

EFFECTO EXPERIMENTAL DE LA BACTERIOVORIA SOBRE LAS TASAS DE  
CRECIMIENTO DE BACTERIA, ARCHAEA Y LOS GRUPOS  $\alpha$ ,  $\beta$  Y  $\gamma$   
PROTEOBACTERIA Y *Cytophaga - Flavobacterium*  
EN EL EMBALSE DEL NEUSA

LAURA BIBIANA SÁNCHEZ GUEVARA

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA  
BOGOTA 2008

EFFECTO EXPERIMENTAL DE LA BACTERIOVORIA SOBRE LAS TASAS DE  
CRECIMIENTO DE BACTERIA, ARCHAEA Y LOS GRUPOS  $\alpha$ ,  $\beta$  Y  $\gamma$   
PROTEOBACTERIA Y *Cytophaga - Flavobacterium*  
EN EL EMBALSE DEL NEUSA

LAURA BIBIANA SÁNCHEZ GUEVARA

Trabajo de Grado

Directora

AMPARO CANOSA DE BARRERO

Microbióloga, M. Sc.

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA  
BOGOTA 2008

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

Firma del Presidente del Jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

BOGOTÁ, OCTUBRE 2008

"Hay dos clases de seres en el mundo, los que sueñan y los que han  
dejado de soñar... "

En memoria de mi papá,  
mis tíos y mis amigos...

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, a mi hermano y a mi familia, mi ejemplo a seguir, mi fuerza, mi esperanza en un mejor futuro, GRACIAS. Gracias por estar conmigo en esos malos momentos que me toco pasar lejos de ustedes... queda demostrado que somos una gran familia y que a pesar de todo lo que hemos pasado, seguimos adelante con la esperanza y la fe puestas en un futuro prospero y sin tantas tristezas... Además su buena energía me dio las fuerzas que necesitaba para seguir adelante, sus chistes me hicieron reír de nuevo.

A Amparo Canosa por permitirme trabajar a su lado desde que fui estudiante, por tener la PACIENCIA para enseñarme cosas nuevas, por sus consejos y enseñanzas y por perdonarme más de una embarradita... A **Juan Pablo Niño** y **Carolina García** por ayudarme a aclarar ideas (y en algunos casos a planteármelas jajaja), explicarme como a niños de primaria muchas cosas, colaborar en todo este camino y también por atenderme en Medellín, gracias por la “agua de panela con queso”... y por supuesto al **MICROBIAL TEAM** (Rafa, Fede, Cami, Cristian, Nohorita, Sandrita, Claudia, Juan y Amparo) que entre los tintos, las risas, el lavadero, las anécdotas y los errores me enseñaron muchas cosas, una de ellas el **trabajo en equipo**. Gracias por mostrarme el mundo de la microbiología!!!

A la Rolis, mi Monita y Juliana (que se aguantaron vivir conmigo jajaja muchas valientes y lindas!!!), Alfredo, Olguita, Andre, Xime, Pao, Jorge, Pacho, Pollo, Pollito, John...(es posible que se me escapen muchos, pero igual los quiero jajaja)`. También a Pili, Giovanni, Dianita, Natalia, Jenny y la “Princesa” (que me ayudaron y se rieron conmigo este tiempito en el laboratorio), en fin a todos mis amigos presentes y ausentes (que al final resultaron ser bastantes, quien lo creyera jejeje), gracias por ayudarme y tenderme la mano en los momentos que

mas los necesitaba... Por estar ahí siempre conmigo, no me olvidare de Comander (no entiendo todavía porque me dicen así...) ni de *Laurencia* claro o Laurancia como me dice el Pollo...

Bueno de todo corazón gracias por enseñarme cosas durante estos seis años; los chascarrillos y las anécdotas no hubieran sido las mismas sin ustedes, espero tener la oportunidad de seguir aprendiendo nuevas e interesantes cosas de cada uno de ustedes GRACIAS...

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	4
Comunidades microbianas y las redes tróficas acuáticas	4
El plancton procariota	5
<i>Dominio Bacteria</i>	6
<i>Proteobacteria</i>	7
<i>Subdivisión <math>\alpha</math> Proteobacteria</i>	7
<i>Subdivisión <math>\beta</math> Proteobacteria</i>	7
<i>Subdivisión <math>\gamma</math> Proteobacteria</i>	8
<i>Cluster Cytophaga – Flavobacterium</i>	8
<i>Dominio Archaea</i>	8
Bacterióvoros y su efecto sobre el bacterioplancton	9
Determinación de las interacciones entre el bacterioplancton y los protozoos	12
<i>Técnica de hibridación in situ con sondas fluorescentes</i>	13
<b>PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	15
Objetivo General	15
<i>Objetivos Específicos</i>	16
Hipótesis	16
<b>METODOLOGÍA</b>	19
Área de estudio	19
Fase de campo	20
<i>Sitios de muestreo</i>	20

<i>Periodicidad del muestreo</i>	21
<i>Diseño experimental</i>	21
<i>Muestras biológicas</i>	23
Fase de laboratorio	24
<i>Medición de la densidad procariota total</i>	24
<i>Medición de la abundancia relativa de organismos del dominio</i>	24
<i>Archaea y Bacteria y las divisiones <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, y <math>\gamma</math> Proteobacteria y el</i>	
<i>cluster Cytophaga – Flavobacterium</i>	
<i>Determinación de las tasas de crecimiento de cada uno de los</i>	28
<i>dominios y de los grupo de Bacteria seleccionados para el</i>	
<i>estudio</i>	
Fase de gabinete	28
<b>RESULTADOS</b>	29
Densidad y abundancia relativa de cada uno de los dominios y de	29
los grupos de Bacteria seleccionados para el estudio	
<i>Comunidad Procariota</i>	29
<i>Dominios Bacteria y Archaea</i>	31
<i><math>\alpha</math> - Proteobacteria</i>	33
<i><math>\beta</math> – Proteobacteria</i>	35
<i><math>\gamma</math> - Proteobacteria</i>	35
<i>Cluster Cytophaga-Flavobacterium</i>	35
Tasa de crecimiento de las comunidades en estudio	37
<i>Comunidad Procariota</i>	37
<i>Dominios Bacteria y Archaea</i>	38
<i><math>\alpha</math> - Proteobacteria</i>	39
<i><math>\beta</math> – Proteobacteria</i>	42
<i><math>\gamma</math> - Proteobacteria</i>	42

<i>Cluster Cytophaga-Flavobacterium</i>	43
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	44
Densidad de la comunidad procariota, de los dominios Bacteria y Archaea y las divisiones de Bacteria $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ - Proteobacteria y el <i>cluster Cytophaga – Flavobacterium</i>	44
Tasas de crecimiento de las comunidades en estudio	48
<b>CONCLUSIONES</b>	51
<b>RECOMENDACIONES</b>	52
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	53
<b>ANEXOS</b>	58

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de las sondas marcadas con Cy3 utilizadas en el Laboratorio de Microbiología de la UJTL	25
<b>Tabla 2.</b> Densidad total de procariotas en los dos sistemas experimentales	30
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de células detectadas con las sondas trabajadas para el sistema experimental de la entrada del río Cubillos en el embalse del Neusa	31
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de células detectadas con las sondas trabajadas para el sistema experimental de La Presa en el embalse del Neusa	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del bucle microbiano	4
<b>Figura 2.</b> Ubicación aproximada de las estaciones de muestreo en el embalse del Neusa	20
<b>Figura 3.</b> Montaje experimental en el embalse del Neusa	23
<b>Figura 4.</b> Diagrama de las etapas generales del procedimiento FISH	26
<b>Figura 5.</b> Variación de la densidad total de procariotas	30
<b>Figura 6.</b> Cambios en la composición filogenética de la comunidad del bacterioplancton en el embalse del Neusa	34
<b>Figura 7.</b> Cambios en la estructura de la comunidad del bacterioplancton en el embalse del Neusa	36
<b>Figura 8.</b> Variación de las tasas de crecimiento procariota en el embalse del Neusa	38
<b>Figura 9.</b> Variación de las tasas específicas de crecimiento para los dominios Bacteria y Archaea	40
<b>Figura 10.</b> Variación de las tasas específicas de crecimiento para los grupos $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ Proteobacteria y cluster <i>Cytophaga- Flavobacterium</i>	41

## **LISTA DE ANEXOS**

**Anexo 1.** Reactivos para preparar las soluciones buffer de hibridación y de lavado para concentraciones de formamida de 20 y 35%.

**Anexo 2.** Imágenes de las células procariotas detectadas con el procedimiento FISH.

## RESUMEN

Se analizó mediante un diseño experimental *in situ* el efecto de la bacteriovoria sobre las tasas de crecimiento y la estructura de la comunidad procariota en dos sitios contrastantes en el embalse del Neusa, utilizando bolsas de diálisis como microcosmos y el fraccionamiento selectivo de muestras de agua naturales. Se usó la técnica de epifluorescencia con Naranja de Acridina y la de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) para obtener datos de densidad, tasas de crecimiento y tiempos de generación de organismos de los dominios Bacteria y Archaea y los grupos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  Proteobacteria y el cluster *Cytophaga - Flavobacterium*. Los resultados mostraron que el pastoreo por heterótrofos nanoflagelados puede llegar a ser un proceso importante en el control de la abundancia de los grupos estudiados, pero no como modelador de la estructura de la comunidad, ya que las abundancias reportadas para cada grupo no presentaron mayores diferencias espaciales y/o temporales.

PALABRAS CLAVES: Embalse del Neusa, FISH, Bacteria, Archaea, Proteobacteria, cluster *Cytophaga-Flavobacterium*, bacteriovoria, tasas de crecimiento.

## ABSTRACT

The effect of bacterivory over the prokaryote community structure and its growth rate was analyzed through an experimental design *in situ* at Neusa dam, using dialysis bags as microcosms and a selective breaking sample of natural water. Epifluorescence technique with Acridine Orange along Fluorescent *in situ* hybridization were used to obtain density data, growth rate and organisms generation times from Bacteria and Archaea domains and  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  Proteobacteria groups and the *Cytophaga* – *Flavobacterium* cluster. Results shows that heterotrophic nanoflagellate grazing may be an important process in the abundance control of the study groups, but not as a community structure modeler so that reported abundance for each group do not represent high temporal or spatial differences.

KEY WORDS: Neusa dam, FISH, Bacteria, Archaea, Proteobacteria, *Cytophaga-Flavobacterium* cluster, bacterivory, growth rate.

## INTRODUCCIÓN

La producción de biomasa en los ecosistemas acuáticos depende de diversos factores que abarcan desde el efecto de variables ambientales hasta complejas interacciones entre los organismos que conforman las redes tróficas de la columna de agua. Tradicionalmente se considera que dicha producción esta basada en los productores primarios del plancton que aprovechan la energía de la luz en la síntesis de los compuestos orgánicos que son metabolizados por diversos consumidores de la red trófica. Los procariotas del bacterioplancton juegan un papel importante en la remineralización de compuestos orgánicos y por lo tanto en la regulación de la productividad primaria en estos ecosistemas acuáticos, y participan activamente en la transferencia de materia hacia niveles tróficos superiores ya que incorporan una parte mayoritaria de los componentes orgánicos disueltos a su biomasa. Estos compuestos disueltos provienen de la biosíntesis del fitoplancton y de los desechos de otros grupos del plancton que de otra manera serian eliminados del sistema (Azam *et al.* 1983; Pomeroy 1974).

Debido a este papel de las bacterias en la reincorporación de compuestos orgánicos, sería de esperar una relación directa entre la cantidad de materia orgánica disuelta en el sistema y la biomasa del bacterioplancton. Sin embargo, aunque tiende a haber una mayor cantidad de bacterias en sistemas eutróficos que en aquellos oligotróficos esta relación no es proporcional; una explicación a este fenómeno es la influencia de factores de regulación como las interacciones bióticas que se dan con otras comunidades y afectan la cantidad de biomasa en el compartimiento de las bacterias (Canosa & Pinilla 1999; Cole *et al.* 1988).

Un factor de regulación de la abundancia del bacterioplancton en los ecosistemas acuáticos es la bacteriovoria proceso mediante el cual las bacterias son consumidas por organismos del plancton heterotrófico, dentro del cual se destacan

los heterótrofos nanoflagelados (HNF). Este proceso según Sherr *et al.* 1983 es un punto de transferencia de biomasa desde el compartimiento bacteriano hacia otros niveles en la red trófica acuática por lo que es importante entender su efecto sobre la productividad en diferentes ecosistemas acuáticos. Además, se cree que la bacteriovoria puede afectar la composición de la comunidad bacteriana porque los HNF pastorean de manera diferencial los diferentes rangos de tamaño que pueden presentar sus presas. Esta selectividad genera cambios en la abundancia relativa de los diferentes grupos que componen la comunidad microbiana (Pernthaler 2005).

La modificación en la estructura de las comunidades microbianas puede tener consecuencias tanto a nivel de las redes tróficas y la productividad, como en la diversidad taxonómica y funcional microbiana. Con respecto a los efectos que la bacteriovoria ejerce sobre la diversidad microbiana, es necesario reconocer que los procariotas constituyen el grupo de organismos más diverso en la biosfera y que los procesos llevados a cabo por las diferentes especies microbianas tienen efectos a nivel global (Sherr & Sherr 2002). Por lo tanto, entender como influye la bacteriovoria en las tasas de crecimiento de diferentes grupos microbianos también es un elemento importante para comprender el papel de esta interacción en la función de los microorganismos en el ecosistema.

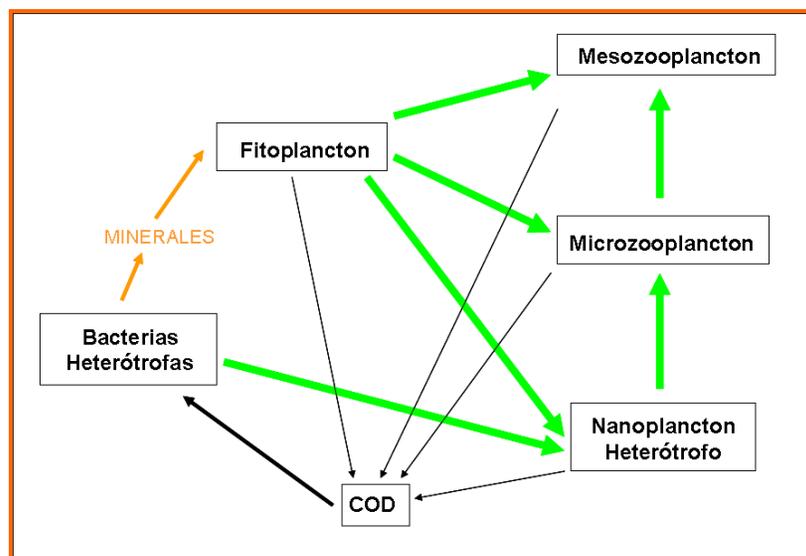
En este estudio se pretendió establecer con un sistema experimental en un cuerpo de agua colombiano la magnitud de la bacteriovoria de los HNF y su efecto sobre las tasas de crecimiento de los dominios Bacteria y Archaea, así como de los grupos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacteria y el cluster *Cytophaga-Flavobacterium* de Bacteria que representan algunos de los más abundantes en la columna de agua en el embalse del Neusa (Canosa & Niño 2006).

Para lograr el objetivo propuesto en este estudio se contó con muestras tomadas durante la ejecución de un proyecto financiado por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República y la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano titulado “Evaluación experimental del efecto de la bacteriovoria sobre la productividad y estructura de la comunidad bacteriana en el Embalse del Neusa” (Canosa & Niño 2007), dentro del cual se enmarcó este trabajo de grado. Se presenta como requisito para optar al título de Bióloga Marina.

## MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### Comunidades microbianas y las redes tróficas acuáticas

Según Azam *et al.* 1983, el bacterioplancton es un componente central de las redes tróficas acuáticas, ya que participa en el reciclaje del carbono orgánico disuelto (COD) proveniente de los desechos del zooplancton y de la lisis celular. Al ser asimilado por las bacterias el COD se convierte en biomasa particulada que se transfiere por pastoreo a los bacterivoros principalmente heterótrofos flagelados y ciliados, los cuales a su vez son depredados por grandes metazoos; de esta forma, este material orgánico, de otra forma perdido, es incorporado de nuevo en la red trófica (figura 1) (Pomeroy 1974). La reincorporación de COD a la red trófica acuática por el bacterioplancton, se ha denominado bucle microbiano (Azam *et al.* 1983).



**Figura 1.** Representación esquemática del bucle microbiano. Las flechas mas gruesas indican la dirección del flujo de materia orgánica en forma de biomasa y las delgadas representan la liberación de carbono orgánico disuelto (COD) (adaptado de Pomeroy 1974; Azam *et al.* 1983).

Las aproximaciones teóricas al funcionamiento del bucle microbiano han permitido establecer el efecto que las variables ambientales tienen sobre dichas poblaciones. El estado trófico del ambiente causa cambios tanto en la composición taxonómica como en la estructura de tamaños del bacterioplancton; estos cambios se ven reflejados en la cantidad de carbono que se puede encontrar por célula, que a su vez puede ser transmitida a través del pastoreo a los niveles superiores de las redes tróficas acuáticas (Koch 1996).

### **El plancton procariota**

Las discusiones acerca de la ubicación de los organismos vivos en jerarquías en las que el mayor nivel era el de reino son siempre actuales especialmente cuando se tratan temas relacionados con los microorganismos. Hace más o menos dos décadas los organismos se agrupaban en cinco reinos, Animalia, Plantae, Fungi, Protista y Monera. Se creía que la máxima diversidad estaba en los eucariotas y se le concedió a los procariotas el título de uniformes en cuanto a sus propiedades (Ford 2000). En 1977, Woese y Fox, al comparar genes rARN 16S propusieron que los procariotas no constituían un grupo homogéneo, sino que constituían dos linajes claramente diferenciados, ahora se acepta que pertenecen claramente a dos dominios Bacteria y Archaea.

Debido al auge de estudios sobre biodiversidad, se han desarrollado una serie de metodologías moleculares basadas en la amplificación del gen rARN 16S específicamente se han diseñado sondas de oligonucleótidos para encontrar en diferentes ambientes organismos de cada uno de los dominios y de niveles taxonómicos intermedios (divisiones) y específicos (géneros y especies) con el fin de entender su participación en algunos procesos dentro de los ecosistemas acuáticos (Amann *et al.*1995) y terrestres. Aunque se sabe de la importancia de

los miembros de Bacteria en el flujo de energía y su participación en ciclos biogeoquímicos en muchos ecosistemas todavía no se sabe la medida de esa participación; adicionalmente estudios iniciales mostraron que la presencia de organismos de Archaea estaba limitada a ambientes extremos, resultados recientes muestran que son más comunes de lo que se creía en aguas marinas, estuarinas y continentales. En este estudio se obtuvieron datos de abundancia relativa de ambos dominios y de algunos linajes seleccionados de Bacteria en el embalse del Neusa, a continuación se hace una breve exposición sobre características relevantes de los grupos estudiados.

### ***Dominio Bacteria***

Comprende a las denominadas Eubacterias. Todos son organismos compuestos por células procariotas con paredes de peptidoglucano y la mayoría sensibles a los antibióticos. Incluye varios linajes identificados a partir de estudios filogenéticos del gen rARN 16S. En este trabajo el dominio Bacteria fue detectado por medio de una sonda de oligonucleótidos GCTGCCTCCCGTAGGAGT marcada con Cy3 (Amann *et al.* 1990).

### ***Proteobacteria***

Este linaje de Bacteria está compuesto por las clásicas bacterias Gram negativas, reconocidas como uno de los grupos más exitosos en el planeta y con gran abundancia en prácticamente todos los ambientes acuáticos; incluso se han reportado distribuciones globales en regiones de todo el mundo (Glockner *et al.* 2000). Algunas especies son de reconocida importancia clínica, industrial o agrícola. Se han encontrado divisiones filogenéticas que además son útiles para

reconocer el hábitat del que provienen, por ejemplo grupos de proteobacterias más frecuentes en el mar, las aguas dulces o los suelos (Glockner *et al.* 2000). En este trabajo se buscaron representantes de las subdivisiones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacteria.

### ***Subdivisión $\alpha$ Proteobacteria***

Los estudios han mostrado que los miembros de este grupo son frecuentes en aguas, con una participación dominante en los sistemas marinos. Hay una gran diversidad de morfología con formas bacilares, filamentosas y vibrionáceas entre otros (Glockner *et al.* 1999).

### ***Subdivisión $\beta$ Proteobacteria***

Los miembros de este grupo son una fracción dominante del bacterioplancton en los sistemas pelágicos y en los agregados de materia orgánica de los sistemas epicontinentales (Glockner *et al.* 1999); lo que favorece a la contribución de estas bacterias al flujo de materia orgánica hacia niveles tróficos superiores (Pernthaler & Amann 2005). Algunos grupos están involucrados activamente en procesos de oxidación y reducción de amonio, en la solubilización de la materia orgánica particulada y en el reciclaje de la materia orgánica disponible (Knoll *et al.* 2001).

### ***Subdivisión $\gamma$ Proteobacteria***

A muchos organismos de esta subdivisión se les ha encontrado en sistemas acuáticos de agua dulce y marina; la mayoría de sus miembros son copiotrofos típicos adaptados a concentraciones muy altas de nutrientes por lo que crecen muy bien bajo condiciones de laboratorio (Glockner *et al.* 1999).

### **Cluster *Cytophaga - Flavobacterium***

Se han encontrado representantes de esta división en aguas marinas y continentales que en ocasiones forman el grupo más representativo del bacterioplancton en sistemas marinos. Se sabe que contienen altas concentraciones de guanina - citosina, son capaces de degradar aeróbicamente muchos sustratos, desde las proteínas e hidratos de carbono hasta pesticidas e insecticidas, entre otros (Glockner *et al.* 1999); razón por la cual los miembros de este grupo son de gran importancia a nivel agrícola. Además desempeñan un papel importante en la mineralización de macromoléculas en regiones profundas en ecosistemas acuáticos.

### **Dominio Archaea**

Dominio constituido también por organismos unicelulares procariotas, por lo cual es complicado distinguirlas del dominio Bacterias bajo el microscopio. Las condiciones extremas en las que viven muchas de ellas las hacen difícilmente cultivables. En un principio se pensó que este dominio era exclusivo de ambientes extremos, como ventilas hidrotermales o ambientes con alta salinidad, ahora se sabe que son normales en el plancton y sedimentos marinos, en el tracto digestivo de rumiantes e incluso en depósitos de petróleo en el subsuelo (Madigan & Martinko 2005).

### **Bacterióvoros y su efecto sobre el bacterioplancton**

En el hábitat acuático los protistas heterótrofos se encuentran en aguas dulces, marinas y estuarinas, formando parte del plancton (Madigan & Martinko 2005). Por

ser heterótrofos se consideran parte del zooplancton. Muchos autores usan una clasificación del plancton basada en tamaños, es así como se conoce al picoplancton (0,2 – 2  $\mu\text{m}$ ), el nanoplancton (2 – 20  $\mu\text{m}$ ) y el microplancton (20 – 200  $\mu\text{m}$ ). También se pueden presentar combinaciones entre zooplancton y tamaños, como picozooplancton (Ruppert & Barnes 1996).

En la columna de agua, el nanozooplancton es considerado el principal grupo consumidor de bacterias tanto en sistemas continentales como marinos (Simek & Chrzanowski 1992). Su abundancia y actividad están relacionadas con el nivel de transferencia de carbono orgánico particulado (COP) hacia niveles tróficos superiores por lo que se estudia su papel en el control de la abundancia de la comunidad de bacterias en el agua (Sherr *et al.* 1992). Tampoco se debe olvidar el papel de algunos protistas mixotrofos en el control del bacterioplancton, ya que estos son importantes componentes de la comunidad bacteriovora (Pernthaler 2005).

En términos generales los mecanismos que permiten o favorecen la bacteriovoria son el encuentro, la captura y la ingestión de la presa. La probabilidad de encuentro, depende además de la abundancia de la presa y del depredador, de la turbulencia del medio acuático y del movimiento de los organismos para acceder activamente a sus presas (Pernthaler 2005). Se cree que la captura de la presa se puede realizar por dos mecanismos diferentes; uno de ellos es la filtración por medio de estructuras especializadas, en este caso, la presa generalmente es más pequeña que el predador. Este mecanismo se ha asociado a la captura de algunas bacterias que se pueden encontrar dentro o en la superficie de partículas suspendidas en la columna de agua. Un segundo mecanismo es la intercepción en la cual la captura de partículas o bacterias se realiza por medio de un contacto directo con el bacteriovoro, en este último caso los tamaños tanto de predador como de la presa son similares (Pernthaler 2005). En el caso de los predadores

flagelados, por ejemplo, la presa es arrastrada por una corriente incitada por los movimientos del flagelo hasta lograr contacto entre presa y predador; inmediatamente se forma una vesícula fagocítica en el sitio de ingestión. Entonces el proceso de captura de las bacterias se puede resumir en cuatro fases: contacto, procesamiento que se refiere al transporte por la probóscide hacia el interior del cuerpo del bacteriovoro (Boenigk & Novarino 2004), la ingesta y la fase refractaria en la que se completa la ingestión y reanuda la actividad de búsqueda de alimento por parte de los bacteriovoros.

Se sabe que la bacteriovoria también puede influenciar la estructura de la comunidad bacteriana, ya que características propias de las bacterias como tamaño, forma y división celular juegan un papel en la selección de las presas por parte de los bacteriovoros lo que conduce a la mortalidad de morfotipos específicos (Simek *et al.* 1999; Pernthaler 2005). Además se liberan grandes cantidades de nutrientes inorgánicos (principalmente fósforo y nitrógeno), entonces este proceso contribuye a unificar la productividad bacteriana con los niveles tróficos superiores (meso y metazooplancton) y con el necton (Strom 2000).

Aparentemente un protozoo pastorea sobre una bacteria si está dentro de sus rangos de selección de talla. Se ha encontrado que los flagelados de tallas que van desde los 2 hasta los 10  $\mu\text{m}$  son los bacteriovoros más activos (Strom 2000). Sin embargo también algunos dinoflagelados de tallas relativamente grandes, entre los 5 a los 50  $\mu\text{m}$  han mostrado activa predación bacteriana (Strom 2000). 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, lo que resulta en que en el ecosistema solo queden las bacterias de los tamaños extremos, generalmente con morfologías resistentes al pastoreo (Koch 1996). Esta selección de tallas va a determinar la manera en que la biomasa del bacterioplancton se distribuye en los

diferentes grupos funcionales, favoreciendo de esta manera el rápido crecimiento y la resistencia al pastoreo de especies o poblaciones, resultando en un cambio en la composición de la comunidad del bacterioplancton (Pernthaler *et al.* 1997).

Se han registrado, en sistemas meso-eutróficos con mayor disponibilidad de nutrientes, células con actividad metabólica alta y crecimiento de formas morfológicamente complejas como espirales y filamentos, al parecer este es un mecanismo de resistencia al pastoreo; en comparación con lo registrado para sistemas oligotróficos, en los que predominan las células pequeñas, debido a la limitación por nutrientes que se presenta en estos sistemas, lo que reduce la actividad metabólica y posiblemente afecta la relación superficie volumen de las células (González 1999).

En Colombia, la participación de los microorganismos en las redes tróficas acuáticas y su influencia sobre los ecosistemas no se ha estudiado mucho; esto puede deberse a que las hipótesis que hasta ahora se han propuesto para explicar la función de los microorganismos no son universales y en algunas situaciones son contradictorias (Canosa & Niño 2006).

Los estudios de las comunidades microbianas del agua en Colombia para 1995 eran casi inexistentes y los pocos trabajos realizados tenían un enfoque más hacia el problema de los indicadores de calidad sanitaria. Los primeros trabajos introdujeron la técnica de epifluorescencia, que ha sido ampliamente utilizada en el estudio de las abundancias del bacterioplancton (Canosa & Pinilla 1999). Con esta metodología se confirmó que los medios de cultivo podían generar subestimaciones en la abundancia procariota, también afirmó la importancia del estudio de los microorganismos, un componente abundante en los ecosistemas acuáticos.

Con la necesidad de buscar explicaciones a la variación de la abundancia de procariotas y sus implicaciones en los ecosistemas acuáticos Andinos y con la introducción de fluorocromos más brillantes y estables se extendió el uso de la microscopia de epifluorescencia al estudio de las abundancias virales y del nanoplancton heterótrofo (Canosa 2002). El grupo de Microbiología Acuática de la Universidad Jorge Tadeo Lozano intenta además estudiar la variación espacial y temporal de los factores que afectan la abundancia y composición del bacterioplancton, para el 2004 se introdujo la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) con el fin de estudiar las interacciones y relaciones entre los diferentes componentes del bacterioplancton, lo que ha permitido obtener datos para generar un modelo explicativo (Canosa & Niño 2006).

### **Determinación de las interacciones entre el bacterioplancton y los protozoos**

El estudio de las interacciones entre el bacterioplancton y los protozoos ha contribuido a entender la importancia de la bacteriovoria en el control de la comunidad del bacterioplancton, no solo en términos de abundancia sino en aspectos como el tamaño celular y la diversidad morfológica. La predación de las bacterias por protozoos podría llevar a un cambio en la estructura de la comunidad del bacterioplancton; y el conocimiento de esta interacción permitirá una mejor comprensión de la manera como el COP y el COD fluyen a través del bucle microbiano (Canosa & Niño 2006).

Para el estudio de esas interacciones se emplean dos tipos de métodos. Los métodos directos que involucran estimación de parámetros como la tasa de ingestión y la productividad bacteriana. Cuando los bacteriovoros son 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). Los métodos indirectos utilizan más de una variable, como por ejemplo relacionar datos de abundancia numérica de protozoos y bacterias, de valores de abundancia numérica de nanoplancton heterótrofo con biovolumen bacteriano o establecer cambios en la estructura de la comunidad en respuesta a la predación (Strom 2000).

Los procedimientos moleculares son cada vez más utilizados para valorar cambios en la estructura de la comunidad (Canosa & Niño 2007). En este estudio se usó el procedimiento FISH que es una técnica indirecta para valorar el impacto de la bacteriovoria sobre la estructura de la comunidad bacteriana. A continuación se describe brevemente el principio teórico de la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH, Fluorescent *In Situ* Hybridization) que permitió evaluar la estructura de la comunidad procariota a través de un diseño experimental en el cual se elimina o se aumenta la bacteriovoria.

### ***Técnica de hibridación in situ con sondas fluorescentes***

La técnica FISH (hibridación *in situ* con sondas fluorescentes) es utilizada para la identificación filogenética de bacterias sin necesidad de cultivos, por lo que es muy útil en estudios de ecología microbiana. Una de sus aplicaciones es el estudio de la composición y la dinámica temporal y espacial de la comunidad en su hábitat (Amann *et al.* 1997). Se vale de sondas de ADN O ARN (oligonucleotidos y polinucleotidos) marcadas covalentemente en el extremo 5' con un fluorocromo (Cy3, Cy5, fluoresceína, tetrametilrodamina, Texas red). Las sondas son diseñadas para dianas específicas en las secuencias del gen 16S y/o 23S rARN (Luque & Herráez 2001). Durante el procedimiento, se filtra un volumen de la

muestra a analizar con una membrana que retenga las células y al mismo tiempo permita su valoración microscópica. Las células blanco, retenidas en el filtro, se deben permeabilizar a dichas sondas, por lo que son tratadas para favorecer el acceso de la sonda marcada a la célula para hibridar secuencias complementarias específicas en el ribosoma (Moter & Gobel 2000). Adicionalmente toda la comunidad es marcada con un fluorocromo como el DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) que permite obtener datos de la comunidad total al unirse de manera inespecífica al ADN de cualquier célula (Ausubel *et al.* 2002; Madigan & Martinko 2005).

