

**TASAS DE CRECIMIENTO DE BACTERIA, ARCHAEA Y EL GRUPO β -
PROTEOBACTERIA EN UN SISTEMA EXPERIMENTAL EN EL EMBALSE DE
NEUSA**

GIOVANNI ESPINEL VILLAMIZAR

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA, 2008**

**TASAS DE CRECIMIENTO DE BACTERIA, ARCHAEA Y EL GRUPO β -
PROTEOBACTERIA EN UN SISTEMA EXPERIMENTAL EN EL EMBALSE DE
NEUSA**

GIOVANNI ESPINEL VILLAMIZAR

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de:
Biólogo**

**Director:
AMPARO CANOSA DE BARRERO
Microbióloga M. Sc**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA, 2008**

*Al Creador,
a mis padres Alfredo y Omaira,
a mis hermanos Elkin, Jefferson y Alexis
por su amor.*

GIOVANNI

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Amparo Canosa por brindarme la posibilidad de trabajar en el laboratorio de Microbiología Acuática de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Por su enseñanza, disciplina, paciencia y grandiosa contribución en mi formación personal y académica.

A la Universidad Jorge Tadeo Lozano y Fundación para la Promoción de la Investigación y Tecnología del Banco de la Republica por su financiamiento.

Al profesor Juan Pablo Niño por su motivación y aportes al desarrollo de este trabajo.

A la profesora Rosa Aura Gavilán de la Universidad Industrial de Santander por su gestión y colaboración en mi “búsqueda del bacterioplancton”.

A la profesora Eva Sintés por sus valiosos comentarios y revisión del documento

A quienes me acompañaron en el laboratorio y mi aventura en Bogotá, especialmente Diana, Pilar y María Fernanda. A Lorena, Arturo y Dora por su amistad y todas sus recomendaciones y colaboración en el trabajo de laboratorio.

A Michael, Gloria y María; Mi familia adoptiva.

A mis amigos biólogos: Alba, Solimary y Claudia, así como a los limnólogos 2006: Angélica, Jhon Jairo, Lizandro y Pablo por su amistad incondicional.

Giovanni Espinel Villamizar.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 COMUNIDADES MICROBIANAS DEL PLANCTON	4
1.1.2 Importancia de las comunidades procariotas del plancton	5
1.2 FACTORES DE CONTROL DEL PLANCTON PROCARIOTA	5
1.2.1 Modelos empíricos del control del plancton de la densidad y crecimiento Procariota	6
1.3 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES PROCARIOTA	10
1.3.1 Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	11
1.3.2 Técnica de epifluorescencia	14
1.3.3 Estudio del crecimiento procariota <i>in situ</i>	14
1.4 TASAS DE CRECIMIENTO E IMPLICACIONES ECOLÓGICAS DE LOS GRUPOS DE PROCARIOTAS DENTRO DE LA COMUNIDAD MICROBIANA	15
1.4.1 Dominio Bacteria	16
1.4.2 Subdivisión β Proteobacteria	16
1.4.3 Dominio Archaea	17
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	18
2.1 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21

4.1	SITIO DE ESTUDIO	21
4.2	DISEÑO EXPERIMENTAL	21
4.2.1	Toma de muestras biológicas	23
4.3	FASE DE LABORATORIO	23
4.3.1	Estimación de la densidad procariótica total	23
4.3.2	Determinación de la densidad relativa de los dominios Bacteria y Archaea y el grupo β Proteobacteria	24
4.3.2.1	Procedimiento FISH	25
4.4	ESTIMACIÓN DE LAS TASAS ESPECIFICAS DE CRECIMIENTO PROCARIOTA	26
4.5	TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS	27
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1	DENSIDADES, TASAS DE CRECIMIENTO Y TIEMPOS DE GENERACIÓN DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA	28
5.2	DENSIDADES RELATIVAS DE EUBACTERIA, β PROTEOBACTERIA Y ARCHAEA OBTENIDAS CON LA TÉCNICA FISH	34
5.2.1	Densidades relativas del dominio Eubacteria	34
5.2.2	Densidades relativas de las poblaciones de β Proteobacteria	37
5.2.3	Densidades relativas de organismos del dominio Archaea	42
5.3	TASAS DE CRECIMIENTO Y TIEMPOS DE GENERACIÓN DE LAS POBLACIONES DE EUBACTERIA, β PROTEOBACTERIA Y EL DOMINIO ARCHAEA	44
5.3.1	Tasas de crecimiento y tiempo de generación del dominio Eubacteria	44
5.3.2	Tasas de crecimiento y tiempo de generación de β Proteobacteria	45
5.3.3	Tasas de crecimiento y tiempos de generación del dominio Archaea	48
5.4	CONTROL HIBRIDACIÓN Y CONSIDERACIONES DE LA APLICABILIDAD DE LAS SONDAS EMPLEADAS	50
6.	CONCLUSIONES	52
7.	RECOMENDACIONES	53
	BIBLIOGRAFÍA	55

- ANEXO** Fotografías de imágenes tomadas con el analizador de imágenes y con
1. la herramienta Image Tool para el conteo de las abundancias relativas
de Bacteria, Archaea y β Proteobacteria siguiendo el procedimiento
FISH 74
- ANEXO** Definición y ecuaciones empleadas para determinar las tasas de
2. crecimiento (k) y el tiempo de generación (g) de las comunidades
procariotas, los dominios Bacteria y Archaea y del grupo β
Proteobacteria 77

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Sondas de los oligonucleótidos empleadas en la técnica FISH	24
Tabla 2. Abundancia total de procariotas en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa	30
Tabla 3. Coeficientes de correlación entre las densidades de procariotas y los grupos en estudio en el sistema experimental incubado en Cubillos	30
Tabla 4. Diferencias estadísticamente significativas entre tasas de crecimiento y sitios de incubación, tiempo de muestreo y grupos de organismos en estudio (Procariota, Bacteria, β Proteobacteria y Archaea). ANOVA de tres vías	32
Tabla 5. Fracción (%) del total de células detectadas con las sondas usadas en este trabajo para Eubacteria (EUB338), β Proteobacteria (BET42a), Archaea (ARCH915) y la sonda control (NON338)	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Modelo logístico denso-dependiente de regulación de las comunidades procariotas planteado por Wright & Coffin (1983)	7
Figura 2.	Modelo empírico de regulación del bacterioplancton según Gasol (1994)	8
Figura 3.	Modelo de regulación de densidades y crecimiento procariota por parte de depredadores y virus	10
Figura 4.	Esquema general de Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes	13
Figura 5.	Localización del Embalse de Neusa y sitios de muestreo	22
Figura 6.	Variaciones de la densidad total de procariotas encontradas durante la incubación de los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa	29
Figura 7.	Variación en las tasas de crecimiento procariota en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa durante todo el período del estudio	31
Figura 8.	Variaciones en las densidades celulares del dominio Bacteria y la comunidad procariota total en los dos sistemas experimentales en el embalse de Neusa	35
Figura 9.	Células detectadas con la Sonda EUB388	38

Figura 10.	Variación de los porcentajes de células hibridadas para la sonda BET42a en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa	39
Figura 11.	Imágenes de células β Proteobacteria capturadas en las primeras horas de incubación y después de 48 horas de incubación	40
Figura 12.	Variación en las densidades relativas de Archaea en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa	43
Figura 13.	Variación en las densidades del dominio Archaea en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa	43
Figura 14.	Variaciones en las tasas de crecimiento de Eubacteria en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa	45
Figura 15.	Variación en las tasa de crecimiento de β Proteobacteria en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa	46
Figura 16.	Variación en las tasas de crecimiento del dominio Archaea en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa	49

ABREVIATURAS

A	: Alfa
AO	: Acridine Orange (Fluorocromo: naranja de acridina)
ARCH915	: Sonda de oligonucleótido específica para el dominio Archaea
B	: Beta
DAPI	: 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (Fluorocromo di clorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol)
Cy3	: Indocarboncyanine 3 (Fluorocromo indocarbocianina 3)
PFH	: Paraformaldehído
HNF	: Heterótrofos nanoflagelados
EUB38	: Sonda de oligonucleótidos específica para el dominio Bacteria
NON	: Sonda de oligonucleótidos control
FISH	: Hibridación Fluorescente <i>in situ</i>
K	: Tasa específica de crecimiento
T	: Tiempo medio de generación
No	: Abundancia inicial de células o células.mL ⁻¹ en un tiempo inicial
Nx	: Abundancia final de células o cél.mL ⁻¹ en un tiempo final
Cél/ml	: Células por mililitro (también cél.mL ⁻¹)
rRNA	: Acido ribonucleico ribosómico
Γ	: Gamma
µg	: Microgramos
µL	: Microlitros
MOD	: Materia orgánica disuelta
MOP	: Materia orgánica particulada
PSV	: <i>Particle seem to virus</i> (partícula parecida a un virus)

RESUMEN

TÍTULO: TASAS DE CRECIMIENTO DE BACTERIA, ARCHAEA Y EL GRUPO β - PROTEOBACTERIA EN UN SISTEMA EXPERIMENTAL EN EL EMBALSE DE NEUSA.*

AUTOR: ESPINEL-VILLAMIZAR, Giovanni.**

PALABRAS CLAVE: tasas de crecimiento, Bacteria, Archaea β -Proteobacteria, FISH, epifluorescencia.

Se evaluaron las tasas específicas de crecimiento de la comunidad procariótica, y de los dominios Bacteria y Archaea y del grupo β -Proteobacteria *in situ* con bolsas de diálisis en dos sitios contrastantes en el embalse de Neusa, Cundinamarca (Colombia).

Para determinar las densidades de los procariotas, las tasas de crecimiento y los tiempos de generación de los grupos estudiados se usaron las técnicas de tinción con naranja de acridina e hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH), seguidas del análisis mediante microscopía de epifluorescencia.

Los parámetros analizados presentaron valores que fueron ligeramente superiores en Cubillos, zona caracterizada por ser la de mayor aporte de nutrientes al embalse, sin embargo no se presentaron diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre los sitios, pero sí entre tasas de crecimiento de los grupos durante el tiempo de muestreo (ANOVA $P \leq 0.05$). Hacia la segunda mitad del experimento (t_{48} , t_{72} y t_{94}) la mayoría de las células hibridadas con la sonda EUB338 correspondieron al grupo β Proteobacteria (sonda BET42a). En los periodos en que se detectó crecimiento exponencial de procariotas, los miembros del grupo β -Proteobacteria presentaban tasas de crecimiento y tiempos de generación relativamente altos, sugiriendo que los miembros de este grupo están mejor adaptados a las condiciones del embalse.

Además, los valores mayores de abundancia encontrados en el microcosmos ubicado en Cubillos indican que las poblaciones de este grupo poseen una mayor capacidad de asimilación de los nutrientes ofrecidos por la entrada del afluente, lo que incide en una rápida respuesta de crecimiento.

Por otra parte los miembros del dominio Archaea presentaron muy bajas densidades con valores cercanos en muchos casos al límite de detección.

Se plantea que las diferencias ambientales dentro del embalse se convierten en una buena herramienta para evaluar las propiedades ecológicas de las comunidades procariotas.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: Amparo Canosa de Barrero, Microbióloga, MSc.

ABSTRACT

TITLE: GROWTH RATE OF BACTERIA, ARCHAEA AND β - PROTEOBACTERIA IN A EXPERIMENTAL SYSTEM IN NEUSA RESERVOIR (COLOMBIA).

AUTHOR: ESPINEL- VILLAMIZAR, Giovanni**

KEY WORDS: Growth rates, Archaea, Bacteria, β -Proteobacteria FISH, epifluorescence.

Specific growth rate of the total prokaryotic community, Bacteria and Archeae domains, and the β Proteobacteria group were evaluated using an *in situ* experimental design with dialysis bags in two dissimilar sites at Neusa's reservoir (Cundinamarca-Colombia).

Prokaryotic abundance, growth rates and generation times of the studied groups were determined using acridine orange staining and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), followed by epifluorescence microscopy.

Evaluated parameters were slightly higher in Cubillos, a zone characterized for being the higher contributor of nutrients to the reservoir, however there were no significant differences in grow rates between sites, but there were significant differences in grow rates of the studied groups among sampling time (ANOVA $P \leq 0.05$). The majority of the hybridized bacterial cells with the probe EUB338 corresponded to the β Proteobacteria (probe BET42a) group around the second half of the experiment (t_{48} , t_{72} y t_{94}).

Apparently, the members of β Proteobacteria are better adapted to the conditions of the reservoir, since there were growth rates and generation times relatively higher for this group when exponential growth was detected. Moreover, the populations of this group have a major capacity of assimilation of the offered nutrients as suggested by the high generation time.

On the other hand, the members of the Archaea domain showed very low abundance, even with values close to the detection limit.

In this study, it is established that the environmental differences within the reservoir result in a good tool for testing the ecological properties of the prokaryotic communities.

* Undergraduate Project.

** Faculty of Science, Biology School. Director: Amparo Canosa de Barrero, Microbiologist, M.Sc.

INTRODUCCIÓN

Estudios pioneros en ecología microbiana demostraron la existencia de densidades considerables de organismos procariotas en aguas continentales y marinas, lo que llevó a plantear una contribución fundamental de esa comunidad en los flujos de materia y energía en el ecosistema, además de su conocida participación en el ciclo de los elementos (Pomeroy, 1974; Azam *et al.*, 1983).

Azam *et al.*, propusieron en la década de los 80 una hipótesis según la cual la materia orgánica disuelta producida por excreción y muerte de los organismos es incorporada a las redes tróficas a través de la actividad de bacterias y arqueas heterotróficas (Azam *et al.*, 1983; Pernthaler, 2005). Esta propuesta conocida como el bucle microbiano es actual y ampliamente aceptada por la comunidad científica, y se trabaja intensamente para averiguar sus implicaciones en la productividad total de los ecosistemas acuáticos.

Desde esta perspectiva se han planteado diferentes modelos para explicar como la estructura y función de la comunidad procariota planctónica afecta los flujos de energía en el sistema. Sin embargo, actualmente todavía se carece de un modelo general que explique el efecto conjunto de variables bióticas y abióticas sobre el plancton procariota (Pernthaler 2005). Este en hecho en parte es debido a las limitaciones metodológicas para reconocer los grupos clave en los procesos de incorporación de la materia orgánica disuelta dentro de la red trófica. También la presencia de competidores, depredadores, virus, heterogeneidad del sustrato, gradientes químicos y espaciales dificultan la interpretación de los resultados obtenidos sobre la actividad y características de crecimiento de grupos específicos del bacterioplancton (Pernthaler & Amann 2005). Sin embargo, la información recopilada ha permitido proponer hipótesis atractivas sobre diferentes estrategias y capacidad de crecimiento de poblaciones microbianas en diversas condiciones

(Pernthaler *et al.* 1997, Hahn *et al.* 1999, Pernthaler *et al.* 2001b, Warnecke *et al.* 2004, Simek *et al.* 2005, 2006, 2007; Weinbauer *et al.* 2006; Jezbera *et al.* 2006).

La medición *in situ* de las tasas de crecimiento de la comunidad procariota total y de poblaciones seleccionadas permitirá entender la magnitud de los procesos en los que participan dichos microorganismos; este conocimiento contribuirá a un mejor entendimiento del funcionamiento de los sistemas acuáticos (Pernthaler *et al.* 1996, Gasol *et al.* 2002b; Pernthaler 2005; Jardillier *et al.* 2005). Estas consideraciones son más importantes cuando se refieren a ecosistemas acuáticos tropicales en los cuales la información disponible es escasa. En Colombia es notable la ausencia de estudios sobre la ecología del plancton procariota.

En este trabajo de grado se abordaron algunas preguntas relacionadas con el anterior planteamiento. Se realizó como parte de las actividades de un proyecto de investigación denominado “Evaluación experimental del efecto de la bacteriovoria sobre la productividad y estructura de la comunidad bacteriana en el embalse de Neusa” (Canosa *et al.* 2008) llevado a cabo por investigadores del grupo de Microbiología Acuática de la Universidad Jorge Tadeo Lozano de Bogotá. Trabajos previos en el embalse de Neusa permiten contar con información sobre variaciones de densidad y distribución del bacterioplancton, virioplancton, nanoplancton heterótrofo y autótrofo (Canosa & Pinilla 1999, Canosa 2002), así como de la estructura y dinámica de los grupos α - γ - β -Proteobacteria, Cytophaga - Flavobacter y el dominio Archaea (Canosa & Niño 2005).

En el presente estudio se determinaron las tasas específicas de crecimiento de la comunidad procariótica total, de los dominios Bacteria y Archaea y del grupo β Proteobacteria en dos regiones del embalse de Neusa. Se utilizaron diferentes metodologías que incluyeron el diseño de un sistema experimental *in situ* con bolsas de diálisis (Herndl *et al.* 1992), la técnica de hibridación *in situ* con sondas

fluorescentes (FISH) para valorar las poblaciones mencionadas y la de epifluorescencia para obtener datos de la densidad total de procariontas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 COMUNIDADES MICROBIANAS DEL PLANCTON

Hasta ahora no hay un acuerdo general para denominar los organismos que forman parte del plancton. El tamaño es una propiedad útil que ha sido utilizada en la clasificación de los organismos que forman parte de la red trófica planctónica. Respecto a los microorganismos, dimensionalmente se han agrupado en tres ordenes de magnitud, se habla del microplancton cuando se hace referencia a aquel conformado por organismos entre 20 y 200 μm , del nanoplancton entre 2 y 20 μm , del picoplancton entre 0.2 y 2 μm (Sieburth *et al.* 1978, Fenchel 1988), otro grupo sugerido ha sido denominado femtoplancton entre 0.02 y 0.2 μm conformado principalmente por virus (Fenchel 1988).

Otra clasificación tiene en cuenta la capacidad de los organismos de elaborar su propia materia orgánica a partir de sustancias orgánicas (heterótrofos) o inorgánicas (autótrofos), según esta clasificación si se trata de microorganismos heterótrofos se les denomina zooplancton y si son autótrofos fotosintéticos, fitoplancton. También se pueden designar de acuerdo al grupo al que pertenecen, por ejemplo bacterias, bacterioplancton, Archaea, arqueoplancton y virus, virioplancton (Sieburth 1979).

En algunas ocasiones por comodidad se combinan unos términos con otros. Por ejemplo el término heterótrofo nanoflagelado (HNF) describe a protozoos flagelados heterótrofos (zooplancton) cuyo tamaño está entre 2 y 20 μm (nanoplancton).

1.1.2 importancia de las comunidades procariotas del plancton.

