

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
IBUN

Posgrado Interfacultades en Microbiología

Tesis de Maestría



EVALUACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LAS BIOPELÍCULAS PRESENTES EN UN RÍO ANDINO

Cuan pequeñas sus piezas,
cuan rica en detalles,
cuan bella e íntima es la esencia de la Verdad.

Rafael Gabriel Barragán González

Biólogo Marino

Director

John C. Donato R.

Profesor Asociado

Departamento de Biología

Universidad Nacional de Colombia

Co-Directora

Amparo Canosa T.

Profesora Investigadora

Programa de Biología Marina

Universidad Jorge Tadeo Lozano

Bogotá, 26 de enero de 2010

NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el 23 de octubre de 2009 (sustentación); 2 de febrero de 2010 (aprobación)

En constancia firman:



Jurado: M. Consuelo Díaz B.
Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional de Colombia



Jurado: Gabriel A. Pinilla
Departamento de Biología
Universidad Nacional de Colombia

Tabla de contenido

Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Marco Teórico	8
¿Por qué es importante estudiar los ríos andinos?.....	8
El río Tota.....	9
Los microorganismos en el río.....	14
Utilización de la materia orgánica.....	16
Materiales y métodos	18
Fase de Campo	18
Frecuencia y estaciones de muestreo.....	18
Experimento de fertilización.....	19
Toma de muestras.....	19
Técnicas aplicadas	21
Conteo y biomasa de bacterias.....	21
Medidas de actividad de enzimas extracelulares.....	22
Variables ambientales y biológicas.....	23
Análisis de los datos.....	24
Resultados	26
Caracterización del río Tota	26
Hidrología y variables fisicoquímicas.....	26
Biomasa algal y productividad primaria en las biopelículas epilíticas.....	29
Caracterización estructural de las biopelículas del río Tota	30
Caracterización funcional de las biopelículas del río Tota	31
Experimento de fertilización	35
Modelo	39
Discusión	43
Caracterización estructural y funcional de las biopelículas del río Tota con respecto al gradiente espacio-temporal	43
Experimento	49
Conclusiones	51
El ambiente en el río Tota	51
Evaluación estructural de las biopelículas	51
Evaluación funcional de las biopelículas	51
Experimento	52
Recomendaciones	53
Bibliografía	54
ANEXO 1	58
Patrones de los fluorocromo, ajuste a las regresiones evaluadas y coeficiente de correlación	58
ANEXO 2	59
Resultado de la prueba de Tukey para Clorofila <i>a</i>	59
ANEXO 3	60
Área susceptible de ser colonizada por sustrato	60

Resumen

Mediante la evaluación de variables estructurales y funcionales de las biopelículas se realizó una descripción de su estado y se abordó el problema del incremento en la disponibilidad de nutrientes en un río andino de alta montaña; al dirigir la mirada sobre la participación de la microbiota bentónica en los flujos de materia y energía en los sistemas lóticos inició la generación de conocimiento sobre el tema en Colombia. Con el objetivo de evaluar la comunidad creciendo sobre sustratos artificiales (cerámicas) y sedimentos en escala temporal y espacial en cuatro tramos en el río Tota se realizó la determinación de biomasa bacteriana de las biopelículas mediante el recuento directo por epifluorescencia con DAPI y un factor de conversión, y la actividad de enzimas extracelulares mediante sustratos análogos fluorogénicos. La biomasa bacteriana presentó en las biopelículas epipsámicas valores entre 0.1 y 13.9 mg C m⁻² (4.9×10^6 y 6.9×10^8 células m⁻²) y en las biopelículas epilíticas entre 0.45 y 63.6 mg C m⁻² (2.6×10^7 y 3.7×10^9 células m⁻²). Las enzimas para las cuales se registró la mayor actividad fueron β -Glucosidasa, Fosfatasa y Celobiohidrolasa, los valores más bajos se registraron para Aminopeptidasa. El contexto en el que los datos obtenidos fueron analizados incluye información sobre la biomasa algal, productividad primaria neta, hidrología y condiciones físico-químicas del agua. Este trabajo también incluyó una aproximación experimental que interpretó, en un contexto natural, el efecto que tiene el aumento de la carga de nutrientes sobre el desarrollo de la comunidad microbiana en las biopelículas epilíticas.

Abstract

By means of the evaluation of structural and functional topics there was made a description of biofilms situation and was assumed the problem of nutrients availability increase in a high mountain Andean river; in Colombia has begun the knowledge generation about the benthic microbial biota participation in the fluxes of matter and energy at the lotic systems. To reach the objective: “to evaluate the community that grows over artificial substrate (clay tiles) and sediments, in the spatial and temporal scale at four strips on the Tota river”, there were made both, the determination of bacterial biomass of the biofilms by means of epifluorescence direct count with DAPI and a conversion factor; and the determination of extracellular enzyme activity by fluorogenic analog substrates use. The bacterial biomass of the epipsammic biofilms showed values between 0.1 and 13.9 mg C m⁻² (4.9×10^6 y 6.9×10^8 células m⁻²), while in the epilithic biofilms between 0.45 and 63.6 mg C m⁻² (2.6×10^7 y 3.7×10^9 células m⁻²). The enzymes for which there was the highest activity values were β -Glucosidase, Phosphatase and Cellobiohydrolase, the lower values were scored for the Aminopeptidase. The analysis context of the gotten data include the information of the algal biomass, primary net productivity, hydrology and physico chemical conditions of the water. This work include an experimental approach too that interpret, in a natural context, the effect that nutrient increase has over the microbial community development of the epilithic biofilms.

Introducción

Los ecosistemas andinos se encuentran entre los ambientes más diversos del mundo y a la vez entre los más amenazados, no obstante hay poca información disponible en relación al impacto que generan los procesos de transformación del paisaje. En dichos ecosistemas los ríos reflejan fielmente lo que sucede en el conjunto del territorio, además su importancia en el altiplano cundiboyacense incluye la dependencia de las comunidades para realizar actividades productivas en busca de una mejor calidad de vida (Etter & Villa, 2000; Ramírez, 2006).

En los ríos, los microorganismos son un componente biótico importante, especialmente los que se encuentran asociados a superficies sumergidas formando biopelículas ya que dominan la reactividad de la interfase con el agua y al participar como protagonistas en los procesos de depuración, retención y liberación de compuestos son tema de interés para la ecología microbiana acuática (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Handelsman, 2004). No obstante, en Colombia los estudios de ecología microbiana son escasos por lo que resulta apremiante aportar información sobre la microbiota presente en sus ríos. Además de aportar información, el conocimiento adquirido a partir de las biopelículas contribuirá al planteamiento de metodologías adecuadas para los sistemas andinos y podría ser proyectado con aplicaciones en modelación, bioremediación y bioprospección (Wirtz, 2003; Schmidt *et al.*, 2003; Wackett *et al.*, 2004; Sánchez & Torres-Alvarado, 2005).

Actualmente las comunidades microbianas deben sobrellevar los disturbios de origen antrópico además de los disturbios naturales. En los sistemas andinos de Colombia la agricultura, la deforestación y el desarrollo urbano son actividades que tienden a incrementar la cantidad de nutrientes en los ecosistemas acuáticos; debido a que frecuentemente las comunidades acuáticas crecen bajo condiciones limitantes, los cambios en la disponibilidad de nutrientes pueden afectar la vía de aprovechamiento de las fuentes de energía (Sabater *et al.*, 2005; Olapade & Leff, 2005). Por lo tanto, esta evaluación de la comunidad microbiana que crece en biopelículas en un río andino de alta montaña, aporta información clave y criterios para la valoración funcional de un ecosistema lótico colombiano.

Con el objetivo de evaluar la comunidad creciendo sobre sustratos artificiales y sedimentos en escala temporal y espacial sobre cuatro tramos en el río Tota se realizó una

caracterización que incluyó la determinación de la biomasa bacteriana de la biopelícula establecida y la actividad de enzimas extracelulares (β -Glucosidasa, Aminopeptidasa, Fosfatasa y Celobiohidrolasa); adicionalmente se contó con información sobre la biomasa algal, la productividad primaria neta, la hidrología y condiciones fisico-químicas del agua. Este trabajo también incluyó una aproximación experimental que interpretó, en un contexto natural el efecto que tiene el aumento de la carga de nutrientes sobre la comunidad de microorganismos creciendo en la interfase entre las superficies sumergidas y el agua; mediante el experimento en campo amparado en la hipótesis de que el enriquecimiento con nutrientes (nitrógeno y fósforo) se vería reflejada en la biomasa y la actividad de las enzimas evaluadas.

La problemática planteada compete al proyecto internacional “Cambios globales en sistemas fluviales: efectos sobre la biodiversidad, la red trófica y el funcionamiento del sistema” abreviado GLOBRIO¹ (Fundación BBVA – Colciencias – Universidad Nacional) y su objetivo general de “determinar el efecto causado por la mayor presencia de nutrientes en sistemas fluviales de cabecera sometidos a un descenso de la escorrentía, en una variedad de biomas” enmarca el presente trabajo. Para la realización se recibió apoyo académico, logístico y metodológico del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

¹ Contacto: Sergi Sabater, Departamento de Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Avda, Diagonal 645, 08028 Barcelona, España. ssabater@porthos.bio.ub.es

Marco Teórico

¿Por qué es importante estudiar los ríos andinos?

Los ecosistemas de los Andes contribuyen significativamente a la diversidad biológica tanto localmente, en Colombia, como globalmente gracias a los altos niveles de endemismo que se encuentran; son ambientes invaluableles al regular la hidrología y favorecer la conservación del suelo, no obstante también sufren la acelerada destrucción a que están sentenciados los hábitats naturales (Etter & Villa, 2000). En el país permanece intacto el 25% del bosque tropical de montaña constituyendo una de las prioridades de conservación global; es considerado uno de los últimos ecosistemas conocidos que aún persiste en los trópicos y mientras recorren su cauce en estos ecosistemas, los ríos se convierten en delicados indicadores de lo que sucede en la cuenca de drenaje al transportar información sobre su situación ambiental. Igualmente, son de vital importancia para las actividades económicas de las sociedades que de ellos dependen por lo cual es inevitable que las consecuencias de la presión humana sean evidentes, especialmente en las zonas rurales y periurbanas que requieren el agua para sus actividades productivas (Armenteras *et al.*, 2003; Ramírez, 2006).

Los ríos son elementos dinámicos del paisaje, sin embargo a nivel mundial se reconoce que el calentamiento global ha producido alteraciones en los sistemas fluviales; en algunos casos el incremento en la estabilidad hidrológica es consecuencia de los cambios en la regularidad de las precipitaciones; la menor frecuencia con que ocurren las variaciones de flujo hace que disminuya la capacidad de dilución de vertidos y que tienda a aumentar la concentración de los nutrientes; además, el uso del suelo acentúa el efecto en el ámbito local. Según Sabater (2006) esta situación conduciría a una disminución de la diversidad y la conectividad biológica. Surge entonces la necesidad de evaluar el efecto que la situación planteada (estabilidad hidrológica y uso del suelo) generaría sobre la comunidad microbiana acuática. La realización de este trabajo además enriquecerá los criterios utilizados en la valoración del estado y la dinámica de uno de los escenarios en que se manifiesta la vida, el Tota, un ecosistema lótico de los Andes colombianos.

El río Tota

Se encuentra en la cordillera oriental y atraviesa la planicie de Sogamoso-Duitama-Iza en el departamento de Boyacá, su recorrido termina en el río Pesca mientras surca un paisaje con alturas que van desde los 3000 hasta los 2400 m.s.n.m. y pertenece al piso térmico frío; si bien los suelos son adecuados para el cultivo de maíz, papa, trigo, legumbres y arbustos frutales la mayor parte ha sido utilizada para el cultivo de pastos para ganadería (Ulloa *et al.*, 2001). Los tramos para el estudio fueron seleccionados en base a la intensidad del uso del suelo y en la conservación de la estructura natural del cauce.

El tramo “A” se consideró el menos intervenido, estuvo ubicado en el municipio de Tota, presentó una pendiente de 2.83° que representó una diferencia de altura entre el punto inicial y el punto final de 247 cm para un tramo de 50 m (Figura 1), se registró una estructura del cauce con rocas grandes en proporción cercana al 100% con respecto a los sedimentos (Anexo 3), numerosos remolinos y caídas de agua, troncos, hojarasca y poca penetración de luz debida al dosel perteneciente al bien desarrollado bosque de galería encontrado sobre sus orillas. Los tramos “B-Control” y “C-Impacto” ubicados en el municipio de Cuítiva, se consideraron con intervención media (Figuras 2 y 3), con algunos árboles en sus orillas, mayor penetración de luz solar, mayor influencia de la actividad ganadera, un cauce menos accidentado en el cual las rocas representaron cerca del 80% con respecto a los sedimentos y los dos tramos con pendientes similares. Finalmente el tramo “D” ubicado después de que el río pasa por el municipio de Iza presenta el cauce con menor cobertura y mayor alteración e influencia antrópica (Figura 4).

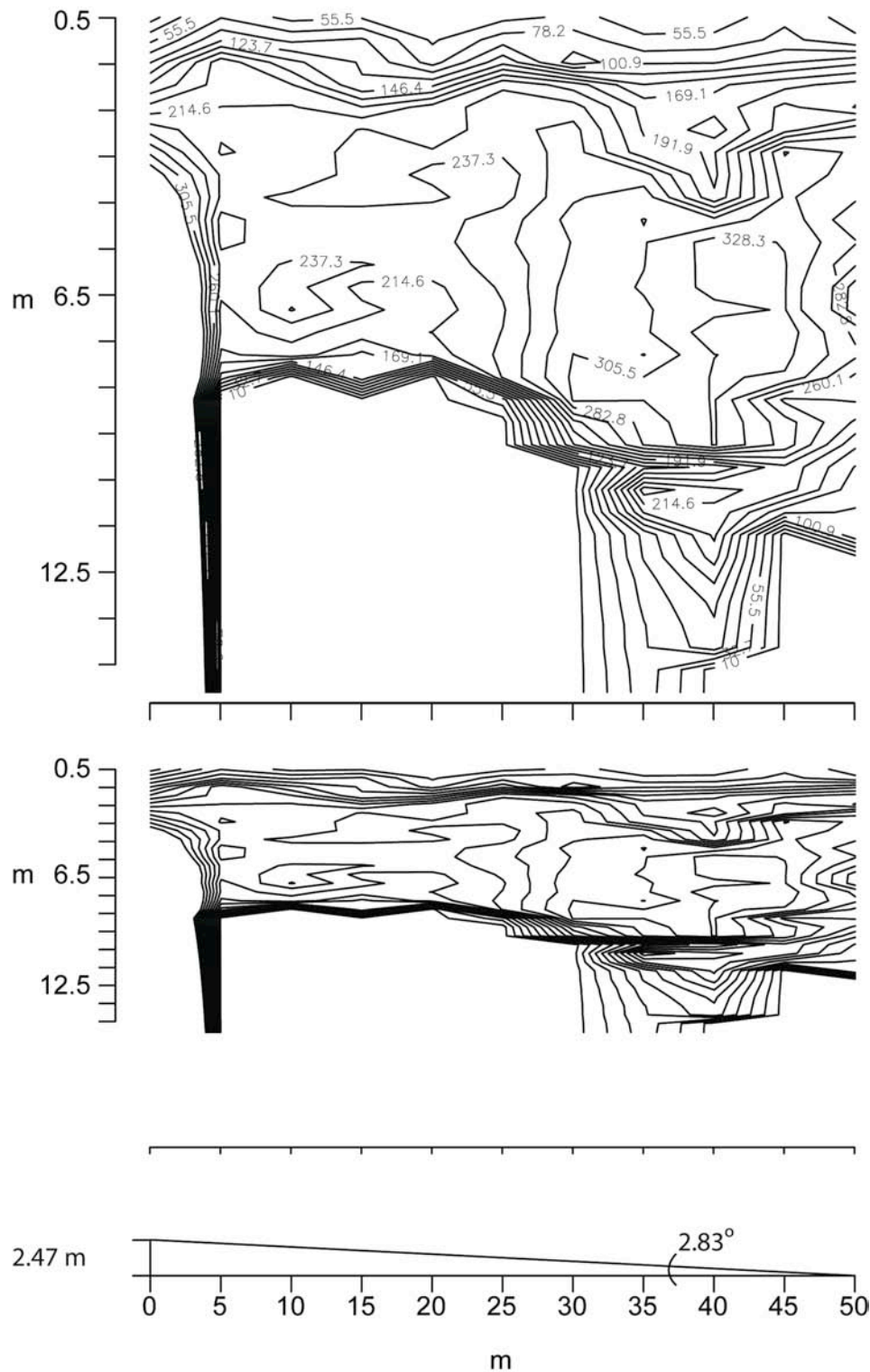


Figura 1. Perfil batimétrico y desnivel del tramo “A”. Las curvas de nivel se encuentran en cm. La figura del medio muestra la proporción largo-ancho del tramo. Datos: Proyecto GLOBRIO; perfil realizado para el presente trabajo

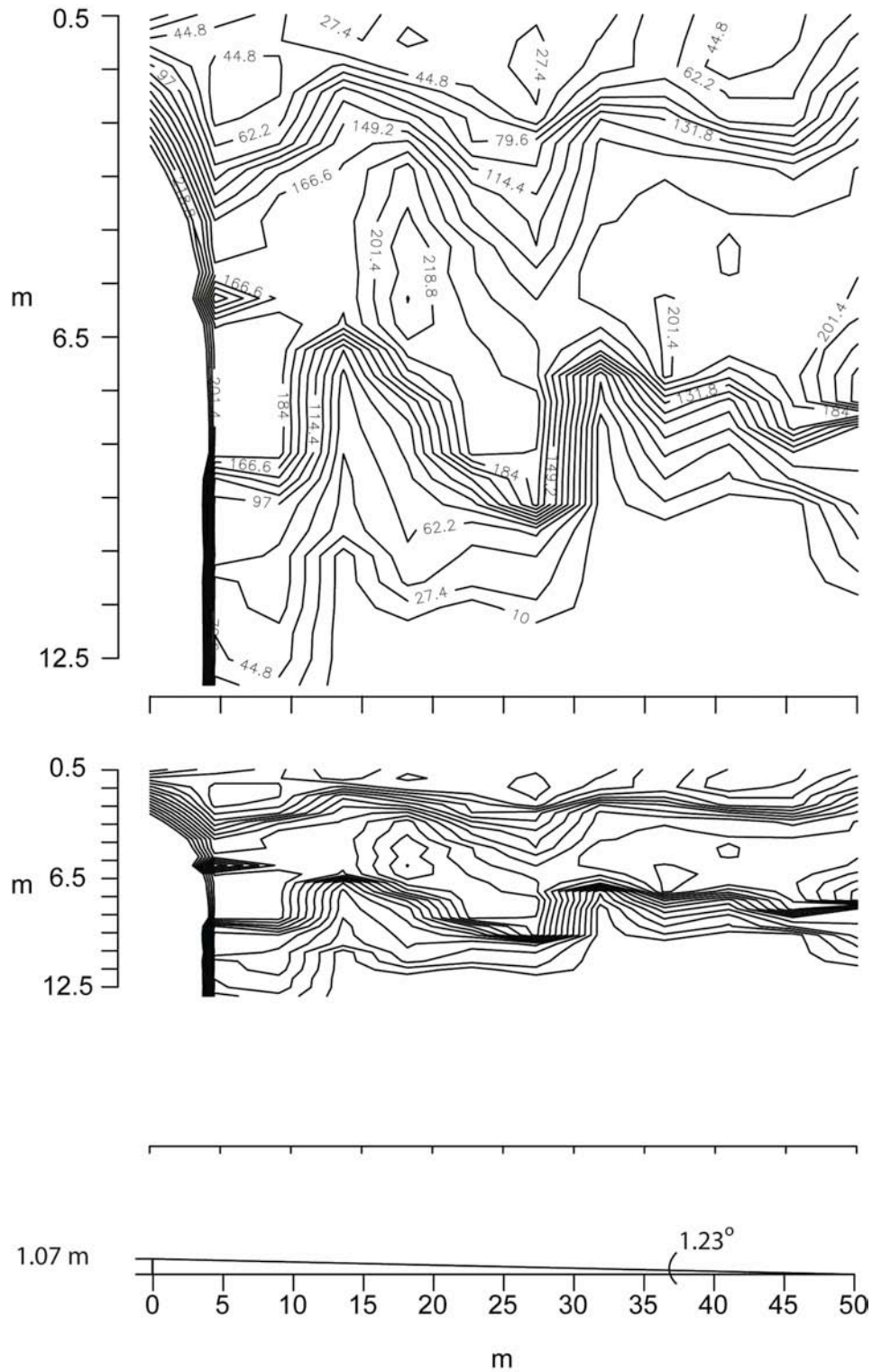


Figura 2. Perfil batimétrico y desnivel del tramo “B-Control”. Las curvas de nivel se encuentran en cm. La figura del medio muestra la proporción largo-ancho del tramo.
 Datos: Proyecto GLOBRIO; perfil realizado para el presente trabajo

