

ASPECTOS ECOLOGICOS DE LAS MUESTRAS DE AGUA ALMACENADAS *

Federico Emiliani, Maria Ofelia García de
Emiliani y Miguel C. Vassallo
Instituto Nacional de Limnología
J. Maciá 1933 ,3016 Sto. Tomé, Sta. Fe
Argentina

R E S U M E N

Se determinaron significativas fluctuaciones en el número y en la estructura de las poblaciones bacteriana y algal en muestras de agua conservadas bajo diferentes condiciones experimentales. Se comprobó, además, que la supresión del desarrollo algal favorece el ritmo de crecimiento saprófito y que el frío aumenta la concentración de ortofosfatos solubles por la desintegración celular y por el menor consumo bacteriano.

S U M M A R Y

Ecological aspects of stored water samples.

Significant fluctuations were observed in both number and structure of bacterial and algal population in natural water samples stored at different experimental conditions. Suppression of algal growth increased saprophytic development while could conservation cause up-building of soluble o-phosphates due cells desintegration and low bacterial uptake.

INTRODUCCION

En una nota anterior (Emiliani, 1976) habíamos demostrado la importancia que reviste el tiempo transcurrido desde la extracción de las muestras hasta la iniciación de los análisis, sobre los resultados de los recuentos en placas de las bacterias saprófitas, cuando

* Trabajo presentado en la Reunión de Comunicaciones Científicas del 29/X/77.

se mantenía la muestra a una temperatura constante e igual a la del ambiente de donde se la extrajo. Otra variable importante, no analizada anteriormente, consiste en conservar la muestra refrigerada hasta el momento de su análisis, procedimiento comúnmente empleado por diversos investigadores. Una segunda variable es la temperatura a la que posteriormente se incuban las cajas de Petri sembradas con tal muestra.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue, en consecuencia, apreciar los efectos de diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento de la muestra sobre su contenido bacteriano; esto último determinado luego de un período de incubación a temperaturas también diferentes. Otro objetivo fue tratar de apreciar algunas de las causas de esos posibles efectos, analizando, paralelamente, las fluctuaciones de otros componentes de tal microecosistema.

Los antecedentes bacteriológicos registrados sobre el tema desde 1894 a 1974 ya fueron dados a conocer en un trabajo anterior (Emiliani, 1976) y, sobre las fluctuaciones de los ortofosfatos en muestras almacenadas, podemos citar a Heron (1962) y Margalef (1974).

MATERIAL Y METODOS

Las muestras fueron extraídas del río Correntoso, frente a la laguna "Los Matadores" (Sta. Fe, Arg.); sus características físicas y químicas pueden consultarse en el trabajo de Schiaffino (1977). Debido a la proximidad del río con nuestro laboratorio, el tiempo transcurrido desde la extracción de la muestra hasta el inicio de los análisis no fue mayor de 15 minutos.

Algunas muestras fueron almacenadas en la oscuridad a temperatura ambiente (alrededor de los 23°C) y en un refrigerador a 4°C y las restantes, bajo una fuente de luz ("Growth lux", Microferm Fermentor, NBS). De todas ellas se tomaron alicotadas a diferentes intervalos de tiempo a fin de realizar los recuentos de bacterias y de algas y para estimar la concentración de ortofosfatos solubles.

Los recuentos de bacterias se realizaron empleando el PCA ("Plate Count Agar", Oxoid, 1971) e incubando durante 14 días a 22°C, pero realizando lecturas periódicas por las razones expuestas en un trabajo anterior (Emiliani, 1976 b). Los recuentos de algas se efectuaron siguiendo la técnica de Utermöhl (1958) y las determinaciones de ortofosfato según el método de Murphy y Riley (En: Strickland y Parson, 1968), inmediatamente después de cada muestreo.

Los cambios que produce la refrigeración prolongada de las muestras en los grupos de bacterias capaces de desarrollarse a 4, 22 y 35°C se determinaron en muestras provenientes de un segundo muestreo realizado en el mismo río. Estas muestras se utilizaron también para detectar si se producía un cambio en los índices de contaminación usados más frecuentemente en limnología sanitaria, es decir el número más probable de bacterias

fecales y la relación: n°C 22/n°C 35 (donde n°C es el número de colonias desarrolladas a las temperaturas indicadas a continuación). La colimetría se realizó siguiendo las técnicas sugeridas por Clark y Kable (1964).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se puede apreciar el rápido incremento del número de bacterias en las muestras mantenidas a temperatura ambiente y en la oscuridad después de sólo 3 horas de almacenamiento. En el mismo gráfico resulta también evidente el efecto estimulante de la supresión del desarrollo algal, es decir que por lo menos parte de ese incremento se debería a que almacenando las muestras en la oscuridad se elimina el antagonismo algal. Para confirmar tal supresión se realizaron recuentos de algas en muestras iluminadas, comprobándose un aumento de cuatro veces el número de la población algal mientras que, en las muestras mantenidas en la oscuridad, el número se mantuvo estadísticamente igual. Pero por lo menos hasta las diez horas de almacenamiento, no se observaron células algales desintegradas por lo tanto, otra causa del aumento registrado en el número de bacterias saprófitas muy probablemente se deba a la preexistencia de materia orgánica muerta, particulada o soluble, en la muestra.

