacciones con otras comunidades microbianas son importantes en su productividad total.

Varios estudios realizados muestran que los principales factores de control sobre el bacterioplancton son la disponibilidad de nutrientes (Chrzanowsky y Grover, 2001; Pace y Cole, 1994), la predación (Sherr *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1992) y la lisis viral (Fuhrman, 1999; Suttle, 1994). Los dos últimos, esto es el pastoreo por protozoos y la lisis viral, hacen parte del llamado control top-down o control desde los niveles tróficos superiores. Sus efectos sobre la comunidad bacteriana han sido comparados en sistemas acuáticos lénticos oligotróficos y eutróficos. Aparentemente, el pastoreo por protozoos es el responsable de remover la mayor proporción de la biomasa bacteriana en la zona óxica, mientras que la acción lítica de los virus es más importante en la regulación de la abundancia en la zona anóxica de lagos con estratificación estacional (Weinbauer, 2003; Weinbauer y Höfle, 1998; Thinsgtad y Lignell, 1997).

La importancia relativa de la depredación, de la lisis viral o la disponibilidad de sustratos nutritivos en el control de las bacterias puede cambiar espacial y temporalmente con las condiciones medioambientales imperantes en cada cuerpo de agua (Almeida *et al.*, 2001; Fuhrman y Noble, 1995). Algunos modelos sugieren que la abundancia y la diversidad bacteriana son controladas principalmente por virus en los sistemas de alta productividad y en zonas anóxicas, ya que la lisis compensa las altas tasas de crecimiento bacteriano de las especies de bacterias que son mas abundantes. Mientras que la predación y la competencia son más importantes en sistemas de baja

productividad (Torsvik *et al.*, 2002, Bohannan y Lenski; 2000). Sin embargo, los datos de los que se dispone no son concluyentes al respecto.

Sí el pastoreo es uno de los principales factores reguladores de la comunidad bacteriana en los ecosistemas acuáticos como lo afirman Sherr *et al.* (1983) y Bloem *et al.* (1988) entre otros, habría un incremento en la transferencia y/o exportación de energía hacia niveles tróficos superiores, y por lo tanto un aumento en la productividad general del sistema. Además la presión selectiva de los protozoos podría generar cambios sobre la estructura taxonómica, actividad fisiológica, metabólica, el tamaño y la morfología de los miembros del bacterioplancton (Strom, 2000; Šimek *et al.*, 1999; Suzuki, 1999; Šimek *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 1997). Algunos de estos postulados se han comprobado en las regiones templadas pero poco se sabe sobre lo que sucede en los trópicos.

En Colombia se han realizado pocos estudios para identificar los factores que controlan la abundancia de la comunidad de bacterioplancton en sistemas acuáticos lénticos. El objetivo principal de este trabajo de tesis fue corroborar si la variación de la abundancia de la comunidad de protozoos planctónicos estaba relacionada con la abundancia y el volumen celular del bacterioplancton en el embalse del Neusa. Así mismo, el presente pretende evaluar si los métodos de recuento de nanoplancton heterótrofo por microscopía de epifluorescencia y cámara de sedimentación empleados aquí, son válidos para evaluar la variación espacial y temporal de la abundancia. El estudio es una producción del grupo de Microbiología Acuática y se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano dentro de un proyecto de investigación cofinanciado por la misma y COLCIENCIAS, titulado “Estructura y variación espacio - temporal de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa, un ecosistema acuático alto Andino” (Canosa y Niño, 2004).

MARCO TEÓRICO

BUCLE MICROBIANO

El clásico modelo de las cadenas tróficas acuáticas muestra un flujo unidireccional de energía que comienza con los productores primarios, seguidos por una serie de consumidores que incrementan gradualmente su biomasa (Steele, 1974; Odum, 1992).

Actualmente hay discrepancias con ese modelo, relacionadas principalmente con las vías que toma el carbono orgánico, tanto particulado (COP) como disuelto (COD) en los ecosistemas marinos y de agua dulce. Nuevamente se discute la definición de los tipos de carbono orgánico en el agua, la mayoría de autores lo expresan de acuerdo a su tamaño, COP como aquel mayor a $0.2 \mu\text{m}$ y COD el menor a $0.2 \mu\text{m}$ (APHA, 1995). Según la versión clásica la mayoría del COP es originado directamente del fitoplancton, sin embargo, recientes descubrimientos indican que la materia orgánica derivada de las bacterias podría ser la mayor fuente de este recurso en el agua (Stoderegger y Herndl, 1998; Benner *et al.*, 1992).

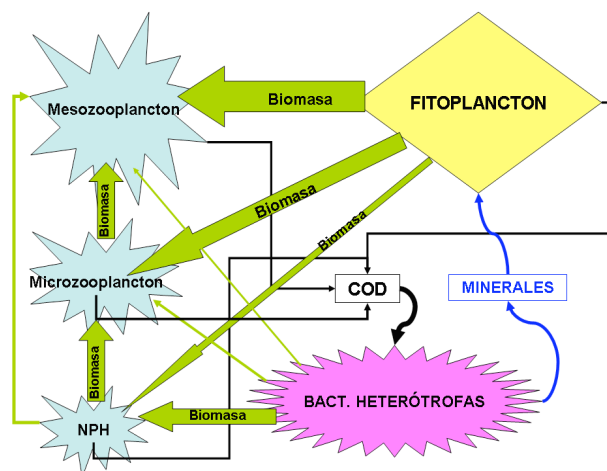


Figura 1. Bucle microbiano (Azam *et al.*, 1983).
NPH : nanoplancton heterótrofo.

Se sabe que los procariotas heterótrofos toman COD, originado principalmente por los productores primarios y consumidores (en forma de exudados y productos de excreción) y una significativa parte aportada por la actividad viral (producto de la lisis celular de algas y bacterias), incrementando su biomasa (en número y tamaño). Posteriormente, estos microorganismos son consumidos por pequeños pastoreadores como flagelados y ciliados, los cuales a su vez son predados por grandes metazoos; de esta forma, este material orgánico, aparentemente perdido, es incorporado de nuevo en la red trófica. Este flujo de COD vía procariotas y pequeños pastoreadores (figura 1), es llamado el “bucle microbiano” (Azam *et al.*, 1983).

PROTISTOS BACTERIÓVOROS Y SU EFECTO SOBRE LA COMUNIDAD DEL BACTERIOPLANCTON

Los protozoos son organismos unicelulares eucarióticos (protistos heterótrofos), ampliamente distribuidos en la naturaleza. En el hábitat acuático se les encuentra en aguas dulces, marinas y estuarinas, formando parte del plancton (Madigan *et al.*, 1999). Tradicionalmente se les considera parte del zooplancton, por su característica de organismos heterótrofos, sin embargo debido a su origen polifilético y a la incertidumbre taxonómica originada por los hallazgos obtenidos con técnicas moleculares, muchos autores prefieren usar una calificación del plancton basada en tamaños (picoplancton, 0.2 - 2 μm , nanoplancton, 2 - 20 μm y microplancton, 20 - 200 μm), así como también es usual una combinación de las anteriores nomenclaturas, por ejemplo microzooplancton (Wommack *et al.*, 1999; Ruppert y Barnes, 1996; Fogg, 1995).

En este trabajo, se usará el término nanozooplancton para describir los protozoos estudiados. Estos miembros del nanoplancton pueden alcanzar grandes abundancias y son los principales consumidores de bacterias en la

columna de agua. Su presencia por lo tanto, implicaría una importante transferencia de COP hacia los niveles tróficos superiores, así como un mecanismo de control de la abundancia de la comunidad bacteriana planctónica (Weinbauer y Höfle, 1998; Sherr *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1992).

Entonces la bacteriovoria en la columna de agua, en sistemas continentales y marinos, es dominado por los protozoos especialmente por flagelados nanoplanctónicos que obtienen toda su nutrición del consumo de otros organismos (Šimek y Chrzanowski, 1992; Güde, 1985). No se puede desconocer la participación en el control bacteriano de los protistos mixótrofos. La mixotrofia se define como el uso combinado de nutrición fototrófica y heterotrófica en un organismo simple (Caron, 2000). Estos organismos han sido observados como importantes componentes de la comunidad bacteriívora (Domaizon *et al.*, 2003; Strom, 2000; Sanders, 1991; Sanders y Porter, 1988).

Los bacteriívoros más activos son los flagelados de menores tallas (2 - 10 μm) como bodónidos, coanoflagelados y crisomonadinos. Se acepta que algunos relativamente grandes (5 - 50 μm) como ciertos euglenoides, criptomonadales y dinoflagelados, pueden consumir bacterias (Strom, 2000). Así mismo, algunos pequeños ciliados < 20 μm , pueden ser importantes en aguas productivas eutróficas (Muylaert *et al.*, 2002; Jürgens *et al.*, 1999; Šimek *et al.*, 1997; Sherr y Sherr, 1987). Finalmente, a pesar que ha sido reportado la bacteriovoria por algunos sarcodinos como radiolarios y foraminíferos, poco se sabe del impacto por pastoreo, se presume que es muy pequeño (Strom, 2000).

Strom, (2000) describe parte de los mecanismos que permiten la bacteriovoría. Para que se de, se necesita el encuentro, la captura e ingestión de la presa. La probabilidad de encuentro depende entonces no solamente de la abundancia de la presa (bacteria) y del predador sino de la turbulencia del medio acuático y del movimiento para acceder activamente a

sus presas sin ser afectados por la turbulencia. Los bacterióvoros tienen que solventar estos inconvenientes, por medio de mecanismos tales como la generación de corrientes unidireccionales o asimétricas, propulsión a chorro, o movimientos ondulantes a través de estructuras como cilios o flagelos. Algunas bacterias además pueden encontrarse asociadas dentro o en la superficie de partículas o microagregados suspendidos y algunos bacterióvoros poseen adaptaciones para acceder a estas (Jürgens y Güde, 1994).

Los protistos pastoreadores afectan negativamente la abundancia de las presas, sin embargo, una parte de la biomasa bacteriana ingerida es liberada como COD, lo que puede a su vez favorecer las tasas de crecimiento bacteriano. Ya ha sido demostrado que la asociación de protozoos y bacterias incrementa significativamente la disponibilidad de nutrientes (Gurung *et al.*, 2000; Bloem *et al.*, 1988; Güde, 1985).

Además de la regulación de la abundancia, los protozoos también pueden influenciar la estructura de la comunidad bacteriana. Tamaños, formas y división celular de las bacterias juegan un papel en la selección de presas por parte de los protozoos y conduce a la mortalidad de morfotipos específicos (Šimek *et al.*, 1999; Šimek *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 1997; Jürgens y Güde, 1994; Šimek y Chrzanowski, 1992).

Se ha observado frecuentemente que una de las consecuencias del fuerte pastoreo en medios naturales pelágicos, es la dominancia de células pequeñas en el bacterioplancton, acompañadas por una alta productividad secundaria de la comunidad (Šimek *et al.*, 1999; Pernthaler *et al.*, 1997). Šimek y Chrzanowski (1992) encontraron indicios de selectividad trabajando con sistemas experimentales y dos especies de bodónidos y un crisomonadido. Sus resultados mostraron una mayor ingestión de bacterias grandes (0.3 y 0.6 μm^3), lo que determinó una comunidad residual conformada por células de menor volumen ($< 0.1 \mu\text{m}^3$).

Aparentemente un protozoo pastorea sobre una bacteria si está dentro de sus rangos de selección de talla. El pastoreo selectivo de tallas, conduce al desarrollo de bacterias muy grandes o muy pequeñas. Las de mayor tamaño difícilmente son ingeridas por los protozoos en tanto que las muy pequeñas escapan y persisten, lo que resulta en la ocurrencia no solo de tamaños extremos sino también de complejas morfologías resistentes al pastoreo (Koch, 1996; Jürgens y Güde, 1994).

La selección de tallas determinará como la biomasa bacteriana es distribuida en los diferentes grupos funcionales. Se ha observado que puede favorecer el rápido crecimiento y/o la resistencia al pastoreo de especies o poblaciones, resultando un cambio en la composición de la comunidad bacteriana (Torsvik *et al.*, 2002; Jürgens *et al.*, 1999; Pernthaler *et al.*, 1997).

También se ha encontrado predominancia de crecimiento de formas morfológicamente complejas como espirales, agregados celulares, filamentos, etc. como mecanismo de resistencia al pastoreo. Esta situación se ha observado principalmente en sistemas meso-eutróficos, en los cuales la disponibilidad de nutrientes permite a las células mantener la actividad metabólica para sus requerimientos energéticos y la biosíntesis; más aún, el predominio de células muy pequeñas se ha evidenciado más en sistemas oligotróficos en los que la limitación por nutrientes reduce su actividad metabólica y posiblemente obliga a mantener una relación superficie volumen grande para solventar este déficit (Jürgens *et al.*, 1999; Chrzanowski y Šimek, 1990; González *et al.*, 1990). Las correlaciones significativas entre los picos máximos de las poblaciones de protozoos pastreadores, especialmente nanoflagelados heterótrofos, con la ocurrencia de una gran variedad morfológica bacteriana se han descrito en aguas continentales y marinas (Jürgens *et al.*, 1999; Šimek *et al.*, 1997).

DETERMINACIÓN DE LAS INTERACCIONES BACTERIAS – PROTOZOOS

La determinación de relaciones empíricas entre los protozoos y las bacterias ha contribuido a ampliar el entendimiento de la importancia de la bacteriovoria en el control de comunidad bacteriana, no solo en lo que a su abundancia se refiere sino también a aspectos como tamaño y diversidad morfológica. En términos generales se acepta que la predación de las bacterias por protozoos o lo que es lo mismo la bacteriovoria, podría llevar a un cambio en la estructura de la comunidad bacterioplanctónica. El conocimiento de esa interacción permitirá una mejor comprensión de la manera como el COP y el COD fluyen a través del bucle microbiano y en un futuro obtener datos precisos que permitan modelar la situación particular de cada cuerpo de agua.

Para estudiar las interacciones bacteria - protozoo se pueden usar datos obtenidos con la medición del consumo de bacterias por protozoos o métodos directos. Cuando a partir de datos de abundancia de las poblaciones de bacterias y de nanozooplankton, se pretenden establecer relaciones entre esas comunidades, se habla de métodos indirectos.

Métodos directos. Estos métodos involucran la estimación de parámetros como la tasa de ingestión de bacterias y la productividad bacteriana. En general estas metodologías son costosas, engorrosas y los resultados obtenidos son de difícil interpretación. Los datos empíricos han mostrado que cuando los bacterióvoros son los reguladores de la comunidad del bacterioplancton, el consumo de bacterias es casi igual o ligeramente menor a la cantidad de células que se producen por unidad de tiempo (Sanders *et al.*, 1992).

Métodos indirectos. Cuando se usan los métodos indirectos para encontrar interacciones entre bacterias y protozoos, se puede elegir trabajar relacionando más de una variable. Algunos autores establecen dichas

interacciones con datos de abundancia numérica de protozoos y bacterias, en tanto que otros relacionan valores de abundancia numérica de nanoplancton heterótrofo con biovolumen bacteriano (Strom, 2000).

Una variable numérica importante se obtiene al establecer una relación entre las densidades de bacterias y protozoos a partir de un cociente bacteria:protozoo, CBP. Fenchel (1986), propuso que en aguas marinas este CBP está alrededor de 1000:1; Sanders *et al.* (1992), comprobaron en una compilación de los resultados de 600 trabajos que esta proporción se cumple para varios cuerpos de agua en la naturaleza excepto en los casos de aguas eutrofizadas en las cuales este cociente es mayor.

Por otra parte, la presencia de nanoplancton heterótrofo en sistemas acuáticos, puede cambiar la distribución de tamaños del bacterioplancton. Los estudios han mostrado interacciones en la abundancia del nanoplancton con el biovolumen bacteriano. El incremento en la abundancia de los protozoos coincide con un aumento en la frecuencia relativa de tallas más pequeñas ($0.05 - 0.1 \mu\text{m}^3$) de las bacterias, por el contrario en ecosistemas en los cuales se ha encontrado poca y aún ausencia de bacteriovoria se ha observado que aumentan las frecuencias de aparición de bacterias de tallas más grandes ($0.1 - 0.35 \mu\text{m}^3$) (Strom, 2000; Šimek y Chrzanowski, 1992).

ESTIMACIÓN DE LA ABUNDANCIA BACTERIANA Y DE PROTOZOOS

La determinación de atributos tales como densidad, biomasa, tasas de crecimiento, reproducción, sobrevivencia, mortalidad, etc. son elementos esenciales que contribuyen a describir las poblaciones, que en conjunto pueden contribuir al entendimiento de las interacciones que se dan al interior de la comunidad microbológica.

Muchos de estos elementos pueden estimarse por medio de métodos que miden la abundancia o el número de individuos en relación a un espacio

(volumen) por medio de recuentos directos e indirectos de células o microorganismos, o a través de la medición de la actividad fisiológica, la biomasa y el volumen celular (Atlas y Bartha, 2002).

Recuento de bacterias. El método más empleado actualmente para el recuento de bacterias es la técnica directa con microscopia de epifluorescencia, acoplada al uso de fluorocromos como el 4'6'-diamino 2-fenilindol (DAPI), el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o la naranja de acridina (AO) (Turley, 1993). El método permite calcular el número total de células presentes en un volumen determinado de muestra (Atlas y Bartha, 2002; Kepner y Pratt, 1994). Esta técnica se ha usado desde la década de los 70 y se considera el método tradicional y de rutina para el recuento bacteriano.

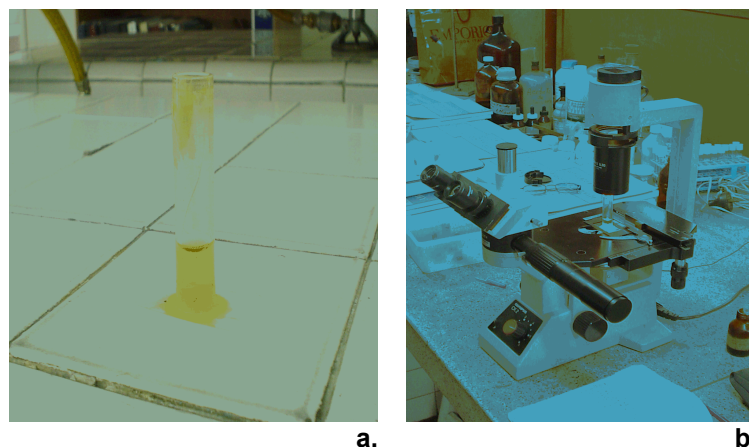


Figura 2. Elementos para recuento de nanozooplankton con cámara de sedimentación (a) y microscopio invertido (b).

Recuento de protozoos. El método más usado es la técnica del microscopio invertido (APHA, 1995; Reid, 1983; Lund *et al.*, 1958; Utermöhl, 1958). El procedimiento comprende una etapa de fijación, su montaje en cámaras Utermöhl (figura 2a) para la concentración de la muestra y el recuento con ayuda de microscopio invertido al que se le ha adaptado una retícula ocular (figura 2b). Aunque el procedimiento es relativamente fácil y barato, no es muy útil en el caso del nanozooplankton. Las mayores dificultades están en la concentración de la muestra, pues se pueden perder

las formas más pequeñas; en la fijación con lugol, lo que dificulta la distinción entre organismos fotótrofos y heterótrofos, especialmente de los más pequeños; y, la naturaleza de la muestra, como por ejemplo la presencia de material en suspensión lo que complica el conteo (APHA, 1995; Wetzel y Likens, 1991; Herbert, 1990,).



Figura 3. Microscopio de epifluorescencia.

La técnica directa con microscopio de epifluorescencia (figura 3), también se ha utilizado para obtener datos numéricos de organismos planctónicos eucariotas, sin embargo todavía se busca mejorar el tipo de fluorocromo a usar, el tamaño de poro de los filtros, el volumen de la muestra que se filtrará y otros pormenores técnicos que permitan su uso con más confiabilidad para el recuento de esas poblaciones. Una de las ventajas de este procedimiento es que permite contar, en una misma muestra, las poblaciones autótrofas y las heterótrofas. Para ello se toman dos porciones de la muestra. Una parte se filtra sin colorear, solo los organismos autótrofos se contarán, ya que la clorofila *a*, presente en el fitoplancton, fluoresce rojo cuando se excita con luz azul y ultravioleta, los otros organismos no se pueden ver. La segunda porción de la muestra, se mezcla con un fluorocromo, en este trabajo se usó la naranja de acridina que se une a los ácidos nucleicos de los organismos autótrofos y heterótrofos, por lo que se pueden contar ambas poblaciones. Cuando se usa luz con la longitud de onda específica para el fluorocromo

usado se obtiene un conteo total de eucariotas en la muestra. La diferencia entre esta población total y la población de autótrofos permite obtener el total de la población de heterótrofos. Una ventaja adicional de este método es que permite con la ayuda de una retícula y/o de análisis de imagen obtener datos de tamaño de la fracción que interesa, en este caso el nanozooplancton (2 – 20 μm).

DETERMINACIÓN DE VOLUMEN CELULAR BACTERIANO

El volumen celular o biovolumen (cantidad de espacio que ocupa la materia viva) así como la biomasa (cantidad de energía almacenada por un segmento particular de la comunidad biológica o la cantidad de materia viva expresada en unidades de peso o energía), son variables ecológicas de suma importancia. Se emplean para determinar la producción de una población y la transferencia de energía entre los diferentes niveles tróficos (Bratbak, 1993; Psenner, 1993).

Los datos resultantes del estudio del volumen celular del bacterioplancton han mostrado su utilidad en la indicación de la disponibilidad de recursos y de la potencialidad de esa comunidad para responder a la presión por predación por protozoos o por lisis viral. Por ejemplo, en medios naturales oligotróficos, hay una dominancia de células de pequeño tamaño (menores a 0,3 μm), aparentemente la mayor relación superficie volumen de las células más pequeñas aumentaría la difusión de nutrientes (Koch, 1996). Varios autores han mostrado cambios en la estructura y la abundancia de la comunidad bacteriana en respuesta a mecanismos de control que han denominado "top-down" en los cuales la bacteriovoria y la lisis viral se han estudiado de manera continua. Como los organismos nanozooplancónicos son los responsables de la transferencia potencial de materia a niveles tróficos superiores, la determinación de relaciones empíricas entre el volumen celular bacteriano y la abundancia de protozoos nanoplancónicos puede ampliar el entendimiento de la importancia de la bacteriovoria en el

control de la abundancia y de la estructura de tamaños y morfologías del bacterioplancton (Jürgens *et al.*, 1999; Šimek y Chrzanowsky, 1992; González *et al.*, 1990)

Existen varios métodos para la estimación del biovolumen bacteriano que se apoyan de herramientas como la microscopia electrónica y la microscopia de epifluorescencia. Los métodos con microscopia electrónica no son muy usados puesto que además de consumir mucho tiempo, son costosos y durante la fijación pueden causar disminución del tamaño de las células (Bratbak, 1993; Fry, 1990).

Los métodos con microscopía de epifluorescencia son más utilizados porque además de prácticos son menos costosos (Bratbak, 1993; Lee, 1993; Fry, 1990). En algunos de ellos, los tamaños de las bacterias pueden ser medidos directamente al microscopio, por proyección o indirectamente de fotografías (Bratbak, 1993; Fry, 1990; Fuhrman, 1981). Las mediciones se hacen con micrómetro o a partir de un dibujo obtenido por delineado de la imagen bacteriana sobre la pantalla con un lápiz o marcador (Psenner, 1993; Bratbak, 1993).

Análisis de imagen. El análisis de imagen permite la captura, digitalización, ampliación, segmentación, edición y procesamiento de una imagen con el fin de obtener información de una o varias variables con aplicaciones en el estudio de la ecología microbiana (Caldwell *et al.*, 1992; Fry, 1990).

La combinación de la técnica de epifluorescencia con el análisis de imagen es el método más usado en la actualidad para la determinación del biovolumen de las bacterias. Una de las ventajas de su uso es que en un mismo procedimiento se pueden contar las bacterias presentes de la muestra y obtener datos morfométricos. El uso de la fluorescencia permite obtener imágenes de una mejor calidad, puesto que se resaltan las diferencias entre las bacterias y su fondo. También los datos son más precisos y objetivos que aquellos que se logran de manera directa con el ojo

humano. Dependiendo del software usado, se pueden hacer mediciones rápidas de muchos organismos, sin embargo, los patrones de reconocimiento tienen el inconveniente de requerir tiempo y esfuerzo (Psenner, 1993; Bratbak, 1993; Fry, 1990).

En síntesis el sistema digitaliza la imagen de las células fluorescentes en un campo microscópico. La imagen entonces puede ser guardada, editada, analizada para realizar un recuento total y la medición de parámetros individuales como tamaño y forma. Los resultados pueden imprimirse o almacenarse en una base de datos para posteriores resúmenes estadísticos descriptivos e histogramas de frecuencias (Psenner, 1993; Lee, 1993; Fry, 1990).

A continuación se presenta una descripción del análisis de imagen. En la figura 4 se muestra el procedimiento general.

Imagen original. Esta imagen se obtiene directamente al microscopio de epifluorescencia. En este paso se selecciona al azar el sitio de captura de las imágenes, evitando áreas con grumos de detritos u organismos planctónicos grandes ya que las bacterias en tales circunstancias no pueden medirse correctamente (Psenner, 1993; Fry, 1990).

Cámaras de video. Este equipo se adapta al microscopio y permite la adquisición de una imagen en video de las bacterias teñidas con el fluorocromo. En la mayoría de estudios se emplean cámaras monocromáticas por su alta sensibilidad a la luz, sin embargo actualmente se usan cámaras a color que aunque facilitan el procesamiento aumentan los costos de operación (Verity y Sieracki, 1993; Sieracki, 1989).

Adquisición y almacenamiento de la imagen monocromática. En este proceso la imagen compuesta es segmentada, es decir, se le asigna una serie de valores de gris y la imagen pasa a ser digital monocromática. Esta imagen puede ser almacenada en el sistema. Para realizar esta operación se

debe contar con software y hardware adecuados, que son los que finalmente constituyen el verdadero sistema de análisis de imagen. Hay una gran variedad de software en el mercado, con herramientas que posibilitan almacenar un gran número de imágenes con una buena calidad (Psenner, 1993; Fry, 1990; Sieracki *et al.*, 1985). Dependiendo de la cámara usada, la imagen tendrá más o menos niveles de gris en cada píxel. Un píxel se define como la más pequeña unidad de una imagen visualizada en una pantalla (Morris, 1991). Este factor eventualmente limita la resolución, aunque algunos instrumentos pueden usar varias herramientas matemáticas para medir tamaños a la exactitud de un infrapíxel.

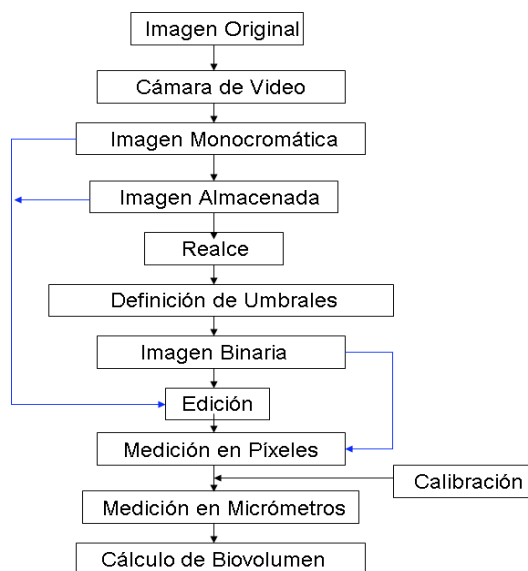


Figura 4. Procedimiento general del análisis de imagen para la estimación de biovolumen bacteriano. Las líneas en azul son caminos alternos (Tomado y modificado de Fry, 1990).

Realce de la imagen y definición de umbrales. Lo que se persigue en esta etapa es lograr la mejor definición posible de los límites de los objetos a medir con respecto al medio en el que se encuentran. Existen herramientas de realce o algoritmos (conjunto ordenado y finito de operaciones para hallar la solución a un problema) que permiten corrección de sombras así como la posibilidad de disminuir el ruido de fondo y modificar el contraste para reducir los halos de las células. Tales técnicas automatizadas, toman poco tiempo computando y eventualmente solucionan el problema de imágenes en las cuales se aprecian bacterias con diferente brillo en el mismo campo

visual, lo que implica diferentes niveles de umbral. Cuando se usan estos algoritmos se debe tener cuidado para no modificar el tamaño real de los objetos a medir. El establecimiento del umbral de la imagen realizada antiguamente se hacía de manera manual, mientras se observaban ambas imágenes superpuestas, recientemente se han desarrollado técnicas semiautomáticas y automáticas (Sieracki *et al.*, 1989).

Obtención de la imagen binaria. Los niveles iniciales de gris de la imagen deben ser convertidos a una imagen binaria antes de la medición. La imagen binaria es creada por la detección de píxeles luego del establecimiento de un umbral que define que límites son considerados parte del objeto pues serán los eventualmente medidos; es posible que esta operación queden algunos píxeles de la imagen sin detectar (Psenner, 1993).

