

EVALUACION DE BACTERIAS ACUATICAS: INFLUENCIAS METODOLOGICAS

III nota *

Roberto C. Rodríguez

Instituto Nacional de Limnología
J. Maciá 1933 - (3016) Sto. Tomé - Santa Fe
Argentina

RESUMEN

Rodríguez, R. C. 1985. Evaluación de bacterias acuáticas: influencias metodológicas, III nota. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 16 (1): 25-28.

Se comparó el método de recuento de bacterias viables en superficie *versus* el recuento en profundidades durante el invierno (temperatura del agua 11-13°C). El método en profundidad se empleó con la variante de la triple capa; la segunda fue formada fundiendo y enfriando el agar hasta los 38°C, antes de mezclarlo con el inóculo. Los resultados obtenidos nunca fueron estadísticamente inferiores a aquéllos obtenidos con el método de siembra en superficie.

ABSTRACT

Rodríguez, R.C. 1985. Evaluation of viable aquatic bacteria: methodological influences, III note. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 16 (1): 25-28

The pour plate method ("sandwiching" the medium containing the organisms between thin layers of sterile agar, cooling the molten medium to 38°C prior to pouring on inoculated plates) permitted viable counts which were never lower than those obtained with the surface plate method. The freshwater samples were holding a temperature between 11-13°C. This does not agree with the results from others authors possibly due to the fact that the pour plate method was used with a single layer of medium and because the molten medium was cooled to high temperatures (45-50°C) prior to pouring on inoculated plates, among other factors.

* Las notas anteriores fueron publicadas en la *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 18: 201-207, 18: 209-215 (1976). Esta nota formó parte del trabajo presentado en las II Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral, 8-11 agosto 1984.

Existe una serie de factores metodológicos que influyen grandemente en los resultados de la evaluación de bacterias acuáticas viables, dificultando el análisis comparativo de los obtenidos por diversos autores. El laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Limnología, desde hace tiempo se abocó a la tarea de cuantificar el peso de las diferentes variables^{4-10, 15}.

Recientemente, Emiliani y Duce⁸ compararon el recuento de colonias en superficie *versus* el de profundidad encontrando que los resultados obtenidos eran estadísticamente iguales. Pero las muestras habían sido recolectadas durante el verano, con una temperatura del agua fluctuante entre 22°C y 25°C. Debido a que algunos ensayos similares realizados en el exterior y en aguas con una temperatura inferior contradecían aquéllos encontrados por los autores recién citados, surgió la duda de que si no era la temperatura original de la muestra un factor que podía alterar los resultados. Para conocer esta influencia, se tomaron muestras durante el invierno, en el río Salado con aguas a una temperatura fluctuante entre 11°C y 13°C.

Para el método en superficie se siguió a Clark³, quien lo describe en detalle. Las alternativas posibles de elegir fueron las siguientes: todos los ensayos se hicieron con 15 ml. de medio; inmediatamente después de vertido y solidificado, las placas se llevaron a secado sin las tapas durante 1 hora 40 minutos, fueron inoculadas con porciones de 0,5 ml de dilución $2,5 \times 10^{-3}$, pipeteados sobre la superficie de las placas secas y distribuidos mediante una varilla de vidrio doblada hasta su absorción. Para el método en profundidad se siguió el método detallado por Emiliani y Duce⁸. En todos los ensayos, el medio de cultivo empleado fue el Plate Count Agar (PCA); el tiempo de incubación siguió hasta que las lecturas diarias fueron constantes (generalmente 5 a 7 días); la temperatura de incubación fue de 36,5°C.

Los resultados se resumen en el Cuadro 1. Confirman que también las bacterias provenientes de aguas frías pueden ser evaluadas por el método de profundidad (emparedando el medio conteniendo los microorganismos en delgadas capas de agar estéril, enfriando el agar líquido a 38°C antes de verterlo en las placas inoculadas) pues éste permitió un recuento de viables que nunca resultó estadísticamente inferior a aquéllos obtenidos por el método en superficie.

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por otros autores (1, 2, 11-17) posiblemente debido a que ellos utilizaron el método de profundidad con una sola capa de medio de cultivo, porque vertieron el medio a altas temperaturas (45°C-50°C). También pudo ser debido a que el tiempo de incubación no fue suficiente, pues como se puede ver en el Cuadro 1 la significancia de los resultados depende de cuándo se dan por terminadas las lecturas.

Cuadro 1

Recuento de unidades formadoras de colonias (ufc) según el método en superficie (S) y profundidad (P) en muestras de agua extraídas durante el invierno (11–13°C) en el río Salado, sembradas en *Plate Count Agar* e incubadas a 37°C.