Se estima que el número de organismos procariotas en el agua está entre 10^5 y 10^6 células.mL⁻¹, albergando una gran diversidad de especies y una alta riqueza metabólica, y permitiendo que estos microorganismos se conviertan en un recurso potencial de genes con aplicabilidad biotecnológica y médica (Pedros-Alió 2006).

Esta elevada diversidad permite asimismo que la comunidad procariota juegue un papel fundamental en el flujo de materia y energía en los ecosistemas acuáticos, como una consecuencia intrínseca de su densidad, eficiente respuesta a distintos nutrientes y el potencial de crecimiento (Gasol 1994). De esta manera la materia orgánica disuelta (MOD) y la materia orgánica particulada (MOP) es modificada principalmente por las bacterias heterotróficas del plancton. Estos conceptos están integrados en la hipótesis del bucle microbiano, la cual plantea el reciclaje de la MOD por bacterias y arqueas heterotróficas y su posterior flujo en forma de MOP (los mismos procariotas) a la red trófica acuática a través de heterótrofos nanoflagelados y ciliados (Pomeroy, 1974; Azam *et al.* 1983; Sanders *et al.* 1992). Estos procesos adquieren un valor clave en la medida que su entendimiento puede conducir al planteamiento y precisión por ejemplo de modelos actuales de cambio climático (Pedros-Alió 2006).

1.2 FACTORES DE CONTROL DEL PLANCTON PROCARIOTA

El entendimiento del papel de bacterias y arqueas en los ecosistemas acuáticos se enfrenta a la paradoja de que a pesar de una gran capacidad de crecimiento su densidad se mantiene relativamente constantes (Cole & Caraco 1993). De esta manera surge un evidente interés por conocer los mecanismos ecológicos que regulan a las bacterias y arqueas.

Algunos estudios muestran que el crecimiento, densidad y estructura del plancton procariota pueden ser regulados por varios factores que incluyen: a). la disponibilidad de sustratos orgánicos e inorgánicos (Cole *et al.* 1988; Wright 1998; Pace & Cole 1994), control denominado por sustrato (bottom up). b). la depredación por protozoos y la lisis viral que implica mortalidad bacteriana también llamado control por depredadores (top down) (Wright 1988, Proctor & Fuhrman 1990, Sherr *et al.* 1992, Cole *et al.* 1998, Fuhrman 1999, Strom 2000, Thingstad 2000, Simek *et al.* 2001, 2003, Hahn & Hofle 2001), y c). otros factores ambientales como la temperatura (Shiah & Ducklow 1993, Sommaruga & Conde 1997, Gurung *et al.* 2000).

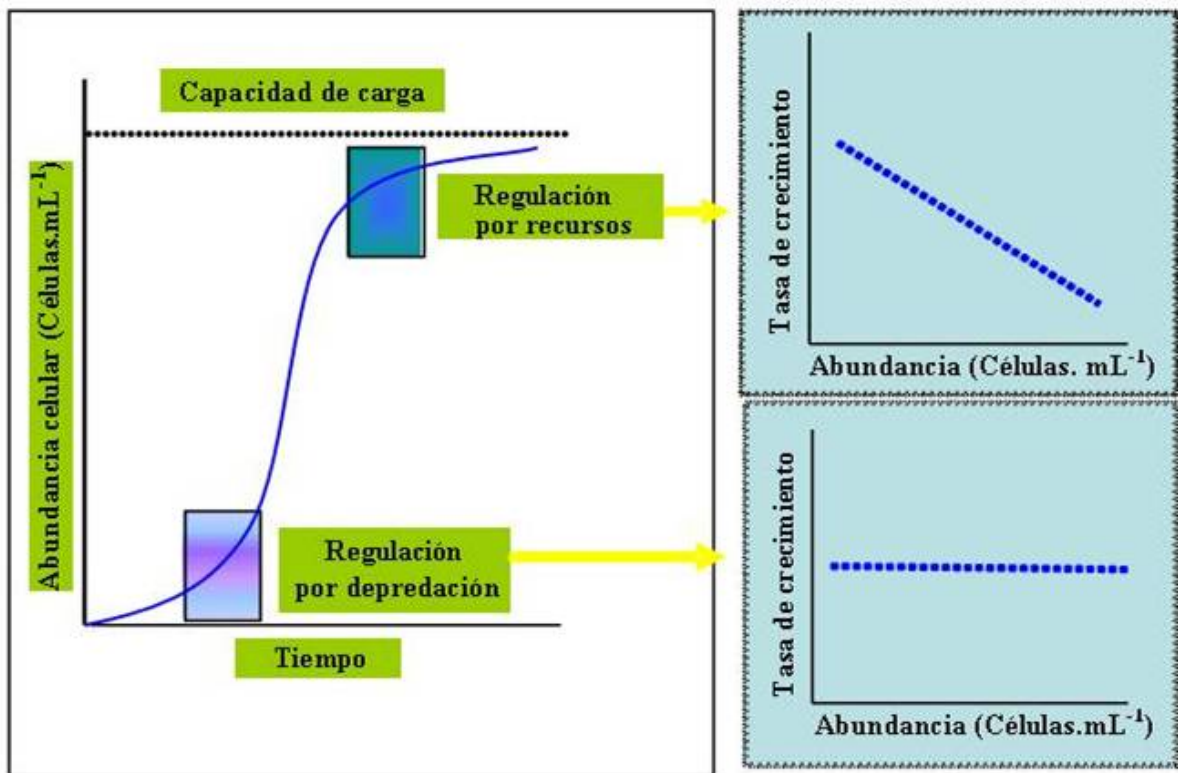
La complejidad de las interrelaciones entre las anteriores variables en sistemas naturales, ha dirigido los esfuerzos de investigación a lograr predecir la importancia de los distintos factores en el control de las poblaciones bacterianas en sistemas acuáticos determinados (Gasol *et al.* 2002).

1.2.1 Modelos empíricos del control de la densidad y crecimiento procariota.

Ecológicamente la biomasa de una población de organismos está determinada por el balance entre sus tasas específicas de crecimiento y de mortalidad. Las poblaciones que están sujetas a perturbaciones logran un rápido crecimiento en brotes erráticos o irregulares (oportunistas), mientras que aquellas que logran densidades más estables alcanzan una mayor capacidad de competencia (estrategias r y k, respectivamente). Diversos modelos empíricos han intentado explicar el comportamiento de las comunidades procariotas ante los factores que las controlan desde el punto de vista de estos conceptos (Weinbauer & Höfle

1998, Gasol & Duarte 2000, Pernthaler 2005), originalmente utilizados en ecología de macroorganismos.

Figura 1. Modelo logístico dependiente de la densidad de regulación de las comunidades del bacterioplancton propuesto por Wright & Coffin (1983).

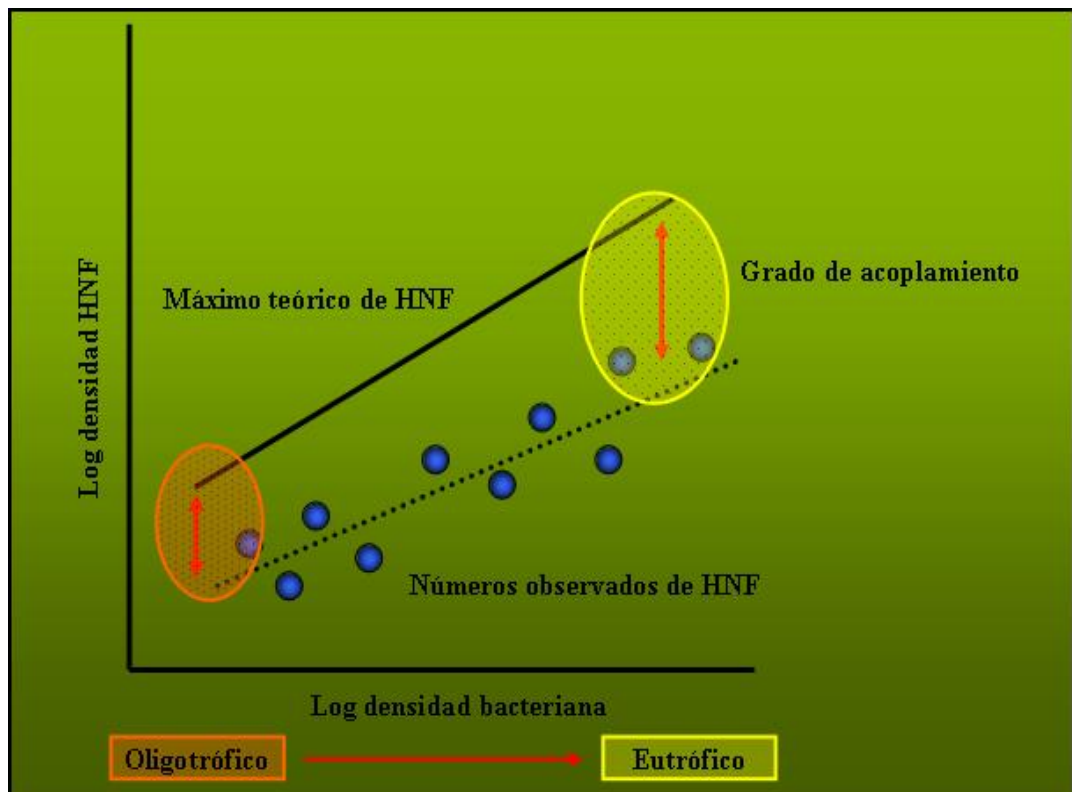


Fuente: Pernthaler 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Review Microbiology*. 3: 537–546.

Wright & Coffin (1983) propusieron un modelo logístico dependiente de la densidad de organismos para estudiar la dinámica de crecimiento de las comunidades microbianas. En dicho modelo se predice que si la densidad

bacteriana se aproxima a la capacidad de carga del ambiente, se hallará una correlación negativa entre las tasas específicas de crecimiento y densidad bacteriana, asumiendo limitación por recursos. Por el contrario, si la densidad y las tasas específicas de crecimiento bacteriano no poseen relación, se asume un control por depredación (figura 1).

Figura 2. Modelo empírico de regulación del bacterioplancton planteado por Gasol (1994)



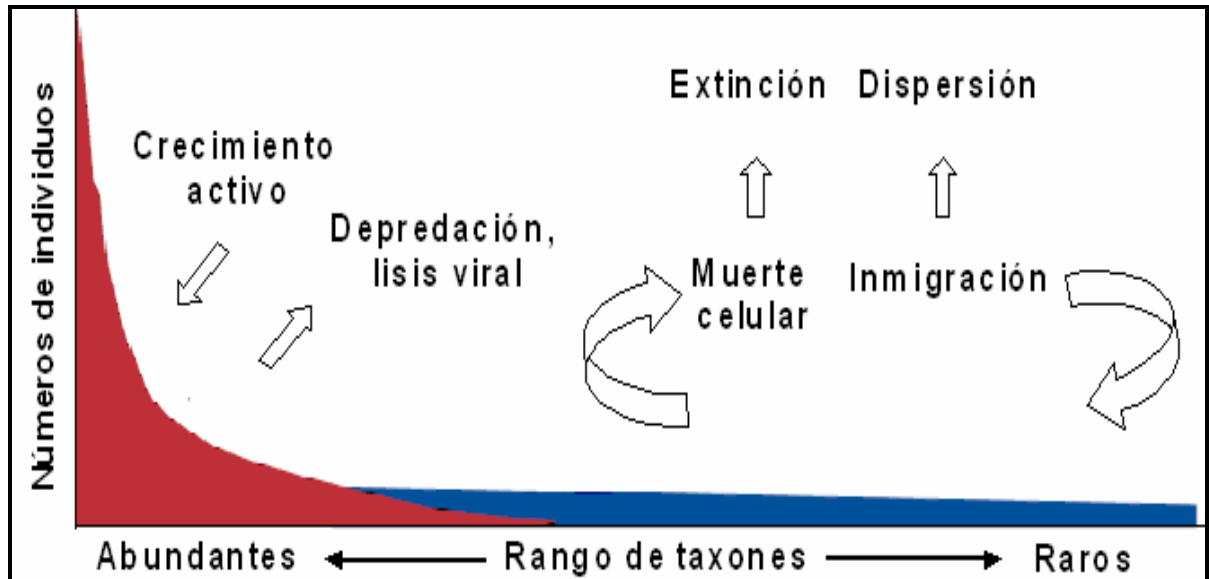
Fuente: Modificado de Pernthaler 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. Nature Review Microbiology. 3: 537–546.

El modelo propuesto por Gasol (1994), plantea un acoplamiento entre las densidades de bacterias y sus principales depredadores, los HNF (acople depredador-presa). El grado de acoplamiento depende del estado trófico del sistema. En ambientes oligotróficos, se obtiene una mayor tendencia de acople entre las bacterias y los HNF (Gasol *et al.* 2002), sugiriendo que en estos sistemas el crecimiento estaría regulado por depredación. Por otro lado, en ecosistemas eutróficos, esta relación tiende a alejarse, la distancia entre el máximo teórico de abundancia de HNF y la abundancia observada aumenta (figura 2), sugiriendo que en ecosistemas eutróficos el crecimiento estaría regulado por recursos (Gasol *et al.* 2002).

Con el hallazgo en la década de los 90 de virus en la columna de agua (Proctor & Fuhrman 1990) en abundancias de un orden de magnitud superior a las bacterias, se propuso que los virus junto con los heterótrofos nanoflagelados son los principales agentes de mortalidad y pueden llegar a afectar considerablemente la riqueza de las comunidades procariotas. Thingstad (2000), planteó que el ataque viral es dependiente de la densidad de organismos, afectando a los organismos mas abundantes de la comunidad y con elevadas tasas de crecimiento, esta hipótesis ha sido denominada “matando al vencedor” (killing the winner).

Pedros-Alio (2006) planteó un modelo para interpretar y esclarecer la importancia relativa de la lisis viral y depredación en el control de las densidades procariotas. Según este modelo, en el ecosistema acuático se mantienen en crecimiento activo taxones procariotas en elevadas abundancias que participan en el flujo de carbono y energía, y que además sufren intensas pérdidas por depredación y lisis viral. Además de estos taxones, existe otro “pool” o banco de taxones raros, que se caracterizan por no crecer o presentar tasas de crecimiento bajas, con densidades muy bajas y que no se ven afectadas por los anteriores agentes de mortalidad, lo que probablemente contribuye a mantener las densidades estables (figura 3).

Figura 3. Modelo de regulación de densidades y crecimiento procariotas por parte de depredadores y virus.



Fuente: Modificado de Pedros-Alio 2006. Marine microbial diversity can it be determined?. Trends In Microbiology. 14: 257-263.

1.3 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES PROCARIOTAS

La comprobación de los anteriores modelos del funcionamiento de las comunidades procariotas *in situ* se encuentra dificultado por una variedad de limitaciones técnicas incluyendo los artefactos introducidos en las metodologías usadas.

Un objetivo central en la ecología microbiana es la identificación y cuantificación de los microorganismos que habitan los ambientes estudiados (Daims *et al.* 1999). Se estima que alrededor del 1-10 % de los organismos de las comunidades procariotas de los sistemas acuáticos son capaces de crecer en medio de cultivo

(Amann *et al.* 1995). En los últimos años se ha revelado que la diversidad de bacterias y arqueas excede desproporcionadamente el número de microorganismos que han sido cultivados (Wagner 2004). Se sabe ahora que las técnicas de cultivo tradicionales brindan escasa información acerca de los verdaderos requerimientos nutricionales y de crecimiento de la diversidad natural de los microorganismos, además la taxonomía clásica bacteriana depende fuertemente de las características metabólicas asignadas después de su aislamiento.

Actualmente el análisis molecular de las comunidades microbianas, a partir de moléculas de interés filogenético como el rRNA se utilizan para complementar los estudios (Woese *et al.* 1983, Olsen *et al.* 1986, Woese 1987). Por ejemplo, con la utilización de análisis comparativo de secuencias de rRNA e hibridación fluorescente *in situ* se ha aprendido sobre la diversidad y estructura de complejas comunidades microbianas *in situ* (Amann *et al.* 1995).

La información obtenida a partir de la hibridación fluorescente *in situ* posee un valor ecológico importante ya que puede dar una aproximación de la distribución de biomasa, cambios en densidades, morfología, comportamiento bacteriano y estrategias de vida de grupos bacterianos definidos, además puede permitir evaluar estas propiedades ante diferentes condiciones ambientales, perturbaciones o presión por depredación (Simek *et al.* 1997, Pernthaler *et al.* 1998; Muyzer *et al.* 1998; Glockner *et al.* 1999; Jürgens *et al.* 1999, Weinbauer & Hofle 1998, Pernthaler *et al.* 2001a).

1.3.1 Hibridación fluorescente *In situ*.

La hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) es una herramienta usada en la aproximación de estudios en ecología y evolución microbiana (Olsen *et*

*al.*1986). Esta técnica fue desarrollada por DeLong (1989) y aplicada en primera instancia por Amann *et al.* (1990) en estudios de microbiología ambiental.