Para la obtención de la información numérica se utiliza la microscopía de epifluorescencia, en la cual se aprovecha la propiedad de ciertos compuestos (fluorocromos), de emitir luz de diferente longitud de onda cuando se estimulan en una longitud de onda específica. Este tipo de microscopio permite seleccionar la longitud de onda de excitación adecuada para cada fluorocromo utilizado. En la técnica FISH se usa la longitud de onda del ultravioleta para excitar al DAPI y así obtener datos de la comunidad total (todas las células teñidas) y la del verde para excitar al Cy3 y obtener datos de la población específicamente marcada. Como el procedimiento es un poco complejo, muchos laboratorios se valen de herramientas adicionales como son la integración de cámaras de video de alta resolución al microscopio para la captura de imágenes que se almacenan en un software específico (por ejemplo Image Tool®) y así facilitar la obtención de las abundancias relativas de una población específica dentro del total de la comunidad.

## PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Este trabajo de tesis surge con la necesidad de estudiar si la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), puede ofrecer información acerca del efecto que la bacteriovoria tiene sobre la estructura de la comunidad bacteriana. Entonces, a través de un diseño experimental, se estudió la magnitud de la bacteriovoria ejercida por los heterótrofos nanoflagelados (HNF), y su efecto sobre las tasas de crecimiento de los dominios Bacteria y Archaea, así como de los grupos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacteria y el cluster *Cytophaga-Flavobacterium* en el embalse del Neusa. Se pretendió así dar respuesta a las siguientes preguntas:

¿Se pueden apreciar cambios en las tasas de crecimiento de los dominios Bacteria y Archaea en sistemas experimentales con y sin bacteriovoria?

¿Brinda utilidad la técnica FISH para valorar los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana y en las tasas de crecimiento de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacterias y el cluster *Cytophaga-Flavobacterium*, en esos sistemas experimentales?

### Objetivo General

Establecer mediante un diseño experimental en el embalse del Neusa la magnitud de la bacteriovoria realizada por los HNF, y su efecto sobre las tasas de crecimiento de los dominios Bacteria y Archaea y las divisiones de Bacteria  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacteria y el cluster *Cytophaga-Flavobacterium*.

### **Objetivos Específicos**

Valorar las tasas de crecimiento de los dominios Bacteria y Archaea en presencia de HNF, en ausencia de HNF y en ausencia de predadores de HNF.

Determinar las tasas de crecimiento de las divisiones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacteria y el cluster *Cytophaga-Flavobacterium* bajo las condiciones definidas en el diseño experimental.

Comparar las tasas de crecimiento de la comunidad procariota de acuerdo a las condiciones de bacteriovoria precisadas en el ensayo.

Valorar la importancia de la bacteriovoria en la estructuración de la comunidad procariota bajo condiciones naturales en el embalse.

### **Hipótesis**

De acuerdo al problema de investigación planteado se formularon las siguientes hipótesis:

Las tasas de crecimiento de los organismos procariotas (Bacteria y Archaea) son mayores en los sistemas experimentales en los cuales se eliminan los HNF.

Si los protozoos son el factor cuantitativamente más importante en el control de la abundancia de la comunidad procariota en el embalse del Neusa entonces la bacteriovoria controlará la productividad bacteriana *in situ* en más de un 50%.

Hay diferencias en la magnitud de la bacteriovoria sobre las tasas de crecimiento de las divisiones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacteria y el cluster *Cytophaga-Flavobacterium* en el embalse del Neusa.

## METODOLOGÍA

Los sitios de trabajo en el embalse del Neusa, la periodicidad del muestreo y las variables biológicas *in situ* fueron definidas en el proyecto marco de este trabajo de grado (Canosa & Niño 2007).

### Área de estudio

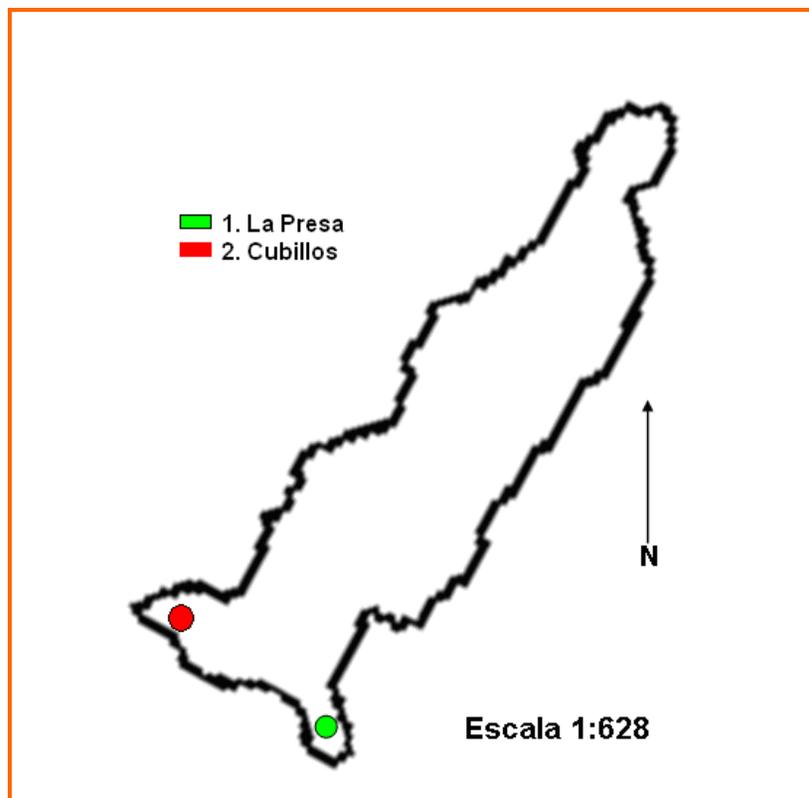
El embalse del Neusa está ubicado en el Departamento de Cundinamarca, 80 Km. al norte de Bogotá, a una altura de 2960 msnm sobre la Cordillera Oriental de Colombia, entre las coordenadas geográficas 5° 8'30" de latitud Norte y 73° 58'28" de latitud Oeste (CAR 1968), es administrado por la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, CAR. Además de surtir de agua algunos acueductos regionales, regula los caudales del río Neusa, cuenta con una estación piscícola y sirve como lugar de recreación.

Su clima se caracteriza por ligeros cambios en las temperaturas relacionados con la variación bimodal de las lluvias. Los picos máximos de precipitación son en abril y octubre y los dos periodos secos se presentan entre junio – agosto y diciembre – enero. Los meses más cálidos son marzo y abril, los mas fríos entre agosto y diciembre (CAR 1968). 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). De acuerdo a los niveles de nutrientes y su moderada cantidad de bacterias puede considerarse como un sistema mesotrófico (Canosa & Pinilla 1999). Este ecosistema acuático fue elegido como área de estudio porque trabajos previos mostraban que la bacteriovoria por HNF podría estar dirigiendo la productividad bacteriana en las aguas del embalse.

## Fase de campo

### *Sitios de muestreo*

Para obtener datos del efecto de la bacteriovoria sobre la productividad y la estructura de la comunidad del bacterioplancton, se llevó a cabo un diseño experimental en el cual se consideraron dos sitios en el embalse, La Presa y la entrada del río Cubillos (figura 2). En estos lugares se han encontrado grandes diferencias en abundancia de heterótrofos nanoflagelados y de procariotas, así como la presencia de macrófitas enraizadas y de nutrientes, con un predominio de características litorales en Cubillos y una dinámica más limnética en La Presa (Canosa & Niño 2006).



**Figura 2.** Ubicación aproximada de las estaciones de muestreo en el embalse del Neusa.

### ***Periodicidad del muestreo***

El montaje experimental se valoró *in situ* durante una semana. Para evaluar las tasas de crecimiento y los cambios temporales en la estructura de la comunidad se tomaron muestras al inicio del experimento, a las 48 y a las 94 horas de los tratamientos sin fraccionar y fraccionados como se explicará más adelante.

### ***Diseño experimental***

El montaje experimental incluyó la incubación *in situ* de muestras de agua en bolsas de diálisis. Se usaron membranas de celulosa Spectra/Por (referencia 132684) con un peso molecular de corte de 12,000 a 14,000 Daltons, equivalente a un tamaño de poro aproximado de 2,4 nm (Canosa *et al.* 2008). Estas bolsas impiden la entrada y salida de microorganismos pero permiten la difusión continua de material orgánico y de iones, lo que evita que el bacterioplancton se vea limitado por nutrientes, inclusive por periodos largos de tiempo (Herndl *et al.* 1993).

La parte experimental se realizó en junio de 2007, para el experimento se colectaron muestras de agua superficial, a una profundidad de 50 cm con botella Van Dorn, en los lugares ya señalados. Con el agua prefiltrada (primero filtros de nylon de 60  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y posteriormente de 20  $\mu\text{m}$ ) se prepararon tres tratamientos (Canosa & Niño 2007). Para cada tratamiento se pasaron 10 litros de agua previamente filtrada a través de filtros de membrana mixtos de esteres de celulosa de diferente diámetro de poro, según el tratamiento (Canosa & Niño 2007).

- 1. Tratamiento sin bacteriovoria (SB).** Agua del embalse, de la que se retiraron por filtración las células mayores a  $0,8 \mu\text{m}$ . En este tratamiento se eliminan los heterótrofos nanoflagelados.
- 2. Tratamiento con bacteriovoria aumentada (BA).** Agua del embalse en la que se retiraron por filtración las células mayores a  $5 \mu\text{m}$ . Se busca así aumentar la presión por pastoreo de los heterótrofos nanoflagelados, al eliminar sus depredadores. Aunque se pueden perder algunos heterótrofos del nanoplancton, se sabe que más del 85% de la bacteriovoria se debe a la fracción nanoplanctónica menor a  $5 \mu\text{m}$  (Strom 2000).
- 3. Tratamiento control (TC).** Agua del embalse sin ningún fraccionamiento. Se utilizó como punto de referencia para estimar el efecto de la bacteriovoria sobre las tasas de crecimiento y la estructura de la comunidad procariota.

Para cada tratamiento, se colocaron 1,7 litros de agua en las bolsas de diálisis. Se incubaron en los sitios indicados (La Presa y río Cubillos) a 50 cm de profundidad durante 4 días. Se mantuvieron en posición vertical, utilizando soportes de acrílico transparente (figura 3).



**Figura 3.** Montaje experimental en el embalse del Neusa. A: soporte y bolsas de diálisis en el montaje. B: diseño sumergido en la entrada del río Cubillos. Tomado de Canosa *et al.* 2008.

### ***Muestras biológicas***

Para la técnica de FISH se tomaron muestras de aproximadamente 10 mL de cada tratamiento experimental SB, BA y TC, a las 0, 48 y 94 horas en cada uno de los sitios de incubación en el embalse del Neusa. **Fijación y concentración de la muestra.** Este procedimiento se realizó en campo. De cada una de las muestras se prepararon dos filtros así: a 6 mL de cada muestra se adicionaron 18 mL de paraformaldehído al 4% (pH 7,2), en un período de tiempo que varió entre 1 y 24 horas. Se filtraron 6 mL de la muestra fijada con membranas Nucleopore blancas de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore GTTP) y filtros de soporte de acetato de celulosa. Los filtros con las muestras se congelaron y almacenaron en oscuridad hasta su procesamiento. El número total de filtros analizados fue de 36 para un total de 144 pruebas (a partir de cada filtro se realizaron cuatro pruebas).

Para la realización de este trabajo de grado los filtros se mantuvieron congeladas a -20° C durante siete meses en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano

## **Fase de laboratorio**

### ***Medición de la densidad procariota total***

Los datos de densidad procariota total fueron tomados de los obtenidos en el proyecto marco de este trabajo de grado (Canosa *et al.* 2008). Se usó la técnica de conteo directo por epifluorescencia, estandarizada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano (Canosa & Pinilla 1999). Como fluorocromo se empleo naranja de acridina y membranas tipo Isopore Nucleopore de policarbonato de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de color negro (Millipore GTB02500). Se utilizó para el conteo un microscopio Olympus BX 60 y filtro de excitación de 450 – 480 nm correspondiente a la luz azul. Para el conteo se seleccionaron campos al azar, para cubrir la mayor área del filtro; se contó un mínimo de 200 células por filtro.

### ***Medición de la abundancia relativa de organismos del dominio Archaea y Bacteria y las divisiones $\alpha$ , $\beta$ , y $\gamma$ Proteobacteria y el cluster Cytophaga-Flavobacterium***

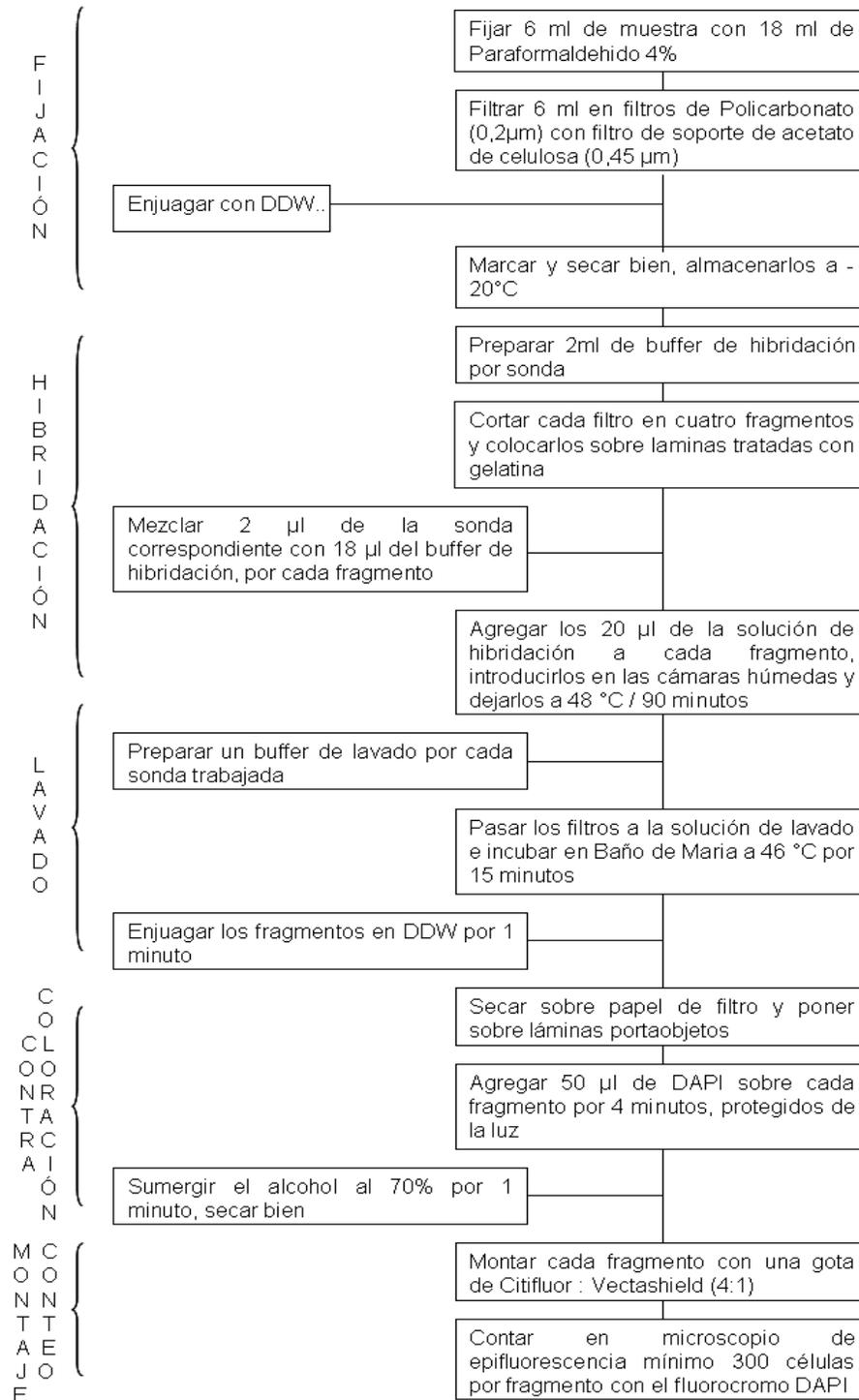
Para obtener datos de la abundancia relativa de organismos de los dominios Bacteria y Archaea y de los grupos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  Proteobacteria y el cluster *Cytophaga-Flavobacterium* se siguió el protocolo de la técnica FISH estandarizado en el Laboratorio de Microbiología (Canosa & Niño 2006). En la figura 4 se muestra un

esquema del procedimiento resumido. Se describen a continuación las cinco etapas posteriores a la fijación y concentración de la muestra.