Edición. Uno de los principales problemas de la técnica de análisis de imagen es la definición de la silueta de las imágenes con respecto a su fondo. En el caso de las muestras que se tiñen con fluorocromos, se presentan varios tipos de problema. Los más frecuentes incluyen el llamado efecto de halo, esto es un intenso brillo alrededor de los objetos lo que aparentemente aumenta su tamaño, el otro se refiere a la presencia de un intenso brillo de fondo y por último la obtención de imágenes en las cuales algunas bacterias quedan desenfocadas por presencia de varios planos en un filtro. Los problemas anteriores pueden ser causados por un gran número de factores que van desde el tipo de muestra, la calidad del procedimiento utilizado, las limitaciones ópticas debido a la resolución de la luz del microscopio y/o el tamaño del píxel del analizador de imagen. Lo anterior ha llevado a que todavía no haya consenso de cómo juzgar cual es el verdadero límite de la bacteria que se va a medir. Por lo anterior la imagen binaria puede ser editada para remover escombros y a veces añadir lo que no se detectado. La edición puede ser manual o automática, pero la primera puede consumir mucho tiempo y debe ser evitada en lo posible (Psenner, 1993; Fry, 1990). La edición automática de caracteres se ha beneficiado de rutinas de erosión (remoción de píxeles alrededor de un objeto) seguidas de

dilataciones (adición de píxeles). Estos procedimientos además pueden separar bacterias muy juntas y remover ruido debido a simples o pequeños grupos de píxeles. La mayoría de estos sistemas tienen caracteres de edición tanto manuales como automáticos, que posibilitan crear rutinas para rellenar huecos y separación de círculos (Psenner, 1993; Fry, 1990).

Medición y cálculos de biovolumen. Una vez la imagen es editada, se pueden realizar mediciones de campo o de caracteres específicos. Las mediciones de campo permiten describir las propiedades de un campo de visión completo como su área y perímetro. Las mediciones de carácter específico, por el contrario, permiten obtener información sobre los objetos que hay en el campo, por lo que se pueden estimar parámetros como número total de células o de objetos, su largo, ancho, redondez, etc. (Leica, 1996). El tipo y número de mediciones de campo y de los objetos en el, dependen del software utilizado.

Los datos de volumen celular no pueden ser estimados directamente de las imágenes bidimensionales que toma el sistema, por lo que se tienen en cuenta algunas mediciones lineales para convertirlas en biovolumen por medio de fórmulas. Los cálculos pueden ser hechos por el software del analizador de imagen o por otro programa dentro del computador (Bratbak, 1993; Fry, 1990).

Para obtener el biovolumen de los objetos en el campo, se han utilizado entre otras tres ecuaciones, que se introducen al programa y posibilitan emplear mediciones lineales específicas como largo (L), ancho (A) y/o radio (r). En la primera se asume que las bacterias tienen formas cocoides por lo que se utiliza la ecuación del volumen de la esfera ($V = 4/3\pi.r^3$). La segunda asume que las células tienen forma bacilar entonces se usa la ecuación del cilindro ($V = \pi.\{(3L-A)/3\} \{A/2\}^2$). La última se utiliza para las bacterias de forma cocobacilar por lo que se usa la ecuación del esferoide oval ($V = 4/3\pi.\{L/2\}.\{A/2\}^2$) (Lee, 1993; Bratbak, 1993).

Es difícil hacer mediciones de bacilos curvados o espirilos, sin embargo se puede con ayuda de las fórmulas anteriores hacer estimaciones razonables. Adicionalmente, debido a la dificultad de obtener datos aproximados del largo central de un bacilo curvado o de un espirilo, se recomienda establecer las mediciones de largo y ancho de una manera manual (Fry, 1990).

Problemas del método. Algunos inconvenientes o desventajas del empleo del análisis de imagen tienen que ver con que algunas bacterias, organismos planctónicos y detritos, producen imágenes muy densas que dificultan y aún imposibilitan el análisis de imagen, por otro lado, los números de bacterias deben ser altos para analizar varias decenas o cientos de células por imagen capturada y así agilizar el tiempo de operaciones (Fry, 1990). En la siguiente lista se enumeran algunas de las limitaciones reconocidas por Lee (1993), Bratbak (1993), Psenner (1993) y Sieracki *et al.* (1985).

- La resolución limitada del microscopio dificulta la precisión sobretodo de las medidas de bacterias pequeñas.
- La calibración del equipo solo es posible con microesferas fluorescentes.
- El criterio para excluir el halo de las imágenes.
- Aun cuando el sistema se basa de manera semiautomática toma alrededor de 30 minutos para medir 500 células por muestreo.
- A pesar que los sistemas cada vez son más baratos y mejores, el método todavía es caro.
- El limitado tiempo de exposición a la luz para la obtención de la imagen

METODOLOGÍA

Área de estudio

El embalse del Neusa hace parte de una reserva natural de la cordillera oriental llamada parque Río Neusa. Está ubicado en el departamento de Cundinamarca, a 70 Km. al nororiente de Bogotá y a 20 Km. al norte de Zipaquirá; sus coordenadas geográficas son 5° 8'30'' de latitud N y 73° 58'28'' de longitud O. La región se puede considerar de acuerdo a su altura (2960 m.s.n.m.) y temperatura media anual como una zona de transición denominada subpáramo (CAR, 1968).

La zona presenta un régimen bimodal de lluvias con una precipitación máxima en abril y octubre y mínima en junio a agosto y diciembre. Los principales afluentes son los ríos Las Juntas y Cubillos, que aportan cerca del 70% del volumen total del agua que recibe el embalse (CAR, 1968). El embalse es de aguas claras y presenta fondo anóxico en algunos períodos del año. De acuerdo a los niveles de nutrientes y su moderada cantidad de bacterias puede considerarse como un sistema mesotrófico (Canosa y Pinilla, 1999; Canosa y Pinilla, 1995).

Estaciones de muestreo

Para evaluar la variación espacial de las variables biológicas se definieron un total de ocho estaciones, siete de ellas localizadas en el embalse y una en el río Cubillos que es el principal afluente de sistema (figura 5). Estos sitios de muestreo fueron ubicados en los mismos puntos definidos en el macroproyecto en el cual se enmarca el estudio (Canosa y Niño, 2004). Para ello se tuvo en cuenta estudios previos y las características ambientales de cada lugar.

De esta forma, para el muestreo horizontal se consideraron la zona litoral cercana a la desembocadura del río Las Juntas (estación 1), el centro del embalse o Chapinero superficial (estación 2), la presa en la superficie (estación 5) y el río Cubillos (estación 8). La variación vertical de las mismas variables se estudió muestreando tres profundidades, la zona superficial, intermedia y fondo, en las estaciones Chapinero (estaciones dos, tres y cuatro) y en la presa (estaciones 5, 6 y 7) (figura 5).

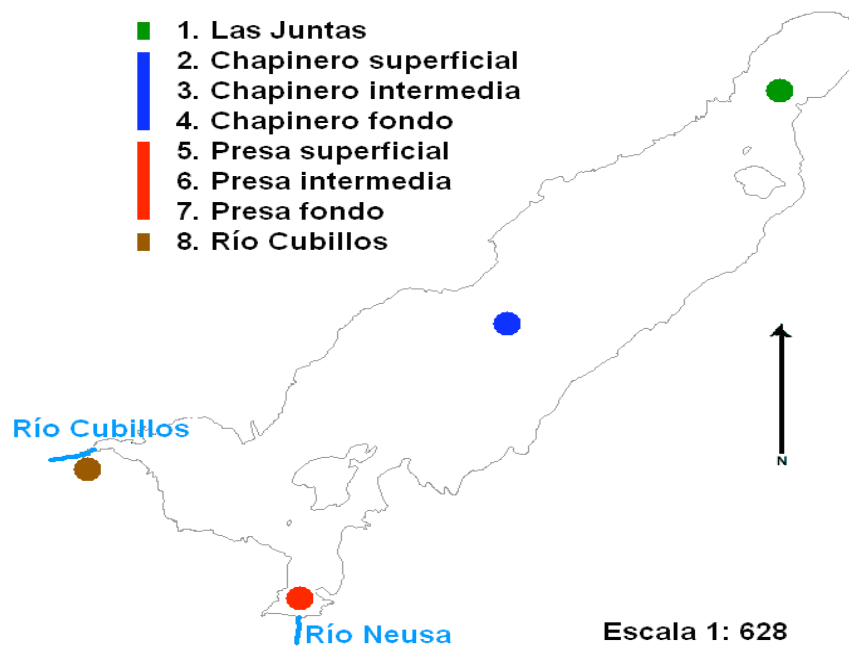


Figura 5. Embalse del Neusa, ubicación aproximada de las estaciones de muestreo.

Con el fin de establecer tendencias generales de las variables biológicas a estudiar, los datos se agruparon por sitios de muestreo (Las Juntas, Chapinero, la presa y Río Cubillos) y por zonas o estratos en el perfil vertical de la columna de agua (superficial, intermedio y fondo). El estrato superficial, se definió por la zona fótica, que corresponde al estrato donde penetra la luz en la columna de agua (estaciones 2, 3 y 5), el estrato intermedio, por debajo de la zona de compensación de la luz (estaciones 4 y 6), ambos establecidos de acuerdo con la profundidad del disco Secchi. El fondo o zona profunda, como la profundidad máxima en la estación de la presa (estación 7).

Periodicidad del muestreo

Para describir la variación temporal de las variables biológicas se realizaron muestreos mensuales durante un período de diez meses tratando de abarcar épocas climáticas secas y lluviosas. En la tabla 1 se resumen las fechas de muestreo, las estaciones y las profundidades a las que se realizaron.

Tabla 1. Fechas de muestreo, profundidad y programación de procesamiento de las muestras del nanozooplancton.

Ubicación estaciones		Las Juntas		Chapinero		La Presa			Río Cubillos	Variables biológicas		
Estación		1	2	3*	4*	5	6	7	8			
Muestreo	Fecha de muestreo	Profundidad (metros)								Fluorescencia Sedimentación		
										B	N	N
1	27-jul-04	0.5	0.5	1	5	0.5	12	20	0.5	X	X	X
2	26-ago-04	0.5	0.5	2	4	0.5	13	24	0.5	X	-	X
3	16-sep-04	0.5	0.5	5	12	0.5	10	27	0.5	X	X	X
4	05-Oct-04	0.5	0.5	5	9	0.5	6	20	0.5	*	*	*
5	09-nov-04	0.5	0.5	7	12	0.5	8	18	0.5	X	-	X
6	09-dic-04	0.5	0.5	7	11	0.5	10	20	0.5	X	X	X
7	01-feb-05	0.5	0.5	3	6	0.5	9	20	0.5	X	X	X
8	22-feb-05	0.5	0.5	4	8	0.5	8	25	0.5	X	-	X
9	15-mar-05	0.5	0.5	5	10	0.5	10	20	0.5	X	-	X
10	12-abr-05	0.5	0.5	6	11	0.5	10	20	0.5	X	X	X

B : Bacterias.

N: nanoplancton heterótrofo.

- : Estaciones no muestreadas para conteo de nanozooplancton.

* : Muestreo no procesado por problemas con la técnica de epifluorescencia.

Adicionalmente, en el presente trabajo se definieron cuatro épocas durante el tiempo de estudio con base en los valores de precipitación y evaporación total, para agrupar e interpretar mejor las variables biológicas. Los periodos entre julio-agosto y marzo-abril (periodo intermedio o de lluvias moderadas), correspondieron a precipitaciones entre 50 y 100 mm/mes. El periodo entre septiembre-noviembre, se definió como la época seca, con un nivel de precipitación superior a los 100 mm/mes (periodo de lluvias); y el periodo diciembre-febrero, por niveles de precipitación menores a 50 mm/mes y evaporaciones superiores a la precipitación.

Muestras biológicas

En la tabla 1 se muestran las épocas en las cuales se muestreó para la medición de las variables biológicas. En todos los casos las muestras se tomaron por triplicado. Debido a los costos, en el caso del conteo de los protozoos con epifluorescencia, se tomó una única muestra por estación, en las salidas 1, 3 y 10. **Conteo de bacterias** Las muestras superficiales se recolectaron manualmente a 0.5 m de profundidad, en frascos estériles. Las de profundidad, se tomaron con una equipo muestreador Zobell con botellas estériles (figura 6a). Las muestras se fijaron con glutaraldehido buferado (GTA-B) hasta concentración final de 2.5%. **Conteo de nanozooplankton.** Se tomaron en cada estación dos tipos de muestras, una sin adición de fijador se usó para el recuento con la técnica de epifluorescencia. La otra se empleó en el recuento con cámaras de sedimentación con microscopio invertido. En este caso, las muestras superficiales se tomaron manualmente y las de profundidad con botella Alfa horizontal (figura 6b), se usaron frascos de plástico opacos aforados a 100 ml y se fijaron con lugol hasta concentración final de 1% (Hertbert, 1990, Lund *et al.*, 1958). Todas las muestras se transportaron refrigeradas y protegidas de la luz (Canosa y Pinilla, 1998; APHA, 1995; Kepner y Pratt, 1994; Sherr y Sherr, 1993; Hertbert, 1990; Lund *et al.*, 1958).

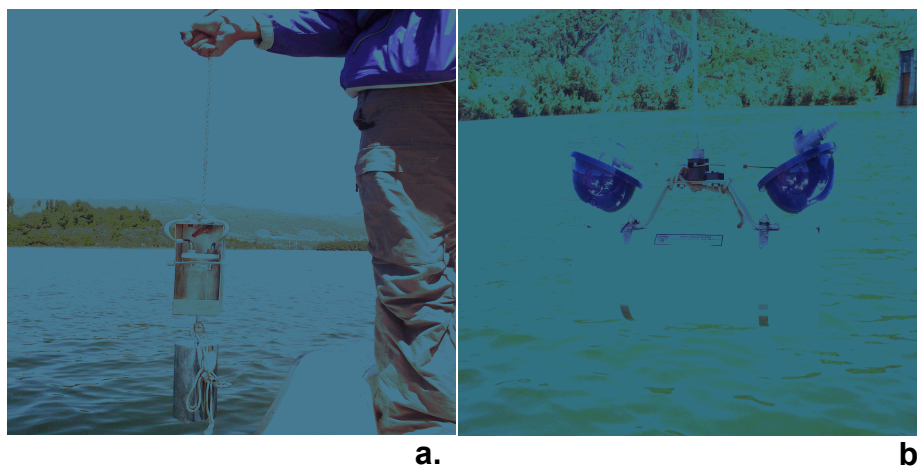


Figura 6. Equipo empleado para la recolección de muestras en la columna de agua. a. Botella muestreadora ZoBell. b. Botella alfa horizontal.

Fase de laboratorio

RECUESTO TOTAL DE BACTERIAS

Para el recuento total de bacterias se empleó la técnica directa de conteo por epifluorescencia según la metodología estandarizada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano de Bogotá (Canosa y Pinilla, 1999; Canosa, 1998) basada en la técnica de Hobbie *et al.* (1977) y Kepner y Pratt (1994).

Las muestras se almacenaron fijadas en nevera a 4°C durante un tiempo no mayor a tres semanas. En el procesamiento, primero se homogenizaron por agitación mecánica con vórtex, se diluyeron con agua desionizada estéril y se teñieron con naranja de acridina (AO) hasta una concentración final de 0.1% o 100 µg/ml durante un tiempo de exposición de 5 minutos. Se diluyeron para obtener entre 20 a 30 células por campo. Posteriormente se filtraron 2 ml de la muestra teñida, sobre una membrana negra tipo Isopore o Nucleopore de policarbonato de 25 mm de diámetro y 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore, GTBP02500). El equipo de filtración constaba de manifold, túnel de filtración y bomba de vacío. La presión de vacío aplicada fue menor a 80 mm de Hg o 5 pulgadas de Hg para evitar rompimiento de las células en su paso a través de la membrana. Finalmente se retiró la membrana seca con pinzas y se extendió sobre una lámina portaobjetos, se colocó una lámina cubreobjeto usando aceite de inmersión de baja fluorescencia. Las láminas fueron analizadas inmediatamente o se almacenaron en oscuridad y a -20°C.

RECUESTO Y ESTIMACIÓN DE VOLUMEN CELULAR BACTERIANO CON ANÁLISIS DE IMAGEN

El número de bacterias y su volumen celular se determinaron mediante la técnica de análisis de imagen según la metodología validada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano por Canosa (1998) y Canosa *et al.* (2000), de acuerdo a la metodologías

sugeridas por varios autores (Norland, 1993; Lee, 1993; Bratbak, 1993; Fry, 1990; Sieracki *et al.*, 1989; Fuhrman, 1981).

El programa empleado para la adquisición, procesamiento de imágenes, recuento y medición de caracteres celulares fue el Leica Qwin Standard versión 2.2. Los pasos de calibración, es decir la determinación de cuanto mide un píxel, ya había sido establecido en un proyecto anterior en el Laboratorio y era parte integral del software con el que se trabajó en esta tesis. El valor de cada píxel en las imágenes tomadas fue de 0.055 μm , todas aquellas imágenes menores a 10 píxeles fueron rechazadas. Lo anterior debido a que 10 son las veces que el área de un píxel cabe en el área de la bacteria más pequeña, que en teoría se puede encontrar en el picoplancton y posee un diámetro de 0.2 μm .

El procedimiento general del cual se habló en el marco teórico fue organizado en una rutina de trabajo semiautomática (anexo A). El proceso se resume en los siguientes pasos:

- 1. Adquisición de la imagen.** Las imágenes fueron almacenadas en el software del computador, segmentada en 256 tonos de grises. Este proceso se realizó de manera manual. En la figura 7, se observa la imagen de un campo de una preparación de epifluorescencia tomado por la cámara monocromática.

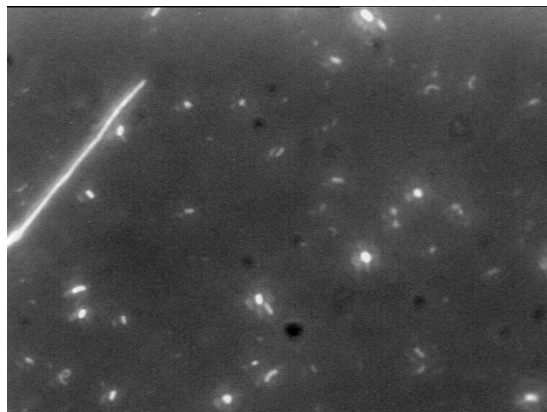


Figura 7. Imagen Monocromática de un campo de una preparación de bacterias teñidas con AO. Los objetos blancos son las bacterias.

- 2. Procesamiento de la imagen.** Una vez la imagen fue adquirida, pasó por una serie de algoritmos con el fin de separar claramente las células del fondo. Utilizando el lenguaje del programa se usó la construcción de una máscara y la definición de semilla. La construcción de la máscara hace referencia al filtro que define los límites y el tamaño real de las células y permite la reconstrucción de estas a partir de un punto de partida detectado llamado semilla. Para la construcción de una máscara de mejor calidad se utilizaron dos vías alternativas dependiendo de las características de la imagen original. La primera usada para imágenes con buen contraste (células brillantes sobre un fondo oscuro), la segunda para imágenes con objetos muy brillantes y fondos muy claros (fluorescencia de fondo). Los algoritmos empleados se describen en el anexo A.

- 3. Edición de la imagen en gris.** La imagen fue arreglada manualmente cuando no hubo una clara separación entre los niveles del gris y los límites bien definidos del objeto, comparándola con la imagen original al microscopio antes de ser procesadas. Se rechazaron las interferencias u objetos brillantes, se rellenaron espacios, se unieron o se separaron largos filamentos que fueron segmentados. Automáticamente el programa realizó una reconstrucción geodésica de los objetos a partir de la semilla hasta ocupar el tamaño de las células detectadas en la máscara anteriormente elaborada. Después de este paso, se efectuó una última revisión para confirmar que todas las células fueran detectadas y que el tamaño reconstruido fuera consistente con la imagen original.

- 4. Recuento y medición de caracteres.** Se determinaron el número de objetos, para obtener la abundancia así como su área, perímetro, largo, ancho y redondez. En cada filtro se contaron mínimo 200 células seleccionadas al azar. La cantidad total de células se determinó por la fórmula:

Número de bacterias /ml = $N \times F \times D / V$

En donde:

N = Número de células promedio por imagen.

F = Número de veces que cabe el área de la pantalla de medición (2481.8 μm^2) en el área efectiva de filtración (22.698.000 μm^2).

D = Inverso de la dilución.

V = Volumen filtrado de la muestra teñida (2 ml).

- 5. Estimación del biovolumen.** Para obtener los datos de biovolumen se eligió la fórmula propuesta por Lee (2003), la ecuación es la del esferoide oval, que se considera que funciona bien para los cocos, bacilos y espirilos.

$$\text{Biovolumen } (\mu\text{m}^3) = 4/3\pi \cdot (L/2) \cdot (A/2)^2$$

Donde:

L = largo; A = ancho

- 6. Almacenamiento de los datos.** Todas las medidas obtenidas incluyendo los números de bacterias así como los caracteres medidos fueron almacenados en una base de datos en el programa de Microsoft *Excel* de *Windows XP* para su análisis posterior.

RECUESTO TOTAL DE PROTISTOS

Para el recuento de protozoos nanoplanctónicos, se utilizarán dos métodos. El método tradicional con cámara de sedimentación y microscopio invertido (Lovejoy *et al.*, 2002; APHA, 1995; Hertbert, 1990; Lund *et al.*, 1958) y el método con microscopía de epifluorescencia. Este último método fue

modificado a partir de un protocolo elaborado en un trabajo anterior realizado en el Laboratorio de Microbiología de la UJTL (López, 2002).

Recuento total de protozoos nanoplancónicos con cámara de sedimentación y microscopio invertido

Esta técnica se basó en la metodología sugerida por Utermöhl (1958), Lund *et al.* (1958) y Herbert (1990). En el procedimiento se adicionaron 5 ml de cada una de las muestras de agua fijadas con lugol, bien homogenizadas, en las cámaras de sedimentación. En este trabajo se usaron cámaras construidas manualmente que consistían en cilindros de vidrio de 60 mm de altura y un diámetro entre 10.9 y 11.8 mm pegados con bórax por uno de los dos extremos planos a una laminilla cubreobjeto de 22 x 40 mm (figura 8). Cada muestra se dejó precipitando por un período no menor a 24 horas en una superficie plana y horizontal para no alterar la distribución de los microorganismos en el fondo de la cámara.

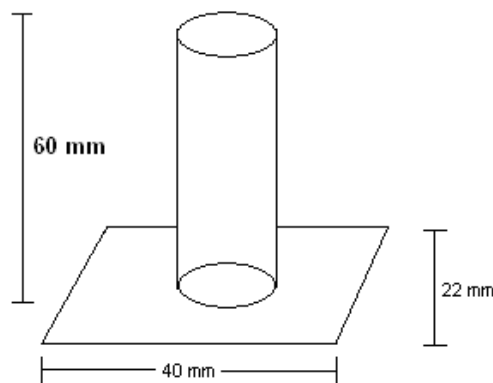


Figura 8. Representación de las cámaras de sedimentación empleadas para el conteo de nanozooplancton.

Para obtener los datos de abundancia se usó un microscopio invertido Olympus ULWCD, provisto de una retícula ocular de 10 mm de lado. Se usó como aumento final 1250X. Durante el conteo se seleccionaron los campos al azar, tratando de cubrir la mayor parte del fondo de cada cámara evitando los extremos. Se contaron todos los organismos que quedaron en el interior

de la rejilla, incluso aquellos situados en el límite de esta, siempre y cuando la mayor parte de su estructura estuviera adentro.

Se contaron un número aproximado de 200 células por cámara excepto en aquellos casos en los cuales las muestras eran muy diluidas o con mucha materia orgánica, en estos eventos se contaron hasta 270 campos por cámara. En este último caso, para obtener un mayor número de organismos, se hizo una variación de la técnica que consistió en retirar parte del sobrenadante y adicionar más muestra para sedimentar en un período de tiempo adicional de 24 horas. Los recuentos incluyeron organismos protistos, específicamente del nanoplancton heterótrofo para lo cual se tuvo en cuenta su tamaño (entre 2 y 20 μm), su coloración (vinotinto u oscuro), su forma y agrupación así como la presencia de estructuras (flagelos y cilios). Se utilizaron algunas claves para la selección de los organismos a contar de acuerdo a su morfología (Ruppert *et al.*, 2004; Patterson, 2003; Ruppert y Barnes, 1996). Cuando se presentaron grumos, se contaron solo los organismos claramente reconocibles presentes en su superficie.

Para la obtención de número total de heterótrofos nanoplanctónicos por mililitro, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Células /ml} = N \times F \times D / V$$

En donde:

N = Número de células promedio por retícula.

F = Veces que cabe la retícula en el área de sedimentación de la cámara, este número varío de acuerdo a la cámara usada

D = Inverso de la dilución, se tiene en cuenta el volumen que se adicionó del fijador.

V = Volumen sedimentado

Recuento total de nanoplancton heterótrofo por microscopia de epifluorescencia

La técnica de epifluorescencia empleada en este estudio fue descrita por Sherr *et al.* (1993) y Davis y Sieburth (1982). Una característica de la técnica es que permite contar los organismos autótrofos y los heterótrofos presentes en cada muestra. La diferencia en la metodología es que la muestra para el conteo de autótrofos no se colorea con fluorocromo en tanto que aquella para el conteo total sí. De manera resumida el procedimiento usado fue el siguiente:

Se tomó un volumen de la muestra sin fijar, se le agregó AO hasta una concentración final de 0.1% (100 µg/ml) y se dejó reaccionar durante tres minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Dependiendo de la cantidad de partículas en suspensión, que pueden causar taponamiento, se filtraron de 5 a 30 ml de la muestra teñida. Se usaron filtros blancos Nucleopore tipo Isopore (Millipore, referencia ATTP02500) de policarbonato, con un diámetro de 25 mm y 2 µm de diámetro de poro. Durante la filtración se usó una presión de vacío entre cinco y diez pulgadas de mercurio. Luego se lavó cada filtro con agua desionizada estéril para arrastrar posibles organismos adheridos en las paredes del túnel de filtración. Posteriormente el filtro se colocó sobre una lámina portaobjetos, antes de colocar el cubreobjetos, se agregó sobre cada filtro una gota de aceite de inmersión de baja fluorescencia. Las preparaciones fueron almacenadas en refrigeración y protegidas de la luz hasta su conteo.

Para obtener el número total de nanoplancton (autótrofo y heterótrofo) se contó en la preparación teñida con el fluorocromo, usando luz de excitación con longitud de onda azul, el número de células fluorescentes.

Para el número de nanoplancton autótrofo se contó a partir de la preparación sin teñir las células que se observaron rojas usando la excitación ultravioleta, (la clorofila *a* fluoresce en ese tono con radiación UV).

En ambos casos se contaron hasta un mínimo de 200 células por filtro en campos elegidos aleatoriamente. Para el recuento se utilizó una retícula colocada en el ocular del microscopio. Se contaron todas las células con fluorescencia roja, naranja o verde en el caso de las preparaciones con AO y las rojas en las preparaciones de autofluorescencia (figura 9a y b).

Se tuvieron en cuenta aquellas de morfología definida y con tamaños entre 2 a 20 μm . Se enumeraron todos los individuos que quedaron en los bordes de la retícula, siempre y cuando más del 50% de su estructura se encontrara dentro de la retícula.

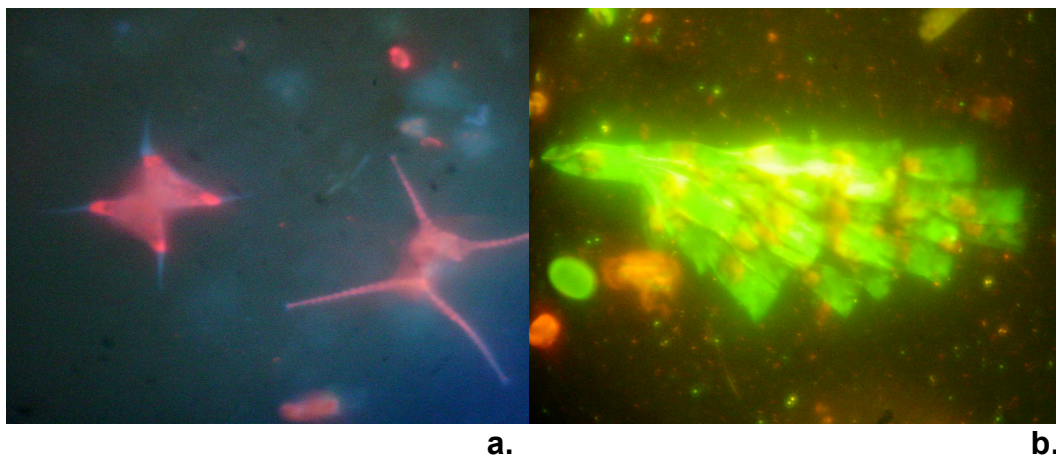


Figura 9. Imágenes de microorganismos eucariotas unicelulares por microscopia de epifluorescencia. a. Preparación de autofluorescencia. b. Preparación teñida con AO.

La densidad de células se determinó con la fórmula:

$$\text{Células /ml} = (\text{N} \times \text{F} \times \text{D}) / \text{V}$$

En donde:

N = Número de células promedio por retícula.

F = Veces que cabe el área de la retícula en el área efectiva 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

$F = \text{Área de filtración} / \text{Área retícula} = 226.98 / 0.01 = 22698$

D = Inverso de la dilución si la hay. En el caso del recuento de autótrofos no se utiliza. En el de heterótrofos fue de $10/9 = 1.11$

V = Volumen filtrado de la muestra.

A partir de la diferencia entre ambas densidades se obtuvo la abundancia de protozoos nanoplanctónicos:

Total de nanoplancton heterótrofo/ml = Total de nanoplancton autótrofo y heterótrofo/ml (muestra teñida con AO) - No. Total de protistos autótrofos/ml

Debido a algunas dificultades técnicas se hicieron algunas modificaciones al procedimiento para obtener mejores resultados, se mencionan las siguientes:

- Para obtener un mayor contraste entre los organismos fluorescentes y su fondo, los filtros blancos se tiñeron con una solución de negro de Irgalam (dos gramos de negro de Irgalam en un litro de ácido acético al 2%) durante diferentes períodos de tiempo. Se obtuvo un mejor contraste cuando los filtros se tiñeron por 24 horas. Los filtros teñidos se enjuagaron varias veces con agua desionizada, para eliminar el exceso de colorante. Se secaron con papel absorbente y se almacenaron hasta su uso (Šherr y Šherr, 1993).
- Debido a que los protozoos del nanozooplancton poseen una membrana celular flexible, aquellos de menor tamaño podrían bajo el influjo de la presión ejercida durante la filtración atravesar los poros de los filtros usados en este trabajo ($2 \mu\text{m}$), como consecuencia se podrían subestimar las densidades. Para evaluar esta situación en el séptimo muestreo se utilizaron además filtros con diámetro de poro de $0.8 \mu\text{m}$ en las muestras de las estaciones de la Presa (superficie, intermedia y fondo). Estos recuentos se realizaron por triplicado.