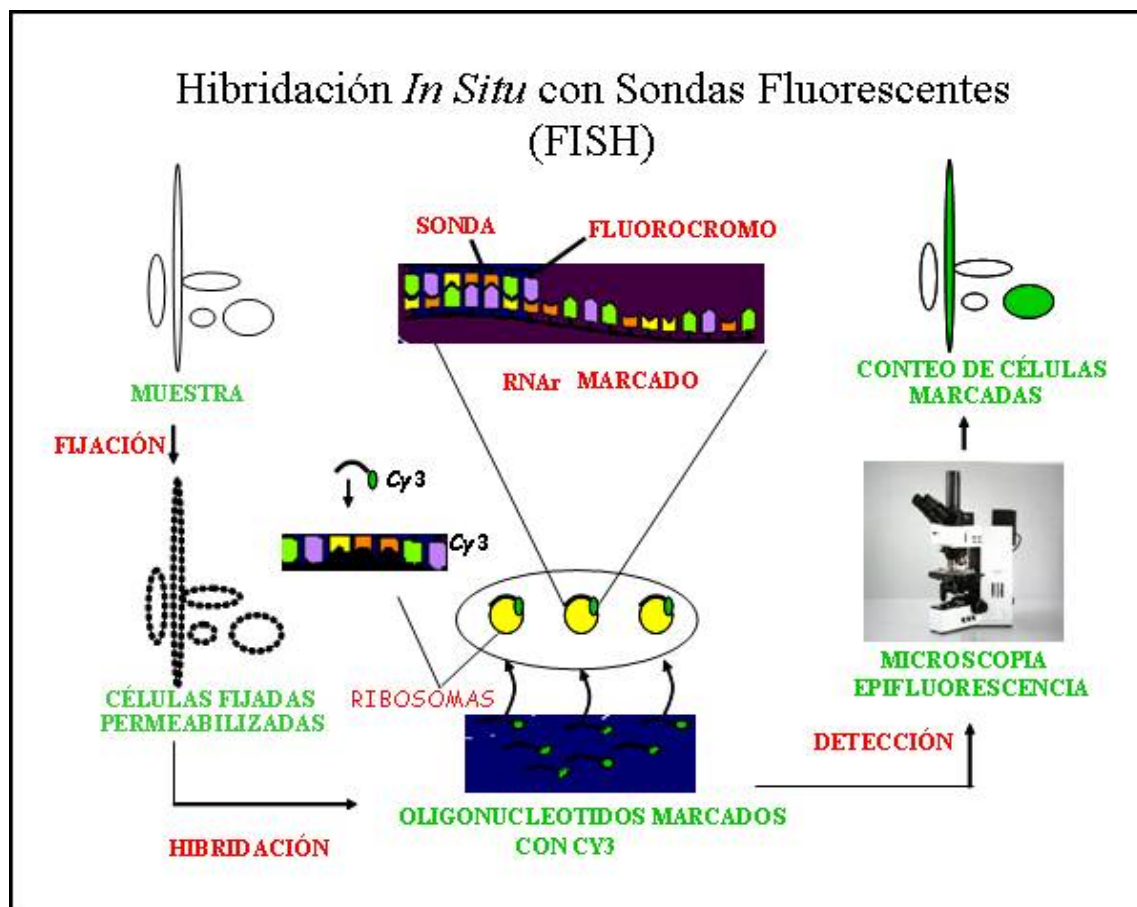
Esta técnica consiste en el uso de sondas (oligo o polinucleótidos), con secuencias complementarias de secuencias del 16S y/o 23S del rRNA en el caso de microorganismos. Estas sondas están marcadas covalentemente en su extremo 5' con un fluorocromo (Cy3, Cy5, fluoresceína, tetrametilrodamina, Texas red) y se detectan mediante microscopia de epifluorescencia. Durante el procesamiento de las muestras se favorece el acceso de la sonda marcada a la célula (en condiciones de astringencia) para hibridar secuencias complementarias específicas en el ribosoma (Moter & Gobel 2000) (figura 4).

FISH es una técnica directa ya que permite la detección en muestras ambientales de numerosos grupos procariotas a diferentes niveles filogenéticos (desde especies hasta dominios), permitiendo determinar densidades, morfología y estado fisiológico (cantidad de rRNA), así como determinar dinámicas en las tasas de crecimiento a partir de cambios en las densidades celulares.

La cantidad de rRNA celular depende fuertemente del estado fisiológico de las poblaciones procariotas, debido a que muchas células en los sistemas acuáticos presentan un crecimiento discontinuo (Kerkhof & Kemp 1999) o estados prolongados de dormancia o inactividad (Morita 1997, Lebaron *et al.* 2001). Esta variación en el contenido de rRNA limita la efectividad y detección *in situ* con el uso de sondas fluorescentes debido a la variabilidad de la intensidad de la señal de hibridación (DeLong *et al.* 1989, Oda *et al.* 2000, Wagner 2004). En este sentido, células con bajo contenido de rRNA y una baja permeabilidad de la sonda a las células diana no serían detectadas.

Estas limitaciones pueden ser sustanciales en ambientes sujetos a prolongadas condiciones de oligotrofia (Amann *et al.* 1995). Sin embargo estos problemas pueden solucionarse en algunos casos mediante el uso de protocolos apropiados de hibridación (Manz *et al.* 1992, Kubota *et al.* 2006).

Figura 4. Esquema general del procedimiento usado en la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes



Fuente: Modificado de Glockner 2002. Fluorescence *In Situ* Hybridization. <http://www.mpi-bremen.de/molecol/fog/fish1.html>

1.3.2 Técnica de epifluorescencia.

La técnica de microscopía de epifluorescencia es una técnica tradicional de conteo directo que permite el recuento total de las células procariotas en muestras de agua natural. Se utiliza microscopía de epifluorescencia y tinción de los ácidos nucleicos celulares con fluorocromos específicos como la naranja de acridina (AO) (Hobbie *et al.* 1977) o el 4'-6' diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Porter & Feig 1980). Las células teñidas fluorescen cuando se estimulan con luz en una longitud de onda adecuada. Las células teñidas con AO fluorescen en tonos naranja, rojizos o verdes brillantes cuando son excitadas con luz azul, las teñidas con DAPI fluorescen azul claro cuando son excitadas con luz ultravioleta.

El uso de rejillas oculares o de análisis de imagen favorece el conteo de las células fluorescentes que han sido retenidas previamente en filtros con tamaño de poro uniforme.

1.3.3 Estudio del crecimiento procariota *in situ*.

Existen diversos métodos para medir las tasas de crecimiento *in situ*, algunos incluyen técnicas de cultivo, otros se basan en la medición de los cambios en el número de células, obtenido a partir de los conteos directos o estimando la frecuencia de células en división (Hagstrom *et al.* 1979, Di Siervi 2002), o también se pueden estimar las tasas de crecimiento *in situ* midiendo la incorporación de varios precursores marcados radiactivamente, como por ejemplo ³H- timidina que se incorpora al DNA y ³H- leucina que se incorpora en proteínas después de ser asimilados por los microorganismos (Bell 1993).

En algunos estudios se han usado inhibidores eucariotas para estimar tasas de crecimiento procariota en ausencia de sus depredadores (Newell *et al.* 1983). El uso de bolsas de diálisis *in situ* (Turley & Lochte 1986, Herndl *et al.* 1993) permite también estudiar las comunidades procariotas en cortos intervalos de tiempo, bajo las condiciones ambientales del sistema y así dilucidar aspectos claves de este compartimiento. Otro método aplicado es la incubación de muestras en botellas cerradas (Landry *et al.* 1995).

Diversos artefactos metodológicos pueden llegar a constituir un impedimento en la interpretación de los factores que influyen en el crecimiento y participación de los microorganismos *in situ* (Jugnia *et al.* 2006). Un método adecuado que permita valorar las tasas de crecimiento en los sistemas acuáticos debe atender al menos las siguientes premisas, especificad para los microorganismos, aplicabilidad a una variedad de estados de crecimiento, la tasa de crecimiento no debe alterarse con la manipulación experimental y mostrar precisión y sensibilidad en incubaciones cortas (Di siervi 2002).

1.4 TASAS DE CRECIMIENTO E IMPLICACIONES ECOLÓGICAS DE LOS GRUPOS DE PROCARIOTAS DENTRO DE LA COMUNIDAD MICROBIANA

Diferentes sondas de oligonucleótidos de los dominios Bacteria y Archaea, así como de niveles taxonómicos intermedios (divisiones) y específicas (géneros y especies) han sido diseñadas recientemente con el fin de monitorizar la participación de los diferentes grupos/organismos en los procesos de flujo de carbono y energía, además de obtener información sobre sus densidades y composición dentro de los sistemas acuáticos (Amann *et al.* 1995, Loy *et al.* 2007).

Debido a que en este trabajo se determinaron las tasas de crecimiento de procariontas al igual que de los dominios Bacteria y Archaea y del grupo β Proteobacteria, a continuación se hará un breve comentario acerca de su presencia en ecosistemas acuáticos continentales.

1.4.1 Dominio Bacteria.

La información recopilada recientemente de microorganismos del dominio Bacteria mediante técnicas como el FISH, ha permitido proponer hipótesis atractivas sobre las implicaciones ecológicas de las diferentes capacidades del crecimiento bacteriano y posibles estrategias de vida de sus diferentes linajes filogenéticos (Simek *et al.* 2006, 2007). Por ejemplo se ha mostrado que la biomasa, tasas de crecimiento y actividad de grupos como Actinobacteria, Proteobacteria (subdivisión α , β , y γ), el grupo *Cytophaga – Flavobacteria* (ricos en guanina-citocina) están relacionados positivamente con los mecanismos de control ya mencionados (Pernthaler *et al.* 1997, Hahn *et al.* 1999, 2003, Pernthaler *et al.* 2001b, Warnecke *et al.* 2004, Jezbera *et al.* 2006, Weinbauer *et al.* 2007). En este trabajo el dominio Bacteria fue detectado por medio de la sonda de oligonucleótidos EUB338 (tabla 1), que esta dirigida a detectar la mayoría de bacterias. Hibrida las posiciones 338-355 del extremo 3' del 16S rRNA (Amann *et al.* 1990).

1.4.2 Subdivisión β Proteobacteria.

La división β -Proteobacteria corresponde a una fracción dominante del bacterioplancton en los sistemas pelágicos y agregados de materia orgánica de

los sistemas epicontinentales (Glockner *et al.* 1999). Esto indica probablemente que las bacterias de este grupo contribuyen desproporcionadamente al flujo de materia orgánica a niveles tróficos superiores (Pernthaler & Amann 2005).

Algunos grupos de la subdivisión β Proteobacteria están involucrados activamente en procesos de oxidación y reducción de amonio (Voytek & Ward 1995), solubilizar la MOP y el reciclaje de MOD disponible, además de la descomposición de aminoácidos en agregados de MOP y subsecuente liberación al medio (Knoll *et al.* 2001).

1.4.3 Dominio Archaea.

El dominio Archaea parece tener una menor representación en sistemas acuáticos epicontinentales, entre el 2 y 5 % del plancton procariota (DeLong 1992) que el dominio Bacteria. Poco se conoce sobre la ecología y función del “arqueoplancton” en estos ecosistemas (Ovreas *et al.* 1997, Pernthaler *et al.* 1998, Casamayor *et al.* 2000; Jürgens *et al.* 2000), ya que la mayoría de los estudios sobre arqueas realizados hasta la fecha se han centrado en suelos, océanos, sedimentos y zonas con condiciones ambientales extremas.

Posiblemente la contribución e importancia de este grupo ha sido subestimada y miembros del “arqueoplancton” podrían estar involucrados activamente en los ciclos biogeoquímicos de estos sistemas (Stein & Simon 1996, Rajagopal *et al.* 1998, Casamayor *et al.* 2001). La reciente acumulación de información sobre genes y genomas de miembros del dominio Archaea, posiblemente conllevará un mayor conocimiento acerca de la ecología de este tercer dominio (Schleper *et al.* 2005).

La falta de trabajos y de información disponible sobre la ecología del plancton procariota en Colombia es un estímulo para desarrollar estudios que permitan tener un mejor conocimiento sobre la presencia, distribución y actividad de este dominio de organismos. El propósito de este trabajo de tesis es contribuir a este conocimiento a través de la valoración de las tasas de crecimiento de la comunidad procariótica total, de los dominios Archaea y Bacteria y de uno de sus grupos representativos β Proteobacteria en un sistema experimental *in situ* en el embalse de Neusa.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En Colombia los estudios sobre la dinámica y estructura del bacterioplancton son muy limitados; sin embargo, algunos trabajos muestran que la densidad de las poblaciones bacterianas son constantes en algunos cuerpos de agua lénticos (Canosa & Pinilla 1998, 1999). Se sabe que en el embalse de Neusa, un ecosistema acuático alto andino, la estructura y dinámica del bacterioplancton esta relacionada con los cambios en la densidad de los virus, los protozoos nanoflagelados y el fitoplancton. (Canosa 2000; Canosa *et al.* 2002; Canosa & Niño, 2005), pero no se conoce sobre el cambio del número de células en el tiempo, debido en parte a dificultades técnicas relacionadas con el muestreo en escalas temporales y espaciales.

Para tratar de entender la dinámica de la comunidad procariota en el embalse de Neusa, en este trabajo de grado se valoraron las tasas de crecimiento de la población procariota total, de los dominios Bacteria y Archaea y del grupo β Proteobacteria en microcosmos. Se utilizó un diseño experimental con bolsas de

diálisis y la técnica FISH para obtener datos de la densidad relativa de cada una de las poblaciones mencionadas.

2.1 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Se pretendió dar respuestas a las siguientes preguntas de investigación:

¿Existen diferencias significativas en las tasas de crecimiento de poblaciones de los dominios Archaea y Bacteria en el embalse del Neusa.?

¿Estas diferencias podrían explicar la baja representatividad del dominio Archaea en el mismo cuerpo de agua?

¿Tiene el grupo β Proteobacteria una mayor velocidad de crecimiento en el tiempo, lo que explicaría que este grupo sea el de más alta representatividad en el embalse?

¿Si existen esas diferencias, ello se podría comprobar en dos sitios contrastantes del embalse, una zona con características de contaminación y otra menos alterada?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar en dos regiones contrastantes del embalse de Neusa mediante un sistema experimental *in situ* las tasas de crecimiento, definidas como el cambio en el número de células por unidad de tiempo, de la comunidad procariótica total, de los dominios Archaea y Bacteria, y del grupo β Proteobacteria.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la densidad total de la comunidad procariótica y las densidades relativas de los dominios Bacteria y Archaea, y del grupo β Proteobacteria utilizando epifluorescencia y FISH.
- Cuantificar la constante de velocidad de crecimiento (g) de la comunidad procariótica total, los dominios Archaea y Bacteria y del grupo β Proteobacteria
- Relacionar y comparar las densidades y tasas de crecimiento de los grupos de procariotas estudiados para dilucidar la preponderancia de estas comunidades en el embalse.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SITIO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el embalse de Neusa, región de sub páramo, ubicado en el departamento de Cundinamarca (Colombia) a 2960 metros de altitud (msnm). La zona se caracteriza un régimen bimodal de lluvias con máximos de precipitación en abril y octubre y mínimos en junio a agosto y diciembre. Este embalse se utiliza como regulador de caudales, para la pesca, irrigación y abastecimiento de algunos acueductos regionales. Sus afluentes principales son los ríos Cubillos y las Juntas, que aportan cerca del 70% del caudal de entrada y pequeñas quebradas de caudales variables. Posee una profundidad máxima de 38 metros y es considerado como un sistema oligo-mesoeutrófico (Canosa & Pinilla 1999) (figura 5).

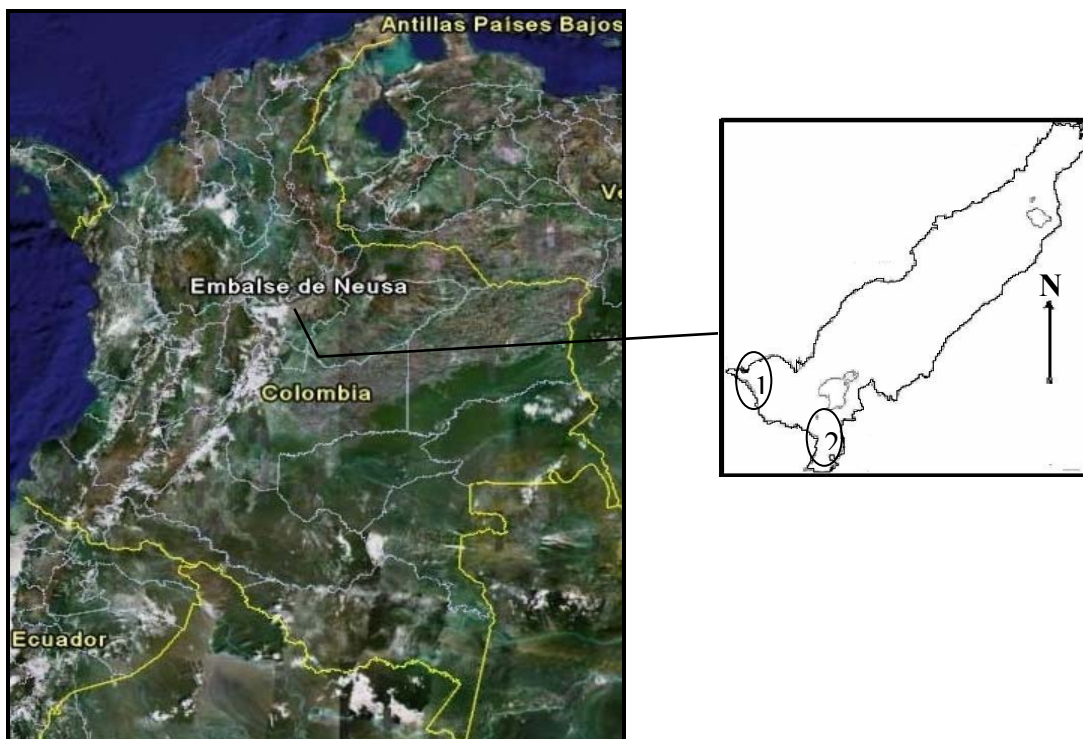
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar experimentalmente las tasas de crecimiento procariota *in situ* se realizó un diseño que consistió en retener en bolsas de diálisis determinada cantidad de agua del embalse. Se buscó así mantener las mismas condiciones ambientales del embalse (experimento *in situ*) favoreciendo entrada y salida de nutrientes (MOD) e impidiendo entrada y salida de los microorganismos. Para lograrlo se usaron bolsas de diálisis con 75 mm de diámetro y un corte de peso molecular (molecular mass cutoff) entre 12000 a 16000 Daltons (Herndl *et al.* 1993).

Los experimentos *in situ* se llevaron a cabo en dos localidades: una caracterizada por una mayor contaminación antropogénica, la entrada del Río Cubillos (estación 1) y otra menos impactada como el de la presa (estación 2) (figura 5).

En cada estación de trabajo se recolectaron mediante botellas de Van Dorn, 6 litros de agua superficial (0.5 mts), que se distribuyeron en porciones de dos litros en bolsas de diálisis, cada experimento se hizo por triplicado. Las bolsas se incubaron *in situ* a una profundidad de 50 cm por un periodo de cuatro días. Se tomaron muestras de 30 mL durante las 0, 4, 14, 24, 38, 48, 72 y 94 horas de incubación (t_0 , t_4 , t_{14} , t_{24} , t_{38} , t_{48} , t_{72} y t_{94}).

Figura 5. Localización del embalse de Neusa y sitios de incubación. 1: Río Cubillos y 2: La Presa



Fuente: Tomado de Google Earth.

4.2.1 Toma de muestras biológicas. En los distintos tiempos mencionados se tomaron asépticamente muestras de agua de cada una de las bolsas en las estaciones señaladas. Dichas muestras se fijaron inmediatamente y posteriormente fueron trasladadas al Laboratorio de Microbiología en la Universidad Jorge Tadeo Lozano donde finalmente se procesaron.

