

## 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-<sup>3</sup>H)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-<sup>3</sup>H)-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.

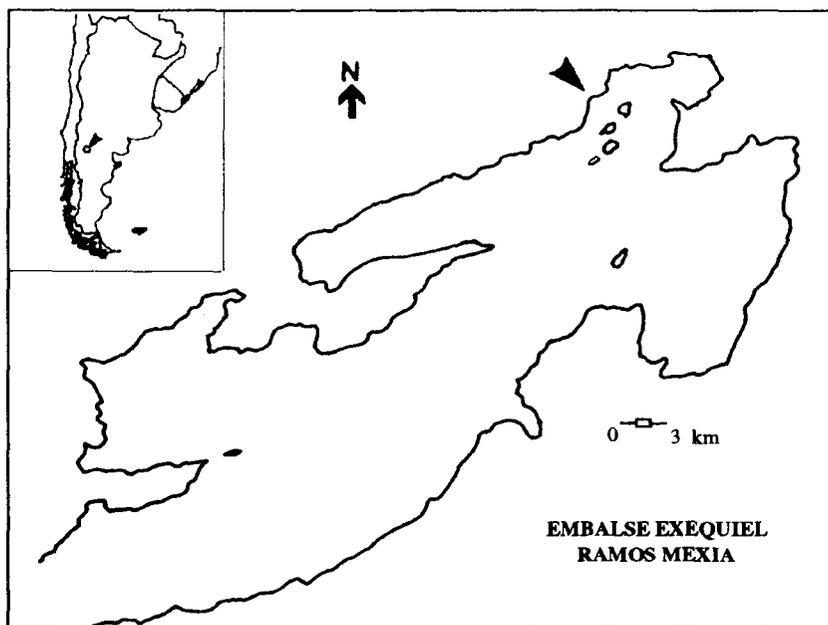
### Descripción del área de estudio

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  $\mu\text{m}$ ). Las muestras por triplicado (más un blanco fijado con formol 2% conc. final) se inocularon con metil- $^3\text{H}$ -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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  por una de 48  $\mu\text{m}$ , la concentración de  $^3\text{H}$ -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  $^3\text{H}$ -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  $\mu\text{m}$  de poro. Luego fueron todas nuevamente filtradas por filtros Sartorius de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. Se usaron también en forma paralela en una muestra total, filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  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  $^3\text{H}$ -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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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  $^3\text{H}$ -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  $\mu\text{m}$  de poro o por filtros Nuclepore de 3 y 1  $\mu\text{m}$ . 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  $\mu\text{m}$  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  $^3\text{H}$ -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  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ . 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  $\mu\text{m}$ ), 79% para la filtrada por 60  $\mu\text{m}$ , 63% en la filtrada por 30  $\mu\text{m}$  y 50% en la de 10  $\mu\text{m}$  (Tabla I).

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

En la experiencia C, a diferencia de las anteriores, la muestra se incubó con  $^3\text{H}$ -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  $\mu\text{m}$ . Por sustracción se establece que entre 12 y 5

$\mu\text{m}$  habría sólo 5% de actividad, ya que un 71% se comprobó en la submuestra filtrada por poros de 5  $\mu\text{m}$ . Para la filtrada por 0,8  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$  y 0,45  $\mu\text{m}$  de poro respectivamente. Se pudo comprobar que la retención en el filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  es de sólo el 80% de lo retenido en el de 0,22  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  de poro, la actividad fue del 93 y 90%, respectivamente. Para aquella muestra de agua libre de partículas mayores de 3  $\mu\text{m}$ , la actividad alcanzó al 89% y un 75% se registró en el agua que pasó a través de poros de 1  $\mu\text{m}$  (Tabla I).

Diámetro de poro ( $\mu\text{m}$ )		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  $\mu\text{m}$  (experiencias A y B), con relación a aquella filtrada por 60 y 48  $\mu\text{m}$ , podría ser atribuida a la predación ejercida por el zooplancton. Al filtrarse a través de la red de 120  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{m}$ , juntamente con el de la experiencia C en la que más del 75% era obtenido en la porción de 5  $\mu\text{m}$  (43% en la menor de 0,8  $\mu\text{m}$ ), y los ensayos D y E con 78% y 75% respectivamente en la fracción menor de 1  $\mu\text{m}$ , 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 <sup>3</sup>H-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 <sup>3</sup>H-thymidine incorporation method. *Microb. Ecol.* 8: 101-114.