**1. Hibridación:** los filtros almacenados fueron descongelados y secados con secador de aire manual. Cada filtro se dividió en cuatro secciones con bisturí. La región exterior de cada fragmento se marcó con lápiz con números que se asignaron según la muestra y la sonda a hibridar. Un fragmento de filtro sin hibridar se utilizó como control de autofluorescencia. Se prepararon dos tipos de buffer de hibridación (anexo 1) dependiendo de la concentración de formamida necesaria para cada sonda. Se utilizaron sondas de acuerdo a la tabla 1. Para las sondas ALF968 y NON338 se trabajó a una concentración del 20% y para las demás sondas (EUB338, BET42a, GAM42a, CF319a y ARCH915) se trabajó al 35%. Cada sección de filtro se colocó sobre laminas tratadas con gelatina en donde se le adicionaron 18  $\mu\text{L}$  del buffer de hibridación y 2  $\mu\text{L}$  de la sonda correspondiente, para una concentración final de 2,5 ng/  $\mu\text{L}$ . Todas las sondas se incubaron en cámara húmeda a 46° C por 90 minutos.

**Tabla 1.** Secuencias de las sondas marcadas con Cy3 para estudiar las comunidades procariontas en el diseño experimental en el embalse de Neusa (Tomado de Canosa & Niño 2006).

Sonda	Secuencia 5'- 3'	Especificidad	Referencia
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Dominio Bacteria	Amann <i>et al.</i> 1990
BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	$\beta$ -Proteobacteria	Manz <i>et al.</i> 1992
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	$\gamma$ -Proteobacteria	Manz <i>et al.</i> 1992
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	$\alpha$ -Proteobacteria	Manz <i>et al.</i> 1992
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	Cluster <i>Cytophaga</i> – <i>Flavobacterium</i>	Manz <i>et al.</i> 1992
NON338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Control negativo	Wallner <i>et al.</i> 1993
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Dominio Archaea	Manz <i>et al.</i> 1992



**Figura 4.** Diagrama que muestra las etapas generales en el procedimiento FISH, estandarizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

**2. Lavado:** se trabajo con la misma concentración de formamida para las diferentes sondas (anexo 1). Cada sección se introdujo en 50 mL en dicha solución de lavado en el Baño de Maria a 48° C por 15 minutos, para así retirar el exceso de sonda que no hibridó.

**3. Contra coloración:** se utilizo el fluorocromo DAPI con una concentración del 2%, cada fragmento de filtro se coloco sobre laminas portaobjetos y se les agregaron 50 µL del DAPI, el tiempo de exposición fue de 4 minutos. Las láminas se mantuvieron durante este tiempo siempre protegidas de la luz con papel aluminio. El fluorocromo por su parte se mantuvo en hielo picado y también protegido de la luz con un forro de papel aluminio.

**4. Montaje:** se empleo como liquido de montaje una mezcla de Citifluor y Vectashield en una proporción 4:1. A cada fragmento se le agrego una gota del líquido de montaje y se cubrió con un cubreobjetos, se realizo una presión para evitar la formación de burbujas.

**5. Captura y conteo de las imágenes:** se utilizó el microscopio de epifluorescencia equipado con dos cubos de fluorescencia; uno en una banda de excitación en 534 – 550 nm que se empleó para diferenciar las células marcadas con la sonda Cy3 y el otro en 450 – 480 nm que permitió el conteo de todas las células procariotas teñidas con DAPI. Se usó cámara monocromática CCD de Cohu, Inc., y un equipo de análisis de imagen (computador Leica Imaging Systems, monitor y el programa Leica Qwin para Microsoft Windows 95). Para comparar el total de células con las teñidas o positivas para cada sonda se utilizó el programa Image Tool. Los campos se tomaron al azar hasta completar un mínimo de 300 células por fragmento de filtro. Se contaron primero las células teñidas con DAPI y luego las marcadas con Cy3; los resultados se expresaron como el porcentaje del número total de células contadas con DAPI que eran detectables con Cy3.

***Determinación de las tasas de crecimiento de cada uno de los dominios y de los grupos de Bacteria seleccionados para el estudio.***

Las tasas de crecimiento se determinaron a partir de los cambios en la abundancia procariota total y de cada uno de los grupos valorados (dominios Archaea y Bacteria, las divisiones de Bacteria  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  Proteobacteria y el cluster *Cytophaga-Flavobacterium*).

Se asumió un crecimiento exponencial de las poblaciones en estudio por lo que se uso la ecuación general de crecimiento:  $k (h^{-1}) = \ln N_x - \ln N_o / (t_x - t_o)$ , en donde la  $k$  es la tasa de crecimiento,  $N_x$  el número de bacterias en un tiempo determinado  $t_x$ ,  $N_o$  es el número de bacterias en el tiempo inicial  $t_o$  y el tiempo de incubación es la diferencia entre  $t_x - t_o$ .

También se obtuvieron datos del tiempo de generación para cada grupo de procariotas seleccionado a partir de la ecuación general:  $T = \ln 2 / k$ .

**Fase de gabinete**

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 graficas de barras y líneas para observar el comportamiento espacial y temporal de los grupos trabajados, en los dos sistemas experimentales y entre los tres tratamientos. Además de esto con ayuda del programa estadístico SPSS se obtuvieron los coeficientes de variación para cada grupo dentro de cada tratamiento, con el fin de determinar si los cambios en la abundancia presentaban una variación significativa en relación a la media.

## RESULTADOS

Este estudio se basó en el análisis y obtención *in situ* de las tasas de crecimientos de la comunidad del bacterioplancton en un sistema acuático; mediante el empleo de la incubación de muestras en bolsas de diálisis, lo que permitió obtener un grado de control sobre las diferentes comunidades que podrían llegar a interactuar dentro de cada bolsa, ya que se trabajó con muestras fraccionadas por medio de filtración con membranas de diferentes tamaños de poro.

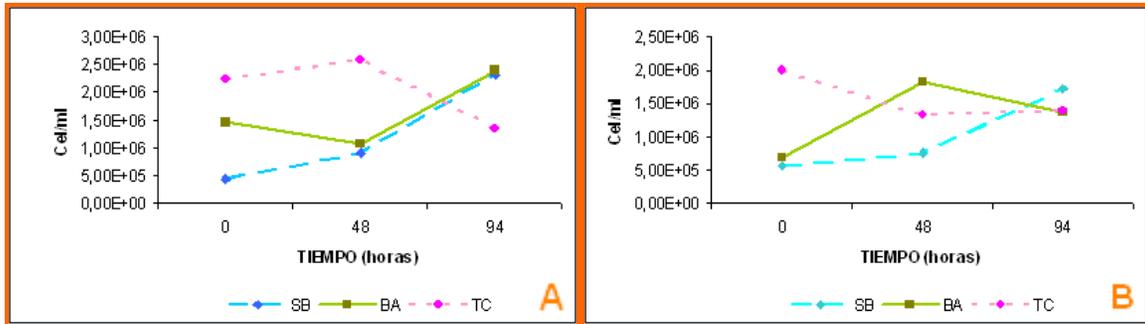
El embalse del Neusa mostró una temperatura promedio de 15°C a lo largo del experimento *in situ*, tanto para el sistema experimental de La Presa como para el ubicado en la entrada del río Cubillos se obtuvieron valores promedio de clorofila *a* de 17,5 µg/l y 19,4 µg/l respectivamente. La densidad procariota promedio para el sector de La Presa fue de  $1,3 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> y para el sector de la entrada del río Cubillos de  $1,8 \times 10^6$  células. mL<sup>-1</sup> (Canosa *et al.* 2008).

### **Densidad y abundancia relativa de cada uno de los dominios y de los grupos de Bacteria seleccionados para el estudio**

#### ***Comunidad Procariota***

En los dos sistemas experimentales (entrada río Cubillos y La Presa) se evidenció un aumento de las densidades de procariotas en el tratamiento sin bacteriovoria (SB) (figura 5), pero en el tratamiento bacteriovoria aumentada (BA), en la entrada del río, se registró un descenso entre las 0 – 48 horas, con un aumento en las siguientes 46 horas, alcanzando casi la misma densidad que el tratamiento SB. En el tratamiento control (TC) se presentaron variaciones en la densidad más notorias en el sistema experimental ubicado en el río Cubillos, con un descenso entre las

48 - 94 horas (figura 5-A), en La Presa se encontró una marcada disminución desde el tiempo 0 hasta las primeras 48 horas, seguido de un pequeño aumento hasta el final del experimento (figura 5-B).



**Figura 5.** Variación de la densidad total de procariontes encontrados durante la incubación en los tres tratamientos, sin bacteriovoria (SB), bacteriovoria aumentada (BA) y tratamiento control (TC) en los dos sistemas experimentales entrada río Cubillos (A) y La Presa (B) en el embalse del Neusa.

Las mayores densidades para el tratamiento SB se registraron a las 94 horas para los dos sistemas experimentales, con valores de 2,33 y 1,71 x 10<sup>6</sup> cél/mL respectivamente.

**Tabla 2.** Densidad total de procariontes en los dos sistemas experimentales (Cubillos y La Presa), en los tres tratamientos, sin bacteriovoria (SB), bacteriovoria aumentada (BA) y tratamiento control (TC), en el embalse del Neusa.

Densidad de la comunidad procarionte (expresada en 10 <sup>5</sup> células / mL)			
Tratamiento	Tiempo (horas)	Cubillos	La Presa
SB	0	4,34	5,72
	48	9,01	7,68
	94	23,3	17,1
BA	0	14,7	7,02
	48	10,6	18,3
	94	24,1	13,
TC	0	22,5	20
	48	25,9	13
	94	13,5	14

En la tabla 2 se muestran las densidades encontradas en cada sitio experimental y a las diferentes horas de muestreo. Las menores densidades procariontas para los dos sistemas experimentales se registraron al inicio del experimento (0 horas).

### **Dominios Bacteria y Archaea**

La totalidad de células detectables con la sonda del Dominio Bacteria (eficiencia de hibridación) fue de 57,46% ( $\pm 18,03$ ) para el sistema experimental de la entrada del río Cubillos (tabla 3) y de 52,58% ( $\pm 21,36$ ) para el sistema de La Presa (tabla 4).

**Tabla 3.** Porcentaje de células detectadas en los tres tratamientos, sin bacteriovoria (SB), bacteriovoria aumentada (BA) y control (TC), en el sistema experimental en la entrada del río Cubillos al embalse del Neusa.  $\beta$ -Proteobacteria ( $\beta$ ),  $\gamma$ -Proteobacteria ( $\gamma$ ),  $\alpha$ -Proteobacteria ( $\alpha$ ), cluster *Cytophaga – Flavobacterium* (CF), control negativo (NON).

Tratamiento	Tiempo (horas)	Abundancia Relativa para Cubillos (%)						
		Bacteria	Archaea	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	CF	NON
SB	0	34,34	12,44	19,76	17,77	9,35	9,29	7,42
	48	37,47	15,36	15,46	30,56	5,94	13,27	1,76
	94	58,62	16,98	38,67	45,76	23,65	10,38	6,60
BA	0	39,71	13,92	17,77	17,59	4,73	14,25	1,86
	48	51,85	10,86	29,40	27,69	4,38	20,86	2,54
	94	63,51	10,41	38,32	32,29	13,42	31,64	4,37
TC	0	70,41	2,40	27,58	14,93	11,42	21,84	2,24
	48	75,83	28,41	45,56	29,55	8,84	8,41	0,85
	94	85,35	2,80	48,43	34,18	13,25	21,99	4,27
PROMEDIO		57,46	12,62	31,22	27,82	10,55	16,88	3,55
DVS		18,03	7,80	12,17	9,78	5,97	7,71	2,28

Se presentó una gran variación del porcentaje de hibridación con la sonda del Dominio Bacteria en el sistema experimental ubicado en la entrada del río Cubillos,

con porcentajes más altos al final del experimento (94 horas) y los menores al inicio (0 horas). Sin embargo, los mayores valores de hibridación con esta sonda se hallaron en el tratamiento control, se evidenció una diferencia cercana al 50% en relación con los otros dos tratamientos (tabla 3).

**Tabla 4.** Porcentaje de células detectadas en los tres tratamientos, sin bacteriovoria (SB), bacteriovoria aumentada (BA) y control (TC), en el sistema experimental ubicado en La Presa del embalse del Neusa.  $\beta$ -Proteobacteria ( $\beta$ ),  $\gamma$ -Proteobacteria ( $\gamma$ ),  $\alpha$ -Proteobacteria ( $\alpha$ ), cluster *Cytophaga – Flavobacterium* (CF), control negativo (NON).

Tratamiento	Tiempo (horas)	Abundancia Relativa para La Presa (%)						
		Bacteria	Archaea	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	CF	NON
SB	0	35,52	12,72	21,22	14,72	6,57	12,68	3,65
	48	35,71	12,38	20,80	25,55	6,32	11,20	0,66
	94	54,22	14,49	44,19	38,79	19,26	16,35	3,22
BA	0	23,29	8,37	29,97	17,26	8,94	12,46	0,00
	48	42,47	10,16	32,98	29,22	8,66	13,45	1,66
	94	63,56	8,07	46,21	33,71	12,59	22,78	2,51
TC	0	83,72	2,69	16,62	14,99	6,43	12,04	1,25
	48	50,30	0,00	16,19	24,82	6,42	11,31	0,32
	94	84,44	1,06	41,98	27,51	24,49	10,76	1,53
PROMEDIO		52,58	7,77	30,02	25,18	11,08	13,67	1,64
DVS		21,36	5,34	11,98	8,34	6,58	3,80	1,27

Respecto a los porcentajes de hibridación para el dominio Bacteria, en el sistema localizado en La Presa, los mayores valores también se hallaron al final del experimento, sin embargo, en este sistema se encontraron unas mayores fluctuaciones en las bolsas control (tabla 4) con disminución a las 48 y aumento a las 94 horas.

