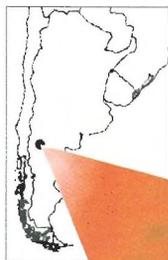


INSTITUTO DE LIMNOLOGÍA
"Dr. Raúl A. Ringuelet"

ISSN 0326-1638

BIOLOGIA ACUATICA N° 18



EMBASE
EXEQUIEL RAMOS MEXIA

619
CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA N°
INSTITUTO DE LIMNOLOGÍA
"DR. R. A. RINGUELET"
U.N.L.P. - CONICET

La Plata, Diciembre 1995

BIOLOGIA ACUATICA es una revista dedicada a la limnología en general y particularmente a la biología de las aguas continentales. Tienen cabida en ella trabajos monográficos y de divulgación científica, revisiones y recopilaciones de artículos inéditos de varios autores sobre temas afines.

NÚMEROS ATRASADOS

- Nº 1 (1981). *Bibliografía de los peces de agua dulce de la Argentina y Uruguay 1967-1981*. Por: H. L. LÓPEZ, R. C. MENNI & R. A. RINGUELET. vi+100p.
- Nº 2 (1982). *Trichoptera of the area platense*. Por: O. S. FLINT. vi+72 p.
- Nº 3 (1982). *Bibliografía de los peces de agua dulce de la Argentina y Uruguay. Suplemento 1982*. Por: H. L. LÓPEZ, R. C. MENNI & R. A. RINGUELET. ii+30 p.
- Nº 4 (1983). *Demografía del pejerrey **Basilichthys bonariensis bonariensis** (Pisces Atherinidae) en el Embalse Río Tercero, Córdoba. Descripción de las artes de pesca*. Por: L. R. FREYRE, L. C. PROTOGINO & J. M. IWASZKIW. 39 p.
- Nº 5 (1984). *Ictiología de áreas serranas de Córdoba y San Luis (Argentina)*. Por: R. C. MENNI, H. L. LÓPEZ, J. R. CASCIOTTA & A. M. MIQUELARENA. 63 p.
- Nº 6 (1984). *Bibliografía limnológica argentina 1979-1983*. (Varios autores). 55 p.
- Nº 7 (1985). *Limnología física del Embalse Río Tercero. Térmica, hidrología y derivaciones biológicas*. Por: A. BOLTOVSKOY & M. FOGGETTA. 58 p.
- Nº 8 (1986). *Estudio de la dentición en peces caracoideos de la República Argentina*. Por: A. M. MIQUELARENA. 60 p.
- Nº 9 (1987). *Bibliografía de los peces de agua dulce de Argentina y Uruguay. Suplemento 1986*. Por: H. L. LÓPEZ, R. C. MENNI & R. A. RINGUELET. 61 p.
- Nº 10 (1987). *Limnological investigation in Tierra del Fuego, Argentina*. Por: A. A. MARIAZZI, V. H. CONZONNO, J. ULIBARRENA, J. C. PAGGI & J. L. DONADELLI. 74 p.
- Nº 11 (1987). *A revisión of the Neotropical species of **Parabezzie** (Diptera: Cera-topogonidae)*. Por: G. R. SPINELLI & W. GROGAN J. 45 p.
- Nº 12 (1987). *Lista de los peces de agua dulce de la Argentina*. Por: H. L. LÓPEZ, R. C. MENNI & A. M. MIQUELARENA. 50 p.
- Nº 13 (1988). *Bibliografía limnológica argentina 1961-1978*. Ed.: H. L. LÓPEZ. 140 p.

ALDO AMILCAR MARIAZZI

(1943-1995)

El Dr. Aldo Amilcar Mariazzi falleció el 9 de setiembre de 1995. Nacido en la ciudad de Chivilcoy, Pcia. de Buenos Aires, el 23 de marzo de 1943, se trasladó a la ciudad de La Plata para realizar sus estudios universitarios, donde se graduó, en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, como Licenciado en Zoología en mayo de 1968. Continuó sus estudios de postgrado, egresando de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata con el título de Bacteriólogo Clínico e Industrial en diciembre de 1970. Especializado en bacteriología limnológica, su tesis doctoral "Estudio bacteriológico en ecosistemas lacustres subalpinos. Ecología y taxonomía de microorganismos con actividad lipolítica" lo llevó a ser el primer Doctor en Bacteriología Clínica e Industrial egresado de la Universidad de La Plata, en noviembre de 1975.

Desde al año 1966, en que comenzó sus tareas como técnico contratado del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Pcia. de Buenos Aires, sus trabajos se orientaron siempre a la investigación de las relaciones de las bacterias acuáticas con su medio ambiente. Fue así como en el año 1968 ingresó como Investigador Asociado con dedicación exclusiva, a cargo del Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Limnología de la Universidad Nacional de La Plata, cargo que mantuvo en forma interina y por concurso desde 1972. A partir de 1975 fue jefe de Trabajos Prácticos con dedicación exclusiva, del Instituto de Limnología de la UNLP. Su ingreso a la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas fue en el año 1977, como Investigador adjunto. A partir de 1981



y hasta la actualidad se desempeñaba como Investigador Independiente de CONICET

Toda su carrera la desarrolló en el Instituto de Limnología de La Plata, hoy llamado "Dr. Raúl A. Ringuelet" en honor de quien fuera su creador, de quien el Dr. Mariazzi fue uno de los discípulos además de integrante del plantel de profesionales que dio origen a esta institución. En ella llegó a formar parte del Consejo Asesor (1986-1987), teniendo luego el honor de ser su Director entre los años 1987 y 1989.

Varias becas lo llevaron a completar e intercambiar sus conocimientos con prestigiosos científicos del mundo. En 1973 - 1975 fue becario externo del CONICET en el Istituto Italiano di Idrobiologia, Pallanza, Italia. En 1975, como becario del British Council tuvo como lugar de trabajo el Windermere Laboratory, Freshwater Biological Association, Gran Bretaña. En el año 1985 fue becario de postdoctorado de la Japan Society for the Promotion of Science, en la Facultad de Agriculture de la Universidad de Kyoto, Japón.

Fue director de becarios, tesis e investigadores, pues muchos noveles científicos encontraron en él una valiosa guía en sus trabajos; y aún posibilitó el viaje de muchos de ellos al exterior, ofreciéndoles desinteresadamente sus múltiples contactos internacionales.

Autor de casi 50 trabajos científicos e innumerables de orden técnico, fue un ferviente impulsor del estudio a largo plazo de los cuerpos de agua continentales, a fin de observar en ellos la influencia del hombre. Fue así que se encontraba abocado al estudio de los efectos pre y post operacionales de la central atómica, sobre el Embalse de Río Tercero, desde el año 1977.

Estableció una importante red de contactos internacionales con investigadores reconocidos mundialmente habiendo alcanzado un amplio reconocimiento científico dentro de su especialidad. Tuvo un gran talento para tomar nuevas ideas e instrumentarlas dentro de su grupo de trabajo del Instituto de Limnología, a quienes dio los fundamentos de las investigaciones sobre ecología microbiana que hoy está desarrollando.

Con la desaparición de Aldo Mariazzi, hemos perdido no sólo un amigo sino también a un inspirado colega, cuyo protagonismo en la investigación microbiológica será difícil de reemplazar.

Miguel Angel Di Siervi

BIOLOGIA ACUATICA N°18

INSTITUTO DE LIMNOLOGÍA "DR. RAÚL A. RINGUELET"
CONICET - UNLP

INDICE

<i>Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico.</i>	
<i>Aspectos metodológicos</i>	pág. 1
MIGUEL A. DI SIERVI, ALDO A. MARIAZZI Y JORGE L. DONADELLI	
<i>Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico.</i>	
<i>Importancia de bacterias libres y adheridas</i>	pág. 14
MIGUEL A. DI SIERVI, ALDO A. MARIAZZI Y JORGE L. DONADELLI	
<i>Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico.</i>	
<i>Variaciones de cortos periodos de tiempo</i>	pág. 23
MIGUEL A. DI SIERVI, ALDO A. MARIAZZI Y JORGE L. DONADELLI	
<i>Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico.</i>	
<i>Variaciones espacio temporales y relaciones con la producción primaria</i>	pág. 33
MIGUEL A. DI SIERVI, ALDO A. MARIAZZI Y JORGE L. DONADELLI	

MEDICION DE LA PRODUCCION BACTERIANA EN UN EMBALSE PATAGONICO. ASPECTOS METODOLOGICOS.

MIGUEL A. DI SIERVI, ALDO A. MARIAZZI Y JORGE L. DONADELLI

*Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet", C.C. 712, 1900 La Plata, Argentina.
Contribución N° 484.*

SUMMARY: Measurement of bacterial production in a Patagonian reservoir. Methodological aspects.

Prior to the development of a periodical study of bacterial production in the Ezequiel Ramos Mexía reservoir, several experiments were performed with the aim of selecting an adequate water sample aliquot and the (³H)-thymidine inoculum, as well as establishing the incubation period and the conversion factors necessary for the transformation of thymidine incorporation rates into bacterial production. Due to the particular characteristics of this reservoir, an aliquot of 50 ml and an inoculum of 2.5 nM (³H)-thymidine were adequate for routine experiments; four hours of incubation were concluded to yield satisfactory results. The conversion factors experiments suggest that the rate of thymidine incorporation is associated with bacterial growth (increase in cellular volume), as well as with cellular division (increase in cells number), and that it is influenced by changes in temperature. Bacterial production can be sub- or overestimated if the wrong factor is selected. The use of a range of conversion factors is suggested as a more precise way of expressing bacterial production.

KEY WORDS: Bacterial production, methodology, (³H)-thymidine, incubation time, conversion factors.

RESUMEN: Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico. Aspectos metodológicos.

Se efectuaron una serie de experimentos como paso previo a un estudio periódico de la producción bacteriana medida por incorporación de (³H)-timidina, en el embalse Ezequiel Ramos Mexía (Neuquén, Argentina). Los mismos tuvieron como finalidad seleccionar una alícuota adecuada de muestra, el inóculo necesario de (³H)-timidina, el tiempo de incubación y factores de conversión necesarios para transformar las tasas de incorporación de timidina en producción bacteriana.

Los resultados obtenidos indicaron que, una alícuota de 50 ml fue el tamaño de muestra adecuado, como así también un inóculo de 2,5 nM de (³H)-timidina y una incubación de 4 horas. Los experimentos para la obtención de factores de conversión sugieren que la tasa de incorporación de timidina está asociada al crecimiento bacteriano (incremento del volumen celular), a la división celular (incremento en el número de células) y que esta influenciada por los cambios de temperatura. La producción bacteriana podría sufrir un error de estimación si se elige un factor de conversión equivocado. Por ello, sugerimos el uso de un rango de factores como una manera de expresar la producción bacteriana.

PALABRAS CLAVES: Producción bacteriana, metodología, (³H)-timidina, tiempo de incubación, factores de conversión.

INTRODUCCION

El estudio de la producción bacteriana basado en la incorporación de (^3H)-timidina mide la síntesis de ADN como paso previo al cálculo de producción de carbono por las bacterias. Azam & Fuhrman (1984) discutieron las condiciones necesarias para la aplicación de un método ideal que midiera la tasa de crecimiento de bacterias en ambientes acuáticos, encontrando que el empleo de (^3H)-timidina cumple en un gran porcentaje con las premisas del método ideal. El consumo de (^3H)-timidina, su asimilación en los constituyentes celulares y la incorporación al ADN, son todos procesos diferentes, y la tasa de ocurrencia de cada uno varía entre los organismos. La incorporación de (^3H)-timidina en el ADN a través de la timidina quinasa, enzima ausente en hongos, cianobacterias, varias algas eucariotas y microalgas marinas, es el proceso final que nos permite distinguir la actividad bacteriana de la de otros organismos. La incorporación es rápida y la timidina es eficientemente tomada por las bacterias, es estable durante su utilización, es convertida rápidamente en nucleótidos y marca el ADN con muy poca o ninguna dilución por "pools" intracelulares. Hay dos formas principales de biosíntesis de nucleótidos en las células: la *de novo* en la cual los nucleótidos son sintetizados a partir de componentes celulares básicos, y la *natural* en la cual las bases libres y los nucleósidos se obtienen de la degradación de los nucleótidos en exceso o ácidos nucleicos que son reconvertidos en trifosfatos de nucleótidos. Cuando se realizan mediciones de tasas de producción bacteriana en ambientes naturales, se debe ser muy preciso en el agregado del sustrato marcado a las muestras, para inhibir completamente la síntesis *de novo* (Pollard & Moriarty, 1984), como así también en la selección del tiempo de incubación. Es necesario además establecer un factor que relacione el consumo de timidina con el crecimiento de las bacterias para poder calcular la biomasa bacteriana que se produce por unidad de tiempo a partir del consumo del compuesto marcado.

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer la cantidad de (^3H)-timidina a utilizar, la alícuota de muestra de agua a incubar, el tiempo óptimo de incubación y los factores de conversión adecuados para la medición de la producción secundaria bacteriana en el embalse Ezequiel Ramos Mexía.

DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO

El embalse Ezequiel Ramos Mexía fue construido por endicamiento del Río Limay en 1972. Se encuentra ubicado a $39^{\circ} 20' \text{ S}$ y $68^{\circ} 20' \text{ O}$, a 381 metros sobre el nivel del mar. Tiene una superficie de 816 km^2 y una profundidad máxima de 60 metros. Mariazzi *et al.* (1991) da una detallada descripción de este ecosistema.

MATERIALES Y METODOS

En marzo, abril y mayo de 1985 se efectuaron las experiencias para volumen de muestra, concentración óptima de inóculo y tiempo de incubación. Las experiencias para la obtención de los factores de conversión se efectuaron en mayo, agosto, diciembre de 1985 y julio de 1986. Las muestras de agua se obtuvieron de superficie, con un muestreador tipo van Dorn, en una estación central cercana al dique.

Volumen de la muestra - concentración óptima - tiempo de incubación

La experiencia A consistió en el fraccionamiento de submuestras de 50 ml previamente filtradas por red de plancton de 30 μm . Se formaron dos grupos de 6 frascos cada uno. En el primer grupo se agregó a cada uno (^3H)-timidina en concentraciones que variaron entre 0,6 y 20 nM. Se siguió simultáneamente un procedimiento similar con otro grupo de frascos los cuales fueron inmediatamente fijados con formol y utilizados como blancos. Se incubaron en laboratorio en baño de agua circulante a la misma temperatura del lago (19,5°C), tomándose alcuotas de 5 ml a los 10, 20, 40, 60 y 120 minutos que fueron filtradas a través de filtros de membrana de 0,22 μm de poro y procesados de acuerdo a Fuhrman & Azam (1980) y Riemann (1984). Los blancos fueron procesados a los 120 minutos.

