

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 Ci.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 microscopia 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.