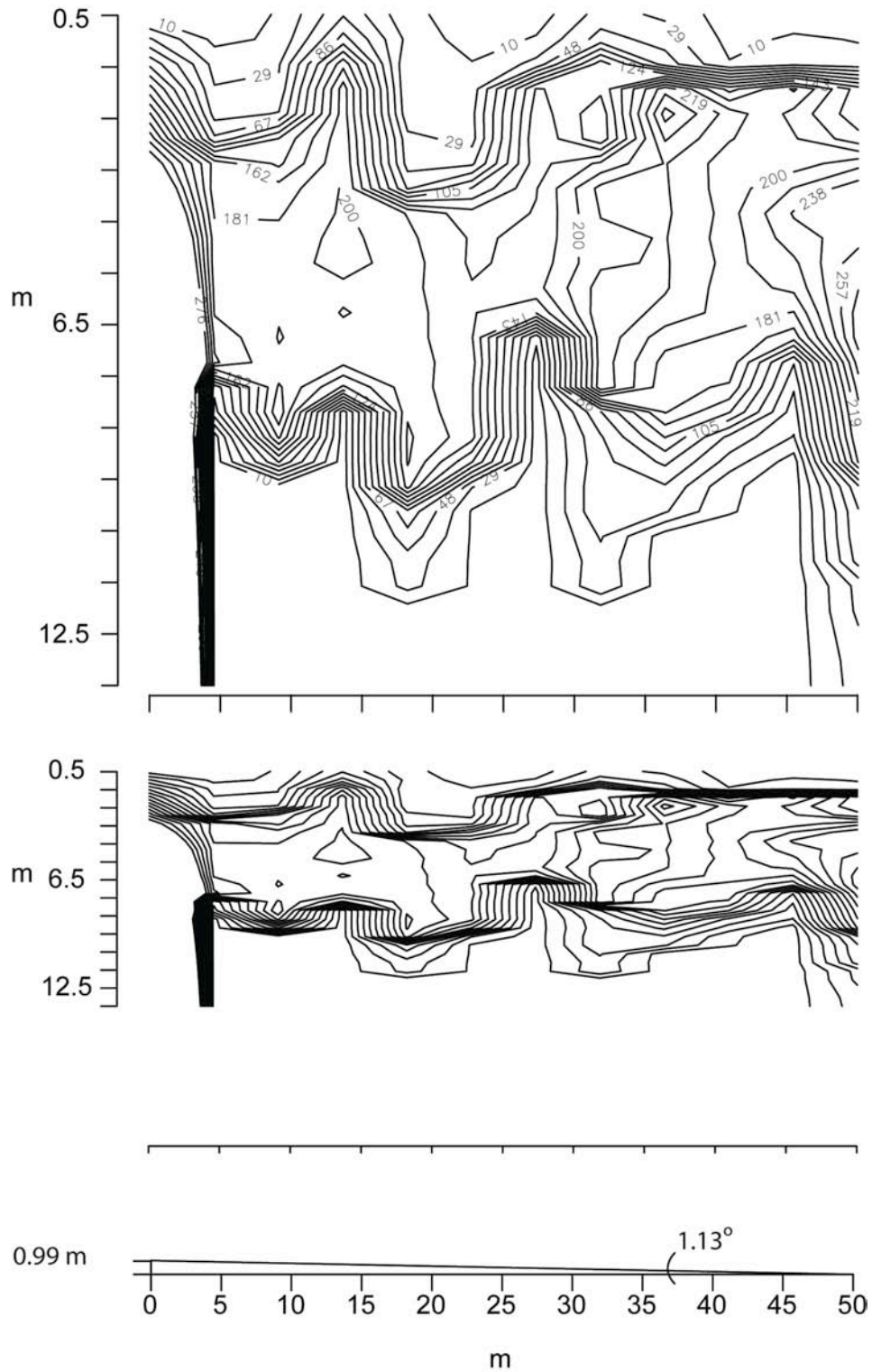


Figura 3. Perfil batimétrico y desnivel del tramo “C-Impacto”. Las curvas de nivel se encuentran en cm. La figura del medio muestra la proporción largo-ancho del tramo.
 Datos: Proyecto GLOBRIO; perfil realizado para el presente trabajo

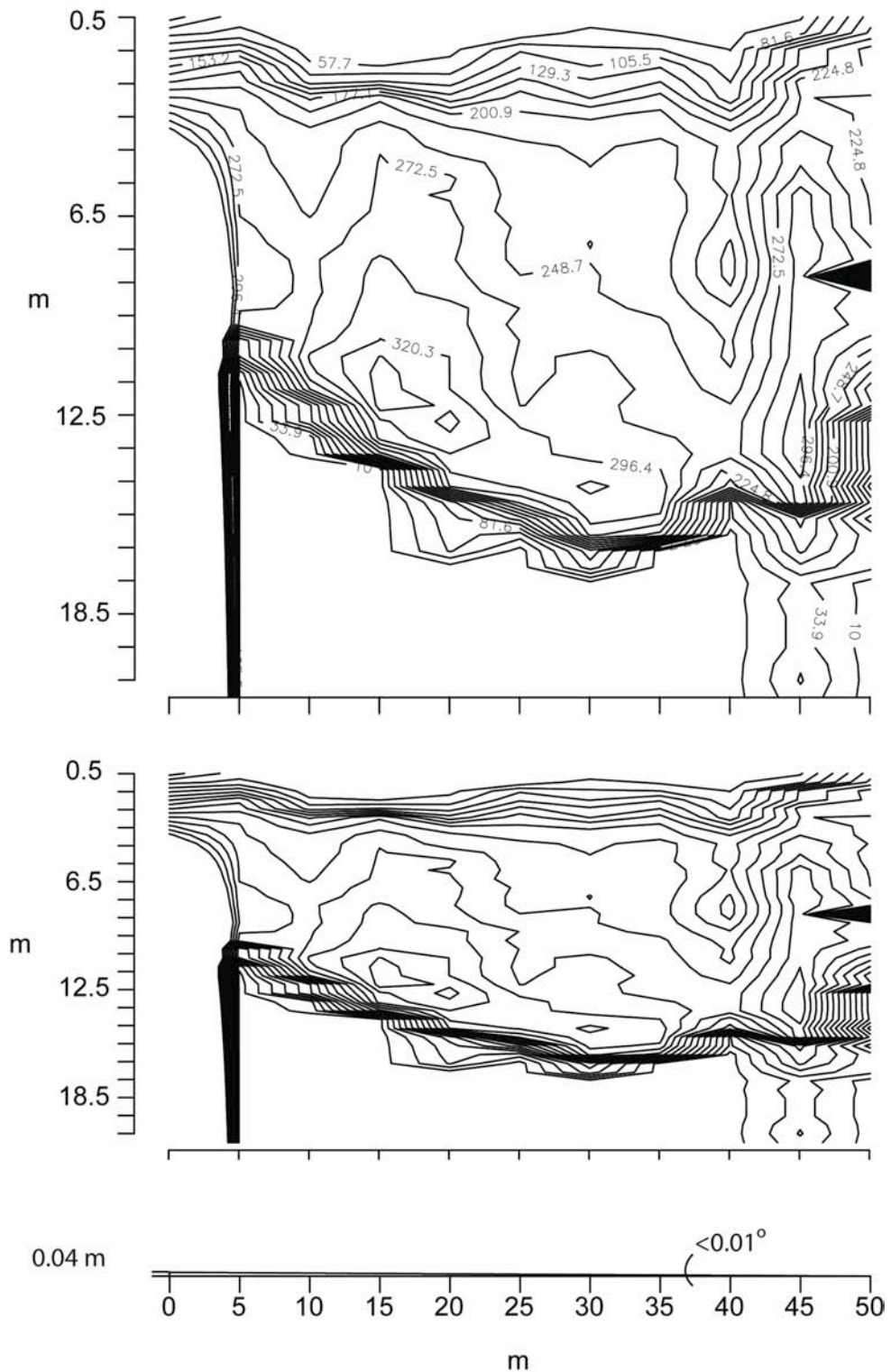


Figura 4. Perfil batimétrico y desnivel del tramo “D”. Las curvas de nivel se encuentran en cm. La figura del medio muestra la proporción largo-ancho del tramo. Datos: Proyecto GLOBRIO; perfil realizado para el presente trabajo

Los microorganismos en el río

Como ocurre en cada ambiente que han conquistado, las comunidades bacterianas juegan un papel importante en los ciclos de los nutrientes, y en los ríos especialmente las que se encuentran en agregados microbianos bentónicos formando las biopelículas o biofilms (Romaní *et al.*, 2004(b)). Estas asociaciones pueden discriminarse de acuerdo al sustrato sobre el que crecen, siendo el epilítion la comunidad que cubre las piedras presentes en ambientes acuáticos; mientras que las bacterias que crecen adheridas a las partículas de los sedimentos (arena) hacen parte de la comunidad conocida como epipsamón (Campbell, 1987; Sánchez & Torres-Alvarado, 2005).

Los biofilms constituyen un ensamble mixto compuesto por bacterias, hongos, protozoos y algas juntos en una matriz polimérica extracelular (Campbell, 1987; Romaní & Sabater, 2001; Stoodley *et al.*, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). La configuración en esta comunidad mixta de autótrofos y heterótrofos les confiere algunos beneficios, por ejemplo amortigua los cambios en la disponibilidad de materia orgánica y favorece la ruta heterotrófica ya que además de las reservas contenidas en cada célula o en la matriz que las contiene, los autótrofos ofrecen una fuente importante de energía a través de sus exudados; no obstante, la materia orgánica disponible en el río puede ser una fuente importante de energía; la singularidad de esta relación sugiere que la disponibilidad de materia orgánica coloidal y/o disuelta para los microorganismos heterótrofos tiene un efecto sobre la estructura del biofilm y determina la suerte de las comunidades microbianas (Lock & Ford 1985; Freeman & Lock, 1995; Romaní *et al.*, 2004(a); Watnick & Kolter, 2000). De esta manera las condiciones ambientales regulan el desempeño de las biopelículas y favorecen procesos de adaptación y sucesión que resultan en la selección de grupos con propiedades metabólicas particulares (Sabater *et al.*, 2005; Olapade & Leff, 2005).

En los ríos las comunidades bentónicas microbianas han sido obligadas a optimizar los mecanismos para incorporar nutrientes como el carbono, el nitrógeno y el fósforo mientras minimizan los efectos de los tóxicos ya que están expuestas a una corriente continua de sustancias benéficas (nutrientes) y dañinas (metales pesados y otros xenobioticos); mientras las bacterias cumplen su papel en el reciclaje de los nutrientes sobresalen entre los microorganismos incluidos en la matriz al ser un eslabón clave y participar en muchos aspectos de la química y

biología de los ecosistemas lóticos, por ejemplo potenciando la capacidad autodepuradora del sistema mediante la degradación de contaminantes (Lünsdorf *et al.* 1997, Fischer & Pusch 1999).

Algunas propiedades de las biopelículas se atribuyen a la diferencia entre los microorganismos que las constituyen y los que transitan en el agua del río; las bacterias asociadas a superficies sumergidas son 100 veces más activas y llegan a contribuir con el 90% de la actividad heterotrófica bacteriana cuando crecen en biopelículas; su densidad puede variar entre 10^6 y 10^9 células cm^{-2} , representar entre el 3 y el 10% de la biomasa microbiana bentónica y no obstante, aportar hasta el 53% de la producción total en algunos casos dependiendo de las condiciones ambientales (Edwards & Meyer 1986; Iriberry *et al.*, 1990). Otras propiedades de las biopelículas dependen de la estructura y composición de la matriz del biofilm que genera condiciones ambientales particulares al funcionar como protección y reserva de energía y nutrientes (Burton *et al.*, 1982; O'Sullivan *et al.* 2002; Romaní & Sabater 2001).

Al estudiar la estructura del biofilm en relación con el medio ambiente fluido que lo rodea se han logrado identificar las variables que afectan el crecimiento bacteriano, resaltando por su importancia la temperatura y la concentración de carbono orgánico total; las variaciones a que se enfrentan los microorganismos determinan ciclos productivos de diferente intensidad en los que se alterna la importancia de grupos metabólicos particulares y de comunidades alóctonas o autóctonas (Romaní & Sabater, 2001). Las características estructurales de las biopelículas dependen de las condiciones ambientales del sistema y de las relaciones que se establecen entre los microorganismos; se ha registrado que cuando crecen sobre rocas las comunidades más expuestas a la luz solar se benefician por la presencia de microorganismos fotótrofos encontrándose relaciones C:N bajas y mayor complejidad en términos de cantidad de algas, bacterias, nitrógeno y carbono, constituyendo un importante sumidero de carbono orgánico disuelto. Mientras que, sobre arena, la proporción C:N es alta y las biopelículas son poco complejas pero tienen mayor capacidad para degradar polisacáridos y fósforo orgánico como consecuencia de la acumulación de materia orgánica, la deficiencia de luz y la limitación por nutrientes (Romaní *et al.* 2004(a); Olapade & Leff, 2005)

Utilización de la materia orgánica.

El aprovechamiento de la materia orgánica depende de las características de los sustratos en los cuales se desarrollan las biopelículas y de la respuesta metabólica, mediada en alto grado por la actividad de las enzimas extracelulares, ante cambios en la cantidad y calidad de la materia orgánica disponible (Romaní & Sabater, 2001). Las enzimas que participan en las reacciones bioquímicas que ocurren fuera de las células han sido denominadas ectoenzimas o enzimas extracelulares, la gran mayoría son hidrolasas; Chróst & Siuda (2002) utilizan el término ectoenzima para referirse a las enzimas que atraviesan la membrana citoplasmática y pueden o no permanecer asociadas al microorganismo que las produce, las enzimas extracelulares que permanecen disueltas en el agua y/o asociadas a superficies pueden ser secretadas activamente por células intactas o ser producto de la lisis celular debida a la acción de los virus o la predación. Las enzimas extracelulares adheridas a la matriz polimérica y a la pared celular constituyen la base de un complejo que permite aprovechar la materia orgánica transportada en las aguas del río. Este complejo también ataca los compuestos secuestrados en la matriz y cuando el aporte de sustratos en las aguas disminuye los microorganismos adquieren cierto nivel de independencia ante el suministro de materia orgánica (Lock & Ford, 1985).

La acción enzimática es una variable importante en la evaluación del estado metabólico de la comunidad microbiana bentónica ya que constituye el primer paso en la degradación de la materia orgánica y da continuidad al ciclo de los nutrientes; dicha actividad enzimática depende de la concentración de sustratos, y por ejemplo en el sedimento dónde los compuestos orgánicos se acumulan en mayor cantidad que sobre las rocas, las actividades reportadas tienden a ser mayores; también se ha reportado que la actividad en los biofilms es mayor cuando tienden a ser más importantes los autótrofos con respecto a los heterótrofos y que sin embargo las diferencias entre actividades de biopelículas con estructuras y régimen de corriente similares pueden ser explicadas si se tiene en cuenta el papel regulador de la temperatura sobre la actividad de las enzimas extracelulares. (Romaní & Sabater, 2000; Romaní & Sabater 2001).

En este contexto, las técnicas fluorométricas se han aplicado para medir la actividad enzimática en muestras naturales desde hace mucho tiempo y gracias a que son rápidas y sensibles se pueden implementar en diferentes formatos de acuerdo con los requerimientos de

cada aplicación, se basan en la utilización de sustratos análogos que contienen una molécula fluorescente artificial y una o más moléculas naturales unidas mediante un enlace específico, la fluorescencia es observada una vez que la enzima ataca el enlace y libera el fluorocromo. Si la concentración del sustrato análogo satura completamente la actividad de la enzima los valores obtenidos corresponderán a la actividad potencial, es decir a la capacidad máxima que tiene la biopelícula para atacar un sustrato específico; debido a que la hidrólisis del sustrato modelo puede ser inhibida por competencia con diferentes compuestos naturales la saturación procura que ningún otro compuesto sea más disponible. Tampoco es deseable que ocurran cambios en la comunidad microbiana durante la evaluación por lo cual las determinaciones de actividad enzimática extracelular en muestras naturales se realizan con periodos cortos de incubación (Hoppe, 1993).

Los microorganismos están en todas partes y transforman el espacio que los rodea mientras existen realizando una labor que intentamos comprender. Mediante la evaluación de variables estructurales y funcionales de las biopelículas, el presente trabajo aborda la evaluación del estado de las biopelículas y el problema del incremento en la disponibilidad de nutrientes en un río andino de alta montaña como consecuencia de la actividad humana; al dirigir la mirada sobre la participación de la microbiota bentónica en los flujos de materia y energía en los sistemas lóticos inicia la generación de conocimiento sobre el tema en Colombia.

Materiales y métodos

Descripción del área

El río Tota nace en la cordillera oriental en el departamento de Boyacá, desemboca en el río Pesca y es alimentado por una cuenca de drenaje de 340625 ha, a su vez forma parte de la cuenca hidrográfica del Magdalena. La región que atraviesa la planicie de Sogamoso-Duitama-Iza (Figura 1). La región pertenece al piso térmico frío. La zona es apta para el cultivo de maíz, papa, trigo, legumbres, arbustos frutales y pastos para ganadería (Ulloa *et al.*, 2001).

El clima de la región es sub-húmedo con régimen de lluvias monomodal, presenta las lluvias más frecuentes entre abril y noviembre, mientras que la época más seca se establece entre diciembre y febrero, la mayor precipitación se traduce en caudales reportados de hasta $5.2 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ y velocidades de máximo 1.62 m s^{-1} ; la variación hidrológica afecta la temperatura, la concentración de oxígeno y la descomposición de la materia orgánica pero poco los valores de nutrientes como fosfato, amonio y nitrato (Martínez & Donato, 2003).

Fase de Campo

Frecuencia y estaciones de muestreo

El muestreo se realizó sobre el recorrido que el río realiza por los municipio de Tota, Cuítiva e Iza, en una zona que en general, ha sido intervenida y acondicionada para la ganadería. Se definieron cuatro tramos del río a lo largo de 50 m sobre su cauce para realizar los muestreos. El tramo "A" ubicado en $05^{\circ}32'0.10''\text{N}$, $73^{\circ}1'28.24''\text{W}$; aproximadamente a 6 Km del tramo "B - Control" ubicado en $05^{\circ}34'53.04''\text{N}$, $72^{\circ}59'10.9''\text{W}$; el tramo "C - Impacto" ubicado en $05^{\circ}35'13.6''\text{N}$, $72^{\circ}59'2.54''\text{W}$; y finalmente el tramo "D" en $05^{\circ} 35' 59.47'' \text{N}$, $72^{\circ} 58' 54.67'' \text{W}$ (Figura 5).