Fase de gabinete

Manejo de datos. Para el estudio de la información, los datos disponibles fueron introducidos en tablas de resumen en el programa Microsoft *EXCEL* de Office XP. A partir de estas tablas, se obtuvieron gráficas de barras y líneas para observar el comportamiento espacial, temporal y entre réplicas de las variables estudiadas. Además de la información biológica lograda en el presente trabajo, se usaron datos hidrológicos y fisicoquímicos obtenidos de otras fuentes. Los datos de las variables hidrológicas e hídricas (precipitación, evaporación, descarga total y volumen total del embalse) fueron proporcionados por la CAR (2005). Los de las variables fisicoquímicas (nutrientes, pH, porcentaje de saturación de oxígeno y temperatura) se tomaron de los obtenidos en el proyecto marco de este trabajo de tesis “Estructura y variación espacio - temporal de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa, un ecosistema acuático alto Andino” (Canosa y Niño, 2005). Para observar posibles interacciones entre las variables biológicas se describió gráficamente la relación entre la densidad de bacterias o volumen celular bacteriano con la densidad de nanoplancton heterótrofo y su variación espacial y temporal.

Análisis de datos. En cuanto a la abundancia del nanoplancton heterótrofo, para identificar la existencia de diferencias significativas entre las abundancias determinadas con ambos métodos de recuento y las obtenidas en el séptimo muestreo entre los filtros con tamaño de poro de 0.8 (recomendado por la literatura para retener las fracciones mas pequeñas del nanoplancton) y las de 2.0 μm (empleadas en este trabajo para disminuir el taponamiento del filtro), se realizaron la pruebas pareadas no paramétrica de Wilcoxon.

Para identificar variaciones temporales y espaciales de la abundancia bacteriana se utilizó una prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis. Como se encontraron diferencias significativas a un nivel de significancia del 95% entre todos los grupos de muestreos y estaciones, se

realizó la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras o grupos para encontrar en cual par de grupos estaba la diferencia (Zar, 1999). Los datos estimados de biovolumen por célula fueron agrupados en rangos de tamaños desde $0.001 \mu\text{m}^3$ (mínimo volumen de una célula esférica de $0.22 \mu\text{m}$ de diámetro) en adelante cada $0.04 \mu\text{m}^3$ (Posh *et al.*, 2001) para observar la distribución de frecuencias.

Para indagar sobre posibles cambios en la estructura de tamaños y morfologías del bacterioplancton relacionados con variaciones espaciales y temporales de la densidad de nanoplancton heterótrofo, se identificó la tendencia general por medio de gráficas de dispersión del volumen celular bacteriano contra su redondez (Psenner y Sommaruga, 1992).

En búsqueda de comprobar correlaciones entre las abundancias de las comunidades del bacterioplancton y del nanoplancton se realizaron pruebas de correlación de Spearman y análisis de regresión. Todas las pruebas estadísticas y análisis de correlación, así como algunas gráficas fueron realizadas por el programa *SPSS para Windows* versión 8.0.1. (1998). Adicionalmente, para evaluar que tan fuertes fueron las relaciones entre estas comunidades, se calculó el coeficiente bacteria-protocoo (CBP), que no es más que la relación entre la concentración de bacterias y la densidad de nanozooplancton; para ello se tuvo en cuenta su variación espacial y temporal

RESULTADOS

Hidrología

Durante el tiempo del estudio, julio de 2004 a abril de 2005, según los datos suministrados por la CAR (2005) se presentó un pico máximo de precipitación entre septiembre-noviembre y un mínimo entre diciembre y febrero. Este último periodo coincidió con valores de evaporación que superaron el nivel de lluvias. Entre julio-agosto y marzo-abril las lluvias no fueron mayores de 100 mm aunque se encontraron valores cercanos a los 50 mm mensuales (figura 10a).

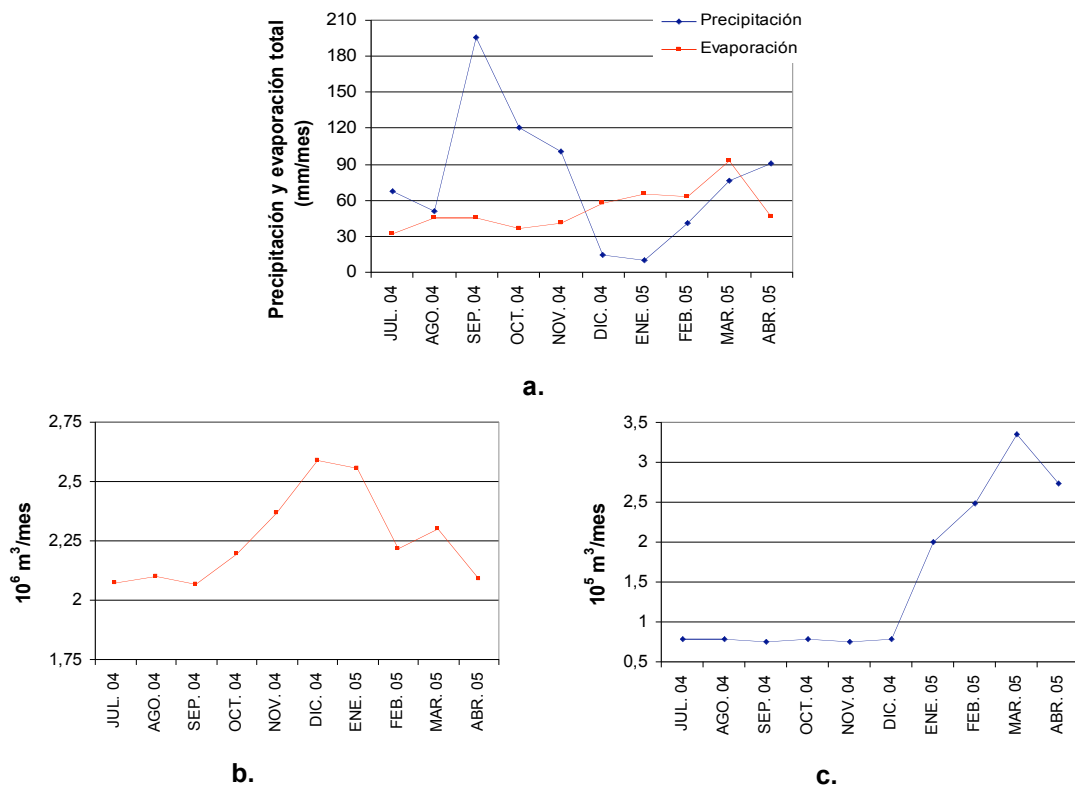


Figura 10. Datos hidrológicos e hidráulicos del embalse del Neusa durante los meses de muestreo. a. Precipitación total y evaporación. b. Volumen total. c. Descarga total.

En cuanto al comportamiento hidráulico, el embalse mantuvo su volumen total bajo y estable entre julio y septiembre. Desde octubre se observó un notable incremento hasta diciembre cuando se registró el volumen máximo

para el periodo de estudio. En los últimos cuatro muestreos se observó un descenso continuo del nivel del embalse, que alcanzó los valores obtenidos al principio del trabajo (figura 10b). Los datos de descarga total fueron constantes desde julio hasta diciembre con altos valores entre enero y abril con un máximo pico en marzo (figura 10c).

Variables Físicas y Químicas

Temperatura. La temperatura promedio del embalse fue de 14.9 °C y varió entre 13.3 °C y 18.3 °C; se observó un aumento gradual desde el inicio hasta el final de los muestreos (figura 11a). Se registró una tendencia en el perfil vertical hacia valores más bajos de temperatura en la zona profunda. Se encontró una leve estratificación térmica en los últimos tres muestreos, con una termoclina que osciló entre los ocho y diez metros de profundidad. En el río Cubillos, la temperatura promedio fue similar a la del embalse, sin embargo, en los primeros seis muestreos fue mas baja, probablemente el incremento ocurrió como consecuencia del represamiento del río, generado por los altos niveles que alcanzó el embalse.

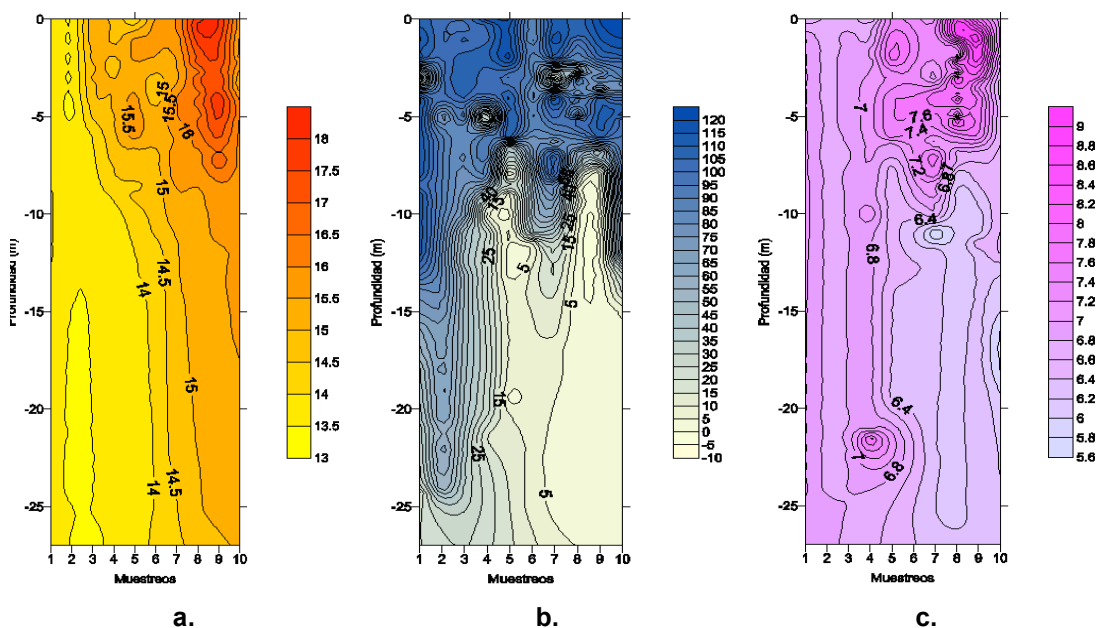


Figura 11. Isolíneas de algunas variables fisicoquímicas en el embalse del Neusa entre julio de 2004 y abril de 2005. a. Temperatura. b. Saturación de oxígeno. c. pH.

Oxígeno. Con respecto a la saturación del oxígeno se observó un comportamiento temporal y espacial bien definido. En todos los muestreos se presentó una disminución con la profundidad, sin embargo, en los tres primeros se encontró una columna de agua casi homogénea. De ahí en adelante fue evidente un perfil vertical clinógrado, con una oxiclina entre los siete y los doce metros. La diferencia entre la superficie y el fondo se acentuó desde el quinto muestreo; se registraron valores tan bajos como 0.7% en la zona profunda y valores superiores al 100% en la zona superficial (figura 11b). Los porcentajes de saturación del oxígeno en el río Cubillos oscilaron entre 92% y 132% con un promedio de 110%; en la mayoría de los muestreos se obtuvieron valores superiores a la saturación.

pH. El promedio del embalse fue de 6.9 unidades con un rango entre 5.5 y 9.6. El comportamiento espacial y temporal de esta variable no fue tan claro como para las anteriores, pero se encontró tendencia hacia pH ácidos en las estaciones más profundas, particularmente en los últimos meses de muestreo (figura 11c). En el río cubillos se encontraron valores similares con un promedio en 6.8 y un rango entre 6.3 y 9.6.

Nitrógeno. El promedio más alto del nitrógeno total se detectó en la estación Las Juntas. Se observó un aumento de esta variable con la profundidad y en los meses en que la precipitación fue moderada (julio-agosto) (figura 12a-c). De las especies solubles del nitrógeno, el amonio fue la más abundante, con una tendencia a aumentar con la profundidad y en el periodo seco (figura 12d y f). Los nitritos y nitratos estuvieron casi siempre por debajo de los límites de detección de la técnica (0.001 mg/L NO₂ y 0.1 mg/L NO₃), sin embargo, se observó un incremento a lo largo del eje Las Juntas - Chapinero - Presa- río Cubillos (anexo B).

Fósforo. El fósforo total y los fosfatos disminuyeron progresivamente hacia los últimos muestreos, aunque se registró un aumento en el fósforo soluble en el periodo marzo-abril (figura 13a y d). Los promedios más altos en el embalse se registraron en el río Cubillos con valores similares para las otras

estaciones analizadas (figura 13c y e). En el perfil vertical se encontraron mayores concentraciones en el fondo para los fosfatos y menores valores de fósforo total en la zona media de la columna de agua (figura 13c y f).

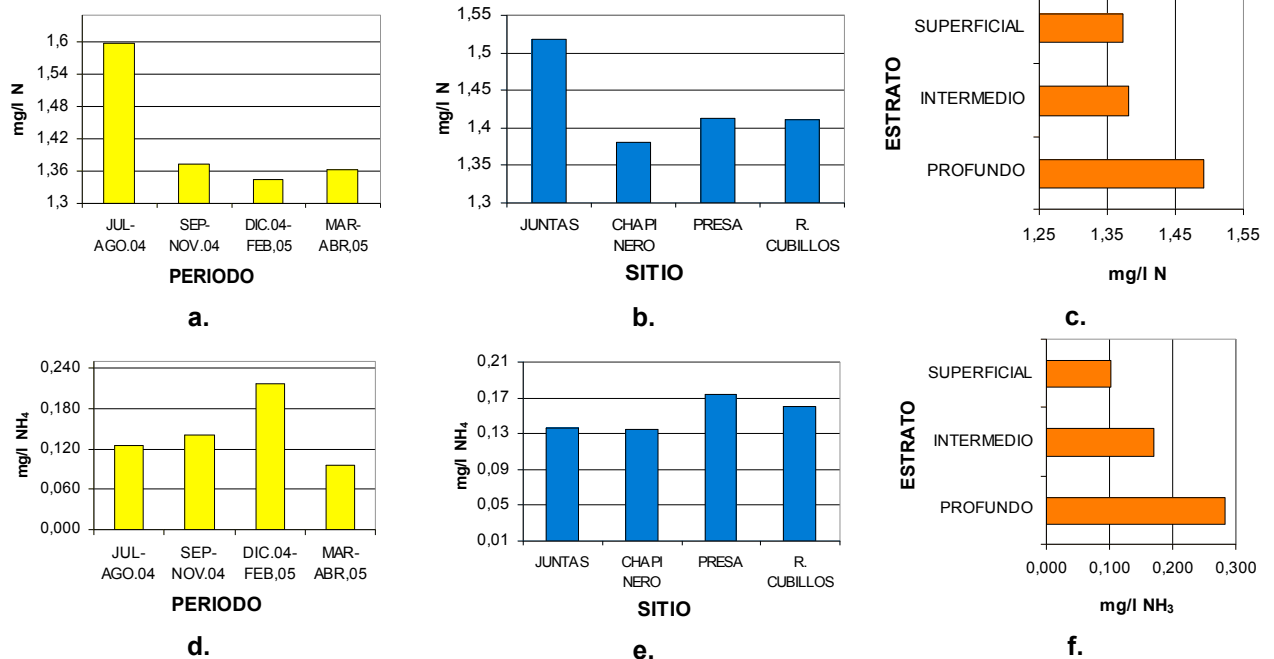


Figura 12. Concentraciones de nitrógeno total (a - c) y amonio (d - e) en el embalse del Neusa. Datos promediados por periodos climáticos (a y d), sectores embalse (b y e) y estratos columna de agua (c y f).

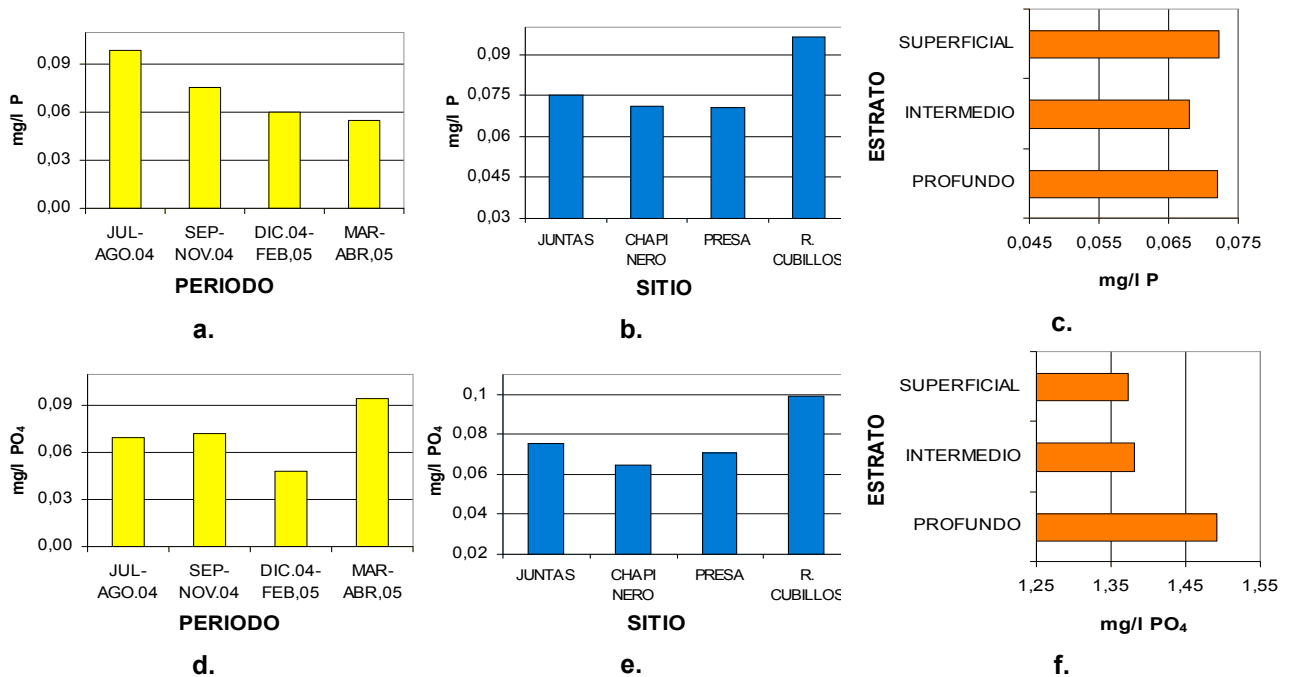


Figura 13. Concentraciones de fósforo total (a - c) y fosfatos (d - f) en el embalse del Neusa. Datos promediados por periodos climáticos (a y d), sectores embalse (b y e) y estratos columna de agua (c y f).

Variación espacial y temporal de la densidad bacteriana

La abundancia promedio en bacterias. ml^{-1} para todo el periodo de estudio varió entre 7.56×10^5 y 4.62×10^6 , con una media general de 2.10×10^6 . En el río Cubillos el promedio fue de 1.48×10^6 con valores mínimos y máximos de 5.1×10^5 y 3.22×10^6 bacterias. ml^{-1} respectivamente (anexo C).



Figura 14. Densidad de bacterias en el embalse del Neusa. Se muestran valores promedio a. por sitio de muestreo. b. De acuerdo a la época de muestreo. c. De acuerdo a la escala vertical.

Espacialmente se observó una tendencia general hacia un descenso de la densidad de bacterias a lo largo del eje Juntas – Chapinero - Presa – río Cubillos (figura 14a). En la escala temporal los cambios más notorios se detectaron durante los periodos comprendidos entre julio-agosto y diciembre-febrero, cuando se registraron las mayores y menores abundancias bacterianas respectivamente (figura 14b). En el perfil vertical, se encontró que la densidad bacteriana disminuyó ligeramente con la profundidad (figura 14c). La comparación múltiple no paramétrica mostró que las diferencias espaciales y temporales en la abundancia bacteriana fueron significativas (Kruskal-Wallis $p(\text{estaciones}) < 0.05$; $p(\text{muestréos}) < 0.05$).

En promedio, las mayores abundancias se registraron en el sitio denominado Las Juntas (3.36×10^6 bacterias. ml^{-1}); los valores de densidad en esta estación siempre fueron estadísticamente diferentes al de las otras zonas

estudiadas (Kolmogorov - Smirnov $p < 0.05$) (anexo D). Las estaciones cuatro y cinco, que hacen parte del estrato superficial, la siguieron en abundancia con 2.19×10^6 y 2.0×10^6 bacterias. ml^{-1} respectivamente, mientras que la seis y la siete, que corresponden a la zona media y profunda de la columna de agua, alcanzaron los valores más bajos en el embalse con 1.61×10^6 y 1.8×10^6 bacterias. ml^{-1} (anexo E).

Vale la pena resaltar que la tendencia descrita anteriormente se cumplió en la mayoría de muestreos, excepto en aquellos del periodo seco cuando el nivel del embalse fue máximo. En este periodo, se observó un estancamiento del agua en el río Cubillos caracterizado por un aumento en la abundancia bacteriana que superó la densidad de las otras estaciones superficiales (figura 15). La abundancia de bacterias en esta estación, al igual que en la de Las Juntas, siempre fue significativamente diferente del resto del embalse (Kolmogorov - Smirnov $p < 0.05$) (anexo D y E).

Durante la época de muestreo, se detectaron en el embalse, tres picos máximos y dos mínimos de abundancia (figura 16; anexo F). Los valores registrados en los meses de julio, diciembre y abril fueron significativamente diferentes de los obtenidos en los otros muestreos (Kolmogorov - Smirnov $p < 0.05$) (anexo D).

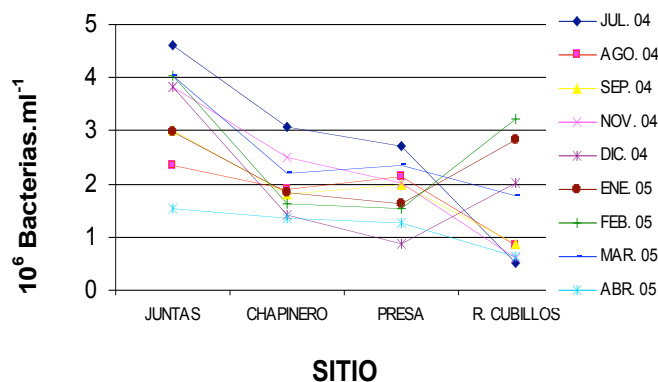


Figura 15. Densidad promedio por muestreo de bacterias en los diferentes sitios del embalse del Neusa.

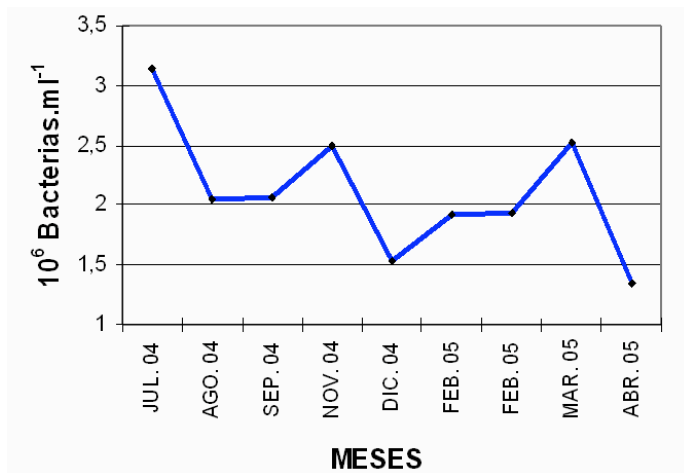


Figura 16. Densidad promedio de bacterias de acuerdo a los meses de muestreo en el embalse del Neusa.

Morfometría celular bacteriana

La tendencia general mostró escasa diversidad en morfología y tamaño, con un predominio de células pequeñas y redondas (figura 17). Los tamaños celulares oscilaron entre $0.001 \mu\text{m}^3$ y $5.56 \mu\text{m}^3$; en la mayoría de los casos el rango comprendido entre $0.001 - 0.041 \mu\text{m}^3$ representó más del 50%.

Según Psenner y Sommaruga (1992), el análisis de la relación redondez:biovolumen permite determinar la diversidad morfológica de las bacterias en un cuerpo de agua. Los datos encontrados en el embalse mostraron una mayor proporción de formas alargadas y grandes entre julio y noviembre, mientras que a partir de diciembre hubo un mayor predominio de células redondas (figura 17; anexo G). Durante el periodo de estudio, el porcentaje de células en el rango de $0.001 - 0.041 \mu\text{m}^3$ cambió desde 54% en julio-agosto hasta 64% en marzo-abril; esta variación fue coherente con un descenso (8% a 5%) en el porcentaje de células con biovolumen mayor a $0.521 \mu\text{m}^3$ (figura 18a).

No se observó un patrón similar en una escala espacial. No obstante, se encontró una menor dispersión en las gráficas de redondez:biovolumen en Las Juntas, el fondo y el río, lo que indica un mayor predominio de células

redondas y pequeñas en estos sitios (anexo H); solo se encontraron 5% de células con un tamaño de más de $0.521 \mu\text{m}^3$ (figura 18b).

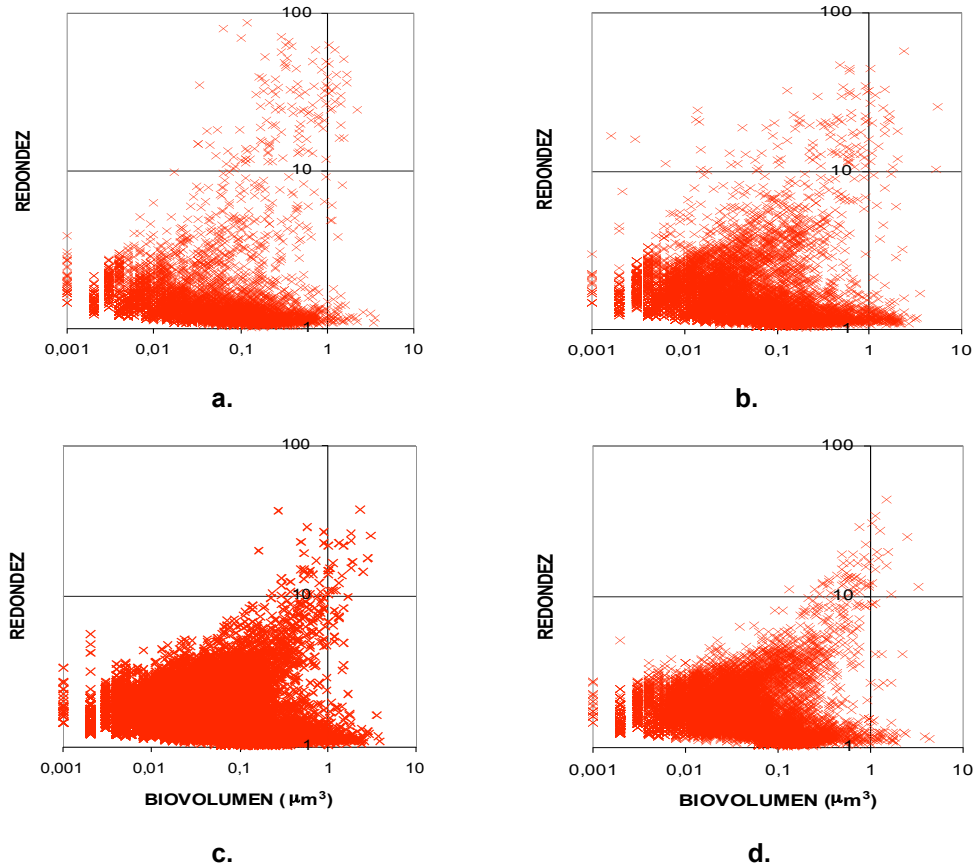


Figura 17. Gráficos de dispersión en escala logarítmica que muestran la relación biovolumen:redondez bacteriana de acuerdo a la época de muestreo en el embalse del Neusa. a. Julio-agosto. b. Septiembre-noviembre. c. Diciembre-febrero. d. Marzo-abril.

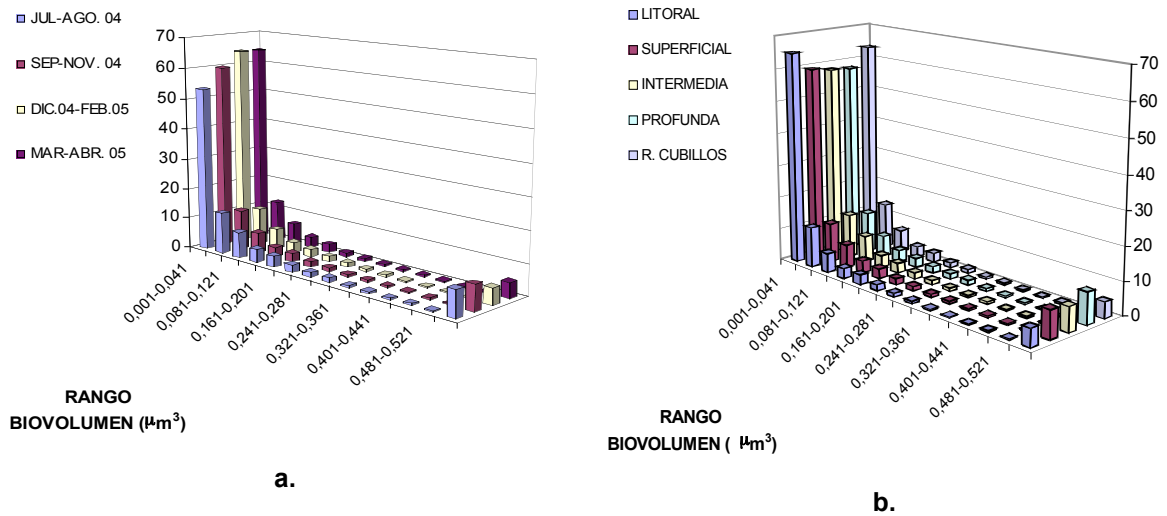


Figura 18. Distribución de frecuencias relativas de biovolumen en el embalse del Neusa. a. De acuerdo a la época de muestreo. b. De acuerdo a los sitios de muestreo. Litoral: Las Juntas.