Para la determinación de la densidad procariota total se tomaron 12 mL de muestra que se fijaron con 2 mL glutaraldehído al 15% (concentración final 2.5 % v/v). Estas muestras se mantuvieron refrigeradas y protegidas de luz hasta su procesamiento. Para la determinación de los grupos seleccionados de procariotas por la técnica FISH se fijaron 6 mL de cada muestra con 18 mL de paraformaldehído al 4 % (pH 7.2) (proporción 1:3). Se filtró inmediatamente sobre filtros Nucleopore blancos de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore GTTP), y utilizando filtros de soporte de acetato de celulosa. Los filtros se mantuvieron refrigerados y a oscuras hasta su procesamiento (Canosa & Niño 2005).

4.3 FASE DE LABORATORIO

4.3.1 Estimación de la densidad procariótica total. Debido a que este trabajo forma parte de un proyecto general, los datos de densidad fueron suministrados (Canosa *et al.* 2008) para los análisis de esta tesis. Sin embargo brevemente se menciona el procedimiento empleado. Se usó la técnica de conteo directo por epifluorescencia (Hobie *et al.* 1977 Kepner & Pratt 1994), estandarizada en el Laboratorio de Microbiología de la Tadeo (Canosa & Pinilla 1999).

A 8 mL de la muestra fijada, se adicionaron 1 mL de diluyente (agua desionizada estéril filtrada) y 1 mL de naranja de acridina (AO), que se dejaron reaccionar por 15 minutos. Se filtraron 2 mL de la muestra teñida sobre membranas tipo Isopore

Nucleopore de policarbonato de 0.22 μm de diámetro de color negro (Millipore GTBP02500). Se utilizó para el conteo un microscopio Olympus BX 60 y filtro de excitación de 450-480 nm (luz azul). Los conteos se realizaron sobre campos microscópicos al azar, cubriendo la mayor parte del área del filtro. Se contaron un mínimo de 200 células por filtro.

Tabla 1. Sondas de oligonucleótidos empleadas en FISH para determinar la densidad relativa de Bacteria, Archaea y β Proteobacteria en un sistema experimental en el embalse de Neusa

Sonda	Especificidad	Secuencia específica 5'-3'	Diana rRNA/ posición	Fuente
ARCH915	Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	16S 915-935	Manz <i>et al.</i> 1992
EUB338	Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S 338-355	Amann <i>et al.</i> 1990
BET 42a	β Proteobacteria	GCCTTCCCACCTTCGTTT	23S 1027-1043	Manz <i>et al.</i> 1992
NON338	Control negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	16S 338-355	Wallner <i>et al.</i> 1993

Fuente: Investigador del Proyecto.

4.3.2 Determinación de la densidad relativa de los dominios Bacteria y Archaea y el grupo β Proteobacteria. Se empleó el procedimiento de hibridación *in situ* con sondas fluorescentes FISH, para lo cual se utilizaron sondas de oligonucleótidos DNA marcadas covalentemente en el extremo 5' con el fluorocromo Cy3 (Glockner *et al.* 1996, Amann *et al.* 1995, Seji 1998, Glockner *et al.* 1999, Moter & Gobel 2000, Pernthaler & Amann 2004). Se siguió el protocolo

estandarizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, con las sondas BET42a, EUB338, ARCH915 y la sonda blanco NON 388 (tabla 1) (Canosa & Niño 2005).

4.3.2.1 Procedimiento FISH.

Cortado y marcaje de cada sección de filtro. Cada uno de los filtros se dividió en el laboratorio en 5 fragmentos. Cada fragmento se marcó con el nombre de la sonda respectiva y el número de muestra. Para cada muestra se dejó un fragmento de filtro sin hibridar, que se utilizó como control de autofluorescencia.

Hibridación. Cada sección de filtro se colocó en láminas tratadas con gelatina (0.1%), se adicionaron 20 microlitros de buffer de hibridación (NaCl 5M; Tris-Hcl 1 M, pH 8.0; formamida 100 %; DDW; SDS 10%) con la sonda correspondiente en una concentración final de 2.5 ng/μL. Todas las hibridaciones se realizaron a 46° C por 90 minutos en una cámara húmeda. Para las cuatro sondas se usó una concentración de formamida de 35 %.

Lavado. Cada sección se sumergió en 50 mL de solución de lavado (NaCl 5M; Tris-Hcl 1 M, pH 8.0; EDTA 0.5 M, DDW, SDS 10%) por 15 minutos en Baño María a 48° C.

Contracoloración. Se utilizó el fluorocromo DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) con una concentración de 2 μg/μL y un tiempo de exposición de 4 minutos. Este fluorocromo tiñe la totalidad de células presentes en el filtro, que así pueden ser comparadas con la fracción de células en el filtro que fueron permeables a las sondas. Posteriormente los fragmentos de filtro se decoloraron con alcohol al 70 % y dejaron secar.

Montaje y conteo. Se usó una mezcla de Citifluor y Vectashield (4:1) como líquido de montaje. Para la observación de las células teñidas con DAPI y las células positivas para cada sonda, se utilizó un microscopio de epifluorescencia equipado con dos cubos de fluorescencia, uno con filtro de excitación en 535-550 nm para diferenciar las células teñidas con la sonda marcada con Cy3 y el otro con uno en 450-480 nm para contar todas las células (teñidas con DAPI).

Para el recuento y captura de las imágenes se usó una cámara monocromática (CCD de CoHu, Inc. Serie 4910 RS 170 y CCIR) conectada al analizador de imágenes Leica Qwin y el programa Image Tool. Los campos microscópicos 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 observables o detectables con Cy3 (anexo 1).

4.4 ESTIMACIÓN DE LAS TASAS ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO PROCARIOTA

Para determinar las tasas de crecimiento de la comunidad procariota total se asumió un crecimiento exponencial. Los cálculos se basaron en el cambio en el número de células en el tiempo.

Se usó la ecuación general de crecimiento:

$$k(\text{d}^{-1}) = \frac{\ln N_x - \ln N_0}{t_x - t_0}$$

Donde:

k es la tasa de crecimiento.

N_x (células. mL^{-1}) es el número de organismos en un tiempo final (t_x)

N_0 es el número de organismos (células. mL^{-1}) en un tiempo inicial t_0

$t_x - t_0$ tiempo de incubación.

También se obtuvieron tasas de crecimiento de Bacteria, Archaea y del grupo β Proteobacteria de acuerdo a los datos de abundancia relativa obtenidos con la técnica FISH durante el experimento *in situ* en los intervalos de los tiempos de incubación (t_0 , t_4 , t_{14} , t_{24} , t_{38} , t_{48} , t_{72} y t_{94}).

El tiempo de generación para la comunidad procariota total, Bacteria, Archaea y β Proteobacteria se calculó a partir de la ecuación general $g = \ln 2/k$. (Anexo 2)

4.5 TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS

Se buscaron relaciones entre la comunidad procariota total, y los miembros de los dominios Archaea y Bacteria y el grupo β Proteobacteria en las dos estaciones de muestreo con el análisis de correlación de Spearman. Las diferencias entre las variables biológicas en los intervalos de incubación y las dos estaciones se probaron con ANOVA factorial de tres vías. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación es uno de los primeros que aborda el estudio de la dinámica del crecimiento *in situ* de las comunidades procariotas desde una perspectiva experimental en un sistema acuático de alta montaña en Colombia. Con el uso de muestras obtenidas a partir de bolsas de diálisis se buscó una mayor aproximación a las condiciones naturales de cada uno de los sitios, permitiendo que las poblaciones incubadas no se vieran afectadas por la disponibilidad del sustrato, la temperatura y otras variables físicas, químicas y bióticas del ambiente.

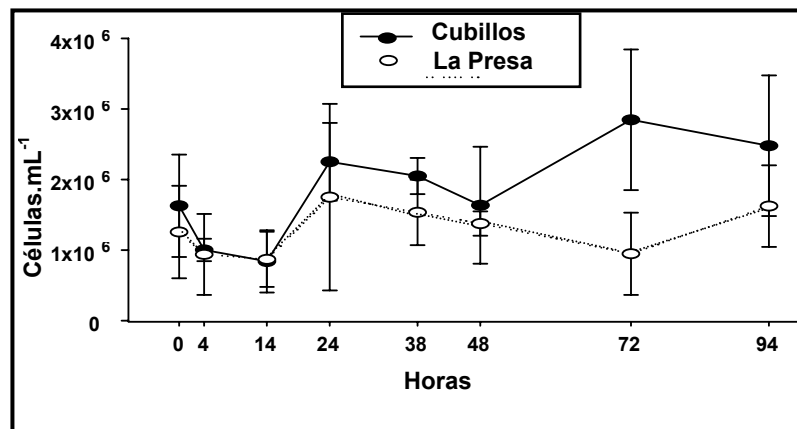
La temperatura promedio encontrada en el embalse durante el experimento *in situ* fue de 15° C. Se obtuvieron valores promedio de clorofila *a* antes y al final del experimento en la Presa y Cubillos de 17.5 µg/L y 19.4 µg/L respectivamente. La densidad procariota promedio para Cubillos fue de 1.8×10^6 células. mL⁻¹ y de 1.3×10^6 células. mL⁻¹ para La Presa (Canosa *et al.* 2008).

5.1 DENSIDADES, TASAS DE CRECIMIENTO Y TIEMPOS DE GENERACIÓN DE LA COMUNIDAD PROCARIOTA

Se encontró un comportamiento similar en las densidades de los procariotas en las muestras tomadas de los sistemas experimentales en el embalse, especialmente en las primeras 24 horas (figura 6). Dentro de este intervalo de tiempo las densidades disminuyeron a partir de t_0 hasta t_{14} y aumentaron para t_{24} . Posteriormente disminuyeron levemente para aumentar principalmente en las bolsas incubadas en el río Cubillos.

En Cubillos, un rápido aumento en las densidades desde t_{48} hasta t_{72} marcó el máximo durante el estudio, hacia el final del experimento (t_{94}) la densidad decreció levemente. Para La Presa se presentó un descenso constante en las densidades desde t_{24} hasta t_{72} , posteriormente aumentó hasta el final del experimento (t_{94}) (figura 6; tabla 2).

Figura 6. Variaciones de la densidad total de procariotas determinadas durante la incubación de los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa.



Fuente: Investigador del Proyecto.

Las densidades de la comunidad procariota fueron mayores en el microcosmos incubado en Cubillos, se encontraron correlaciones positivas significativas con el tiempo de muestreo ($r=0.75$), con el grupo β -Proteobacteria ($r=0.71$) y con las densidades del dominio Bacteria ($r=0.95$) (tabla 2). En tanto que en el experimento incubado en La Presa solo se encontró correlación entre las densidades de la comunidad procariota y el dominio Bacteria ($r=0.82$). Los resultados sugieren la predominancia del dominio Bacteria dentro de la abundancia total de procariotas en el embalse y un aumento aparente de las poblaciones de organismos de β -

Proteobacteria en respuesta a procesos de contaminación como aquellos que se dan en el sector de Cubillos en el embalse.

Tabla 2. Abundancia total de procariotas en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa.

Tiempo	Densidad Procariota Células. mL ⁻¹	
	Cubillos	La Presa
0	1.6 x 10 ⁶	1.3 x 10 ⁶
4	1.0 x 10 ⁶	9.4 x 10 ⁵
14	8.4 x 10 ⁵	8.7 x 10 ⁵
24	2.3 x 10 ⁶	1.8 x 10 ⁶
38	2.0 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶
48	1.6 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶
72	2.8 x 10 ⁶	9.5 x 10 ⁵
94	2.5 x 10 ⁶	1.6 x 10 ⁶

Fuente: Investigador del Proyecto.

Tabla 3. Coeficientes de correlación entre las densidades de procariotas y los grupos en estudio en el sistema experimental incubado en Cubillos.

	Tiempo	Densidades Procariotas	Eubacteria	β Proteobacteria
Tiempo				0.84**
Procariota	0.75**		0.95**	0.71*
Eubacteria	0.85**	0.95**		0.86*

** Correlación significativa al nivel de 0.01

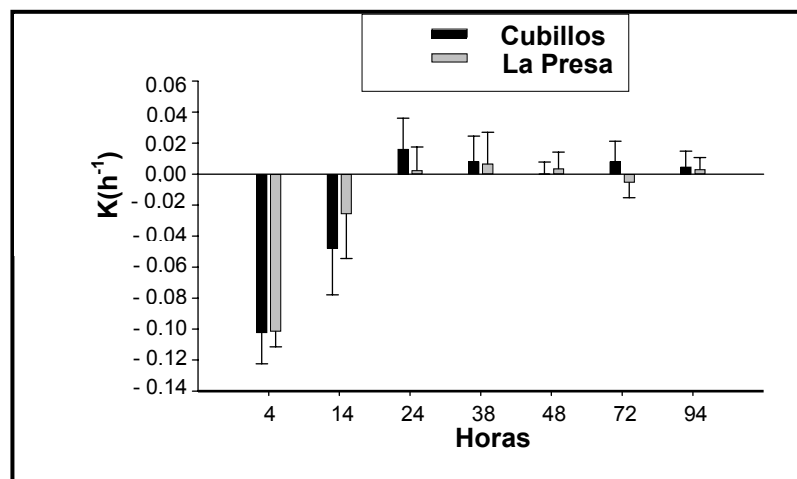
* Correlación significativa al nivel de 0.05

Fuente: Investigador del Proyecto.

La tasa de crecimiento total procariota en el sistema experimental incubado en Cubillos (t_0 a t_{94}) fue de 0.0046 h^{-1} y el tiempo de generación en el mismo período de 149.5 horas (6.2 días). En las primeras 14 y después de las 24 y las 72 horas de incubación, la tasa específica de crecimiento fue negativa (disminución del crecimiento, por muerte o pérdida de células) solamente se observó crecimiento exponencial entre las 14 a 24 y de las 48 a 72 horas (figura 6), en estos intervalos, se obtuvieron tasas de crecimiento de 0.0098 y de 0.023 h^{-1} con tiempos de generación de 7 y de 30 horas respectivamente (figura 7).

En La Presa la tasa de crecimiento total fue de 0.0032 h^{-1} con un tiempo de generación de 215.9 horas (8.9 días). El crecimiento exponencial se observó en dos intervalos, entre las 14 a 24 y 72 a 94 horas, con tasas de crecimiento de 0.07 h^{-1} y 0.024 h^{-1} y tiempos de generación de 9.9 y 28.3 horas respectivamente (figura 7). Aparentemente en ambos sitios las tasas de crecimiento son similares, ligeramente mayores en la entrada del río Cubillos en el cual se encuentra la mayor alteración antropogénica.

Figura 7. Variación en las tasas de crecimiento procariota en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa durante todo el período del estudio.



Fuente: Investigador del Proyecto.

No se encontraron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de los organismos procariotas entre los dos sitios de incubación en el embalse ($p=0.89$) pero sí las hubo entre los grupos procariotas y las diferentes horas de muestreo ($P= 0.001$) ANOVA $P \leq 0.05$) (tabla 4).

Tabla 4. Diferencias estadísticamente significativas entre tasas de crecimiento y sitios de incubación, tiempo de muestreo y grupos de organismos en estudio (Procariota, Bacteria, β Proteobacteria y Archaea). ANOVA de tres vías.

Variables	F	P
Horas de muestreo	0.880072	0.513236
Sitios de incubación	0.016403	0.898397
Grupo de bacterias	1.650345	0.198147
Tiempo de muestreo * Sitios de incubación	2.056352	0.067041
Tiempo de muestreo * grupo de bacterias	3.137210	0.001012
Sitios de incubación * grupo de bacterias	0.182964	0.833129
Hora de muestreo* Sitio de incubación * grupo de bacterias	0.623332	0.816782

Nivel de significancia $P \leq 0.05$.

Fuente: Investigador del Proyecto.

Las tasas de crecimiento encontradas en este trabajo son similares a las encontradas por Jugnia *et al.* (2006) en el bacterioplancton de embalses mesoeutróficos ($0.013 - 0.07 \text{ h}^{-1}$). Weinbauer *et al.* 2003 reportaron para la zona de entrada del afluente principal de un embalse mesoeutrófico un valor más alto de 0.03 h^{-1} y en la zona menos eutrófica valores más bajos (0.01 h^{-1}), sugiriendo un mayor crecimiento procariota en ambientes con mayor presencia de nutrientes.

En Neusa, la entrada del río Cubillos al embalse transporta gran cantidad de nutrientes lo que sumado a la presencia de macrófitos litorales en esta zona representan un importante aporte de material orgánico (Canosa & Niño 2005). Esta situación permite proponer que los procariotas en este sitio juegan un papel importante en el rápido aprovechamiento de nutrientes, hipótesis que está corroborada por las mayores densidades procariotas y menores tiempos de generación encontrados en este trabajo en esta zona.

Aunque la medición de la densidad viral no fue un objetivo en este estudio, se debe considerar que la lisis viral, mecanismo de control (top-down), puede influenciar la dinámica de crecimiento de la comunidad procariota y los demás grupos (Weinbauer *et al.* 2003).

Canosa *et al.* (2008) encontraron una mayor presencia de virus en Cubillos en t_{48} (2.3×10^7 psv. mL^{-1}) y en t_{24} para La Presa (2.0×10^7 psv. mL^{-1}), correspondiéndose con momentos en los cuales la abundancia de células procariotas disminuyó levemente, principalmente en Cubillos en donde las densidades celulares disminuyeron a medida que los virus alcanzaron su máxima abundancia. Este aumento en la densidad viral (t_{48}) coincide también con la disminución en la tasa de crecimiento (de 0.016 a 0.0021 h^{-1}) en Cubillos, mientras que en La Presa las tasas de crecimiento específicas se mantuvieron relativamente constantes, con excepción de t_{72} cuando se presentó un valor negativo. Algunos estudios muestran que la lisis viral es un factor que conlleva a variaciones en las tasas de crecimiento de los procariotas con relativa frecuencia, y que el efecto del ataque viral es más significativo en ambientes más productivos (Abedon 2008; Bettarel *et al.* 2004; Weibauer *et al.* 2003).

5.2 DENSIDADES RELATIVAS DE EUBACTERIA, ARCHAEA Y BETA PROTEOBACTERIA OBTENIDAS CON LA TÉCNICA FISH

5.2.1 Densidades relativas del dominio Eubacteria.

En la tabla 5 se muestran los porcentajes de hibridación encontrados para todos los grupos estudiados, durante los tiempos de incubación definidos, en los experimentos ubicados en la entrada del río Cubillos y en La Presa en el embalse del Neusa.

Tabla 5. Fracción (%) del total de células detectadas con las sondas usadas en este trabajo para Eubacteria (EUB338), β Proteobacteria (BET42a), Archaea (ARCH915) y la sonda control (NON338).