El trabajo fue dividido en dos niveles de resolución de acuerdo con la intensidad del muestreo, inicialmente en una escala temporal amplia se reconoció el estado de las biopelículas epilíticas y epipsámicas en cuatro tramos (A, B, C y D) ubicados a lo largo del río tomando muestras cada 40 días aproximadamente; para este muestreo se realizaron 6 salidas (mayo, junio, agosto, octubre de 2007, abril y mayo de 2008) durante las cuales se colectaron en cada estación por triplicado muestras de biopelículas tanto epilíticas como epipsámicas. No obstante las

biopelículas son una comunidad que cambia en una escala temporal e incluso espacial mucho menor, el trabajo se realizó asumiendo que la información obtenida resumiría la dinámica que controla la estructura y actividad de la biopelícula. En el segundo nivel de resolución (muestreo intensivo) se evaluó el efecto de la fertilización de un tramo del río (Impacto) con respecto a un tramo sin alterar (Control) separados 600 m, muestreando cada 12 horas durante 3 días. Los tramos B y C corresponden a los tramos Control e Impacto respectivamente (Figura 5).

Experimento de fertilización

En abril de 2008 se inició el experimento de fertilización de un tramo del río (Impacto), el cual consistió en incrementar la cantidad de fósforo y nitrógeno en el sistema. Se procuró al menos triplicar la concentración registrada en el análisis de los nutrientes fosfato y amonio, agregando a un tanque de 500 l de capacidad la cantidad necesaria de fertilizante comercial teniendo en cuenta la proporción de estos nutrientes en la composición del mismo, la velocidad del flujo de salida y el caudal. La fertilización se hizo efectiva en tres puntos de goteo a lo largo del tramo. Durante la salida de abril de 2008 se recolectaron muestras de biopelículas epilíticas cada 12 horas hasta el tercer día, en las estaciones Control e Impacto, y posteriormente a los 15 días. Con la información obtenida se calcularon las tasas de crecimiento de la comunidad de procariontas y de algas.

Toma de muestras

Todas las muestras de biopelículas se transportaron bajo cadena de refrigeración en neveras con hielo hasta el momento del análisis en el laboratorio; el método de muestreo fue tomado y modificado de Artigas *et al.* (2008) como se describe a continuación.

Epilíton. Para la recolección de las biopelículas epilíticas se dispuso de un sustrato artificial colonizado durante un mínimo de 4 semanas, excepto para el experimento de fertilización. El sustrato artificial consistió en cuadrados de cerámica de aproximadamente 1 cm² pegados con silicona a bloques de concreto sumergidos en cada uno de los tramos seleccionados, en cada tramo fueron distribuidos cuatro bloques de concreto con 25 cerámica cada uno. Los cuadrados de cerámica se desprendieron y se colocaron en tubos de centrífuga.

Epipsamon. Las muestras de la biopelícula epipsámica se tomaron con una jeringa de 1.54 cm de diámetro, cortada en su extremo (1 cm³ aproximadamente), se tomaron muestras de tres lugares del cauce, parte central y las orillas del río, en cada tramo a partir del sedimento extraído con un corazonador (primeros 5 cm de profundidad).

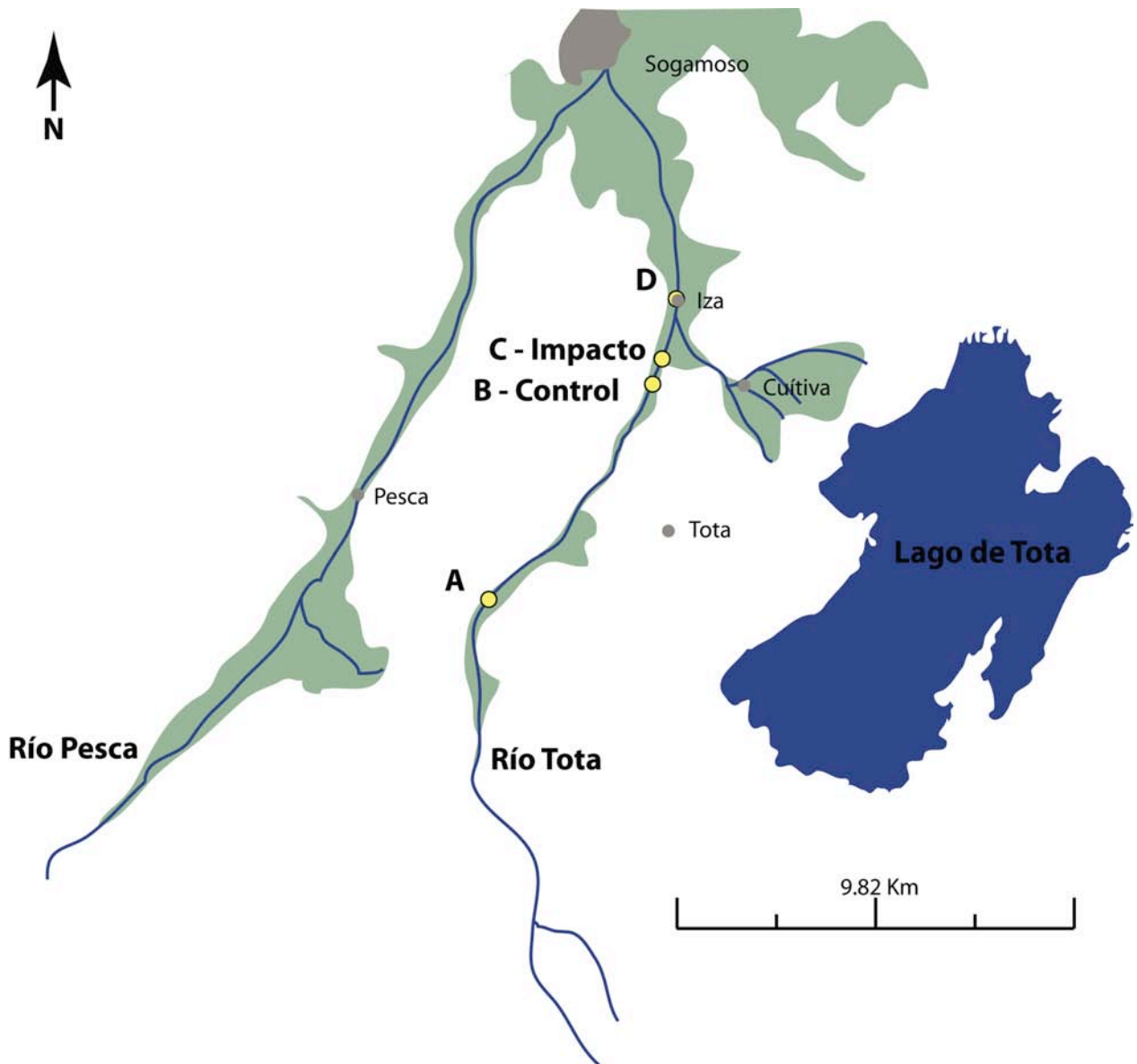


Figura 5. Ubicación del río Tota y de las estaciones de muestreo. Los puntos amarillos representan las estaciones. Los puntos grises representan los municipios. El color verde representa el área de la cuenca que ha sido activamente utilizada.

Técnicas aplicadas

Conteo y biomasa de bacterias

Las muestras de las biopelículas se fijaron en campo con solución de formalina al 2% preparada con agua del río, la misma solución se utilizó como blanco, los valores de abundancia de este blanco fueron restados de los valores de las muestras. Posteriormente en el laboratorio, las muestras (epilíticas y epipsámicas) fueron sometidas a un baño de ultrasonido con una frecuencia de 28 kHz, durante máximo 2 minutos, tres veces. Durante la sonicación la temperatura se mantuvo controlada con hielo. En el caso de los sedimentos, al terminar la sonicación las muestras se dejaron sedimentar 3 minutos para así reducir la interferencia en la observación por partículas y detritus.

Para el conteo se utilizó la técnica de epifluorescencia con el fluorocromo DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol). Se probaron distintas diluciones de la muestra para lograr alrededor de 30 células por campo. Se tiñó con DAPI en una concentración final de $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ durante 10 minutos. Las muestras teñidas se filtraron sobre filtros de policarbonato negros de $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro a baja presión de vacío (180 mm Hg), posteriormente cada filtro se colocó entre lámina y laminilla con aceite de inmersión de baja fluorescencia. La tinción con DAPI permitió diferenciar las bacterias de color azul claro sobre el fondo negro del filtro utilizando un microscopio para epifluorescencia marca Olympus BMax 60 y filtros UV-2A (Excitación 330-380 nm, DM 400 nm, BA 420 nm) a 1000 aumentos (Canosa & Pinilla, 2001). Se contaron 20 campos de cada filtro para lograr un total de 400-600 bacterias. Los conteos de las bacterias se realizaron en el laboratorio de Microbiología Acuática de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Para el cálculo de densidad de bacterias cm^{-2} se utilizó la fórmula: $N \cdot F \cdot I / V$; en donde N: cantidad de células por campo; F: factor que determina el número de campos por filtro; I: es el inverso de la dilución utilizada y V: volumen de muestra filtrado/volumen de muestra fijada. Para calcular la biomasa se aplicó un factor según el modelo de biomasa constante asumiendo que cada célula contenía 20 fg C, no obstante, implica relativamente mayor peso seco en las células pequeñas que en las más grandes, se utilizó dada la aparente homogeneidad en la distribución de tamaños observada en todas las muestras (Lee & Fuhrman, 1987; Norland, 1993).

Medidas de actividad de enzimas extracelulares

Para medir la actividad potencial de las cuatro enzimas objetivo que se muestran en la tabla 1 se utilizaron sustratos enzimáticos artificiales en concentración establecida de 0.3 mM debido a las dificultades para determinar la concentración de saturación de la actividad enzimática de cada sustrato, tramo y enzima. Para generar la curva patrón del potencial de emisión de fluorescencia Vs. concentración del fluorocromo (μM) se prepararon soluciones de 0 a 50 μM de 4-Metilumbeliferil (MUF) y 7-amido-4-metilcumarina hidrocloreuro (AMC). A los datos de la curva obtenida se les aplicó una regresión polinómica de ajuste local “loess” (R Development Core Team, 2008), después de evaluar el ajuste con tres modelos polinómicos y uno racional para las posibles regresiones (Anexo 1).

Tabla 1. Enzimas objetivo de los sustratos artificiales utilizados para evaluar actividad de enzimas extracelulares en las biopelículas estudiadas.

Enzima	Sustrato artificial	Reacción
β -D- glucosidasa (EC 3.2.1.21)	MUF- β -D- glucopiranosido	Descomposición de pequeños oligómeros con enlaces β -D-glucosa
Leucina-aminopeptidasa (EC 3.4.11.1)	AMC-Leucina	Descomposición de péptidos
Fosfatasa (EC 3.1.3.1 y EC 3.1.3.2)	MUF-fosfato	Descomposición de esteres de fosfato
Celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91)	MUF- celobiósido	Degradación de celulosa

Después de descongelar las muestras a temperatura ambiente, se midió en espectrofluorómetro (Perkin Elmer, Coleman 139 UV-VIS) la fluorescencia del sobrenadante. El MUF a 455 nm de emisión y el AMC a 445 nm de emisión bajo excitación con lámpara de mercurio. La cuantificación de la concentración de fluorocromo liberado se realizó sobre la curva de calibración de soluciones patrón de MUF y AMC usando la regresión polinómica de ajuste local generada para los patrones por el programa “R” (Anexo 1). Las lecturas de fluorescencia de los controles se tuvieron en cuenta para corregir la posible hidrólisis no enzimática del sustrato, actividad enzimática del agua y la presencia de compuestos fluorescentes en las muestras. La

lectura de actividad enzimática se realizó en el Laboratorio de Química de la Pontificia Universidad Javeriana.

Se analizaron las muestras para cada actividad teniendo en cuenta los controles de fluorescencia. Se siguió el procedimiento sugerido por Muñoz & Romani (Proyecto GLOBRIO²) que se describe brevemente a continuación. Se agregó a cada muestra 150 µl del stock 10 mM de sustrato enzimático artificial para alcanzar la concentración de 0.3 mM en un volumen de reacción final de 5 ml. Junto con las muestras tratadas para evaluar la actividad de cada enzima se incubó un control con el mismo sustrato fluorogénico adicionado a las muestras. Al control de sedimento y de cerámica no se les agregó sustrato fluorogénico. Las muestras y controles se incubaron durante 1 h en la oscuridad con agitación constante y aproximadamente a 20 °C. La incubación se detuvo agregando 2.5 ml de tampón glicina 0.05 M, pH 10.4, las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta la lectura final de fluorescencia.

VARIABLES AMBIENTALES Y BIOLÓGICAS

Se contó con la información recolectada para el proyecto GLOBRIO. Las variables ambientales y biológicas incluyeron temperatura, pH, potencial de oxido-reducción (redox), conductividad, sólidos disueltos totales y oxígeno disuelto, registradas mediante un equipo portátil multi-parámetro YSI modelo 5563-10 MPS, caudal con un anemómetro multi-parámetro MiniAir20 marca Schiltknecht Messtechnik AG, y nutrientes aplicando métodos estándar. Adicionalmente se usó en el análisis de los resultados la información biológica correspondiente al índice de diversidad pigmentaria de Margalef y cantidad de clorofila a siguiendo la metodología de extracción con acetona (American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Pollution Control Federation (WPCF), 2005), y productividad primaria neta (PPN) del perifiton siguiendo el método cerrado (Guasch *et al.*, 1995). Todas estas determinaciones se realizaron al menos con triplicados y en el mismo momento de tomar las muestras microbiológicas.

² Contacto: Sergi Sabater, Departamento de Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Avda, Diagonal 645, 08028 Barcelona, España. ssabater@porthos.bio.ub.es

Análisis de los datos

Para su análisis las variables se organizaron en dos grupos denominados de variables independientes y de variables dependientes, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Denominación de las variables evaluadas

Variables dependientes	Biomasa procariota
	Actividad enzimática extracelular
Variables independientes	Caudal
	Temperatura
	pH
	Potencial Redox
	Conductividad
	Sólidos disueltos totales
	Oxígeno disuelto
	Clorofila a
	Índice de diversidad pigmentaria
	PPN
	Nutrientes

Se aplicaron factores de conversión para expresar los datos biológicos en términos de cantidad de carbono o fósforo (Tabla 3). Para determinar si las diferencias encontradas fueron significativas se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) en la valoración de actividad enzimática y biomasa entre tramos, sustratos y meses. Se realizaron las transformaciones necesarias para cumplir en lo posible los supuestos para el análisis; los datos de biomasa procariota se transformaron aplicando raíz cuadrada, los de biomasa algal aplicando logaritmo natural. A continuación se evaluaron los efectos de los modelos con y sin interacción entre los factores (Mes, Sustrato y Estación).

Las relaciones entre actividad de enzimas extracelulares, biomasa procariota, biomasa fotoautótrofa, nutrientes (NH_4^+ , PO_4^{-3}), y caudal se exploraron mediante análisis de regresión polinómica de ajuste local “lowess” (R Development Core Team, 2008). Se realizó un modelo conceptual (representación) que integra la información obtenida. En las figuras la caja del

boxplot represento el primer y tercer cuartil (amplitud semi-intercuartil), la línea en el medio de la caja represento la mediana, las líneas que salen de la caja (bigotes) se extienden hasta los valores extremos que no se consideran atípicos, los valores que se encuentran a más de 1.5 veces la amplitud semi-intercuartil se consideran atípicos y se representan con un círculo. Se utilizó el lenguaje y ambiente para cómputo estadístico R versión 2.7.0 en el análisis de los datos (R Development Core Team, 2008).

Tabla 3. Factores de conversión utilizados para expresar los datos en términos de carbono o fósforo. Los datos en las unidades iniciales se multiplican por el factor para obtener los datos en las unidades finales

Ítem	Unidades iniciales	Factor de conversión	Unidades finales	Origen del factor
Biomasa heterótrofos procariontas ^a	células m ⁻²	2 x 10 ⁻¹¹	mg C m ⁻²	20 fg C célula ⁻¹
Actividad de Glucosidasa ^b	mmol MUF m ⁻² h ⁻¹	72	mg C m ⁻² h ⁻¹	mg C-piranososa (mmol MUF) ⁻¹
Actividad de Celobiohidrolasa ^b	mmol MUF m ⁻² h ⁻¹	144	mg C m ⁻² h ⁻¹	mg C-celobiosa (mmol MUF) ⁻¹
Actividad de Aminopeptidasa ^b	mmol AMC m ⁻² h ⁻¹	72	mg C m ⁻² h ⁻¹	mg C-leucina (mmol AMC) ⁻¹
Actividad de Fosfatasa ^b	mmol MUF m ⁻² h ⁻¹	31	mg P m ⁻² h ⁻¹	mg P-PO ₄ ⁻³ (mmol MUF) ⁻¹
Biomasa algas ^c	g clorofila a m ⁻²	30,3	g C m ⁻²	Carbono:clorofila a
PPN	mg O ₂ m ⁻² h ⁻¹	0,375	mg C m ⁻² h ⁻¹	6CO ₂ +6H ₂ O → C ₆ H ₁₂ O ₆ +6O ₂

^a Norland, 1993; ^b Hoppe, 1993; ^c Cloern *et al.*, 1995; Fabiano & Danovaro, 1998.

Resultados

Caracterización del río Tota

Hidrología y variables fisicoquímicas

Los datos de caudal permitieron definir dos periodos dentro de la época de lluvias con características hidrológicas contrastantes. Los meses de mayo, junio, agosto y octubre de 2007 pertenecientes al periodo de caudal alto, con valores que variaron entre 0.7 y $2.24 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ mientras que en el periodo de caudal bajo se registraron valores entre 0.06 y $0.37 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ correspondientes a los meses de abril y mayo de 2008, durante el muestreo se presentaron condiciones climáticas atípicas que permitieron detectar diferencias significativas entre el periodo de caudal alto y el de caudal bajo. Fue necesario asumir que las diferencias detectadas entre agosto-junio y octubre-agosto se debieron a la variación natural de los valores de caudal dentro del periodo de caudales altos, es decir que se estableció un nivel de significancia (α) de 0.001 (Figura 6).

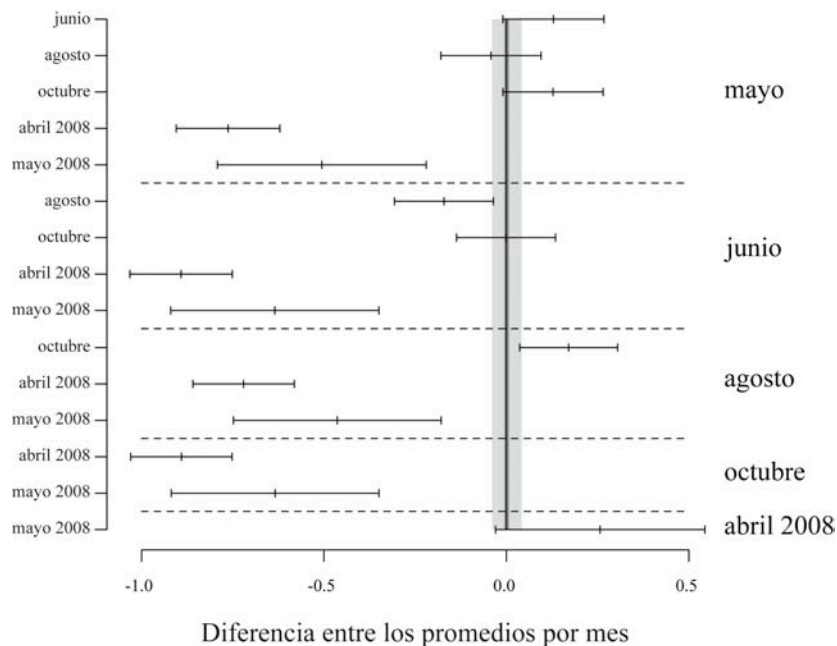


Figura 6. Resultado del Test de Tukey para los datos de caudal. Diferencia entre pares de meses, las barras horizontales representan el intervalo de confianza (95%). Mayo ($n=22$), junio ($n=23$), agosto ($n=24$), octubre ($n=24$), abril 2008 ($n=24$), mayo 2008 ($n=6$). Franja negra: $\alpha=0.05$; franja gris: $\alpha=0.001$.