En promedio, el volumen celular para el embalse fue $0.080 \mu\text{m}^3$ con rangos entre $0.0280 \mu\text{m}^3$ y $0.198 \mu\text{m}^3$. En el río Cubillos se encontraron valores de $0.0699 \mu\text{m}^3$ con mínimos y máximos de 0.045 y $0.131 \mu\text{m}^3$ respectivamente (anexo I).

Los mayores valores de volumen celular se registraron en Chapinero y la Presa, en las zonas superficiales, y los menores en Las Juntas y el río Cubillos (figura 19a); este patrón espacial se presentó en la mayoría de los muestreos (anexo I). Entre julio y noviembre se observaron los datos más altos para esta variable, particularmente en los meses de mayor precipitación, con un descenso paulatino a partir de diciembre (figura 19b). El análisis del perfil vertical mostró un descenso del biovolumen con la profundidad (figura 19c).

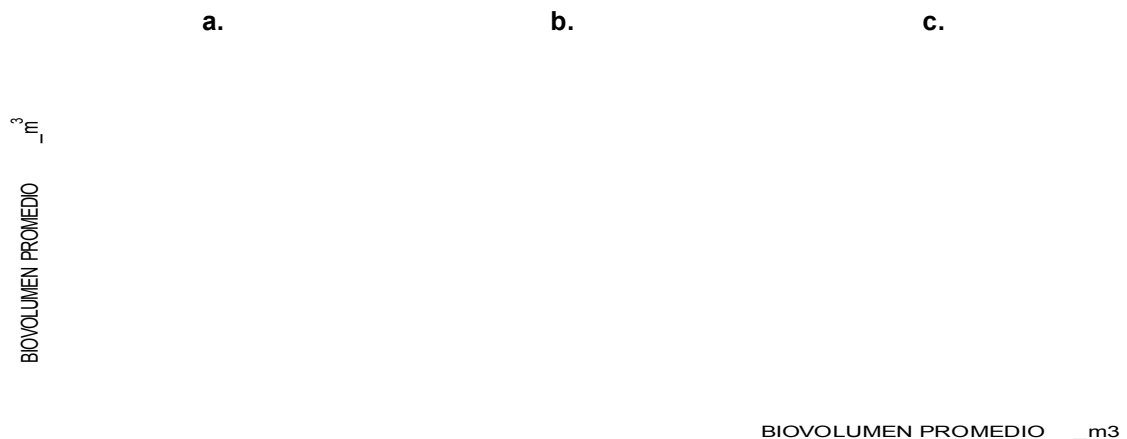


Figura 19. Valores promedio de biovolumen bacteriano en el embalse del Neusa: a. De acuerdo al sitio de muestreo. b. De acuerdo a la época de muestreo. c. De acuerdo a la escala vertical.

Abundancia de protozoos

Comparación de las dos técnicas utilizadas para el recuento de nanoplancton heterótrofo

Con el método de epifluorescencia los recuentos de nanoplancton heterótrofo fueron en promedio 1.74×10^3 células. ml^{-1} y variaron entre 5.99×10^1 y

6.06×10^3 células. ml^{-1} . Con la técnica de la cámara de sedimentación el valor promedio fue ligeramente mayor, 2.12×10^3 células. ml^{-1} con una variación entre 2.87×10^1 y 2.17×10^4 células. ml^{-1} . La abundancia encontrada durante el periodo de estudio mostró por ambos métodos una tendencia temporal y espacial similar, excepto por un pico en el séptimo muestreo, mejor detectado por el recuento con epifluorescencia (figura 20a y b; anexos J, K, L, M, N, O y P). Aunque se observaron diferencias entre los recuentos con las dos técnicas, estas no fueron estadísticamente significativas (Wilcoxon $p(0.729) > 0.05$). Adicionalmente, los conteos obtenidos con ambos métodos se correlacionaron positivamente (Spearman = 0.59, $p < 0.01$).

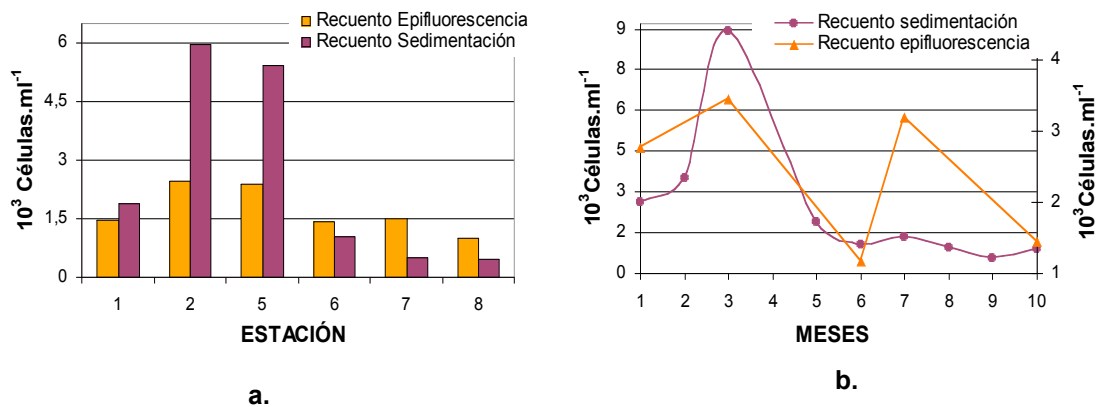


Figura 20. Densidades promedio de nanoplancton heterótrofo obtenido con las técnicas de epifluorescencia y de la cámara de sedimentación. a. Densidades encontradas para cada sitio de muestreo. b. Densidades según los meses de muestreo.

De acuerdo a lo mencionado en la sección de metodología, se utilizaron filtros con diferente tamaño de poro para comparar los conteos obtenidos con epifluorescencia. Se debe recordar que este ejercicio solo se realizó con las muestras del séptimo muestreo. La abundancia promedio, en células. ml^{-1} , fue de 2.51×10^3 cuando se usaron filtros de $2.0 \mu\text{m}$ y de 2.17×10^3 con filtros de $0.8 \mu\text{m}$ (anexos J). Los resultados mostraron iguales tendencias, sin embargo la abundancia obtenida con los filtros con $2.0 \mu\text{m}$ de diámetro de poro fue ligeramente superior que la encontrada con los de $0.8 \mu\text{m}$; estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Wilcoxon $p(0.686) > 0.01$). Probablemente los resultados reflejan una mayor sensibilidad relacionada con el mayor volumen de muestra que se puede filtrar cuando se aumenta el tamaño del diámetro de poro.

Para analizar la variación temporal y espacial del nanoplancton heterótrofo en el embalse del Neusa se utilizaron los datos obtenidos con el método de las cámaras de sedimentación con microscopio invertido.

Variación espacial y temporal de la densidad de nanoplancton heterótrofo

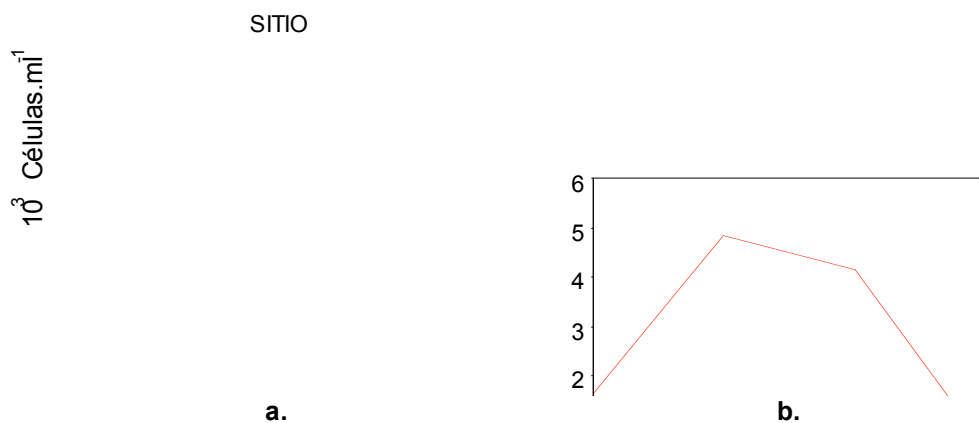


Figura 21. Densidad de nanoplancton heterótrofo obtenida por recuento en cámara de sedimentación. a. La figura muestra los datos promedio obtenidos en cada sitio de muestreo. b. Se muestran solo los datos de las estaciones superficiales.

Se encontraron mayores abundancias en Chapinero y menores en el río Cubillos (figura 21), así como disminución con la profundidad (figura 22a). Las mayores densidades se registraron entre septiembre y noviembre, que corresponden al periodo de mayor precipitación, con un pico máximo en septiembre, y las menores entre diciembre-abril (figura 22b). Esta tendencia temporal fue más acentuada en las estaciones superficiales (anexos K y L). En la Presa (profundidades intermedia y fondo), se encontraron también valores altos en los dos primeros muestreos, sin embargo las densidades fueron bajas durante todo el estudio. En el río, los recuentos fueron bajos y no variaron mucho entre el primer y quinto muestreos; a partir del sexto se observó, al igual que con las abundancias bacterianas, un incremento progresivo hasta el noveno muestreo (anexos K y M).

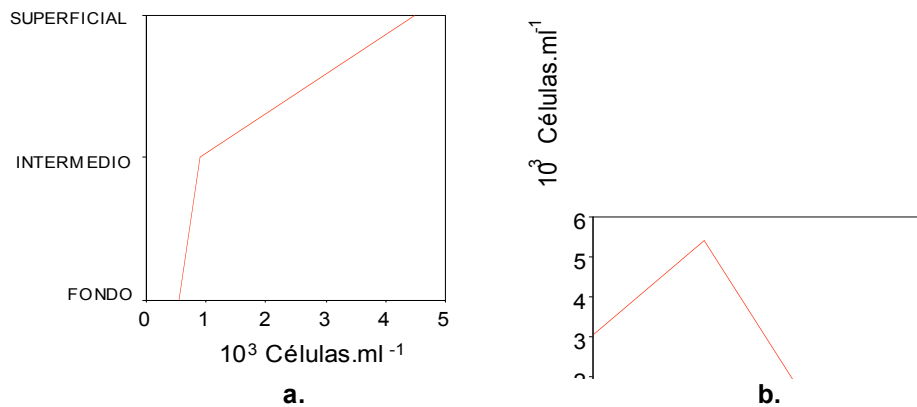


Figura 22. Densidad de nanoplancton heterótrofo obtenida con el método de cámaras de sedimentación en el embalse del Neusa. a. Se muestran los valores promedios en una escala vertical. b. Se muestra la abundancia promedio de acuerdo a la época de muestreo.

Relación abundancia bacteriana vs abundancia protozoos

El estudio del comportamiento de la densidad de las comunidades, tanto en los sitios como en las épocas de muestreo, indicó que las variables están relacionadas. Este vínculo pareció ser más fuerte en los primeros meses de trabajo y en la zonas litoral y limnética superficial (figura 23b; anexos Q y R).

La regresión lineal obtenida entre todos los datos mostró que el nanoplancton heterótrofo explicó en un 27% ($R^2= 0.2755$) la variación de las densidades del bacterioplancton. El análisis de la gráfica de dispersión permitió observar que esta tendencia tiene una marcada influencia espacial; aquellos sitios con mayores densidades bacterianas usualmente presentaron abundancias de nanoplancton heterótrofo más altas (figura 23).

Con el análisis de correlación no paramétrica, la relación entre bacterias y nanoplancton fue positiva y significativa cuando se agruparon todos los datos. No obstante, un análisis detallado permitió establecer cambios espaciales y temporales en esta relación (tabla 2). Aunque en la mayoría de los casos, se encontró esa correlación positiva, en Las Juntas fue negativa durante todo el estudio. Entre julio y noviembre, con los datos de la zona limnética superficial, se encontraron también correlaciones negativas que

fueron particularmente importantes entre septiembre y noviembre cuando se encontraron las mayores abundancias de nanoplancton y bacterias en esta zona (tabla 2).

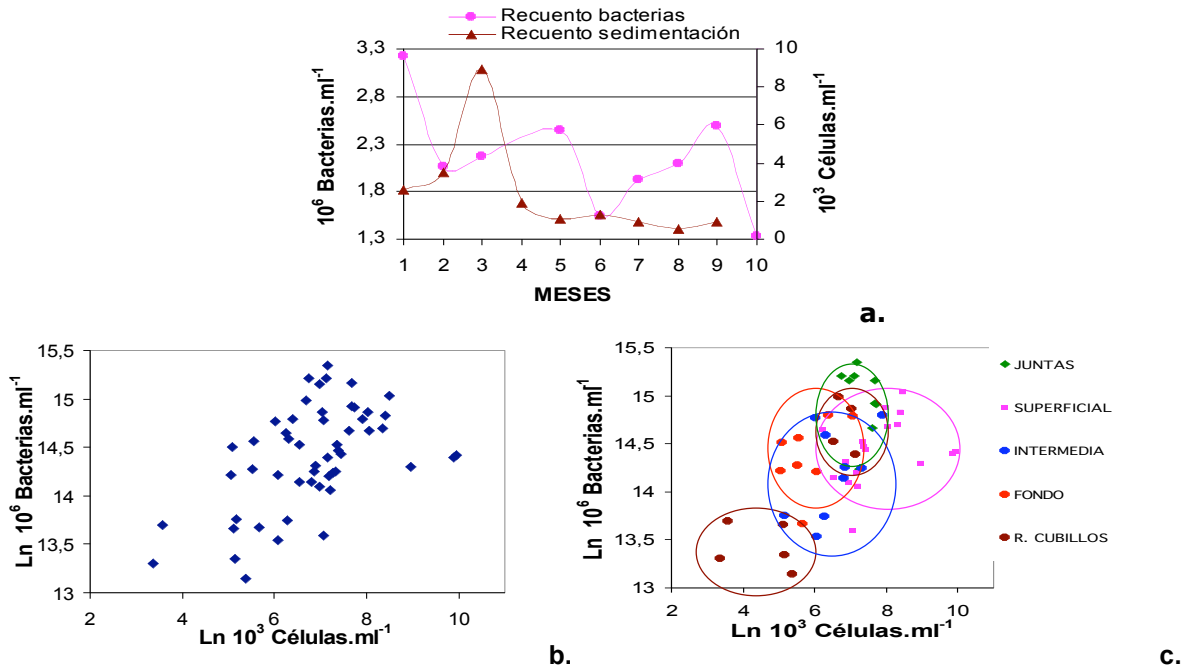


Figura 23. Densidad promedio de bacterias y de nanoplancton heterótrofo en el embalse del Neusa. a. De acuerdo a los periodos de muestreo. b. Gráfico de dispersión. c. Gráfico de dispersión de acuerdo a zonas de muestreo.

Tabla 2. Correlaciones entre los recuentos de bacterias y nanoplancton heterótrofo de acuerdo a los sitios de muestreo, las épocas de muestreo en todos los sitios, la escala vertical y en la zona superficial por época de muestreo.

		Coeficiente Correlación Spearman
Todas las estaciones y muestreos		0.376**
Sitios de muestreo	Las Juntas	-0.419*
	Chapinero	0.573**
	La Presa	0.361**
	Río Cubillos	0.690**
Épocas de Muestreo	Meses julio-agosto y marzo-abril	0.514**
	Meses septiembre-noviembre	0.414**
	Meses diciembre-febrero	0.463**
Escala vertical	Superficial	0.407**
	Profundidad intermedia	0.431**
	Fondo	0.334
Superficie – época de muestreo	Meses julio-agosto y marzo-abril	0.437*
	Meses julio-noviembre	-0.630**
	Meses septiembre-noviembre	-0.741**
	Meses diciembre-febrero	0.585*
	Meses diciembre-abril	0.082

* : Significante a un nivel de 0.05.

** : Significante a un nivel de 0.01.

Cociente bacterias-protocitos (CBP)

El promedio total del CBP en el embalse del Neusa fue de 2545:1 con un valor mínimo en 87:1 y máximo en 12.328:1. En el río Cubillos la relación varió entre 1403:1 y 20947:1 con un promedio en 2739:1. Según Fenchel (1986) este parámetro en muchos de los ecosistemas acuáticos se acerca a 1000:1 (figura 24).

Espacialmente se observaron los mayores CBP en el río y en Las Juntas y los menores en las estaciones limnéticas superficiales. Además, se encontró una tendencia al incremento de este cociente con la profundidad (figura 25a), con algunas excepciones entre diciembre y abril (anexo S).

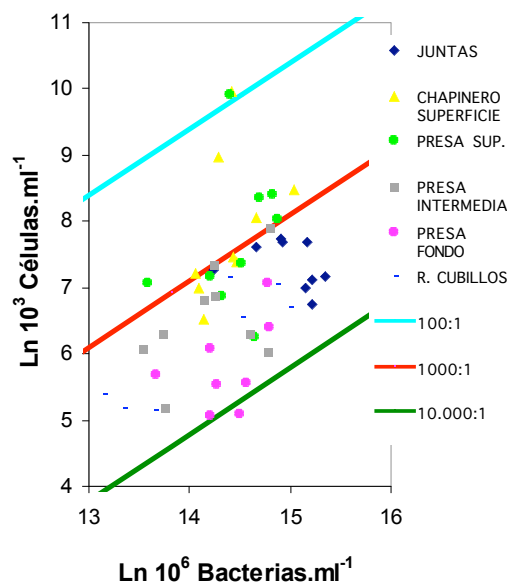


Figura 24. Gráfico de dispersión con los datos de los cocientes de las densidades bacterianas y del nanoplancton heterótrofo en el embalse del Neusa y en el río Cubillos de acuerdo a los sitios de muestreo. Las líneas coloreadas en azul, rojo y verde representan relaciones encontradas en la literatura. La línea roja o relación 1000:1, es la generalidad para los sistemas acuáticos propuesta por varios autores.

La variación temporal del CBP promedio en el embalse reveló un aumento progresivo a partir del segundo muestreo hasta el noveno, cuando alcanza el máximo valor (figura 25b). En el río Cubillos, en el tercer y quinto muestreo

se encontraron valores extremos del CBP (24533:1 y 20947:1 respectivamente), (anexo R).

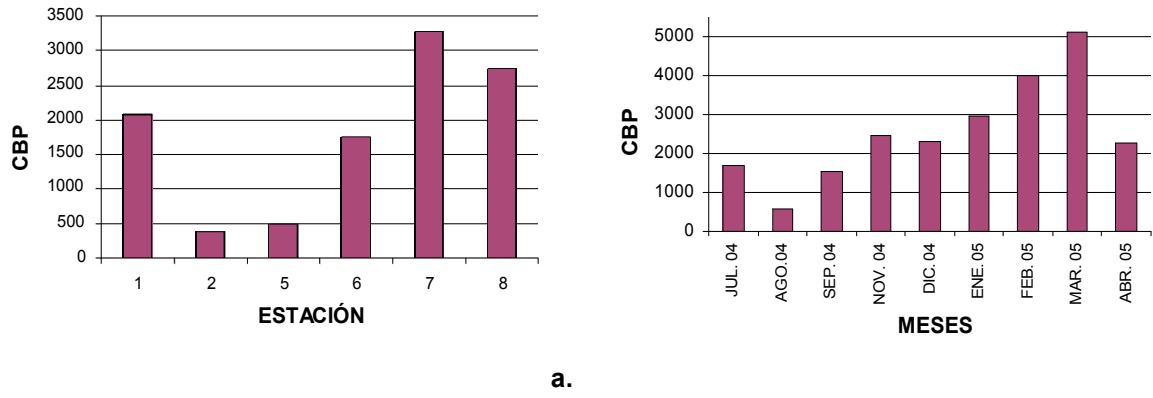


Figura 25. Cocientes Bacterias-Protozoos (CBP) promedio en el embalse del Neusa. a. De acuerdo a la estación de muestreo. b. De acuerdo a los meses de muestreo.

DISCUSIÓN

Comparación de las técnicas utilizadas para el recuento de nanoplancton heterótrofo

Los mayores problemas de los métodos para el recuento del nanoplancton en muestras naturales están relacionados con la dificultad para detectar el bajo número de células presente en la muestra y la diferenciación de microorganismos autótrofos de heterótrofos (Caron, 1983). Por ello, en este trabajo se utilizaron dos métodos de recuento, ampliamente usados en la literatura, en los cuales un volumen de agua es concentrado ya sea por sedimentación o por filtración.

Los valores de densidad encontrados en este trabajo con ambas metodologías, mostraron algunas variaciones numéricas pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos. Los mayores recuentos obtenidos con las cámaras de sedimentación, particularmente en la zona superficial podrían deberse a una sobrestimación con este método o una subestimación con el método de epifluorescencia; llamó la atención que este comportamiento no se presentara en las estaciones Las Juntas, intermedia, fondo y en el río Cubillos. Lo anterior indica que las diferencias encontradas podrían deberse a la composición taxonómica de la comunidad del nanoplancton en las estaciones superficiales. Teniendo en cuenta que estas estaciones siempre mostraron las mayores abundancias de protistas, tanto autótrofos como heterótrofos, es posible que en el recuento se incluyeran morfotipos autótrofos flagelados fagotróficos dominantes en esta comunidad, como criptofíceas y crisofíceas, sesgando hacia valores altos los recuentos de heterótrofos con cámaras de sedimentación (Caron, 1983).

No obstante, es ampliamente reconocido el papel de los microorganismos mixótrofos en la bacteriovoria, especialmente en ecosistemas oligotróficos donde la ausencia de nutrientes puede inducirlos a la fagotrofia (Domaison *et al.*, 2003; Jezbera *et al.*, 2003; Christaki *et al.*, 1999; Stoecker, 1999). Teniendo en cuenta que organismos de los grupos mencionados arriba son característicamente mixótrofos y que son contados como autótrofos con la técnica de epifluorescencia, los menores valores obtenidos con esta metodología podrían subestimar el efecto de las poblaciones mixótrofas en el control del bacterioplancton.

Además, otra posible fuente de subestimación en la técnica de epifluorescencia es el tamaño de poro de los filtros utilizados. Aunque en la literatura se describen filtros de 0.8 μm y de 2.0 μm , los más usados son los primeros porque permiten contar las fracciones del plancton con tamaños entre 2 y 20 μm , sin que haya pérdida durante la filtración. Sin embargo, las experiencias previas con esta metodología mostraron que este tamaño de poro reduce sustancialmente el volumen de muestra filtrada cuando las aguas tienen partículas en suspensión, disminuyendo la reproducibilidad de la técnica e incluso haciendo imposible el conteo (López, 2002). En este caso, se utilizaron filtros de 2.0 μm de tamaño de poro y no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon con las abundancias obtenidas con filtros de 0.8 μm . No obstante, se debe ser cuidadoso en la interpretación de los resultados ya que esta comparación solo se realizó en un período del estudio, debido principalmente a los costos que implica esta metodología.

Por otra parte, el coeficiente de variación promedio para las réplicas con el método de sedimentación fue de 21% y para el de epifluorescencia de 19%, lo que indica que la precisión de ambas técnicas fue muy similar (anexo T). La observación anterior podría resultar extraña teniendo en cuenta que para el recuento con epifluorescencia con naranja de acridina se utilizan dos filtros, uno para los autótrofos y otro para el recuento total, lo que aumentaría el error debido al conteo porque se suman los errores independientes de

cada filtro (Caron, 1983); no obstante, hay que tener en cuenta que los recuentos con microscopia de epifluorescencia tienen menos datos. Adicionalmente, los cambios espaciales y temporales de la abundancia también mostraron diferencias hasta de un orden de magnitud lo que implica que cualquiera de las dos técnicas, a pesar del error de recuento, puede detectar los cambios en las abundancias de las comunidades heterotróficas del nanoplancton.

Abundancia del bacterioplancton y el nanoplancton heterótrofo

Los resultados del recuento total de bacterias se encontraron dentro de los rangos registrados previamente para este sistema (Canosa, 2003; Canosa y Pinilla, 1999). Las densidades fueron similares a otros valores reportados para ecosistemas meso y oligotróficos (Vaqué *et al.*, 2002; Wille *et al.*, 1999; Christaki *et al.*, 1999; Thouvenot *et al.*, 1999), lo cual confirma las apreciaciones de varios autores sobre la poca variación de las abundancias bacterianas a pesar que las condiciones físicas, geográficas, y ambientales cambien (Cole *et al.*, 1993; Pace y Cole, 1994).

En el caso del nanoplancton heterótrofo, aunque el rango de variación fue bastante amplio, se encontró una abundancia promedio bastante cercana a la reportada para otros sistemas con características similares. Es posible que la escala de muestreo tenga una incidencia importante sobre los cambios de las abundancias de heterótrofos en estos resultados. Mientras que en este trabajo se exploraron cambios verticales y horizontales durante diez meses, en otros estudios se realizaron pocos muestreos en menor número de sitios (tabla 3); además, hay que resaltar que esto no es concluyente ya que no se cuentan con datos de abundancia en otros estudios para sistemas acuáticos tropicales. No hay que descartar que factores tales como mecanismos de resistencia (físicos y químicos) de las bacterias a la depredación, la presencia de depredadores del nanozooplancton en la columna de agua y cambios espaciales de algunos parámetros ambientales, no evaluados en

este trabajo, podrían haber contribuido a las variaciones encontradas (Kisand y Noges, 2004; Jürgens y Güde, 1994).

Tabla 3. Valores promedio, mínimos y máximos de recuentos de nanoplancton heterótrofo (células.ml⁻¹) reportados en sistemas acuáticos marinos y continentales. Los valores de este trabajo se muestran en las dos últimas filas.

Abundancia de nanozooplancton			Lugar	Escala de muestreo	Autor
Promedio	Mínimo	Máximo			
1.8 x10 ³	3.0 x10 ²	5.6 x10 ³	Mar de Weddell (Antártica) Oligotrófico	Un muestreo, variación vertical (0-150m cada 10m).	Vaqué <i>et al.</i> (2002)*
7.5 x10 ²	2.9 x10 ²	1.1 x10 ³	Lago Anney (Francia) - Oligotrófico	Dos veces por mes durante siete meses (0 -10m).	Domaison <i>et al.</i> (2003)**
9.3 x10 ²	2.5 x10 ²	1.5 x10 ³	Mar Egeo - Oligotrófico	Varias estaciones y muestreos (0-10m).	Christaki <i>et al.</i> (1999)**
1.8 x10 ³	-	-	Vineyard Sound Oligotrófico	Un muestreo	Caron (1983)
2.4 x10 ³	-	-	Head of Buzzards Bay Oligotrófico		
2.5 x10 ³	-	-	Woods Hole Harbor Oligotrófico		
1.2 x10 ³	3.0 x10 ²	4.5 x10 ³	Bahía Masan -Eutrófico	Cuatro muestreos (0 -10m)	Choi <i>et al.</i> (2003)**
7 x10 ²	-	-	Reservorio inundado epilimnion 1m (Francia) Oligo-mesotrófico	Muestreo semanal (1 - 7m) por cinco meses	Thouvenot, <i>et al.</i> (1999)**
4 x10 ²	-	-	Reservorio inundado metalimnion 7m (Francia) Oligo-mesotrófico		
6.5 x10 ²	2.3 x10 ²	2.8 x10 ³	Lago Gossenköllesee (Austria) - Oligotrófico	Verano de 1996 y 97 varias profundidades (1-8m)	Wille <i>et al.</i> (1999)**
*2.41x10 ³	1.07 x10 ¹	2.52 x10 ⁴	Embalse del Neusa Oligo-mesotrófico	Muestreo mensual durante diez meses en ocho estaciones.	Este trabajo
2.42 x10 ³	3.56 x10 ¹	6.06 x10 ³			
5.41x10 ²	2.46 x10 ¹	1.69 x10 ³	Río Cubillos Oligotrófico		
*9.87x10 ²	5.99 x10 ¹	1.63 x10 ³			

Los datos sin asterisco fueron obtenidos con epifluorescencia y naranja de acridina, *: datos obtenidos con cámaras de sedimentación, **: con epifluorescencia y DAPI

Los valores mínimos de protozoos se hallaron en la zona profunda, mientras que los máximos se encontraron en la superficie de la zona limnética especialmente en el mes de septiembre. Este último valor podría mostrar problemas relacionados con limitaciones en la metodología empleada, ya que en ese mes, se registraron las mayores densidades del fitoplancton así como de clorofila *a* (Canosa y Niño, 2005); la técnica con cámaras de sedimentación no permite diferenciar autótrofos y heterótrofos, lo que claramente pudo incidir en una sobre-estimación de la abundancia de las poblaciones así medidas.

Aunque no se puede desconocer el posible efecto de la metodología sobre las abundancias encontradas, los datos obtenidos con la técnica de epifluorescencia mostraron los mismos picos máximos y mínimos ya mencionados (anexo P), aunque con valores menos extremos. De acuerdo a lo anterior, los cambios en la abundancia son una respuesta de la comunidad nanoplanctónica a factores del entorno más que a limitaciones metodológicas.

Relación de la abundancia bacteriana y las variables ambientales

El desarrollo de las comunidades microbianas en el agua puede verse afectado por diversos factores abióticos y bióticos. Dentro de los primeros, los nutrientes, la temperatura, el oxígeno y los cambios en los niveles de la columna del agua suelen explicar la variación de las abundancias del bacterioplancton en diferentes sistemas (Kisand y Noges, 2004).