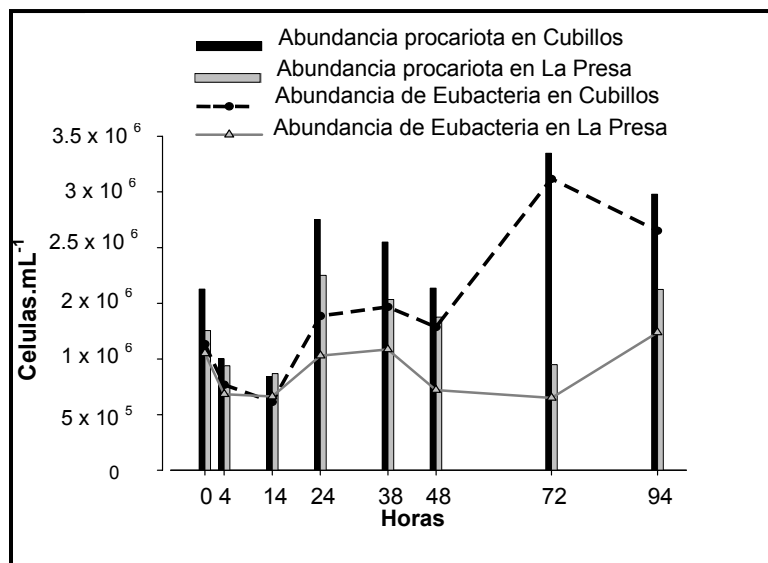
Tiempo (horas)	Bacteria		β Proteobacteria		Archaea		Control Negativo	
	Cubillos	La Presa	Cubillos	La Presa	Cubillos	La Presa	Cubillos	La Presa
0	69.8	83.8	35.2	21.1	3.2	2.1	1.42	1.11
4	77.1	71.7	55	64.2	3.6	3	1.66	3.73
14	70.7	75	27.6	37.2	2.6	3.8	0.69	0.83
24	60.8	62.9	24.5	19.8	1	0.6	0.40	0.43
38	71.2	71.7	9	5.6	1.2	2.2	0.32	0.67
48	79.5	52	47.2	10.5	0.8	0.3	0.39	0.51
72	91.4	66.7	60.6	41.5	1.7	1.2	0.70	0.87
94	87	76.6	68.8	48.3	2.3	1	0.69	0.35
Media	75.9	70.03	41	31	2	1.8	0.78	1.06
DVS	9.4	9.6	20.4	20.1	1	1.2	0.49	1.11

Fuente: Investigador del Proyecto.

La eficiencia de hibridación definida como la totalidad de células detectables con la sonda del dominio Bacteria, EUB338, mostró una eficiencia del 76 % (DVS \pm 10%) del total de las células teñidas con DAPI para el río Cubillos. Se encontró una leve disminución en t_{24} , sin embargo a las 38 horas se observó un aumento constante en los porcentajes de células que hibridaron con la sonda EUB338 hasta el final del experimento (figura 8).

En La Presa, la eficiencia de hibridación fue de 70 % (DVS \pm 9.6 %) del total de las células teñidas con DAPI (tabla 5). Al igual que en Cubillos, se presentó una disminución en el porcentaje de células en t_{24} , aumentando levemente para t_{38} , posteriormente se observó una disminución para t_{48} , a partir de este momento aumentan las densidades hasta el final del experimento (tabla 5).

Figura 8. Variaciones en las densidades celulares del dominio Bacteria y la comunidad procariota total en los dos sistemas experimentales en el embalse de Neusa.



Fuente: Investigador del Proyecto.

Se encontraron diferencias numéricas cuando se compararon las densidades de organismos del dominio Bacteria respecto a la comunidad procariota total (figura 8). Desde un punto de vista teórico se esperaría que la fracción total de células procariotas esté conformada por una mayor proporción de células del dominio Bacteria y una porción restante por células pertenecientes a Archaea. Sin embargo las proporciones de Archaea, en este estudio, fueron muy bajas.

De acuerdo a la técnica, la señal positiva de una célula procariota detectada con FISH en una muestra ambiental permite identificar el organismo así como mostrar su presencia en dicho ambiente. Sin embargo la ausencia de señales de hibridación con la técnica FISH y una sonda específica, por ejemplo EUB338, no necesariamente indica que el organismo no está presente en el ambiente, esto está relacionado con algunas de las desventajas del procedimiento. Primero, se necesitan un número mínimo de células de 10^3 - 10^4 células.mL⁻¹ para ser detectables. En segundo lugar, se debe considerar que algunos tipos celulares procariotas, como por ejemplo bacterias Gram positivas y arqueas, pueden resultar impermeables a las sondas de oligonucleótidos debido a su envoltura o pared celular característica, incluso después de las actividades de fijación. Otro factor que se debe tener en cuenta es la distinta actividad de las diferentes células en la columna de agua.

Se cree que una determinada fracción del plancton procariota está conformada por células inactivas, las cuales por tanto presentarían pocos ribosomas, lo cual dificulta su detección en el procedimiento clásico de FISH utilizado en este estudio (Amann *et al.* 1995, Lebaron *et al.* 2004, Pedros-Alio 2006, Glockner *et al.* 1999). En la figura 9 se muestran imágenes obtenidas con el uso de la sonda EUB338.

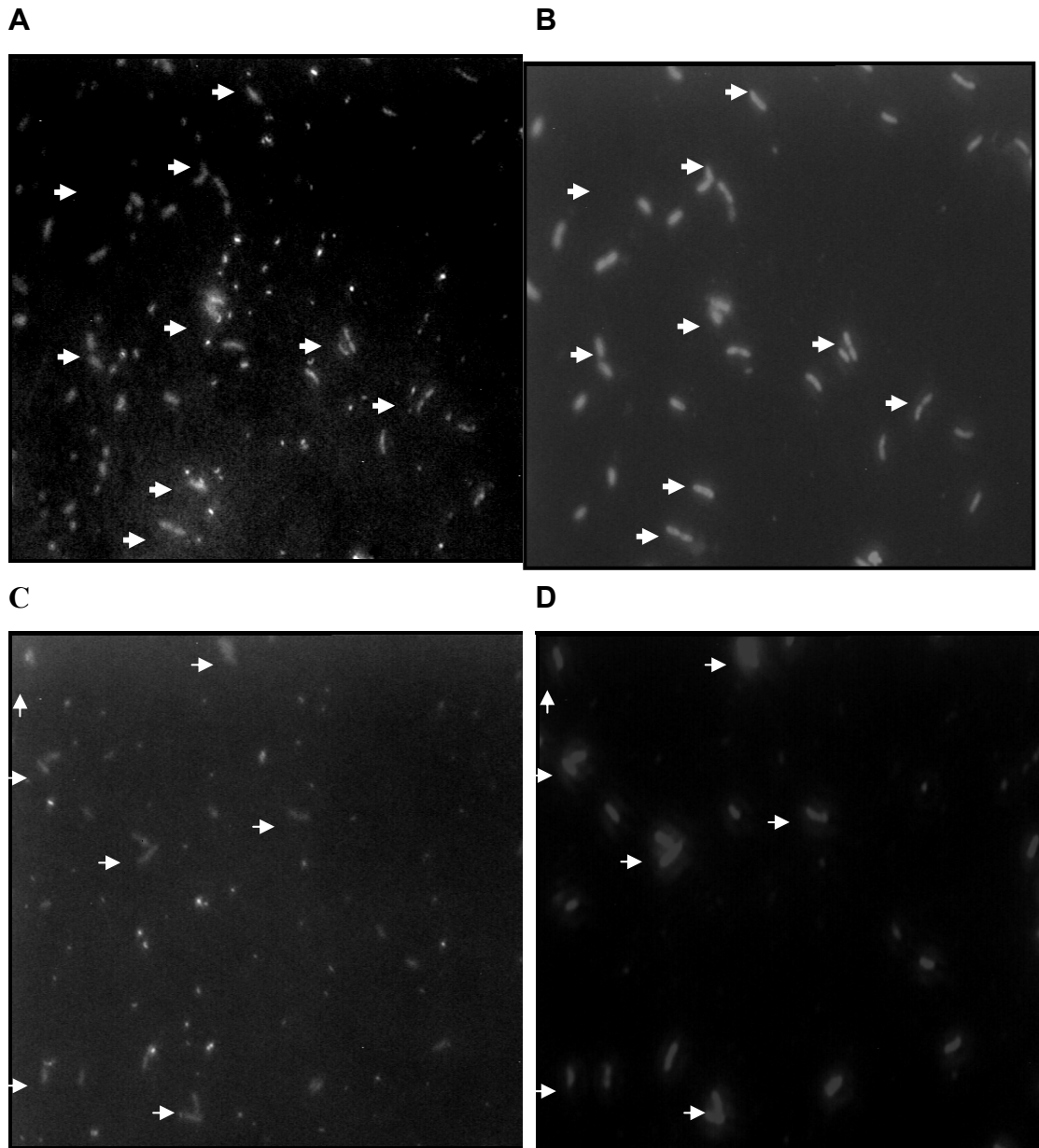
5.2.2 Densidades relativas de las poblaciones de β Proteobacteria.

Canosa & Niño (2005) reportaron una importante dinámica espacial y temporal del grupo β Proteobacteria en el embalse de Neusa, sugiriendo que estas poblaciones son un componente clave en este sistema. De acuerdo a los resultados encontrados en este estudio, la proporción de β Proteobacteria en las bolsas incubadas en Cubillos fue 41% (DVS \pm 20), y en La Presa 31 % (DVS \pm 20) (tabla 5). Los dos sitios presentaron una dinámica similar en cuanto a la proporción y densidad de los organismos en este grupo (figura 10). También se encontró una correlación fuerte de este grupo con Eubacteria en Cubillos ($r=0.86$) situación no encontrada en La Presa (tabla 3).

Se observó un aumento en las densidades relativas de β Proteobacteria desde t_0 a t_4 , en los dos sitios de incubación (55 % cubillos y 64 % La Presa), a partir de t_4 hubo un descenso constante hasta t_{38} , en este tiempo se alcanzaron mínimos porcentajes tanto para Cubillos (9.0 %, DVS \pm 4 %) como para La Presa (5.6 %, DVS \pm 0.3%). A partir de las 38 horas de incubación se encontró un aumento en las densidades, alcanzando un pico máximo en Cubillos de 69 % (DVS \pm 17.7) y una densidad relativa final de 48% (DVS \pm 8.6) para La Presa a las 94 horas (figura 10 y tabla 5).

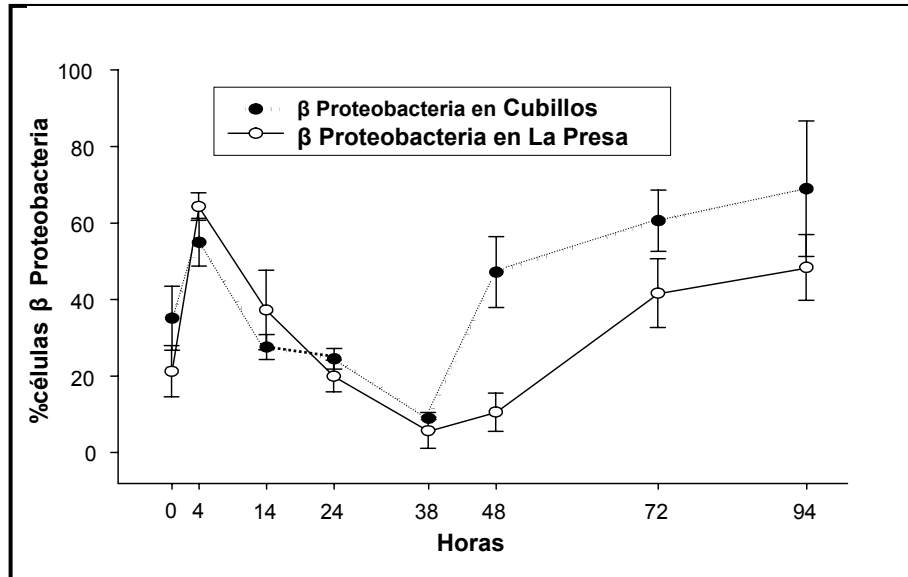
Simek *et al.* (2001), encontraron en un embalse meso-eutrófico porcentajes similares de β Proteobacteria al evaluar la participación de diferentes grupos bacterianos en la estructura de la comunidad procariota en similares condiciones de incubación a las utilizadas en este estudio; estos autores destacan la elevada proporción de este grupo respecto a Bacteria y lo proponen como un grupo fundamental dentro de los procesos de producción de biomasa bacteriana en la columna de agua.

Figura 9. (a) y (c) número total de células coloreadas con DAPI y capturadas con luz ultravioleta. (b) y (d) los mismos campos en los que se aprecian las células hibridadas con la sonda EUB388 marcada con Cy3 y capturadas con luz verde.



Fuente: Investigador del Proyecto.

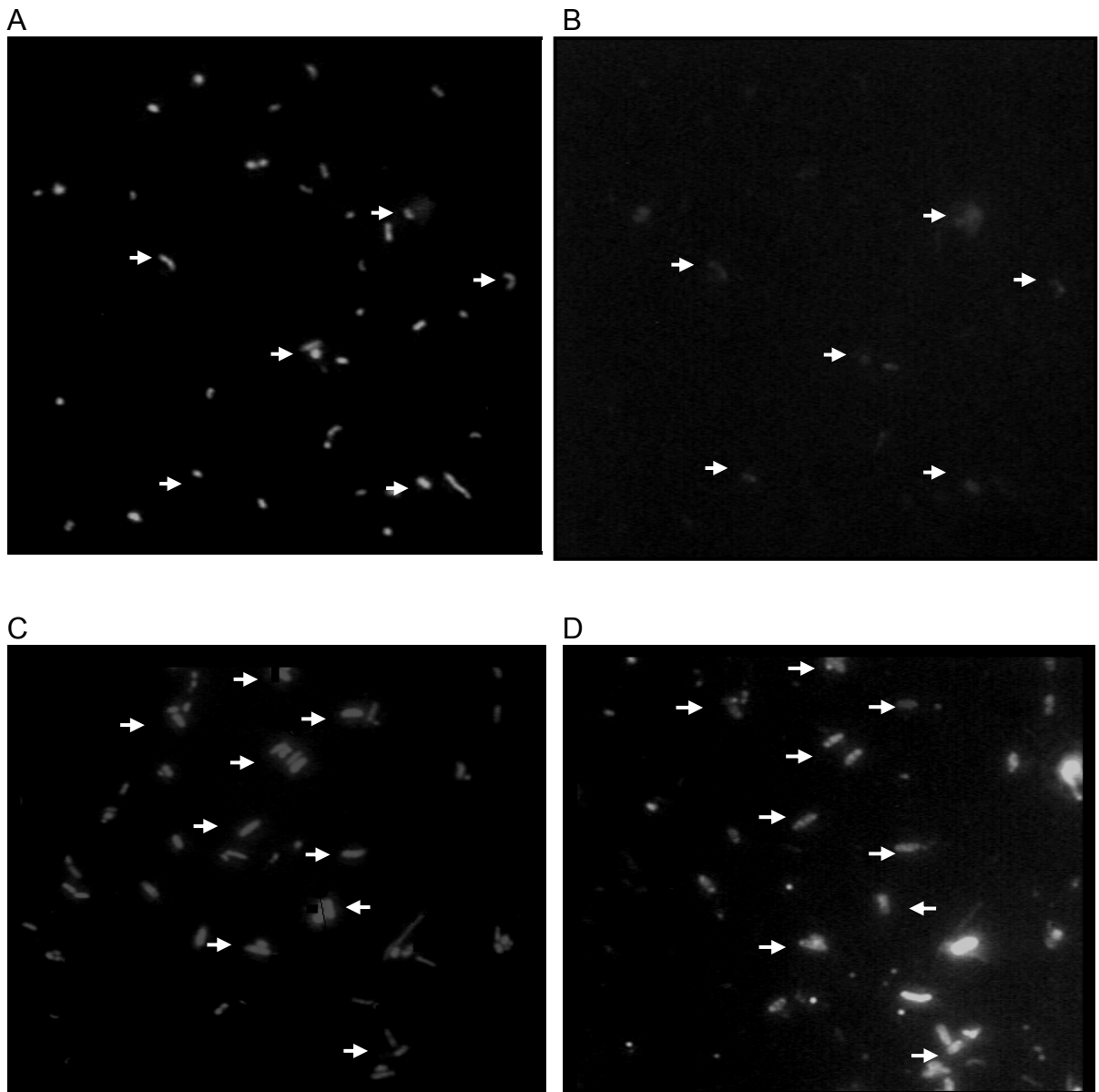
Figura 10. Variación de los porcentajes de células hibridadas para la sonda BET42a en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa.



Fuente: Investigador del Proyecto.

La mayoría de células que hibridaron con la sonda EUB338 a partir de t_{48} , correspondieron a β Proteobacteria, cabe señalar que en muchos casos se observó un aumento en el tamaño celular así como una mayor intensidad en la señal de hibridación (figura 11). Los mecanismos que inducen el aumento de tamaño, como el observado en este trabajo, es una cuestión bastante discutida en el campo de la ecología microbiana acuática, fenómeno observado principalmente cuando los procariontes están sometidos a procesos de depredación.

Figura 11. (a) y (b) imágenes de las muestras en las primeras horas de incubación. (a) Abundancia total en el campo (DAPI y luz ultravioleta) (b) abundancia de β Proteobacteria en el mismo campo (sonda BET42a y Cy3). (c) y (d) imágenes capturadas después de 48 horas de incubación. (c) abundancia total de células en el campo (d) células hibridadas con la sonda β Proteobacteria. Las flechas indican las correspondientes células que hibridaron.



Fuente: Investigador del Proyecto.

Muchos modelos de interacción depredador-presa (Simek *et al.* 2001) señalan la aparición de células grandes como una respuesta ante una fuerte presión de depredación por parte del zooplancton, heterótrofos nanoflagelados y ciliados, es decir, control "Top-down" (Simek *et al.* 1997, Jürgens *et al.* 1999; Langenheder & Jürgens 2001, Jezbera *et al.* 2005). También podrían indicar una respuesta indirecta ante el reciclaje de nutrientes, control "Bottom-up", producto de la constante depredación y liberación de MOD, la cual las bacterias aprovecharían para crecer (Pernthaler *et al.* 1997).