Esta temporalidad también fue evidente en los valores registrados para los demás variables ambientales (Figura 7), presentándose temperaturas más elevadas y valores de oxígeno más bajos en los meses correspondientes al periodo de caudal bajo, no obstante la saturación de oxígeno en el agua nunca estuvo lejos del 100% de su capacidad a la temperatura medida. Durante el periodo de caudal bajo, se registró una ligera alcalinización de las aguas con respecto a los valores cercanos a la neutralidad registrados durante los meses de la época de lluvias. Se observaron valores de potencial rédox menores durante los meses de lluvia. Aparentemente los valores de conductividad (caudal alto: $66.3 \mu\text{S cm}^{-1}$; caudal bajo: $141.3 \mu\text{S cm}^{-1}$) y sólidos disueltos totales (caudal alto: 0.04 g l^{-1} ; caudal bajo: 0.11 g l^{-1}) presentaron el mismo patrón entre las dos periodos, presentándose los valores más bajos para las dos variables ante los caudales altos.

La concentración de los nutrientes amonio y fosfato presentó diferencias significativas (ANOVA, $P < 0.05$) debidas a los efectos de los factores Mes, Estación y su interacción, es decir que las diferencias detectadas fueron debidas a situaciones particulares de cada estación en cada mes y no solamente al ciclo hidrológico definido por las variaciones en el caudal (Figura 8); y aunque el registro de la fertilización no fue evidente en el momento puntual de tomar las muestras para las determinaciones, la respuesta de los microorganismos indicó que fue efectiva, no obstante la posible irregularidad de su intensidad.

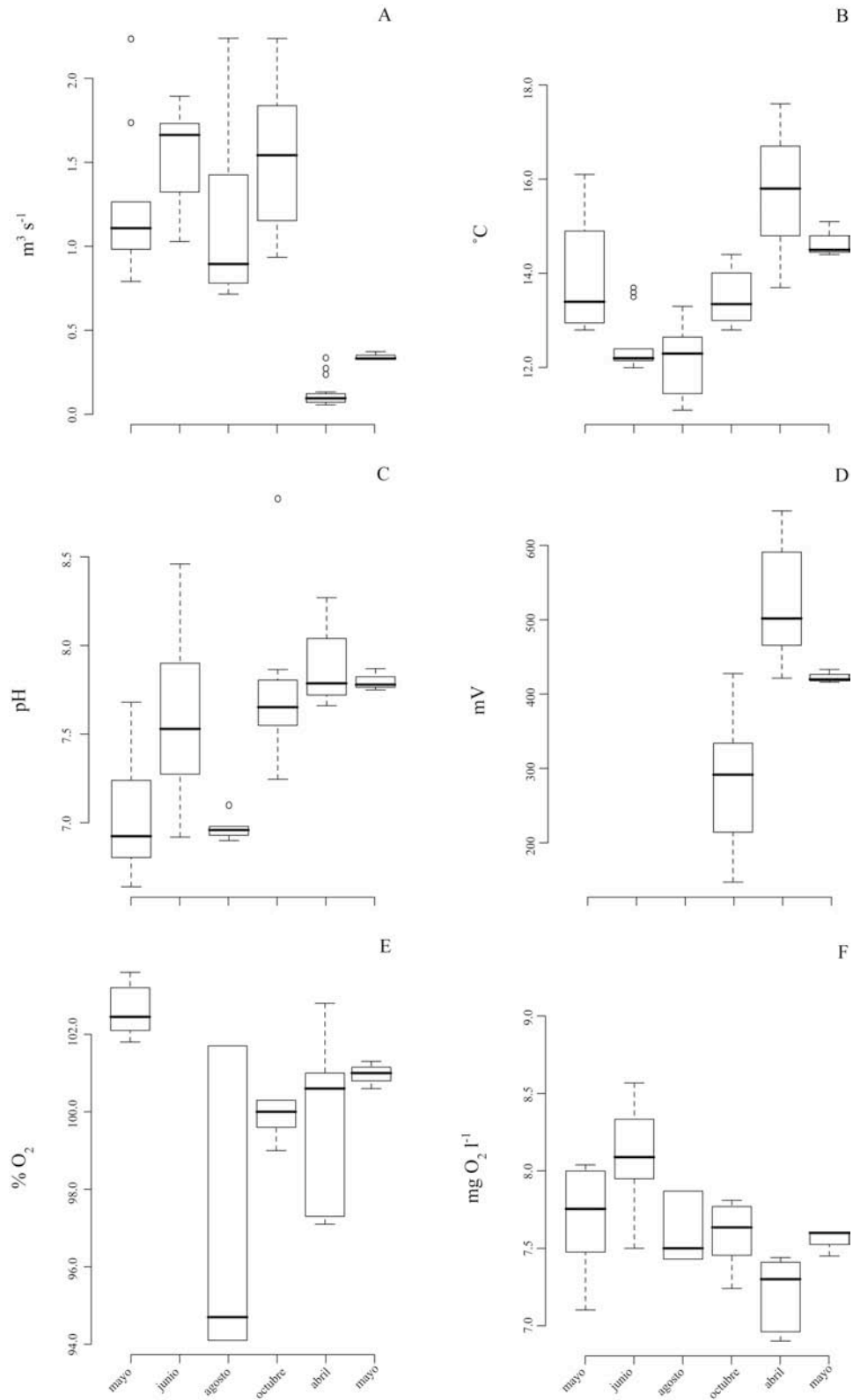


Figura 7. Variables físico-químicos por mes. (A) Caudal; (B) Temperatura; (C) pH; (D) Potencial de oxido-reducción; (E) Oxígeno disuelto %; (F) Oxígeno disuelto $mg l^{-1}$.

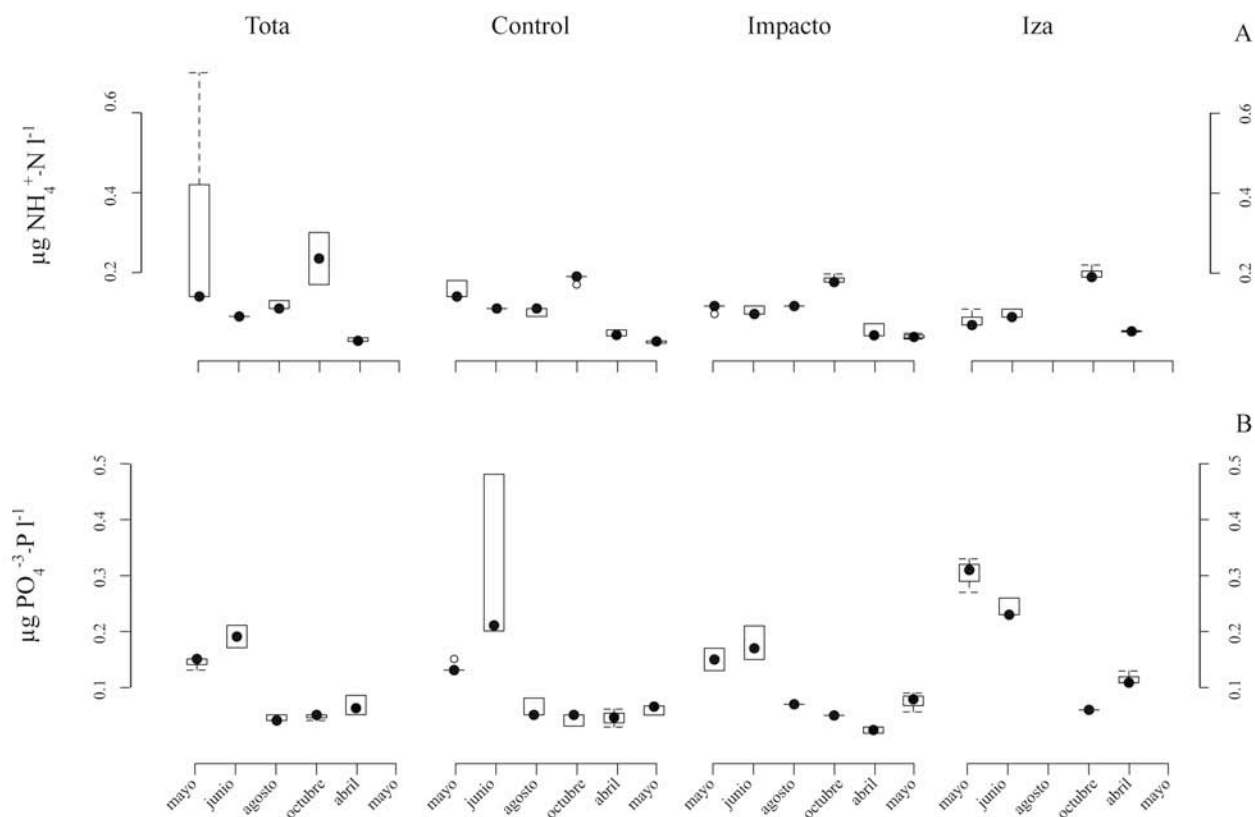


Figura 8. Valores registrados para los nutrientes amonio (A) y Fosfato (B) en cada mes y estación (Fuente: Proyecto GLOBRIO).

Biomasa algal y productividad primaria en las biopelículas epilíticas

La biomasa de fotótrofos desarrollada sobre las cerámicas presentó valores que variaron entre 0.13 y 6.04 g C m⁻². Los valores más altos fueron registrados durante los meses de caudales altos. Sin embargo los casos particulares en que las diferencias debidas a los efectos de la interacción Mes:Estación fueron significativas (ANOVA, P<0.05), se revelaron mediante los intervalos de confianza entre las diferencias de los promedios (Test de Tukey, ANEXO 2). El índice de diversidad pigmentaria de Margalef (Absorbancia 430 nm/Absorbancia 665 nm) en promedio fue de 2.1 con valores entre máximo: 2.6 y mínimo: 1.4. Los valores de productividad primaria neta fueron ligeramente más altos durante el periodo de caudal bajo y variaron entre 0.4 y 132.7 mg C m⁻² h⁻¹ en promedio (Figura 9).

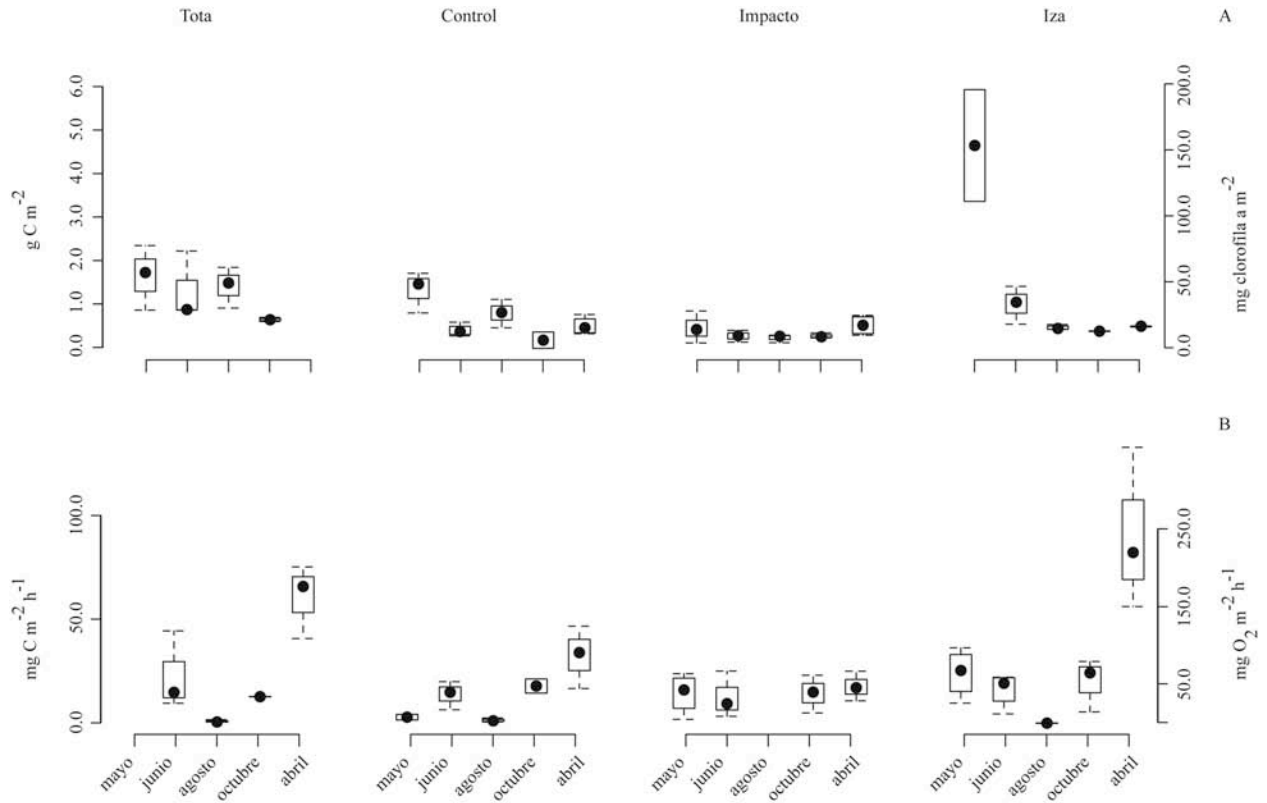


Figura 9. Biomasa de algas (A) y productividad primaria neta (B) en cerámica para cada estación durante el periodo de muestreo (Fuente: Proyecto GLOBRIO).

Caracterización estructural de las biopelículas del río Tota

La biomasa de procariotas varió en las biopelículas epipsámicas entre 0.1 y 13.9 mg C m^{-2} (4.9×10^6 y 6.9×10^8 células m^{-2}) y en las biopelículas epilíticas entre 0.45 y 63.6 mg C m^{-2} (2.6×10^7 y 3.7×10^9 células m^{-2}). Los valores más altos de biomasa bacteriana en las biopelículas se presentaron durante los caudales altos, y fueron particularmente elevados en el mes de mayo de 2007 (Figura 10.A y 10.B). Los valores de biomasa procariota fueron significativamente mayores en las cerámicas que en los sedimentos (ANOVA, $P < 0.001$). Los valores de biomasa fueron significativamente mayores en mayo y octubre de 2007 para las biopelículas epilíticas y significativamente menores en agosto para las biopelículas epipsámicas (ANOVA, $P < 0.001$). No obstante, las condiciones estuvieron lejos de ser homogéneas entre estaciones para un mismo mes y se detectó que la interacción Mes:Estación tuvo un efecto estadísticamente significativo más importante para las biopelículas epilíticas (ANOVA, $P < 0.01$) que para las biopelículas epipsámicas (ANOVA, $P < 0.05$).

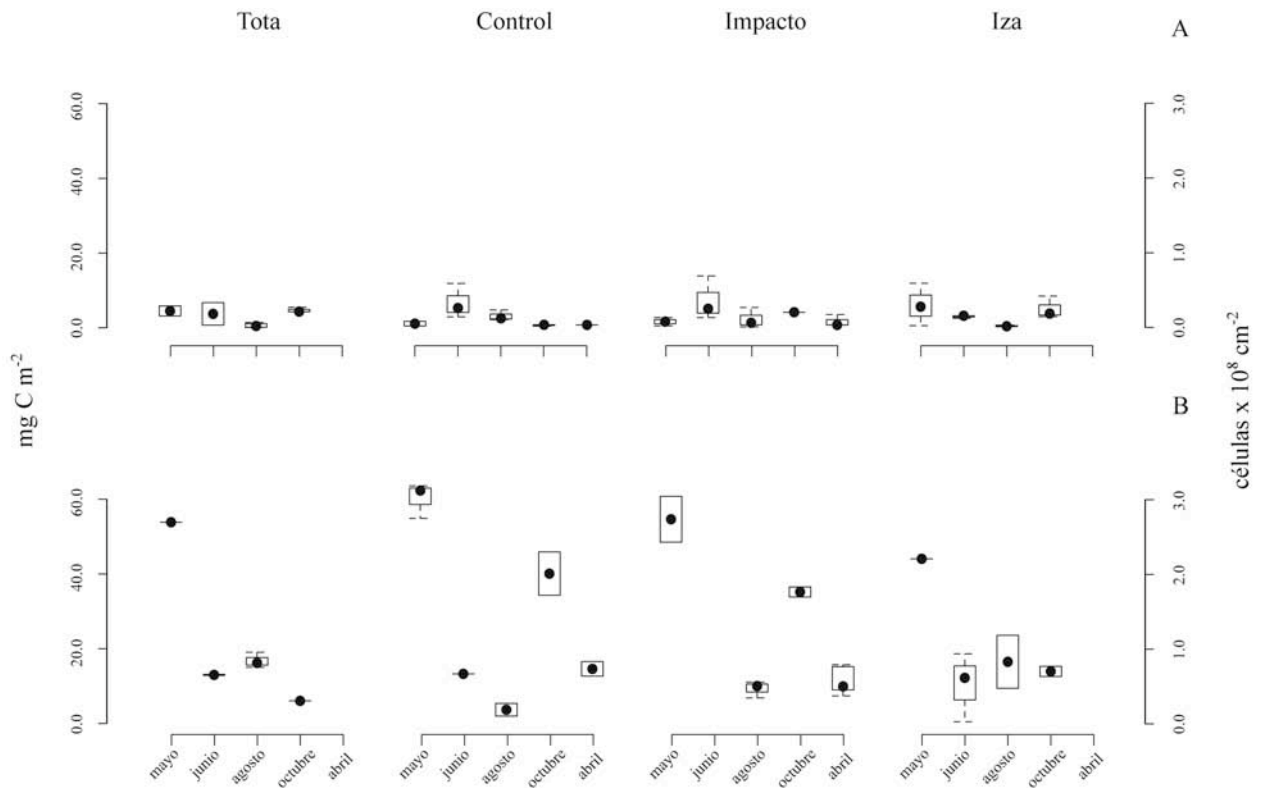


Figura 10. Biomasa de bacterias en sedimento (A) y cerámica (B) para cada estación durante el periodo de muestreo.

Caracterización funcional de las biopelículas del río Tota

En general, los valores más altos de actividad enzimática se registraron en las cerámicas. Las enzimas para las cuales se registró la mayor actividad fueron β -Glucosidasa, Fosfatasa y Celobiohidrolasa, los valores más bajos se registraron para Aminopeptidasa. Algunos valores promedio de actividad sobreestimaron la actividad enzimática debido a los valores extremos (Tabla 4). Las células creciendo en biopelículas epilíticas con actividad más elevada de β -Glucosidasa y Celobiohidrolasa se encontraron en el mes de agosto de 2007 durante el periodo de caudal alto; mientras que las células creciendo en biopelículas epipsámicas fueron más activas para estas enzimas en el mes de abril de 2008 durante el periodo de caudal bajo (Figura 11.A).

Tabla 4. Valores promedio, mínimo y máximo de actividad potencial de enzimas extracelulares por unidad de área y por célula para los dos sustratos de colonización evaluados

Sustrato	Enzima	Unidades	Promedio	Mínimo	Máximo	
Cerámica	Glucosidasa	mg C m ⁻² h ⁻¹	23.82	0.30	170.70*	Por área
	Aminopeptidasa		4.67	0.02	64.36*	
	Celobiohidrolasa		24.56	0.57	341.50*	
	Fosfatasa	mg P m ⁻² h ⁻¹	29.75	0.12	73.51	
Sedimento	Glucosidasa	mg C m ⁻² h ⁻¹	16.56	0.43	32.22	
	Aminopeptidasa		1.08	0.02	16.32*	
	Celobiohidrolasa		3.81	0.12	16.27*	
	Fosfatasa	mg P m ⁻² h ⁻¹	4.46	0.12	13.87	
Cerámica	Glucosidasa	pg C célula ⁻¹ h ⁻¹	0.0625	0.0003	0.3086	Por célula
	Aminopeptidasa		0.0026	0.0001	0.0072*	
	Celobiohidrolasa		0.0490	0.0003	0.4987*	
	Fosfatasa	pg P célula ⁻¹ h ⁻¹	0.0496	0.0012	0.1329	
Sedimento	Glucosidasa	pg C célula ⁻¹ h ⁻¹	0.0514	0.0009	0.5118	
	Aminopeptidasa		0.1687	0.0002	3.3420*	
	Celobiohidrolasa		0.0405	0.0002	0.3020	
	Fosfatasa	pg P célula ⁻¹ h ⁻¹	0.0514	0.0009	0.5118	

(*) Valores extremos

La actividad de las enzimas extracelulares β-Glucosidasa y Celobiohidrolasa presentaron valores mínimos y máximos relacionados con situaciones particulares en cada estación durante cada mes en un patrón espacio-temporal de difícil interpretación. Sin embargo, al asociar la densidad celular en cada caso con las medidas de actividad de enzimas extracelulares se identificó una tendencia al aumento de actividad por célula durante el periodo de caudal bajo con respecto al de caudal alto particularmente evidente para las biopelículas epipsámicas (Figura 11.B).