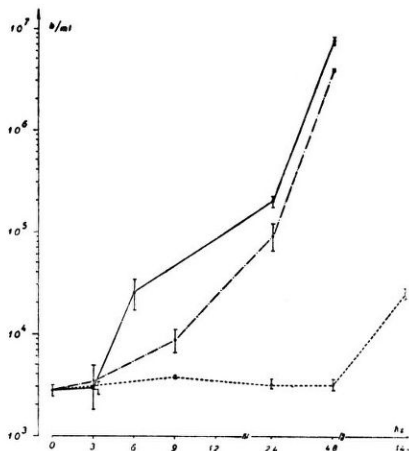


Fig. 1. Número de colonias por mililitro (b/m³) desarrolladas en cajas de Petri sembradas con muestras de agua almacenada en la oscuridad (a 22°C = línea continua y a 4°C = línea de trazos) y bajo una fuente de luz (línea de rayas y puntos), en función del tiempo (en horas). Las barras indican los límites de confianza de cada recuento.

A través de los análisis de ortofosfatos (figura 2) se pudo comprobar que durante las primeras horas de conservación se acentúan los procesos de mineralización, pues, como señalara Margalef (1974), la liberación de fosfatos de la materia orgánica muerta es "rapidísima". Esta aseveración también la comprobamos en la muestra iluminada debido a que la materia orgánica que ceden las algas contiene fosfatos en "cantidad notable" que se separa pronto en esta forma (Margalef, 1974). Nuestros análisis determinaron que este proceso se inicia antes de las 3 horas de almacenamiento. En este mismo ensayo, los resultados indican que después de las 9 horas se aceleran los procesos de inmovilización, principalmente en la muestra iluminada donde, al notable desarrollo bacteriano, se le suma un creciente número de algas, después de superar un período de competencia interespecífica y de adaptación al nuevo ambiente. Nuevo ambiente que, evidentemente resultó favorable para la mayor parte de las algas (como se puede ver en la figura 2) y que nos permite suponer de que difícilmente la muestra original poseía nutrientes en una concentración tal que fueran limitantes para su desarrollo y de que más bien los factores limitantes en su ambiente natural eran de orden físico (turbulencia, penetración lumínica, etc.), totalmente alterados en nuestras condiciones experimentales.

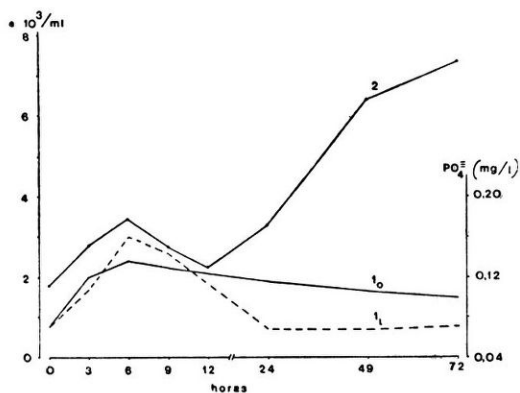


Fig. 2. Número de algas x 10³/ml (línea 2) desarrolladas en muestras de agua almacenadas (a 22°C) bajo una fuente de luz y fluctuaciones de la concentración de ortofosfatos solubles en las mismas muestras de agua conservadas en la oscuridad (1₀) y bajo una fuente de luz (1₁), a igual temperatura.

Las algas que experimentaron las mayores fluctuaciones fueron: *Crucigenia quadrata* y *Synura uvella* (cuya concentración final fue 30 veces superior), *Trachelomonas atomaria* (aumentó 10 veces entre las 24 y 48 hs.), *Chroomonas* spp. (duplica su concentración entre las 3 y 6 horas; a las 49 hs. cuadruplica su valor inicial). *Chlamydomonas* spp. (triplica su concentración inicial a las 6 hs. y la mantiene hasta el final) y *Cryptomonas* spp. (que duplica, después de 6 hs. su concentración inicial para luego disminuir y volver a alcanzar, ese aumento, a las 49 hs. A las 72 hs., esta especie, vuelve a declinar numéricamente hasta su valor inicial). Por otra parte, el número total de especies aumenta hasta las 6 horas (de 22 a 27) y luego varía hasta llegar a un valor final de 24 especies.

En las muestras conservadas en la oscuridad, a temperatura ambiente y en refrigerador, se observó que la estructura de la dominancia no varió fundamentalmente con respecto a la muestra original, pero el número de especies halladas disminuyó de 22 a 14 (temperatura ambiente) y a 10 (en refrigerador).