En otro ensayo (experiencia B), las submuestras fueron obtenidas y filtradas de la manera descrita anteriormente, pero en este caso los volúmenes fraccionados fueron de 400 ml. Las concentraciones de (^3H)-timidina inoculadas variaron entre 0,3 y 5 nM. Se tomaron alcuotas de 50 ml a los 30 minutos y luego de 1, 2, 3 y 4 horas. Al mismo tiempo se realizó la experiencia C en la que el agua fue mantenida a temperatura ambiente por 12 horas, para que las bacterias alcanzaran su fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente se fraccionaron frascos de 400 ml cada uno a los que se agregó (^3H)-timidina (entre 0,6 y 5 nM) y se efectuó un enriquecimiento con glucosa (entre 1 y 10 mg por litro). Las alcuotas, de 50 ml, se obtuvieron luego de 1, 2, 3 y 4 horas de incubación.

Finalmente se realizó la experiencia D en la que el procedimiento fue similar al anterior, pero esta vez sin glucosa, mientras que las alcuotas fueron tomadas a las 0 (blanco), 4, 8, 12, 20 y 28 horas. Para todos los experimentos se utilizó (metil- ^3H)-timidina 50-80 Ci.mmol⁻¹ (New England Nuclear, Boston Mass, USA).

Todos los filtros de las distintas experiencias fueron colocados en viales de centelleo y desecados en vacío y solubilizados con 1 ml de acetato de etilo. Luego de agregar a cada vial 10 ml de solución de centelleo con base de tolueno, se midió la radiactividad con un espectrómetro Beckman LS-100. El "quenching" fue determinado por el método del estándar externo.

Los moles de (^3H)-timidina incorporados fueron calculados por la fórmula:

$$\text{moles} = (\text{des/min})/(\text{AS}) \times 4,5 \times 10^{-13}$$

donde *des/min* son las desintegraciones por minuto sobre el filtro, *AS* es la actividad específica de la solución de timidina en $\text{Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$ y $4,5 \times 10^{-13}$, el número de curies por *des/min*.

Recuento microscópico directo

Para la estimación del número de bacterias y volúmenes celulares se utilizó la técnica de microscopía de epifluorescencia con tinción de naranja de acridina (Hobbie et al., 1977), con filtros Nuclepore (0,2 μm de poro) coloreados con Irgalan Black de acuerdo a Jones & Simon (1975). Las muestras de agua se colorearon con naranja de acridina filtrándose un volumen adecuado, que permitiese obtener de 30 a 40 bacterias por campo microscópico. Los filtros se inspeccionaron con un aumento de 1.250 en un microscopio Zeiss Standard 14 equipado con una lámpara de 12 voltios, 100 watts, filtros para excitación en azul BP 455, divisor de rayos FT 510 y filtros supresores LP 520 y BG 38. Se contaron entre 200 y 400 bacterias en 20 campos, como mínimo. Las bacterias fueron medidas (largo y ancho para bacilos y diámetro para los cocos) y agrupadas en clases de tamaño. El volumen medio de los cocos y bacilos se obtuvo de acuerdo a la fórmula de la esfera y el cilindro.

Factores de conversión

Los ensayos realizados para calcular el factor de conversión indispensable para las mediciones de producción bacteriana en el embalse Ezequiel Ramos Mexía, fueron realizados en distintos meses de acuerdo al siguiente detalle:

Mayo

a) Tres litros de muestra de filtraron por 30 μm y se incubaron en un Erlenmeyer en un baño con agua circulante a 13 °C. En forma inmediata (tiempo cero) y a las 3, 6, 12 y 24 horas se extrajeron tres alícuotas de 50 ml que fueron inoculadas con (^3H)-timidina (1,25 nM de concentración final). Una fracción (blanco) se fijo rápidamente con formol (2% concentración final) y las dos restantes se incubaron en oscuridad por una hora y luego fueron fijadas.

b) Se incubaron 3 litros de agua del lago, filtrada por 30 μm y con el agregado de glucosa (5 mg l^{-1}) en un baño con agua circulante a 13 °C durante 12 horas. A partir de ese momento (tiempo cero) se tomaron tres alícuotas de 50 ml a las 3, 6, 12 y 24 horas. Se incubaron con (^3H)-timidina (1,25 nM) durante una hora y luego se fijaron con formol.

c) Se fraccionaron frascos con 400 ml de agua de lago filtrada por 30 μm , a los que se inoculó (^3H)-timidina hasta una concentración final de (5), (2,5), (1,2), (0,6), y (0,3) nM. Se extrajeron alcuotas de 50 ml de cada uno de ellos al iniciar la experiencia (blanco) y a las 4, 8, 12, 20 y 28 horas. Todos fueron fijados rápidamente con formol.

Agosto

Se efectuó un experimento en recipientes con 600 ml de agua de lago agregando (^3H)-timidina (1,25 nM). Las submuestras (50 ml) se obtuvieron al inicio de la experiencia (blanco) y a las 3, 6, 9 y 14,5 horas.

Diciembre

Se siguió el procedimiento anterior. La concentración de (^3H)-timidina fue de 2,5 nM y las alcuotas se extrajeron a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas.

Julio

Se incubaron 5 litros de agua del lago en baño de agua circulante. Se tomaron submuestras por duplicado, mas un blanco fijado con formol, de 50 ml cada una a las 0, 6, 21, 27 y 45 horas, las que luego de ser inoculadas con 2,5 nM de (^3H)-timidina e incubadas por 3 horas, se fijaron con formol.

Las muestras para recuento microscópico directo fueron extraídas paralelamente a las alcuotas de las distintas experiencias y fijadas con formol.

El cálculo del factor de conversión se realizó de acuerdo a Kirchman *et al.* (1982) y según la modificación de Bell *et al.* (1983). La ecuación final es:

$$C: \mu \frac{N(0)}{V(0)} \quad (1)$$

donde μ es la tasa específica de crecimiento (horas^{-1}) obtenida de las regresiones de tasas de consumo y abundancia, $N(0)$ es el número inicial de bacterias que incorporan timidina y $V(0)$ es la intersección-y (medición inicial) de la regresión de tasa de consumo.

Partiendo de la hipótesis de que el volumen celular aumenta exponencialmente con la edad de la célula, el cambio en el promedio del volumen celular en el tiempo deberá sumarse al crecimiento de la biomasa total ($\mu + s$) (Kirchman *et al.*, 1982).

RESULTADOS Y DISCUSION

Volumen de la muestra - concentración óptima - tiempo de incubación.

Los resultados de la experiencia A (Tabla I), muestran que a partir de los 40 minutos de incubación el consumo fue bastante similar para todas las concentraciones, mostrando toda la experiencia ($n = 27$) un coeficiente de correlación elevado ($r = 0,90$; $P < 0,01$) estimándose entonces que la utilización de timidina aumentó en forma proporcional con el tiempo, independientemente de su concentración.

La experiencia B, en la que se utilizaron alícuotas de 50 ml de muestra e incubaciones de hasta 4 horas, partiendo de una concentración de 1,25 nM, dio resultados similares a los anteriores (Tabla II).

Con el agregado de glucosa (experiencia C), hasta los 5 mg l⁻¹ hubo un aumento en el consumo en la muestra con sustrato que alcanzó un máximo de 70 % en una hora, para el inóculo de 1,25 nM. El consumo no fue tan alto con concentraciones mayores de glucosa (Tabla III). Esto pudo estar relacionado con una inhibición por la concentración alta de sustrato o una alta producción con gran dilución isotópica del inóculo radiactivo.

Durante la experiencia D (Tabla IV) se observó un aumento del 37 % en la tasa de incorporación para el inóculo de 5 nM, respecto al de 2,5 nM a las 28 hs. Esto puede deberse a que este último recurso se agotaría primero, o a un posible marcado del ADN u otras sustancias en microorganismos distintos a las bacterias, durante la incubación con más sustrato disponible. Estos datos coinciden con lo observado por Bell *et al.* (1983).

De esta manera también se explicarían las pequeñas diferencias encontradas entre las relaciones de 1,25 - 2,5 nM a las 20 y 28 horas. No obstante estas diferencias, en esta experiencia el coeficiente de correlación fue de 0,99 ($P < 0,01$).

Tiempo (min.)	Concentración agregada (nM)					
	0,63	1,25	2,5	5	10	20
10	0,8*	5,8*	5,9*	8,0*	-	-
20	3,5*	6,8*	6,2*	8,1*	4,9*	-
40	4,9*	6,3*	5,8*	6,8*	5,0*	1,9*
60	5,4*	5,2*	6,2*	6,2*	5,5*	5,3*
120	4,1*	6,6*	5,5*	5,3*	6,6*	3,7*

*(nmol.l⁻¹.h⁻¹).10⁻⁴

TABLA I. Incorporación de ³H-timidina en el material insoluble en ácido tricloroacético. Datos correspondientes a la experiencia A.

Tiempo (horas)	Concentración agregada (nM)				
	0,31	0,63	1,25	2,5	5
0,5	0,6*	1,5*	1,5*	1,5*	0,8*
1	0,5*	1,5*	1,8*	1,8*	1,6*
2	0,5*	1,5*	1,8*	1,9*	1,7*
3	0,5*	1,5*	1,8*	1,8*	1,8*
4	0,5*	1,5*	1,8*	1,9*	1,8*

*(nmol.l⁻¹.h⁻¹).10⁻⁴

TABLA II. Incorporación de (³H)-timidina en el material insoluble en ácido tricloroacético. Datos correspondientes a la experiencia B.

Hs. de incub.	Timidina agregada (nM)	Consumo en la muestra sin glucosa	Glucosa agregada (mg.l ⁻¹)	Consumo en la muestra con glucosa	% en más
1	0,625	1,52*	10	1,97*	30
2		1,45*		1,90*	31
3		1,46*		1,88*	29
4		1,46*		1,90*	32
1	1,25	1,75*	5	2,98*	70
2		1,83*		2,74*	50
3		1,79*		2,90*	62
4		1,80*		2,80*	56
1	2,5	1,83*	2	2,70*	48
2		1,85*		2,25*	22
3		1,80*		2,20*	21
4		1,87*		2,40*	29
1	5	1,64*	1	2,30*	40
2		1,68*		2,20*	30
3		1,82*		2,30*	29
4		1,78*		2,10*	19

* (nmol.l⁻¹.h⁻¹).10⁻³

TABLA III. Consumo de (³H)-timidina en las muestras con y sin agregado de sustrato extra (glucosa). Datos correspondientes a la experiencia C.

Siempre hubo un importante aumento en el número de bacterias durante las incubaciones. Al final de la experiencia de 28 horas, la población bacteriana había aumentado un 120 % ($r = 0,99$; $P < 0,01$).

Muchos autores han usado (³H)-timidina en una concentración 5 nM (Kirchman *et al.*, 1982; Ducklow & Kirchman, 1983 y Ducklow & Hill, 1985). Bell *et al.* (1983) y Riemann *et al.* (1982) sugieren que usar de 5 a 10 nM es útil para impedir la síntesis *de novo* en ambientes acuáticos, mientras otros autores opinan que estas cantidades no son suficientes (Finlay *et al.*, 1984). Pollard & Moriarty (1984) sostienen que aún 20 nM es insuficiente pero que sobre 40 nM está la concentración adecuada (estos autores trabajaron con muestras de sedimentos donde la adsorción es elevada).

Empíricamente se puede determinar la concentración óptima mediante el cálculo de tasas de consumo para distintas cantidades de timidina de una misma actividad específica (Fuhrman & Azam, 1982; Bell *et al.*, 1983 y Bell, 1986). Se debe elegir aquella para la cual

Tiempo (hs)	Concentración agregada (nM)				
	0,31	0,63	1,25	2,5	5
4	0,6*	1*	0,9*	1,4*	1,6*
8	0,6*	1*	1,2*	1,4*	1,6*
12	0,5*	1*	1,2*	1,3*	1,5*
20	0,4*	0,8*	1*	1,3*	1,4*
28	0,3*	0,6*	0,8*	1*	1,4*

*(nmol.l⁻¹.h⁻¹).10⁻⁴

TABLA IV. Incorporación de (³H)-timidina en el material insoluble en ácido tricloroacético. Datos correspondientes a la experiencia D.

se obtiene una curva asintótica de incorporación de radioisótopo para distintos tiempos de incubación. De acuerdo a nuestros resultados esta concentración fue de 2,5 nM.

Se puede apreciar que las concentraciones usadas por los distintos autores van de mayor a menor, así se trate de sedimentos, aguas eutróficas o mar abierto, lo que denotaría que mucha de la (³H)-timidina agregada es adsorbida por el medio cuanto más sustancias y partículas se encuentran en el mismo, haciendo que no pueda ser utilizada por las bacterias. También puede ocurrir que en tales ambientes haya un aumento de timidina exógena que compita con la suministrada, haciendo que en ambientes con más partículas, la concentración de radioisótopo a usar deba ser mayor. Es en este punto donde también se hace importante la utilización de un volumen de muestra adecuado que no sea influenciado por las condiciones propias del medio que se investiga. En un ambiente como el del embalse Exequiel Ramos Mexía, una alcuota de 50 ml probó ser eficiente.

Un tiempo medio de duplicación que varió entre 18 y 52 horas permitió que la timidina suministrada supiera todos los requerimientos necesarios en la síntesis de ADN. Si las bacterias crecen muy rápidamente, la entrada a la célula de la timidina exógena no alcanza a suplir la síntesis *de novo* y esta diluye la (³H)-timidina que se incorpora al ADN (Moriarty & Pollard, 1982). De acuerdo a este razonamiento, en el presente estudio una concentración de 2,5 nM y un tiempo de incubación de 4 horas mostró los mejores resultados.

Factores de conversión

Las estimaciones de tasas de crecimiento, determinadas de acuerdo a los cambios en la abundancia de bacterias y según la tasa de incorporación de (³H)-timidina, fueron similares. Los resultados de las experiencias se presentan en las Tablas V, VI y VII. En las experiencias de mayo (C), la correlación entre el número de bacterias y el tiempo fue alta ($r = 0,99$). No

ocurrió lo mismo con el consumo, debido a que con algunas concentraciones no se alcanzó a cubrir la demanda requerida. Esto ocurrió por debajo de una concentración de 1,25 nM. Este comportamiento no lineal es debido posiblemente a la dilución isotópica. Por otro lado, en la experiencia B, que se realizó con agua enriquecida con glucosa, el factor de conversión varió en un amplio rango. Esto fue producto de la diferencia entre las tasas de crecimiento, calculadas de acuerdo al incremento celular por un lado y a su consumo por el otro, que variaron entre 0,04 y 0,09 respectivamente. Esto podría ser resultado del enriquecimiento del sustrato (Tablas VI y VII).

La discrepancia entre las tasas de crecimiento obtenidas a partir del conteo directo y consumo, se repitieron también en los ensayos de mayo A y C, aunque los distintos factores de conversión de estas experiencias se mantuvieron dentro del mismo orden de magnitud (10^9). El promedio de todos los factores de conversión derivados de la experiencia C, fue 2.1×10^9 cel.nmol⁻¹, que es exactamente igual al obtenido por Bell *et al.* (1983).

Considerando que en este trabajo los factores se obtuvieron de la fórmula (1), los distintos valores de μ para bacterias y consumo son los que determinan la diferencia en los resultados en una misma experiencia, quizás provocada por el aumento de la biomasa bacteriana durante el ensayo.