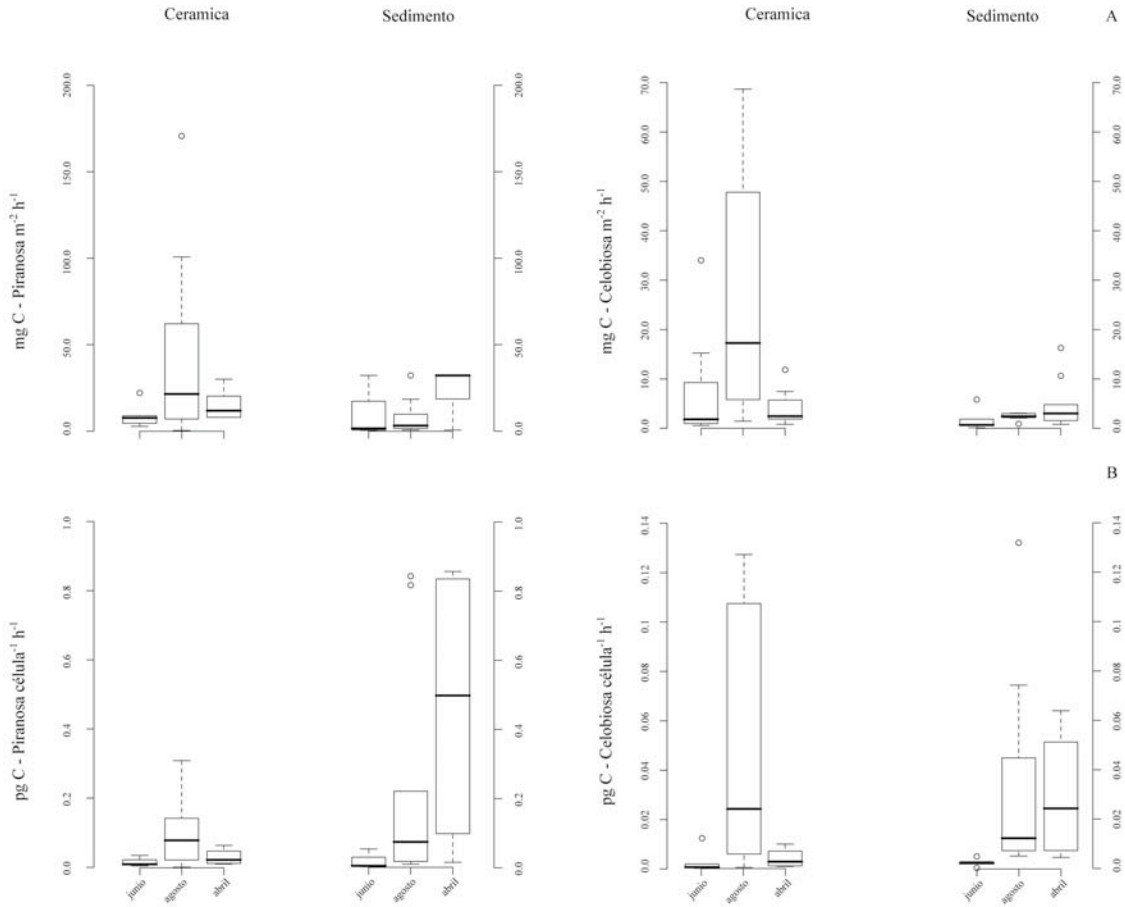


Figura 11. Actividad potencial de β -Glucosidasa y Celobiohidrolasa por área (A), y por célula (B), en biopelículas creciendo sobre cerámica y sedimento para cada mes.

La Aminopeptidasa presentó los valores más bajos de actividad (Tabla 3). No obstante se registraron actividades de hasta 16.32 y 64.36 mg C-Leucina m⁻² h⁻¹ en los sedimentos y cerámicas respectivamente. Aunque la actividad potencial por área fue mayor en las cerámicas, la actividad por célula fue mayor en los sedimentos. La liberación potencial promedio de carbono procedente de proteínas fue de 101.8 y 25.8 mg C m⁻² día⁻¹ como leucina para cerámicas y sedimentos respectivamente. No obstante la dificultad en interpretar de forma concluyente la actividad de la Aminopeptidasa, en promedio podría liberar el 10% del carbono que circula a través de las biopelículas epilíticas con respecto a las enzimas evaluadas.

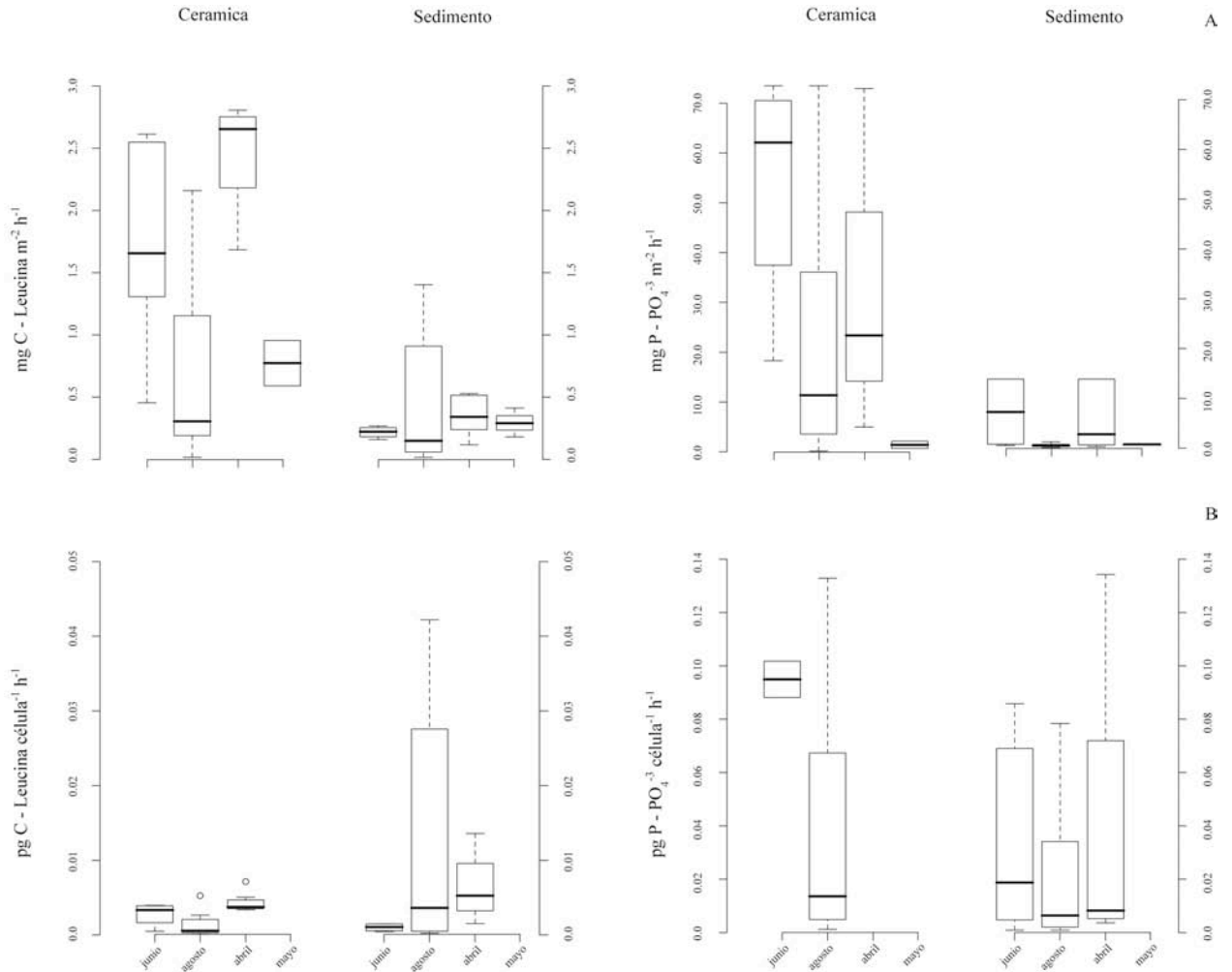


Figura 12. Actividad potencial de Aminopeptidasa y Fosfatasa por área (A), y por célula (B), en biopelículas creciendo sobre cerámica y sedimento para cada mes.

La actividad de la Fosfatasa puede atribuirse a la Fosfatasa alcalina (Figura 13). Se detectó un incremento de actividad en relación con la biomasa bacteriana tanto en las cerámicas como en los sedimentos. La actividad potencial Fosfatasa más elevada por área se presentó durante los meses de caudal alto; las diferencias fueron significativas entre sustratos (ANOVA, $P < 0.001$), mientras que los valores de actividad por célula fueron similares entre los dos sustratos de colonización evaluados (Figuras 12.A y 12.B). La magnitud de la actividad potencial de Fosfatasa representó entre 671.5 y $107 \text{ mg P m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ como fosfato inorgánico en cerámicas y sedimentos respectivamente.

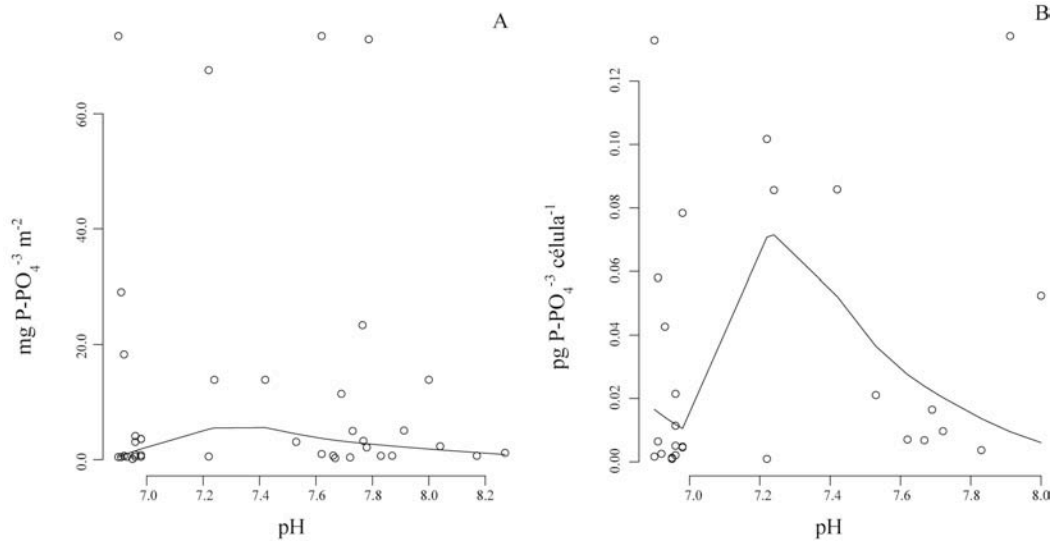


Figura 13. Gráficos de dispersión de actividad Fosfatasa por área (A) y por célula (B) contra los valores de pH para epipsamon y epiliton. La línea representa el ajuste con la regresión lowess.

Experimento de fertilización

El efecto positivo de la fertilización con nitrógeno y fósforo sobre la biomasa procariota y algal se observó claramente a las 360 horas (15 días) después de haber iniciado el tratamiento (Figura 14), resultando en biomasa de procariotas de máximo 9.46 mg C m⁻² y de autótrofos de 1.39 g C m⁻². Los datos de la sucesión hasta las 72 h de seguimiento revelaron un incremento en la biomasa de algas principalmente, mientras que en este mismo intervalo las diferencias en biomasa procariota no son claramente discernibles.

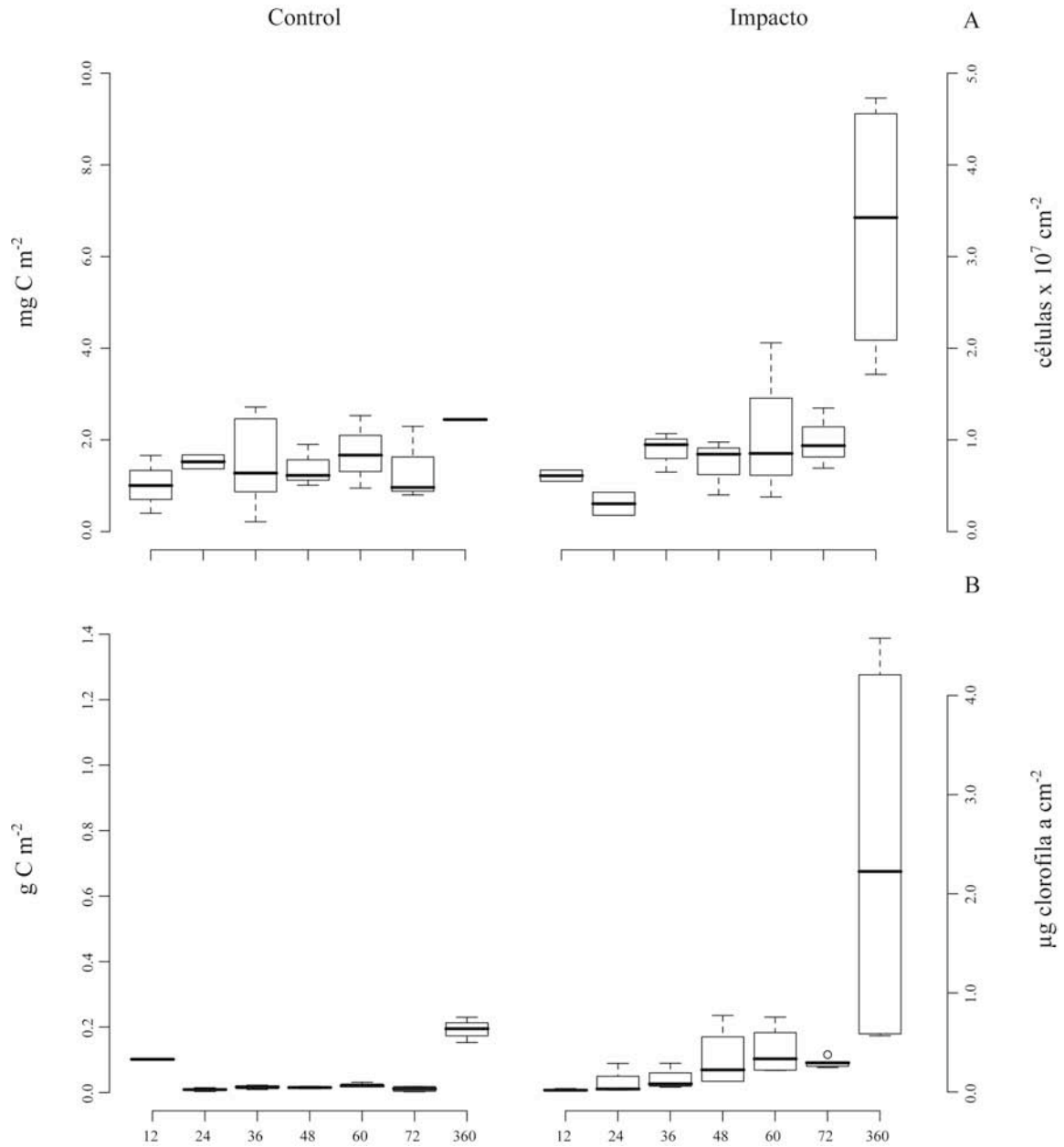


Figura 14. Biomasa de bacterias (A) y de algas (B) creciendo en la biopelícula epilíticas durante el seguimiento de la colonización cada 12 horas.

La actividad de las enzimas β -Glucosidasa y Fosfatasa fue máxima a las 360 horas en ambos tratamientos. En el Control se registraron los valores más altos para las dos enzimas, en comparación con los registrados para el Impacto (Figuras 15.A y 16.A).

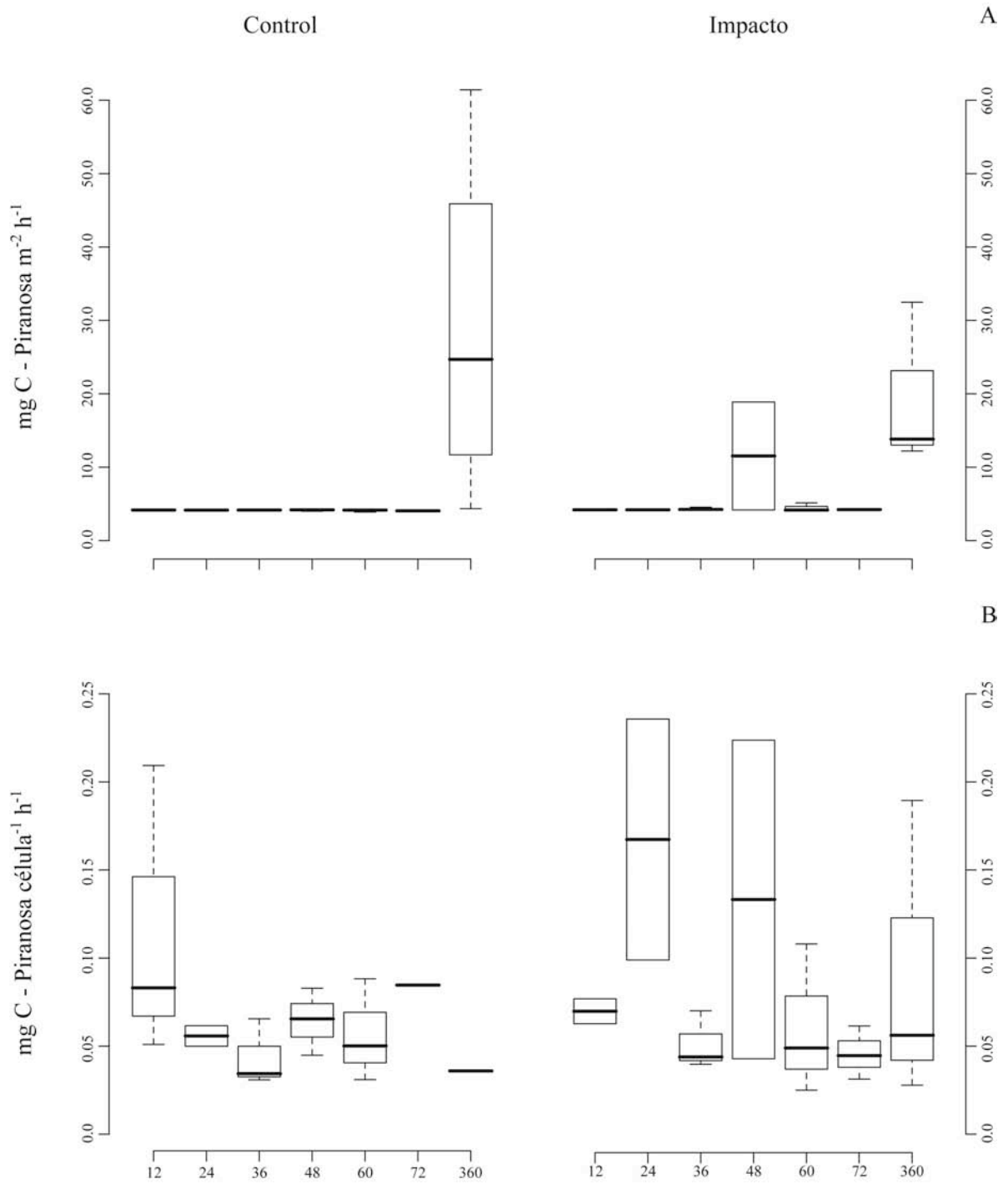


Figura 15. Actividad potencial de β -Glucosidasa por área (A) y por célula (B) en la biopelícula epilítica durante el seguimiento de la colonización cada 12 horas.