El número de células algales, en las muestras conservadas en refrigerador, disminuyó hasta llegar a la tercera parte del número originario, mientras que los ortofosfatos aumentaron 3,4 veces su concentración inicial, lo que nos permite presentar la hipótesis de la existencia de una relación causa-efecto. En estas muestras, entonces, era de esperar el máximo incremento de ortofosfatos (0,246 ppm) debido a la lisis de las células algales, comprobada al microscopio, y a la disminución del consumo por parte de una población microbiana numéricamente inferior con respecto a la existente en las muestras no mantenidas en refrigerador.

Los resultados obtenidos conservando la muestra refrigerada durante diferentes períodos de tiempo, pero realizando los recuentos de colonias luego de haber incubado los medios de cultivo a 4°C, 22°C y 35°C se transcriben en los cuadros 1 y 2.

Cuadro nº 1. Número de colonias (por ml) desarrolladas en cajas de Petri con PCA, según la temperatura de incubación y el tiempo de almacenamiento (a 4°C) de la muestra.

Tiempos (horas)	Temperaturas			Indices (nºb 22/35)
	4°C	22°C	35°C	
0	145	4760	700	7/1
24	214	4420	790	6/1
72	722	7410	730	10/1
144	44600	303000	872	300/1

Cuadro n° 2. Número más probable de bacterias por 100 ml (NMP/100) según el medio de cultivo Lauryl Tryptose Broth (LTB), Brilliant Green Bile 2 % (BGB) y EC Medium (EC); los dos primeros incubados a 35°C y el último a 44°C, en función del tiempo de almacenamiento de la muestra de agua mantenida a 4°C.

Tiempos (horas)	N M P / 100 (95 % límite de confianza)		
	L T B	B G B	E C
0	3500 (1200-10000)	350 (120-1000)	110 (31-250)
24	3500 (1200-10000)	700 (230-1700)	210 (70-630)
72	350 (120 -1000)	340 (120- 930)	280 (90-850)
144	1600 (640 -5800)	920 (300-3200)	90 (20-210)

En el primero resalta que la refrigeración no paraliza el desarrollo de las bacterias pues constantemente se va incrementando el número capaz de multiplicarse a la misma temperatura del refrigerador, donde se almacenó la muestra. Después de las 24 horas se comprobó, una vez más, el aumento del número de bacterias capaces de desarrollarse a 22°C, mientras que el de aquellas que lo hacen a 35°C se mantuvo relativamente constante, lo que provocó un cambio notable en el índice de contaminación. En los ensayos comúnmente empleados en colimetría (cuadro n° 2) se registraron fluctuaciones importantes e impredecibles. Estos resultados conjuntamente con los anteriores y teniendo en cuenta aquéllos obtenidos por Geldreich (1971) y Geldreich *et al.* (1972), demuestran la necesidad de analizar la muestra de agua inmediatamente después de haberla extraída de su ambiente natural.

B I B L I O G R A F I A

- Clark, H. F. y P. W. Kabler. 1964. The physiology of the coliform group (p. 202-229). En: Heukelekian y Dondero (Eds.) - "Princip'es and applications in aquatic microbiology". Wiley, New York (452 p.).
- Emiliani, F. 1976. Influencia de factores metodológicos sobre el recuento de bacterias acuáticas (I nota). *Rev. lat-amer. Microbiol.*, 18: 201-207.
- Emiliani, F. 1976 b. Influencia de factores metodológicos sobre el recuento de bacterias acuáticas (II nota). *Rev. lat-amer. Microbiol.*, 18: 209-215.
- Geldreich, E. E. 1971. Application of bacteriological data in potable water surveillance. *Jour. AWWA*, 64 (4): 225-229.
- Ge'dreich, E. E.; H. D. Nash; D. J. Reasoner y R. H. Taylor. 1972. The necessity of controlling bacterial populations in potable waters: community water supply. *Jour. AWWA*, 64 (9): 596-602.
- Heron, J. 1962. Determination of phosphate in water after storage in polyethylene. *Limnol. Oceanogr.*, 7 (3): 316-321.
- Margalef, R. 1974. Ecología. *Omega*. Barcelona (952 p).
- Oxoid Ltd. (Ed.). 1971. The Oxoid manual of culture media. *Oxoid Ltd.*, London (368 p).
- Schiaffino, M. 1977. Fitoplancton del río Paraná, I: sus variaciones en relación al ciclo hidrológico en cauces secundarios de la llanura aluvial. *Physis*, 92 (36): en prensa.
- Strickland, J. D. H. y T. R. Parsons. 1968. A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Board Canadá*, Ottawa (312 p).
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton, Methodik. *Mitt. Int. Verein Limnol.*, 9: 1-38.