



# ESTUDIO CUANTITATIVO DE LOS OOMYCETES DEL RIO SANTIAGO Y AFLUENTES (BUENOS AIRES, ARGENTINA)

*Mónica M. Steciow*

Instituto de Botánica Spegazzini, 53 N° 477,  
1900 La Plata (Buenos Aires, Argentina)

**RESUMEN.** Se emplearon diferentes métodos para el análisis cuantitativo de los propágulos de los Oomycetes presentes en agua y materia orgánica flotante del río Santiago y afluentes (Buenos Aires, Argentina). Se comentan aspectos tales como presencia y distribución estacional de estos hongos zoospóricos en distintos tipos de muestras. El mayor número de especies fue obtenido en agua y en materia orgánica. Las zoosporas y sus quistes fueron los propágulos predominantes en agua, los que mostraron dos períodos anuales de máxima producción: primavera y otoño.

**ABSTRACT.** Quantitative study of the Oomycetes from Santiago River and affluents (Buenos Aires, Argentina).

Different methods were developed for the quantitative estimation of the propagules of Oomycetes fungi present in freshwater and floating organic matter from Santiago River and affluents (Buenos Aires, Argentina). The occurrence and seasonal distribution of these zoosporic fungi in different kinds of samples were also discussed. The greater number of species was obtained from water and organic matter samples. Zoospore and zoospore cysts were found to be the predominant propagules in water which showed two annual periods of peak availability: spring and autumn.

## INTRODUCCION

Los hongos acuáticos zoospóricos, principalmente representados por aquéllos pertenecientes al O. Saprolegniales (Cl. Oomycetes), completan su ciclo de vida, o desarrollan parte de él, en el agua, siendo el medio en el que liberan y pro-

pagan las zoosporas y/o gametas (Cooke, 1961; Hudson, 1986).

El valor biológico de las zoosporas de estos organismos saprobios y/o parásitos residiría en su poder para seleccionar el sustrato sobre el cual se establecen en virtud de su taxismo (Fis-

cher & Werner, 1958; Carlile & Machlis, 1965; Machlis, 1969).

Según Sparrow (1968), los sustratos tales como quitina, queratina, celulosa y otros, son invadidos en la naturaleza debido a la fuerza selectiva de las zoosporas del hongo. Es por ello, que la técnica de cebado, ha permitido la obtención de distintos tipos de hongos especializados fisiológicamente para la distinción de sustratos de composición químicamente diferentes. El sustrato no sólo es importante por proveer los requerimientos físico-químicos a las especies, sino que además brinda una superficie o matrix para la penetración del propágulo, con un área relativa expuesta al agua.

El hábitat y el sustrato deben ser considerados como un aspecto del medio para realizar una aproximación más ajustada, ya que el segundo puede tener distinto significado ecológico según el sitio donde se lo considere.

Willoughby (1962); Dick (1970); Hallett & Dick (1981) encontraron los mismos patrones de distribución y abundancia, para especies de Saprolegniales halladas en ambientes lacustres de Inglaterra, con una flora principalmente abundante en aguas superficiales de las márgenes del lago, y pobremente representada en su porción central.

De este modo, la zona con alto contenido de plantas y animales, provee los sustratos que son continuamente introducidos en las márgenes, a los que se suman los de origen terrestre y acuático por descarga hacia el interior del lago, a través de una vía de ingreso o afluente. A esto se agregan los propágulos que ingresan directamente y que contribuyen a ampliar la diversidad de especies y su abundancia.

El presente trabajo tiene como objetivos analizar el número de cepas y el contenido de propágulos de los Oomycetes, en distintos tipos de muestras obtenidas en el río Santiago y afluentes, siendo un ambiente cuyos parámetros naturales se hallan alterados por un alto grado de contaminación antrópica (Steciow, en prensa a y b).

## MATERIAL Y METODOS

El área de muestreo corresponde al sistema formado por el río Santiago y afluentes (Ensenada, Prov. Buenos Aires), siendo un ambiente muy modificado, con aportes de los efluentes del polo petroquímico e industrial de sus márgenes, por lo que el agua y las costas aparecen cubiertas con hidrocarburos y combustibles.

Los sitios de muestreo fueron: isla Borsani, arroyo El Zanjón, Destacamento, Boya 2740 y Cuatro Bocas (Steciow, en prensa a).