En mayo, en la experiencia B, las bacterias que recibieron un aporte extra de sustrato aumentaron rápidamente de volumen. Este aumento de volumen es el paso previo a la división celular, con el consiguiente incremento en el consumo de timidina. Se comprobó aquí una tasa de crecimiento de 0,09, indicativa de un menor tiempo de duplicación (11 horas, Tabla VII), lo que se refleja en el aumento substancial en el número de bacterias en 24 horas (Tabla V).

Muestra	Inóculo (nM)	horas de Incub.	Temp. incub.(°C)	N° inicial (cel.ml ⁻¹ x10 ⁵)	N° final (cel.ml ⁻¹ x10 ⁵)
Mayo a	1,25	24	12	1,67	4,15
Mayo b	1,25	24	12	1,87	5,93
Mayo c	5	28	12	2,28	5,02
Mayo c	2,5	28	12	2,28	5,02
Mayo c	1,25	28	12	2,28	5,02
Mayo c	0,625	28	12	2,28	5,02
Mayo c	0,312	28	12	2,28	5,02
Agosto	1,25	14,5	10	1,59	5,20
Diciembre	2,5	4	20	7,87	11,25
Julio	2,5	48	8	7,07	14,88

TABLA V. Cambios en el número de bacterias durante las incubaciones correspondientes a las experiencias realizadas con el objeto de determinar el factor de conversión.

En el mes de agosto se obtuvieron dos factores muy semejantes ($3,03$ y $3,9 \times 10^9$ cel.nmol⁻¹). En esta oportunidad se realizaron mediciones de volumen celular. Teniendo en cuenta su tasa de aumento (s), ambos factores se igualan (Tabla VI).

En diciembre el factor volvió a aumentar y alcanzó el máximo registro con $3,3 \times 10^{10}$ cel.nmol⁻¹ para el consumo de timidina, con una tasa (μ) de $0,41$ (Tabla VII). El factor obtenido a partir de las bacterias fue $7,2 \times 10^9$ cel.nmol⁻¹. El número de bacterias, que aumentó de $7,9 \times 10^5$ a $1,13 \times 10^6$ cel.ml⁻¹ en sólo 4 horas, determinaría el alto consumo de timidina (tiempo de duplicación, $1/\mu$, de 2,4 horas). Evidentemente, la temperatura jugó un papel muy importante, ya que fue el único factor que fue variando con respecto a los ensayos anteriores.

En julio el factor de conversión fue igual al de la experiencia B de mayo. La tasa de consumo fue $0,02$ y $\mu + s$ también $0,02$ ($0,01 + 0,01$).

Algunos valores documentados en la literatura están en el rango de 1×10^9 a $1,7 \times 10^{10}$ cel.nmol⁻¹, aun considerando ambientes totalmente diferentes entre sí (Fuhrman & Azam, 1980; Moriarty & Pollard, 1981; Kirchman *et al.*, 1982 y Murray & Hodson, 1985). A excepción de las experiencias de diciembre, la mayor parte de los factores obtenidos por nosotros estuvieron dentro del mismo orden de magnitud.

En el embalse Ramos Mexía, la temperatura media del cuerpo de agua entre mayo y principios de noviembre no superó los 9°C , y de diciembre a abril fue cercana a 17°C . La experiencia de diciembre realizada a 20°C reflejó ese aumento, con un menor tiempo de duplicación de la comunidad bacteriana y un consiguiente aumento en la utilización de (³H)-timidina. Este efecto también fue reportado por Riemann (1983) para un lago eutrófico de

Muestra	Inóculo	μ	r	s	1/ μ	Factores (Cel. nmol ⁻¹)	
						μ	s + μ
Mayo a	1,25	0,03	0,95		33	$4,8 \times 10^9$	
Mayo b	1,25	0,04	0,98		25	$2,0 \times 10^9$	
Mayo c	5	0,03	0,99		33	$1,1 \times 10^9$	
Mayo c	2,5	0,03	0,99		33	$1,2 \times 10^9$	
Mayo c	1,25	0,03	0,99		33	$1,2 \times 10^9$	
Mayo c	0,625	0,03	0,99		33	$1,6 \times 10^9$	
Mayo c	0,312	0,03	0,99		33	$2,5 \times 10^9$	
Agosto	1,25	0,07	0,80	0,02	14	$3,03 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$
Diciemb.	2,5	0,09	0,97		11	$7,2 \times 10^9$	
Julio	2,5	0,01	0,84	0,01	100	$5,4 \times 10^9$	$1,08 \times 10^{10}$

μ = Tasa constante de crecimiento instantáneo (aumento relativo por hora)
s = Tasa específica de crecimiento del volumen celular
1/ μ = Tiempo de generación instantáneo (necesario para que se duplique la población).

TABLA VI. Factores de conversión obtenidos utilizando la pendiente generada a partir del conteo microscópico directo vs tiempo.

Muestra	Inócul	μ	r	1/ μ	Factores (Cel.nmol ⁻¹)
Mayo a	1,25	0.07	0.96	14	8.3 x 10 ⁹
Mayo b	1,25	0.09	0.99	11	1.07 x 10 ¹⁰
Mayo c	5	0.07	0.95	14	2.6 x 10 ⁹
Mayo c	2,5	0.06	0.92	17	2.3 x 10 ⁹
Mayo c	1,25	0.05	0.80	20	1.99 x 10 ⁹
Mayo c	0,625	0.05	0.88	20	2.6 x 10 ⁹
Mayo c	0,312	0.05	0.87	20	4.1 x 10 ⁹
Agosto	1,25	0.09	0.95	11	3.9 x 10 ⁹
Diciemb.	2,5	0.41	0.99	2.4	3.3 x 10 ¹⁰
Julio	2,5	0.02	0.98	50	1.08 x 10 ¹⁰

μ = Tasa constante de crecimiento instantáneo (aumento relativo por hora).
 1/ μ = Tiempo de generación instantáneo (necesario para que se duplique la población).

TABLA VII. Factores de conversión obtenidos utilizando la pendiente generada a partir del consumo de (³H)-timidina.

Dinamarca, donde encontró que con bajas temperaturas en el agua, a pesar de la alta producción primaria, las bacterias asimilaban sólo del 3 al 8 % del carbono fijado por las algas, pero cuando la temperatura superaba los 13 °C, la producción secundaria bacteriana era, en algunas ocasiones, mayor al 100 % de la producción primaria.

Teniendo en cuenta que los factores de conversión pueden tener variaciones, y siendo los mismos de importancia fundamental para el cálculo de la producción bacteriana, se decidió la utilización de dos factores, quedando determinado un rango de valores. Fuhrman & Azam (1980) justifican esta elección: la incertidumbre en la proporción de ADN marcado en cada célula, condición muy importante a tener en cuenta si es que las unidades del factor de conversión se dan en bacterias por nmoles de (³H)-timidina incorporados en el ADN. Si bien no es posible conocer el valor exacto de la producción en el embalse Exequiel Ramos Mexía en un momento determinado, podría ser estimada dentro de límites máximos y mínimos utilizando los factores 2 x 10⁹ - 1,08 x 10¹⁰ cel.nmol⁻¹ para los meses con temperaturas bajas y 1,08 x 10¹⁰ - 3,3 x 10¹⁰ cel.nmol⁻¹ para los meses cálidos.

CONCLUSIONES

En ambientes como el Embalse Exequiel Ramos Mexía, se puede trabajar con diluciones de (³H)-timidina entre 1,25 y 5 nM y un tiempo de incubación de cuatro horas. El volumen de la muestra debe ser de 50 ml como mínimo.

Un aumento en la concentración de (^3H)-timidina no condiciona un aumento en su utilización, pero el aumento de nutrientes (como ocurrió en este caso con la glucosa), puede ser el causante del crecimiento bacteriano reflejado en una mayor producción. En este caso, si la concentración de (^3H)-timidina no es suficiente, podría ocurrir que haya dilución isotópica por lo que sería aconsejable el aumento de la concentración del precursor marcado.

No debe sorprender que el factor de conversión pueda ser más alto en un ambiente con menor disponibilidad de nutrientes que aquel calculado para ambientes eutróficos. Esto se debería a que los microorganismos presentes son abundantes pero de menor tamaño (menor biomasa por ml) y la limitación de los nutrientes y la predación del zooplancton actuarían selectivamente sobre las células más grandes. No siempre un aumento en el número de bacterias implica un aumento en la biomasa, por lo que se justifica la necesidad del cálculo de las tasas de incremento bacteriano (μ) y la del volumen celular (s).

Los factores de conversión deben ser calculados cada vez que un cambio en el ambiente (condiciones de luz, temperatura, etc.) haga presumir alteraciones en las tasas de consumo de (^3H)-timidina o número de bacterias que impliquen marcadas variaciones entre una época y otra del año y aún a distintas horas del día o entre el día y la noche.

Debido a las diversas alteraciones que puede sufrir el factor de conversión, se considera adecuado expresar la producción secundaria bacteriana como un rango, determinado por dos factores de conversión obtenidos empíricamente y que englobe las posibles fluctuaciones producidas por variables no consideradas.

BIBLIOGRAFIA

- AZAM, F. & FUHRMAN, J. A. 1984. Measurements of bacterioplankton growth in the sea and its regulation by environmental conditions. In: *Heterotrophic activity in the sea*. Hobbie, J. & LeB. Williams, P. J. (Eds.). Plenum Press -N.Y.- pp: 176-196.
- BELL, R. T. 1986. Further verification of the isotope dilution approach for estimating the degree of participation of (^3H)-thymidine in DNA synthesis in studies of aquatic bacterial production. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1212-1214.
- BELL, R.T., AHLGREN, G. M. & AHLGREN, I. 1983. Estimating bacterioplankton production by measuring (^3H)thymidine incorporation in a eutrophic swedish lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1709-1721.
- DUCKLOW, H. W. & HILL, S. M. 1985. Tritiated thymidine incorporation and the growth of heterotrophic bacteria in a warm core rings. *Limnol. Oceanogr.* 30: 260-272.
- DUCKLOW, H. W. & KIRCHMAN, D. L. 1983. Bacterial dynamics and distribution during a spring diatom bloom in the Hudson River Plume, U.S.A. *J. Plankton Res.* 5: 333-355.
- FINDLAY, S. MEYER, J. L. & EDWARDS, R. T. 1984. Measuring bacterial production via rate of incorporation of ^3H thymidine into DNA. *J. Microbiol. Methods.* 2: 57-72.

- FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1085-1095.
- FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120.
- HOBBIE, J. E., DALEY, R. J. & JASPER, S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225-1228.
- JONES, J. G. & SIMON, B. M. 1975. An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. *J. Appl. Bacteriol.* 39: 317-329.
- KIRCHMAN, D. DUCKLOW, H. W. & MITCHELL, R. 1982. Estimates of bacterial growth from changes in uptake rates and biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1296-1307.
- MARIAZZI, A. A., CONZONNO, V. H., ECHENIQUE, R. y LABOLLITA, H. 1991. Physical and chemical characters, phytoplankton and primary production of Ezequiel Ramos Mexía Reservoir (Argentina). *Hydrobiologia* 209: 107-116.
- MORIARTY, D. J. W. & POLLARD, P. C. 1981. DNA synthesis as a measure of bacterial productivity in seagrass sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 151-156.
- MORIARTY, D. J. W. & POLLARD, P. C. 1982. Diel variation of bacterial productivity in seagrass (*Zostera capricorni*) beds measured by rate of thymidine incorporation into DNA. *Mar. Biol.* 72: 165-173.
- MURRAY, R. E. & HODSON, R. E. 1985. Annual cycle of bacterial secondary production in five aquatic habits of the Okefenokee Swamp ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 650-655.
- POLLARD, P. C. & MORIARTY, D. J. W. 1984. Validity of the tritiated Thymidine method for estimating bacterial growth rates: the measurements of isotope dilution during DNA synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1076-1083.
- RIEMANN, B. 1983. Biomass and production of phyto- and bacterioplankton in eutrophic lake Tystrup, Denmark. *Freshwat. Biol.* 13: 389-398.
- RIEMANN, B. 1984. Determining growth of natural assemblages of freshwater bacteria by means of ³H-thymidine incorporation into DNA: Comments on methodology. *Arch. Hydrobiol. Beith. Ergebn. Limnol.* 19: 67-80.
- RIEMANN, B., FUHRMAN, J. & AZAM, F. 1982. Bacterial secondary production in freshwater measured by ³H-thymidine incorporation method. *Microb. Ecol.* 8: 101-114.

MEDICION DE LA PRODUCCION BACTERIANA EN UN EMBALSE PATAGONICO. IMPORTANCIA DE BACTERIAS LIBRES Y ADHERIDAS

MIGUEL A. DI SIERVI, ALDO A. MARIAZZI Y JORGE L. DONADELLI

*Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet", C.C. 712, 1900 La Plata, Argentina.
Contribución Nº 520.*

SUMMARY: Measurements of bacterial production in a Patagonian reservoir. Importance of free-living and attached bacteria.

One of the roles of bacteria in aquatic environments is that of intermediaries between primary producers and consumers. As such, they recycle dissolved organic matter and transform it into particled organic matter, in the process of bacterial secondary production. The aim of this study is to assess the incidence of free-living and of attached bacteria on total bacterial production of the Exequiel Ramos Mexía reservoir. In the experiments (methyl-³H)thymidine was used as a precursor of genetic material. The samples were inoculated, incubated, and filtered through nets and filters of different pore-sizes. DNA was extracted from the various fractions obtained. The results show that an important fraction of bacterial production was due to bacteria that passed through the smallest pore-size filters used (<5 µm).

KEY WORDS: Free-living bacteria, attached bacteria, bacterial production, reservoirs

RESUMEN: Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico. Importancia de las bacterias libres y adheridas

Una de las funciones de las bacterias en los ambientes acuáticos es la de actuar como intermediarias entre los productores primarios y los consumidores. En esta actividad, son las encargadas de reciclar la materia orgánica disuelta, transformándola en materia orgánica particulada, cuya expresión final es la producción secundaria bacteriana. El objetivo de este trabajo fue el de evaluar la incidencia de las bacterias libres y/o adheridas en la producción bacteriana total del embalse Exequiel Ramos Mexía (Neuquén, República Argentina). Para los experimentos, se empleó (metil-³H)-timidina como precursora del material genético. Las muestras, una vez incubadas fueron filtradas a través de mallas y filtros de diferente medida de poro, procediéndose luego a la extracción del ADN marcado. Los resultados mostraron que una parte importante de la producción bacteriana se debió a las bacterias que pasan a través de los filtros de menor medida usados (<5 µm).

PALABRAS CLAVES: Bacterias libres, bacterias adheridas, producción bacteriana.

