

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

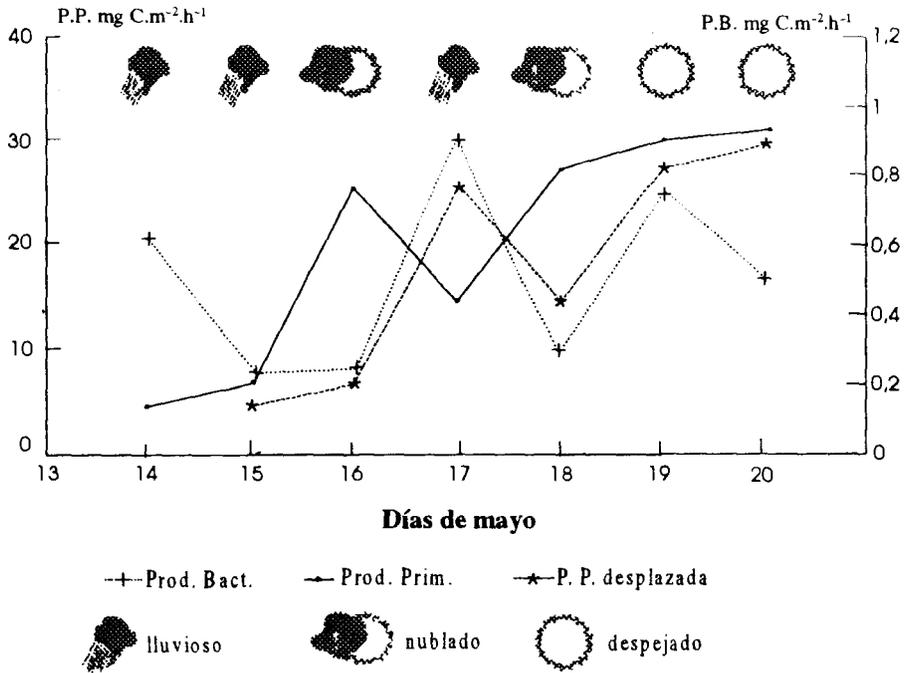


Fig. 1: Producción primaria algal y producción secundaria bacteriana por m² (valor medio del rango calculado), correspondientes a los muestreos diarios realizados al mediodía, en la semana del 14/5 al 21/5.

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

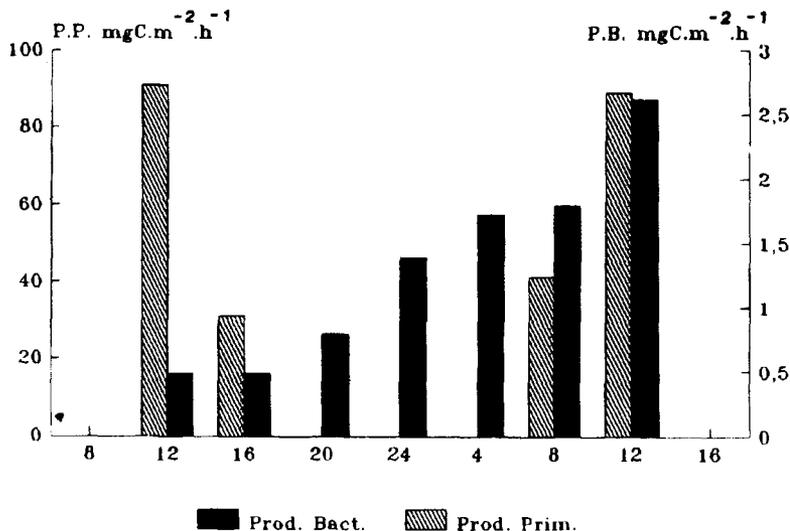


Fig. 2: Producción primaria algal y producción secundaria bacteriana expresada en m^2 (valor medio del rango calculado), correspondientes a los muestreos horarios realizados entre las 12,00 hs. del 12/4 y las 12,00 hs. del 13/4.

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.