Las especies se obtuvieron mensualmente de agua superficial (no más de 20-30 cm), suelo (obtenido del fondo, a una profundidad de 2-5 m) y de materia orgánica flotante (hojas, ramas, etc.) cebadas con semillas de cáñamo y *Brassica* sp., de acuerdo a las técnicas convencionales (Johnson, 1956; Sparrow, 1960; Seymour, 1970). Se analizó el número de cepas en cada tipo de muestra de los años 1987-1988.

Las muestras de suelo se coleccionaron en frascos esterilizados y en laboratorio se procedió a colocar 10 g de peso húmedo por cada caja de Petri cubriéndose con agua destilada esterilizada. Luego que las partículas se asentaron, se adicionaron 5 mitades de semillas de cáñamo y/o *Brassica* sp. esterilizadas.

Estos cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente. Cuando el micelio del hongo desarrolló sobre el cebo (usualmente después de 24 a 72 horas), se procedió a removerlo y a lavarlo completamente con una corriente de agua, para luego transferirlo a otra caja conteniendo agua destilada esterilizada, a la que se adicionó nuevas mitades de semillas de cáñamo.

Las muestras de agua y de materia orgánica flotante se cebaron de la misma manera que las anteriores.

El cálculo del contenido de propágulos/l de agua fue realizado de acuerdo a la metodología empleada por Willoughby (1962), y continuada por Willoughby & Collins (1966); Ji & Dayal (1966); Hallett & Dick (*op. cit.*). Se colocaron alícuotas (5 ml), en cajas de Petri que contenían 10 ml de agar harina de maíz, justo antes de solidificar; luego, se separaron 8 sectores triangulares, del mismo tamaño por cada caja de Petri, que se colocaron en agua destilada estéril, a temperatura ambiente, por 7 días. Se emplearon 5 cajas de Petri por muestra, total 40 en cada estimación. Luego de la incubación, se observaron los sectores para detectar el crecimiento de hifas, contándose como *positivos* a aquéllos que mostraron su crecimiento. Se partió de la base de que cada sector que soporta el crecimiento de una especie, tiene originalmente un solo propágulo (zoospora), aplicándose la distribución de Poisson para el cálculo de sectores esperados con más de 1 propágulo.

Ya que estos hongos resultaron ser muy abundantes en la materia orgánica vegetal, se utilizó una modificación de la técnica de Dick (1966): se separaron 100 g de materia orgánica húmeda (peso fres-

co) y se procedió a triturarla en 500 ml de agua en una procesadora, durante 3-5 minutos. Luego, se filtró por un tamiz de 1,5 mm, el residuo de mayor diámetro (identificado como *restos vegetales*), se fraccionó en porciones de 10 g que se colocaron en cajas de Petri con agua destilada esterilizada y 5 semillas de *Brassica* sp.

La suspensión líquida recogida se volvió a desintegrar durante 3 minutos y se dejó decantar por 15-20 minutos. Se evidenciaron 2 porciones: el líquido sobrenadante y el detrito. De cada uno de ellos se colocaron por cada caja de Petri unos 20 ml con 5 semillas de *Brassica* sp.

Por fracción se estimó (por 100 g de peso fresco):

% Frecuencia de géneros en cada fracción de materia orgánica=

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ total de semillas con Oomycetes} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ total de semillas (50)}}$$

## RESULTADOS Y DISCUSION

Las muestras de agua y materia orgánica resultaron ser las más satisfactorias para el aislamiento de estos hongos, sobre todo en zonas con mayor vegetación circundante, tales como isla Borsani, arroyo El Zanjón y Boya 2740 (Cuadro 1). En cambio, en las zonas con aguas de mayor movimiento y/o con hidrocarburos, como Destacamento y Cuatro Bocas, la materia orgánica, por lo general, fue escasa, mientras que el agua mostró valores ligeramente superiores en el número de cepas aisladas.

En las muestras de suelo, por lo general, los hongos no fueron aislados (o escasamente), en parte debido a la presencia de hidrocarburos y metales

Cuadro 1. Número de cepas obtenidas a partir de los distintos tipos de muestras.