Ya se había reportado en el embalse de Neusa una situación similar en la que el aumento en las densidades de β Proteobacteria se correlacionó significativamente con la disminución en las densidades de uno o varios grupos bacterianos (como α y/o γ Proteobacteria y/o el grupo *Cytophaga-Flavobacterium*) (Canosa & Niño 2005). En este estudio, el hallazgo de aumento de tamaño celular en miembros de β Proteobacteria después de la mitad del experimento (t_{48} - t_{94}), permite valorar alguna dinámica de control y actividad de este grupo en el embalse.

De acuerdo a los resultados encontrados en el microcosmos en el Neusa se podría proponer algún mecanismo temporal en el que el grupo β Proteobacteria muestra una selección positiva (comestibles) hasta las primeras 48 horas de incubación (t_{48}) y una selección negativa (no comestibles) a partir de las 48, 72 y 96 horas de incubación. Posiblemente las poblaciones de β Proteobacteria sometidas a esta constante selección positiva por parte de los protozoos, como respuesta logran células con un marcado elongamiento celular, lo cual estratégicamente les permitiría evitar a sus depredadores inmediatos (selección negativa). Posiblemente esta dinámica estaría funcionando en cortos intervalos de tiempo dentro del embalse. Ya Jezbera *et al.* (2005) sugirieron un posible modelo de selectividad de tamaño sobre las tasas de ingestión de diferentes grupos bacterianos por los protozoos (índices de selectividad de los depredadores).

Finalmente, debe señalarse que también una entrada inusitada de nutrientes o de carbono orgánico (no medido en este estudio) podría estimular el desarrollo, las células más activas podrían aumentar su tamaño y acelerar sus tasas de crecimiento (figura 7 y tabla 4). Hahn *et al.* (1999) reportaron este tipo de respuesta fisiológica en diferentes grupos del bacterioplancton, sin embargo no encontraron una correlación significativa entre la respuesta fisiológica y la presión de depredación. Este resultado sugiere que esta respuesta de las bacterias era mas bien función de la tasa de crecimiento e independiente de la presencia del depredador.

5.2.3 Densidades relativas de organismos del dominio Archaea.

Las densidades relativas del dominio Archaea detectadas con la sonda ARCH915, en Cubillos fueron de 2 % (DVS \pm 1 %) y para La Presa de 1.6 % (DVS \pm 1.2 %) (tabla 5). Estos porcentajes son mas bajos que los encontrados en 2005 en las aguas del embalse (Canosa & Niño 2005), sin embargo los datos coinciden con otros encontrados en la literatura para sistemas acuáticos continentales (Glockner *et al.* 1999, Langenheder & Jürgens 2001).

En el sistema experimental dispuesto en Cubillos las densidades relativas aumentaron hacia t_4 (3.6 %) y disminuyeron rápidamente en las primeras 24 horas de incubación (1%), para t_{38} aumentaron levemente y sobre las 48 horas de incubación disminuyeron alcanzando el valor mas bajo (0.8 %), a partir de t_{48} se observó un aumento hasta el final del experimento (figura 12; tabla 5). En el experimento ubicado en La Presa se observó un aumento en las densidades relativas hasta t_{14} (3.8 %), posteriormente al igual que en Cubillos disminuyeron significativamente hasta t_{24} , con valores muy bajos en t_{48} (0.3 %) (figura 13).

Algunos de los valores hallados para las poblaciones de arquea estuvieron por debajo del límite de detección (< del 1%; tabla 5). Además no se encontró alguna correlación significativa entre su abundancia y los demás grupos estudiados.

Figura 12. Variación en las densidades relativas de Archaea en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa.

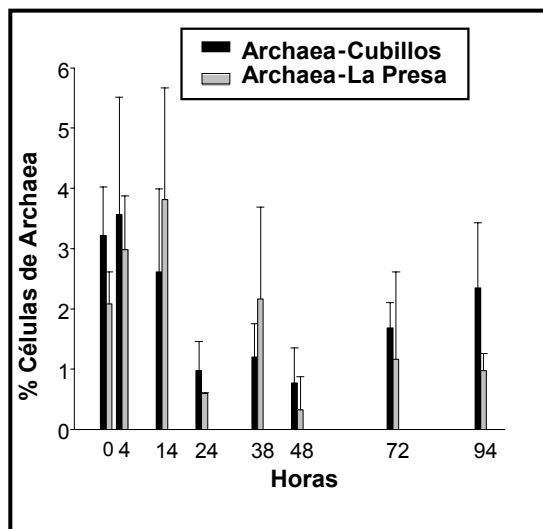
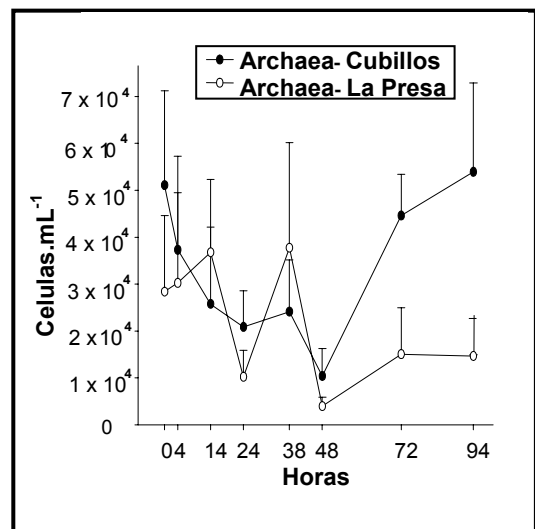


Figura 13. Variación en las densidades del dominio Archaea en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa.



Fuente: Investigador del Proyecto.

Recientes estudios sobre el “arqueoplancton” en sistemas acuáticos indican que los máximos de abundancia ocurren en momentos específicos del ciclo anual (Pernthaler *et al.* 1998, Massana *et al.* 1998). En sistemas acuáticos tropicales se ha asociado la presencia de significativas abundancias de arqueas a actividad metanogénica en el hipolimnion y en zonas anóxicas, mientras que en el epilimnion mostraban abundancias bajas (Jürgens *et al.* 2000, Wells & Deming 2003, Lehours *et al.* 2005, Dumestre *et al.* 2001).

También parece haber una relación entre la presión por HNF y el incremento de la densidad de arquea (Langenheder & Jürgens 2001), lo que puede sugerir que los pequeños incrementos en la abundancia hallados en este estudio podrían estar ligados a este factor de control. Sin embargo cualquier afirmación está sujeta a estudios más detallados.

Hasta el momento es claro que los organismos de este dominio son activos y están involucrados en la incorporación de aminoácidos en la columna de agua (Ouverney & Furhman 2000).

5.3 TASAS DE CRECIMIENTO Y TIEMPOS DE GENERACION DE LAS POBLACIONES DE EUBACTERIA, β PROTEOBACTERIA Y ARCHAEA

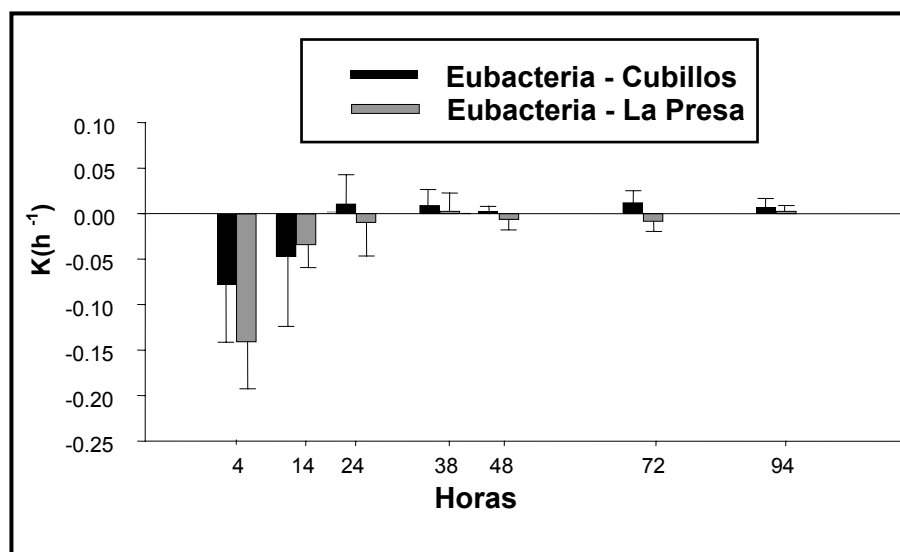
5.3.1 Tasas de crecimiento y tiempo de generación del dominio Eubacteria.

La tasa de crecimiento de Bacteria desde el inicio hasta el fin del experimento en Cubillos (t_0 - t_{94}), fue de 0.069 h^{-1} y el tiempo de generación de 99.8 horas (4.1 día). En las primeras 14 horas de incubación ($t_0 - t_{14}$) se hallaron valores negativos en las tasas de crecimiento. Se encontró crecimiento exponencial entre las 14 a 24 horas y en el intervalo comprendido entre las 48 y 72 horas. En estos intervalos se obtuvieron tasas de crecimiento de 0.081 h^{-1} y 0.03 h^{-1} con tiempos de generación de 8.5 y 23.4 horas respectivamente (figura 14).

En el experimento incubado en La Presa la tasa de crecimiento total fue de 0.002 h^{-1} con un tiempo de generación de 310.4 horas (12.9 días). En los intervalos $t_{24} - t_{38}$ y t_{72} - t_{94} , se observó crecimiento exponencial con tasas de crecimiento de 0.044 h^{-1} y 0.029 h^{-1} y tiempos de generación 15.7 y 23.7 horas respectivamente. El alto

valor en el tiempo de generación total (310.4 horas) y en los intervalos de crecimiento exponencial refleja el lento y escaso crecimiento celular posiblemente de la mayoría de poblaciones procariotas en esta zona (figura 14).

Figura 14. Variaciones en las tasas de crecimiento de Eubacteria en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa.



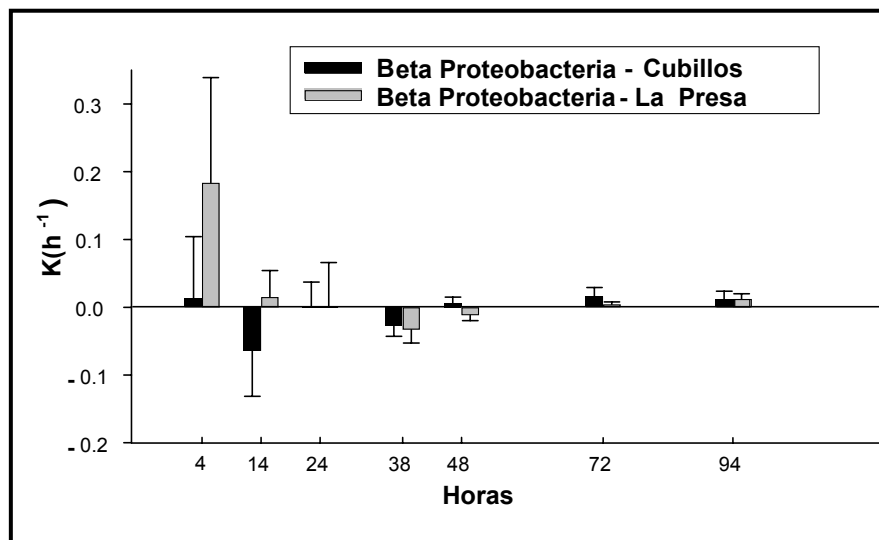
Fuente: Investigador del Proyecto.

5.3.2 Tasas de crecimiento y tiempo de generación de β Proteobacteria.

La tasa de crecimiento total (t_0 - t_{94}) de β Proteobacteria en el sistema experimental ubicado en Cubillos fue de $0.01 h^{-1}$ y el tiempo de generación de 59.1 horas (2.5 días). Solo se observó crecimiento exponencial en los intervalos de tiempo entre las 14 y 24 (t_{14} - t_{24}) y las 38 y 94 (t_{38} - t_{94}) horas de incubación con tasas de crecimiento de $0.092 h^{-1}$ y $0.004 h^{-1}$, lo que corresponde a 7.5 y 16.9 horas de generación respectivamente (figura 16). En La Presa la tasa de crecimiento total

fue de 0.012 h^{-1} con un tiempo de generación de 56.7 horas (2.4 días). Se encontró crecimiento exponencial a las 38 horas hasta el final del experimento ($t_{38} - t_{94}$) con una tasa de crecimiento de 0.037 h^{-1} y un tiempo de generación 18.8 horas (figura 15).

Figura 15. Variación en las tasas de crecimiento de β Proteobacteria en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa.



Fuente: Investigador del Proyecto.

Los tiempos de generación obtenidos señalan una mayor velocidad de crecimiento en organismos de β Proteobacteria respecto a Bacteria, debido probablemente a que los miembros de este grupo están mejor adaptados a las condiciones del embalse. Esta adaptación podría estar relacionada con la capacidad de respuesta rápida al proceso de depredación o con la capacidad de compensación de muerte celular gracias a rápidas tasas de crecimiento. La mayor velocidad de crecimiento en el sistema experimental incubado en Cubillos, puede ser debida además a la mejor disponibilidad de recursos en este sitio en el embalse.

Los tiempos de generación encontrados llevan a especular sobre las estrategias de los miembros de β Proteobacteria (y otros grupos procariotas) con cambios en características fenotípicas como el alargamiento celular y formación de células filamentosas. Aparentemente estas características están relacionadas con tasas de crecimiento constantes (MacArthur 2006). Probablemente esto explique lo observado con el grupo β Proteobacteria al final del experimento (t_{72} - t_{94}) cuando se observaron tasas de crecimiento relativamente constantes y positivas (figura 15), además de la respuesta fenotípica de elongación celular (figura 11). Igualmente esta característica podría capacitar a las bacterias para competir de una manera más activa bajo condiciones favorables de recursos, como en el caso de Cubillos, en donde se pudo observar un crecimiento más activo y constante que en La Presa a partir de las 48 horas de incubación.

Otros resultados encontrados dentro del proyecto marco de este trabajo de tesis mostraron máximos de abundancia viral en t_{24} en La Presa y t_{48} en Cubillos (Canosa et al. 2008). En La Presa se halló una marcada reducción en las tasas de crecimiento de β Proteobacteria, alcanzando una tasa de crecimiento negativa en t_{38} , posiblemente como consecuencia de la constante presión y frecuencia de infección viral. En Cubillos la tasa de crecimiento parece no verse afectada, pues en el momento de máxima abundancia de virus se encuentra una tasa de crecimiento positiva. Canosa & Niño (2005), encontraron en el mismo embalse y en condiciones naturales una fuerte correlación positiva entre las densidades virales y β Proteobacteria, en tanto que con otras poblaciones como las de γ Proteobacteria fue negativa; Weinbauer et al. (2003) registraron un comportamiento similar. Lo discutido sugiere que la lisis viral también limitaría poblaciones de β Proteobacteria en esos intervalos de tiempo y favorecería otros grupos. Sin embargo esta hipótesis requiere estudios adicionales, ya que no se evaluó la abundancia de otros grupos.

Thingstad (2000), plantea que los virus actúan como un factor equilibrador que permite la coexistencia de especies procariontas con diferentes tasas de crecimiento (hipótesis denominada “killing the Winner”). Weinbauer *et al.* (2003) sugieren de una manera atractiva que respuestas fisiológicas como el alargamiento celular no son solo una estrategia ante la presión de pastoreo por parte de los protozoos, si no que posiblemente muestran una estrategia de evasión a la alta densidad viral. Los datos experimentales encontrados en Cubillos, en los que el máximo de abundancia de virus coincide con la formación de células alargadas y con tasas de crecimiento positivas permite especular con los resultados encontrados en este trabajo se corresponderían con esta hipótesis, aunque no todos los autores coinciden con ella (p. ej, McArthur 2006).

5.3.3 Tasas de crecimiento y tiempos de generación del dominio Archaea.

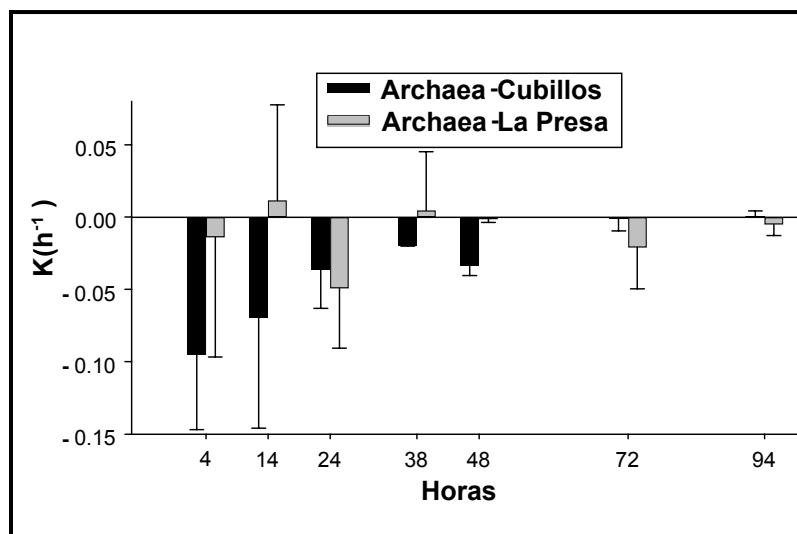
En el experimento incubado en Cubillos la tasa de crecimiento total fue de 0.00052 h^{-1} y el tiempo de generación de 1323.5 horas, lo que implicaría que a estas poblaciones les tomaría 55.1 días para duplicarse. Las tasas específicas de crecimiento fueron negativas desde el t_4 hasta t_{72} . Sin embargo, cuando se valoró el crecimiento en la región exponencial, t_{72} - t_{94} , se obtuvo una tasa de crecimiento de 0.0086 h^{-1} y un tiempo de generación de 80.5 horas (3.35 días) (figura 16).

En La Presa la tasa de crecimiento total fue negativa (-0.0050 h^{-1}), sin embargo se observó crecimiento exponencial en los intervalos comprendidos entre 4 y 14, 24 y 38 y 48 y 72 horas de incubación (figura 12 y 13) con tasas de crecimiento de 0.018 h^{-1} , 0.09 h^{-1} y 0.052 h^{-1} y tiempos de generación 37.56 horas 7.43 horas y 12.5 horas respectivamente (figura 16).

Algunos estudios experimentales muestran que la presencia significativa de virus en la columna de agua puede influir en la riqueza de Archaea (Hewson *et al.* 2003,

Schwalbach *et al.* 2004, Jardillier *et al.* 2005). En este mismo experimento se encontraron abundancias máximas de virus (Canosa *et al.* 2008) que coinciden con los mínimos valores en densidad y tasas de crecimiento de arquea, específicamente en t_{48} en Cubillos y el máximo de abundancia de virus en La Presa (t_{24}) se relacionó con una leve reducción en las abundancias de los miembros de este dominio (figuras 12 y 13).