La actividad de Fosfatasa claramente se ve menguada por la fertilización (Figuras 16.A y 16.B), también el incremento de la actividad potencial de β -Glucosidasa por célula evidenció el efecto de la adición de nutrientes (Figura 15).

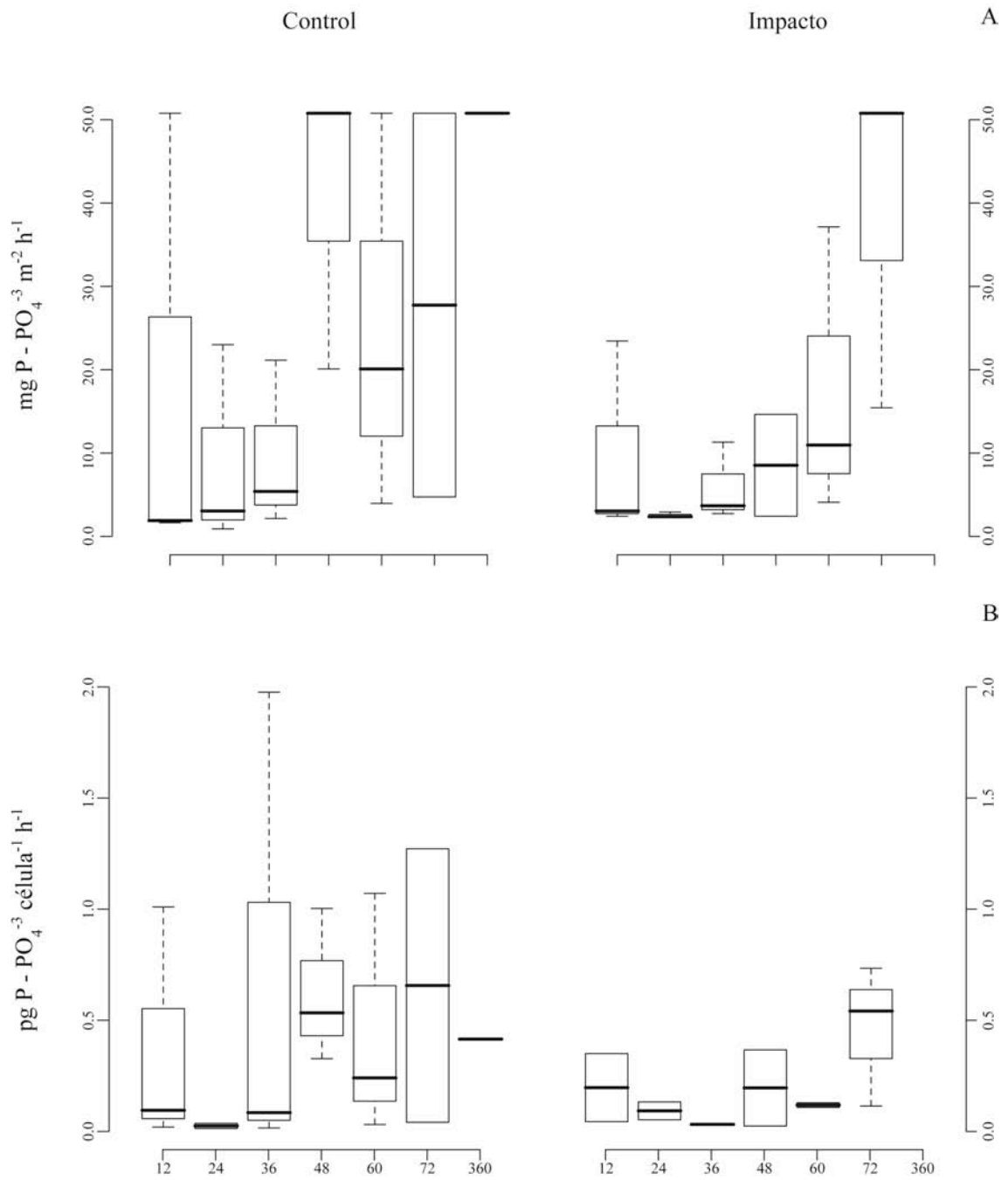


Figura 16. Actividad potencial de Fosfatasa por área (A) y por célula (B) en la biopelícula epilítica durante el seguimiento de la colonización cada 12 horas.

Modelo

Después de explorar el comportamiento de las variables durante las condiciones evaluadas y las relaciones que se presentaron entre ellas, la información obtenida sobre las biopelículas y el contexto en el que se desarrollan en el río Tota fue integrada en un modelo.

La dinámica climática jugó un papel determinante en la regulación del caudal, la calidad de la luz y la disponibilidad de nutrientes para el sistema, no solamente por el transporte y/o dilución en el agua del río, también por el lavado de nutrientes provenientes de los campos de cultivo ya que el clima determina el uso del suelo. La combinación entre el ciclo de manejo del suelo y la aparición de las lluvias más frecuentes favoreció que la cantidad de nutrientes que entraron al río por escorrentía fuera mayor en los caudales más altos (figura 17.A). En este contexto, caudales entre 1 y 1.5 m³ s⁻¹ estuvieron relacionados con (i) cantidad de nutrientes, (ii) biomasa bacteriana elevadas e igualmente con (iii) biomasa algal pero en menor grado (Figura 17.B). Mientras que los valores promedio más elevados de productividad primaria neta y actividad por célula de Fosfatasa y β-Glucosidasa en sedimentos estuvieron relacionados con caudales bajos, en unas condiciones enmarcadas por valores de temperatura, pH y potencial redox mayores (figuras 17.B). No obstante, los valores promedio de actividad enzimática en las biopelículas epilíticas fueron menores en estas condiciones (figura 17.D).

Los datos registrados en este trabajo permitieron ilustrar mediante un esquema representado en las figuras 18 y 19, las relaciones entre algunos procesos ocurridos en el río Tota. El tamaño de las figuras geométricas utilizadas es proporcional a los valores promedio de actividad de enzimas extracelulares y la biomasa tanto en términos de C m⁻² como de clorofila m⁻².

Los caudales altos incrementaron la cantidad de nutrientes, la biomasa de las poblaciones microbianas epilíticas y en consecuencia la actividad enzimática. La biopelícula epipsámica no tuvo un papel tan importante como la epilítica en el procesamiento del carbono y el fosfato en cuanto a la actividad enzimática por área, no obstante las células más activas del sistema se encontraron en los sedimentos, debido posiblemente a la mayor dependencia de compuestos orgánicos complejos almacenados en la materia en descomposición.

Durante el muestreo se registraron valores altos de actividad Fosfatasa, señalando a los microorganismos como protagonistas en el procesamiento de la materia orgánica como fuente de este nutriente, especialmente en las biopelículas epilíticas. Aunque la cantidad de carbono

disponible para ser utilizado por los microorganismos heterótrofos es desconocida, los datos indicaron que la escorrentía es una fuente importante para este nutriente, es decir que el aprovechamiento de la materia orgánica disuelta es activamente favorecido por la actividad y el desarrollo de los procariontes heterótrofos en biopelículas.

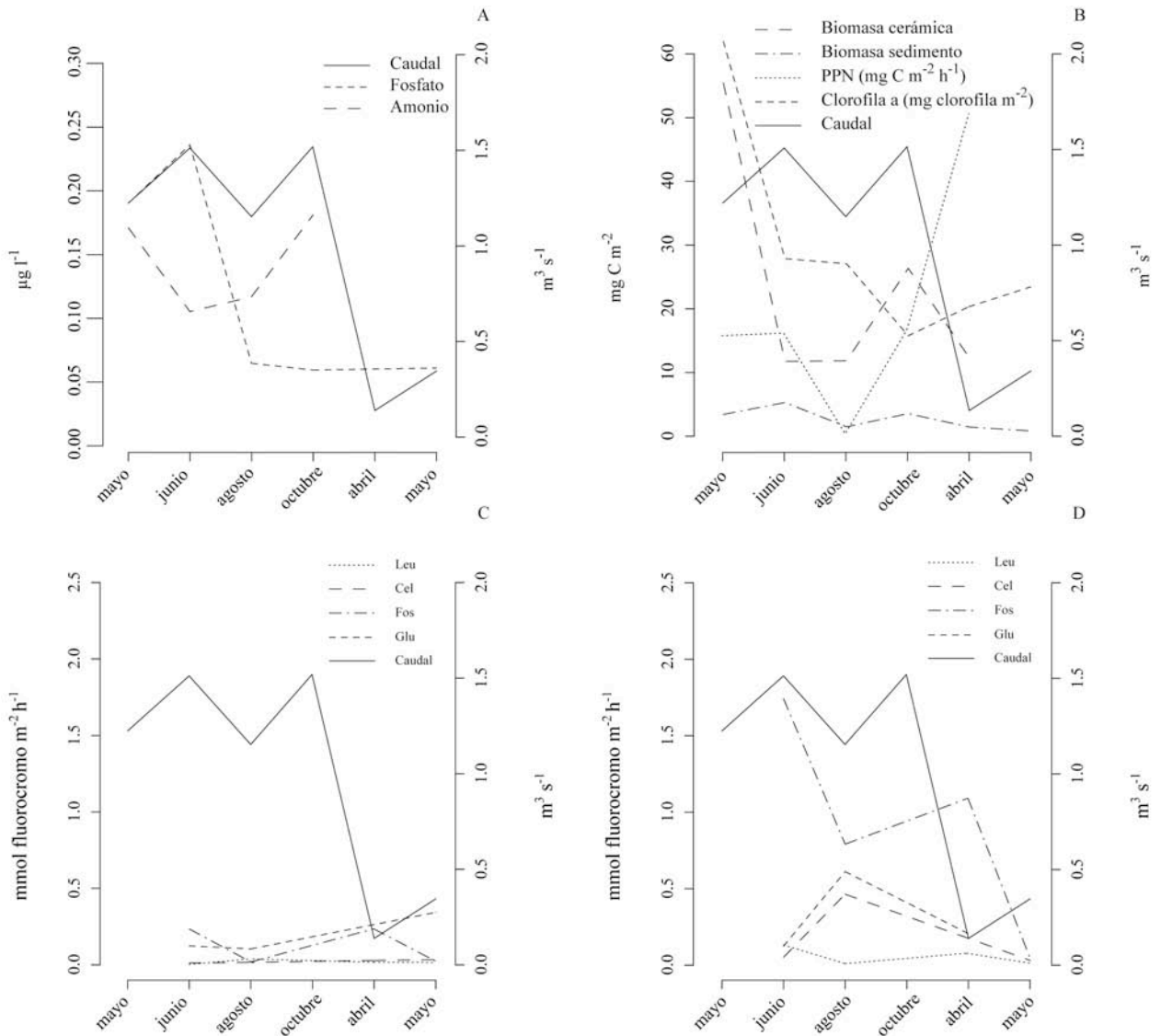


Figura 17. Interacción entre el caudal y los nutrientes (A), la biomasa y productividad primaria neta (B) y la actividad de enzimas en sedimento (C) y en cerámica (D). Valores promedio.

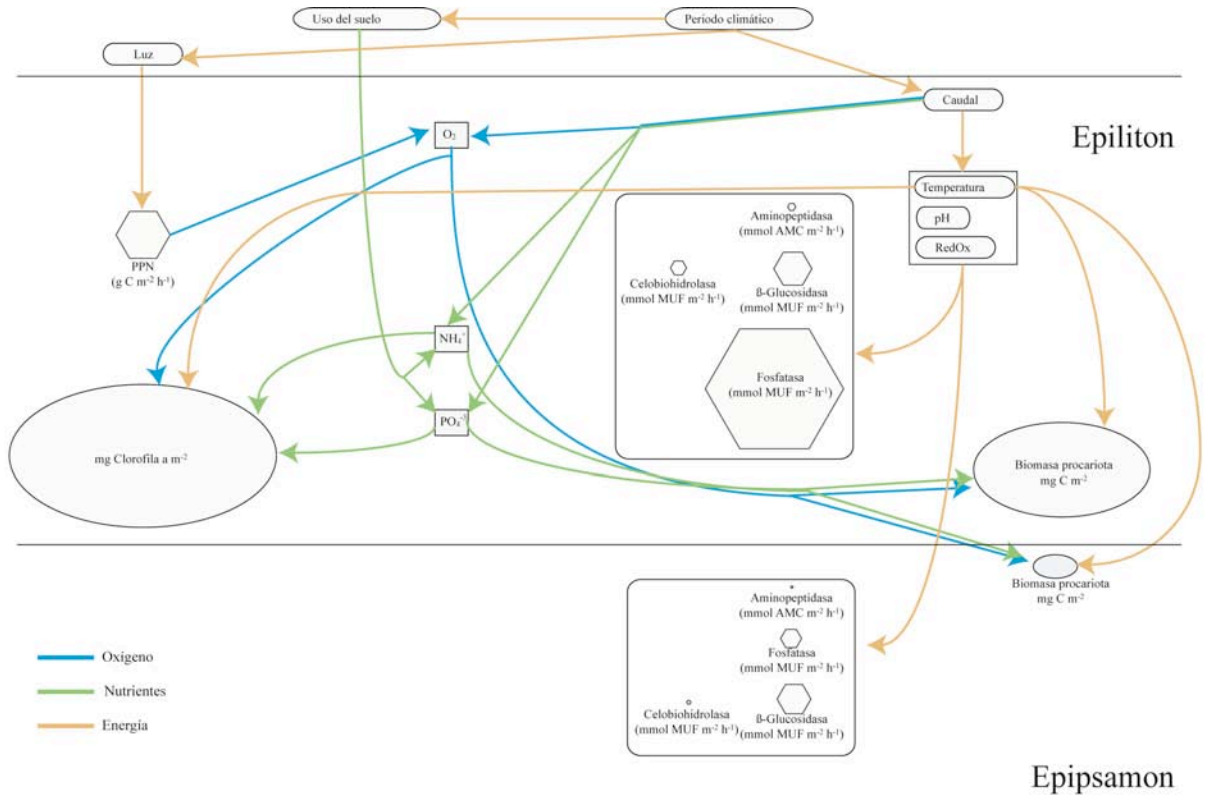


Figura 18. Modelo que representa la interacción variables de acuerdo con los resultados obtenidos en el río Tota. Las líneas azules representan el flujo del oxígeno, las verdes el flujo de los nutrientes amonio y fosfato y las amarillas la acción de las restantes variables ambientales.

La fertilización realizada en el experimento alivió la limitación por nutrientes, sin embargo la actividad Fosfatasa llegó a niveles elevados una vez que la biopelícula se desarrolló en términos de biomasa procarionta, actividad β -Glucosidasa y tasa de duplicación de la comunidad de procariontas. Esto quiere decir que en la comunidad microbiana de las biopelículas epilíticas, las bacterias tiene la capacidad de responder más rápidamente que las algas ante la entrada de nutrientes, ya que si bien se pudo observar una respuesta, en el caso de los productores primarios no fue tan evidente.

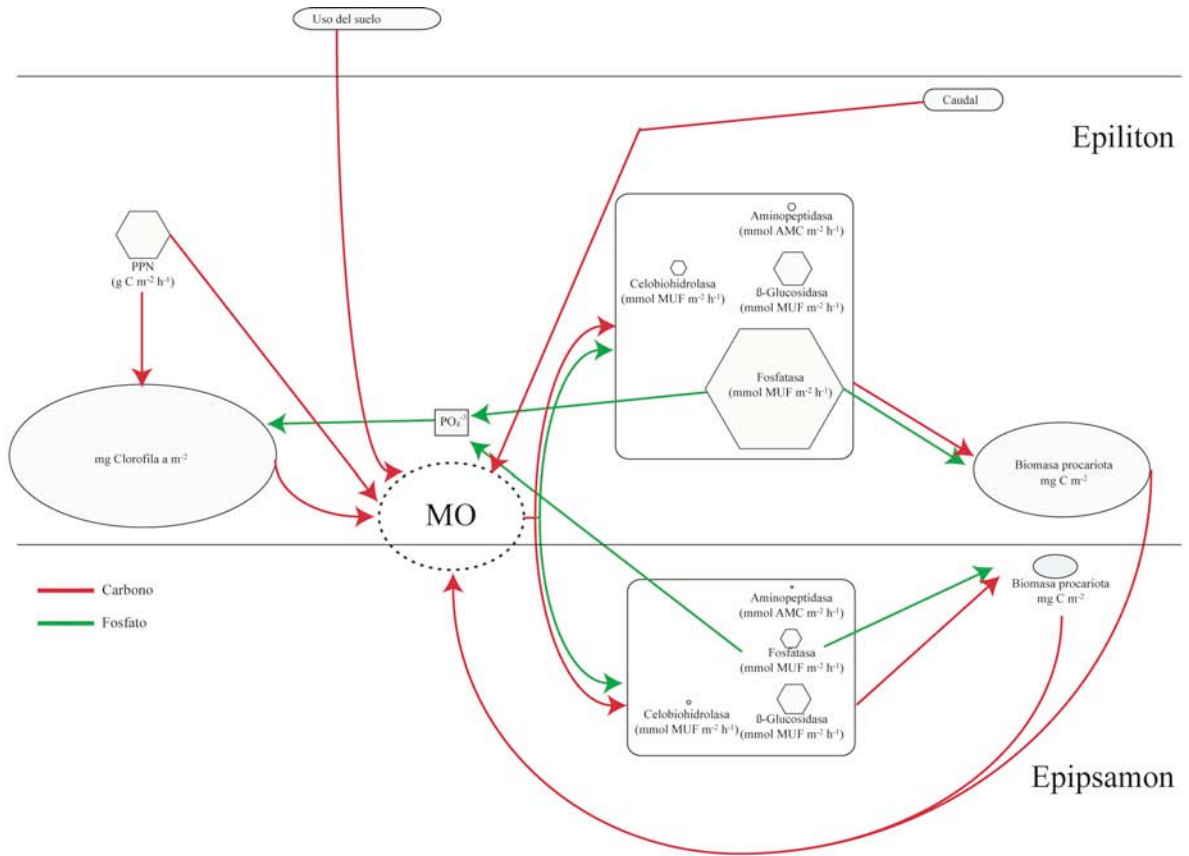


Figura 19. Representación de las variables medidas indicando las posibles relaciones entre ellas. Las líneas rojas representan el flujo de carbono mediado por la actividad β-Glucosidasa, Celobiohidrolasa y Leucina-amino-peptidasa. Las líneas verdes representan el flujo de fosfato mediado por la actividad Fosfatasa.

Discusión

Caracterización estructural y funcional de las biopelículas del río Tota con respecto al gradiente espacio-temporal

El crecimiento microbiano en biopelículas en los distintos tramos del río no presentó diferencias marcadas espacialmente, es decir, las diferencias entre los ambientes de cada tramo que podrían afectar las variaciones estructurales y funcionales propias de las biopelículas, no presentan la intensidad suficiente para que sus efectos fueran registrados como diferencias en las variables medidas en este estudio. La dinámica hidrológica, entendida como el cambio en el caudal, homogeniza las condiciones y los recursos mientras exige de la comunidad microbiana la capacidad para sortear estas variaciones, generando así una configuración que fue mejor definida por la dinámica en la escala temporal que en la espacial; en los datos provenientes de las biopelículas fue registrada la intensidad de los eventos que las moldean, de esta manera lo que ocurrió en una escala mayor (caudal) pudo ser registrado en la escala más fina de la respuesta microbiana (biomasa y actividad). Las condiciones que favorecen el desarrollo de las biopelículas epilíticas procariotas, en términos de más alta biomasa, menor actividad β -Glucosidasa y Celobiosa, Aminopeptidasa por célula y de Fosfatasa por área y por célula, están asociadas con la época de mayor caudal. Esta situación, no obstante parece favorecer apenas ligeramente la comunidad de fotótrofos, es decir que no responden a los mismos estímulos con la misma intensidad y en consecuencia parecen no estar acoplados.