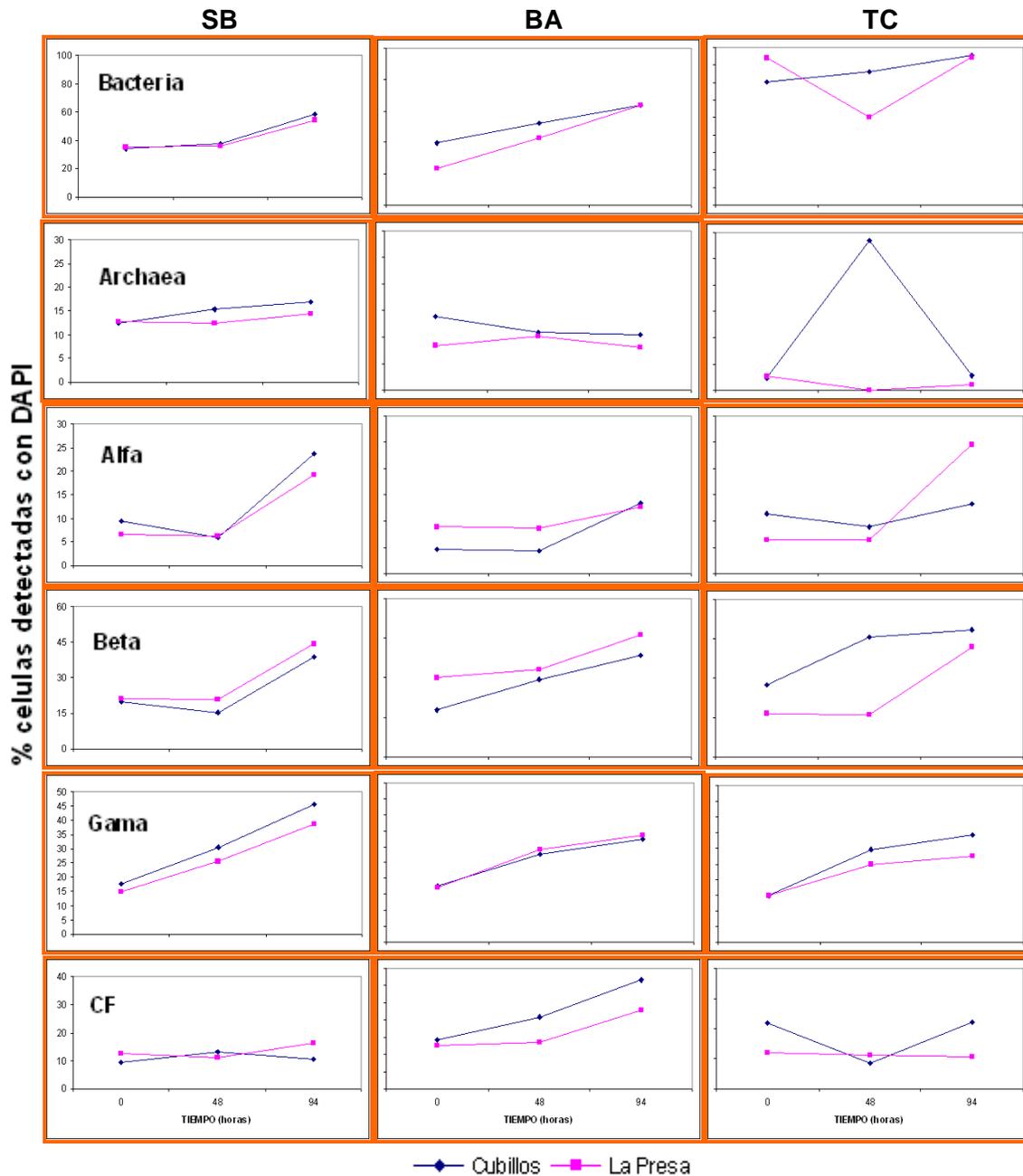
En el caso de los resultados encontrados cuando se usó la sonda del Dominio Archaea se encontraron las menores abundancias relativas en los dos sistemas

experimentales de 12,62% ( $\pm 7,80$ ) para la entrada del río Cubillos y de 7,77% ( $\pm 5,34$ ) para La Presa. Los valores mas altos se presentaron en el tratamiento sin bacteriovoria tanto para la entrada del río Cubillos como para La Presa (tablas 3 y 4).

Se encontró disminución de la abundancia de organismos de Archaea a las 94 horas en ambos sistemas (10,41% en Cubillos y 8,07% en La Presa). En las bolsas control se encontraron mayores variaciones sin un patrón definido ya que para la entrada del río Cubillos se registraron valores entre 2,40 y 28,41% y para La Presa entre 0 y 2,69% (figura 6). Para la entrada del río Cubillos el porcentaje de hibridación promedio con la sonda NON, que indica que tan efectiva es la hibridación, fue de 3,55% ( $\pm 2,28$ ) y para La Presa de 1,64% ( $\pm 1,27$ ). Estos valores están por debajo del valor establecido por Glockner *et al.* 1999 para sistemas meso-oligotróficos del 5%, indicando que el porcentaje de hibridación en este experimento fue bueno.

### ***$\alpha$ - Proteobacteria***

Para el linaje  $\alpha$  Proteobacteria se encontró una abundancia relativa promedio de 10,55% ( $\pm 5,97$ ) en La Presa y de 11,08% ( $\pm 6,58$ ) en el sistema en Cubillos, lo que equivaldría a  $1,94 \times 10^5$  y  $1,52 \times 10^5$  cel/mL, respectivamente). Las abundancias relativas mas bajas se hallaron en el tratamiento BA (6,32% en La Presa y 4,38% en la entrada del río Cubillos). Los mayores valores se registraron en el tratamiento SB (figura 6 y tabla 3) y en el tratamiento control (figura 6 y tabla 4).



**Figura 6.** Cambios en la composición filogenética de la comunidad del bacterioplancton en el embalse del Neusa, en un periodo de 94 horas en los tres tratamientos, sin bacteriovoria (SB), bacteriovoria aumentada (BA) y tratamiento control (TC), en los dos sistemas experimentales de la entrada río Cubillos y de La Presa.  $\alpha$ -Proteobacteria (Alfa),  $\beta$ -Proteobacteria (Beta),  $\gamma$ -Proteobacteria (Gama), cluster *Cytophaga-Flavobacterium* (CF).

### ***β – Proteobacteria***

Respecto a la abundancia relativa promedio para el grupo de  $\beta$  Proteobacteria se encontraron valores similares entre las dos sistemas experimentales, ligeramente mayor en Cubillos 31,22% ( $\pm 12,17$ ), en donde la abundancia relativa mas alta se halló en el control y a las 94 horas de incubación (48,43%) resultado similar se encontró en las bolsas incubadas en La Presa pero para el tratamiento BA (46,21%). Las abundancias relativas mas bajas se registraron a las 48 horas en el tratamiento SB Cubillos y en el control para La Presa con valores de 15,46% y 16,19% respectivamente (figura 6).

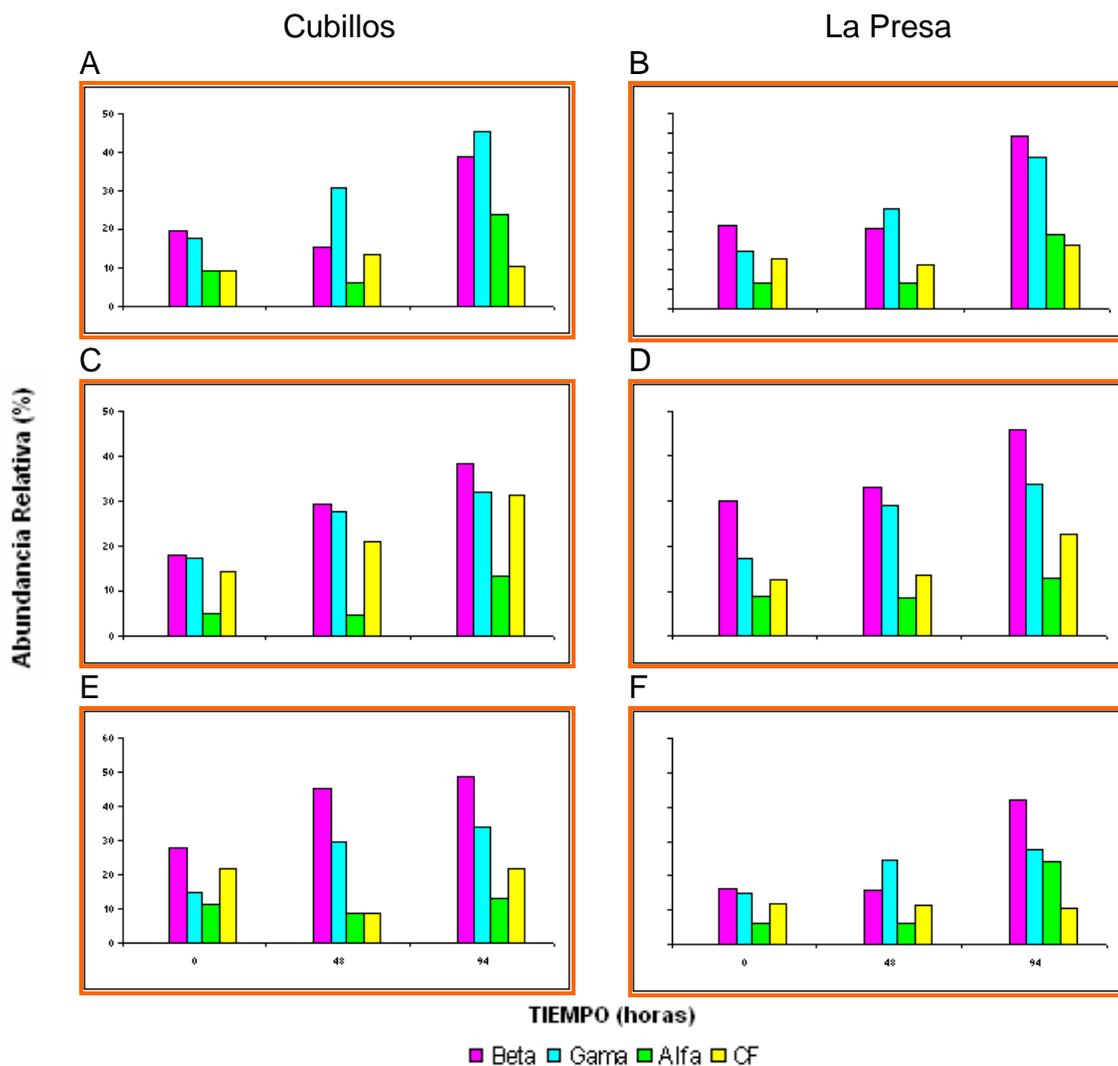
### ***γ - Proteobacteria***

En el caso de el grupo  $\gamma$  Proteobacteria se registraron abundancias relativas promedio de 27,82% ( $\pm 9,78$ ) para Cubillos y de 25,18% ( $\pm 8,34$ ) para La Presa, lo que equivale en células por mililitro a  $4,79 \times 10^5$  y  $3,41 \times 10^5$  respectivamente (tablas 3 y 4). La menor abundancia relativa en Cubillos se encontró en el control al inicio del experimento (0 horas) con 14,93% y en La Presa en el tratamiento SB con 14,72%. Así mismo la mayor abundancia relativa en ambos sitios de incubación fue en el tratamiento SB y a las 94 horas de incubación (en Cubillos de 45,76% y en La Presa de 38,79 %) (figura 6).

### ***Cluster Cytophaga-Flavobacterium***

En el sistema experimental ubicado en la entrada del río Cubillos se encontró la mayor abundancia promedio de organismos del cluster *Cytophaga – Flavobacterium* con 16,88% ( $\pm 7,71$ ) en comparación a los porcentajes

encontrados en La Presa de 13,67% ( $\pm 3,80$ ) estos valores equivalen a  $2,89 \times 10^5$  y  $1,80 \times 10^5$  cel/mL respectivamente (tablas 3 y 4). Los valores mas bajos se hallaron en ambos sitios en las bolsas control pero a las 48 horas en Cubillos (8,41%) y a las 94 horas en La Presa (10,76%) (figura 6).



**Figura 7.** Cambios en la estructura de la comunidad del bacterioplancton en el embalse del Neusa, en un periodo de 94 horas en los tres tratamientos, sin bacteriovoria (A y B), bacteriovoria aumentada (C y D) y tratamiento control (E y F), en los dos sistemas experimentales de la entrada río Cubillos y de La Presa.  $\alpha$ -Proteobacteria (Alfa),  $\beta$ -Proteobacteria (Beta),  $\gamma$ -Proteobacteria (Gama), cluster *Cytophaga-Flavobacterium* (CF).

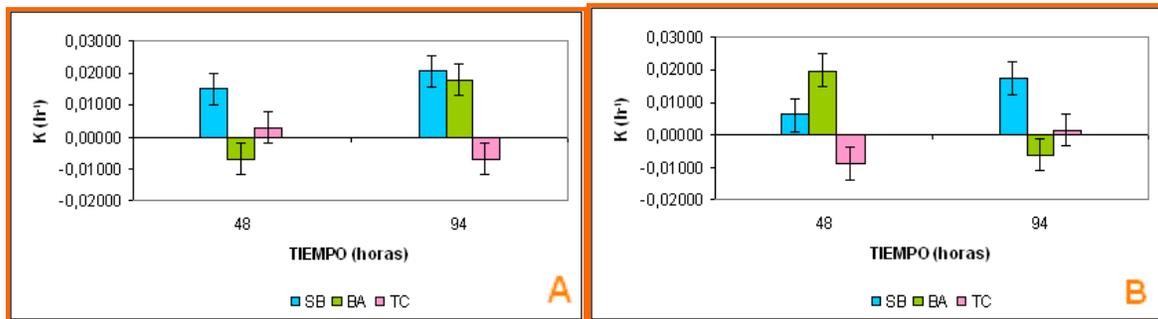
Se encontraron las mayores variaciones en la abundancia relativa de los organismos de Archaea y del linaje  $\alpha$  Proteobacteria (figura 7) en las bolsas control localizadas en La Presa con coeficientes de variación de 108,4% y 83,79%, respectivamente. En tanto que los organismos de Bacteria en el tratamiento control en el sistema experimental en Cubillos y el cluster *Cytophaga* – *Flavobacterium* para el mismo tratamiento en la incubación en La Presa, no mostraron una diferencia o variación significativa en relación a su abundancia, coeficientes de variación del 9,79% y 5,64%, respectivamente.

## **Tasas de crecimiento de las comunidades en estudio**

### ***Comunidad Procariota***

La tasa específica de crecimiento total procariota determinada en los sistemas experimentales fue de  $0,00528 \text{ h}^{-1}$  con un tiempo de generación de 131,29 horas (5,47 días) en la entrada del río Cubillos y de  $0,00712 \text{ h}^{-1}$  con un tiempo de generación de 97,34 horas (4,06 días) para el sistema de La Presa. Se encontró crecimiento en los tratamientos SB en ambos sistemas experimentales, la tasa específica de crecimiento total procariota ( $t_0-t_{94}$ ) fue de  $0,01787 \text{ h}^{-1}$  con un tiempo de generación de 38,79 horas (1,62 días) para Cubillos y de  $0,01163 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación de 59,60 horas (2,48 días) en La Presa (figura 8). Para el tratamiento BA se evidenció una disminución en el crecimiento en los dos sistemas experimentales, presentando una tasa específica de crecimiento negativa para el intervalo de tiempo entre las 0 a las 48 horas solo se observó crecimiento durante el intervalo 48 a 94 horas con un valor de  $0,01788 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación de 131,29 horas (5,47 días) el crecimiento se evidencio en el intervalo

de las 0 a las 48 horas con un valor de  $0,01994 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación de 97,34 horas (4,06 días) (figura 8).



**Figura 8.** Variación de las tasas de crecimiento procariota en el embalse del Neusa, en los tres tratamientos, sin bacteriovoria (SB), bacteriovoria aumentada (BA) y tratamiento control (TC) en los dos sistemas experimentales entrada río Cubillos (A) y La Presa (B).

En los controles se encontraron tasas específicas de crecimiento total ( $t_0-t_{94}$ ) negativa en los dos sistemas experimentales, sin embargo cuando se estudian las tasas de crecimiento en intervalos de tiempo se evidencia un crecimiento entre las 0 y 48 horas para la entrada del río Cubillos ( $0,00297 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 233,54 horas equivalente a 9,7 días) y para el sistema de La Presa en el intervalo de las 48 a las 94 horas ( $0,00133 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 522,20 horas equivalentes a 21,7 días (figura 8).