Figura 16. Variación en las tasas de crecimiento del dominio Archaea en los dos sistemas experimentales en el embalse del Neusa.



Fuente: Investigador del Proyecto.

Sin embargo, hace falta más información para entender la participación de las arqueas en los sistemas acuáticos epicontinentales tropicales. Los estudios deben buscar el afinamiento de metodologías que en el caso de FISH se relacionan con un mejor diseño de las sondas y mejorar su penetrabilidad en organismos de este dominio.

5.4 CONTROL HIBRIDACIÓN Y CONSIDERACIONES DE LA APLICABILIDAD DE LAS SONDAS EMPLEADAS

El uso de una sonda de control negativo, NON338, definida como una secuencia complementaria del dominio Bacteria que no debe hibridar con el rRNA de este dominio, se utiliza como un control de la especificidad del proceso de hibridación, esto es si se logró una unión específica de cada una de las sondas empleadas a los grupos para los que fue diseñada. En la técnica FISH se acepta un porcentaje máximo de hibridación con esta sonda del 5 % de las células teñidas con DAPI, por encima de este valor se considera que el proceso de hibridación no fue específico. En este estudio el porcentaje promedio de células que hibridaron con esta sonda (NON338) fue para Cubillos de 0.78 ($DVS \pm 0.5$) y para La Presa de 1.0 ($DVS \pm 1.1$). Por otra parte, el control de autofluorescencia mostró un número moderado de células autofluorescentes, estas falsas señales de hibridación corresponden a picroalgas y picocianobacterias (autofluorescencia de la clorofila *a*) y en algunos casos a material inorgánico particulado presente en las muestras (Glockner *et al.* 1999).

La elección de las sondas de oligonucleótidos utilizadas para FISH en este trabajo, se basó en las descripciones de varios autores (Glockner *et al.* 1999, Jürgens *et al.* 1999, Simek *et al.* 2001), y los resultados hallados respecto a porcentajes de hibridación fueron similares a los reportados en la literatura para zonas similares.

Cada uno de los grupos filogenético tenidos en cuenta dentro de estas sondas potencialmente contienen diferentes especies y filotipos, las mediciones en las tasas de crecimiento representan “propiedades colectivas” de los grupos, que probablemente reflejan y definen los caracteres de las especies dominantes o subgrupos (Yokokawa & Nagata 2005). Sin embargo se debe tener en cuenta que diferentes modelos de crecimiento, estrategias de vida y mecanismos de control (top- down y bottom-up) pueden ser encontrados dentro de un mismo clúster o

grupo específico (por ejemplo Actinobacteria o Proteobacteria) (Zwart *et al.* 2002, Pernthaler *et al.* 2004, Yokokawa & Nagata 2005, Warnecke *et al.* 2005, Simek *et al.* 2005, 2007, Wu & Hahn 2006).

La mayoría de estudios en la ecología del plancton procariota se han limitado a zonas templadas, por lo que la investigación en sistemas acuáticos tropicales es limitada (Dumestre *et al.* 2001, Canosa & Niño 2005, Bettarel *et al.* 2006). Los resultados obtenidos sobre dinámicas de crecimiento se han logrado estudiando muestras de agua en las que se ha fraccionado la comunidad planctónica de acuerdo al tamaño, lo que ha originado diferentes respuestas y estrategias de crecimiento de cada uno de los grupos tenidos en cuenta. Aunque esta manipulación es una herramienta útil en el entendimiento de las interacciones ecológicas, también puede llegar a generar un desacople en la red trófica planctónica (Matz & Jürgens 2003, Pernthaler *et al.* 2004) y consecuentemente alterar las relaciones y el balance de las tasas de crecimiento (Simek *et al.* 2001).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la importancia de continuar estudiando la complejidad de los sistemas biológicos en la que sin duda los microorganismos juegan un papel decisivo a través de los flujos de energía y materia.

6. CONCLUSIONES

Los resultados encontrados a partir de un diseño experimental incubado en dos regiones contrastantes en el embalse de Neusa mostraron que las tasas de crecimiento, tiempos de generación y densidades de los procariotas y algunos grupos seleccionados mostraron dinámicas ligeramente diferentes que no fueron estadísticamente significativas. En los experimentos incubados en Cubillos, se encontraron mayores abundancias de procariotas y una correlación significativa entre los grupos y el tiempo de muestreo; indicando probablemente que la descarga de material alóctono tiene un papel fundamental en el control de las comunidades procariotas, probablemente por una mayor eficiencia en la asimilación de nutrientes en esta zona del embalse. De esta manera diferencias ambientales dentro del embalse se convierten en una buena herramienta para evaluar las propiedades ecológicas de esta fracción de la comunidad.

Las poblaciones de β Proteobacteria parecen mostrar una activa participación en los procesos e interacciones de la cadena trófica microbiana en el embalse. Aparentemente la dinámica de crecimiento y los cambios en la morfología celular de este grupo (alargamiento), indican la versatilidad de este grupo ante diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes y/o estrategias de vida. Estos aspectos pueden servir como punto de comparación ante condiciones de perturbación y alteración de este sistema acuático, el cual en los últimos años ha mostrado una visible influencia antrópica involucrando un acelerado crecimiento de macrófitas, descarga incontrolada de nutrientes y disminución en los niveles y el espejo de agua.

7. RECOMENDACIONES

Los resultados encontrados en este trabajo de grado permiten señalar algunas recomendaciones basadas principalmente en aspectos metodológicos que permitirán en un futuro cercano obtener modelos de manejo de este importante embalse. Estos modelos podrían ser aplicables a otros embalses colombianos, en los que hasta el momento no se ha tenido en cuenta la comunidad microbiana y su papel clave en la productividad y el mantenimiento de la calidad de las aguas.

En este estudio solo se usaron tres linajes para estudiar las tasas de crecimiento de los procariotas. Es necesario considerar otros grandes grupos de los cuales ahora se cuenta con mejor información que surte de manera creciente las bases de datos genómicas. En la década de los 90 la información sobre la diversidad de los microorganismos en las aguas era muy limitada, sin embargo, recientemente se ha encontrado que representantes de varios taxones han mostrado una dinámica importante en las cadenas tróficas acuáticas, en las interacciones depredador–presa y muchas otras propiedades ecológicas.

A continuación se señalan los taxones y las sondas que en el último quinquenio se utilizan más ampliamente. Dentro del dominio Bacteria: Firmicutes (bacterias Gram Positivas bajas en G+C; sonda LGC354A), Fibrobacter (sonda fibro), Planctomycetes (sondas Pla46 y EUBII), Verrocomicrobiales (sonda EUB338III), β Proteobacteria (sonda R-BT065, sonda Bet2-870), en actinobacteria los linajes de aguas dulces Acl (sondas Acl -840-1,3 y Acl -840-H1, H3). Dentro del dominio Archaea los taxones Crenarchaeota (sonda CREN499), Euryarchaeota (sonda EURY498) (probeBase: <http://www.microbial-ecology.net/probeBase>)

En busca de suficientes datos que permitan diseñar modelos para el manejo de los cuerpos de agua naturales y artificiales como embalses, se deben seguir estudiando los factores que regulan la abundancia y actividad de los procariotas en la columna de agua. Así es importante clarificar cómo virus, heterótrofos nanoflagelados y zooplancton controlan las poblaciones y exportan el carbono orgánico del bucle microbiano hacia eslabones superiores. Igualmente es necesario continuar valorando factores abióticos como temperatura, nutrientes y oxígeno, entre otros, como parámetros reguladores de la dinámica poblacional del agua.

BIBLIOGRAFÍA

- **Abedon S.** 2008. Bacteriophage ecology. Population growth, evolution and Impact of bacterial viruses. *Advances in Molecular and Cellular Microbiology*. 251-282
- **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. *FEMS Microbiology Reviews*. 20: 191-200.
- **Aravalli R, She Q & Garret R.** 1998. Archaea and the new age of microorganisms. *Trends Ecology Evolution*. (13)5: 190-194.
- **Azam F, Fenchel T, 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.

- **Bettarel Y, Sime-Ngando T, Amblard C & Dolan J.** 2004. Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 2941-2951.
- **Bettarel Y, Bouvy M, Dumont C & Sime-Ngando T.** 2006. Virus-bacterium interacciones in water and sediment of West African inland aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 5274-5282.
- **Bell R.** 1993. Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine: In: Kemp, P., B. Sherr, E. Sherr & J. Cole (Eds). *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers. Boca Raton, FL, USA.
- **Billen G, Servais P & Becquevort S.** 1990. Dynamics of bacterioplankton in oligotrophic and eutrophic aquatic environments: bottom-up or top-down control? *Hydrobiologia*. 207: 37–42.
- **Calvet A, Landry M & Nunnery S.** 2001. Bacteria-flagellate interactions in the microbial food web of the oligotrophic subtropical North Pacific. *Aquatic Microbial Ecology*. 23: 283-292.
- **Canosa A & Pinilla G.** 1998. Evaluación de la población bacteriana total en tres cuerpos de agua lénticos mediante la técnica de epifluorescencia. Informe Final Universidad Jorge Tadeo Lozano y COLCIENCIAS.
- **Canosa A & Pinilla G.** 1999. Bacteriological eutrophication indicators in four Colombian water bodies. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*. 4: 23-27.

- **Canosa A, Pinilla G, Díaz J & Vargas A.** 2000. Influencia del ciclo hidrológico sobre la densidad y biomasa del bacterioplancton en el Lago Boa y los ríos Meta y Caquetá, Amazonía Colombiana. Informe Final Universidad Jorge Tadeo Lozano y COLCIENCIAS (Mecanografiado).
- **Canosa A.** 2002. Distribución de virus y bacteriófagos y su relación con las bacterias y los coliformes en tres cuerpos de agua lenticos de la región central de Colombia. Informe final Universidad Jorge Tadeo Lozano y Fundación para la Promoción de la Investigación y de la Tecnología. Banco de la República (Mecanografiado).
- **Canosa A & Niño J.** 2005. Estructura y variación espacial y temporal de la comunidad bacteriana en el embalse de Neusa, un ecosistema acuático altoandino. Informe Final Universidad Jorge Tadeo Lozano y COLCIENCIAS (Mecanografiado).
- **Canosa A, Niño J, Torres I, Vigoya L, Espinel G & Morales D.** 2008. Evaluación experimental del efecto de la bacteriovoria sobre la productividad y estructura de la comunidad bacteriana en el embalse de Neusa. Informe Final Universidad Jorge Tadeo Lozano y Fundación para la Promoción de la Investigación y Tecnología. Banco de la República (mecanografiado).
- **Casamayor E, Schafer H, Bañeras L, Pedrós-Alió C & Muyzer G.** 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 499–508.
- **Casamayor E, Muyzer G & Pedrós-Alió C.** 2001. Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous

environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquatic Microbial Ecology*. 25: 237-246.

- **Cole J & Caraco N.** 1993. The pelagical microbial food web of oligotrophic lakes. In T.E. Ford, (Eds), *Aquatic microbiology: an ecology approach*. Blackwell, pp. 101-111.
- **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.
- **Daims H, Bruhl A, Amann R, Schleifer K-H & Wagner M.** 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic Applied Microbiology* 22: 434- 444.
- **DeLong E, Wickham G & Pace N.** 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360-1363.
- **DeLong E.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings National Academic of Sciences. USA* 89:5685–5689.
- **Del Giorgio P & Gasol J.** 1995. Biomass distribution in freshwater plankton communities. *American Nature*. 146: 135-152.
- **Di Siervi M.** 2002. Bacterias. *Aquatec*.7:1- 48.
- **Dumestre J-F, Casamayor E, Massana R & Pedrós-Alió C.** 2001. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the

water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquatic Microbial Ecology*. 26: 209–221.

- **Fenchel T.** 1988. Marine plankton food chains. *Annual Reviews Ecology and Systematics*. 19:19-38.
- **Fuhrman J.** 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*. 399: 541–548.
- **Gasol J.** 1994. A framework for the assessment of top-down vs. bottom-up control of heterotrophic nanoflagellate abundance. *Marine Ecology Progress Series*. 113: 291–300.
- **Gasol J & Duarte C.** 2000. Comparative analyses in aquatic microbial ecology: how far do they go? *FEMS Microbiology Ecology*. 31: 99–106.
- **Gasol J, Pedros-Alio C & Vaque D.** 2002a. Regulation of bacterial assemblages in oligotrophic plankton systems: results from experimental and empirical approaches. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 435–452.
- **Gasol J, Comerma M, Garcia J, Armengol J, Casamayor E, Kojacká P & Simek K.** 2002b. A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnology and Oceanography*. 47: 62–77.
- **Glockner F, Amann R, Alfreider A, Penrthaler J, Psenner R, Trebesius K & Schleifer K.** 1996. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 19: 403-406.

- **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.
- **Glockner F.** 2002. Fluorescence *In Situ* Hybridization. <http://www.mpi-bremen.de/molecol/fog/fish1.html>
- **Gurung T, Nakanishi M & Urabe J.** 2000. Seasonal and vertical difference in negative and positive effects of grazers on heterotrophic bacteria in Lake Biwa. *Limnology and Oceanography*. 45(8): 1689-1696.
- **Hahn M, Moore E & Höfle M.** 1999. Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:25–35.
- **Hahn M & Höfle M.** 2001. Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 35: 113–121.
- **Hagstrom A, Larsson U, Horstedt P & Normak S.** 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 37: 805-812.
- **Herndl J, Kaltenbock E & Mullerf-Niklas G.** 1993. Dialysis bag incubation as a nonradio labeling technique to estimate bacterioplankton production *in situ*. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Kemp P, Sherr B F, Sherr E B & Cole J. (Eds). Lewis Publisher. Boca Raton, FL, USA.
- **Hewson I, Vargo G & Fuhrman J.** 2003. Bacterial diversity in shallow oligotrophic marine benthos and overlying waters: Effects of virus infection, containment, and nutrient enrichment. *Microbial. Ecology*. 46: 322–336.

- **Hobbie J, Daley R & Jasper S.** 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 1225-1228.
- **Jardillier L, Boucher D, Personnic S, Jacket S, Thénot E, Sargos D, Amblard C & Debroas D.** 2005. Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status: microcosm experiments. *FEMS Microbiology Ecology*. 53: 429-433.
- **Jezbera J, Hornak K & Simek K.** 2005. Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*. 52: 351-353.
- **Jezbera J, Hornak K & Simek K.** 2006. Prey selectivity of bacterivorous protists in different size fractions of reservoir water amended with nutrients. *Environmental Microbiology*. 8: 1330-1339.
- **Jugnia L, Sime-Ngando T & Gilbert D.** 2006. Dynamics and estimates of growth and loss rates of bacterioplankton in a temperate freshwater system. *FEMS Microbiology Ecology*. 58: 23–32.
- **Jürgens K, Pernthaler J, Schalla S & Amann R.**1999. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology* 65:1241–1250
- **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. *FEMS Microbiology Ecology* .34:45–56.

- **Kerkhof L & Kemp P.** 1999. Small ribosomal RNA content in marine proteobacteria during non-steady-state growth. *FEMS Microbiology Ecology*. 30:253-260.
- **Kepner R & Pratt J.** 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples past and present. *Microbiology Reviews*. 58:603–615.
- **Knoll S, Zwisler W & Simon M.** 2001. Bacterial colonization of early stages of limnetic diatom microaggregates. *Aquatic Microbial Ecology*. 25: 141-150.
- **Kubota K, Ohashi A, Imachi H & Harada H.** 2006. Improved in situ hybridization efficiency with locked –nucleic acid –incorporated DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 5311-5317.
- **Landry M, Kirshstein J & Constantinou J.** 1995. A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton, with experimental test in the central equatorial Pacific. *Marine Ecology Progress Series*. 120: 53-63.
- **Langenheder S & Jürgens K.** 2001. Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnology and Oceanography*. 46(1): 121-134.
- **Lebaron P, Servais P, Agogue H, Courties H & Joux F.** 2001. Does the High Nucleic Acid Content of Individual Bacterial Cells Allow Us To Discriminate

between Active Cells and Inactive Cells in Aquatic Systems?. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1775-1782.

- **Lehours A, Bardot C, Thenot A, Debroas D & Fonty G.** 2005. Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:7389-7400.
- **Loy A, Maixner M, Wagner M & Horn F** 2007. probeBase: an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Research*. 35: 801-804.
- **MacArthur V.** 2006. *Microbial ecology. An evolutionary approach.* University of Georgia. Academic Press (Elseiver). Pag. 317-318.
- **Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M & Schleifer K.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*. 15: 593-600.
- **Massana R, Taylor L, Murray A, Wu K, Jeffrey W & DeLong E.** 1998. Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic archaea in the Gerlache Strait, Antarctica, during early spring. *Limnology and Oceanography*. 43: 607-617.
- **Matz C, Jürgens K .** 2003. Interaction of nutrient limitation and protozoan grazing determines the phenotypic structure of a bacterial community. *Microbial Ecology* 45: 384–398
- **Morita R.** 1997. *Bacteria in Oligotrophic Environments: Starvation-Survival Lifestyle,* Chapman and Hall, New York.

- **Moter A & Gobel U.** 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiology Methods*. 41: 85-112.
- **Muyzer G & Smalla K.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek*. 73: 127–141.
- **Oda Y, Slagman Simen-Jan, Meijer W, Forney L & Gottschal J.** 2000. Influence of growth rate and starvation on fluorescent *in situ* hybridization of *Rhodospseudomonas palustris*. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 205-213.
- **Olsen G, Lane D, Giovannoni S, Pace N & Stahl D.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal rRNA approach. *Annual Reviews Microbiology*. 40: 337–365.
- **Ouverney C & Furhrman J.** 2000. Marine planktonic Archaea take up amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4829-4833.
- **Ovreas L, Forney L, Daae F & Torsvik V.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3367–3373.
- **Pace M & Cole J.** 1994. Comparative and experimental approaches top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microbial Ecology*. 28: 181–193.
- **Pedros-Alio C, Calderon-Paz J, Guixa-Boixereu N, Estrada M & Gasol J.** 1999. Bacterioplankton and phytoplankton biomass and production during summer stratification in the northwestern Mediterranean Sea. *Sea Research*. 46: 985–1019.