Muestra	Is. Borsani				A El Zanjón				Destacamento				Boya 274-0				Cuatro Bocas			
	P	V	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I
Suelo	5	2	3	1	3	0	2	0	0	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0
Agua	14	8	11	6	7	6	6	4	5	3	5	2	5	3	3	4	3	3	3	2
Mat. Orgánica	10	6	12	4	8	7	8	4	4	0	2	0	5	3	4	5	1	0	1	0
Total	29	16	26	11	18	13	16	8	9	3	8	2	12	6	8	9	4	3	4	2

pesados en el sedimento que se deposita en las márgenes y, sobre todo, en el fondo del río. En áreas más alejadas de la influencia de estos contaminantes, se aislaron especies tales como: *Allomyces arbuscula*, *Isoachlya toruloides*, *Protoachlya* sp.

Es importante destacar que los tres tipos de muestras colectadas resultan ser complementarias para conocer la flora fúngica del ambiente.

En Isla Borsani se obtuvo la mayor proporción de cepas aisladas a partir de los tres tipos de muestras.

Con la metodología empleada, basada en el análisis de los sectores triangulares, se realizó la estimación del contenido de Oomycetes expresado en propágulos/l.

Para realizar las correcciones se calcularon las medias observadas de sectores positivos correspondientes a las reales, estimadas para valores desde 0,1 a 1 propágulo por sector (Fig. 1).

La estimación del contenido de propágulos/l se realizó mensualmente a la altura

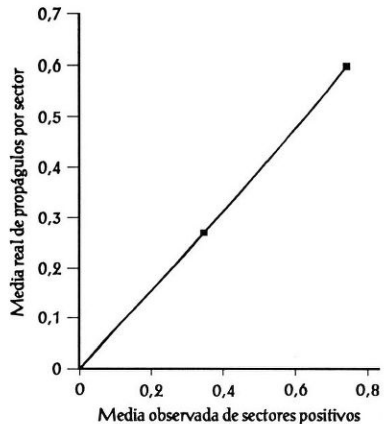


Fig. 1. Corrección para inoculaciones múltiples empleadas en la estimación de Oomycetes.

de la Isla Borsani, a partir del muestreo correspondiente a junio/87 (Cuadro 2). El cálculo estacional fue: primavera:  $400 \pm 16$  (39,10%); verano:  $208 \pm 82$  (20,33%); otoño:  $277 \pm 74$

Cuadro 2. Número de sectores positivos y estimación del número de propágulos/l en isla Borsani.

---

---

MES	Nº de sectores positivos	Nº de propágulos/l
junio/87	3	160
julio/87	2	96
agosto/87	3	160
setiembre/87	7	368
octubre/87	8	416
noviembre/87	8	416
diciembre/87	3	160
enero/88	7	368
febrero/88	2	96
marzo/88	3	160
abril/88	5	256
mayo/88	8	416

---

---

(27,08%); invierno:  $138 \pm 21$  (13,49%); total: 1023.

Comparando estos datos con los obtenidos por Steciow, en prensa a, sobre semillas de *Brassica* sp. se obtuvieron resultados similares: primavera: 38,2%; verano: 20%; otoño: 28,6%; invierno: 13,2%. Del mismo modo, los propágulos/l alcanzaron mayor proporción en primavera, con valores intermedios en otoño y verano, siendo menor la abundancia en los meses de invierno.

El cebado de las muestras de agua y el cálculo de propágulos resultan ser 2 métodos favorables para detectar la abundancia de los Oomycetes en los sitios de muestreo y brindar un conocimiento más acabado de la presencia *in situ*, eliminando las posibles desviaciones introducidas con la aplicación de un solo método. Las diferencias existentes, en la correlación de los resultados obteni-

dos por ambos métodos, pueden deberse a la temperatura del agar, que en algunos casos, al no estar a una mínima, podría afectar el número de zoosporas posteriormente viables. También el mayor porcentaje de frecuencia podría deberse a que las semillas empleadas, resultan ser sustratos mejor aprovechados (aminoácidos) y más favorables que el agar harina de maíz (Khulbe *et al.*, 1983), para el crecimiento de estos hongos.

El método de cebado de las cajas por el agregado de un sustrato favorable (semillas), facilita el reconocimiento efectivo de las zoosporas libres o enquistadas traídas en las muestras de agua, mientras que el análisis de los sectores triangulares pone en evidencia la presencia de Oomycetes, a partir no sólo de las zoosporas, sino también de oosporas, yemas o micelio, que luego germinan.