INTRODUCCION

Mientras que la materia orgánica particulada es colonizada por bacterias, pues ésta solamente puede ser utilizada si primero es hidrolizada a pequeñas moléculas, generalmente monómeros, la pérdida de material intracelular por daños producidos por el zooplancton durante la predación sobre las algas también puede producir microzonas ricas en materia orgánica disuelta. Es así que las bacterias pueden encontrarse en la proximidad de las algas tratando de utilizar sus exudados o la materia producida por su autólisis. Los detritos orgánicos son también recursos de materia orgánica disuelta y suelen detectarse altas concentraciones de bacterias en su proximidad. Este comportamiento puede influir en la tasa de predación ejercida por el zooplancton sobre las bacterias, ya que aquellos de hábito alimentario filtrador, son capaces de filtrar bacterias adheridas a pequeñas partículas e incapaces de capturar a las libres (Fenchel, 1980), mientras que las bacterias pueden colonizar rápidamente la materia fecal excretada por éstos (Newell, 1965).

Por estas consideraciones, en este trabajo se tratará de evaluar qué porcentaje de la producción secundaria bacteriana proviene de las bacterias libres y cuál de las adheridas a las distintas partículas; y en este último caso, si esta producción se registra mayoritariamente en alguna fracción del plancton. Todo esto, como paso previo a un estudio más detallado de la vinculación de las bacterias en el reciclado de la materia orgánica de los ambientes acuáticos.

Descripción del área de estudio

El embalse Exequiel Ramos Mexía, se construyó por endicamiento del Río Limay. Está ubicado entre los 39° 30' S y los 68° 30' O, a 381 metros sobre el nivel del mar. Tiene una profundidad máxima de 60 metros. La transparencia del agua, medida con disco de Secchi, fluctúa en las distintas épocas del año entre 2 y 4,5 metros, siendo los valores de pH cercanos a la neutralidad, con tendencia a la alcalinidad.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de las muestras

El lugar elegido para el muestreo fue una pequeña bahía de poco más de 30 metros de profundidad, a resguardo de los vientos (Fig. 1). Las muestras de superficie se obtuvieron en bidones oscuros de 5 litros de capacidad, los que una vez llenos con la muestra fueron trasladados al laboratorio, donde se procedió a fraccionar las alícuotas para cada experiencia.

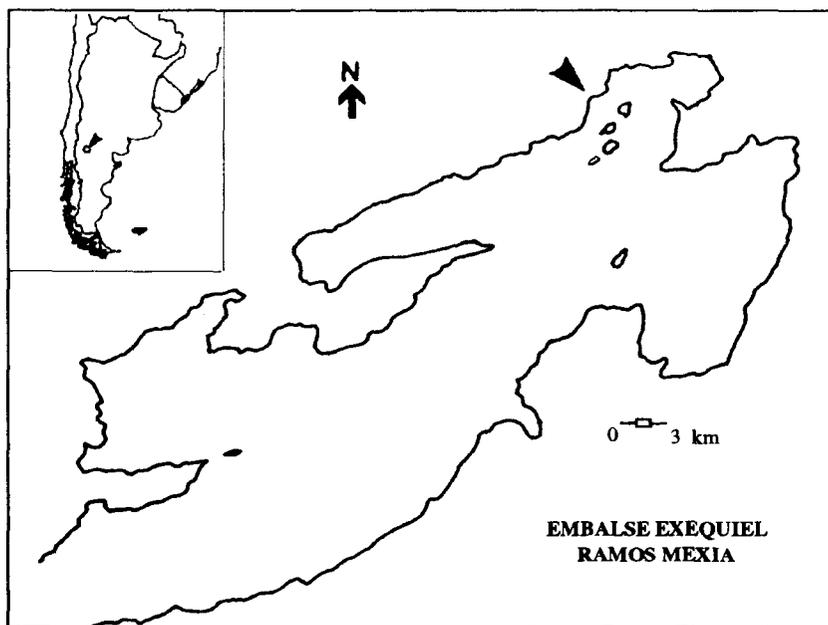


Fig. 1: Ubicación de la estación de muestreo en el Embalse Exequiel Ramos Mexía.

Descripción de las experiencias

Se realizó una serie de experiencias, diseñadas con el objetivo de lograr fraccionamientos de tamaño según el sistema de filtración.

Experiencia A

Alícuotas de 50 ml fueron filtradas por redes de plancton de distintos diámetros de poro (10, 30, 60 y 120 μm). Las muestras por triplicado (más un blanco fijado con formol 2% conc. final) se inocularon con metil- ^3H -timidina (2,5 nM, 50-80 Ci/mmol, New England Nuclear Corp.) e incubaron 4 horas en un baño de agua circulante a 13,5 °C (temperatura del agua del lago en ese momento). Finalizada la incubación fueron fijadas con formol (2% conc. final), y luego filtradas a través de filtros Sartorius de 0,22 μm de poro. Estos finalmente fueron tratados de acuerdo a Fuhrman & Azam (1980), teniendo en cuenta las modificaciones

aportadas por Riemann (1984).

Experiencia B

Se realizó en forma semejante a la anterior, aunque se modificaron algunas de las condiciones. Se reemplazó la red de 60 μm por una de 48 μm , la concentración de ^3H -timidina inoculada fue de 5 nM, mientras que la incubación se prolongó a 5 horas. Las muestras fueron tomadas por triplicado, más un blanco.

Experiencia C

El agua extraída del lago fue inoculada con ^3H -timidina (1,25 nM) e incubada durante 4 horas en baño de agua circulante. Posteriormente la muestra se fijó con formol (2% conc. final), y se tomaron alcuotas de 50 ml por triplicado. Permanecieron sin filtrar las correspondientes a las muestras totales siendo las demás filtradas por filtros Sartorius de 0,8; 5 y 12 μm de poro. Luego fueron todas nuevamente filtradas por filtros Sartorius de 0,22 μm de poro. Se usaron también en forma paralela en una muestra total, filtros de 0,45 μm de poro, con el fin de comparar la cantidad del material retenido en éstos con el de los filtros de poros de diámetros menores, de acuerdo a lo sugerido por Fuhrman y Azam (1982) y Riemann et al. (1982). Por último, todos los filtros fueron tratados como en la experiencia A.

Experiencia D

Una muestra de agua fue inoculada con ^3H -timidina (1,25 nM) e incubada en baño de agua circulante durante seis horas. Posteriormente se extrajeron alcuotas, que fueron filtradas por filtros Nuclepore de 1 μm de poro. Estos fueron mantenidos en ácido tricloroacético frío (5% concentración final) durante 20 minutos, luego lavados, y el producto final filtrado a través de Sartorius (0,22 μm de poro) (Lovell & Konopka 1985a). Estos filtros fueron tratados como en A.

Experiencia E

Una muestra de 600 ml de agua fue inoculada hasta una concentración 3,33 nM de ^3H -timidina (20 Ci/mmol). Fue incubada durante cuatro horas, al cabo de las cuales se tomaron alcuotas de 100 ml, que fueron filtradas con redes de plancton de 30 y 10 μm de poro o por filtros Nuclepore de 3 y 1 μm . Al producto resultante se le agregó igual volumen de ácido tricloroacético frío al 10%, para lograr una concentración final de 5%. Después de 10-15 minutos fueron filtradas por filtros Sartorius de 0,22 μm de poro.

Procesado de los filtros

Posteriormente a las experiencias, todos los filtros fueron desecados en vacío y colocados en viales para centelleo donde, para su disolución, se les agregó 1 ml de acetato de etilo. Luego de 30 minutos se agregó el líquido de centelleo a base de tolueno. Las muestras fueron procesadas en un espectrómetro Beckman LS100C. Las lecturas fueron corregidas con una curva de "quenching" realizada con patrones de tolueno tritiado, calculándose la eficiencia con lecturas del estándar externo. Los moles de ^3H -timidina incorporados fueron calculados por la fórmula:

$$\text{moles} = (\text{des/min}) / (\text{AS}) \times 4,5.10^{-13}$$

donde (*des/min*) son las desintegraciones por minuto sobre el filtro, *AS* es la actividad específica de la solución de timidina en Ci/mmol, y $4,5.10^{-13}$, el número de curies por desintegración.

RESULTADOS

El resultado del ensayo A hizo dudar del orden de las redes por las que había sido filtrada la muestra, ya que la submuestra filtrada a través de poros de 120 μm , aparecía con una actividad menor a la de las submuestras filtradas por redes de poros de diámetro inferior. A partir de esta submuestra se obtuvo una escala de mayor a menor, desde 60 μm a 10 μm . Si se toma en cuenta la actividad que arrojó la muestra sin filtrar como un 100%, la actividad en el agua filtrada por las diferentes redes, y ya liberada de partículas mayores, fue del 63% en la primera (120 μm), 79% para la filtrada por 60 μm , 63% en la filtrada por 30 μm y 50% en la de 10 μm (Tabla I).

El ensayo B entonces se efectuó en la misma forma que la experiencia anterior, exceptuando el cambio de la red de 60 μm por otra de 48 μm . El resultado final fue similar al de la prueba A, pues el agua filtrada por 120 μm retuvo menos actividad (58%) (Tabla I) que la filtrada a través de poros de 48 μm (68%). Los resultados para las otras dos submuestras fueron 51 y 46% para redes de 30 y 10 μm respectivamente.

En la experiencia C, a diferencia de las anteriores, la muestra se incubó con ^3H -timidina y posteriormente filtrada por filtros de membrana, en lugar de redes de plancton. Los poros fueron de menor tamaño y los resultados mostraron que un 76% de actividad se registró en el agua libre de partículas menores de 12 μm . Por sustracción se establece que entre 12 y 5

μm habría sólo 5% de actividad, ya que un 71% se comprobó en la submuestra filtrada por poros de 5 μm . Para la filtrada por 0,8 μm , la actividad fue del 43% (Tabla I). En el transcurso de este experimento, se trató de comparar la eficiencia en la retención de material insoluble en ácido tricloroacético, en filtros de 0,22 μm y 0,45 μm de poro respectivamente. Se pudo comprobar que la retención en el filtro de 0,45 μm es de sólo el 80% de lo retenido en el de 0,22 μm , motivo por el cual no fue usado en este trabajo.

La experiencia D se llevó a cabo adoptando el diseño experimental de Lovell y Konopka (1985a). Estos autores proponen para las filtraciones diferenciales, tratar no solamente el agua filtrada, sino también evaluar en el material que queda retenido en el filtro, qué actividad corresponde a bacterias adheridas a partículas mayores a los filtros utilizados. Del 100% que corresponde al tratamiento del agua sin filtrar, un 78% de actividad se registró en el agua, posteriormente al filtrado por un filtro Nuclepore de 1 μm de diámetro de poro (Tabla I), lo que indicaría que la actividad se debió principalmente a las bacterias libres. Solamente un 2% de actividad quedó retenida en el filtro, mientras que el 20% restante no se pudo recuperar. Esta pérdida es atribuida al manipuleo del filtro, el cual es mayor aplicando esta técnica.

Para la experiencia E, una parte de la incubación fue filtrada por redes de plancton y otra por filtros de membrana. En la parte correspondiente al filtrado por redes de 30 y 10 μm de poro, la actividad fue del 93 y 90%, respectivamente. Para aquella muestra de agua libre de partículas mayores de 3 μm , la actividad alcanzó al 89% y un 75% se registró en el agua que pasó a través de poros de 1 μm (Tabla I).

Diámetro de poro (μm)		Exp.A	Exp.B	Exp.C	Exp.D	Exp.E
red	filtro					
	0,8			43%		
	1				78%	75%
	3					89%
	5			71%		
10		50%	46%			90%
	12			76%		
30		63%	51%			93%
48			68%			
60		79%				
120		63%	58%			

TABLA I. Porcentajes de actividad bacteriana remanente en el agua respecto de muestras sin filtrar, y tomadas como 100% en las experiencias A, B, C, D y E, luego de ser filtradas por redes de plancton y filtros de membrana Sartorius de diferentes diámetros de poro.

DISCUSION

La evaluación exacta de la proporción en que las bacterias libres o adheridas contribuyen a la producción bacteriana en el embalse Exequiel Ramos Mexía depende, entre otros factores, de la influencia de la predación ejercida por el zooplancton sobre ellas. La forma en que se lleva a cabo esta predación fue descrita por Riemann (1983), que fundamentó que el pastoreo sobre el nanoplancton (que incluye a las bacterias) es más alto cuanto mayor es la trofia de un ambiente; y que en un ambiente acuático eutrófico, la mayor parte del carbono fijado por el fitoplancton es canalizado a través de las bacterias, en una medida superior al fijado en un ambiente oligotrófico. Los datos de Mc Cauley & Kalff (1981) mostraron que la producción del zooplancton en un ambiente eutrófico, comparado con la de uno oligotrófico, decrecía relativamente junto a la producción total del fitoplancton, esto, presumiblemente, como resultado de una disminución en la cantidad de nanoplancton. Si el nanoplancton es el recurso disponible más directo del zooplancton, una parte cada vez mayor de biomasa fitoplanctónica sufrirá sedimentación, o será utilizada para producción a medida que la eutroficación incremente la proporción de las especies fitoplanctónicas más grandes (Riemann, 1983). La menor actividad en el agua filtrada por poros de 120 μm (experiencias A y B), con relación a aquella filtrada por 60 y 48 μm , podría ser atribuida a la predación ejercida por el zooplancton. Al filtrarse a través de la red de 120 μm de poro, se eliminarían solamente cladóceros y copépodos, que pueden consumir bacterias pero con menor eficiencia que la que tienen para partículas de mayor tamaño. Jespersen *et al.* (1988) encontraron valores de un 5% de producción bacteriana canalizada a través del macrozooplancton, proponiendo que el resto podría ser consumido por microflagelados. La predación sobre las bacterias durante la incubación puede ser tan importante, que es recomendable un previo filtrado por red de 30 μm de poro para eliminar la presencia de bacterióvoros.

Cuando se trata de conocer en qué magnitud las bacterias integran la dieta del zooplancton o de qué manera utilizan los recursos de materia orgánica disuelta, es útil conocer la estructura del microambiente bacteriano. El hallazgo de que las bacterias utilizan una fracción importante de la producción primaria, es una contradicción aparente con la idea de que la materia orgánica disuelta está en tan baja concentración que no podría promover el crecimiento bacteriano en forma significativa. Sin embargo, las bacterias sólo pueden utilizar materia orgánica disuelta ya que la materia orgánica particulada debe ser primero hidrolizada para ser utilizada. Fuhrman y Azam (1982), usando micro-radioautografías, demostraron que las bacterias libres, en mayor medida que las adheridas a material orgánico particulado, son las responsables de la mayor parte de la producción secundaria. Azam y Ammerman (1984) consideraron que las bacterias no están distribuidas al azar en el agua, sino que formarían agrupaciones estructuradas con respecto a la concentración de nutrientes, y que responderían por quimiotaxis y movilidad para optimizar sus posiciones en el campo de los nutrientes, formando asociaciones en la proximidad (5-100 μm) del recurso de materia orgánica disuelta. Este puede provenir del fitoplancton (por exudación, autólisis y descarga a través de células

dañadas por el zooplancton), del zooplancton (excreción) y de partículas orgánicas (por despolimerización).