Los datos encontrados en este trabajo, parecen indicar que los cambios en la abundancia del bacterioplancton en el embalse del Neusa podrían ser explicados por la disponibilidad de los nutrientes. Lo anterior parece estar soportado no solo por el predominio de células pequeñas encontradas a lo largo del estudio, sino por las mayores densidades halladas de manera consistente en Las Juntas y en la zona limnética superficial. En Las Juntas, además de la producción del fitoplancton, buena parte de los sustratos orgánicos necesarios para el desarrollo de la comunidad bacteriana podrían provenir de la descomposición de la necromasa macrofítica, que domina esta zona del embalse (Carrillo y Guarín, 2000). Esta suposición es coherente con los mayores valores de demanda biológica de oxígeno (DBO_5) detectados en este sector del embalse (Canosa y Niño, 2005).

Los sustratos orgánicos, entonces, podrían ser un elemento de control importante para el desarrollo de la comunidad bacteriana en este sistema. De acuerdo con los datos de clorofila *a*, obtenidos en el proyecto general que

enmarcó este trabajo de tesis, se encontraron mayores nutrientes inorgánicos y biomasa fitoplanctónica durante los primeros 5 meses, con un pico máximo de clorofila *a* en el mes de septiembre que decayó progresivamente como consecuencia del aumento en la precipitación y los caudales (CAR, 2005); este comportamiento coincidió con mayores abundancias de bacterias en este periodo así como con un aumento inesperado de la abundancia de bacterias desde agosto hasta noviembre. Es posible que la muerte de células del fitoplancton liberara COD que podría haber estimulado más las tasas de crecimiento bacteriano, manteniendo una alta densidad a pesar del efecto de las lluvias sobre el fitoplancton. Así mismo, la disponibilidad de sustratos orgánicos aportados por el fitoplancton podría explicar la mayor concentración de bacterias en las capas superficiales, que corresponden a la zona de mayor actividad fotosintética en los sistemas lacustres (Valencia *et al.*, 2003). Este patrón de aumento del bacterioplancton con los aportes orgánicos del fitoplancton, también se observó en el río Cubillos cuando este se represó (por aumento de las precipitaciones y el nivel del embalse). Las anteriores observaciones fueron reforzadas por las correlaciones encontradas entre bacterioplancton y fitoplancton durante este trabajo, Spearman= 0.53, $p < 0.01$ (Canosa y Niño, 2005).

Por otra parte, los cambios morfológicos celulares pueden verse como una adaptación para solventar la limitación por nutrientes, incrementando la superficie celular con respecto a su volumen para obtener mayor cantidad de nutrientes y gastar menos energía en el transporte de estos hacia el interior de la célula (Posh *et al.*, 2001; Jürgens y Güde, 1994). En este trabajo se encontró un dominio de células pequeñas en todo el muestreo, sin embargo, en los primeros meses de muestreo se observó una mayor diversidad morfológica, especialmente en la zona limnética, lo que apoya la idea de una mayor disponibilidad de nutrientes para la biosíntesis en este periodo.

Así como los nutrientes, otras variables físico-químicas podrían contribuir al entendimiento de los cambios en la abundancia de las comunidades

microbianas. La disminución de la abundancia del nanoplancton con la profundidad, podría tener relación con el descenso en la temperatura y la disponibilidad del oxígeno. Altas temperaturas en la superficie podrían explicar mayores abundancias que en el fondo, debido a su efecto positivo sobre las tasas de crecimiento (Vaquer *et al.*, 1994; Iriberry *et al.*, 1993; Sanders *et al.*, 1989; Sherr *et al.*, 1988). Sin embargo, es posible que esta variable no haya sido relevante en la distribución del número de microorganismos en la columna de agua, ya que las diferencias de temperatura entre la superficie y el fondo en el embalse del Neusa fueron pequeñas (3°- 5°C), comparadas con las de los ecosistemas acuáticos de las regiones templadas, con una marcada estratificación estacional (Šolić *et al.*, 2001). Además, no se detectó una respuesta temporal de la abundancia de estas comunidades microbianas al aumento de temperatura hacia el final del estudio.

La variación en el nivel de saturación de oxígeno en las aguas del embalse, podría ser mas importante como descriptor de este cambio, ya que la disponibilidad de oxígeno es limitante para el crecimiento de la mayoría de protozoos, y una buena parte de bacterias (Pedrós-Alió *et al.*, 2000; Weinbauer y Höfle, 1998; Massana y Pedrós-Alió, 1994; Miracle *et al.*, 1992). En este estudio las zonas profundas se caracterizaron por ser hipóxicas, debido a la baja producción de oxígeno por parte de los organismos fotoautótrofos y al agotamiento de esta molécula para oxidar la materia orgánica allí presente. El nanozooplancton fue probablemente más susceptible a la disminución de oxígeno con la profundidad, debido a su mayor dependencia. Las bacterias, por otro lado, poseen una mayor diversidad metabólica que les permite sobrevivir en diferentes ambientes, obteniendo energía a partir de otras fuentes alternativas y utilizando aceptores de electrones diferentes del oxígeno (Madigan *et al.*, 1999). Lo anterior podría explicar la menor variación de las bacterias en el perfil vertical con respecto a los protozoos.

Relaciones entre las densidades de bacterias y nanoplancton heterótrofo

Varios estudios muestran que el control por depredación es una de las principales fuerzas que puede afectar la abundancia y moldear la estructura del bacterioplancton (Bloem *et al.*, 1988; Sherr *et al.*, 1983).

Las relaciones significativas encontradas entre las abundancias de bacterias y nanoplancton heterótrofo en esta investigación muestran la dependencia entre ambas comunidades. A pesar que la bacteriovoria afecta negativamente la densidad del bacterioplancton, por lo que se esperarían correlaciones negativas entre la abundancia de ambas comunidades, en este trabajo se encontraron correlaciones positivas en la mayoría de los casos. Este comportamiento, sugiere que el aumento de la presa estimuló el crecimiento del depredador o podría deberse a que parte de la biomasa bacteriana ingerida por pastoreadores fuese posteriormente liberada como formas orgánicas solubles lo que pudo estimular el crecimiento bacteriano y mantener altas densidades a pesar de la remoción de un elevado número de células (Bloem *et al.*, 1988; Güde, 1985). Debe tenerse en cuenta entonces, que el efecto de la depredación sobre la abundancia depende no solo de la velocidad con que el depredador consume sino también de la tasa de crecimiento de la presa.

Es posible que las relaciones positivas reflejen el comportamiento espacial de las variables; en todos los casos, Las Juntas y la zona limnética superficial, mostraron las mayores abundancias de bacterias y altos valores para el nanozooplancton. El predominio de esta tendencia espacial no implica que los protozoos no estén controlando la abundancia de las bacterias, sino que los cambios generados por esta interacción pueden estar enmascarados por el aparente efecto espacial de los nutrientes orgánicos e inorgánicos sobre el bacterioplancton.

Lucas *et al.* (1987) y Fenchel (1982), reportaron que las tasas de pastoreo y remoción del bacterioplancton dependen en gran parte de las densidades de depredadores y presas, así como de su probabilidad de encuentro. Por lo tanto, sería de esperar que las relaciones más fuertes entre estas comunidades se presentaran cuando sus abundancias fueran mayores. En este trabajo, esta situación se presentó en las Juntas y en menor proporción en la zona limnética superficial en donde además se encontraron relaciones negativas que coincidieron con un comportamiento similar al de oscilaciones acopladas entre la abundancia de bacterias y nanozooplancton. Siguiendo los modelos depredador-presa estas oscilaciones podrían presentarse cuando el pastoreo es un factor importante de control del bacterioplancton (Lampert y Sommer, 1997). De acuerdo a Sanders *et al.* (1992), las relaciones negativas entre las abundancias del depredador y la presa resultan de variaciones en las tasas de pastoreo y producción bacteriana hasta que se alcanza un equilibrio entre ambas. Aunque en este estudio no se estimaron tasas de pastoreo y producción del bacterioplancton, podría sugerirse que altas concentraciones de bacterias en Las Juntas y la zona limnética superficial se deban a una mayor producción de células bacterianas por unidad de tiempo. Si esta tasa supera a la tasa de bacteriovoria, entonces la comunidad bacteriana tiende a aumentar. Sin embargo, cuando una mayor tasa de remoción de células supera a la de producción bacteriana, como consecuencia de un aumento en la densidad de nanoplancton heterótrofo, la abundancia bacteriana desciende.

Este comportamiento observado es consistente con los resultados de Šolić *et al.* (2001), Berninger *et al.* (1991) y Sanders *et al.* (1992), que sugieren que el control por depredación de las bacterias es más importante en ambientes con menor limitación nutricional que en aquellos donde los recursos son escasos. Este concepto fue ilustrado por Sanders *et al.* (1992) a través de su propuesta de la capacidad de carga del sistema. Podría inferirse que en Las Juntas y la zona limnética superficial, la capacidad de carga del sistema fue mayor a la de otras zonas del embalse, debido a la mayor concentración de nutrientes orgánicos e inorgánicos y por lo tanto podrían haber sostenido

mayores abundancias de bacterias y nanoplancton heterótrofo. En estas situaciones, la bacteriovoria mantiene a las bacterias muy por debajo de la capacidad de carga del sistema, mientras que cuando los nutrientes son escasos este proceso apenas es efectivo debido a la baja probabilidad de encuentro entre el depredador y la presa (Fenchel, 1982). Bajo estas condiciones, los protozoos podrían remover un gran número de células cuando la comunidad bacteriana alcanza sus mayores abundancias, favoreciendo la proliferación de organismos del nanoplancton. Cuando el efecto del pastoreo se vuelve suficientemente fuerte, debido al aumento de los depredadores, las abundancias bacterianas descienden considerablemente. Este descenso en las abundancias limita a las poblaciones del nanoplancton heterótrofo, que también disminuye en su densidad. Probablemente, como las bacterias están muy por debajo de la capacidad de carga y por lo tanto tienen nutrientes disponibles para su desarrollo, entonces podrían crecer rápidamente generando las oscilaciones anteriormente descritas.

Las oscilaciones entre las abundancias de ambas comunidades fueron consistentes a lo largo de todo el periodo de muestreo en Las Juntas y en la zona superficial limnética, en los primeros cinco meses de muestreo. Adicionalmente, en las aguas de estos sitios y en esos periodos de muestreo, además de presumir un mayor aporte de material orgánico proveniente por la presencia de las macrófitas litorales o del fitoplancton, se observaron mayores contenidos de nitrógeno y fósforo. No es muy usual encontrar este tipo de comportamiento oscilante en las comunidades naturales (Colinvaux, 1991), debido a la influencia de otros factores como la presencia de refugios ecológicos frente a la depredación, la presión selectiva sobre los heterótrofos del nanoplancton y la influencia de variables ambientales, entre otros, sin embargo este comportamiento fue repetitivo en estas zonas. Es posible que esto tenga que ver con que los mecanismos de autorregulación por parte de la comunidad del nanoplancton heterótrofo no sean muy fuertes, generando poblaciones depredadoras altamente efectivas, lo que favorecería la intensidad de las fluctuaciones observadas (Rosenzweig y MacArthur, 1963).

Para reforzar esta propuesta, vale la pena analizar el comportamiento independiente de las abundancias de bacterias y protozoos después del quinto mes de trabajo. Durante este periodo, las abundancias de nanozooplankton disminuyeron fuertemente y variaron poco a pesar de los cambios en las abundancias del bacterioplankton. Es posible que las comunidades del microplankton y del metazooplankton de la zona limnética hayan afectado más las abundancias del nanoplankton en este periodo (Jürgens y Güde, 1994). Esto podría relacionarse con la aparición de cladóceros en las muestras de nanozooplankton en los muestreos de diciembre y enero así como un aumento en la proporción de ciliados oligotricos a partir de este último; los resultados sugerirían un aumento en la complejidad de las interacciones tróficas hacia final del periodo de muestreo que podría enmascarar las relaciones entre bacterias y protozoos (Jürgens y Güde, 1994). Una comprobación de cuanto se exporta la materia orgánica del bucle microbiano al siguiente eslabón en las cadenas tróficas acuáticas no fue objeto de este trabajo, sin embargo, se ha descrito ampliamente el efecto de las comunidades de protozoos sobre el bacterioplankton (Almeida *et al.*, 2001; Fuhrman y Noble, 1995; Sherr *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1992), quedando así planteada la necesidad de su valoración en este ecosistema colombiano.

Los valores de CBP encontrados en la zona litoral y los estratos superficiales son otro argumento a favor de las variaciones en las interacciones de las comunidades bacterianas en un mismo sistema. Hay que ser muy cuidadoso con la interpretación de los datos obtenidos, ya que ellos no son un indicador de la existencia de interacciones entre las densidades de bacterias y protozoos, sino de la importancia relativa que podrían tener estas interacciones en donde se encontraron relaciones significativas (Sanders *et al.*, 1992).

La estación de las Juntas y la zona limnética superficial mostraron diferentes CBP, mayores a 1000:1 en la primera y levemente menores en la segunda. Generalmente, cocientes menores al 1000:1 han sido observados en

sistemas oligotróficos mientras que mayores a 1000:1 son propios de sistemas meso a eutróficos, donde se soportan mayores biomásas. Adicionalmente, mayores CBP encontrados en este trabajo pueden ser consecuencia del efecto en cascada trófica por una mayor predación sobre nanozooplankton debido al microzooplankton (Sanders *et al.* 1992). Esto podría explicar los altos cocientes encontrados en la zona limnética superficial después del muestreo seis y en la zona litoral, sin embargo no se cuenta con evidencia más fuerte para sustentar estas observaciones.

Como ya se mencionó, los resultados mostraron predominio de bacterias muy pequeñas y de forma redondeada quizás como una respuesta a la baja cantidad de nutrientes en el embalse. Sin embargo, no debe desconocerse el impacto que el pastoreo selectivo tiene sobre la composición de tamaños de la comunidad bacteriana. Algunos estudios han identificado que el nanozooplankton, tiene preferencia por presas relativamente grandes con tamaños entre 0.3 y 0.6 μm^3 , lo cual lleva a modificar la estructura de tallas hacia un predominio de formas mas pequeñas y menos alargadas resistentes al pastoreo (Šimek *et al.*, 1997; Pernthaler *et al.*, 1997; Jürgens y Güde, 1994; Šimek y Chrzanowski, 1992). Fenchel (1982) y Lucas *et al.* (1987), encontraron que la probabilidad de que las presas grandes sean capturadas en encuentros directos es superior que con presas de menor tamaño. De esta forma las bacterias con biovolumen menor a 0,1 μm^3 podrían estar protegidas del pastoreo de nanozooplankton debido a su pequeño tamaño (González *et al.*, 1990).

Nuevamente en Las Juntas, sitio en el que aparentemente se presenta la menor limitación por nutrientes orgánicos e inorgánicos, se esperaría que las bacterias hubieran alcanzado mayores tamaños debido a un incremento en la síntesis de material celular. Sin embargo, los resultados mostraron mayor frecuencia de células con un pequeño volumen celular comparado con otras estaciones donde la abundancia de protozoos fue menor y los nutrientes más escasos; esto apoyaría la hipótesis de un control por depredación de las bacterias en esta zona del embalse.

En este trabajo se encontraron fuertes evidencias que demuestran que el nanoplancton heterótrofo podría estar controlando la abundancia de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa; no obstante, este control varía tanto en una escala espacial como temporal. Esta variación parece depender de la disponibilidad de sustratos orgánicos e inorgánicos para la producción bacteriana en este sistema, que en definitiva puede modificar la intensidad de la interacción entre nanoplancton y bacterioplancton en la columna de agua. Los resultados de este trabajo sugieren que podría estar ocurriendo una transferencia importante de materia desde la biomasa del bacterioplancton hacia otros niveles tróficos en el microzooplancton y metazooplancton. Además, la aparente dependencia del bacterioplancton por nutrientes orgánicos indica que es posible que exista un acople entre la producción primaria limnética y litoral del sistema, lo que implicaría que la cantidad de material transferido a través de la bacteriovoria puede depender de la dinámica espacial y temporal de fitoplancton y macrófitas en el embalse del Neusa. Aunque en este trabajo se vislumbra la relación existente entre bacterias y protozoos y su importancia en la transferencia de materia, es necesario profundizar en el estudio de la magnitud de la bacteriovoria y de las relaciones causales de las interacciones entre dichas comunidades.

CONCLUSIONES

- Los valores de densidad del bacterioplancton en el embalse del Neusa se encontraron dentro de los rangos reportados para sistemas acuáticos oligo y mesotróficos.
- Las densidades promedio de nanoplancton heterótrofo fueron similares a las encontradas en otros estudios. Sin embargo, mostraron mayor variación probablemente debido a la escala espacial y temporal del muestreo utilizado.
- A pesar de las limitaciones inherentes a las metodologías para el recuento de nanoplancton heterótrofo, tanto el uso de cámaras de sedimentación como el recuento por epifluorescencia mostraron los mismos patrones de variación espacial y temporal, lo que indica que las dos metodologías son útiles en la evaluación de la abundancia de esta comunidad.
- Las abundancias del bacterioplancton y nanoplancton heterótrofo en el embalse del Neusa presentaron correlaciones significativas. Sin embargo la intensidad de esta interacción varió espacial y temporalmente; los cambios en la intensidad de esta relación podría tener que ver con las fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos en el embalse.
- Los nutrientes parecieron estar mejor relacionados temporal y espacialmente con la densidad bacteriana que los otros factores físico-químicos. Aparentemente el oxígeno puede tener implicaciones importantes en la distribución vertical de la abundancia de los heterótrofos nanoflagelados en la columna de agua. Parecería que el funcionamiento hidráulico e hídrico del embalse, no afecta directamente a las comunidades estudiadas. No obstante, factores como la dilución y la entrada de partículas en suspensión podrían haber influido a la comunidad del

fitoplancton, generando un efecto positivo indirecto en la abundancia del bacterioplancton en los periodos de mayor precipitación y caudal.

- En general el volumen celular de las bacterias se encontró dentro de los rangos reportados para otros cuerpos de agua oligotróficos. Sin embargo, se halló un predominio de pequeños tamaños, posiblemente como una respuesta a la limitación por nutrientes. En Las Juntas, este comportamiento pudo ser consecuencia además, del fuerte pastoreo selectivo del nanoplancton sobre las bacterias.

RECOMENDACIONES

- Para tener una técnica de recuento de nanoplancton heterótrofo más sensible, sería recomendable utilizar un fluorocromo como la primulina. Según Caron (1983), este compuesto permite una mejor diferenciación de las estructuras celulares, utilizando un único filtro, puesto que tiene una mayor especificidad por los lípidos de las membranas celulares y además no enmascara la autofluorescencia de la clorofila. Lo anterior reduciría la variación introducida con el uso de naranja de acridina.
- La implementación de técnicas como la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), podría ofrecer información acerca de la contribución de poblaciones bacterianas en la abundancia total y a la distribución de tamaños de la comunidad.
- Este estudio podría complementarse con la medición de tasas de productividad bacteriana y tasas de depredación y remoción por parte del nanozooplancton, con el fin de cuantificar la transferencia de energía a través de la bacteriovoria y su contribución a la productividad general del sistema.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association. (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPC). 1995. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 19 Edition. United Book Press Inc. Baltimore.
- Almeida, M., Cunha, M. and Alcántara, F. 2001. Loss of estuarine bacteria by viral infection and predation in microcosm conditions. *Microbial Ecology*. 42: 562 - 571.
- Atlas, R. y Bartha, R. 2002. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Pearson Educación. Prentice Hall. España. 696 p.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Riel, L. and Thingstad, F. 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*. 10: 257 - 263.
- Benner, R., Pakulski, J.D., McCarthy, M., Hedges, J.I. and Hatcher, P.G. 1992. Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science*. 255: 1561 - 1564.
- Berninger, U., Finlay, B.J. and Kuuppo-Leinikki, P. 1991. Protozoan control of bacterial abundances in freshwater. *Limnology and Oceanography*. 36: 139 - 147.
- Bloem, J., Starink, M., Bär-Gillisen, B.M. and Cappen-Bert, T.E. 1988. Protozoan grazing, bacterial activity, and mineralization in two-stage continuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 3113 - 3121.
- Bohannan, B. and Lenski, R. 2000. The relative importance of competition and predation varies with productivity in a model community. *American Naturalist*. 156: 329 - 340.
- Bratbak, G. 1993. Microscope methods for measurement of carbon and nitrogen biomass and biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In: Kemp, P. Sherr, B. Sherr, E. and Cole, J. Edit. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton. 309 - 318.
- Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lawrence, J.R. 1992. Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology. In: *Advances in Microbial Ecology*. Vol. 12. K.C. Marshall ed. Plenum Press. New York. 1 - 67.

- Canosa, A. y Niño, J.P. 2005. Estructura y variación espacio - temporal de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa, un ecosistema acuático alto Andino". Informe final COLCIENCIAS. Proyecto financiado por la Fundación Universitaria Jorge Tadeo Lozano y COLCIENCIAS. Bogotá.
- Canosa, A. y Niño, J.P. 2004. Estructura y variación espacio - temporal de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa, un ecosistema acuático alto Andino". Proyecto financiado por la Fundación Universitaria Jorge Tadeo Lozano y COLCIENCIAS. Bogotá. Mecanografiado.
- 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 U.J.T.L. y Fundación para la Promoción de la Ciencia y de la Tecnología del Banco de la República.
- Canosa, A. y Pinilla, G. 1999. Bacteriological eutrophication indicators in four Colombian water bodies. *Lakes and Reservoir: Research and Management*. 4: 23 - 27.
- Canosa, A. 1998. Técnica de epifluorescencia para el conteo total de bacterias. Conteo de bacterias viables. Manual de Procedimientos en el Laboratorio de Microbiología. U.J.T.L. Bogotá, Mecanografiado.
- Canosa, A. y Pinilla, G. 1998. Evaluación de la población bacteriana total en tres cuerpos de agua lénticos mediante la técnica de epifluorescencia. Informe Final. U.J.T.L. y COLCIENCIAS.
- Canosa, A. y Pinilla, G. 1995. Indicadores bacteriológicos de eutroficación en los embalses de Chuza, Neusa, Tominé y en la laguna de Chingaza. Informe final U.J.T.L. y COLCIENCIAS.
- Caron, D.A. 2000. Symbiosis and Mixotrophy Among Pelagic Microorganisms. *In: Microbial Ecology of the Oceans*. Kirchman, D.L. Ed. Wiley - Liss. U.S.A. 495 - 523.
- Caron, D.A. 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedurert. *Applied and environmental* . 46 (2): 491 - 498.
- CAR - Corporación Autónoma Regional. 1968. Mapificación, inventario y datos forestales del embalse del Neusa. Facultad de Ingeniería Forestal. Universidad Distrital. Bogotá.
- CAR - Corporación Autónoma Regional. 2005. Informe técnico - Características Hidrológicas e Hidráulicas del Embalse del Neusa. Documento de trabajo.

- Carrillo, Y. y Guarín, A. 2000. Dinámica de la biomasa de *Egeria densa* en el embalse del Neusa. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Christaki, U., Van-Wambeke, F. and Dolan, J. 1999. Nanoflagellates (mixotrophs, heterotrophs and autotrophs) in the oligotrophic eastern Mediterranean: standing stocks, bacterivory and relationships with bacterial production. *Marine Ecology Progress Series*. 181: 297 - 307.
- Chrzanowsky, T. and Grover, J. 2001. Effects of mineral nutrients on the growth of bacterio- and phytoplankton in two southern reservoirs. *Limnology and Oceanography*. 40(6): 1319 - 1330.
- Chrzanowski, T. H. and Šimek, K. 1990. Prey-size selection by freshwater flagellated protozoa. *Limnology and Oceanography*. 35: 1787 - 1795.
- Cole, J., Pace, M., Caraco, N. and Steinhart, G. 1993. Bacterial biomass and cell size distributions in lakes: More and larger cells in anoxic waters. *Limnology and Oceanography*. 38(8): 1627 - 1632.
- Colinvaux, P. 1991. Introducción a la Ecología. Ed. Limus. México. 473 - 495.
- Davis, P. and Sieburth, J. 1982. Differentiation of phototrophic and heterotrophic nanoplankton populations in marine waters by epifluorescence microscopy. *Annals Institute Oceanography*. 58: 249 - 255.
- Domaizon, I., Viboud, S. and Fontvieille D. 2003. Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microbiology Ecology*. 46: 317 - 329.
- Fenchel, T. 1986. The ecology of heterotrophic microflagellates. *In*: Marshall, K.C. (ed.) *Advances in Microbial Ecology*. Plenum Press, New York. 57 - 97.
- Fenchel, T. 1982. Ecology of heterotrophic microflagellates: II. Bioenergetics and growth. *Marine Ecology Progress Series*. 8: 225 - 231.
- Fogg, G. 1995. Some comments on picoplankton and its importance in the pelagic ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*. 9 (1): 33 - 39.
- Fry, J. 1990. Direct methods and biomass estimation. *In*: Grigorova, R. and Norris, J.R. *Methods in Microbiology*. Academic Press. 41 - 85.
- Fuhrman, J.A. and Noble, R. T. 1995. Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*. 40: 1236 - 1242.

- Fuhrman, J.A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*. 399: 541 - 548.
- Fuhrman, J.A. 1981. Influence of method on the apparent size distribution of bacterioplankton cell: Epifluorescent microscopy compared to scanning microscopy. *Marine Ecology Progress Series*. 5: 103 - 106.
- González, J., Sherr, E. B. and Sherr, B. F. 1990. Size selecting grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 583 - 589.
- Güde, H. 1985. Influence of phagotrophic processes on the regeneration of nutrients recycling: Theory, observation, and consequences. *Ecology*. 80: 735 - 751.
- Gurung, T., Nakanishi, M. and Urabe, J. 2000. Seasonal and vertical difference in negative and positive effects of grazers on heterotrophic bacteria in lake Biwa. *Limnology and Oceanography*. 45(8): 1689 - 1696.
- Herbert, R.A. 1990. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In: Grigorova, R. y Norris, J.R. *Methods in Microbiology*. Academic Press. 1 - 39.
- Hobbie, J.E., Dary, R.J., and Jasper, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 1225 - 1278.
- Iriberry, J., Ayo, B., Unanue, M., Barcina, I. and Egea, L. 1993. Channeling of bacterioplanktonic production toward phagotrophic flagellates and ciliates under different seasonal conditions in a river. *Microbiology Ecology*. 26: 111 - 124.
- Jezbera, J., Redoma, J. and Šimek, K. 2003. Longitudinal changes in protistan bacterivory and bacterial production in two canyon-shaped reservoirs of different trophic status. *Hydrobiologia*. 504: 115 -130.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S. and Amann, R. 1999. Morphological and compositional changes in planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3): 1241 - 1250.
- Jürgens, K. and Güde, H. 1994. The potential importance of grazing resistant bacteria in planktonic systems. *Marine Ecology Progress Series*. 112: 169 - 188.
- Kepner, R.L. and Pratt, J.R. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews*. Dec. 54(4): 603 - 615.

- Kisand, V. and Noges, T. 2004. Abiotic and biotic factors regulating dynamics of bacterioplankton in a large shallow lake. *FEMS Microbiology Ecology*. 50: 51 - 62.
- Koch, A. 1996. What size should a bacterium be? A question of scale. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:317 - 48.
- Lambert, W. and Sommer, J. 1997. *Limnoecology: The ecology of lakes and streams*. Oxford University. New York. 187 - 196.
- Lee, S. 1993. Measurement of carbon and nitrogen biomass and biovolume from naturally derived marine bacterioplankton. In: Kemp, P. Sherr, B. Sherr, E. and Cole, J. Editor. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton. 319 - 326.
- Leica. 1996. *Leica QWin User Guide and Leica QWin Reference Guide. Image Processing and Analyses System*. Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, England. 150p.
- López, L. 2002. Cuantificación de protozoos nanoplanctónicos en cultivos y aguas naturales. Trabajo de grado (Bióloga Marina). Universidad Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Biología Marina. Bogotá. 100p.
- Lovejoy, C., Carmack, E., Legendre, L. and Price, N. 2002. Water column interleaving: a new physical mechanism determining protist communities and bacterial states. *Limnology and Oceanography*. 47(6): 1819 - 1831.
- Lucas, M.I., Probyn, T.A. and Painting, S.J. 1987. An experimental study of microflagellate bacterivory: further evidence for the importance and complexity of microplanktonic interactions. *Journal of Marine Science*. 5: 791 - 808.
- Lund, J., Kipling, C. and Le Cren, E. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hidrobiologia*. 11:143 - 170.
- Madigan, T., Martinko, J. and Parker, J. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. Octava edición. Prentice Hall, Iberia. Madrid. 550 - 551.
- Massana, R. and Pedrós-Alió, C. (1994) Role of anaerobic ciliates in planktonic food webs: abundance, feeding and impact on bacteria in the field. *Applied and environmental*. 60: 1325 - 1334.
- Miracle, M.R., Vicente, E. and Pedrós-Alió, C. 1992. Biological studies of Spanish meromictic and stratified lakes. *Limnetica*. 8: 59 - 77.
- Morris, C. (edit). 1991. *Academic Press Dictionary of Science and Technology*. Academic Press. USA. 2432p.

- Muylaert, K., Van Der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M. and Vyverman, W. 2002. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (6): 4740 - 4750.
- Norland, S. 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Kemp, P. Sherr, B. Sherr, E. and Cole, J. Edit. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publisher. Boca Raton. 303 - 307.
- Odum, E. 1992. *Ecología. Bases Científicas para un Nuevo Paradigma*. Primera edición. Ediciones Vedra. Barcelona. 230 - 231.
- Pace, M. L. and Cole J. J. 1994. Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microbial Ecology*. 28: 181 - 193.
- Patterson, D. J. 2003. *Free-Living Freshwater Protozoa. A colour guide*. Manson Publishing. Washington. 223p.
- Pedrós-Alió , C., Calderón-Paz, J., and Gasol, J. 2000. Comparative analysis shows that bacterivory, not viral lysis, controls the abundance of heterotrophic prokaryotic plankton. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 157 - 165.
- Pernthaler, J., Poch, T., Šimek, K., Vrba, J., Amann, R. and 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, M.L. 1974 The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience*. 24: 499 - 504.
- Posh, T., Loferer-Kröbacher, M., Gao, G., Alfreider, A., Pernthaler, J. and 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. 1993. Determination of size and morphology of aquatic bacteria by automated image analysis. In: Kemp, P. Sherr, B. Sherr, E. and Cole, J. Edit. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton. 339 - 346.
- Psenner, R. and 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.