Cuadro 3. Frecuencias de los géneros encontrados en las 3 fracciones.

	Género	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Fr mín - Fr máx.
Residuo	<i>Achlya</i>	54	22	40	10	10-54
	<i>Dictyuchus</i>	46	70	50	30	30-46
Vegetal	<i>Pythium</i>	28	14	30	18	14-30
	<i>Saprolegnia</i>	30	58	24	26	24-58
Sobre- nadante	<i>Achlya</i>	30	30	40	10	10-40
	<i>Dictyuchus</i>	50	50	70	40	40-70
	<i>Pythium</i>	24	25	34	26	24-34
	<i>Saprolegnia</i>	24	10	20	0	0-24
Detrito	<i>Achlya</i>	10	0	6	0	0-10
	<i>Dictyuchus</i>	60	0	24	10	0-60
	<i>Pythium</i>	20	2	8	0	0-20
	<i>Saprolegnia</i>	10	20	4	0	0-20

Se analizó la frecuencia de los Oomycetes aislados en restos de materia orgánica de la Isla Borsani, donde la cantidad de ramas, hojas, tallos, etc. en suspensión es muy abundante a lo largo del año (Cuadro 3).

Los géneros *Achlya*, *Dictyuchus*, *Pythium* y *Saprolegnia*, estuvieron presentes durante todo el año. Para *Achlya* y *Saprolegnia* la mayor frecuencia (54 y 58%, respectivamente) fue obtenida en el residuo vegetal; para *Dictyuchus* y *Pythium* en el sobrenadante (70 y 34%, respectivamente).

De esta forma, se pone de manifiesto la presencia de los Oomycetes, a partir de estructuras de reposo (oosporas) o vegetativas (micelio), las cuales están representados por los mismos géneros encontrados en agua.

En cuanto a la abundancia de estos hongos, existe poca información, así como en relación a su actividad en los ambientes acuáticos. Entre las técnicas empleadas para su detección figuran: a)

análisis de los sustratos naturales; b) cebado de las muestras; c) incorporación de alcuotas de agua colectada en cajas de Petri con medio agarizado, la que con algunas variantes es la más difundida. De acuerdo a ello, Willoughby (*op. cit.*), estableció que el número de propágulos viables da un índice de la relativa actividad de los distintos géneros y especies presentes. En varios lagos de Inglaterra, el autor encontró correlación de la mayor abundancia con la cantidad de lluvia caída y el consiguiente aumento del nivel de las aguas y de la materia orgánica llevada hacia las márgenes, con un descenso del número de propágulos en el centro de los cuerpos de agua.

En el río Santiago, las especies de *Achlya* resultaron ser más numerosas que las de *Saprolegnia*; el género *Dictyuchus*, estuvo representado por *D. monosporus* durante todo el año: las mayores frecuencias ocurren en primavera, de la conjunción de factores tales

como materia orgánica flotante, temperatura y mayor oxigenación (Steciow, en prensa a). La cantidad de propágulos encontrada puede considerarse como abundante, dadas las condiciones del área estudiada, modificada constantemente por factores antropogénicos.

Los niveles de zoosporas detectados, son indicativos de la presencia de una población miceliar activa; teniendo en consideración la corta vida media de las zoosporas, los picos estacionales dan cuenta de la presencia de una biomasa, que origina y pone en libertad a las esporas móviles (Hallett & Dick, *op. cit.*).

Bajo condiciones estables del ambiente predomina la forma asexual en el ciclo de vida, es decir la producción de distintas clases de zoosporas y sus quistes; la distribución poblacional puede verse afectada por su agregación. La germinación de la oospora puede mostrar variación por las condiciones del medio o seguir un patrón genotípicamente determinado por lo que tiene un papel ecológico diferente para cada especie (Dick, 1992).

De esta manera, con la metodología empleada se puso en evidencia la abundancia de las Saprolegniales. Asimismo se han desarrollado otras técnicas que emplean pasta de papel celulósica a temperatura ambiente (Willoughby *et al.*, 1984) y un medio nutritivo con primarina, el que se adiciona a cajas de Petri con hidroxietil celulosa (Celio & Padgett, 1989). Según este método, los resultados superarían en un 30% a los obtenidos por el análisis de los sectores triangulares agarizados.