Los resultados de las experiencias A y B, en las que casi un 50% de la producción se registró en el agua con partículas menores de 10 μm , juntamente con el de la experiencia C en la que más del 75% era obtenido en la porción de 5 μm (43% en la menor de 0,8 μm), y los ensayos D y E con 78% y 75% respectivamente en la fracción menor de 1 μm , indicarían una gran proporción de bacterias libres o adheridas a partículas muy pequeñas.

La pérdida de un 20% de actividad en el ensayo D pudo deberse a que el manipuleo de la muestra produjo un aumento en la temperatura de la misma. Esto habría motivado la hidrólisis de macromoléculas en el precipitado de material insoluble (Riemann, 1984).

Las bacterias libres ostentan una tasa muy baja de sedimentación en un lago pero la adherencia a partículas la puede aumentar, además de favorecer su captura por el zooplancton (Lovell & Konopka, 1985b). Ducklow *et al.* (1982) midieron una tasa de sedimentación de 0,1 a 1 metro por día, y estimaron que del 3 al 67% de la producción de la columna de agua precipita.

Lo expuesto fundamenta la importancia de conocer en qué proporción tanto las bacterias libres como las adheridas participan de la producción secundaria. En el embalse Ramos Mexía, más de la mitad de la producción bacteriana total fue debida a las bacterias libres pero una fracción significativa de esta producción puede no ser registrada debido a predación ejercida sobre ellas. También la sedimentación, debido al posible aumento de las bacterias adheridas al fitoplancton durante el envejecimiento posterior a las floraciones, produciría la pérdida de una fracción significativa.

Las bacterias juegan un papel cuantitativamente significativo en la red alimentaria, donde las interacciones entre partículas, materia orgánica disuelta, bacterias y zooplancton, son múltiples y complejas. Los factores que las gobiernan serán el objetivo de futuros estudios.

BIBLIOGRAFIA

- AZAM, F. & AMMERMAN, J. W. 1984. Cycling of organic matter by bacterioplankton in pelagic marine ecosystems: Microenvironmental considerations. In: *Flows of energy and materials in marine ecosystems*. Ed.: M. J. R. Fasham. Plenum Publishing Corp., p. 345-360.
- DUCKLOW, H. W.; KIRCHMAN, D. L. & ROWE, G. T. 1982. Production and vertical flux of attached bacteria in the Hudson River Plume of the New York Bight as studied with floating sediment traps. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 769-776.
- FENCHEL, T. 1980. Relation between particle size selection and clearance in suspension feeding ciliates. *Limnol. Oceanogr.* 25: 733-738.

- FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1085-1095.
- FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120.
- JESPERSEN, A. M.; CHRISTOFFERSEN, K. & RIEMANN, B. 1988. Annual carbon fluxes between phyto-, zoo- and bacterioplankton in eutrophic Lake Frederiksborg Slotssø, Denmark. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 23: 440-444.
- LOVELL, CH. R. & KONOPKA, A. 1985a. Primary and bacterial production in two dimictic Indiana lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 485-491.
- LOVELL, CH. R. & KONOPKA, A. 1985b. Thymidine incorporation by free living and particle-bound bacteria in an eutrophic dimictic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 501-504.
- Mc CAULEY E. y KALFF, J. 1981. Empirical relationships between phytoplankton and zooplankton biomass in lake. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 38: 458-463.
- NEWELL, R. 1965. The role of detritus in the nutrition of two marine deposit-feeders, the prosobranch *Hydrobia ulvae* and the bivalve *Macoma balthica*. *Proc. Zool. Soc. London* 144: 25-45.
- RIEMANN, B. 1983. Biomass and production of phyto and bacterioplankton in eutrophic lake Tystrup, Denmark. *Freshwat. Biol.* 13: 389-398.
- RIEMANN, B. 1984. Determining growth of natural assemblages of freshwater bacteria by means of ³H-thymidine incorporation into DNA: Comments on methodology. *Arch. Hydrobiol. Beith. Ergebn. Limnol.* 19: 67-80.
- RIEMANN, B.; FUHRMAN, J. & AZAM, F. 1982. Bacterial secondary production in freshwater measured by ³H-thymidine incorporation method. *Microb. Ecol.* 8: 101-114.

MEDICION DE LA PRODUCCION BACTERIANA EN UN EMBALSE PATAGONICO. VARIACIONES EN CORTOS PERIODOS DE TIEMPO.

MIGUEL A. DI SIERVI, ALDO A. MARIAZZI Y JORGE L. DONADELLI

*Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet", C.C. 712, 1900 La Plata, Argentina.
Contribución Nº 509.*

SUMMARY: Measurements of bacterial production in a Patagonian reservoir. Short-time variations.

In order to assess the influence of hourly and daily variations in the relationship between phytoplanktonic primary production and bacterial secondary production, parallel measurements of the two processes (primary production covering an entire daylight period) were performed in the Patagonian reservoir Exequiel Ramos Mexía. Significant variations in the rates of bacterial secondary production during 24 hours periods were observed, with maximum values during the night and early morning. Because there was no coincidence with the maxima in algal production, it was concluded that isolated measurements only indicate the situation at that particular day and hour, and that algae-bacteria relationships must be carefully evaluated since bacterioplanktonic production can be underestimated if the measurements are restricted to the daylight period.

KEY WORDS: bacterioplankton production, primary production, diel variations.

RESUMEN: Medición de la producción secundaria bacteriana en un embalse patagónico. Variaciones en cortos períodos de tiempo.

Mediciones paralelas de producción primaria (todo el período de luz del día) y producción secundaria bacteriana, en días diferentes de una misma semana y a distintas horas del mismo día, se llevaron a cabo con el objeto de evaluar las posibles diferencias entre sus tasas, las cuales podrían conducir a una incorrecta interpretación de la relación entre ambas productividades. Se observó una importante variación de la tasa de producción secundaria bacteriana a lo largo de las 24 horas con valores máximos durante la noche y a primeras horas de la mañana. Al no encontrarse coincidencia con los valores máximos de producción algal, se concluyó que los muestreos aislados sólo corresponden al día y la hora en que ellos fueron obtenidos, y que la relación algas-bacterias debe ser cuidadosamente evaluada ya que la producción del bacterioplankton puede ser subestimada si el trabajo se lleva a cabo solamente en las horas de luz solar.

PALABRAS CLAVE: Producción primaria, producción bacteriana, variaciones horarias.

INTRODUCCION

El proceso continuo de muerte o depredación de las bacterias ocurre al mismo tiempo que su crecimiento. Consecuentemente, el estado de equilibrio y los cambios registrados en experiencias aisladas sobre producción bacteriana no reflejan la realidad de lo que ocurre en un ambiente acuático. A ésto se le suma uno de los problemas básicos en el estudio *in situ* de la actividad bacteriana: que las bacterias reaccionan en forma inmediata a cambios relativamente pequeños, tanto físicos como químicos, de sus ambientes.

Con el empleo de trazadores radiactivos, es posible seguir con mayor seguridad el comportamiento de la comunidad bacteriana y así conocer la influencia de los cambios que se registran en sus hábitats, ya no de aquellos de largo plazo como las variaciones estacionales, floraciones, etc., sino de los que ocurren en cortos períodos, tales como el descenso de la temperatura durante la noche, los períodos de luz y oscuridad, el flujo de nutrientes, etc. El objetivo de este trabajo, fue el de determinar posibles diferencias en la producción algal y bacteriana entre días consecutivos, y entre diferentes horas del día y detectar cambios en la relación existente entre las bacterias y su ambiente, y en este caso específicamente, entre la producción primaria algal y la secundaria bacteriana, que pudieran dar lugar a interpretaciones erróneas de su interdependencia.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en el embalse Exequiel Ramos Mexía, y el lugar elegido para el muestreo fue una pequeña bahía de poco más de 30 metros de profundidad, a resguardo de los vientos (Di Siervi *et al.*, 1995a, Fig. 1).

Las muestras correspondientes a los ensayos diarios sobre producción primaria algal y producción secundaria bacteriana, fueron obtenidas durante siete días consecutivos, del 14 al 20 de mayo de 1986, al mediodía, en la misma estación, e incubadas *in situ*. En los meses de abril y mayo de 1986 se realizaron las experiencias horarias, con muestreos cada 4 horas. En el primer mes abarcaron 24 hs (desde el mediodía). Al mes siguiente, desde las 8,30 hs del 18/5 a las 14,30 hs del 20/5. Las correspondientes a producción primaria, aproximadamente de 8,00 a 20,00 hs. en abril y de 9,00 a 19,00 hs en mayo.

Las muestras para la producción algal se inocularon con $4\mu\text{Ci}$ de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (Comisión Nacional de Energía Atómica), y se incubaron por duplicado a (0), (1), (2,5), (5) y (7,5) metros, siguiéndose en líneas generales, el procedimiento de Steemann Nielsen (1952). Un promedio de las cuentas por minuto obtenidas (cuya dispersión nunca superó el 10 %) se usó para el cálculo de los valores finales.

Para estimar la producción bacteriana, las muestras, por triplicado y de 50 ml, se extrajeron de (1), (2,5) y (5) metros, profundidades en las cuales se observó una mayor

producción (Di Siervi *et al.*, 1995b). Fueron inoculadas con metil-³H-timidina (2,5 nM) (50-80 Ci/mmol, New England Nuclear Corp.) e incubadas conjuntamente con las de producción primaria durante 4 horas. Finalizada la incubación, todas fueron fijadas con formol (2% concentración final) y filtradas por filtros Sartorius de 0,22 µm de poro. Las muestras de producción secundaria, fueron procesadas de acuerdo a Fuhrman y Azam (1982) y las modificaciones de Riemann (1984) (el procedimiento se indicó detalladamente en Di Siervi *et al.*, 1995b). Una vez que las muestras de producción secundaria fueron tratadas con ácido tricloroacético y filtradas, tanto estos filtros como los de producción primaria fueron desecados en vacío. Colocados posteriormente en viales de centelleo, todos fueron disueltos con 1 ml de acetato de etilo, y luego del agregado de la solución centelleadora, se midió la actividad en un espectrómetro Beckman LS 100C.

Los moles de timidina incorporados fueron calculados por la fórmula:

$$\text{moles: } (des/min) / (AS) \times 4,5 \times 10^{-13}$$

donde *des/min* son las desintegraciones por minuto sobre el filtro, *AS* es la actividad específica de la timidina en Ci/mmol y $4,5 \times 10^{-13}$ es el número de Ci por des/min.

Un promedio de los moles obtenidos a partir de las incubaciones de duplicados o triplicados de las muestras (que mostraron una dispersión de entre el 5 y el 7 %) fueron usados en el cálculo de la producción bacteriana. Esta se consideró comprendida dentro de un rango establecido por el uso de dos factores de conversión (discutida su utilización en Di Siervi *et al.*, 1995c) y del que por convenciencia, para los gráficos sólo se tiene en cuenta el valor medio. La ecuación utilizada fue la de Bell *et al.* (1983):

$mgC.l^{-1}.h^{-1}$: nmoles de (³H)timidina en el extracto insoluble en ácido tricloroacético x factor de conversión (cel/nmol) x carbono celular promedio x 60 / tiempo de incubación (minutos).

RESULTADOS

Muestreos diarios

La temperatura del agua en el Embalse Ramos Mexía es muy estable, sin cambios en profundidad (salvo una muy pequeña variación superficial, no mayor a 2 grados, entre el día y la noche). En la experiencia realizada en la semana del 14 al 20 de mayo inclusive, pudieron apreciarse diferencias diarias en los valores del mediodía en la producción secundaria, con un intervalo que varió entre 0,23 mgC.m⁻².h⁻¹ (registrado el día 15) a 0,91 mgC.m⁻².h⁻¹ (el día 17). Los valores de producción primaria respondieron en forma directa a los cambios climáticos que se registraron, bajos los días 14 y 15 (fueron días lluviosos), aumentaron el 16 (seminublado), y nuevamente bajos el 17 (lluvioso). Aumentó la producción a partir del día

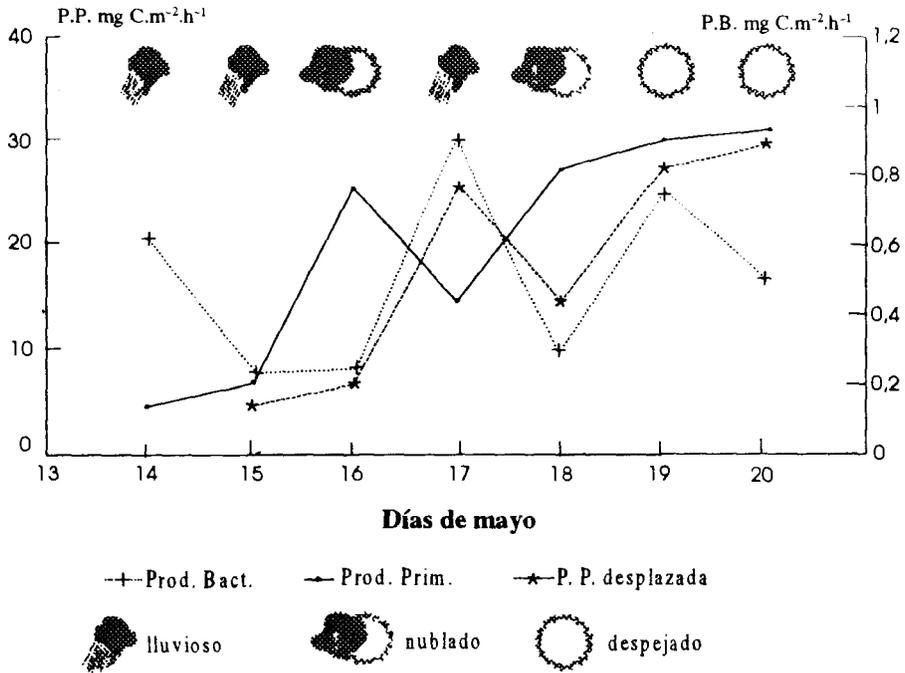


Fig. 1: Producción primaria algal y producción secundaria bacteriana por m^2 (valor medio del rango calculado), correspondientes a los muestreos diarios realizados al mediodía, en la semana del 14/5 al 21/5.

18 (seminublado) y se estabilizó en valores altos los días 19 y 20 (totalmente despejados) (Fig. 1).

Podría suponerse una total falta de relación entre las producciones algal y bacteriana, pues se aprecia que a un pico de máxima de la primera le corresponde un mínimo registro de la segunda y viceversa. El hecho de que durante este muestreo de una semana, se sucedieran días con distintas condiciones climáticas permitió obtener valores de producción primaria irregulares, al igual que los de la producción bacteriana. Estas circunstancias posibilitaron observar que, si se desplaza la curva perteneciente a la producción algal 24 horas, se obtiene una casi total coincidencia con la de producción secundaria (Fig. 1).

Muestreos cada 4 horas (Fig. 2).

Estos se realizaron con el fin de conocer la fluctuación de los valores correspondientes a la producción secundaria bacteriana a lo largo de las 24 horas del día.