### ***Dominios Bacteria y Archaea***

Cuando se analizan las tasas de crecimiento de los miembros del Dominio Bacteria (figura 9-E) en las bolsas control, se encuentran tasas específicas de crecimiento total ( $t_0-t_{94}$ ) mas bajas para los dos sistemas experimentales (entrada del río Cubillos de  $0,00205 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 338,66 horas, 14,11 días, y La Presa de  $0,00009 \text{ h}^{-1}$  con un tiempo de generación de 7639,32 horas,

aproximadamente 318,31 días) (figura 9-F). En el sistema experimental ubicado en la entrada del río Cubillos se encontró un descenso en la tasa específica de crecimiento para el intervalo de tiempo comprendido entre las 48 - 94 horas (figura 9-E), en La Presa no se presentó disminución en la tasa de crecimiento (figura 9-F).

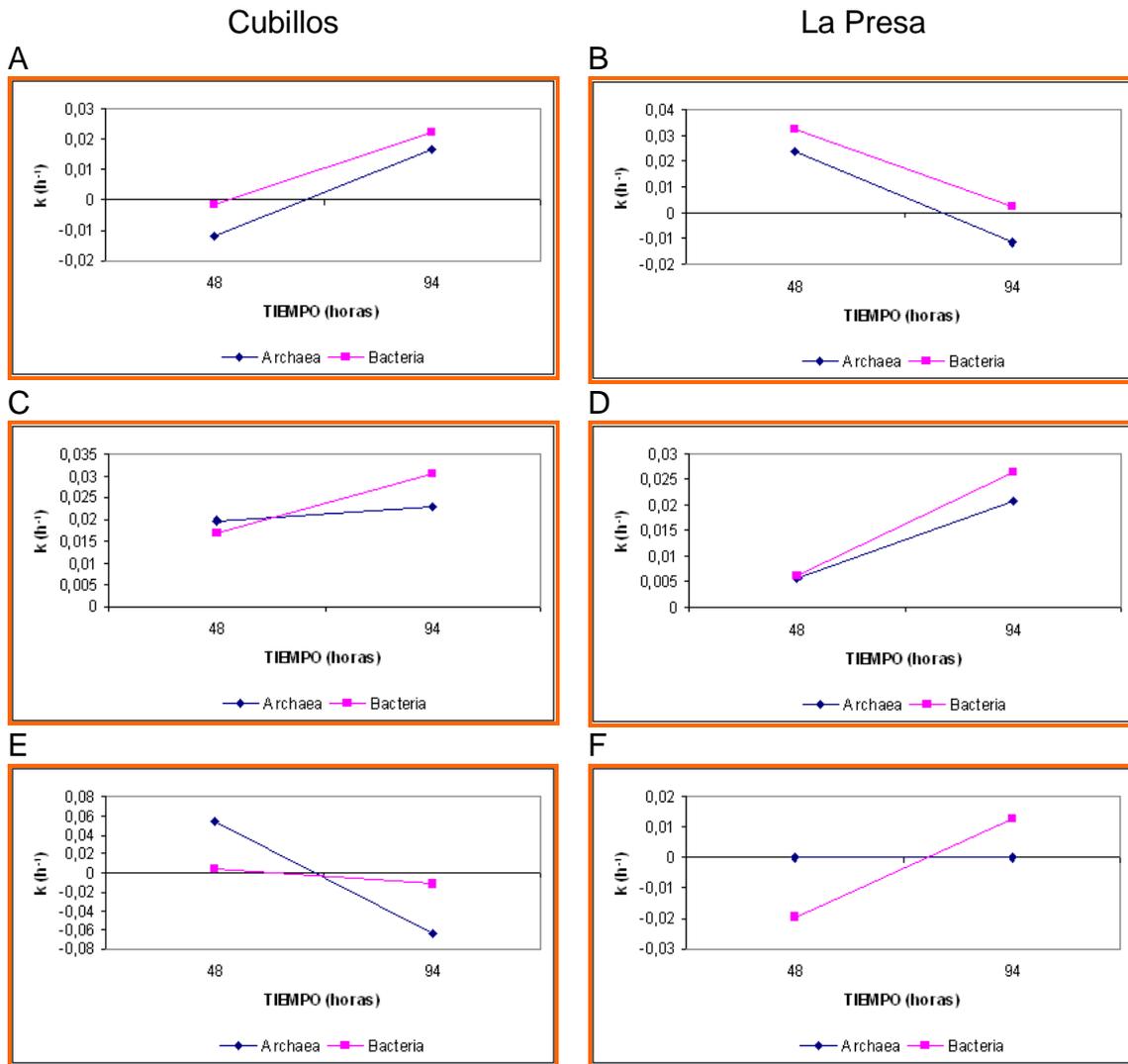
La mayor tasa específica de crecimiento total ( $t_0 - t_{94}$ ) para el Dominio Bacteria en el sistema de La Presa se presentó en el tratamiento BA con  $0,01068 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 64,89 horas correspondientes a 2,7 días (figura 9-B); para Cubillos se encontró en el tratamiento SB con  $0,00569 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 121,86 horas equivalentes a 5,08 días (figura 9-C).

En el caso de organismos de Archaea se encontró en el sistema experimental ubicado en La Presa y en las bolsas control una tasa de crecimiento total negativa ( $t_0 - t_{94}$ ); en tanto que en Cubillos fue de  $0,00163 \text{ h}^{-1}$  con tiempo de generación de 426 horas (17,75 días), comparativamente con todas las poblaciones estudiadas, este fue el menor valor encontrado en el sistema incubado en este lugar. Para el sistema de La Presa no se registró crecimiento entre los intervalos 0 - 48 horas y 48 - 94 horas en este mismo tratamiento (figura 9-F). En el tratamiento BA las tasas de crecimiento fueron negativas en ambos sitios de incubación (figura 9-B).

### ***$\alpha$ - Proteobacteria***

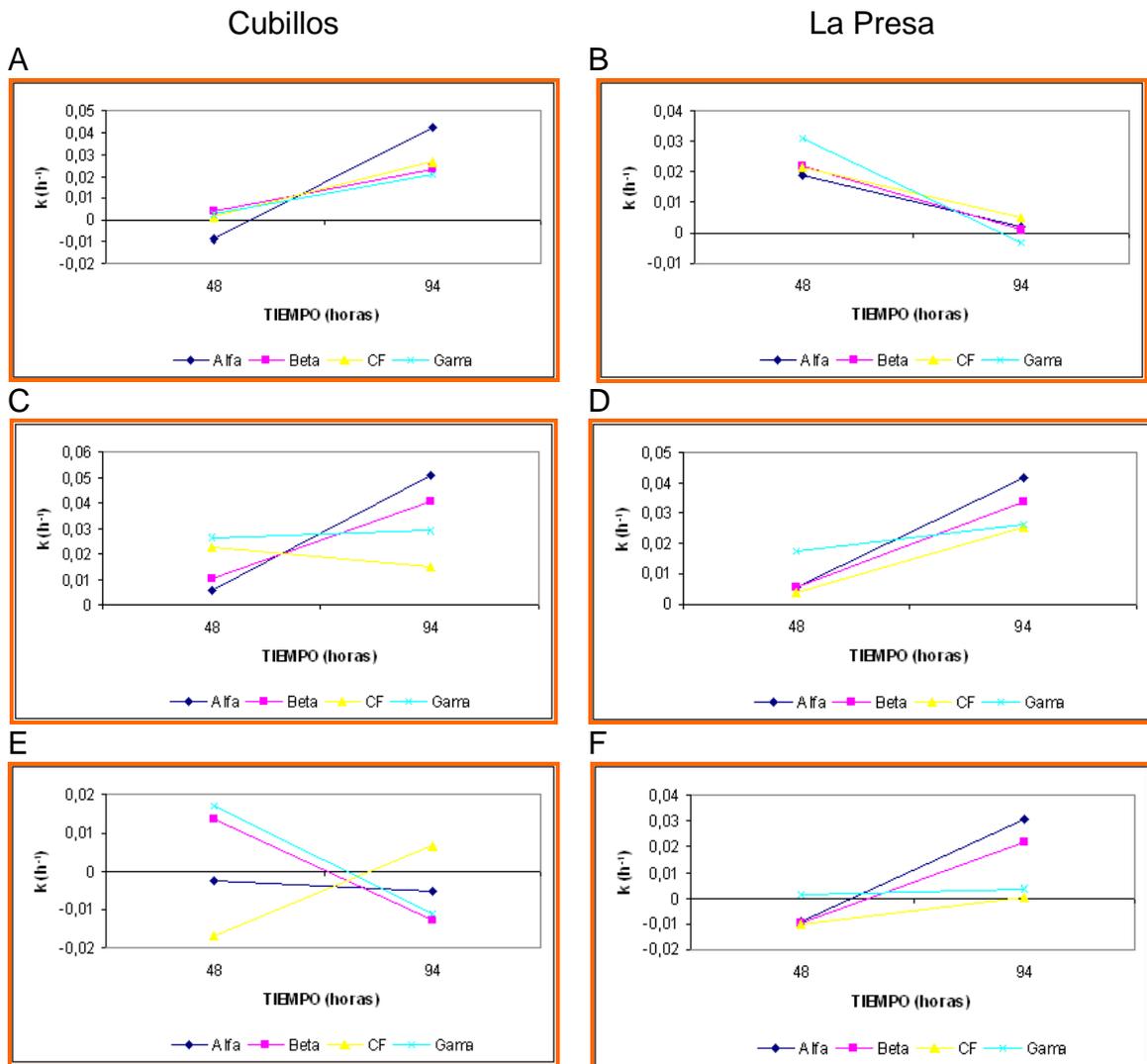
La mayor tasa de crecimiento desde  $t_0$  a  $t_{94}$  de  $\alpha$  Proteobacteria se encontró para el sistema experimental ubicado en Cubillos en el tratamiento BA,  $0,01110 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 62,44 horas (2,60 días) y para el sistema en La Presa en el tratamiento SB de  $0,01144 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 60,58 horas equivalentes a 2,52 días. Respecto al comportamiento se encontró en la entrada

del río Cubillos una disminución entre las 48 - 94 horas de incubación en los controles (figura 10-E) comparativamente en La Presa el único tratamiento que mostró disminución en el crecimiento y aún tasas de crecimiento negativas fue en BA (figura 10-B).



**Figura 9.** Variación de las tasas específicas de crecimiento ( $h^{-1}$ ) de organismos de Bacteria y Archaea en los tres tratamientos experimentales, bacteriovoria aumentada (A y B), sin bacteriovoria (C y D) y tratamiento control (E y F) ubicados en la entrada del río Cubillos y La Presa en el embalse del Neusa.

Analizando las tasas de crecimiento de  $\alpha$  Proteobacteria en el sistema experimental localizado a la entrada del río Cubillos se encontraron las mayores tasas de crecimiento en el tratamiento SB para los intervalos 0 - 48 y 48 - 94 horas de incubación, con  $0,00547 \text{ h}^{-1}$  y  $0,05070 \text{ h}^{-1}$  respectivamente (figura 10-C).



**Figura 10.** Variación de las tasas específicas de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ) para  $\alpha$ -Proteobacteria (Alfa),  $\beta$ -Proteobacteria (Beta),  $\gamma$ -Proteobacteria (Gama) y cluster *Cytophaga-Flavobacterium* (CF) en los tres tratamientos experimentales, bacteriovoria aumentada (A y B), sin bacteriovoria (C y D) y tratamiento control (E y F) ubicados en la entrada del río Cubillos y La Presa en el embalse del Neusa.

En el sistema ubicado en La Presa se encontraron las mayores tasas de crecimiento en el tratamiento SB para el intervalo entre 48 y 94 horas ( $0,04158 \text{ h}^{-1}$ ) (figura 10-D).

### ***$\beta$ – Proteobacteria***

La mayor tasa específica de crecimiento total ( $t_0-t_{94}$ ) de  $\beta$  Proteobacteria se encontró en el tratamiento BA en el sistema en Cubillos ( $0,00818 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación 84,75 horas, 3,53 días) en tanto que para el sistema incubado en La Presa fue en el control con ( $0,00986 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 70,31 horas, 2,93 días).

En la figura 10 se pueden apreciar las variaciones en las tasas de crecimiento de este linaje de Bacteria en los sistemas experimentales ubicados en el embalse, por ejemplo, en el intervalo de incubación desde el inicio hasta las 48 horas se encontraron las mayores tasas de crecimiento en las bolsas sin ningún tratamiento (control) en Cubillos (figura 10-E); en tanto que en La Presa fueron en el tratamiento BA ( $0,01343 \text{ h}^{-1}$  y  $0,02193 \text{ h}^{-1}$  respectivamente) (figura 10-B). En contraposición en el tratamiento SB se encontraron las mayores tasas de crecimiento entre 48-94 horas, de  $0,04059 \text{ h}^{-1}$  en Cubillos (figura 9-C) y  $0,03374 \text{ h}^{-1}$  en La Presa (figura 10-D).

### ***$\gamma$ - Proteobacteria***

La mayor tasa específica de crecimiento total de  $\gamma$  Proteobacteria se registró en el tratamiento SB en ambos sitios de incubación, de  $0,01006 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de

generación de 68,88 horas (2,87 días) en la entrada del río Cubillos y de  $0,01031 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 67,26 horas (2,80 días) en La Presa.

Las mayores tasas de crecimiento se detectaron en el intervalo 0 - 48 horas en el tratamiento SB en Cubillos ( $0,02648 \text{ h}^{-1}$ ) (figura 10-C) y en el tratamiento BA en La Presa ( $0,03090 \text{ h}^{-1}$ ) (figura 10-B). En el tratamiento SB también se encontraron las mas altas tasas de crecimiento en el intervalo de las 48 - 94 horas, de  $0,02944 \text{ h}^{-1}$  para Cubillos (figura 10-A) y  $0,02643 \text{ h}^{-1}$  para La Presa (figura 10-B).

### **Cluster *Cytophaga-Flavobacterium***

Respecto a las tasas de crecimiento totales del cluster *Cytophaga-Flavobacterium* se encontró la mayor tasa específica en el tratamiento BA con  $0,00849 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 81,68 horas (3,40 días) para los sistemas incubados en Cubillos y de  $0,00642 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación de 107,97 horas (94,50 días) en La Presa.

Las tasas de crecimiento mas altas para el intervalo de incubación de 0 - 48 horas se encontraron en el tratamiento SB para Cubillos y en el tratamiento BA en La Presa ( $0,02261 \text{ h}^{-1}$  y  $0,02154 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente). Los tratamientos BA en Cubillos y SB en La Presa mostraron las mayores tasas de crecimiento en el intervalo 48 - 94 horas de incubación con  $0,02694 \text{ h}^{-1}$  y  $0,02558 \text{ h}^{-1}$  respectivamente (figuras 10-A y 10-D).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### **Densidad de la comunidad procariota, de los dominios Bacteria y Archaea y los grupos de Bacteria $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ - Proteobacteria y el cluster *Cytophaga* - *Flavobacterium***

Con este diseño experimental se valoraron los efectos de la bacteriovoria sobre la composición de la comunidad procariota total, para ello el agua del embalse del Neusa completa y fraccionada, se almacenó en bolsas de diálisis de manera tal que hubiera intercambio de nutrientes pero no de microorganismos, los sistemas experimentales se mantuvieron en las condiciones naturales de nutrientes, gases, intensidad lumínica y temperatura en dos sitios del embalse, se buscó así una aproximación a las condiciones de cada uno de los sitios elegidos para la incubación *in situ*. Los resultados obtenidos en este trabajo de grado son elementos de análisis para la comprensión del efecto del diseño experimental sobre la comunidad procariota pero no una interpretación ecológica de la realidad del embalse del Neusa.

