

## EVALUACION DE BACTERIAS ACUATICAS: INFLUENCIAS METODOLOGICAS

### IV: Selectividad de medios de cultivo utilizados en el agrupamiento trófico de las bacterias acuáticas\*

*Federico Emiliani y Roberto Rodríguez*

Instituto Nacional de Limnología  
José Maciá 1933  
3016 Santo Tomé (Sta. Fe)  
Argentina

#### RESUMEN

**Emiliani, F. y R.C. Rodríguez. 1986. Evaluación de bacterias acuáticas: influencias metodológicas, IV: Selectividad de medios de cultivo utilizados en el agrupamiento trófico de las bacterias. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 17 (2): 157 - 160.**

Anteriormente, se había establecido la división de las bacterias en grupos tróficos (hiper, meso y oligotrófico) de acuerdo con el medio de cultivo utilizado para el recuento de las unidades formadoras de colonias (ufc). A fin de conocer el grado de selectividad de esos medios, se estimó el porcentaje de colonias aisladas de un medio oligotrófico que podría crecer en los otros medios y viceversa. Los porcentajes resultaron muy variables. Esto es coherente con la alta variabilidad de las diferencias entre los recuentos de los tres grupos encontradas en el transcurso de un año. A pesar de dicha variabilidad, se apreció un mayor grado de selectividad de los medios oligo e hipertrófico, con respecto al restante.

Además, se comprobó la existencia de bacterias sensibles a las eventuales fluctuaciones de la composición del "Microcosmos-agar", medio oligotrófico preparado *in situ* con agua del lugar de muestreo y agar purificado.

#### ABSTRACT

**Emiliani, F. and R.C. Rodríguez 1986. Evaluation of viable aquatic bacteria: methodological influences, IV: Selectivity of culture media utilized in the trophic classification of aquatic bacteria. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 17 (2): 157 - 160.**

Recently, the division of bacteria into ecological-trophic groups (hyper, meso and oligotrophic) was established according to the medium used for the evaluation of numbers of colony-forming units. Percentage of oligotrophs that grew on mesotrophic and hypertrophic media and viceversa was estimated in order to know selectivity of those media. The proportion was very variable. This fact has coherency with high variability of the count differences between those three groups. Oligo and hypertrophic media resulted relatively more selective than mesotrophic one.

Other assays were made about the sensibility of "Microcosmos-agar" (prepared only using river water and purified agar) to changing environmental conditions. The results showed that it is necessary to renew this oligotrophic medium in each sampling by changing its water component.

\* Las notas anteriores fueron publicadas en la *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 8: 201-207; 18: 209 - 215 (1976), *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 16(1): 25 - 28 (1985). Esta nota formó parte de un trabajo presentado en las *II Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral*, 8 - 11 agosto 1984.

En un trabajo anterior<sup>1</sup>, las bacterias fueron clasificadas según la concentración de nutrientes del medio de cultivo empleado para su recuento, en oligo, meso e hipertróficas, y se analizaron las variaciones de los tres grupos (cada uno, a su vez, subdividido en varios subgrupos según su relación con la temperatura y los sólidos en suspensión), en función de algunos parámetros ambientales. Pero no se tenían evidencias en qué proporción las oligotrofas podían crecer en un medio mesotrófico e hipertrófico y viceversa. Es decir, no se había estimado su relativa especificidad o grado de selectividad. Esto podría ser importante, podría explicar o ayudar en la interpretación de algunos resultados expuestos en trabajos anteriores<sup>1,2</sup> (Jones, J.G.; com. pers. 1984).

Se realizaron, entonces, ensayos de laboratorio con los tres medios de cultivo (Plate Count Agar —hipertrófico—, YPA/25 —mesotrófico— y el "Microcosmos Agar" —oligotrófico—), cuya composición y demás detalles operacionales ya fueron publicados<sup>1,3</sup>. La estimación de la selectividad fue realizada siguiendo a Straskrbova<sup>4</sup>, calculando el porcentaje de colonias que, crecidas en cada uno de los medios también podía hacerlo en los restantes.

Los resultados (Cuadro 1) indican que los medios más distanciados en lo que se refiere a la posibilidad de desarrollar las mismas colonias es el hipertrófico *versus* oligotrófico, situándose en una zona próxima a ambos, el sustrato mesotrófico. En el mismo cuadro se observa que es posible recuperar un mayor porcentaje de colonias cuando se las replica en un medio similar o en uno más rico en nutrientes. Esto último se puede decir de otra forma: es más fácil que un "pobre" se adapte a la riqueza que un "rico" a la pobreza, pues resultó más alto el porcentaje de colonias replicado en el medio hipertrófico (proveniente del oligotrófico) que viceversa.

Por otra parte, el Cuadro 1 muestra que la selectividad de los medios de cultivo ensayados es muy variable. Esto concuerda con la también amplia variabilidad de las diferencias cuantitativas obtenidas en la utilización de los tres medios de cultivo para estimar los respectivos grupos tróficos (Emiliani<sup>2</sup>, figura 1): en algunos muestreos se obtuvo un número similar de colonias, en otros las diferencias eran estadísticamente significativas. La existencia de estas diferencias, de variable importancia, debería estar relacionada con el diverso grado de adaptabilidad nutritiva de los componentes de la población bacteriana presentes en una determinada muestra. En otras palabras, parte de la heterogénea población, recolectada en cada muestra y sembrada en los tres medios, resulta afectada por factores limitantes nutritivos que impiden su manifestación en colonias.