La actividad enzimática medida en las biopelículas del río Tota fue comparada con la registrada en otros estudios que implementaron la misma metodología, es decir la utilización de sustratos análogos fluorogénicos (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de actividad de enzimas extracelulares para ríos de diferente orden. Se utilizaron los mismos sustratos de colonización que en el presente estudio excepto en los casos especificados. Promedio (Desviación estándar).

Orden	Ubicación	Colonización (d)	Biopelícula	Actividad (nmol Fluorocromo cm ⁻² h ⁻¹)						Fuente
				β -Glucosidasa	Fosfatasa	Aminopeptidasa	Celobiohidrolasa			
1	Tota, Colombia	40	Epilítica Epipsámica	97.0 (99.7) 130.8 (115.7)	194.4 (105.4) 101.2 (113.2)	15.2 (31.4) 9.9 (11.4)	81.9 (116.1) 76.3 (109.3)		Presente estudio	
2	Riera Major, España	60	Epilítica - luz Epilítica - oscuridad	12.4 (3.2) 4.9 (2.3)					Romaní & Sabater, 1999	
			Epilítica Epipsámica	6.1 (4.9) 16.4 (9.3)	37.5 (31.4) 19.9 (15.3)				Romaní & Sabater, 2001	
			Epilítica Epipsámica	5.7 (3.6) 14.2 (7.2)	39.0 (32.0) 20.0 (15.0)				Romaní & Sabater, 2000	
			Cianobacteria	57.1 (11.0)	260.5 (174.7)					
3	Fuirosos, España	46	Epilítica Epipsámica	5.0 300.0	310.0 660.0	115.0 210.0			Romaní et al., 2004(a)	
		60	Epilítica Epipsámica	55.0 (63.6) 35.0 (35.4)	275.0 (318.2) 100.0 (113.1)	1000.0 (1131.4) 150.0 (70.7)	8.5 (9.2) 10.0 (11.3)		Artigas et al., 2008	
		49	Epilítica - vidrio	34.8 (35.2)		8.5 (9.2)			Romaní et al., 2008	
4	Ter, España		Epilítica	39.7 (31.7)	49.0 (42.0)				Romaní & Sabater, 2000	
>	Ebro, España		Epilítica - vidrio	32.5 (38.9)	237.5 (300.5)				Romaní et al., 2004(b)	

La actividad de Aminopeptidasa fue baja en comparación con los valores reportados mientras que la actividad de Celobiohidrolasa fue alta; no obstante los sistemas estudiados son ríos ubicados en diferentes lugares del planeta, se observó que la actividad β -Glucosidasa y Fosfatasa estuvo dentro del rango reportado que en general presentó una tendencia particular dependiendo del orden del río, la primera tiende a disminuir mientras la segunda parece aumentar (Figura 20) Las variables funcionales (actividad de enzimas extracelulares) de las biopelículas creciendo sobre los dos sustratos colonizables evaluados, indicaron que la cantidad de materia orgánica disponible para las bacterias fue menor en los sedimentos que en las cerámicas, situación que se traduce en un desarrollo estructural con mayor biomasa en estas últimas; no obstante sería necesario buscar una relación con otras variables que no fueron tenidas en cuenta para el presente trabajo para los sedimentos.

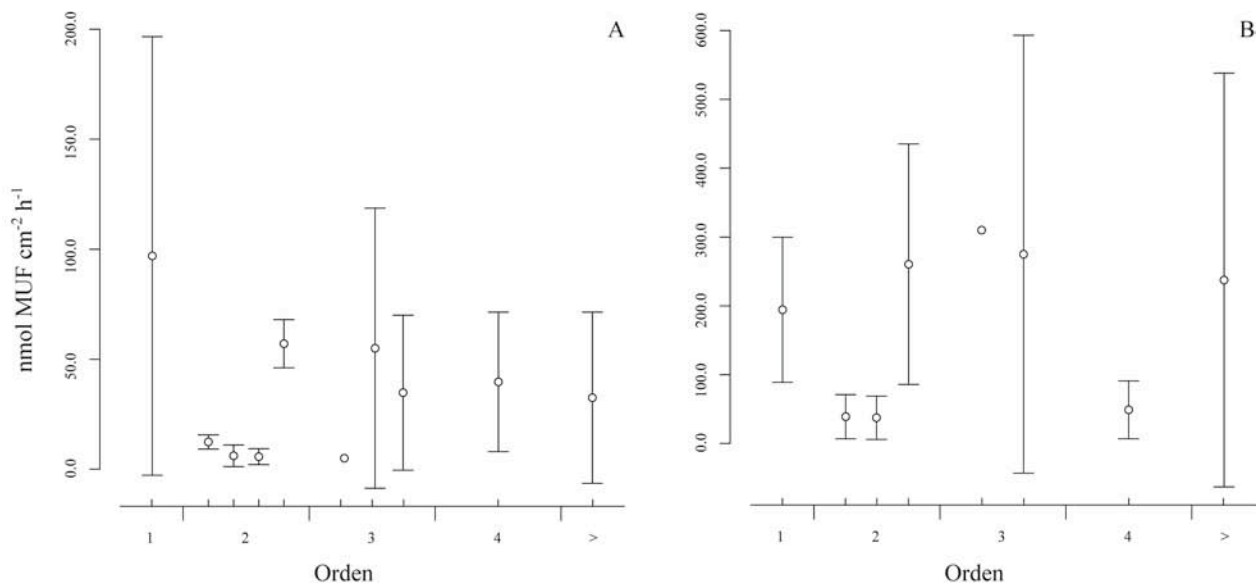


Figura 20. Valores de actividad de β -Glucosidasa (A) y Fosfatasa (B) reportados para diferentes sistemas lóuticos incluyendo el presente estudio organizados de acuerdo a la cantidad de tributarios (Ver Tabla 5)

En el río Tota, la actividad potencial por área señaló las condiciones ambientales en las que existió una mayor demanda de nutrientes debida al desarrollo de la biopelícula, mientras que la actividad potencial por célula indicó en que condiciones se presentó una limitación mayor de nutrientes debida a su disponibilidad en el ambiente. El sustrato colonizable más importante en el río Tota fueron las rocas (ANEXO 3), representan entre el 81.4 y 98.3% del área colonizable (sumergida) en un tramo de 50 m, y además la información sobre las biopelículas epilíticas reveló una mayor variación frente a los cambios ambientales determinados por la dinámica hidrológica en términos de biomasa procariota en comparación con lo registrado para los sedimentos.

Como en muchas otras biopelículas que crecen en ambientes acuáticos naturales, la comunidad microbiana del río Tota constituye un ensamble mixto. Esta configuración que incluye autótrofos y heterótrofos le confiere algunos beneficios entre los cuales la capacidad de amortiguar los cambios en la disponibilidad de materia orgánica mediante el subsidio que los fotoautótrofos ofrecen a través de sus exudados como una fuente importante de energía, ha sido planteada como el origen de una estrecha relación. No obstante, la materia orgánica alóctona transportada en el río puede ser una fuente importante de energía; los estudios realizados sugieren que el efecto de la disponibilidad de materia orgánica disuelta para los microorganismos heterótrofos determina la estructura del biofilm (Lock & Ford 1985; Freeman & Lock 1995;

Watnick & Kolter 2000; Romani *et al.*, 2004(a)). El presente trabajo simplificó la evaluación de las biopelículas al contemplar solamente las bacterias desde el punto de vista estructural y funcional en un contexto fisicoquímico y biológico sin embargo se reconoce que este tipo de comunidades está compuesto por bacterias, hongos, protozoos y algas juntos en una matriz polimérica extracelular (Campbell, 1987; Romani & Sabater, 2001; Stoodley *et al.*, 2002; Hall-Stoodley *et al.*, 2004), sin embargo.

Para revelar la relación existente entre autótrofos y heterótrofos se deben valorar los exudados originados por los productores primarios o una posible fuente de energía para los productores secundarios, que en el caso particular de este estudio en el río Tota también puede ser la biomasa algal en decaimiento, evidenciada mediante los valores del índice de diversidad pigmentaria de Margalef (Miracle *et al.*, 1984). Idealmente se debe cuantificar la cantidad de carbono orgánico disuelto (COD) de origen algal directamente, sin embargo, al presentar en un gráfico de dispersión los datos de actividad β -Glucosidasa contra biomasa algal y productividad primaria neta, se observó que la comunidad procariota no parece depender en gran medida del subsidio que los productores primarios aportan a través de sus exudados (Figura 21), ya que la actividad de β -Glucosidasa no se ve afectada por los cambios en la productividad primaria o en biomasa algal excepto por un ligero incremento. En este orden de ideas, la biomasa procariota pudo verse favorecida por las mismas condiciones que beneficiaron el incremento de biomasa algal pero no necesariamente por la productividad primaria. Findlay *et al.* (1993) plantearon que la relación entre heterótrofos procariotas y algas se refuerza en la medida en que se abandonan las condiciones de oligotrofia, ya que en condiciones limitantes recurren a fuentes de COD alóctonas, y aunque para el río Tota se reportaron valores altos de clorofila a, la evidencia señaló una relación de dependencia débil.

El carbono orgánico disuelto puede provenir de procesos originados en el suelo de la cuenca más que en el mismo río (Findlay *et al.*, 1993), igualmente, el incremento de nutrientes relacionados en general con los caudales altos que se presentan en el río Tota dificultaron la detección de la respuesta por parte de la comunidad bacteriana ante los cambios en la comunidad algal. Resulta entonces una cuestión que debe ser resuelta en un estudio posterior, ¿Cuál es la fuente principal de COD para la comunidad de heterótrofos en el río Tota? Romani & Sabater (1999) reportaron altos valores de actividad β -Glucosidasa por célula como consecuencia de la

utilización de Celobiosa por heterótrofos y que los polisacáridos liberados por las algas estimularon la actividad de la enzima.

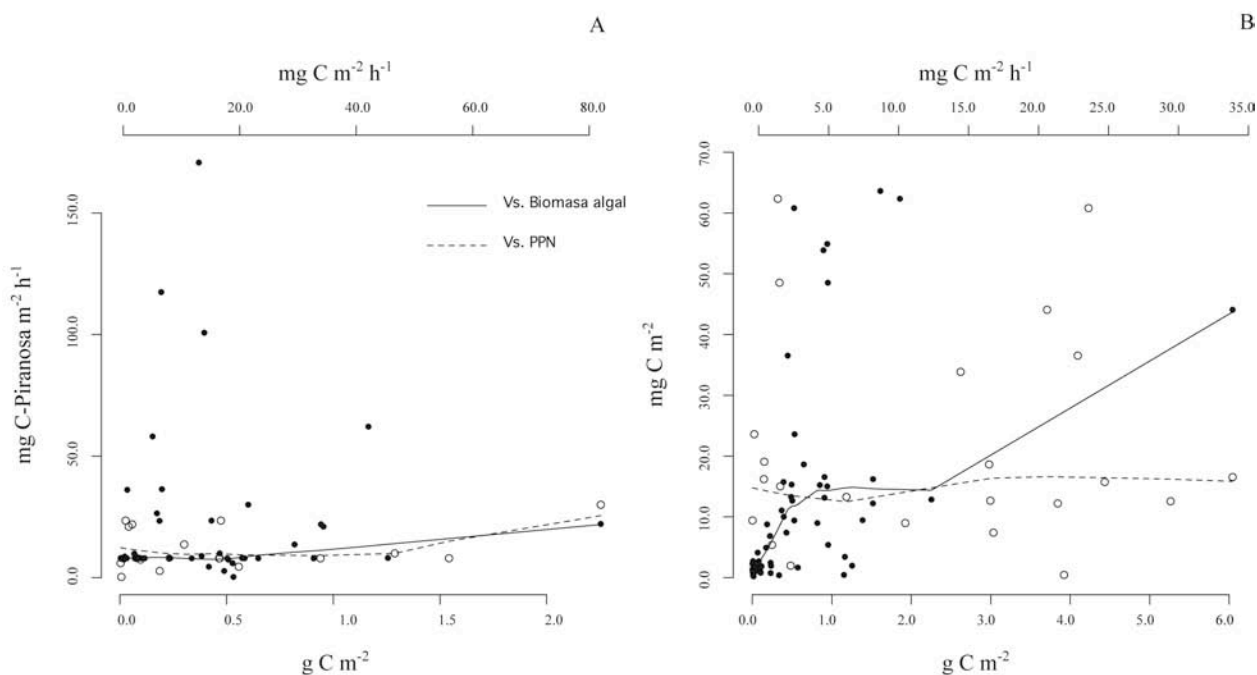


Figura 21. Dispersión de los datos correspondientes a actividad enzimática β -Glucosidasa (A) y la biomasa de heterótrofos procariontas (B) contra la biomasa de algas (puntos rellenos) y la productividad primaria neta (puntos vacíos). Las líneas corresponden al ajuste con la regresión polinómica de ajuste local.

En el presente estudio, la relación entre la actividad de Celobiohidrolasa y β -Glucosidasa registrada para cerámicas y sedimentos indicó que no obstante, los metabolitos provenientes de algas soportan algo de la producción secundaria, debe haber una fuente externa de sustrato para la β -Glucosidasa. Los estudios con cultivos axénicos de bacterias y hongos indican que la actividad β -Glucosidasa es inhibida por altas concentraciones de glucosa y es inducida por la presencia de diferentes carbohidratos, entre ellos Celobiosa (Moldoveanut & Kluepfel, 1983; Freer & Detroy, 1985.; Strobel & Russell, 1987; Roy *et al.*, 1988). Los estudios con cultivos mixtos por el contrario, indican que no se presenta inhibición por incremento de producto y argumentan resiliencia ante los cambios en la disponibilidad de sustratos debido a su acumulación en la matriz que sustenta la biopelícula (Romani & Sabater, 1999; Mallet & Debroas, 2001).

En cuanto a la Aminopeptidasa, para el río estudiado se hallaron los valores más bajos de actividad entre las enzimas evaluadas sin un patrón temporal o espacial evidente. El repertorio de Aminopeptidasas con que cuentan los microorganismos es tal que el perfil de utilización de

aminoácidos se ha propuesto como un criterio para identificar bacterias, gracias al balance y especificidad que las Aminopeptidasas presentan en cada célula ante diferentes condiciones de crecimiento, es decir que la preferencia de aminoácidos en cada situación por parte de la comunidad en desarrollo también debe ser tenida en cuenta (Westley, *et al.*, 1967). En otro estudio se relacionó la actividad de Aminopeptidasa con ambientes que presentan bajo contenido de proteína y biomasa bacteriana alta (Fabiano & Danovaro, 1998). Los datos logrados en el río Tota señalaron a través de la actividad potencial por célula las condiciones de verdadera limitación es decir, que la cantidad de proteína disponible no constituye un factor limitante para la comunidad en las cerámicas pero si en los sedimentos. Este esbozo del estado trófico de la comunidad creciendo en biopelículas plantea otro interrogante, ¿Qué proporción de proteínas, carbohidratos y lípidos son procesados gracias a la actividad de las enzimas extracelulares?

La actividad de Fosfatasa es el mejor ejemplo de inhibición debida al producto liberado por la actividad de la enzima y por tanto un buen indicador de limitación por fosfato, no obstante, su actividad esta estrechamente relacionada con la disponibilidad de carbono, nitrógeno y el desarrollo de las biopelículas en términos de biomasa bacteriana, es decir de la estructura y estado metabólico de las biopelículas evaluadas, por lo cual no es raro que incluso entre muestras provenientes de un mismo lugar se pueda presentar una variación importante (Sayler *et al.*, 1979; Huang *et al.*, 1998; Neddermann & Nausch, 2004).

Cuando crecen sobre rocas las comunidades más expuestas a la luz solar se benefician por la presencia de microorganismos fotótrofos encontrándose mayor complejidad en términos de cantidad de algas, bacterias y disponibilidad de nitrógeno, en estas condiciones constituyen un importante sumidero de carbono orgánico disuelto; sobre arena las biopelículas son poco complejas pero tienen mayor capacidad para degradar compuestos orgánicos complejos como consecuencia de la acumulación de materia orgánica, la deficiencia de luz y la limitación por nutrientes (Romaní *et al.* 2004(a); Romaní *et al.*, 2004(b); Olapade & Leff, 2005). En el río Tota la cantidad promedio de carbohidratos procesados como piranosa fue de 441.2 y 397.5 mg C m⁻² día⁻¹ para cerámicas y sedimentos respectivamente y como celobiosa de 488 y 91.5 mg C m⁻² día⁻¹ para cerámicas y sedimentos respectivamente. En general a lo largo del río no se observó una acumulación importante de sedimentos lo cual resalta la importancia de las biopelículas epilíticas en el ciclaje de nutrientes como el carbono, el nitrógeno y el fósforo, proceso en el cual los procariotas son un eslabón reconocido (Lünsdorf *et al.* 1997, Fischer & Pusch 1999)

Experimento

En la sucesión microbiana que tuvo lugar bajo las condiciones de la estación Impacto, la tasa de duplicación de la comunidad de heterótrofos procariotas fue mayor en comparación con la registrada para la situación Control (Tabla 6), lo mismo ocurrió en una proporción mucho menor para la comunidad de fotótrofos eucariotas. El aumento registrado de más de tres veces en la velocidad de duplicación de la biomasa procariota corresponde con la significancia estadística de las diferencias entre el Impacto y el Control en términos de biomasa (ANOVA, $p < 0.05$), no así para los valores de biomasa algal y actividad de β -Glucosidasa y Fosfatasa, aunque la respuesta fue igualmente evidente (Figura 22.B).

Tabla 6. Tiempo de duplicación la biomasa de la comunidad en las biopelículas en el río Tota

Tratamiento	d^{-1}	
	Bacteriana	Algal
Control	16.05	3.40
Impacto	5.66	3.11

En el río Tota, las bacterias respondieron más rápidamente ante la fertilización que las algas, esta reacción independiente confirma que la relación entre estos dos componentes de las biopelículas epilíticas no es estrecha o de dependencia (Figura 22). La actividad por célula de Fosfatasa revela el efecto de la adición de fósforo en el Impacto, y demostró además una posible limitación por este nutriente en el sistema, ya que en la situación Control se presentaron valores altos prácticamente desde el principio de la sucesión (Figura 15.B). No obstante, a las 360 horas se alcanzó el mismo valor de actividad potencial máxima por área, señalando el requerimiento de la comunidad por este nutriente como consecuencia de su desarrollo (Figura 15.A).