M. S.	\bar{x}	CV	p	T	M. S.	\bar{x}	CV	p	T
S	10	44			S	7,5	64		
P	12	21	0	1	P	9,5	16	0	1
S	28	37			S	16,5	27		
P	20	30	0	3	P	19,5	15	0	2
S	32	33			S	19	26		
P	26	26	0	5	P	24	26	0	3
S	34	33			S	20,2	20		
P	28,5	30	2	7	P	22,8	27	0	7

M. S.	\bar{x}	CV	p	T	M. S.	\bar{x}	CV	p	T
S	10	21			S	8,4	25		
P	11	18	0	2	P	6,5	25	0	1
S	12	22			S	21	32		
P	16	21	0	3	P	13	34	0	3
S	15	23			S	23	41		
P	19	24	0	4	P	18	15	0	4
S	16,5	21			S	25	41		
P	22,5	30	2	7	P	19	30	0	7

Referencias: M.S. = métodos de siembra; \bar{x} = promedio de ufc ($2,5 \times 10^3$); CV = coeficiente de variación (en %/o); T = tiempo de incubación, en días; p = nivel de significancia: 0 diferencia no significativa ($p > 0,05$), 1, 2 y 3 significativas al nivel $p < 0,05$; 0,01 y 0,001, respectivamente.

AGRADECIMIENTO

Al Sr. J. C. Romero (INALI) por su colaboración.

REFERENCIAS

1. Buck, J.D. y Cleverdon, R.C. 1960. The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria. *Limnol. Oceanogr.*, 5: 78–80.
2. Clark, D.S. 1967. Comparison of pour and surface plate methods for determination of bacterial counts. *Can. J. Microbiol.*, 13: 1409–1412.
3. Clark, D.S. 1971. Studies on the surface plate method of counting bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 17: 943–946.
4. Emiliani, F. 1972. Nuevos métodos para el estudio ecológico de microorganismos en aguas eutróficas. *Microbiol. Españ.*, 25: 175–178.
5. Emiliani, F. 1981. La selección del medio de cultivo en ecología bacteriana. *Ecología*, 6: 45–54.
6. Emiliani, F. 1981. Nota sobre el "Microcosmos–agar". *Ecología*, 6: 113–114.
7. Emiliani, F., García de Emiliani, M. O. y Vasallo, M.C. 1977. Aspectos ecológicos de las muestras de agua almacenadas. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 8: 93–99.
8. Emiliani, F. y Duce, J.A. 1985. Rehabilitation of the pour plate method for viable counts of freshwater bacteria. *Rev. Latin-amer. Microbiol.*, (en prensa).
9. Emiliani, F. y Rodríguez, R.C. 1975. Fundamentos para la adopción de un nuevo concepto metodológico aplicable en los estudios ecológicos que incluyen recuentos en placa de la microflora acuática o terrestre. *Rev. Latin-amer. Microbiol.*, 17: 207–210.
10. Emiliani, F. y Rodríguez, R.C. 1977. Rehabilitación del "Microcosmos–agar" para los estudios de ecología bacteriana. *Fave*, 7:95–100.
11. Jones, J.G. 1970. Studies on freshwater bacteria: effect of medium composition and method on estimates of bacterial population. *J. Appl. Bact.*, 33: 679–686.
12. Klein, D.A. y Wu, S. 1974. Stress: a factor to be considered in heterotrophic microorganism enumeration from aquatic environments. *Appl. Microbiol.*, 27: 429–431.
13. Means, E.G.; Hanami, L.; Ridgway, H.F. y Olson, B. H. 1981. Evaluating mediums and planting techniques for enumerating bacteria in water distribution systems. *J. Am. Water Works Assoc.*, 73: 585–590.
14. Moaledj, K. y Overbeck, J. 1982. Verteilung der oligocarbohilien und saprophytischen bacterien im Pubsee. *Arch. Hydrobiol.*, 93: 287–302.
15. Rodríguez, R.C. 1977. Un nuevo tipo de contador de colonias bacterianas oligocarbofilicas. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 8: 41–44.
16. Tessi, M.A. y Mir., A.L. 1970. Determinación de microorganismos en el agua y sedimento cuenca del Paraná medio. *Rev. Fac. Ing. Quim. (Santa Fe, Argentina)*, 39: 149–168.
17. Van Soestbergen, A.A. y Lee, C.H. 1969. Pour plates or streak plates?. *Appl. Microbiol.*, 18: 1092–1093.

Recibido/Received/: 20 agosto 1984.