En un primer muestreo, que abarcó desde las 12,00 horas del 12/4 a las 12,00 horas del 13/4, se pudo comprobar que los valores de producción primaria del mediodía fueron similares tanto un día como el otro (91 y 89 $\text{mgC}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente) y que los valores del atardecer (después de las 16,00 horas), fueron similares a los del amanecer (estos últimos algo mayores). La producción bacteriana fue siempre en aumento a partir del primer muestreo, aún durante la noche y hasta el mediodía del día siguiente. (Fig. 2). Las variaciones durante estas 24 horas, no aclararon mucho sobre el comportamiento bacteriano a lo largo de un día, aunque se pudo al menos comprobar la falta de paralelismo temporo-espacial entre la producción del bacterioplancton y la producción primaria. Para poder comprobar si este comportamiento obedece a un ciclo horario no ligado a las variaciones de radiación solar, al mes siguiente se extendió el muestreo a tres días consecutivos y cada cuatro horas.

En general, la producción primaria fue muy baja, siendo los resultados de las incubaciones al mediodía de sólo 27, 30 y 31 $\text{mgC}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Es de destacar que el primer día se presentó seminublado, motivo por el cual se registró un valor menor al de los días siguientes de cielo despejado.

Respecto de la producción secundaria, se obtuvieron algunos registros más altos en horas de oscuridad (noche del 18/5, madrugada del 19/5), que otros de horas en las que había

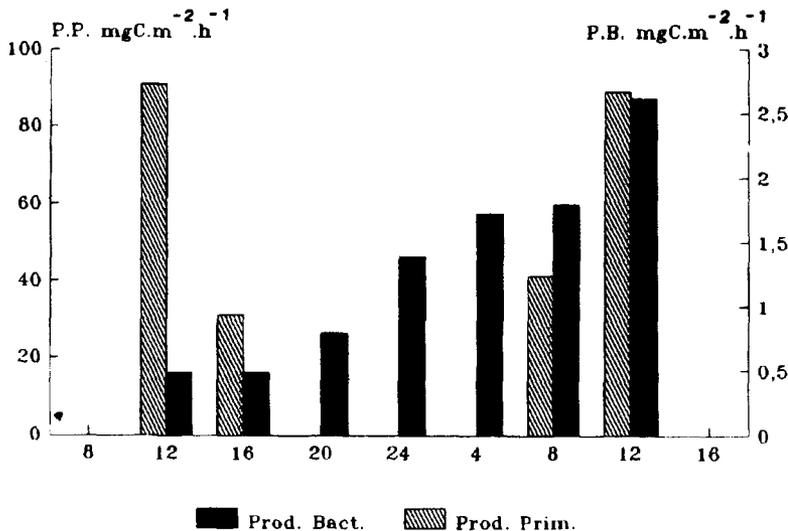


Fig. 2: Producción primaria algal y producción secundaria bacteriana expresada en m^2 (valor medio del rango calculado), correspondientes a los muestreos horarios realizados entre las 12,00 hs. del 12/4 y las 12,00 hs. del 13/4.

producción primaria (mediodía y tarde del 18/5, tarde del 19/5, mediodía del 20/5) (Fig 3). Lo interesante se vio en la composición vertical de estos muestreos, donde los máximos descendieron con la profundidad en el transcurso de las horas. El primer día hubo una mayor producción a las 8,00 hs. a 1 metro y luego a las 20,00 hs. el pico estuvo a los 2,5 y 5 metros. A las 4,00 hs. del día siguiente, hubo mayor actividad a 1 metro, trasladándose ese pico de producción a las 12,00 hs. a los 2,5 metros. A las 20,00 hs. hay un leve aumento en 5 metros con valores semejantes al anterior. Es a 1 metro donde comienza a detectarse un nuevo aumento de actividad, también registrado a los 5 metros al mediodía del último día de trabajo. Esto corroboraría la independencia espacio-temporal, entre la producción secundaria bacteriana y la primaria algal en lo que se refiere a sus valores máximos (Fig. 4).

Se pudo comprobar que hay tres momentos del día en los que la producción bacteriana presentó picos de máxima actividad, y éstos se dieron siempre con espacios de alrededor de 8 horas entre sí, generalmente en las incubaciones comenzadas a las 4, 12 y 20 hs.

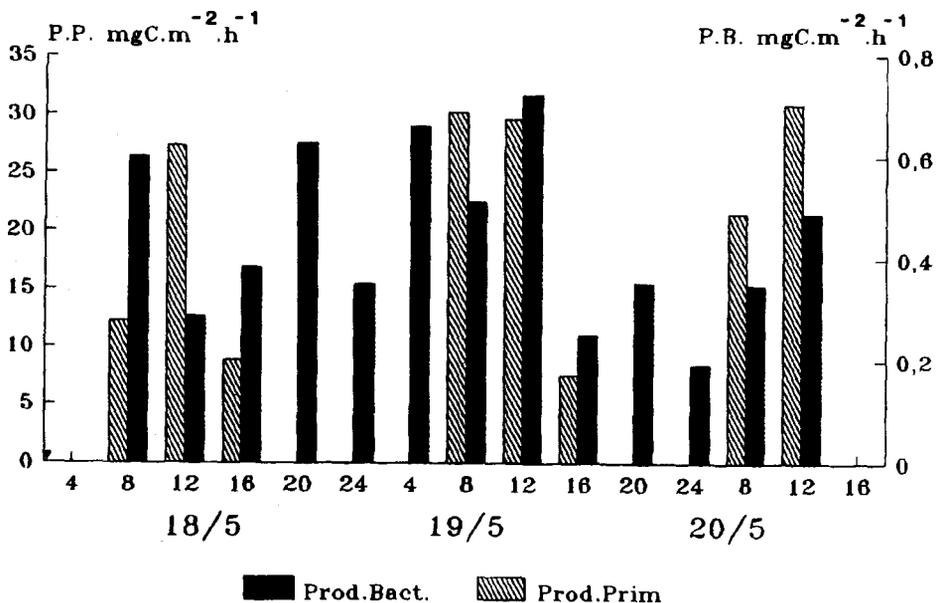


Fig. 3: Producción primaria algal y producción secundaria bacteriana expresada en m^2 (valor medio del rango calculado), correspondientes a los muestreos horarios realizados entre las 8,00 hs. del 18/5 y las 12,00 hs. del 20/5.

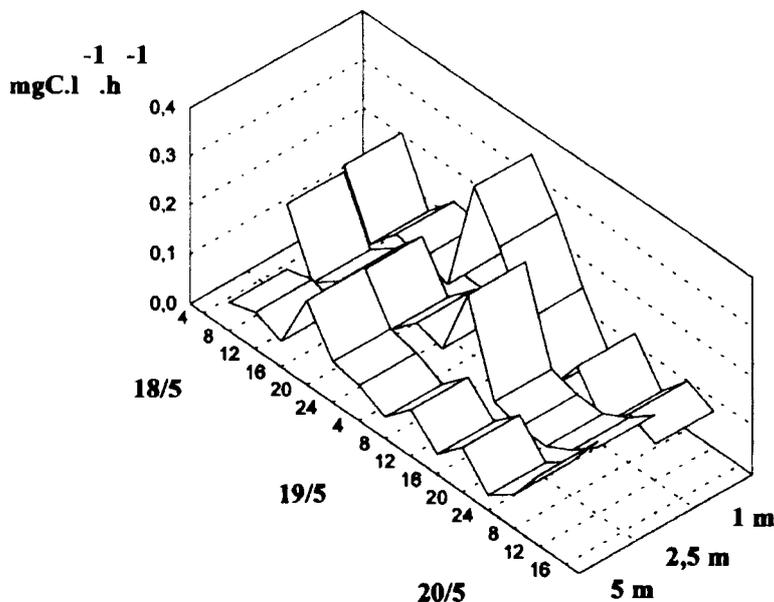


Fig. 4: Producción secundaria bacteriana (valor medio del rango calculado), en tres profundidades (1 m; 2,5 m y 5 m) según muestreos realizados cada cuatro horas desde las 8,00 hs. del 18/5 a las 12,00 hs. del 20/5. Para los valores de producción primaria, ver texto.

DISCUSION

No sólo durante el año se presentan variaciones en la actividad bacteriana, debido a cambios estacionales de temperatura, abundancia de fitoplancton u otros factores físicos y químicos sino que también pueden producirse cambios según se trate de un día nublado o soleado, en una misma semana y aún dentro de un mismo día. Estos cambios no son atípicos o circunstanciales, sino que reflejan el estado dinámico de un ambiente y la rápida adaptación del bacterioplancton.

Una alteración en la tasa de duplicación a diferentes horas del día, fue comprobada por Moriarty *et al.* (1985), quienes calcularon distintos valores de producción entre el día y la noche en el agua en contacto con el fondo y hallaron una variación similar en orden de

magnitud en la columna de agua, cerca de un arrecife de coral. Estos autores consideraron que las variaciones diarias en el crecimiento bacteriano en comunidades planctónicas, podían estar influenciadas por la excreción de materia orgánica por las algas durante la fotosíntesis, como así también, por la liberación de materia orgánica durante su predación por el zooplancton. No deben confundirse estas variaciones con problemas producidos por dilución isotópica. Cuando las poblaciones bacterianas crecen lentamente, la timidina exógena suple todos los requerimientos de la síntesis de ADN, inhibiendo la síntesis *de novo*. Cuando las bacterias crecen rápidamente, si la ^3H -timidina agregada al medio no es suficiente, su consumo no tiene la rapidez suficiente como para suplir la cantidad necesaria de dTMP, y es así como la síntesis *de novo*, diluye la timidina marcada incorporada al ADN. Para este trabajo, se asumió que la cantidad de ^3H -timidina suministrada a las muestras era suficiente como para evitar la síntesis *de novo*, de acuerdo a los resultados obtenidos durante la puesta a punto de esta metodología (Di Siervi *et al.*, 1995c).

En ambientes acuáticos eutróficos, también hay registros de variaciones en la tasa de incorporación de ^3H -timidina. En el lago Frederiksborg Slotssø, Riemann *et al.* (1982) comprobaron un incremento en el consumo de radioisótopo durante la mañana. Posteriormente, también observaron un aumento a medianoche y un nuevo pico de síntesis a la salida del sol. Tales resultados coinciden con los obtenidos en esta investigación. Ciclos diarios semejantes a los referidos fueron encontrados por Hagström (1984), mientras que Riemann y Søndergaard (1984) hacen mención a un incremento de producción secundaria al amanecer, encontrando asimismo en estudios diarios, un incremento constante en un período de 24 horas, tal como se planteó aquí respecto del muestreo horario correspondiente a abril.

Algunos autores consideran que la actividad bacteriana reflejada en su producción, involucra ciclos diarios, que fueron comprobados con distintas metodologías y en ambientes totalmente diferentes. Generalmente, estos ciclos muestran picos importantes al amanecer, al atardecer y durante la noche, en marcado desfase con la producción primaria. Bell (1984) comentó la previsibilidad de tal comportamiento, pues la síntesis de ADN no muestra una respuesta inmediata al cambio en el suministro de nutrientes y postuló que el resultado de una incubación al mediodía puede no ser representativa de la realidad. Señaló además, que en un día nublado, la tasa de incorporación de ^3H -timidina era similar en la tarde, anochecer y noche, por lo que estimó que el estado climático del día de muestreo puede ser de suma importancia si se quiere dar representatividad mensual a ese día en una proyección anual. Los resultados aquí obtenidos sirven para reforzar las opiniones respecto a la real existencia de ciclos de producción bacteriana diarios y aún, de ciclos más cortos dentro de un mismo día. Una variedad de eventos puede ser la causa de la existencia de estos ciclos, aunque generalmente hay convergencia de opiniones en cuanto a que se deberían fundamentalmente al exudado fitoplanctónico (Iturriaga, 1981; Riemann *et al.*, 1982; Moriarty y Pollard, 1982).

La excreción de material fotosintético de bajo peso molecular por el fitoplancton fue considerado fundamental por Bell y Kuparinen (1984). Larsson y Hagström (1982) consideraron que este exudado suplía el 50 % de los requerimientos de energía bacteriana. Es así como pueden apreciarse las diferencias cuando se trata de experiencias puntuales. Si el día se

presenta lluvioso o con sol radiante, los resultados pueden ser totalmente diferentes entre sí, tal como pasó en el muestreo semanal de mayo en el que circunstancialmente se pudo contar con días de características diferentes. Estas variaciones plantean al menos dos interrogantes: si la producción bacteriana es mayor de noche que de día, ¿cómo es posible que en un día nublado ésta sea menor a la de un día con luz óptima?; y en este caso, la luz ¿inhibe o estimula la producción bacteriana?. Esto puede tener la siguiente explicación: cuando el resultado procede de una sola experiencia, los nutrientes serán los que se encontraban en el agua al iniciar la experiencia más los que suma la actividad algal durante la incubación. En un muestreo horario los resultados dejan de ser puntuales, para responder a valores representativos del flujo de nutrientes de todo un sistema abierto, en el que las algas producen y las bacterias consumen este producto pero no al mismo tiempo. En resumen, tanto la materia orgánica disuelta como la particulada, excretadas o producidas a partir de algas, sufren en su utilización un desplazamiento espacial y temporal con respecto a su origen, pues en horas de la noche las bacterias siguen consumiendo lo producido durante el día. El aumento de la actividad bacteriana durante el día, se debería a la disponibilidad de lo no consumido en la noche sumado a lo último producido, sugiriendo de esta manera no un ciclo de día y noche arbitrariamente propuesto (ya que la influencia de la luz sobre las bacterias es totalmente indirecta), sino más bien a la disponibilidad de nutrientes y al número de bacterias activas en un momento determinado. Este razonamiento otorga importancia a la incubación con luz ambiente, pues de esta manera se interfiere menos en el ciclo comentado.

BIBLIOGRAFIA

- BELL, R.T. 1984. Thymidine incorporation rates and bacterioplankton dynamics during early spring in Lake Erken. *Arch. Hydrol. Beith. Ergebn. Limnol.* 19: 81-89.
- BELL, R.T., AHLGREN, G. M. & AHLGREN, I. 1983. Estimating bacterioplankton production by measuring (³H)thymidine incorporation in a eutrophic swedish lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1709-1721.
- BELL, R. T. & KUPARINEN, J. 1984. Assessing phytoplankton and bacterioplankton production during early spring in Lake Erken, Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1221-1230.
- DI SIERVI, M. A., MARIAZZI, A. A. y DONADELLI, J. L. 1995.a. Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico - Importancia de bacterias libres y adheridas. Este volumen.
- DI SIERVI, M. A., MARIAZZI, A. A. y DONADELLI, J. L. 1995.b. Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico - Variaciones espacio temporales y relaciones con la producción primaria. Este volumen
- DI SIERVI, M. A., MARIAZZI, A. A. y DONADELLI, J. L. 1995.c. Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico - Aspectos metodológicos. Este volumen.

- FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Marine Biology* 66: 109-120.
- HAGSTRÖM, A. 1984. Aquatic bacteria: Measurements and significance of growth. In: *Current perspectives in Microbial Ecology*. Ed.: M. J. Klug and C. A. Redd. American Society for Microbiology Washington D. C., p. 495-501.
- ITURRIAGA, R. 1981. Phytoplankton photoassimilated extracellular products, heterotrophic utilization in marine environments. *Kiel meersforsch. Sonderh.* 5: 318-324.
- LARSSON, V. & HAGSTRÖM, A. 1982. Fractionated phytoplankton primary production, exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Marine Biology* 47: 57-70.
- MORIARTY, D. J. W. & POLLARD, P. C. 1982. Diel variation of bacterial productivity in seagrass (*Zostera capricorni*) beds measured by rate of thymidine incorporation into DNA. *Marine Biology* 72: 165-173.
- MORIARTY, D. J. W., BOON, P. I., HANSEN, J. A., HUNT, W. G., POINER, I. R., POLLARD, P. C., SKYRING, G. W., & WHITE, D. C. 1985. Microbial biomass and productivity in seagrass beds. *Geomicrobiology Journal* 4: 21-51.
- RIEMANN, B. 1984. Determining growth of natural assemblages of freshwater bacteria by means of ³H-thymidine incorporation into DNA: Comments on methodology. *Arch. Hydrobiol. Beith. Ergebn. Limnol.* 19: 67-80.
- RIEMANN, B., FUHRMAN, J. & AZAM, F. 1982. Bacterial secondary production in freshwater measured by ³H-thymidine incorporation method. *Microb. Ecol.* 8: 101-114.
- RIEMANN, B. & SØNDERGAARD, M. 1984. Measurements of diel rates of bacterial secondary production in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 632-638.
- STEEMANN NIELSEN, E. 1952. The use of radioactive carbon (¹⁴C) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil* 18: 117-140.

MEDICION DE LA PRODUCCION BACTERIANA EN UN EMBALSE PATAGONICO. VARIACIONES ESPACIO TEMPORALES Y RELACIONES CON LA PRODUCCION PRIMARIA

MIGUEL A. DI SIERVI, ALDO A. MARIAZZI Y JORGE L. DONADELLI

*Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet", C.C. 712, 1900 La Plata, Argentina.
Contribución Nº 619.*

SUMMARY: Measurement of bacterial production in a Patagonian reservoir. Spatial and temporal variations and relationships with primary production.

The purpose of this work is the assessment of the relationships between bacterioplanktonic biomass and secondary production and biomass and primary production of the phytoplankton. The research was carried out at the Ezequiel Ramos Mexía reservoir, a 816 km² waterbody located in Neuquén province (Argentina). Similar trends were observed at the three sampling sites, with maximum values of bacterial production in coincidence with primary production peaks in the water column. Significant values of bacterial production also occurred in the aphotic zone. Maximum production rates were observed in summer, seasonal variations revealing a pattern similar to that of the primary production. Temperature seems to be an important regulator of this trend. The lack of correlation between bacterial numbers and their production rates suggests that in winter, when bacterial densities are highest and their production is lowest, most bacteria are in starvation or dormant stages.

KEY WORDS: Bacteria, algae, production, (³H)-thymidine, space-time variations.

RESUMEN: Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico. Variaciones espacio temporales y relaciones con la producción primaria.

El propósito básico de este trabajo es la evaluación de las relaciones entre la biomasa y producción secundaria del bacterioplancton y la biomasa y producción primaria del fitoplancton. La investigación se realizó en el embalse Ezequiel Ramos Mexía, un cuerpo de agua de 816 Km² localizado en la provincia de Neuquén (Argentina). Se observó un comportamiento similar en las tres estaciones de muestreo, con valores máximos de producción bacteriana en coincidencia con los de producción primaria en la columna de agua. También se registraron valores importantes de producción bacteriana en la zona afótica. Las tasas máximas se observaron en verano y las variaciones estacionales tuvieron igual comportamiento que las de la producción primaria. La temperatura parece ser un importante regulador de dichas variaciones. La falta de correlación entre el número de bacterias y su producción sugiere que los altos valores de bacterias en invierno, en coincidencia con una baja actividad, estarían asociados a estados de vida latente de gran parte de las bacterias.

PALABRAS CLAVE: Bacterias, algas, producción, (³H)-timidina, variaciones espacio temporales.

INTRODUCCION

Las bacterias han sido reconocidas como eslabones básicos de la cadena alimentaria (Sorokin, 1978; Pomeroy, 1974; Williams, 1981).

El fitoplancton puede proveer de materia orgánica a las bacterias directamente a través de la excreción o de la lisis de células muertas. Por otro lado, las bacterias proveen al fitoplancton de nutrientes que pueden ser suministrados en cantidades limitantes, siendo el crecimiento fitoplanctónico, en tales casos, directamente dependiente de la actividad bacteriana.

El flujo de energía en un ambiente acuático está representado en los múltiples circuitos de circulación entre los diferentes organismos que lo pueblan. Conocer todos estos caminos es una ardua tarea a la que están abocados muchos investigadores. Nuestro trabajo, desarrollado en el embalse Exequiel Ramos Mexía, tuvo como objetivo estimar la producción secundaria bacteriana y producción primaria algal a lo largo de un año, con el fin de efectuar un aporte al conocimiento de las complejas relaciones existentes entre bacterias y algas. La ubicación y características del embalse se describen detalladamente en Mariazzi *et al.* (1991).

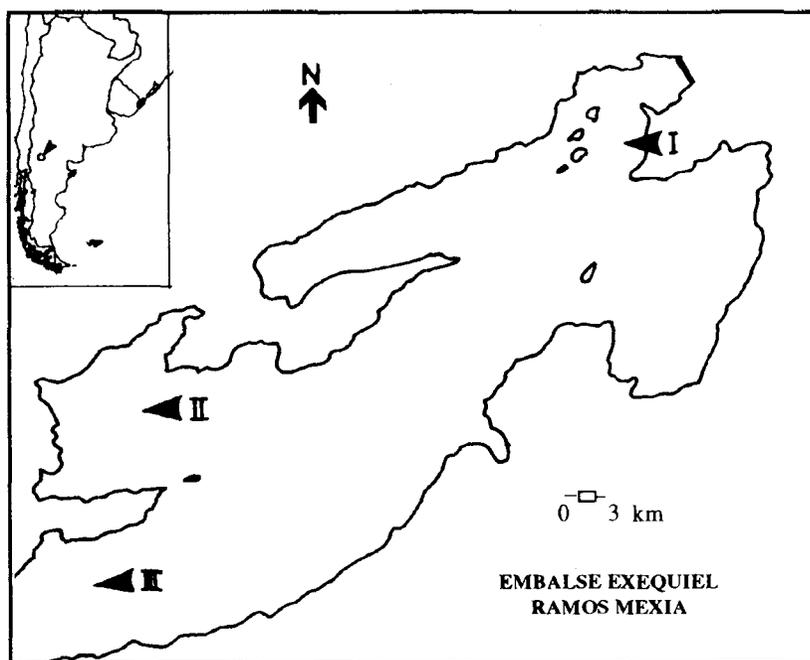


Fig. 1: Ubicación de las estaciones de muestreo en el embalse Exequiel Ramos Mexía

MATERIALES Y METODOS

Los muestreos fueron mensuales desde agosto de 1985 a agosto de 1986, y en tres estaciones (fig. 1). Se obtuvieron muestras de superficie, (1), (2,5), (5), (7,5), (10), (15), (20) metros y fondo (a un metro sobre el sedimento). Los relevamientos se efectuaron con una botella de tipo van Dorn y en particular para la clorofila, mediante un sistema de bombeo. La temperatura se midió directamente de la boca de bombeo con un termómetro. La clorofila se determinó según Lorenzen (1967). La producción primaria (PP) se midió *in situ* según Steemann Nielsen (1952). Dos botellas claras y una oscura por cada profundidad se inocularon con 4 mCi de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ y se incubaron por cuatro horas entre las 10 y las 14 hs. aproximadamente. Luego el agua se filtró por filtros de 0,45 μm . Los filtros se colocaron en viales, se secaron y se solubilizaron con 1 ml de acetato de etilo. Luego se agregaron 10 ml de un cóctel con base de tolueno y se midió la radiactividad en un espectrómetro Beckman LS-100, determinándose el quenching por el método de la relación de canales.

La producción secundaria bacteriana (PSB) se midió incubando por 4 horas al mediodía, siguiendo la metodología de Fuhrman y Azam (1982) con algunas modificaciones (Riemann, 1984). Las muestras de 50 ml, por duplicado, fueron inoculadas con 2,5 nM de (metil- ^3H)timidina, 50 - 80 Ci.mmol⁻¹ (New England Corp., Boston, Mass., USA). La producción bacteriana se detuvo por el agregado de formol (2% conc. final). Las muestras se filtraron por filtros de 0,2 μm y se procesaron de la misma forma que para la producción primaria. Las lecturas de radiactividad fueron corregidas con una curva de "quenching" realizada con estándares de tolueno tritiado, calculándose la eficiencia con lecturas del estándar externo.

Los moles de (^3H)-timidina incorporados fueron calculados por la fórmula:

$$\text{moles} = (\text{des/min})/(\text{AS}) \times 4,5 \times 10^{-13}$$

donde *des/min* son las desintegraciones por minuto sobre el filtro, *AS* es la actividad específica de la solución de timidina en Ci/mmol y $4,5 \times 10^{-13}$, el número de curies por des/min.

La producción bacteriana fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación (Bell *et al.*, 1983):

$\text{mgC} \cdot \text{h}^{-1} : \text{nmoles de } (^3\text{H})\text{timidina en el extracto insoluble en ácido tricloroacético} \times \text{factor de conversión (cel/nmol)} \times \text{carbono celular promedio} \times 60 / \text{tiempo de incubación (minutos)}$.

La producción bacteriana fue calculada como un rango establecido por el uso de dos factores de conversión 2×10^9 - $1,08 \times 10^{10}$ cel.nmol⁻¹ para los meses de temperaturas menores a 13 °C y $1,08 \times 10^{10}$ - $3,3 \times 10^{10}$ cél.nmol⁻¹ para los meses cálidos (noviembre a abril), (Di Siervi, M. *et al.*, 1995).

Las bacterias se cuantificaron y se estimaron los volúmenes por el método de

microscopía de epifluorescencia con naranja de acridina (Hobbie *et al.*, 1977). La biomasa se calculó multiplicando el volumen medio de cada muestra por el factor $1,21 \times 10^{-13}$ grC. μm^{-3} (Watson *et al.*, 1977).

RESULTADOS

A partir de los meses fríos y hasta el verano, hubo aumentos graduales de la producción primaria (PP) y también de la secundaria bacteriana (PSB). A partir de noviembre, los registros de PP fueron irregulares aunque se apreció un marcado aumento de la misma cuando la temperatura superó los 13 °C. En diciembre, la PSB aumentó desde superficie hasta los 5 metros, disminuyendo luego hasta los 10 metros, tal como ocurrió con la producción algal. De enero a abril hubo una estrecha relación entre ambas producciones. En mayo y junio la producción primaria disminuyó en forma muy marcada, siendo también muy baja la PSB en la zona fótica. En julio y agosto hay un leve aumento de ambas producciones. La temperatura media anual fue de 13,4 °C, con una máxima en enero de 20 °C en superficie. La mínima se registró en junio y julio con 6 °C.

La PP tuvo sus máximos valores a los 2,5 y 5 metros y el comportamiento de la PSB fue similar para la zona fótica, con altos valores a los 5 metros y en la zona cercana al límite de transparencia. Es decir, hay un desfase vertical con respecto a la PP, encontrándose también valores importantes en la zona afótica, lo que indicaría la presencia de procesos de activa descomposición orgánica en los estratos más profundos (Fig. 2).

En las tres estaciones de muestreo observamos que la PP fue acompañada por un ciclo anual de PSB de comportamiento bastante similar, con una baja producción invernal y con máximos valores en los meses cálidos, en los que la temperatura promedio estuvo alrededor de los 17-18 °C.

La PP estuvo entre 1 y 173 mgC. $\text{m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Si bien las tasas de producción bacteriana se estimaron a partir de dos factores de conversión, cuyo resultado final es un rango, la PSB osciló entre valores promedios de 1 y 54 mgC. $\text{m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ en las distintas estaciones (Fig. 3). El porcentaje de PSB respecto de la PP tomada como 100 % estuvo entre un máximo de 45 % en enero y mínimos cercanos a 2 % en mayo y junio.

Las tasas de crecimiento y producción bacterianas son mayores en períodos de mayor temperatura. Prueba de ello fueron las tasas de crecimiento instantáneo calculadas, de 100 horas para julio, cuando la temperatura fue de 6 °C y de solamente 11 horas en diciembre, con temperaturas cercanas a 20 °C.

Resultó llamativo un comportamiento opuesto entre el número de bacterias y su producción. En la estación I se registraron dos picos máximos precisamente en los meses en los que la PSB fue menor. Esto no representaría un hecho casual, ya que los mismos resultados se apreciaron en las demás estaciones (Fig. 4). Algo similar ocurrió entre PP y clorofila. Por

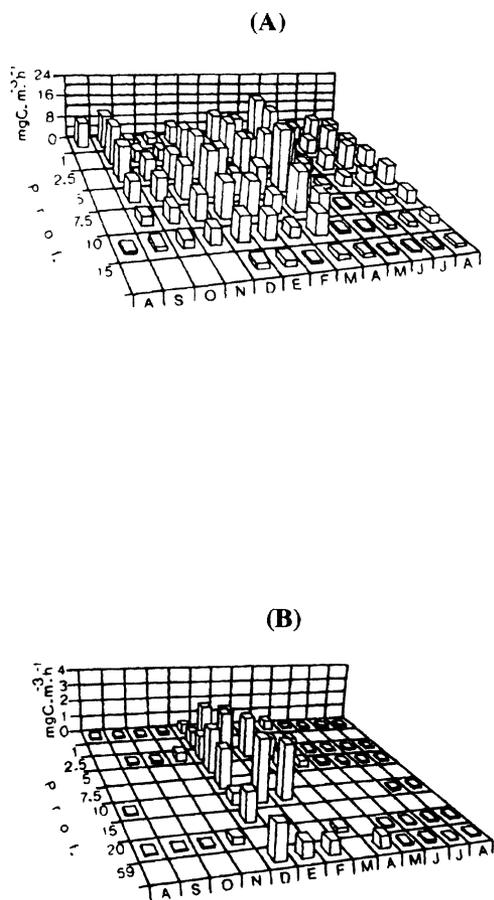


Fig. 2: Perfiles verticales de la producción primaria (A) y producción secundaria bacteriana (valores promedio del rango, B) en la estación I, desde agosto de 1985 a agosto de 1986.