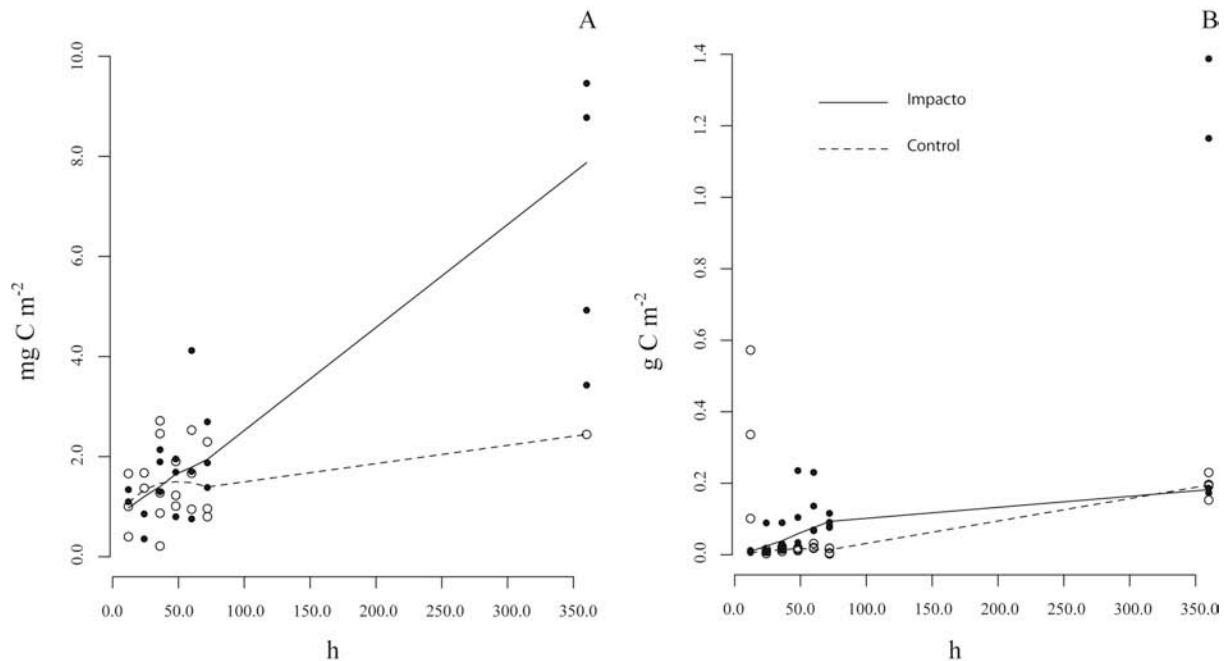


Figura 22. Biomasa de heterótrofos procariotas (A) y de algas (B) en la situación Control (puntos vacíos) e Impacto (puntos rellenos) contra el tiempo (h). Las líneas corresponden al ajuste con la regresión lowess.

En comunidades mixtas de algas y bacterias que crecen en concentraciones bajas de fosfato, los procariotas son más eficientes en la incorporación y utilización de este nutriente, en consecuencia el factor limitante sería la fuente de energía (carbono), en estos casos puede incluso presentarse un flujo de fósforo entre bacterias y algas (Janson, 1988). La respuesta registrada en este experimento es coherente asumiendo que en el río Tota las bacterias tienen acceso a una fuente representativa de COD adicional a los productores primarios, y aunque sin duda hace falta una aproximación más detallada, se puede plantear que la respuesta no fue más contrastante porque las condiciones hidrológicas permanecieron estables durante el tiempo que duró el experimento, pues como ya se señaló anteriormente en este documento, hubo evidencia de una respuesta por parte de la comunidad de heterótrofos procariotas ante los aumentos de caudal.

Conclusiones

El ambiente en el río Tota

Las biopelículas en el río Tota están sometidas a un régimen de lluvias monomodal que se traduce en aumentos de caudal frecuentes durante la época de mayor precipitación (mayo a octubre) y condiciones más estables durante la época seca (noviembre a abril). Durante el trabajo de campo las variables físicas y químicas que mejor describieron el ambiente del río Tota fueron caudal, temperatura, pH, potencial redox y concentración de oxígeno. Los valores de los nutrientes (amonio y fosfato) dependieron de las condiciones particulares de cada estación y mes. Se observó que en general la biomasa de heterótrofos procariotas y de algas se vio favorecida por el contexto físico-químico registrado durante los caudales altos, contrario a lo ocurrido con la productividad primaria neta.

Evaluación estructural de las biopelículas

La estructura más compleja en términos de biomasa de procariotas se observó en las biopelículas epilíticas, y exhibió una dinámica asociada con las variaciones de los descriptores ambientales ya mencionados. De acuerdo con los mayores valores de biomasa observados durante los meses caudal alto, los procariotas creciendo en biopelículas en el río Tota tuvieron la capacidad de responder rápidamente ante la llegada de nutrientes en la corriente del río, mientras que los productores primarios en términos de biomasa algal, se beneficiaron pero respondieron en una proporción menor. La disponibilidad de nutrientes pudo enmascarar la relación algas - bacterias y como consecuencia el aumento observado en los valores de productividad primaria para la época seca no se reflejó en la comunidad procariota.

Evaluación funcional de las biopelículas

La actividad potencial más alta se registró para la β -Glucosidasa seguida de la Celobiohidrolasa y la Aminopeptidasa, se registraron los valores más elevados para las biopelículas epilíticas. Igualmente, la Fosfatasa presentó una mayor actividad potencial en las muestras provenientes de las cerámicas y en términos de cantidad de fluorocromo liberado ($\text{mmol MUF m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) se registraron los valores más altos. La cantidad de carbono procesado indica la

importancia de los procesos microbianos en el ciclo de este nutriente, sin embargo plantea la necesidad de evaluar la representatividad de este flujo para el sistema.

Experimento

El efecto de la fertilización se reflejó en el desarrollo de la comunidad heterótrofica principalmente, al aliviar la posible limitación por fosfato e incrementar la actividad potencial de β -Glucosidasa por célula indicando además el déficit en las fuentes de energía ante el desarrollo de la comunidad. La respuesta de la comunidad procariota ante la fertilización indica una posible limitación por fosfato y le otorga un papel crítico en la liberación de este nutriente a la actividad de Fosfatasa para la comunidad microbiana epilitica principalmente. La respuesta al experimento, y en general, los datos obtenidos durante el muestreo sugirieron una relación débil entre productores primarios y secundarios, lo cual implica un subsidio externo en la fuente de energía para las bacterias.

Recomendaciones

El presente trabajo comenzó la exploración microbiana de los sistemas lóticos en el país y mediante las siguientes recomendaciones pretende resaltar algunos temas que podrían ser de interés para el futuro estudio de los microorganismos creciendo en biopelículas en los ríos colombianos.

Estructura y función de las biopelículas

- Se debe ampliar el contexto en los estudios que intenten reconocer el papel de las biopelículas, esto quiere decir incluir más ríos en diferentes condiciones por ejemplo en reservas o parques naturales
- Se debe incluir la evaluación de la diversidad taxonómica y metabólica de los microorganismos que conforman la biopelícula
- Se deben evaluar las posibles fuentes de COD para la comunidad de heterótrofos en el río Tota
- Se debe tener en cuenta la proporción de proteínas, carbohidratos, lípidos y sus polímeros (quitina, celulosa) que son procesados gracias a la actividad de las enzimas extracelulares

Acople algas-bacterias:

- Se debe evaluar el efecto que las frecuentes variaciones de caudal tiene sobre el acople entre algas y bacterias en las biopelículas del río.
- Se debe evaluar el efecto que el tipo de algas dominantes tiene sobre el acople entre algas y bacterias en las biopelículas del río.

Bibliografía

- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Pollution Control Federation (WPCF). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th ed. Victor Graphics. Baltimore. USA.
- Armenteras, D; Gast, F & Villarreal, H. 2003. Andean forest fragmentation and the representativeness of protected natural areas in the eastern Andes, Colombia. *Biological Conservation*. 113:245-256.
- Artigas, J; Romani, A; Gaudes, A; Muñoz, I & Sabater, S. 2008. Organic matter availability structures microbial biomass and activity in a Mediterranean stream. *Freshwater Biology*. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02140.
- Campbell, R. 1987. *Ecología Microbiana*. Limusa. México. 268 p.
- Canosa, A. & Pinilla, G. 2001. Total bacterial populations in three lentic water bodies of the Colombian Andes using the epifluorescence technique. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*. 6: 169 – 174
- Chróst, R & Siuda, W. 2002. Ecology of microbial enzymes in lake ecosystems. En: Burns, R & Dick, R. (Edit.). *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 35.
- Cloern, J; Grenz, C & Vidregar-Lucas, L. 1995. An empirical model of the phytoplankton chlorophyll:carbon ratio the conversion factor between productivity and growth rate. *Limnology and Oceanography*. 40(7): 1313-1321.
- Edwards, R. & Meyer J. 1986. Production and turnover of planctonic bacteria in two southeastern blackwater rivers. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(6):1317-1323.
- Etter, A & Villa, L. 2000. Andean forest and farming systems in part of the eastern cordillera (Colombia). *Mountain Research and Development*. 20(3):236-245
- Fabiano, M & Danovaro, R. 1998. Enzymatic activity, bacterial distribution, and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica). *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10):3838–3845
- Findlay, S; Howe, K & Fontvieill, D. 1993. Bacterial-algal relationships in streams of the Hubbard Brook experimental forest. *Ecology*. 74(8):2326-2336
- Fischer, H & Pusch, M. 1999. Use of the [¹⁴C] Leucine incorporation technique to measure bacterial production in river sediments and the epiphyton. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(10): 4411-4418
- Freeman, C & Lock, M. 1995. The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply? *Limnology and Oceanography*. 40(2): 273-278
- Freer, S & Detroy, R. 1985. Regulation of β -1,4-Glucosidase Expression by *Candida wickerhamii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 50(1): 152-159

- Guasch, H; Martí, E & Sabater, S. 1995. Nutrient enrichment effects on biofilm metabolism in a Mediterranean stream. *Freshwater Biology* 33: 373-383.
- Hall-Stoodley, L; Costerton, J & Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2:95-108.
- Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology. Kemp, P; Sherr, B; Sherr, E; Cole, J. (Edit.) Lewis Publishers. USA.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4):669-685
- Hoppe, H. 1993. Use of fluorogenic model substrate for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Kemp, P; Sherr, B; Sherr, E; Cole, J (Edit.) Lewis Publishers. USA.
- Huang, C; Xu, K; Mcfeters, G & Stewart, P. 1998. Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(4):1526-1531
- Iriberry, J; Unanue, M; Ayo, B; Barcina, I & Egea, L. 1990. Bacterial production and growth rate estimation from [³H]Thymidine incorporation for attached and free-living bacteria in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(2):483-487
- Janson, M. 1988. Phosphate uptake and utilization by bacteria and algae. *Hydrobiologia*. 170(1):177-189
- Lee, S & Fuhrman, J. 1987. Relationship between biovolume and biomass of natural derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(6):1298-1303
- Lock, M & Ford, T. 1985. Microcalorimetric approach to determine relationships between energy supply and metabolism in river epilithon. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(2):408-412.
- Lünsdorf, H; Brümmer, K; Timmis, K. & Wagner-Döbler. 1997. Metal selectivity of in situ microcolonies in biofilms of the Elbe river. *Journal of Bacteriology*. 179(1):31-40.
- Mallet, C & Debroas, D. 2001. Regulation of β and α glycolytic activities in the sediments of a eutrophic lake. *Microbial Ecology*. 41:106-113
- Martínez, L & Donato, J. 2003. Efecto del caudal sobre la colonización de algas en un río de alta montaña tropical (Boyacá, Colombia). *Caldasia*. 25(2):337-354.
- Miracle, M; García, M & Vicente, E. 1984. Heterogenidad especial de las comunidades fitoplanctónicas de la Albufera de Valencia. *Limnetica*. 1:20-31
- Moldoveanut, N & Kluepfel, D. 1983. Comparison of β -Glucosidase activities in different
- Neddermann, K & Nausch, M. 2004. Effects of organic and inorganic nitrogen compounds on the activity of bacterial alkaline phosphatase. *Aquatic Ecology* 38: 475-484
- Norland, S. 1993. The relationship between biomass and volume of bacteria. In:

Olapade, O & Leff, L. 2005. Seasonal response of stream biofilm communities to dissolved organic matter and nutrient enrichments. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(5):2278-2287.

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Ramírez, M. 2006. Usos múltiples del agua como estrategia para combatir la pobreza. Experiencias en Bolivia y Colombia. CONDESAN/Sistema Andino de Cuencas CPWF; CGIAR Challenge Program on Water & Food.

Romani, A & Sabater, S. 1999. Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm. *Freshwater Biology*. 41:729-736

Romani, A & Sabater, S. 2000. Influence of algal biomass on extracellular enzyme activity in river biofilms. *Microbial Ecology*. 40(1):16-24.

Romani, A & Sabater, S. 2001. Structure and activity of rock and sand biofilms in a Mediterranean stream. *Ecology*. 82(11): 3232-3245.

Romani, A; Giorgi, A; Acuña, V & Sabater, S. 2004(a). The influence of substratum type and nutrient supply on biofilm organic matter utilization in streams. *Limnology and Oceanography*. 49(5):1713-1721.

Romani, A; Guasch, H; Muñoz, I; Ruana, J; Vilalta, E; Schwartz, T; Emtiazi, F & Sabater, S. 2004(b). Biofilm structure and function and possible implications for riverine DOC dynamics. *Microbial Ecology*. . 47:316-328

Romani, A; Fund, K; Artigas, J; Schwartz, T; Sabater, S & Obst, U. 2008. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology*. On line. OI 10.1007/s00248-007-9361-8

Roy, S; Raha, S; Dey, S & Chakrabarty, S. 1988. Induction and catabolite repression of r-glucosidase synthesis in *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). *Applied and Environmental Microbiology*. 54(8):2152-2153

Sabater, S; Acuña, V; Giorgi, A; Guerra, E; Muñoz, I & Romani, A. M. 2005. Effects of nutrients inputs in a forested Mediterranean stream under moderate light availability. . *Archiv für Hydrobiologie*. 163(4):479-496.

Sánchez, J & Torres-Alvarado, M. 2005. Estructura y aspectos biotecnológicos de las comunidades acuáticas microbianas: biopelículas y tapetes microbianos. *ContactoS*. 58:63-71.

Sayler, G; Puziss, M & Silver, M. 1979. Alkaline phosphatase assay for freshwater sediments: application to perturbed sediment systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 38(5):922-927.

Schmidt, I; Sliemers, O; Schmidt, M; Bock, E; Fuerst, J; Kuenen, J; Jetten, M & Strous, M. 2003. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*. 27:481-492.

Stoodley, P; Saber, K; Davies, D & Costerton, J. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. 56:187-209.

streptomycetes strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 46(1):17-21

Strobel, H & Russell, J. 1987. Regulation of 1-Glucosidase in *Bacteroides rumenicola* by a different mechanism: Growth rate-dependent derepression. *Applied and Environmental Microbiology*. 53(10):2505-2510

Ulloa, C; Rodríguez, E; Fuquen, J & Acosta, J. 2001. Geología de la Plancha 192 Laguna de Tota. República de Colombia. Ministerio de Minas y Energía. Instituto de Investigación e información Geocientífica, Minero-Ambiental y Nuclear. Ingeominas. Memoria Explicativa.

Wackett, L; Dodge, A & Ellis, L. 2004. Microbial genomics and the periodic table. Minireview. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2):647-655.

Watnick, P & Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. Minireview. *Journal of Bacteriology*. 182(10):2675-2679.

Westley, J; Anderson, P; Close, V; Halpern, B & Lederberg, E. 1967. Aminopeptidase profiles of various bacteria. *Applied Microbiology*. 15(4):822-825

Wirtz, K. 2003. Control of biochemical cycling by mobility and metabolic strategies of microbes in the sediments: an integrate model study. *FEMS Microbiology Ecology*. 46:295-306.

ANEXO 1

Patrones de los fluorocromo, ajuste a las regresiones evaluadas y coeficiente de correlación.

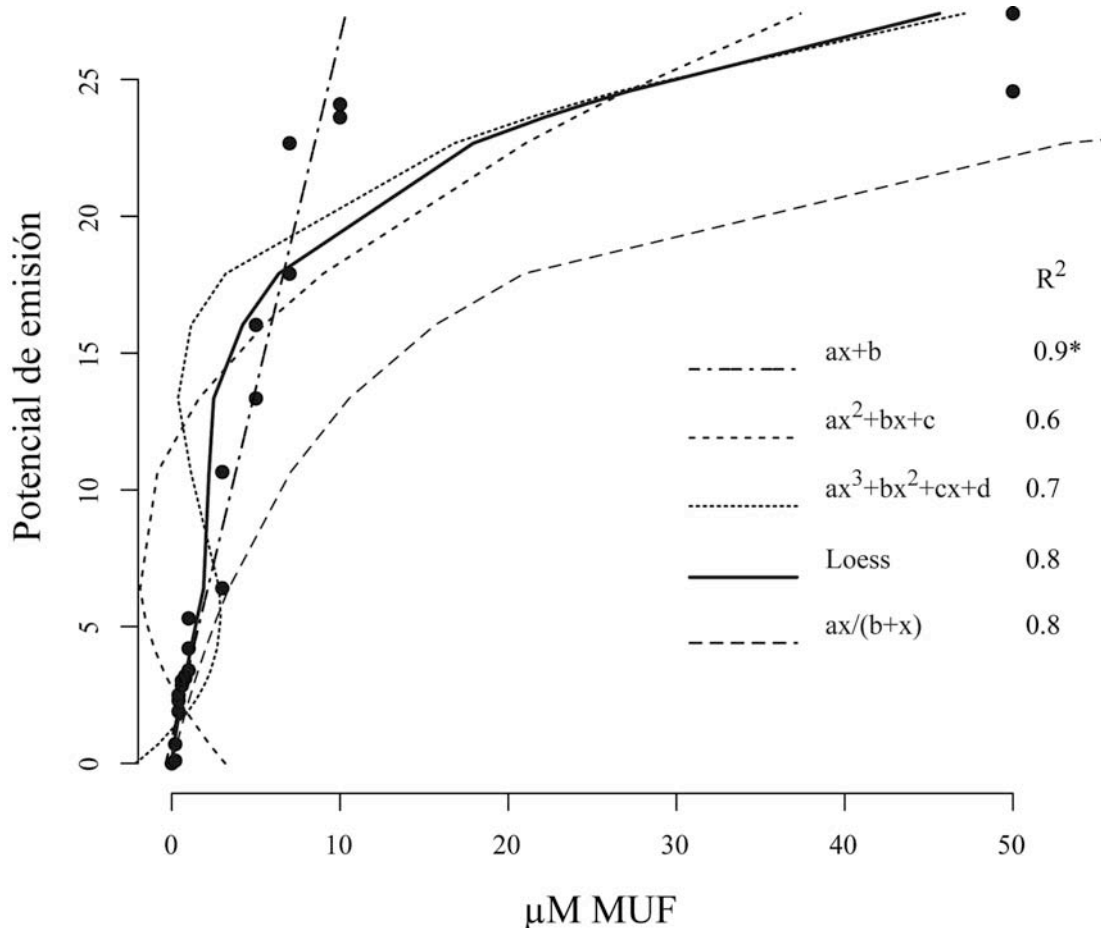
Los puntos representan los valores de los patrones. Las líneas representan los valores calculados mediante el ajuste de las regresiones evaluadas, tres polinómicas, una polinómica de ajuste local (Loess) y una racional (Michaelis-Menten).

El comando utilizado para calcular los valores de concentración fue:

```
>AEE <- loess(μM~PE,Patrones);predict(AEE,data.frame(PE=Mediciones))
```

en dónde Patrones: Base de datos de las curvas patrón con concentración de fluorocromo (μM) Vs. potencial de emisión (PE); Mediciones: Base de datos del PE medido para muestras, controles y blancos.

* El ajuste de la regresión lineal se realizó omitiendo los valores correspondientes al patrón de 50 μM . El coeficiente de correlación (R^2) presentó un valor de 0.5 al incluirlo.



ANEXO 2

Resultado de la prueba de Tukey para Clorofila *a*

Casos en los cuales los resultados de la prueba de Tukey o de los intervalos de confianza de las diferencias de los promedios fueron significativos para combinaciones de los factores mes:estación con datos de clorofila *a* ($\alpha = 0.05$).

P	Comparación (mes:estación vs. mes:estación)
0,002	octubre:Control - abril:Tota
0,008	junio:Impacto - abril:Tota
0,003	agosto:Impacto - abril:Tota
0,012	octubre:Impacto - abril:Tota
0,015	octubre:Control - junio:Tota
0,023	agosto:Impacto - junio:Tota
0,006	octubre:Control - agosto:Tota
0,020	junio:Impacto - agosto:Tota
0,008	agosto:Impacto - agosto:Tota
0,031	octubre:Impacto - agosto:Tota
0,005	octubre:Control - abril:Control
0,018	junio:Impacto - abril:Control
0,007	agosto:Impacto - abril:Control
0,027	octubre:Impacto - abril:Control
0,048	junio:Iza - octubre:Control

ANEXO 3.

Área susceptible de ser colonizada por sustrato.

Porcentaje del área que representa cada sustrato de colonización natural (roca o sedimento) para cada estación.