- Reid, F. 1983. Biomass estimation of components of the marine nanoplankton and picoplankton by the Utermöhl settling technique. *Journal of Plankton Research*. 5(2): 235 - 252.
- Rosenzweig, M. and MacArthur, K. 1963. Graphical representation and stability conditions of predator-prey interactions. *American Naturalist*. 97: 209 - 223. In: Lampert, W. and Sommer, J. 1997. *Limnoecology: The ecology of lakes and streams*. Oxford University. New York. 187 - 196.
- Ruppert, B. y Barnes, R. 1996. *Zoología de los invertebrados*. Sexta edición. Mc Graw Hill Interamericana. México. 1114 p.
- Ruppert, B., Fox, E. and Barnes, R. 2004. *Invertebrate Zoology, A Functional Evolutionary Approach*, 7^a. Ed. Brooks Cole Thomson, Belmont, CA. 963p.
- Sanders, R. W., Caron, D. and Berninger U. 1992. Relationship between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Marine Ecology Progress Series*. 86: 1 - 14.
- Sanders, R. W. 1991. Trophic strategies among heterotrophic flagellates. In: Patterson, D and Larsen, J. Edit. *The Biology Of Free Living Heterotrophic Flagellates*. Calderon Press, Oxford. 21 - 38.
- Sanders, R.W., Porter, K.G., Nennet, S.J. and De Biase, A.E. 1989. Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnology and Oceanography*. 34: 673 - 687.
- Sanders, R. W and Porter K. G. 1988. Phagotrophic flagellates. *Advances in Microbial Ecology* 10: 167 - 192.
- Scavia, D. 1988. On the role of bacteria in secondary production. *Limnology and Oceanography*. 33: 1220 - 1224.
- Šherr, E.B., Caron, E.A. and Sherr, B.F. 1993. Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. In: Kemp, P. Sherr, B. Sherr, E. and Cole, J. Edit. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton. 207 - 212.
- Šherr, E.B. and Sherr, B.F. 1993. Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy. In: Kemp, P. Sherr, B. Sherr, E. and Cole, J. Edit. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton. 213 - 228.
- Šherr, B. F., Sherr, E. B. and McDaniels, J. 1992. Effect of protistan grazing on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages.

- Applied and Environmental Microbiology. 58: 2381 - 2385.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B. and Rassoulzadegan, F. 1988. Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: temperature dependence. Applied and Environmental Microbiology. 54: 1091 - 1095.
- Šherr, B. F. and Sherr E. B. 1987. High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates. Nature. 325: 348 - 351.
- Šherr, B. F., Sherr, E. B. and Bertman, T. 1983 Grazing, growth and ammonium excretion rates of heterotrophic microflagellate fed with four species of bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 45: 1196 - 1201.
- Sieracki, M., Reichenbach, S. and Webb, K. 1989. Evaluation of threshold selection methods for accurately sizing microscopic fluorescent cells by image analysis. Applied and Environmental Microbiology. 55 (11): 2762 -2772.
- Sieracki, M., Johnson, P. and Sierburth, J. 1985. Detection enumeration and sizing of aquatic bacteria by image analyzed epifluorescence microscopy. Applied and Environmental Microbiology. 55: 2762 - 2772.
- Šimek, K., Hartman, P. and Kojecká, P. 1999. Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in eutrophic reservoir. Limnology and Oceanography. 44(7): 1634 - 1644.
- Šimek, H., Vrba, J., Pernthaler, J., Posh, T., Hartman, P., Nedoma, J. and Psenner, R. 1997. Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protist with contrasting feeding modes. Applied and Environmental Microbiology. 62(2): 587 - 595.
- Šimek, K. and Chrzanowski, T. 1992. Direct evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. Applied and Environmental Microbiology. 58(11): 3715 - 3720.
- Šolić, M., Krstulović, N. and Šestanović, S. 2001 The roles of predation, substrate supply and temperature in controlling bacterial abundance: interaction between spatial and seasonal scale. Acta Adriatica. 42(1): 35 - 48.
- Steele, J. H. 1974. The Structure of Marine Ecosystems. Harvard University of Cambridge, M.A.
- Stoderegger, K. and Herndl, G. J. 1998. Production and release of bacterial capsular material and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. Limnology and Oceanography. 43: 877 - 884.
- Stoecker, D.K. 1999. Mixotrophy among dinoflagellates. Journal of

- Eukaryotic Microbiology. 46: 397- 401.
- Strayer, D. 1988. On the limits to secondary production. *Limnology and Oceanography*. 33: 1217 - 1220.
- Strom, S. 2000. Bacterivory: Interactions Between Bacteria and their Grazers. In: *Microbial Ecology of the Oceans*. Kirchman, D.L. Ed. Wiley - Liss. U.S.A. 351 - 386.
- Suttle, C.A. 1994. The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microbial Ecology*. 28: 237 - 243.
- Suzuki, M. 1999. Effect of protistan bacterivory on coastal bacterioplankton diversity. *Aquatic Microbial Ecology*. 20: 261 - 272.
- Thingstad, T. and Lignell. R. 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquatic Microbial Ecology*. 13: 19 - 27.
- Thouvenot, A.; Debroas, D.; Devaux, J. 1999. Bacterivory of metazooplankton, ciliates and flagellates in a newly flooded reservoir. *Journal of Plankton Research*. 21: 1659 - 1679.
- Torsvik, V., Ovreas, L., and Thingstad, T.F. (2002) Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*. 296: 1064 - 1066.
- Turley, C.M. 1993. Direct estimates of bacterial numbers in seawater samples without incurring cell loss due to sample storage. In: Kemp, P. Sherr, B. Sherr, E. and Cole, J. Edit. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton. 143 - 148.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommenung der quantitativen Phytoplankton: methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*. 9: 1 - 38.
- Vaqué, D., Calderón-Paz, J., Guixa-Boixereu, N. and Pedrós-Alió, C. 2002. Spatial distribution of microbial biomass and activity (bacterivory and bacterial production) in the northern Weddel Sea during the austral summer (January 1994). *Aquatic Microbial Ecology*. 29: 107 - 121.
- Vaqué, D., Gasol, J.M. and Marrasé, C. 1994. Grazing rates on bacteria: the significance of methodology and ecological factors. *Marine Ecology Progress Series*. 109: 263 - 274.
- Valencia, J., Abalde, J., Bode, A., Cid, A., Fernández, E., González, N., Lorenzo, J., Teira, E. and Varela, M. 2003. Variations in planktonic bacterial biomass and production, and phytoplankton blooms off A Coruña (NW Spain). *Scientia Marina*. 67(2): 143 - 157.

- Verity, P.G. and Sieracki, M.E. 1993. Use of color image analysis and epifluorescence microscopy to measure plankton biomass. In: Kemp, P. Sherr, B. Sherr, E. y Cole, J. Edit. Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers. Boca Raton. 327 - 338.
- Weinbauer, M. 2003. Ecology of prokariotic viruses. FEMS. Microbiology Reviews. 1 - 55.
- Weinbauer, M.G. and Höfle, M.G. 1998. Significance of viral lysis and flagellate grazing as factors controlling bacterioplankton production in a eutrophic lake. Applied and Environmental Microbiology. 64 (2): 431 - 438.
- Wetzel, R. and Likens, G. 1991. Composition and Biomass of Phytoplankton. In: Limnological Analyses. 2^a edition. Springer Verlag. New York. 391p.
- Wille, A., Sonntag, B., Sattler, B. and Psenner, R. 1999. Abundance, biomass and size structure of the microbial assemblage in the high mountain lake Gossenköllesee (Tyrol, Austria) during the ice-free period. Journal of Limnology. 58(2): 117 - 126.
- Wommack, J. and Colwell, R. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64 (1): 69 - 114.
- Wommack, E., Ravel, J., Hill, R., Chunk, J. and Colwell, R. 1999. Population dynamics of Chesapeake Bay virioplankton: total community analysis by pulsed-field gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 65(1): 231 - 240.
- Zar, J. 1999. Biostatistical Análisis. Fourth Edition. Prentice Hall. New York. 663p.

ANEXO A

EL PROCEDIMIENTO GENERAL DEL CUAL SE HABLÓ EN EL MARCO TEÓRICO FUE ORGANIZADO EN UNA RUTINA DE TRABAJO SEMIAUTOMÁTICA COPIA DEL QUIP

ALGORITMOS PARA CONTRUCCIÓN DE LA MASCARA

PRIMERA ALTERNATIVA

- Identificación de regiones máximas blancas.
- Sustracción de constantes o capas de píxeles a la imagen original.
- Autocontraste para una mayor definición de los objetos con el fondo.
- Extracción de detalles blancos del fondo oscuro.
- Producción de un gradiente morfológico de la imagen.
- Producción de una imagen sólida con una distribución igual de los niveles de gris para incrementar el contraste de los objetos con el fondo.
- Continúas sustracciones y adiciones de píxeles a la imagen original de imágenes modificadas.
- Arreglos a la imagen resultante con erosión (contracción de la imagen moviendo los límites hacia adentro de una manera uniforme), seguida de una dilatación (expansión de la imagen moviendo los límites hacia fuera) para limpiar la imagen de pequeños objetos oscuros; y una secuencia dilatación de seguida de una erosión para remover pequeños objetos brillantes.
- Expansión del contraste de las áreas brillantes

SEGUNDA ALTERNATIVA imágenes brillantes sobre fondo claro

El proceso alternativo para la construcción de la máscara, difirió del anterior puesto que involucró menor cantidad y algunos diferentes algoritmos. Debido a la gran cantidad de fluorescencia de fondo, estos algoritmos tienden a disminuir el tamaño y delimitar mejor las células por la falta de contraste entre el objeto y el fondo. Los procedimientos para esta máscara son los siguientes:

- Identificación de regiones mínimas blancas.
- Sucesivas sustracción de constantes o píxeles a la imagen original que produce una imagen más oscura.
- Delineación morfológica para mejorar la definición de los bordes ajustando cada píxel a los valores locales máximos y mínimos sobre una región
- Arreglos a la imagen resultante: se realizó una secuencia de erosión seguida de una dilatación para limpiar la imagen de pequeños objetos oscuros; y una secuencia dilatación de seguida de una erosión para remover pequeños objetos brillantes.
- Autocontraste, para obtener una mayor definición de los objetos con el fondo.

Una vez se obtuvo la máscara, se efectuó una detección para implantar la semilla o punto de inicio de reconstrucción de las células. En este paso se aseguró incluir todas las formas bacterianas, sin importar que se detecte el fondo. La detección se llevó a cabo desde un nivel de gris de 219 a 255 píxeles. A la imagen resultante se

le realizó una fuerte erosión que disminuye hasta cinco veces los objetos muy grandes y deja las muy pequeñas. Luego se ejecutó una serie de arreglos con secuencias de erosiones seguidas de dilataciones y viceversa, con el fin de remover la imagen de pequeños objetos oscuros y de pequeños objetos brillantes.

A continuación se presenta la programación del quip desarrollado con todos los pasos y algoritmos usados en el Software *Leica Qwin*:

Iniciar

```
PauseText ( "Si quieres capturar una imagen dale 1, si quieres abrir una imagen
archivada dale 0." )
Input ( FUENTE )
If ( FUENTE=1 )
  Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\captura.Q5R ) Else
  Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\abrir.Q5R ) Endif
```

Captura

```
PauseText ( "Asegurate de ajustar el "brightness" adecuado, debe ser el mismo
para todas las imagenes (32.17-32.19). Enfoca la imagen.....y captura!" )
Image Setup [PAUSE] ( Camera 0, Upper 100.00, Lower 32.19, Lamp 0.00 )
Acquire average ( Number of cycles: 6, image Image0 )
PauseText ( "Dale un nombre a la imagen recién capturada y ubicala en la carpeta
que le corresponde." )
Write image [PAUSE] ( from Image0 into file C:\QPCMC\IMAGES\Bacterioplancton
Marino, export calibration )
Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\Theone.q5r )
```

Abrir

```
PauseText ( "Selecciona la imagen que quieras procesar." )
Read image [PAUSE] ( from file C:\QPCMC\IMAGES\Bacterioplancton Marino into
Image0, import calibration )
Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\Theone.q5r )
```

Máscara para células con buen contraste (The one)

```
Grey Transform ( Maxima from Image0 to Image1, depth 218, operator Octagon )
Grey Transform ( WTopHat from Image1 to Image2, cycles 2, operator Octagon )
Grey Arithmetic ( C = A-B : C Image3, A Image1, B Image2 )
Grey Transform ( Gradient from Image3 to Image4, cycles 1, operator Octagon )
Grey LUT ( Histo EQ from Image0 to Image5 )
Grey Arithmetic ( C = A-B : C Image1, A Image5, B Image0 )
Grey Arithmetic ( C = A-B : C Image2, A Image0, B Image1 )
Grey Arithmetic ( C = A+B : C Image3, A Image2, B Image2 )
Grey Arithmetic ( C = A+B : C Image5, A Image3, B Image4 )
Grey Amend ( Open from Image5 to Image1, operator Octagon, cycles 1 )
Grey Amend ( Close from Image1 to Image2, operator Octagon, cycles 1 )
```

```

Grey Transform ( Maxima from Image2 to Image3, depth 218, operator Octagon )
Grey LUT ( AutoContrast from Image3 to Image5 )
Grey Transform ( WTopHat from Image4 to Image4, cycles 2, operator Octagon )
Grey LUT ( Sq root from Image4 to Image3 )
Grey Arithmetic ( C = A-B : C Image1, A Image5, B Image3 )
Grey Arithmetic ( C = A+B : C Image2, A Image1, B Image1 )
PauseText ( "Esta deteccion servira como mascara y debe ser muy precisa,
evitando incluir el halo. Dale Ok aunque estes inconforme..." )
Detect [PAUSE] ( from grey level 255 to 255, from Image2 into Binary0 delineated
)
PauseText ( "Si la detección fue exitosa escribe 1, de lo contrario 0." )
Input ( MASCARA )
If ( MASCARA=1 )
Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\Bin.q5r ) Else
Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\Brillantes2.Q5R ) Endif

```

Máscara para fondo brillante

```

Grey Transform ( Minima from Image0 to Image1, depth 255, operator Octagon )
Grey Arithmetic ( C = A-B : C Image2, A Image0, B Image1 )
Grey Transform ( Minima from Image2 to Image3, depth 255, operator Octagon )
Grey Arithmetic ( C = A-B : C Image4, A Image2, B Image3 )
Grey Transform ( Delineate from Image4 to Image5, cycles 1, operator Octagon )
Grey Amend ( Open from Image5 to Image2, operator Octagon, cycles 2 )
Grey LUT ( AutoContrast from Image2 to Image3 )
Grey Amend ( Close from Image3 to Image4, operator Octagon, cycles 10 )
PauseText ( "Esta detección servirá como mascara y debe ser muy precisa." )
Detect [PAUSE] ( from grey level 255 to 255, from Image4 into Binary0 delineated
)
PauseText ( "Si estas conforme con la detección dale 1, si no dale 0....el campo no
sirve, intentalo denuevo." )
Input ( MASKARA )
If ( MASKARA=1 )
Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\Bin.q5r ) Else
Grey Util ( Clear All )
Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\Iniciar.Q5R ) Endif

```

Imagen binaria

```

Display (Image0 (on), frames (on,on), planes (off,off,2,off,off,off), lut 5, x 0, y 0, z 1,
Reduction off )
PauseText ( "Incluye en la detección todas las formas bacterianas, sin que mucho
importe el fondo." )
Detect [PAUSE] ( from grey level 219 to 255, from Image0 into Binary2 delineated
)
Binary Segment ( Ult Erode from Binary2 to Binary3, stepsize 5, max cycles 0,
operator Octagon )
Binary Amend ( Open from Binary3 to Binary4, cycles 1, operator Octagon, edge
erode on )
Binary Amend ( Close from Binary4 to Binary5, cycles 1, operator Octagon, edge
erode on )

```

Binary Amend (Open from Binary5 to Binary2, cycles 1, operator Octagon, edge erode on)
 Binary Amend (Close from Binary2 to Binary5, cycles 1, operator Octagon, edge erode on)
 Binary Amend (Erode from Binary5 to Binary2, cycles 1, operator Octagon, edge erode on)
 Chain (C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\edibin.Q5R)

Edición binaria y medición

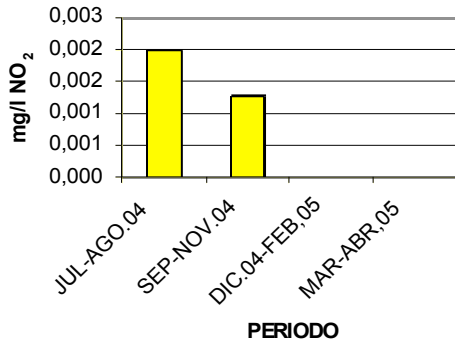
Display (Image0 (on), frames (on,on), planes (off,off,2,off,off,off), lut 5, x 0, y 0, z 1, Reduction off)
 PauseText ("Rechaza las interferencias o aspectos brillantes en las zonas corregidas y de ser necesario une los largos filamentos que hayan sido segmentados.")
 Binary Edit [PAUSE] (Reject from Binary2 to Binary3, nib Rect, width 1)
 Binary Segment (GdsSkiz from Binary0 to Binary3, operator Octagon)
 PauseText ("Confirma la detección y..... a medir!")
 Binary Edit [PAUSE] (Line from Binary3 to Binary4, nib Rect, width 1)
 Feature Accept :
 Area from 3.024999984e-002 to 100.0004501
 Measure feature (plane Binary4, 64 ferets, minimum area: 10, grey image: Image0)
 Selected parameters: Area, X FCP, Y FCP, Length, Breadth, Roundness, AspectRatio, FullRatio, UserDef3
 Feature Expression (UserDef3 (all features), title biovolumen = (0.7854*PBREADTH(FTR)*PBREADTH(FTR))*(PLENGTH(FTR)-(0.333333333333*PBREADTH(FTR))))
 Display Feature Results (x 16, y 631, w 1036, h 194)
 Label Feature (Number)
 PauseText ("Dale 1 si el proceso se realizó satisfactoriamente, si no dale 0.")
 Input (LISTO)
 If (LISTO=1)
 Goto GRABAR Else
 Goto REPETIR Endif
 GRABAR:
 Binary to Grey (Copy Binary4 to bit 7 of Image1)
 PauseText ("Dale nombre a la imagen sobre la cual se realizaron las mediciones")
 Write image [PAUSE] (from Image1 into file C:\QPCMC\IMAGES\Bacterioplancton Marino, export calibration)
 Grey Util (Clear All)
 PauseText ("Dale 1 si quieres seguir capturando, si quieres abrir una imagen dale 0.")
 Input (SERONOSER)
 If (SERONOSER=1)
 Chain (C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\captura.Q5R) Else
 Chain (C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\abrir.Q5R) Endif
 REPETIR:
 Chain (C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\repetir.Q5R)

Repetir

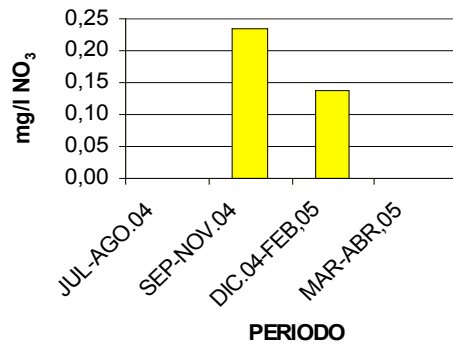
```
PauseText ( "Dale 1 si el problema se soluciona en edición binaria, si no dale 0." )  
Input ( PROBLEMA )  
If ( PROBLEMA=1 )  
Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\edibin.Q5R ) Else  
Grey Util ( Clear All )  
Chain ( C:\QPCMC\QUIPS\Pruebas04\THE ONE\Iniciar.Q5R ) Endif
```

ANEXO B

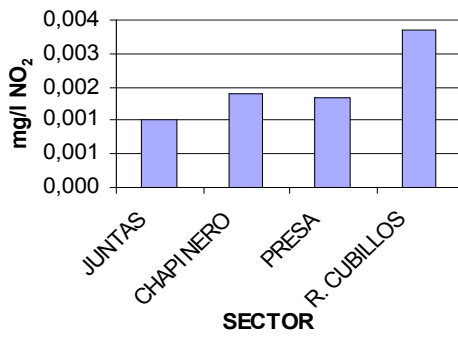
GRÁFICAS DE CONCENTRACIONES PROMEDIO DE NITRITOS (NO₂) Y NITRATOS (NO₃) POR PERIODO Y SECTOR DE MUESTREO Y ESTRATO DE LA COLUMNA DE AGUA.



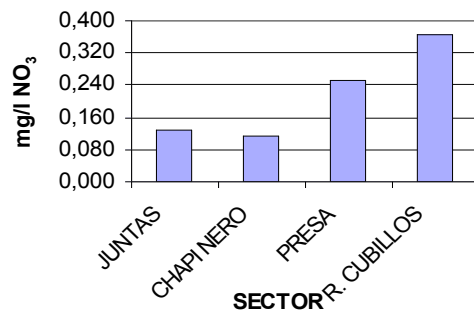
a.



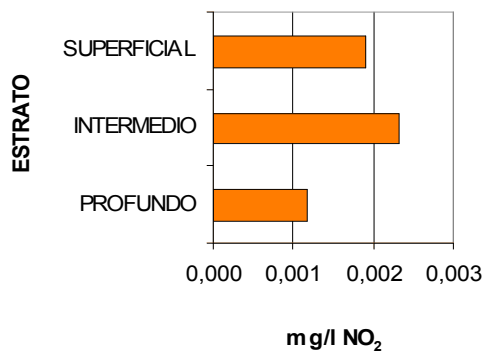
b.



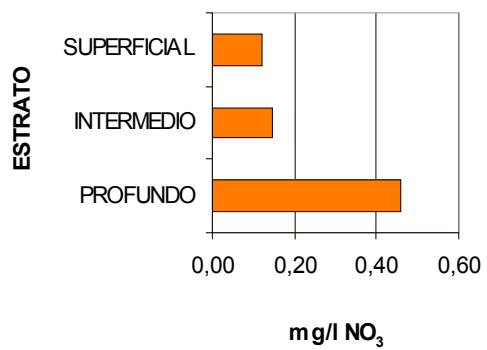
c.



d.



e.



f.

Gráficas de concentraciones promedio de nitritos (a, c y e) y nitratos (b, d y f), agrupados por periodo (a y b) y sector (c y d) de muestreo y estrato de la columna de agua (e y f).

ANEXO C
DENSIDADES MÁXIMAS, MÍNIMAS Y PROMEDIO DE BACTERIOPLANCTON EN CADA PUNTO DE MUESTREO DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO

Estación	Variabes / Muestras	1	2	3	5	6	7	8	9	10	Total
1	Máximo	5,79E+06	2,63E+06	3,65E+06	4,31E+06	4,37E+06	3,34E+06	4,48E+06	4,48E+06	1,78E+06	5,79E+06
	Mínimo	2,95E+06	1,90E+06	2,35E+06	3,39E+06	3,30E+06	2,57E+06	3,45E+06	3,45E+06	1,14E+06	1,14E+06
	Promedio	4,62E+06	2,34E+06	3,02E+06	3,82E+06	3,84E+06	2,99E+06	4,03E+06	4,03E+06	1,52E+06	3,36E+06
2	Máximo	4,32E+06	1,70E+06	1,88E+06	2,72E+06	1,40E+06	2,07E+06	1,89E+06	1,54E+06	1,44E+06	4,32E+06
	Mínimo	2,68E+06	1,56E+06	1,78E+06	2,09E+06	1,16E+06	1,63E+06	1,82E+06	1,12E+06	1,16E+06	1,12E+06
	Promedio	3,37E+06	1,62E+06	1,82E+06	2,35E+06	1,27E+06	1,92E+06	1,86E+06	1,38E+06	1,32E+06	1,88E+06
3	Máximo	2,91E+06	2,38E+06	2,51E+06	1,99E+06	1,35E+06	2,04E+06	1,89E+06	1,85E+06	1,56E+06	2,91E+06
	Mínimo	2,52E+06	2,02E+06	1,65E+06	1,79E+06	9,90E+05	1,93E+06	1,40E+06	1,29E+06	9,69E+05	9,69E+05
	Promedio	2,73E+06	2,20E+06	2,13E+06	1,92E+06	1,11E+06	1,97E+06	1,65E+06	1,52E+06	1,34E+06	1,85E+06
4	Máximo	4,14E+06	2,04E+06	1,56E+06	3,75E+06	2,26E+06	1,81E+06	1,55E+06	4,61E+06	1,48E+06	4,61E+06
	Mínimo	2,43E+06	1,70E+06	1,28E+06	2,61E+06	1,52E+06	1,55E+06	1,25E+06	2,95E+06	1,23E+06	1,23E+06
	Promedio	3,12E+06	1,83E+06	1,43E+06	3,27E+06	1,89E+06	1,65E+06	1,40E+06	3,73E+06	1,38E+06	2,19E+06
5	Máximo	3,07E+06	2,92E+06	1,93E+06	2,50E+06	9,05E+05	2,33E+06	1,97E+06	2,36E+06	1,65E+06	3,07E+06
	Mínimo	2,56E+06	2,46E+06	1,56E+06	2,29E+06	7,33E+05	1,86E+06	1,17E+06	2,24E+06	1,13E+06	7,33E+05
	Promedio	2,87E+06	2,74E+06	1,79E+06	2,41E+06	7,95E+05	2,03E+06	1,65E+06	2,30E+06	1,47E+06	2,00E+06
6	Máximo	3,24E+06	1,60E+06	1,61E+06	2,50E+06	1,05E+06	1,40E+06	1,06E+06	2,89E+06	8,57E+05	3,24E+06
	Mínimo	2,00E+06	1,48E+06	1,45E+06	1,65E+06	8,68E+05	1,37E+06	7,92E+05	2,39E+06	6,11E+05	6,11E+05
	Promedio	2,66E+06	1,54E+06	1,55E+06	2,17E+06	9,42E+05	1,38E+06	9,27E+05	2,60E+06	7,56E+05	1,62E+06
7	Máximo	2,63E+06	-	2,93E+06	1,65E+06	1,14E+06	1,82E+06	2,19E+06	2,83E+06	1,70E+06	2,93E+06
	Mínimo	2,63E+06	-	2,35E+06	1,26E+06	6,70E+05	1,07E+06	1,77E+06	1,72E+06	1,37E+06	6,70E+05
	Promedio	2,63E+06	-	2,66E+06	1,48E+06	8,63E+05	1,49E+06	2,00E+06	2,11E+06	1,58E+06	1,78E+06
8	Máximo	5,62E+05	9,20E+05	1,17E+06	6,31E+05	2,09E+06	2,93E+06	3,36E+06	1,86E+06	7,07E+05	3,36E+06
	Mínimo	4,37E+05	7,77E+05	5,63E+05	5,63E+05	1,93E+06	2,68E+06	3,14E+06	1,72E+06	5,41E+05	4,37E+05
	Promedio	5,11E+05	8,54E+05	8,85E+05	6,01E+05	2,02E+06	2,84E+06	3,22E+06	1,77E+06	6,25E+05	1,48E+06
Total	Máximo	5,79E+06	2,92E+06	3,65E+06	4,31E+06	4,37E+06	3,34E+06	4,48E+06	4,61E+06	1,78E+06	5,79E+06
	Mínimo	2,00E+06	1,48E+06	1,28E+06	1,26E+06	6,70E+05	1,07E+06	7,92E+05	1,12E+06	6,11E+05	4,37E+05
	Promedio	3,14E+06	2,04E+06	2,06E+06	2,49E+06	1,53E+06	1,92E+06	1,93E+06	2,52E+06	1,34E+06	2,10E+06

ANEXO D

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS PARA LAS DENSIDADES PROMEDIO DE BACTERIOPLANCTON ENTRE ESTACIONES Y MUESTREOS

Diferencias significativas entre densidades promedios de estaciones según la prueba de Kolmogorov - Smirnov para dos muestras independientes.

Estaciones	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	**							
3	**	-						
4	**	-	-					
5	**	-	-	-				
6	**	*	-	*	**			
7	**	-	-	-	-	-		
8	**	**	**	**	**	*	**	

- : No hay diferencia significativa.

* : Diferencia significativa a un nivel de significancia de 0.1.

** : Diferencia significativa a un nivel de significancia de 0.05.

Diferencias significativas entre densidades promedios de muestreos según la prueba de Kolmogorov - Smirnov para dos muestras independientes.

Muestreos	1	2	3	5	6	7	8	9	10
1									
2	**								
3	**	-							
5	**	-	-						
6	**	**	**	**					
7	**	-	-	-	**				
8	**	-	-	-	*	-			
9	**	-	-	-	**	-	-		
10	**	**	**	**	-	**	**	**	

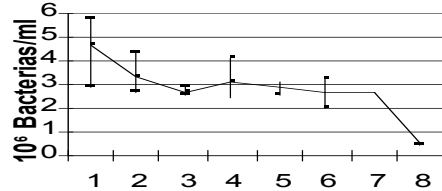
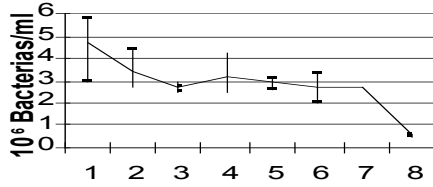
- : No hay diferencia significativa.