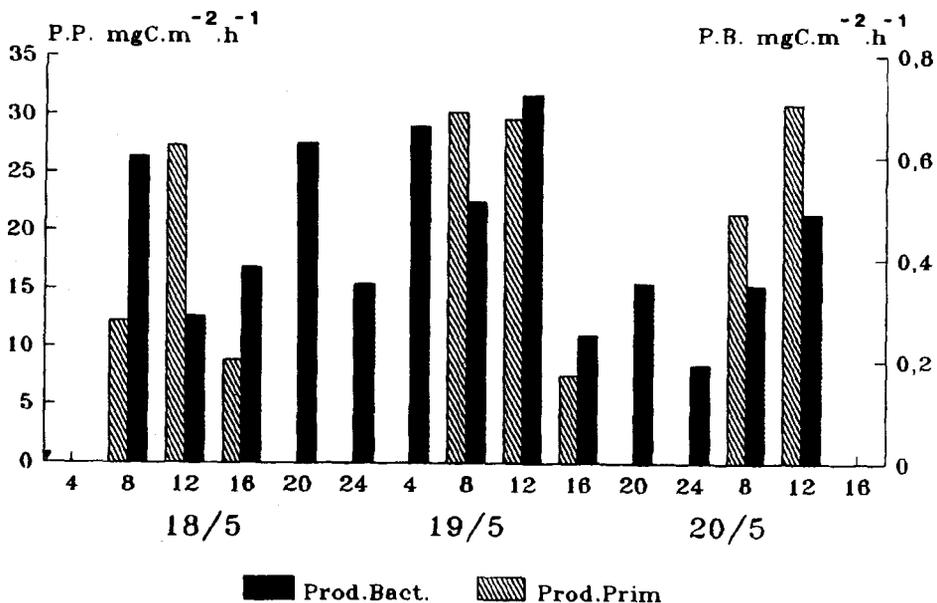


Fig. 3: Producción primaria algal y producción secundaria bacteriana expresada en m^2 (valor medio del rango calculado), correspondientes a los muestreos horarios realizados entre las 8,00 hs. del 18/5 y las 12,00 hs. del 20/5.

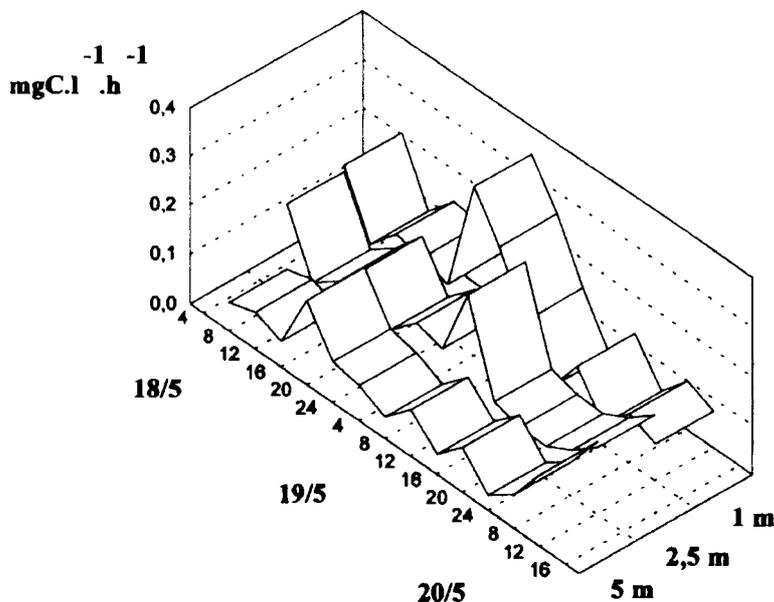


Fig. 4: Producción secundaria bacteriana (valor medio del rango calculado), en tres profundidades (1 m; 2,5 m y 5 m) según muestreos realizados cada cuatro horas desde las 8,00 hs. del 18/5 a las 12,00 hs. del 20/5. Para los valores de producción primaria, ver texto.

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.