Como se señaló en los resultados, se encontraron pocas variaciones en la abundancia en el tiempo y en el espacio, estos resultados ya se han reportado para el mismo embalse (Canosa & Pinilla 1999, 2001; Canosa 2002; Canosa & Niño 2006, 2007; Canosa *et al.* 2008) y en otras latitudes (Pace & Cole 1994); es posible que debido a esto no se presente una variación significativa de la abundancia procariota dentro del tratamiento control entre los dos sitios de incubación. El recuento de células totales de la comunidad procariota se encontró dentro de los rangos registrados previamente para el embalse (Canosa & Pinilla 1999). Aunque las diferencias en las abundancias no son notorias se encontraron en los sistemas incubados en Cubillos mayor variación en los resultados y en las

densidades de procariotas lo que quizás refleje el efecto de la mayor entrada de nutrientes y el aporte de las macrófitas litorales que son abundantes en este sitio en el embalse. Adicionalmente en los tratamientos SB y BA el número de bacterias asciende en el tiempo en tanto que en el control las abundancias disminuyen desde las 48 horas, las tendencias que presentan los resultados señalan que la bacteriovoria juega un papel importante en el control de las poblaciones de bacterias en el embalse (figura 5A) pero que otros factores reguladores independientes de disponibilidad del sustrato como el control bottom up, pueden ser importantes en el funcionamiento del bucle microbiano en el embalse.

Más importantes y predecibles fueron los cambios que se presentaron en los resultados hallados en la Presa, y muestran el efecto del control top down, si se mantienen constantes los nutrientes y se quitan los bacterívoros la comunidad aumenta en tamaño, al tiempo que si se retiran los predadores del plancton heterótrofo, las densidades disminuyen. Una deducción de las tendencias de estos resultados es que en los sitios menos impactados del embalse la bacteriovoria es un importante modulador del bucle microbiano situación que cambia cuando se estudia el embalse en un sitio impactado, esta información corrobora el efecto de la contaminación sobre las comunidades microbianas acuáticas (figura 5B).

No hay que desconocer que la disminución de la abundancia de procariotas en los tratamientos incubados en el embalse pueda deberse a lisis viral; ya que la densidad viral puede inducir tendencias en la dinámica de crecimiento de la comunidad procariota en la cual se encuentren (Weinbauer *et al.* 2003). Se ha encontrado en sistemas templados que la disminución en la abundancia de la comunidad procariota esta relacionada con el incremento de la lisis viral, las mayores abundancias virales registradas para el embalse se presentan en el sector de la Presa con valores máximos de  $2,0 \times 10^{-7}$  pvs.mL<sup>-1</sup> (Canosa *et al.* 2008), este valor obtenido durante la realización de la investigación en la que se

enmarcó este trabajo de grado concuerda con el pico mínimo de la abundancia para este sector.

Los resultados encontrados muestran que los miembros del Dominio Bacteria constituyen por lo menos el 55% del total de células microbianas, este porcentaje de células hibridadas con la sonda EUB338, brinda confianza en la técnica FISH, por lo que se utiliza de manera eficaz como herramienta para estudiar los atributos de la comunidad microbiana en los cuerpos de agua (Manz *et al.* 1992; Wallner *et al.* 1993; Glockner *et al.* 1999).

La baja representatividad de miembros del Dominio Archaea encontrados en ambos sistemas experimentales parecen confirmar los hallazgos de Jürgens *et al.* (2000), los miembros de este Dominio están asociados a actividades metanogénicas en zonas anóxicas en los sistemas acuáticos tropicales por lo que muestran una baja dominancia en el epilimnion. Además se acepta que en los ecosistemas acuáticos, muchas células del plancton procariota permanecen inactivas, esta baja actividad fisiología es acompañada por la presencia de pocos ribosomas, situación que podría dificultar la detección de señales (sondas marcadas) que puedan llegar a emitir dichas células en un procedimiento como el utilizado en FISH, lo que consecuentemente incide en baja detección y consecuente pérdida en abundancia (Glockner *et al.* 1999; Amann *et al.* 1995). Parece importante señalar que las sondas utilizadas en este trabajo, dirigidas contra el RNA ribosomal, pueden mostrar una pobreza en las señales, ya que es posible que se pierdan datos de presencia de células inactivas con baja en cantidad de ribosomas, esta situación muestra la necesidad de trabajar con una técnica que permita la amplificación de la señal como la CARD FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In Situ* Hybridization, Ferrari *et al.* 2006).

Glockner *et al.* (1999) proponen que el linaje de las Proteobacteria, principalmente los grupos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y el cluster *Cytophaga – Flavobacterium* del Dominio Bacteria, son los grupos más exitosos en el planeta y representan una gran parte de la diversidad microbiana en los ambientes acuáticos; se sabe que las  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacteria coexisten en ambientes costeros, siendo las primeras muy abundantes en ambientes de agua dulce y pudiendo llegar a desplazar al grupo de las  $\alpha$  Proteobacteria, así mismo el cluster *Cytophaga – Flavobacterium* es característico de ambientes en donde las  $\alpha$  Proteobacteria no se desarrollan o su abundancia es relativamente pequeña.

Las tendencias de los resultados a lo largo de este ensayo mostraron que el grupo  $\beta$  Proteobacteria fue el más representativo dentro del Dominio Bacteria para los dos sistemas experimentales y en los tres tratamientos; los estudios de Canosa & Niño (2006) en el mismo embalse muestran una importante dinámica espacial y temporal, lo que sugiere que estas poblaciones son un componente clave para el paso de materia de un nivel trófico a otro en este sistema. Simek *et al.* (2001), al evaluar bajo condiciones de incubación similares a las utilizadas en este estudio la participación de diferentes grupos de bacterias en la estructura de la comunidad procariota encontraron que las mayores abundancias eran también de las  $\beta$  Proteobacteria, así mismo destacaron la gran participación de este grupo en la dinámica de la comunidad procariota y lo proponen como un punto clave en los procesos de producción de biomasa bacteriana dentro de la columna de agua. Los resultados muestran similitudes importantes en estudios localizados en regiones geográficas diferentes encontrando que la estructura de la comunidad procariota en los trópicos y las zonas templadas podría ser similar, futuros estudios de diversidad con métodos moleculares más afinados permitirán comprobar esta afirmación.

Se encontró una mayor abundancia y representatividad del linaje  $\gamma$  Proteobacteria que la de *Cytophaga* – *Flavobacterium* y  $\alpha$  Proteobacteria en los sistemas experimentales incubados en la entrada del río Cubillos; los resultados pueden mostrar la marcada alteración antropogénica en este sitio del embalse, con mayor cantidad de nutrientes lo que posiblemente favorece el desarrollo de miembros de este grupo. Para mencionar un caso, los miembros de la familia Enterobacteriaceae, ampliamente relacionados con el sistema gastrointestinal de humanos y vertebrados homeotermos y alóctonos al ecosistema acuático son miembros de este linaje (Holt *et al.* 1994; Madigan & Martinko 2005).

### **Tasas de crecimiento de las comunidades en estudio**

De acuerdo a la tendencia que presentaron los resultados obtenidos en el estudio se puede proponer que la bacteriovoria es un proceso importante en el control de la abundancia y estructura de la comunidad procariota en el embalse del Neusa. Para la mayoría de los linajes estudiados en los sistemas experimentales se evidenció un efecto significativo sobre las tasas de crecimiento poblacional y el incremento de la densidad de la comunidad bacteriana en el tratamiento SB, con valores que superaron a los registrados para el control (figuras 9 y 10).

Los resultados no se ajustaron a la hipótesis inicial de trabajo según la cual, la mayor parte del control de la comunidad procariota se ejercía por bacteriovoria por HNF. Se esperaba disminución en las tasas de crecimiento de cada grupo estudiado en el tratamiento BA con respecto al control, puesto que al retirar la fracción del plancton superior a 5  $\mu\text{m}$  habría un aumento en la bacteriovoria (se retiran los predadores de HNF). Los datos mostraron que el incremento en los valores de las tasas de crecimiento para BA fue mayor a los del control y relativamente iguales a las de SB para Proteobacteria y el cluster *Cytophaga* –

*Flavobacterium* en el sistema incubado en Cubillos entre las 48 y 94 horas (figura 10). Los resultados sugieren que una buena parte de la bacteriovoria en este sector del embalse puede deberse a grupos diferentes a los HNF, que se encuentran por encima de los 5  $\mu\text{m}$ . En cambio para este mismo intervalo de tiempo de incubación en el sistema experimental ubicado en La Presa se comprobó el efecto de la bacteriovoria sobre las tasas de crecimiento de los diferentes grupos, ya que se encontró disminución en el tratamiento BA en relación a los datos obtenidos en SB y control (figura 10).

Es posible sugerir una estrategia de supervivencia frente a la presión por pastoreo por los resultados encontrados en ambos sistemas experimentales en los que  $\alpha$  Proteobacteria presentó mayores tasas de crecimiento y menores tiempos de generación entre las 48 a las 94 horas de incubación (figura 10). Según Pernthaler *et al.* 1997 el incremento en la tasa de crecimiento puede ser el resultado de la presión por pastoreo a la cual se enfrentan los diferentes grupos de bacterias. Esta afirmación requerirá futuros estudios de comprobación. Así mismo los datos señalan que la bacteriovoria como proceso de control de la densidad y biomasa del bacterioplancton en el embalse del Neusa equivale a un alto porcentaje de la producción bacteriana; aunque podría no ser el único proceso que puede competir con la producción total de biomasa. Con este diseño experimental se encontró que el pastoreo por parte de heterótrofos del nano y microplancton es el responsable de por lo menos la mitad de la mortalidad bacteriana.

Finalmente los datos obtenidos aparentemente indican que la bacteriovoria no es un proceso importante en la variación de la composición de grupos del bacterioplancton y la diversidad bacteriana en el embalse. Los valores obtenidos con la técnica FISH aunque muestran cambios en la abundancia de algunos de los grupos estudiados en los tratamientos SB y BA respecto al control después de las

48 horas, los cambios no son constantes hasta las 94 horas (figura 7). Los largos tiempos de generación encontrados bajo las condiciones del estudio en los dos sitios del embalse sugieren que se deben realizar incubaciones más largas en este tipo de diseño experimental. Adicionalmente con el auge de técnicas moleculares para el estudio de la diversidad microbiana es necesario acopiar información más específica acerca de los linajes más activos en el embalse para así elegir sondas que brinden una información que permita entender mejor el funcionamiento del bucle microbiano en el embalse y así obtener una mejor aproximación a los ecosistemas acuáticos tropicales.

## CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en este estudio muestran que la técnica FISH puede brindar utilidad para valorar los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en respuesta a procesos de bacteriovoria. Se pudo evidenciar que en sistemas incubados en dos zonas contrastantes en el embalse del Neusa, las tendencias en las tasas de crecimiento de organismos de los dominios Bacteria y Archaea fueron ligeramente mayores cuando se estudian experimentalmente retirando el nanoplancton bacteriovoro que cuando se aumentó la bacteriovoria (al retirar la fracción que pastorea a esta comunidad).

Al comparar las variaciones de los datos obtenidos en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa, se pudo evidenciar que las mayores diferencias en la magnitud de la bacteriovoria sobre las tasas de crecimiento se presentaron en el sistema experimental incubado en la Presa, sin embargo, este proceso ejerce un mayor control sobre la biomasa bacteriana que sobre la composición de la comunidad, permitiendo de este modo que se observaran todos los grupos evaluados durante las 94 horas de incubación en los dos sitios de muestreo dentro del embalse.

El pastoreo por parte de protozoos fue responsable de más de la mitad de la mortalidad bacteriana, en los sistemas experimentales incubados en el embalse del Neusa. Cabe señalar, que la tendencia de los datos también indica que este proceso no sería el único que puede afectar la producción bacteriana en el embalse.

## RECOMENDACIONES

Los resultados mostraron tiempos de generación muy largos de las poblaciones estudiadas, por lo que se recomienda en próximos diseños experimentales utilizar mayores intervalos de incubación para estudios *in situ* de las diferentes poblaciones que componen la comunidad procariota del embalse.

Utilizar procedimientos moleculares más finos para valorar la diversidad microbológica en el embalse. De esta manera se podrán estudiar los fenómenos de control del bacterioplancton de una manera más específica.

Continuar indagando acerca de factores diferentes a la disponibilidad del sustrato como importantes en el control de las poblaciones procariotas. Todos estos datos permitirán en el futuro un mejor entendimiento del ecosistema de una manera integral.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amann R, Binder B, Olson R, Chisholm S, Devereux R & Stahl D.** 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*. 172: 762 – 770.
- Amann R, Ludwig W & Schleifer K H.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*. 59: 143 – 169.
- Amann R, Glockner F & Neef A.** 1997. Modern methods in subsurface microbiology: *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *Microbiology Reviews*. 20: 191 – 200.
- Ausubel F, Brent R, Moore D & Kingston R.** 2002. Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. Fifth Edition. Wiley – John & Sons Incorporated. USA. 1512 p.
- Azam F, Fenchel J, Field J, Gray J, Meyer-Reil L & Thingstad F.** 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*. 10: 257 – 263.
- Boenigk J & Novarino G.** 2004. Effect of suspended clay on the feeding and growth of bacterivorous flagellates and ciliates. *Aquatic Microbial Ecology*. 34: 181 – 192.
- Canosa A & Pinilla G.** 1999. Bacteriological eutrophication indicators in four Colombian water bodies. *Lakes and Reservoir: Research and Management*. 4: 23 – 27.
- Canosa A & Pinilla G.** 2001. Total bacterial populations in three lentic waterbodies of the colombian Andes using the epifluorescent technique. *Lakes & Reservoirs Research and Management*. 6: 169 – 174.
- Canosa A.** 2002. Distribución de virus y bacteriofagos y su relación con las bacterias y los coliformes en tres cuerpos de agua lénticos de la región central de Colombia. Informe Final Fundación para la Promoción de la Investigación y Tecnología. Banco de la República (mecanografiado).

- Canosa A & Niño J.** 2006. Estructura y variación espacio-temporal de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa, un ecosistema acuático alto andino. Informe Final Proyecto Conciencias, UJTL (mecanografiado).
- Canosa A & Niño J.** 2007. Evaluación experimental del efecto de la bacteriovoria sobre la productividad y estructura de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa. Anteproyecto. Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología. Banco de la República y la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Canosa A, Niño J, Torres I & Morales D.** 2008. Evaluación experimental del efecto de la bacteriovoria sobre la productividad y estructura de la comunidad bacteriana en el embalse del Neusa. Informe Final. Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología. Banco de la República y la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- CAR – Corporación Autónoma Regional.** 1968. Mapificación, inventario y datos forestales del embalse de Neusa. Facultad de Ingeniería Forestal. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá.
- Cole J, Findlay S & Pace M.** 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series*. 43: 1 – 10.
- Ferrari B, Tujula N, Stoner K & Kjelleberg S.** 2006. Catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization allows for enrichment-independent detection of microcolony-forming soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1): 918 – 922.
- Ford W.** 2000. Nuevo árbol de la vida. *Investigación y Ciencia*. 4: 25 – 32.
- Glockner F, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A & Amann R.** 2000. Comparative 16S rRNA analysis of Lakes Bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic cluster including an abundant group of Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 5053 – 5065.
- Glockner F, Fuchs B & Amann R.** 1999. Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3721 – 3720.
- González J.** 1999. Bacterivory rate estimates and fraction of active bacterivores in natural protist assemblages from aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1463 – 1469.

- Herndl E, Kaltenböck E & Müller N.** 1993. Dialysis bag incubation as a non radio labeling technique to estimate bacterioplankton production *in situ*, 553 – 556 pp. In: Kemp P, Sherr E, Sherr B & Cole J (Eds.). Handbook of Methods Aquatic Microbial Ecology. Lewis Publishers. USA. 752 p.
- Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J & Williams S.** (Editors). 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Williams & Wilkins. USA. 787 p.
- Jezbera J, Hornák K & Simek K.** 2005. Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by jeans of fluorescence *in situ* hybridization. Microbial Ecology. 52: 351 – 353.
- Jürgens G, Glöckner F, Amann R, Saano A, Montonen L, Likolammi M & Münster U.** 2000. Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent *in situ* hybridization. Microbiology Ecology. 34: 45 – 56.
- Kisand V & Noges T.** 2004. Abiotic and biotic factors regulating dynamics of bacterioplankton in a large shallow lake. Microbial Ecology. 50: 51 – 62.
- Knoll S, Zwislwe W & Simon M.** 2001. Bacterial colonization of early stages of limnetic diatom microaggregates. Aquatic Microbial Ecology. 25: 141-150.
- Koch A.** 1996. What size should a bacterium be? A question of scale. Annual Reviews of Microbiology. 50: 317 – 348.
- Luque J & Herráez A.** 2001. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Ediciones Harcourt S.A. España. 492 p.
- MacArthur V.** 2006. Microbial Ecology: An Evolutionary Approach. University of Georgia. Academic Press. 514 pp.
- Madigan T & Martinko J.** 2005. Brock, Biología de los Microorganismos. 11 Edición. Benjamín Cummings Publisher Company. Estados Unidos. 1088 p.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M & Schleifer K-H.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. Systematic Applied Microbiology. 15: 593 – 600.
- Moter A & Gobel U.** 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. Journal of Microbiology Methods. 41: 85 – 112.