- **Pedros-alió C, Calderon– Paz J & Gasol J.** 2000. Comparative analysis show that bacteriovory, not lysis viral, controls of abundance of heterotrophic prokaryotic plankton. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 157-165.
- **Pedros-Alió C.** 2006. Marine microbial diversity can it be determined? *Trends In Microbiology*. 14: 257-263.
- **Pernthaler A & Amann R.** 2004. Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 5426-5433.
- **Pernthaler J, Sattler B, Simek K, Schwarzenbacher A & Psenner R.** 1996. Top down effects on the size-biomass distribution of a freshwater bacterioplankton community. *Aquatic Microbiology Ecology*. 10: 255-263.
- **Pernthaler J, Posch T, 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: 596–601.
- **Pernthaler J, Glöckner F, Unterholzner S, Alfreider A, Psenner R & Amann R.** 1998. Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and Archaea in a high mountain lake. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4299–4306.
- **Pernthaler J, Glöckner F, Schönhuber O & Amann R.** 2001a. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods Microbiology*. 30:207–226.

- **Pernthaler J, Posch T, Simek K, Vrba J, Pernthaler A & Glockner F.** 2001b. Predator-specific enrichment of Actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2145–2155.
- **Pernthaler J.** 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Review 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.
- **Pomeroy L.** 1974. The ocean's food web a changing paradigm. *Bioscience*. 24: 499-504.
- **Porter K & Feig Y.** 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology Oceanography*. 25:943–948.
- **ProbeBase.** Online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. consultado en Internet en 2008-07-15: <http://www.microbial-ecology.net/probeBase>
- **Proctor L & Fuhrman J.** 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*. 343: 60-62.
- **Psenner R & Sommaruga R.** 1992. Are rapid changes in bacterial biomass caused by shifts from top-down to bottom-up control? *Limnology and Oceanography*. 37: 1092–1100.

- **Rajagopal A, Qunxin S & Roger G.** 1998. Archaea and the new age of microorganisms. *Tree*. 13 (5):190-194.
- **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.
- **Schleper C, Jürgens G & Jonuscheit M.** 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Review Microbiology*. 3: 479-488.
- **Schwalbach M, Hewson I & Fuhrman J.** 2004. Viral effects on bacterial community composition in marine plankton microcosms. *Aquatic Microbial Ecology*. 34: 117–127.
- **Schweitzer B, Huber I, Amann R, Ludwig W & Simon M.** 2001. α y β -Proteobacteria control consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 632-645.
- **Seji D.** 1998. Desnitrificação e caracterização filogenética das bactérias de vida livre e bactérias aderidas as partículas no hipolimnio do Lago Kizaki, Japão. Tese apresentada a Escola de Engenharia de San Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental. São Carlos. Brasil.
- **Sherr B, Sherr E & McDaniel J.** 1992. Effect of protistan on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 2381-2385.

- **Shiah F-K & Ducklow H.** 1993. Temperature regulation of heterotrophic bacterioplankton abundance, production, and specific growth rate in Chesapeake Bay. *Limnology and Oceanography*. 39 (6): 1243-1258.
- **Sieburth M, Smetacek V & Lenz J.** 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*. 23: 1256- 1263.
- **Simek K, Vrba J, Pernthaler J, Posch T, Hartman P, Nedoma J & Psenner R** 1997. Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:587–595.
- **Simek K, Kojecká P, Nedoma J, Hartman P, Vrba J & Dolan J.** 1999. Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography*. 44: 1634–1644.
- **Simek K, Pernthaler J, Weinbauer M, Hornák K, Dolan J & Nedoma 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: 1723–2733.
- **Simek K, Hornák K, Mazin M, Christaki U, Nedoma J, Weinbauer M & Dolan J.** 2003. Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*. 13: 123–135.
- **Simek K, Hornák K, Jezbera J, Masín M, Nedoma J, Gasol J & Schauer M.** 2005. Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065

subcluster of β -Proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 2381–2390.

- **Simek K, Hornák K, Jezbera J, Nedoma J, Vrba J & Straskrabova V.** 2006. Maximum growth rates and possible strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environmental Microbiology*. 8: 1613–1624.
- **Simek K, Weinbauer M, Hornák K, Jezbera J, Nedoma J & Dolan J.** 2007. Grazer and virus-induced mortality of bacterioplankton accelerates development of *Flectobacillus* populations in a freshwater community. *Environmental Microbiology*. 9 (3): 789-800.
- **Sommaruga R. & Conde D.** 1997. Seasonal variability of metabolically active bacteria in the euphotic zone of a shallow hypertrophic lake. *Aquatic. Microbial. Ecology*. 13: 241-248.
- **Stein L & Simon M.** 1996. Archaeal ubiquity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93-13: 6228-6230.
- **Strom S.** 2000. Bacterivory: interactions between bacteria and their grazers. In: Kirchman D. (Ed). *Microbial Ecology of the Oceans*. Willey. USA.
- **Thingstad T.** 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography*. 45:1320–1328.
- **Turley C & Lochte K.** 1986. Diel changes in the specific growth rate and mean cell volume of natural bacterial communities in two different water masses in the Irish Sea. *Microbial Ecology*. 12: 271–282.

- **Voytek M & Ward B.** 1995. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class *Proteobacteria* in aquatic samples with the PCR. *Applied Environmental Microbiology*. 61:1444–1450.
- **Wagner M.** 2004. Deciphering functions of uncultured microorganisms. *ASM News*. 70 (2): 63-70.
- **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.
- **Warnecke F, Amann R & Pernthaler J.** 2004. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environmental Microbiology* 6: 242–253.
- **Warnecke F, Sommaruga R, Sekar R, Hofer R & Pernthaler J.** 2005. Abundances, identity, and growth state of Actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 5551-5559.
- **Weinbauer M & Hofle M.** 1998. Distribution and life strategies of two bacterial populations in a eutrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: (10). 3376-3783.
- **Weinbauer M, Simek K, Christaki U & Nedoma J.** 2003. Comparing the effects of resource enrichment and grazing on viral production in a meso-eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*. 31:137–144

- **Weinbauer M, Hornak K, Jezbera J, Nedoma J, Dolan J & Simek K.** 2007 Synergistic and antagonistic effects of viral lysis and protistan grazing on bacterial biomass, production and diversity. *Environmental Microbiology*. 9 (3): 777-788.
- **Wells LI & Deming J.** 2003. Abundance of Bacteria, the Cytophaga-Flavobacterium cluster and Archaea in cold oligotrophic waters and nepheloid layers of the Northwest Passage, Canadian Archipelago. *Aquatic Microbial Ecology*. 31: 19-31.
- **Woese C, Gutell R, Gupta R & Noller H.** 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiology. Reviews*. 47: 621–669.
- **Woese C.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*. 51:221–271.
- **Wright R.** 1988. A model for short-term control of the bacterioplankton by substrate and grazing. *Hydrobiology*. 159: 111–117.
- **Wright R & Coffin.** 1983. "Planctonic bacteria in estuaries and coastal waters of northern Massachusetts: spatial and temporal distribution." *Marine Ecology Progress Series*. 11: 205-216.
- **Wu Q & Hanh M.** 2006. High predictability of the seasonal dynamics of a species -like *Polynucleobacter* population in a freshwater lake. *Environmental Microbiology*. 8 (9): 1660-1666.
- **Yokokawa T & Nagata T.** 2005. Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6799–6807

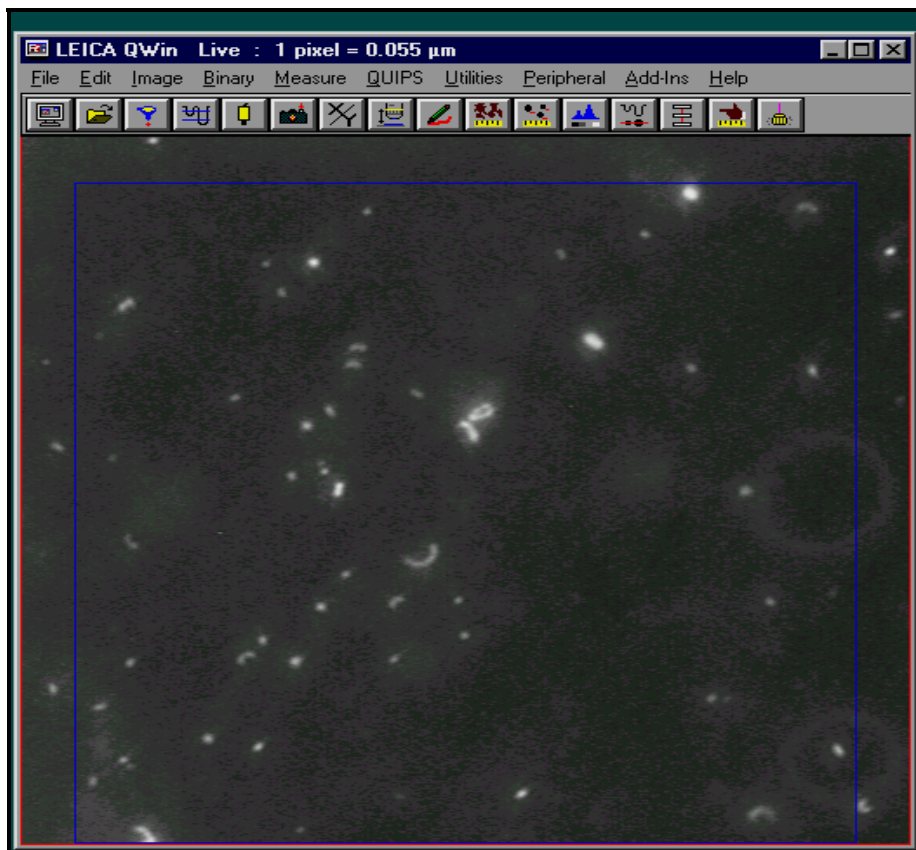
- **Zwart G, Crump B, Agterveld M, Hagen F & Han Suk-Kyun.** 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology*. 28: 141-155.

ANEXOS

ANEXO 1

Fotografías de imágenes tomadas con el analizador de imágenes y con la herramienta Image Tool para el conteo de las abundancias relativas de Bacteria, Archaea y β Proteobacteria siguiendo el procedimiento FISH.

Figura 1. Células procariotas capturadas en membranas Nucleopore blancas de 0.2 μm de diámetro de poro, teñidas con el fluorocromo DAPI y vistas al microscopio con filtro para luz ultravioleta. Imagen capturada con el programa Leica QWin. 1000 aumentos.



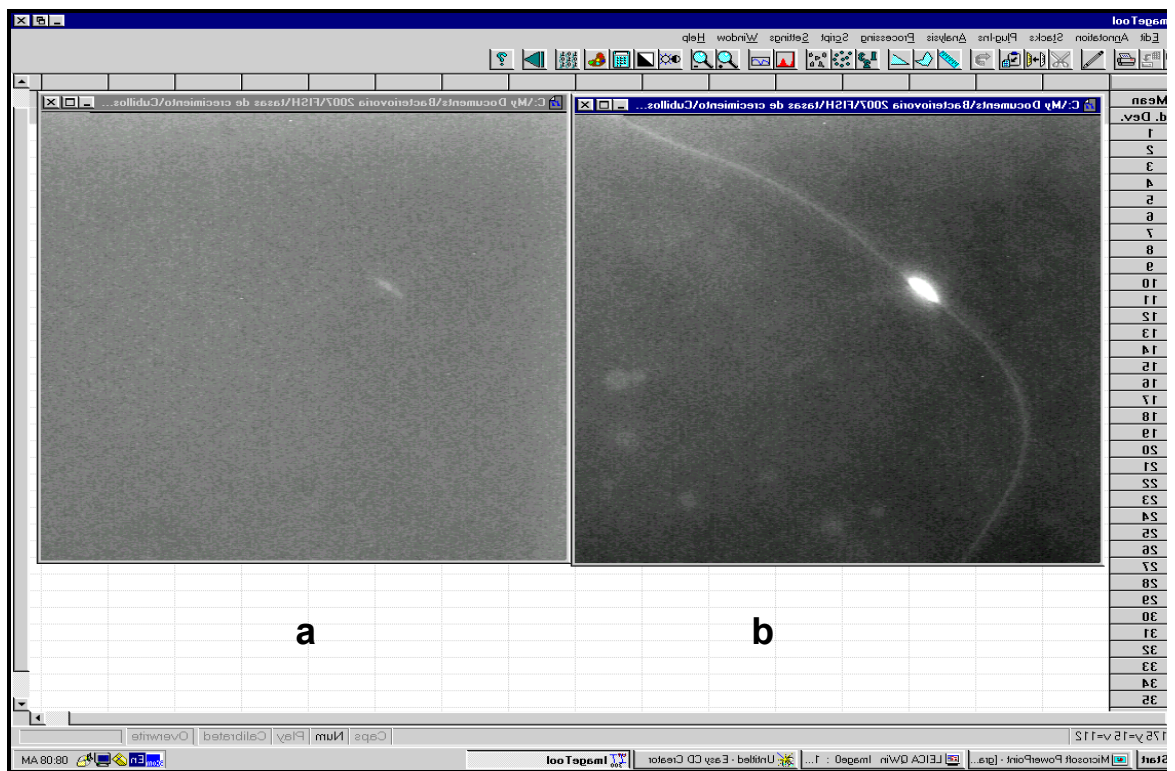


Figura 2. Imágenes obtenidas con la técnica FISH. (a) y (b) son fotografías del mismo campo. En (a) se observa la célula teñida con la sonda de B Proteobacteria (BET43a.) marcada con Cy3 en tanto que en (b) se ve la misma célula teñida con DAPI (1000 aumentos)

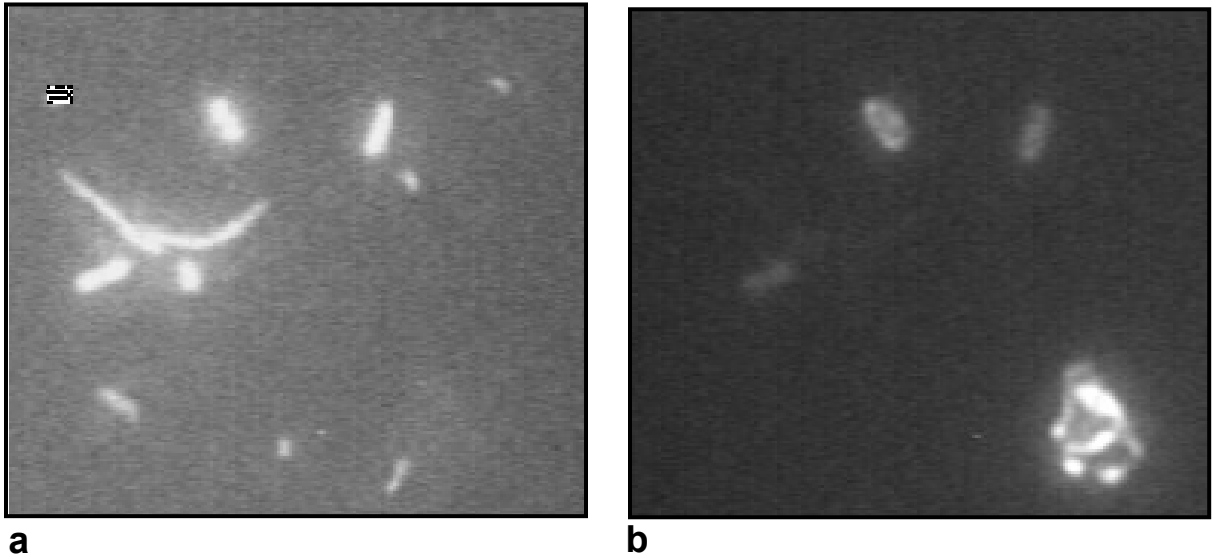


Figura 3. Imágenes obtenidas con la técnica FISH. (a) y (b) son fotografías del mismo campo. En (a) se observa el total de células teñidas con DAPI en (b) solo aquellas detectadas con la sonda BET43a.

ANEXO 2

Definición y ecuaciones empleadas para determinar las tasas de crecimiento (k) y el tiempo de generación (g) de las comunidades procariotas, los dominios Bacteria y Archaea y del grupo β Proteobacteria

Tasa Específica de crecimiento

La tasa específica de crecimiento (k) se calcula a partir de las diferencias entre las densidades medias de bacterias en un intervalo de tiempo. Si se asume que el crecimiento en las comunidades procariotas es exponencial, se va dando continuamente, de esta manera la constante k representa el crecimiento por hora, pero si se necesita del crecimiento en intervalos cortos de tiempo lo mejor es representarlo acortando la diferencia entre $t_x - t_0$ y $N_x - N_0$, de esta manera queda un espacio infinitesimal, el que se calcula usando diferenciales (dN, dt). Los valores se expresan como h^{-1} .

De esta manera $dN =$ cambio de N en un pequeño incremento de tiempo t, es proporcional a N, así como a k , por lo tanto:

$$kN = \frac{dN}{dt}$$

Al integrar N_t y N_0 de esta ecuación resulta:

$$N_t = e^{kt} \cdot N_0$$

Cuya forma logarítmica es:

$$kt = \frac{N_t}{N_0} - 1$$

$$k(t_2 - t_1) = \frac{\ln N_{t_2} - \ln N_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

La tasa específica de crecimiento indica el aumento relativo de la población, en este trabajo de la procariota, β Proteobacteria, Bacteria o Archaea por unidad de tiempo, cuando la velocidad del crecimiento correspondiente al tiempo 0 permanece inalterada.

Tiempo de generación

Se reconoce como el tiempo necesario para que el número celular se duplique. El crecimiento (número de individuos vs. tiempo) debe ser representado en forma semi logarítmica. Estos valores se calculan a partir del logaritmo en base 10 usando la siguiente formula:

$$\log_2 N = \frac{\log_{10} N}{\log_{10} 2} = \frac{\log_{10} N}{0.301}$$

Si N_0 es el tamaño de una población a tiempo 0 y N_t a tiempo t, el número de generaciones ocurridas en ese intervalo esta dada por:

$$N_t = 2^{gt} \cdot N_0$$

Donde g= tiempo de generación, es decir, es el numero de duplicaciones por unidad de tiempo. Se expresa como el número de duplicaciones por hora.

La forma logarítmica de esta ecuación esta dada por:

$$gt = \frac{N_t}{N_0} \log_2$$

A partir de esta fórmula se deduce g: tiempo medio de generación

$$g = \frac{(\log_2 N_t) - (\log_2 N_0)}{t}$$

$$g = \frac{(\log_{10} N_t) - (\log_{10} N_0)}{0.301 \cdot t}$$

Relacionando numéricamente estas dos ecuaciones se obtiene, el tiempo necesario para que se duplique la población.

$$N_t = 2^{gt} \cdot N_0 \quad N_t = 2^{kt} \cdot N_0$$

$$g = \frac{\ln 2}{k}$$