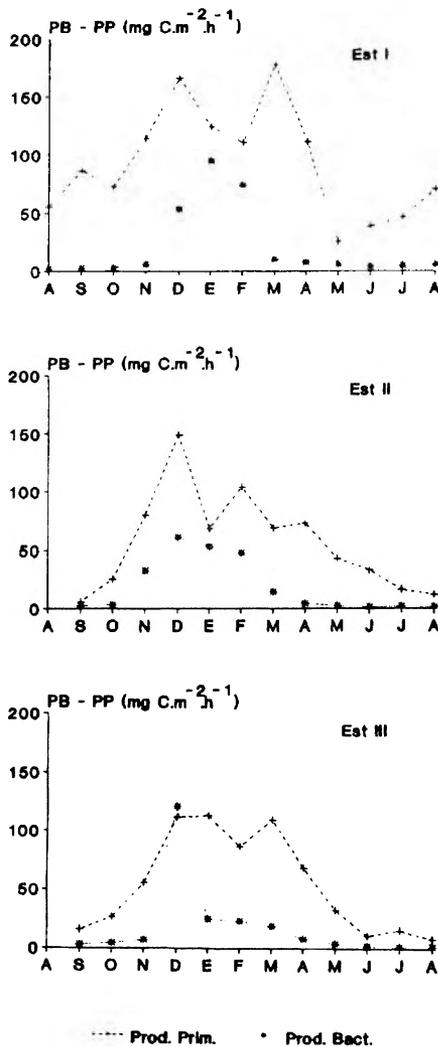
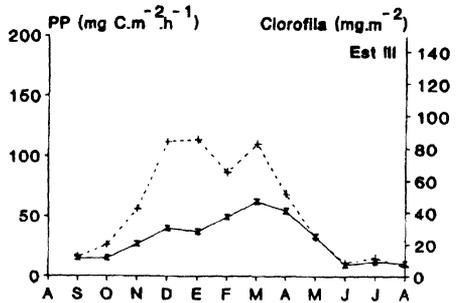
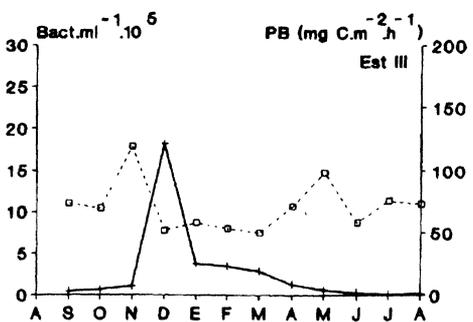
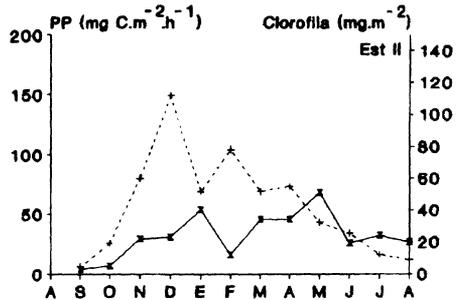
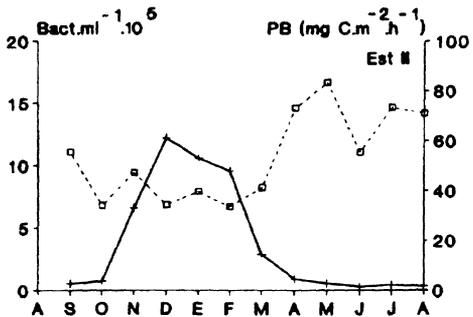
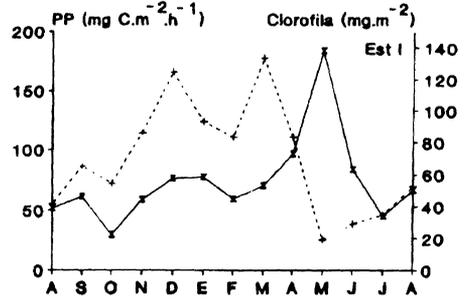
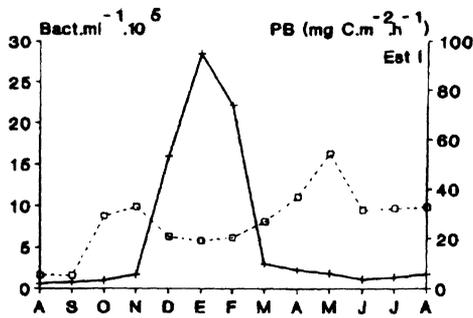


Fig. 3: Valores de producción primaria y producción secundaria bacteriana (promedio del rango), registrados en las estaciones I, II y III.



— Prod. Bact. - - - Bacterias totales

- - - Prod. Prim. — Clorofila

Fig. 4: Valores de producción secundaria bacteriana (valores promedio del rango) y número de bacterias totales (promedio de la columna de agua) registrados en las estaciones I, II y III.

Fig. 5: Valores de producción primaria y clorofila registrados en las estaciones I, II y III.

ejemplo, en la estación III la producción primaria fue mayor en los meses de verano, mientras que la cantidad de clorofila fue notoriamente alta en marzo, abril y mayo (Fig. 5).

DISCUSION

Durante el año de trabajo, pudieron reconocerse tres subperíodos en la producción bacteriana, el primero de baja actividad; el segundo, de índices máximos en los meses de verano y el tercero, con una producción que retornó a valores muy bajos. También en profundidad, mensualmente se apreciaron notables diferencias verticales.

Las bacterias son capaces de crecer rápidamente en aguas libres de partículas, a expensas de materia orgánica disuelta (Ammerman *et al.*, 1984), la cual provendría originalmente del fitoplancton (Ducklow & Kirchman, 1983). Los nutrientes pueden llegar al medio no sólo por lisis celular sino que su concentración está ligada a la excreción de materia orgánica durante la fotosíntesis. Aunque las bacterias difieren en el grado de dependencia a los exudados algales, muchos autores consideran al crecimiento bacteriano entre el 10 y el 80 % (Larsson & Hagström, 1982; Riemann, 1983; Bell *et al.*, 1983; Bell & Kuparinen, 1984). De este modo también en el embalse Ramos Mexía, el fitoplancton sería el generador de la materia orgánica necesaria para el crecimiento y producción bacterianos, lo cual fue comprobado por la evidente relación entre PP y PSB, mucho más manifiesta ante el aumento de la temperatura. Si se considera una eficiencia bacteriana del 60 % (Calow, 1977), el porcentaje de la producción algal que se necesitaría para sostener la producción de las bacterias sería mucho mayor a los indicados. En enero sería del 76 %, con un mínimo cercano al 4 % en época invernal. Además de lo excretado por el fitoplancton, habría otros procesos que son importantes en el aporte de materia orgánica disuelta utilizable por las bacterias y no considerados, pero que explicarían un porcentaje aún mayor. Además, dado que la PP está limitada al período de luz solar, mientras que las bacterias producen durante las 24 horas, estos porcentajes superarían olgadamente el 100 % de la producción primaria, especialmente en la época estival.

En los sedimentos habría una considerable producción bacteriana. En condiciones de calma, debido a la sedimentación de materia orgánica y bacterias, aumenta la producción en el fondo, pero este material vuelve a la columna de agua debido a la turbulencia inducida por los vientos (Moriarty *et al.*, 1985b). Es por esta causa que la interfase agua sedimento sea una región de intensa actividad, en la que se efectuaría la mayor actividad heterotrófica (Novitsky, 1983). Esto explicaría el aumento aquí registrado de la PSB en las zonas más profundas del lago, con picos por debajo de los 15 metros en la estación I y una importante y regular producción cercana al fondo en las estaciones II y III.

Muchas veces los datos de actividad bacteriana o algal son utilizados con ligereza para justificar la ubicación de un ambiente determinado en alguna categoría trófica. En Bell *et al.* (1983) se efectúa una revisión de los distintos valores de producción calculados por varios

autores y con distintos métodos. Los datos calculados en el Embalse Ramos Mexía son semejantes a los indicados para lagos eutróficos, mientras que en base a una serie de variables, fue caracterizado como oligo mesotrófico por Mariazzi *et al.* (1991).

El clásico modelo de crecimiento bacteriano en un cultivo, comienza con un crecimiento logarítmico sigue luego exponencial, estacionario y finalmente declinante. Pero en ambientes naturales la situación es más compleja, con bacterias en diversos estados de crecimiento al mismo tiempo. El cambio anual y paralelo de la tasa de producción bacteriana y el ciclo de crecimiento algal, sugirieron que la población bacteriana en el embalse dependía principalmente de la producción primaria como un recurso accesible y continuo de nutrientes. Para la utilización de tales recursos, la bacteria no sólo debe estar en el sistema sino que debe ser activa. Con los conteos directos se obtiene sólo el número de bacterias, pero sin llegar a conocer su estado fisiológico. El gran número de pequeñas células presentes en las muestras de invierno, indicarían que no todas son activas y que están en un estado de latencia (Morita, 1983). Novitsky (1983) consideró que el incremento de la actividad bacteriana es debido a un gran número de bacterias activas, en un grado mayor que a un alto porcentaje de células activas o al aumento de la actividad celular. En nuestro estudio se observó un aumento de producción ligado a un aumento de la temperatura, lo que estaría dado por un aumento del porcentaje de células activas debido a un menor número de bacterias totales y una mayor biomasa por aumento del volumen de los individuos productivos (Mariazzi *et al.*, en prensa). Quizás pueda justificarse en forma semejante la discrepancia observada entre PP y clorofila, como también que, a una temperatura adecuada, exista una estrecha relación entre presencia y actividad de algas y bacterias.

Teniendo en cuenta que la PSB es cuantitativamente importante, se confirma una vez más que el bacterioplancton actúa como un eslabón fundamental en la cadena alimentaria. Su producción se desarrolla principalmente a expensas de materia orgánica disuelta. Este material, aún en muy baja concentración en las aguas, tras ser convertido en partículas nutricionales es reciclado en la cadena trófica. Pero no se puede considerar un modelo que se construya sólo en base a las producciones de algas y bacterias y a la temperatura, pues sería una simplificación que desprendería las seguramente numerosas e importantes variables que puedan actuar al mismo tiempo. Hay muchos organismos que consumen bacterioplancton, lo que establecería una cadena entre materia orgánica disuelta y bacterioplancton y entre bacterias y zooplancton. Los caminos entre estos eslabones son probablemente complejos y se necesitarán estudios específicos de cada uno de ellos para su total comprensión.

BIBLIOGRAFIA

- AMMERMAN, J. W., FUHRMAN, J. A., HAGSTRÖM, A. & AZAM, F. 1984. Bacterioplancton growth in seawater: I. growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 18: 31-39.

- BELL, R. T. & KUPARINEN, J. 1984. Assessing phytoplankton and bacterioplankton production during early spring in Lake Erken, Sweden. *Appl. Environ. Microbio.* 48: 1221-1230.
- BELL, R. T., AHLGREN, G. M. & AHLGREN, I. 1983. Estimating bacterioplankton production by measuring (³H)thymidine incorporation in a eutrophic swedish lake. *Appl. Environ. Microbio.* 45: 1709-1721.
- CALOW, p. 1977. Conversion efficiencies in heterotrophic organisms. *Biol. Rev.* 52: 385-409.
- DI SIERVI, M. A., MARIAZZI, A. A. y DONADELLI, J. L. 1995.c. Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico - Aspectos metodológicos. Este volumen.
- DUCKLOW, H. W. & KIRCHMAN, D. L. 1983. Bacterial dynamics and distribution during a spring diatom bloom in the Hudson River PLume, U.S.A. *J. Plankton Res.* 5: 333-355.
- FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure if heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120.
- HOBBIE, J. E., DALEY, R. J. & JASPER, S. 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbio.* 33: 1225-1228.
- LARSSON, V. & HAGSTRÖM, A. 1982. Fractionated phytoplankton primary production, exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Marine Biology* 47: 57-70.
- LORENZEN, C. J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigments: Spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343-346.
- MARIAZZI, A. A., CONZONNO, V. H., ECHENIQUE, R & LABOLLITA, H. A. 1991. Physical and chemical characters, phytoplankton and primary production of Ezequiel Ramos Mexía Reservoir (Argentina). *Hydrobiologia* 209: 107-116.
- MARIAZZI, A. A., DI SIERVI M. A. & DONADELLI J. L. 1995. Annual cycle of bacterial numbers, biovolumes and productivities in the Ezequiel Ramos Mexía reservoir (Río Negro, Argentina). En Prensa, *Invernat. Verein.Limnol.*
- MORIARTY, D. J. W., BOON, P. I., HANSEN, J. A., HUNT, W. G., POINER, I. R., POLLARD, P. C., SKYRING, G. W. & WHITE, D. C. 1985. Microbial biomass and productivity in seagrass beds. *Geomicrobiol. J.* 4: 21-51.
- MORITA, R. T. 1983. Starvation of heterotrophs in the marine environments. *Adv. Microb. Ecol.* 6: 171-198
- NOVITSKY, J. A. 1983. Heterotrophic activity throughout a vertical profile of seawater in sediment in halifax harbor, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1753-1760.
- POMEROY, L. R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience* 24: 499-504.
- RIEMANN, B. 1983. Biomass and production of phyto- and bacterioplankton in eutrophic lake Tystrup, Denmark. *Freshwat. Biol.* 13: 389-398.
- RIEMANN, B. 1984. Determining growth of natural assemblages of freshwater bacteria by means of ³H-thymidine incorporation into DNA: Comments on methodology. *Arch. Hydrobiol.*

Beith. Ergebn. Limnol. 19: 67-80.

- SOROKIN, Y. I. 1978. Decomposition of organic matter and nutrient regeneration. In: *Mar. Ecol.*, vol. IV. Ed.: O. Kinne. Willy Interscience, Chichester, p. 501-616.
- STEEMANN NIELSEN, E. 1952. The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. *J. Conseil* 18: 117-140.
- WATSON, S. W., NOVITSKY, T. J., QUINBY, H. L. & VALOIS, F. W. 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 940-947.
- WILLIAMS, P. J. 1981. Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* 5: 1-28.

INSTITUTO DE LIMNOLOGÍA "Dr. Raúl A. Ringuelet"

BIOLOGIA ACUATICA

ISSN 0326-1638

Director

Andrés Boltovskoy

Secretaria de Redacción

Adriana A. Aquino

Diseño y Composición Láser

Claudio della Croce

Los pedidos deben ser enviados a:

Adriana A. Aquino
Instituto de Limnología " Dr. Raúl A. Ringuelet"
Casilla de Correo 712, (1900) La Plata, Argentina
Tel: 54 1 237-5864 Fax: 54 1 237-7799



INSTITUTO DE LIMNOLOGÍA "Dr. R. A. Ringuelet"



CCT - La Plata

Ricardo H. Albino
ILPLA-Biblioteca
(CCT La Plata-CONICET) - UNLP
Av. Calchaquí Km 23,5
1888-Florencio Varela
Prov. Bs. As., Argentina

Tel: +54-(011)4275-8564 - Interno 44

+54-(011)4275-7799 - Fax: Interno 31

e-mail: bibliote@ilpla.edu.ar

e-mail alternativo: gudea2001@yahoo.com

URL - <http://www.ilpla.edu.ar>