- Pace M & Cole J.** 1994. Comparative and experimental approaches top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microbial Ecology*. 28: 181 – 193.
- Pernthaler J.** 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 537 – 546.
- Pernthaler J & Amann R.** 2005. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: Focus on populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69: 440-461.
- Pernthaler J, Poch P, Simek K, Vrba J, Amann R & Psenner R.** 1997. Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(2): 596 – 601.
- Pomeroy M.** 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*. 24: 499 – 504.
- Ruppert B & Barnes R.** 1996. *Zoología de los Invertebrados*. Sexta Edición. McGraw Hill Interamericana. México. 1114 p.
- Sanders R, Caron D & 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.
- Sherr E & Sherr B.** 2002. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 293 – 308.
- Sherr E, Sherr B & 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, Sherr E & Betman T.** 1983. Grazing, growth and ammonium excretion rates of heterotrophic micro flagellate fed with four species of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 1196 – 1201.
- Simek K, Pernthaler J, Weinbauer M, Hornák K, Dolan J & Redoma J.** 2001. Changes in bacterial community composition, dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a meso-eutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1723 – 1733.

- Simek K, Hartman P & Kojecka P.** 1999. Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in eutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography*. 44(7): 1634 – 1644.
- Simek K & Chrzanowski T.** 1992. Direct evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3715 – 3720
- Strom S.** 2000. Bacterivory: interactions between bacteria and their grazers. 351 – 386 pp. In: Kirchman, D. (Edit). *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley - John & Sons Incorporated. USA.
- Vaqué D, Calderón J, Guixa N & Pedrós-Alió C.** 2002. Spatial distribution of microbial biomass and activity (bacteriovory and bacterial production) in the northern Weddel Sea during the austral summer (January 1994). *Aquatic Microbial Ecology*. 29: 107 – 121.
- Wallner G, Amann R & Beisker W.** 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*. 14: 136 – 143.
- Weinbauer M, Christaki U, Nedoma J & Simek K.** 2003. Comparing the effects of resource enrichment and grazing on viral production in a meso-eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*. 31: 137 – 144.
- Woese C, Kandler O & Wheelis M.** 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87: 4576 – 4579.
- Woese C & Fox G.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(11): 5088 – 5090.

# ANEXOS

## Anexo 1

Reactivos para preparar las soluciones buffer de hibridación y de lavado para concentraciones de formamida de 20 y 35%.

En la tabla 1 se muestran los componentes de las soluciones buffer de hibridación y de lavado para cada una de las sondas utilizadas en el procedimiento FISH.

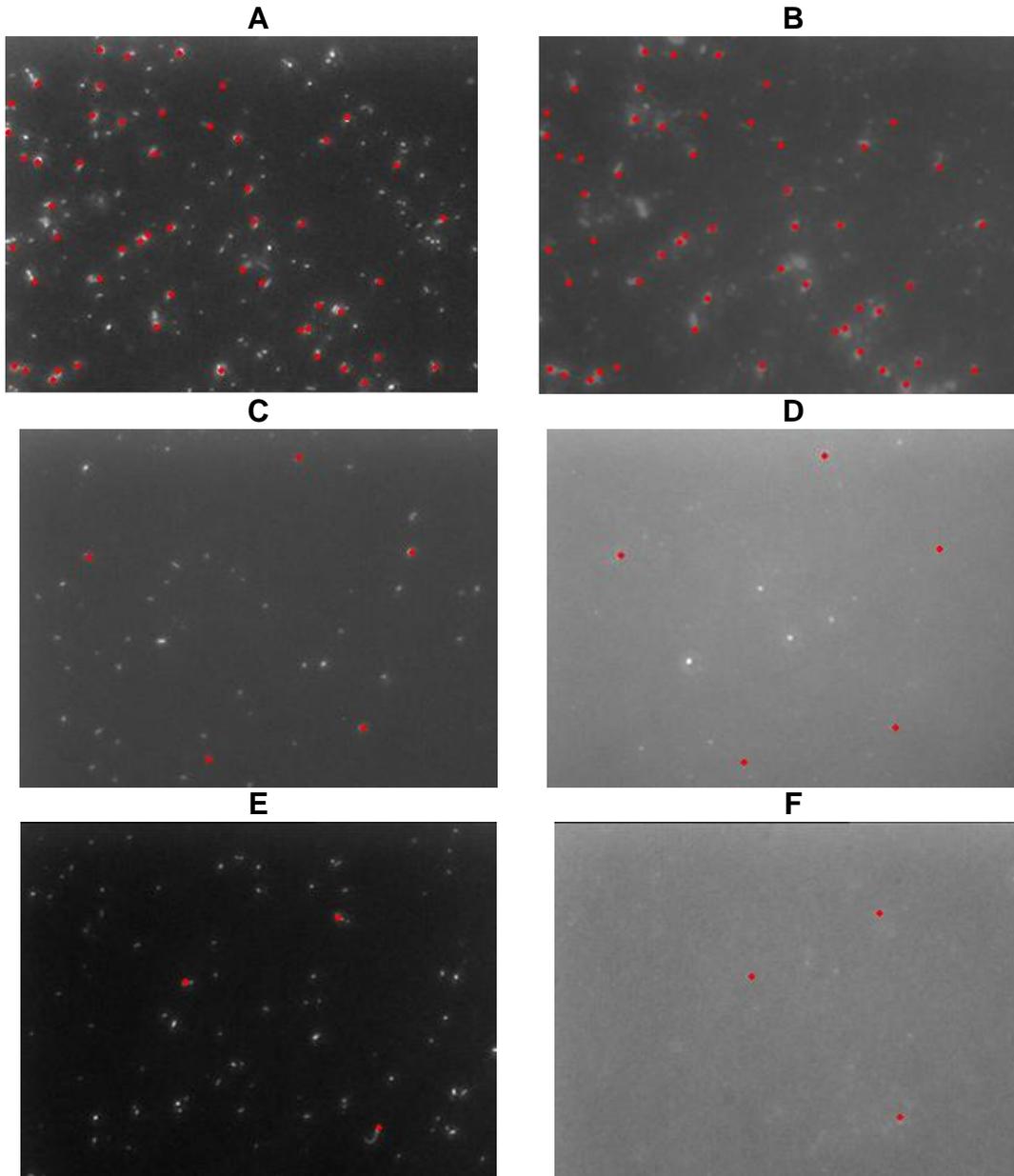
Tabla 1. Reactivos y porcentaje final empleados en la reacción FISH para preparar el buffer de hibridación y el buffer de lavado, según concentraciones de formamida.

	<b>Solución Stock (mL)</b>			
	<b>20%</b>		<b>35%</b>	
<b>[ ] Formamida</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Lavado</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Lavado</b>
<b>NaCl</b>	0,36	2,25	0,36	0,80
<b>Tris - HCl</b>	0,04	1,00	0,04	1,00
<b>Formamida</b>	0,40	0,00	0,70	0,00
<b>EDTA</b>	0,00	0,50	0,00	0,50
<b>DDW</b>	1,18	46,20	0,88	47,65
<b>SDS*</b>	0,02	0,05	0,02	0,05
<b>Vol. Final</b>	<b>2 mL</b>	<b>50 mL</b>	<b>2 mL</b>	<b>50 mL</b>

\*Para evitar la precipitación el SDS se debe adicionar de último en la preparación de las dos soluciones.

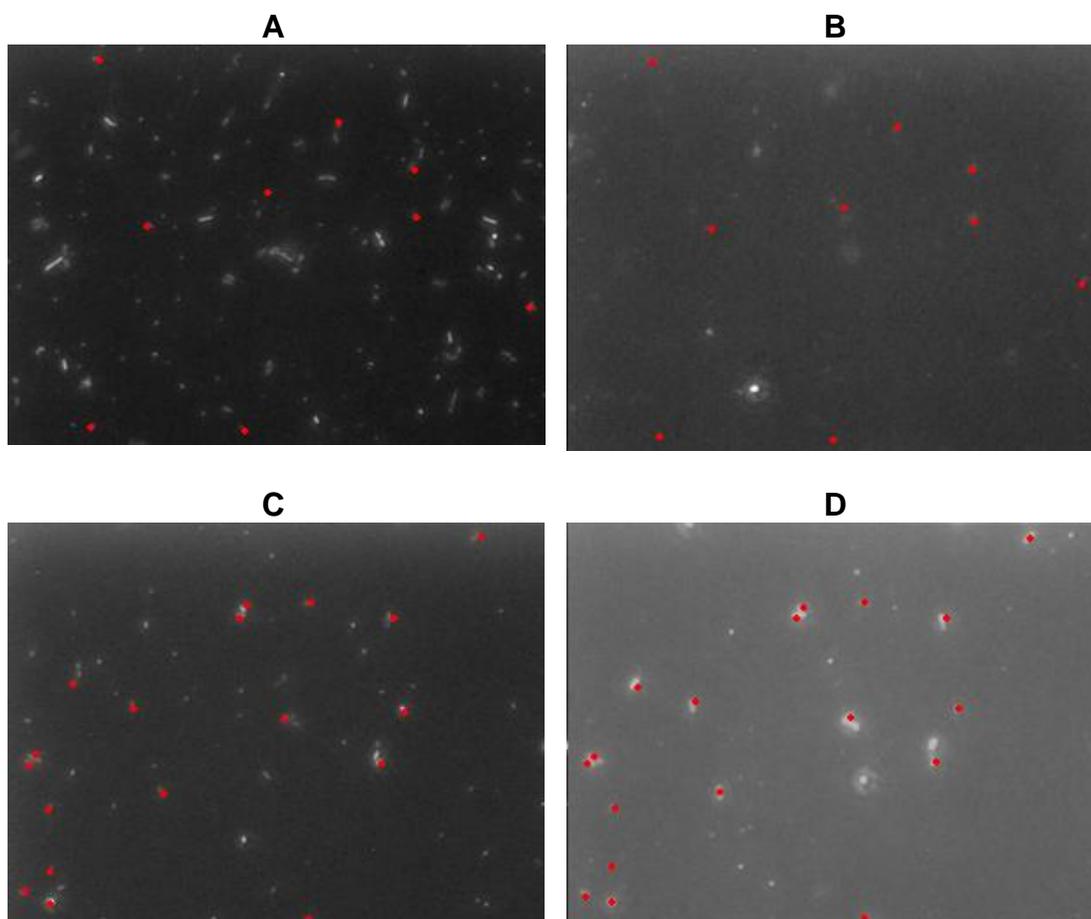
## Anexo 2

Imágenes de las células procariontas detectadas con el procedimiento FISH



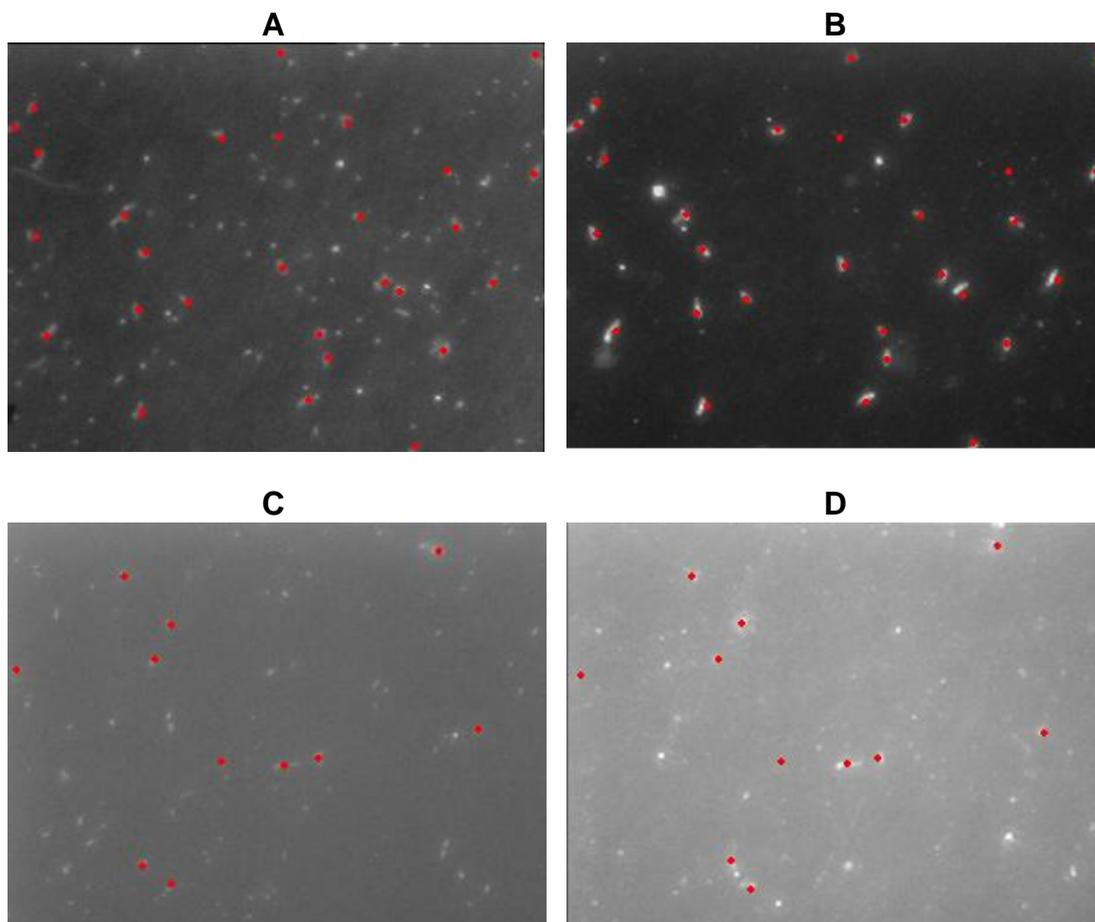
**Nota:** Los puntos rojos corresponden a células positivas para cada grupo detectadas con la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH).

**Figura 1.** Imágenes de los dominios Bacteria (A y B) y Archaea (C y D) y al control negativo (E y F). A, C y D son el número total de células coloreadas con DAPI y capturadas con luz ultravioleta; B, D y F son los mismos campos en los que se aprecian células blanco de la sonda marcada con Cy3 y capturadas con luz verde.



**Nota:** Los puntos rojos corresponden a células positivas para cada grupo detectadas con la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH).

**Figura 2.** Imágenes de  $\alpha$  Proteobacteria (A y B) y  $\beta$  Proteobacteria (C y D). A y C corresponden a imágenes del número total de células coloreadas con DAPI y capturadas con luz ultravioleta; B y D son los mismos campos en los que se aprecian células blanco de la sonda marcada con Cy3 y capturadas con luz verde.



**Nota:** Los puntos rojos corresponden a células positivas para cada grupo detectadas con la técnica de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH).

**Figura 3.** Imágenes de  $\gamma$  Proteobacteria (A y B) y el cluster *Cytophaga Flavobacterium* (C y D). A y C corresponden a imágenes del número total de células coloreadas con DAPI y capturadas con luz ultravioleta; B y D son los mismos campos en los que se aprecian células blanco de la sonda marcada con Cy3 y capturadas con luz verde.