* : Diferencia significativa a un nivel de significancia de 0.1.

** : Diferencia significativa a un nivel de significancia de 0.05.

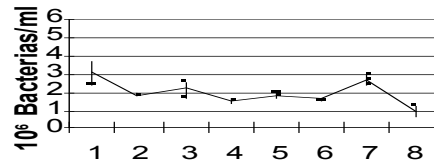
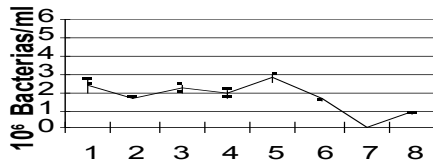
ANEXO E.

VARIACIÓN ESPACIAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO BACTERIOPLANCTON EN CADA MUESTREO



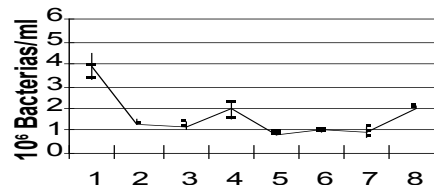
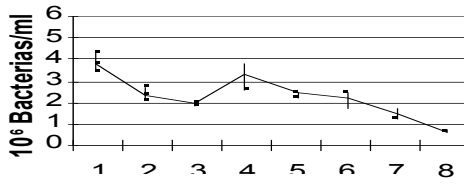
a

b



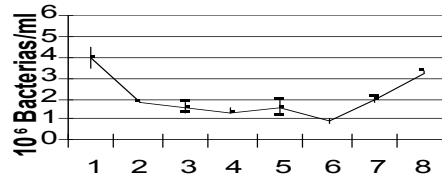
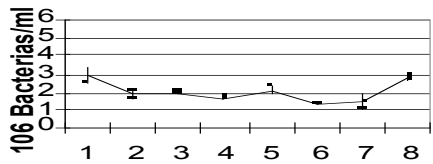
c

d



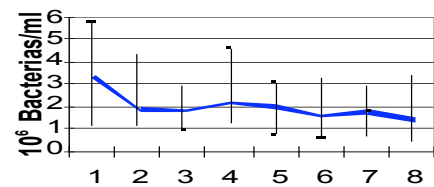
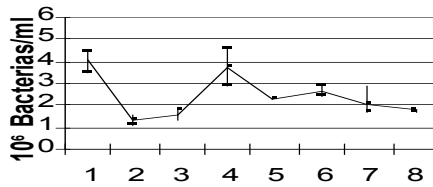
e

f



g

h



- Máx - Mh - Rom

- Máx - Mh - Rom

i

j

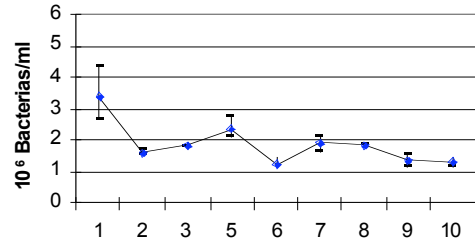
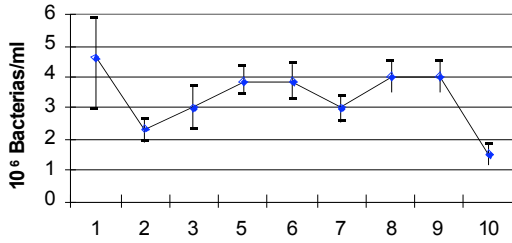
ESTACIÓN

ESTACIÓN

Variación espacial de la densidad promedio bacterioplancton en cada muestreo. a. Julio b. Agosto. c. Septiembre. d. Noviembre. e. Diciembre. f. Enero. g. Febrero. h. Marzo. i. Abril. j. Promedio general por puntos de muestreo.

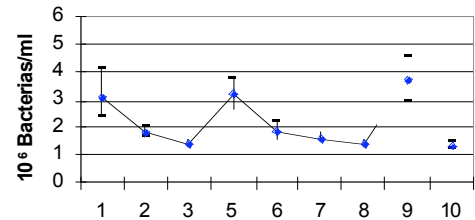
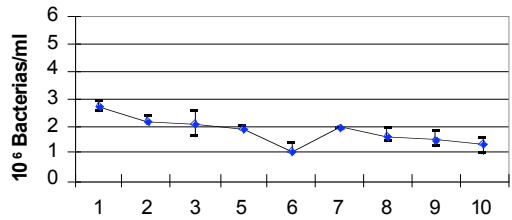
ANEXO F

VARIACIÓN TEMPORAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO BACTERIOPLANCTON EN CADA PUNTO DE MUESTREO



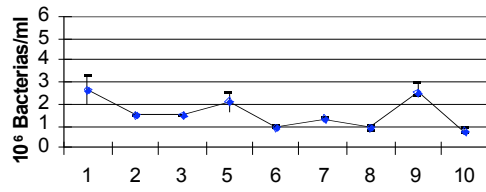
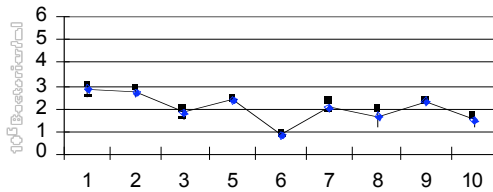
a.

b.



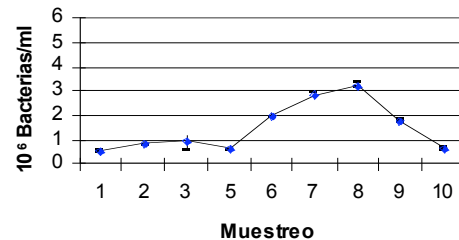
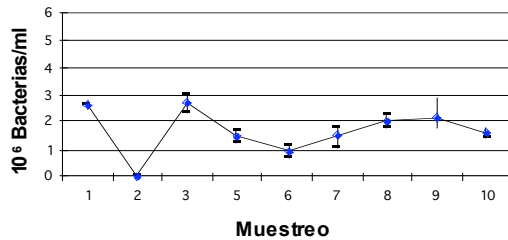
c.

d.



e.

f.



- Max - Min —●— Prom

- Max - Min —●— Prom

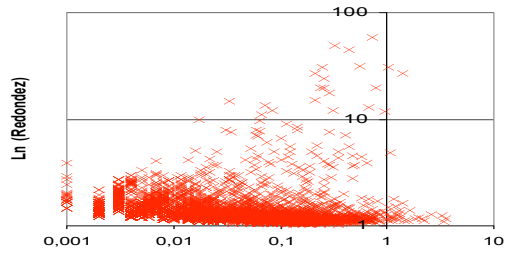
g.

h.

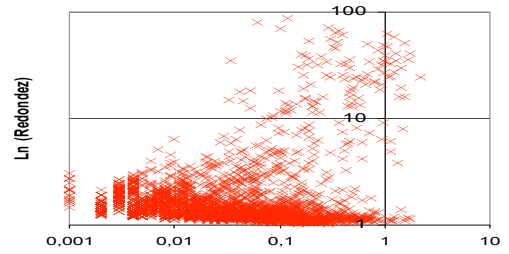
Variación temporal de la densidad promedio bacterioplancton en cada punto de muestreo. a. Las Juntas. b. Chapinero superficial. c. Chapinero intermedia. d. Chapinero fondo. e. Presa superficial. f. Presa intermedia. g. Presa fondo. h. Río Cubillos.

ANEXO G

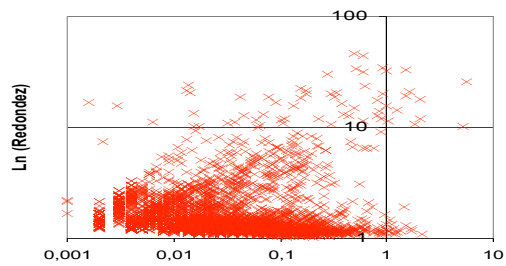
VARIACIÓN TEMPORAL DE LA RELACIÓN BIOVOLUMEN:REDONDEZ DEL BACTERIOPLANCTON EN CADA PUNTO DE MUESTREO



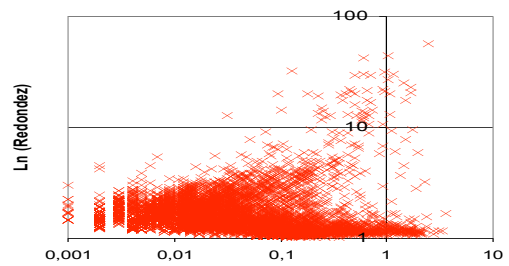
a.



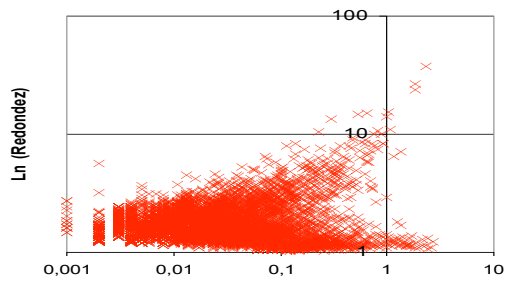
b.



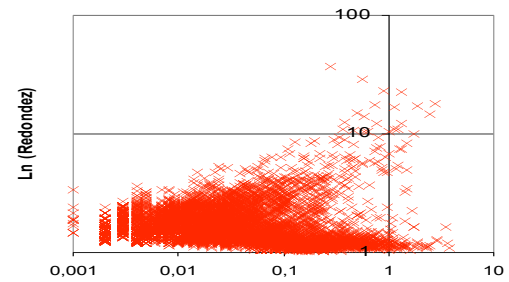
c.



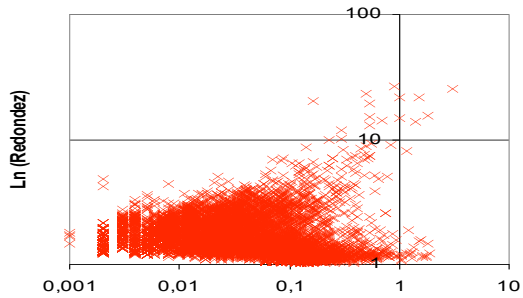
d.



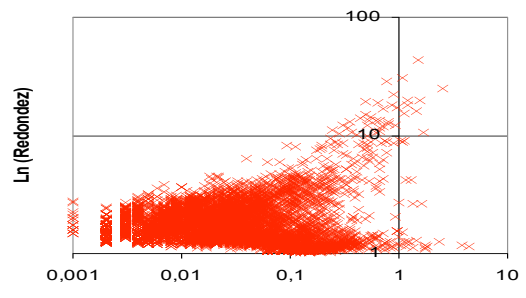
e.



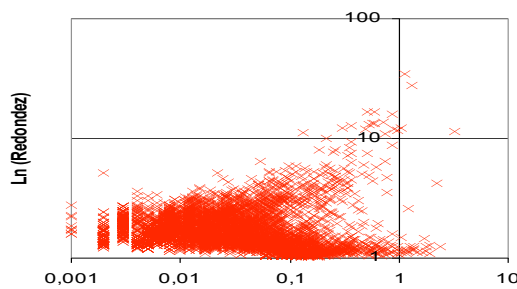
f.



g.



h.

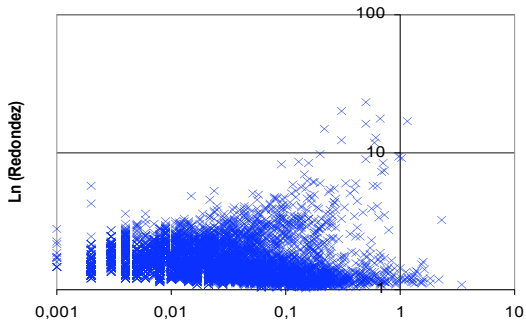


i.

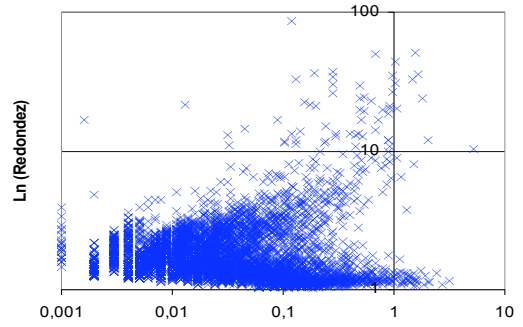
Variación temporal de la relación biovolumen:redondez del bacterioplancton. a. Julio b. Agosto. c. Septiembre. d. Noviembre. e. Diciembre. f. Enero. g. Febrero. h. Marzo. i. Abril.

ANEXO H

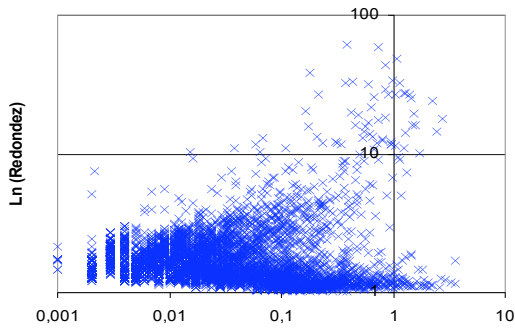
VARIACIÓN ESPACIAL DE LA RELACIÓN BIOVOLUMEN:REDONDEZ DEL BACTERIOPLANCTON EN CADA MUESTREO



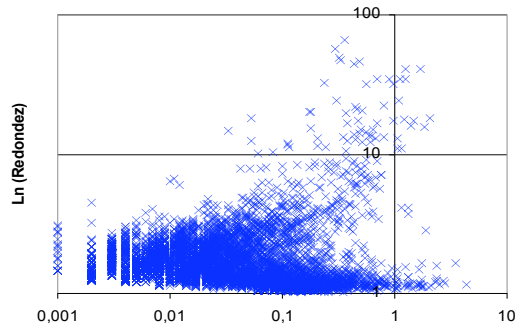
a.



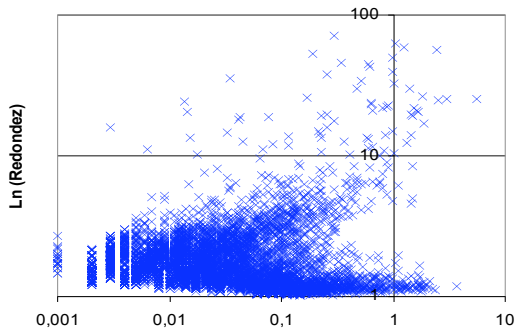
b.



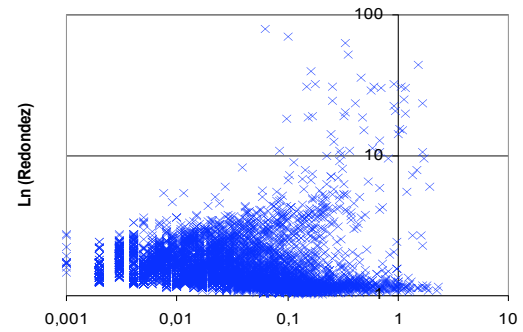
c.



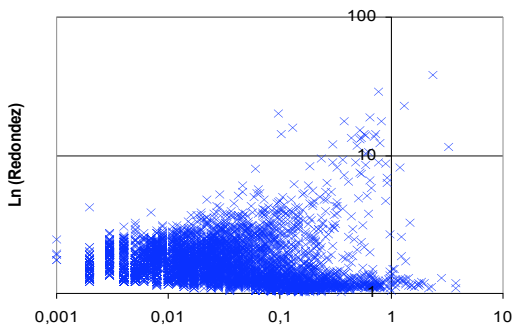
d.



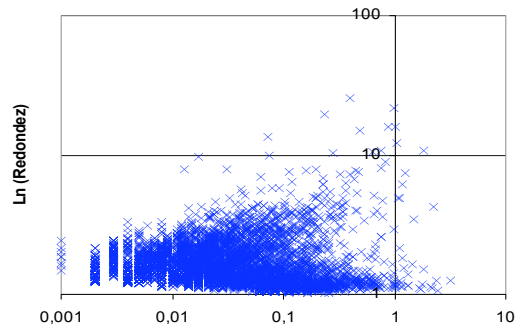
e.



f.



g.



h.

Variación espacial de la relación biovolumen:redondez del bacterioplancton. a. Las Juntas. b. Chapinero superficial. c. Chapinero intermedia. d. Chapinero fondo. e. Presa superficial. f. Presa intermedia. g. Presa fondo. h. Río Cubillos.

ANEXO I
VALORES MÁXIMOS, MÍNIMOS Y PROMEDIO DE VOLUMEN CELULAR BACTERIANO PROMEDIO (μm^3) EN CADA PUNTO DE MUESTREO DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO

Estación	Variable / Muestreo	1	2	3	5	6	7	8	9	10	Total
1	Máximo	0,1064	0,0865	0,0651	0,0784	0,0691	0,0574	0,0805	0,0293	0,0454	0,1064
	Mínimo	0,0775	0,0387	0,0500	0,0456	0,0509	0,0370	0,0253	0,0268	0,0357	0,0253
	Promedio	0,0962	0,0578	0,0580	0,0581	0,0629	0,0457	0,0577	0,0280	0,0391	0,0560
2	Máximo	0,0653	0,0972	0,1434	0,1622	0,0979	0,0922	0,0555	0,0667	0,0829	0,1622
	Mínimo	0,0395	0,0671	0,0622	0,1034	0,0695	0,0476	0,0445	0,0350	0,0716	0,0350
	Promedio	0,0521	0,0838	0,1138	0,1275	0,0815	0,0682	0,0499	0,0553	0,0756	0,0786
3	Máximo	0,1116	0,1395	0,0870	0,2214	0,0926	0,1273	0,0776	0,0821	0,0724	0,2214
	Mínimo	0,1038	0,1343	0,0717	0,0931	0,0480	0,1105	0,0648	0,0499	0,0520	0,0480
	Promedio	0,1080	0,1361	0,0786	0,1434	0,0717	0,1197	0,0712	0,0657	0,0593	0,0958
4	Máximo	0,0828	0,1303	0,1011	0,1480	0,0660	0,1110	0,0838	0,0690	0,0870	0,1480
	Mínimo	0,0556	0,0867	0,0634	0,0977	0,0519	0,0764	0,0594	0,0558	0,0477	0,0477
	Promedio	0,0675	0,1112	0,0798	0,1234	0,0571	0,0930	0,0705	0,0643	0,0678	0,0816
5	Máximo	0,1195	0,1126	0,0805	0,1912	0,1185	0,1283	0,0645	0,0685	0,0740	0,1912
	Mínimo	0,0442	0,0705	0,0685	0,1067	0,0710	0,0998	0,0612	0,0454	0,0680	0,0442
	Promedio	0,0841	0,0924	0,0760	0,1450	0,0962	0,1129	0,0633	0,0573	0,0706	0,0886
6	Máximo	0,0688	0,0651	0,0776	0,1387	0,0870	0,1252	0,0584	0,0786	0,0615	0,1387
	Mínimo	0,0474	0,0516	0,0401	0,1196	0,0481	0,1162	0,0569	0,0580	0,0483	0,0401
	Promedio	0,0564	0,0583	0,0532	0,1261	0,0726	0,1195	0,0578	0,0662	0,0527	0,0742
7	Máximo	0,1980	-	0,0716	0,0802	0,1086	0,1437	0,0551	0,0819	0,0920	0,1980
	Mínimo	0,1980	-	0,0367	0,0716	0,0416	0,0713	0,0526	0,0598	0,0745	0,0367
	Promedio	0,1980	-	0,0524	0,0768	0,0646	0,1064	0,0534	0,0677	0,0814	0,0776
8	Máximo	0,1384	0,0709	0,0653	0,0908	0,0882	0,0919	0,0550	0,0532	0,0782	0,1384
	Mínimo	0,1161	0,0511	0,0505	0,0612	0,0522	0,0804	0,0424	0,0351	0,0418	0,0351
	Promedio	0,1306	0,0595	0,0564	0,0733	0,0679	0,0857	0,0466	0,0449	0,0640	0,0699
Total	Máximo	0,1980	0,1395	0,1434	0,2214	0,1185	0,1437	0,0838	0,0821	0,0920	0,2214
	Mínimo	0,0395	0,0387	0,0367	0,0456	0,0416	0,0370	0,0253	0,0268	0,0357	0,0253
	Promedio	0,0946	0,0900	0,0731	0,1143	0,0724	0,0951	0,0605	0,0578	0,0638	0,0802

ANEXO J

DENSIDADES MÁXIMAS, MÍNIMAS Y PROMEDIO DE NANOPLANCTON HETERÓTROFO POR EL MÉTODO DE RECuento CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA EN CADA PUNTO DE MUESTREO DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO

Estación	Variable / Muestreo	1	3	6	7	7*	10	Total
1	Máximo	1,43E+03	2,14E+03	1,06E+02	2,30E+03	6,18E+02	1,30E+03	2,30E+03
	Mínimo	1,43E+03	2,14E+03	1,06E+02	2,30E+03	6,18E+02	1,30E+03	1,06E+02
	Promedio	1,43E+03	2,14E+03	1,06E+02	2,30E+03	6,18E+02	1,30E+03	1,46E+03
2	Máximo	1,18E+03	6,06E+03	2,38E+02	4,08E+03	4,10E+03	8,37E+02	6,06E+03
	Mínimo	1,18E+03	6,06E+03	2,38E+02	4,08E+03	4,10E+03	8,37E+02	2,38E+02
	Promedio	1,18E+03	6,06E+03	2,38E+02	4,08E+03	4,10E+03	8,37E+02	2,48E+03
5	Máximo	1,75E+03	3,49E+03	1,69E+03	4,15E+03	2,66E+03	8,75E+02	4,15E+03
	Mínimo	1,75E+03	3,49E+03	1,23E+03	3,52E+03	1,83E+03	8,75E+02	8,75E+02
	Promedio	1,75E+03	3,49E+03	1,40E+03	3,75E+03	2,29E+03	8,75E+02	2,39E+03
6	Máximo	2,30E+03	1,76E+03	5,71E+02	2,51E+03	3,38E+03	1,20E+03	2,51E+03
	Mínimo	2,30E+03	1,76E+03	3,56E+01	1,96E+03	2,28E+03	1,20E+03	3,56E+01
	Promedio	2,30E+03	1,76E+03	2,97E+02	2,21E+03	2,69E+03	1,20E+03	1,42E+03
7	Máximo	4,60E+03	1,19E+03	1,90E+03	1,50E+03	2,51E+03	5,27E+02	4,60E+03
	Mínimo	4,60E+03	1,19E+03	5,08E+02	7,17E+02	8,04E+02	5,27E+02	5,08E+02
	Promedio	4,60E+03	1,19E+03	1,30E+03	1,11E+03	1,42E+03	5,27E+02	1,51E+03
8	Máximo	1,63E+03	5,99E+01	1,43E+03	-	-	8,26E+02	1,63E+03
	Mínimo	1,63E+03	5,99E+01	1,43E+03	-	-	8,26E+02	5,99E+01
	Promedio	1,63E+03	5,99E+01	1,43E+03	-	-	8,26E+02	9,87E+02
Total	Máximo	4,60E+03	6,06E+03	1,90E+03	4,15E+03	4,10E+03	1,30E+03	6,06E+03
	Mínimo	1,18E+03	5,99E+01	3,56E+01	7,17E+02	6,18E+02	5,27E+02	3,56E+01
	Promedio	2,15E+03	2,45E+03	8,96E+02	2,51E+03	2,17E+03	9,27E+02	1,74E+03

* : Comparación con filtros de diámetro de poro de 0.8 μm .

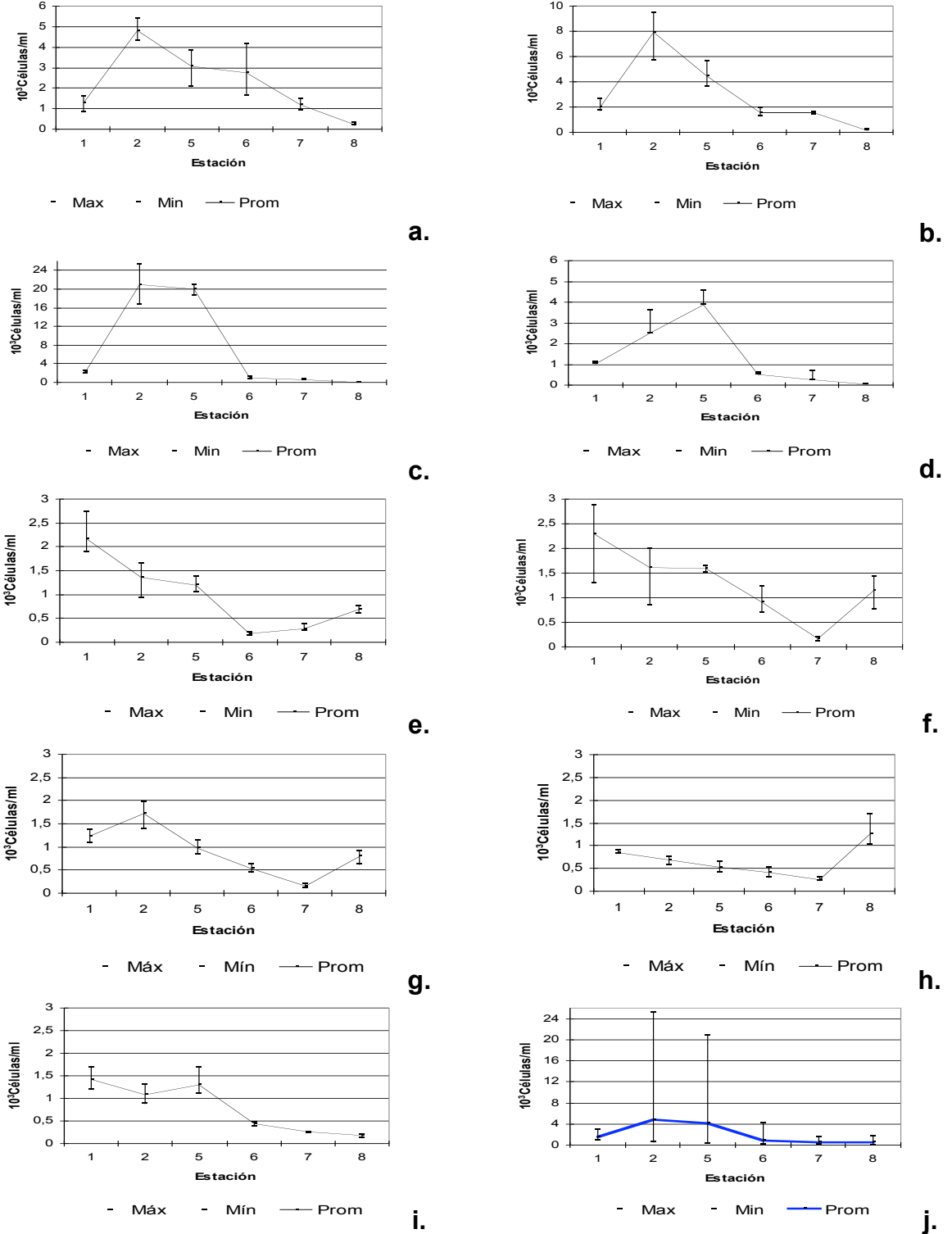
ANEXO K

DENSIDADES MÁXIMAS, MÍNIMAS Y PROMEDIO DE NANOPLANCTON HETERÓTROFO POR EL MÉTODO DE RECuento CON CÁMARA DE SEDIMENTACIÓN Y MICROSCOPIO INVERTIDO EN CADA PUNTO DE MUESTREO DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO

Estación	Variable / Muestreo	1	2	3	5	6	7	8	9	10	Total
1	Máximo	1,62E+03	2,67E+03	2,53E+03	1,12E+03	2,74E+03	2,88E+03	1,37E+03	8,92E+02	1,69E+03	2,88E+03
	Mínimo	8,29E+02	1,69E+03	1,97E+03	1,03E+03	1,88E+03	1,29E+03	1,09E+03	8,20E+02	1,20E+03	8,20E+02
	Promedio	1,30E+03	2,02E+03	2,17E+03	1,08E+03	2,18E+03	2,30E+03	1,24E+03	8,56E+02	1,42E+03	1,62E+03
2	Máximo	5,39E+03	9,47E+03	2,52E+04	3,60E+03	1,64E+03	2,00E+03	1,96E+03	7,47E+02	1,31E+03	2,52E+04
	Mínimo	4,29E+03	5,69E+03	1,67E+04	2,51E+03	9,42E+02	8,44E+02	1,38E+03	5,72E+02	8,72E+02	5,72E+02
	Promedio	4,83E+03	7,91E+03	2,10E+04	3,15E+03	1,35E+03	1,61E+03	1,72E+03	6,86E+02	1,08E+03	4,82E+03
5	Máximo	3,82E+03	5,63E+03	2,09E+04	4,56E+03	1,38E+03	1,64E+03	1,14E+03	6,34E+02	1,69E+03	2,09E+04
	Mínimo	2,06E+03	3,62E+03	1,85E+04	3,86E+03	1,04E+03	1,52E+03	8,48E+02	4,18E+02	1,10E+03	4,18E+02
	Promedio	3,07E+03	4,47E+03	1,99E+04	4,22E+03	1,19E+03	1,59E+03	9,73E+02	5,22E+02	1,30E+03	4,14E+03
6	Máximo	4,17E+03	1,94E+03	1,12E+03	6,14E+02	2,05E+02	1,23E+03	6,14E+02	5,19E+02	4,72E+02	4,17E+03
	Mínimo	1,65E+03	1,27E+03	7,36E+02	4,96E+02	1,37E+02	7,06E+02	4,52E+02	2,95E+02	3,89E+02	1,37E+02
	Promedio	2,73E+03	1,55E+03	9,69E+02	5,50E+02	1,78E+02	9,13E+02	5,38E+02	4,16E+02	4,37E+02	9,20E+02
7	Máximo	1,46E+03	1,62E+03	6,87E+02	6,77E+02	3,88E+02	2,10E+02	1,91E+02	2,92E+02	2,68E+02	1,62E+03
	Mínimo	9,17E+02	1,42E+03	5,28E+02	2,62E+02	2,36E+02	1,07E+02	1,17E+02	2,40E+02	2,37E+02	1,07E+02
	Promedio	1,18E+03	1,54E+03	5,97E+02	4,32E+02	2,90E+02	1,58E+02	1,62E+02	2,61E+02	2,54E+02	5,42E+02
8	Máximo	3,05E+02	2,40E+02	1,30E+02	3,69E+01	7,54E+02	1,42E+03	9,00E+02	1,69E+03	2,05E+02	1,69E+03
	Mínimo	1,76E+02	1,18E+02	3,61E+01	2,46E+01	6,03E+02	7,58E+02	6,19E+02	1,02E+03	1,28E+02	2,46E+01
	Promedio	2,19E+02	1,69E+02	7,87E+01	2,87E+01	6,91E+02	1,15E+03	8,04E+02	1,26E+03	1,73E+02	5,41E+02
Total	Máximo	5,39E+03	9,47E+03	2,52E+04	4,56E+03	2,74E+03	2,88E+03	1,96E+03	8,92E+02	1,69E+03	2,52E+04
	Mínimo	1,76E+02	1,18E+02	3,61E+01	2,46E+01	1,37E+02	1,07E+02	1,17E+02	2,40E+02	2,37E+02	2,46E+01
	Promedio	2,62E+03	3,50E+03	8,93E+03	1,89E+03	1,04E+03	1,31E+03	9,27E+02	5,48E+02	8,99E+02	2,41E+03

ANEXO L

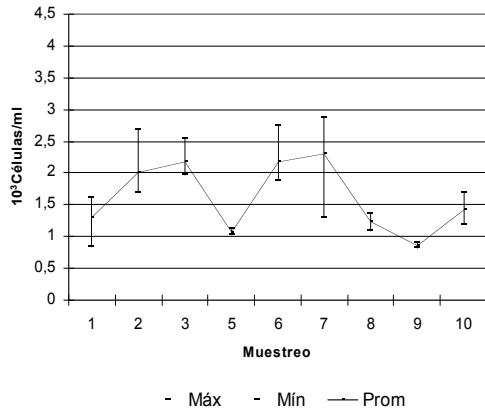
VARIACIÓN ESPACIAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO DE NANOPLANCTON HETERÓTROFO POR EL MÉTODO DE RECUENTO CON CÁMARA DE SEDIMENTACIÓN Y MICROSCOPIO INVERTIDO EN CADA MUESTREO



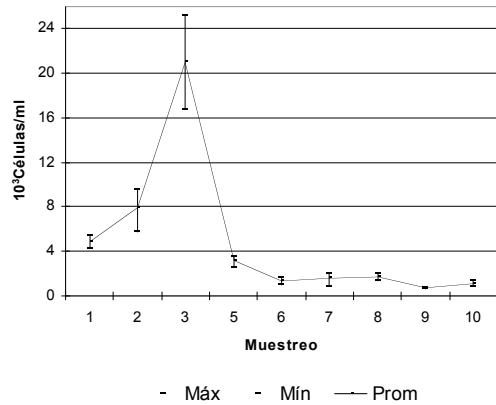
Variación espacial de la densidad promedio nanoplankton heterótrofo en cada muestreo por el método de recuento con cámara de sedimentación y microscopio invertido en cada punto de muestreo. a. Julio b. Agosto. c. Septiembre. d. Noviembre. e. Diciembre. f. Enero. g. Febrero. h. Marzo. i. Abril. j. Promedio general por puntos de muestreo.