Cuadro n° 1 — Porcentajes mínimos — máximos de colonias desarrolladas en medios hipertróficos (A), mesotróficos (B) y oligotróficos (C), aisladas de otros medios.

Origen	Porcentajes de colonias desarrolladas.		
	A	B	C
A	100	70 — 80	0 — 30
B	40 — 75	100	38 — 66
C	10 — 50	44 — 100	100

Comentarios análogos se pueden realizar con respecto a otras variables; por ejemplo, la temperatura. En el mismo trabajo recién citado, el promedio general de oligotrofas incubadas a la temperatura óptima para las mesófilas (35°C) fue prácticamente igual al obtenido a la misma temperatura que tenía el río en el momento de los muestreos (14 - 28°C); sin embargo, los recuentos obtenidos con estas últimas incubaciones fueron mayores más frecuentemente (en el 64% de las muestras), excepto en los meses invernales (36% de las muestras, 14°C vs. 35°C). Como los nutrientes empleados fueron exactamente los mismos, los resultados indican que la temperatura también fue, ocasionalmente, un factor limitante.

Otra cuestión a resolver era sobre la selectividad del medio de cultivo, a través del tiempo, utilizado para la estimación de las oligotrofas. Como se sabe, en microbiología marina se utiliza, entre otros ingredientes, el agua de mar como medio de cultivo y se utiliza siempre la misma agua para toda una serie de muestreos. Nosotros, en cambio, para agua dulce, habíamos propuesto<sup>3</sup> preparar un medio de cultivo nuevo para cada nuevo muestreo pero no habíamos hecho ningún ensayo de laboratorio que justificara la adopción de la incomodidad operativa que implica la preparación del medio de cultivo *in situ*, en condiciones de campo. Es decir, necesitábamos conocer si era necesario o no preparar un solo medio de cultivo (con agua de río) para analizar muestras extraídas del mismo río pero obtenidas a diferentes intervalos de tiempo. En el caso negativo, una muestra analizada con un medio de cultivo preparado con agua recolectada en una fecha determinada no debería mostrar diferencias notables con respecto a los recuentos realizados utilizando medios de cultivo preparados en cualquier otra fecha, tomando un curso de tiempo suficientemente amplio para dar lugar a la posibilidad de un cambio de las características ambientales.

Para responder a tales preguntas, tomamos muestras en las distintas fechas indicadas en el Cuadro 2, en una sección transversal del tramo medio del río Paraná. En cada una de esas fechas preparamos el "Microcosmos agar", distribuimos y esterilizamos en tubos de ensayo y los conservamos en heladera herméticamente cerrados (tapones a rosca sellados con vaspar) hasta el momento de analizar el conjunto en forma simultánea.

Cuadro n° 2 - Variaciones porcentuales de los recuentos en "Microcosmos agar" según la fecha de su preparación (noviembre = 100%) en dos series de ensayos (A = 1977 y B = 1978).

		23 junio	11/25 julio	22 agosto	5/11 setiem.	3 oct.	15 nov.
A	---	36,5	44/48	70	89/136	81	100
B	51	---	182/120	112	161/148	---	100
		23 mayo	11/24 julio	9 agosto	11/26 setiem.		22 nov.

Los resultados del Cuadro 2 justifican la propuesta de renovar en cada muestreo el medio de cultivo, pues es posible encontrar diferencias importantes atribuibles al variado contenido nutritivo de las muestras que posibilitan en mayor o menor grado la manifestación, como colonias visibles, de las células viables sembradas. En efecto, durante ese mismo lapso, se registraron fluctuaciones importantes en las características químicas, p.ej.: DQO = 5,1 – 11,4 mgO<sub>2</sub> /l, NO<sub>3</sub> = 0,1 – 3,5 mg/l (para más detalles, ver Vassallo y Kieffer<sup>5</sup>).

## REFERENCIAS

1. Emiliani, F. 1984. Oligotrophic bacteria: Seasonal fluctuations and correlations with environmental variables (middle Paraná river, Argentina). *Hydrobiologia*, 111 : 31 – 36.
2. Emiliani, F. 1985. Estudios limnológicos en una sección transversal del tramo medio del río Paraná, XIII: Bacteriología. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 16: 215 – 223.
3. Emiliani, F. y R.C. Rodríguez. 1975. Un nuevo concepto metodológico aplicable en los estudios ecológicos que incluyen recuentos en placa de la microflora acuática o terrestre. *Rev. Latinoamer. Microbiol.*, 17: 207 – 210.
4. Straskrabová, V. 1973. Methods for counting water bacteria: comparison and significance. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 1: 433 – 454.
5. Vassallo, M. y L. Kieffer. 1984. Estudios limnológicos en una sección transversal del tramo medio del río Paraná, VII: Química del agua. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral*, 15: 97 – 108.