ANEXO M

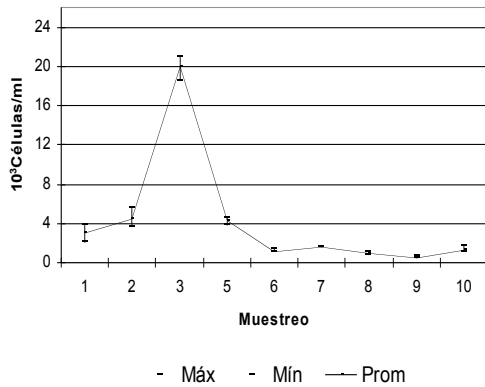
VARIACIÓN TEMPORAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO DE NANOPLANCTON HETERÓTROFO POR EL MÉTODO DE RECuento CON CÁMARA DE SEDIMENTACIÓN Y MICROSCOPIO INVERTIDO EN CADA PUNTO DE MUESTREO



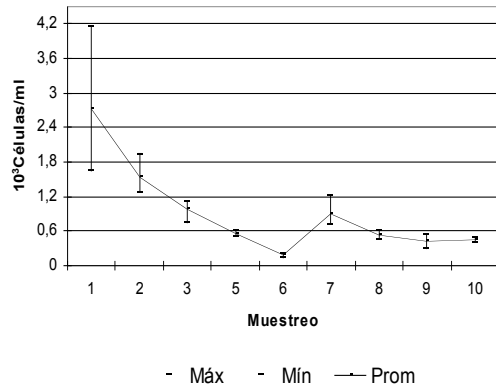
a.



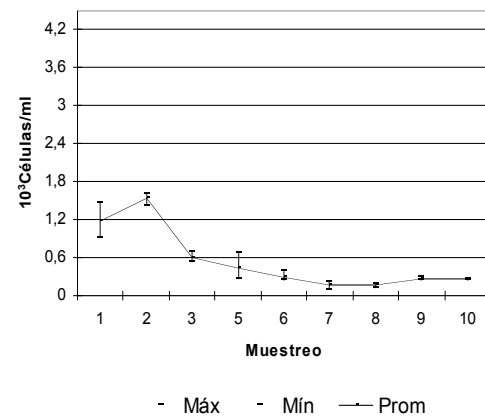
b.



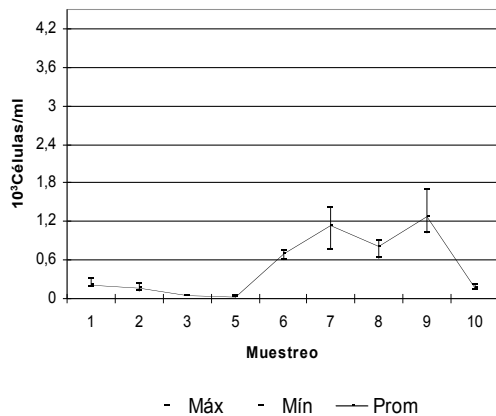
c.



d.



e.

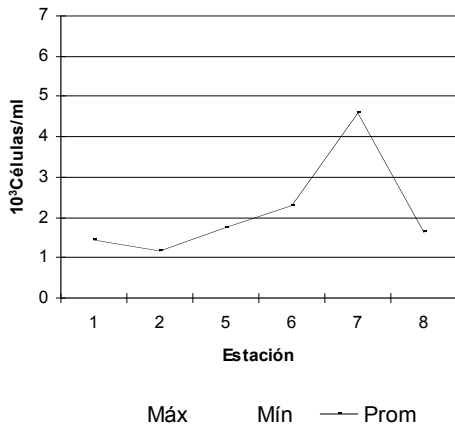


g.

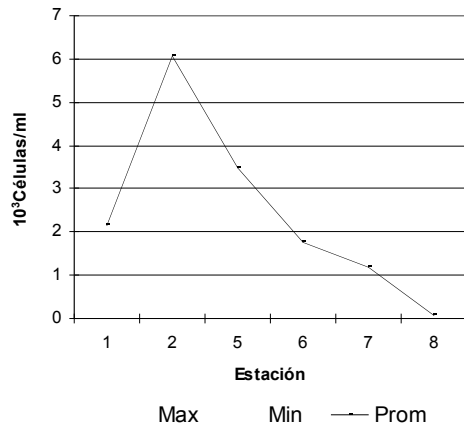
Anexo M. Variación temporal de la densidad promedio nanoplancton heterótrofo en cada muestreo por el método de recuento con cámara de sedimentación y microscopio invertido en cada punto de muestreo. a. Las Juntas. b. Chapinero superficial. c. Chapinero intermedia. d. Chapinero fondo. e. Presa superficial. f. Presa intermedia. g. Presa fondo. h. Río Cubillos.

ANEXO N

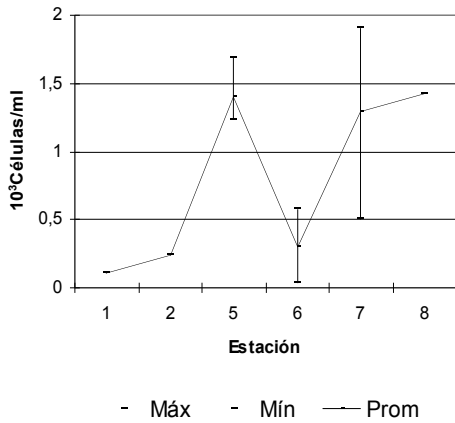
VARIACIÓN ESPACIAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO DE NANOPLANCTON HETERÓTROFO CON EL MÉTODO DE RECuento POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA EN CADA MUESTREO



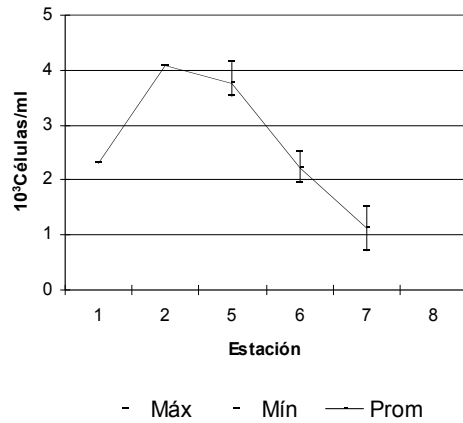
a.



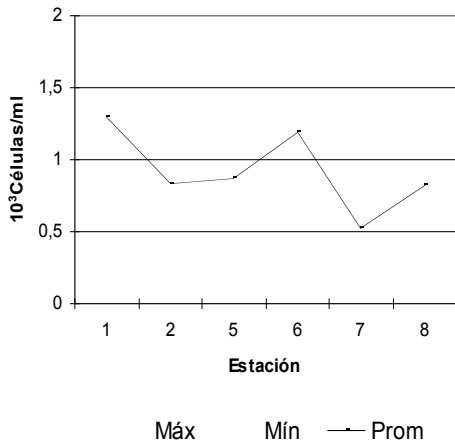
b.



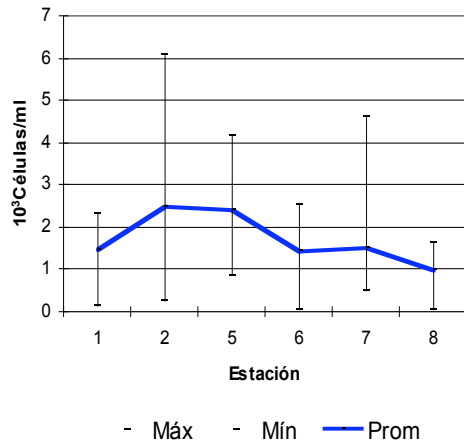
c.



d.



e.

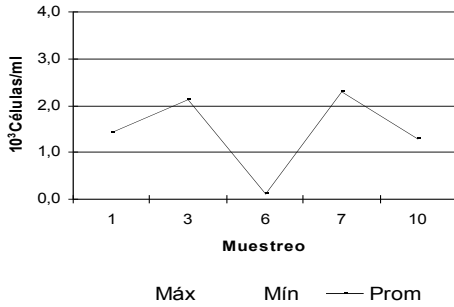


f.

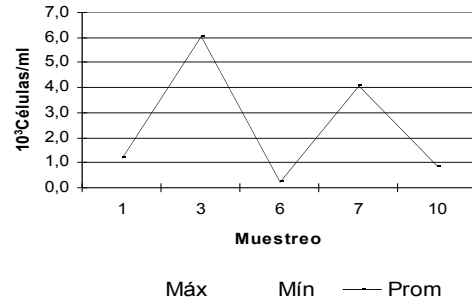
Anexo N. Variación espacial de la densidad promedio nanoplancton heterótrofo con el método de recuento por microscopia de epifluorescencia en cada punto de muestreo. a. Julio b. Septiembre. c. Diciembre. d. Enero. e. Abril. f. Promedio general por puntos de muestreo.

ANEXO O

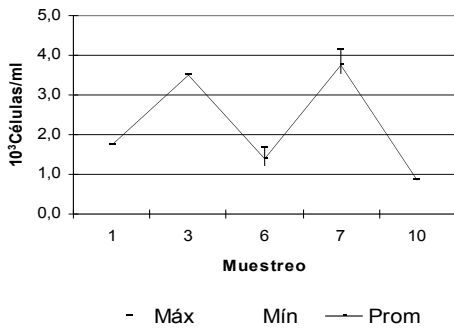
VARIACIÓN TEMPORAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO DE NANOPLANCTON HETERÓTROFO CON EL MÉTODO DE RECuento POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA EN CADA PUNTO DE MUESTREO



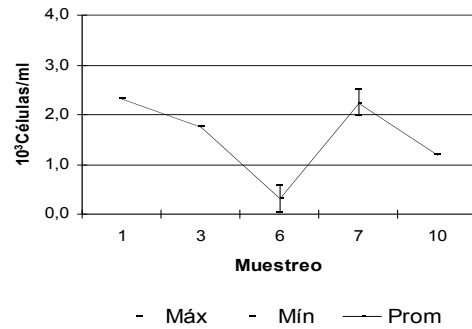
a.



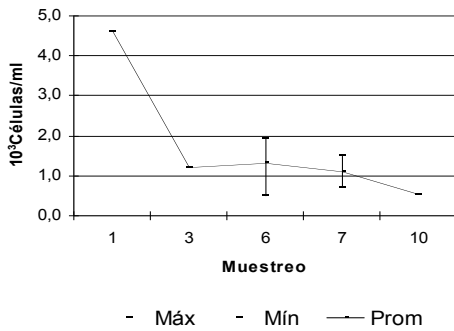
b.



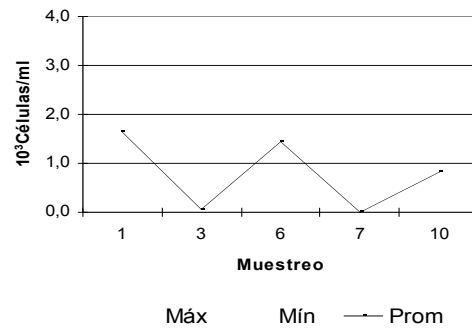
c.



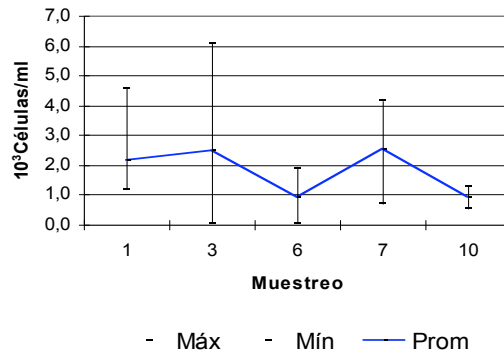
d.



e.



f.

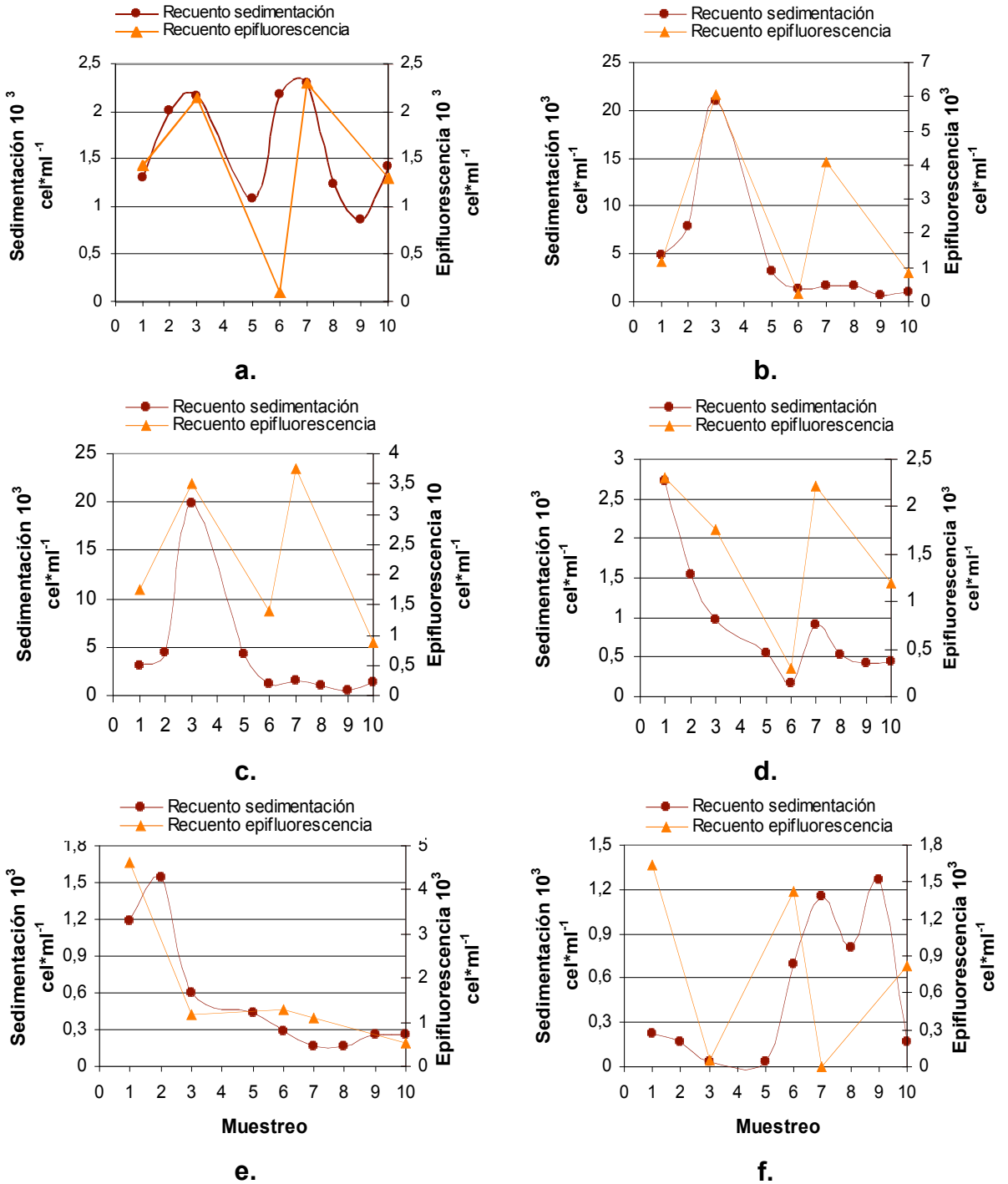


g.

Anexo O. Variación temporal de la densidad promedio nanoplankton heterótrofo en cada muestreo con el método de recuento por microscopia de epifluorescencia en cada punto de muestreo. a. Las Juntas. b. Chapinero superficial. c. Chapinero intermedia. d. Chapinero fondo. e. Presa superficial. f. Presa intermedia. g. Presa fondo. h. Río Cubillos.

ANEXO P

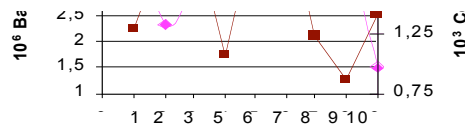
VARIACIÓN TEMPORAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO DEL NAÑOZOOPLANCTON OBTENIDA CON CÁMARA DE SEDIMENTACIÓN Y MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA EN CADA PUNTO DE MUESTREO



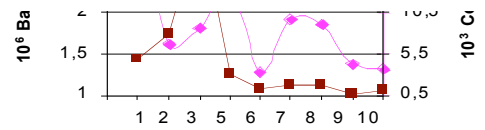
Variación espacial de la densidad promedio del nanozooplankton obtenida con cámaras de sedimentación y microscopía de epifluorescencia en cada muestreo. a. Las Juntas. b. Chapinero superficial. c. Presa superficial. d. Presa intermedia. e. Presa fondo. f. Río Cubillos.

ANEXO Q

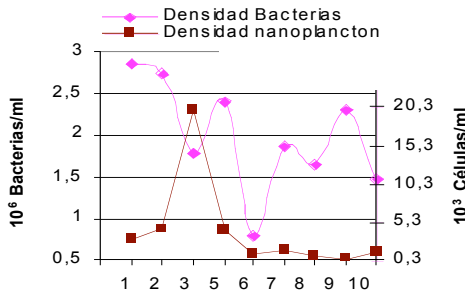
VARIACIÓN TEMPORAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO BACTERIOPLANCTON Y NANOZOOPLANCTON EN CADA PUNTO DE MUESTREO



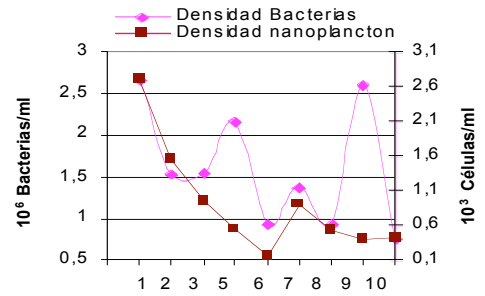
a.



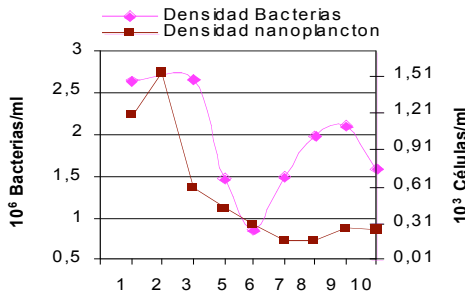
b.



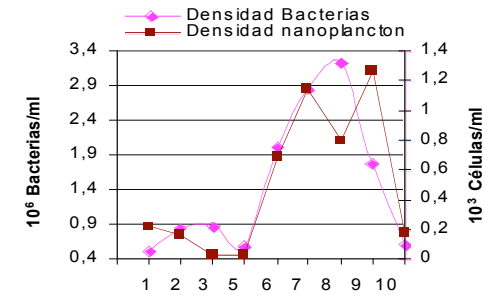
c.



d.



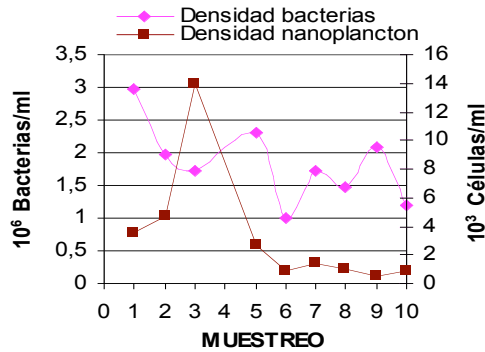
e.



f.

MUESTREO

MUESTREO

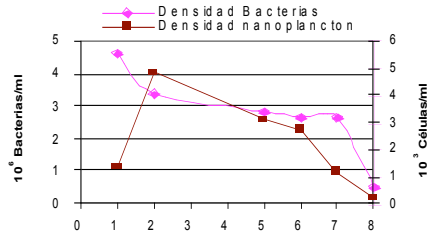


i.

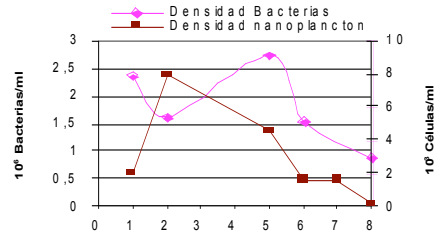
Variación temporal de la densidad promedio bacterioplancton y nanozooplancton en cada punto de muestreo. a. Las Juntas. b. Chapinero superficial. c. Chapinero intermedia. d. Chapinero fondo. e. Presa superficial. f. Presa intermedia. g. Presa fondo. h. Río Cubillos. i. Estaciones superficiales.

ANEXO R

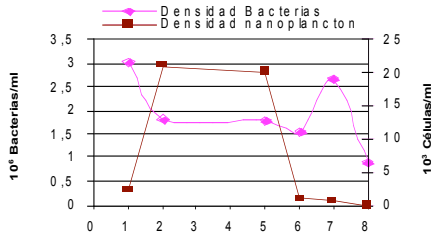
VARIACIÓN ESPACIAL DE LA DENSIDAD PROMEDIO BACTERIOPLANCTON Y NANOZOOPLANCTON EN CADA MUESTREO



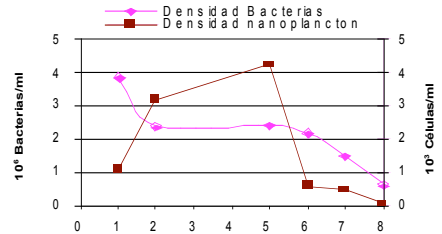
a.



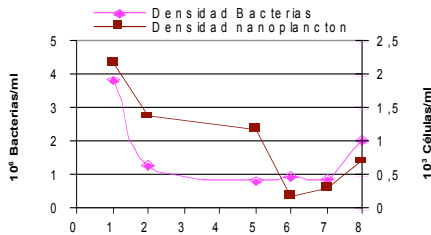
b.



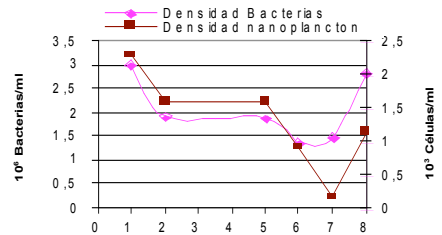
c.



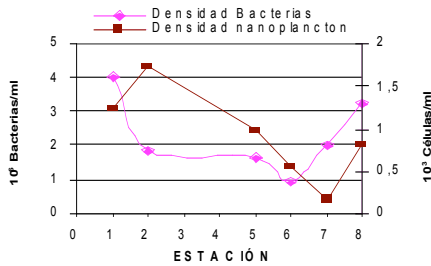
d.



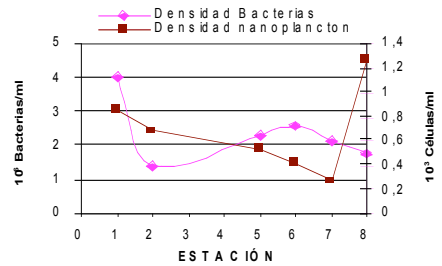
e.



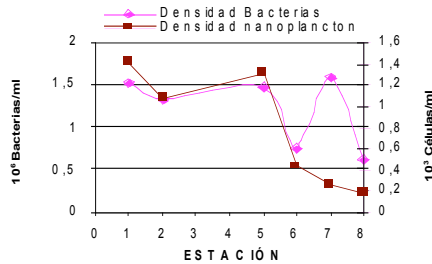
f.



g.



h.



i.

Variación espacial de la densidad promedio bacterioplancton y nanozooplancton en cada muestreo. a. Julio b. Agosto. c. Septiembre. d. Noviembre. e. Diciembre. f. Enero. g. Febrero. h. Marzo. i. Abril.

ANEXO S

COCIENTES BACTERIA:PROTOZOO EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO

Cocientes Bacteria:Protozoo (CBP) en las estaciones de muestreo durante el periodo de estudio.

Muestreo	Estación						Promedio
	1	2	5	6	7	8	
JULIO. 04	3558	698	934	974	2223	2334	1677
AGOSTO.04	1160	205	613	995	-	5053	595
SEPTIEMBRE. 04	1392	87	90	1602	4456	24533	1525
NOVIEMBRE. 04	3554	745	570	3949	3425	20947	2449
DICIEMBRE. 04	1761	940	670	5287	2974	2929	2327
ENERO. 05	1299	1190	1275	1512	9443	2475	2944
FEBRERO. 05	3258	1079	1692	1722	12328	4010	4016
MARZO. 05	4712	2019	4406	6239	8108	1403	5097
ABRIL. 05	1073	1226	1127	1730	6234	3613	2278
Promedio	2076	390	484	1757	5466	2739	2545

ANEXO T

COEFICIENTES DE VARIACIÓN ENTRE REPLICAS, MUESTREOS Y PROMEDIOS DE LOS RECUENTOS DE NANOPLANCTON HETERÓTROFO CON MICROSCOPIO INVERTIDO Y CON CÁMARA DE SEDIMENTACIÓN Y MICROSCOPIO INVERTIDO

Coefficientes de variación entre replicas, muestreos y promedios de los recuentos de nanoplancton heterótrofo con microscopía de epifluorescencia.

Muestreo	Estaciones						Variación entre estaciones
	1	2	5	6	7	8	
1	-	-	-	-	-	-	58,6
3	-	-	-	-	-	-	85,6
6	-	-	18,3	90,2	55,0	-	74,9
7	-	-	9,3	12,6	35,3	-	47,0
7*	-	-	18,6	22,4	66,7	-	49,5
10	-	-	-	-	-	-	30,2
Variación entre muestreos	64,6	84,5	46,2	58,2	77,0	71,6	70,5

- : no hay replicas.

* : muestras procesadas con filtros de 0.8 μm de diámetro de poro.

Coefficientes de variación entre replicas, muestreos y promedios de los recuentos de nanoplancton heterótrofo con cámara de sedimentación y microscopio invertido.

Muestreos	Estaciones						Variación entre estaciones
	1	2	5	6	7	8	
1	31,9	11,5	29,7	47,4	22,9	34,0	75,1
2	27,9	25,0	23,2	22,6	6,6	37,5	93,7
3	14,5	20,3	6,2	21,0	13,7	60,8	128,9
5	4,2	18,2	8,3	10,7	50,2	24,7	102,6
6	22,5	27,0	14,6	20,1	29,2	11,4	75,5
7	38,0	41,2	3,8	30,3	32,6	30,2	61,9
8	11,4	17,5	15,6	15,1	24,3	20,0	58,5
9	4,2	14,4	20,8	27,2	10,7	29,0	54,7
10	17,4	20,2	25,5	9,8	6,1	23,3	70,1
Variación entre muestreos	39,4	132,4	142,0	92,6	89,5	95,2	188,0