## CONCLUSIONES

Las zoosporas y sus quistes fueron los principales propágulos encontrados en

el agua, mientras que en los restos orgánicos resultaron ser más abundantes las estructuras de reposo o vegetativas.

Esta estimación de la cantidad de zoosporas en el agua, es indicadora de la presencia de una población miceliar activa, productora de esporas móviles en el momento o unas horas antes del muestreo, teniendo en cuenta su período de viabilidad.

La estimación aproximada de la cantidad de zoosporas resulta de la interacción de una serie de factores, como ser el momento en que se ha tomado la muestra, el período de máxima presencia en el agua y el empleo de las técnicas que tienen distintas eficiencias en seleccionar los taxa.

## AGRADECIMIENTOS

A las Dras. A. M. Arambarri y M. N. Cabello, por sus consejos y la lectura crítica del manuscrito.

## REFERENCIAS

- Carlile, M. J. & L. Machlis. 1965. A comparative study of the chemotaxis of the motile phases of *Allomyces*. *Am. J. Botany* 52: 484-486.
- Celio, D. A. & D. E. Padgett. 1989. An improved method of quantifying water mold spores in natural water columns. *Mycologia* 81(3): 459-460.
- Cooke, W. B. 1961. Pollution effects on the fungus population of a stream. *Ecology* 42: 1-18.
- Dick, M. W. 1966. The Saprolegniaceae of the environs of Blelham Tarn: Sampling techniques and the estimation of propagule numbers. *J. Gen. Microbiol.* 42: 257-282.
- Dick, M. W. 1970. Saprolegniaceae on insect exuviae. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 449-458.
- Dick, M. W. 1992. Patterns of phenology in populations of zoosporic fungi (355-382). In: Carroll, G. C. & D. T. Wicklow (eds). The fungal community. Its organization and role in the ecosystems. Mycology Series, vol. 9. Marcel Dekker, Inc. New York. 976 pp.

- Fischer, P. J. & G. Werner. 1958. Die chemotaxis der Schwarmsporen von Wasserpilzen (Saprolegniaceen). *Z. Physiol. Chem.* 310: 65-91.
- Hallett, I. C. & M. W. Dick. 1981. Seasonal and diurnal fluctuations of Oomycete propagule numbers in the free water of a freshwater lake. *J. Ecol.* 69: 671-692.
- Hudson, H. J. 1986. Fungal Biology. Contemporary, Edward Arnold Ltd., London. 298 pp.
- Ji, T. & R. Dayal. 1966. The occurrence and distribution of reproductive spores of Saprolegniales in certain ponds of Varanasi. *Nova Hedwigia* 12(3-4): 509-517.
- Johnson, T. W., Jr. 1956. The genus *Achlya*: Morphology and Taxonomy. *Univ. Michigan Press.*, Ann. Arbor, Michigan. 180 pp.
- Khulbe, R. D., B. L. Verma & D. L. Verma. 1983. A new medium of Saprolegniaceae. *Bibl. Mycol.* 91: 557-561.
- Machlis, L. 1969. Zoospore chemotaxis in the water mold *Allomyces*. *Physiol. Plant.* 22: 126-139.
- Seymour, R. L. 1970. The genus *Saprolegnia*. *Nova Hedwigia* 19: 1-124.
- Sparrow, F. K., Jr. 1960. Aquatic Phycomycetes. *Ann. Arbor, Univ. Michigan Press.* Michigan. 1187 pp.
- Sparrow, F. K., Jr. 1968. Ecology of freshwater fungi (41-93). In: Ainsworth, G. C. & A. S. Sussman (eds.). The fungi. vol. III. *Academic Press.* New York. 580 pp.
- Steciow, M. M. En prensa a. Variación estacional de los Oomycetes en un ambiente contaminado: Río Santiago y afluentes (Buenos Aires, Argentina). *Rev. Iberoam. Micol.*
- Steciow, M. M. En prensa b. Frecuencia relativa y abundancia de los Oomycetes de Río Santiago y afluentes (Buenos Aires, Argentina). *Rev. Gayana. Bot.*
- Willoughby, L. G. 1962. The occurrence and distribution of reproductive spores of Saprolegniales in freshwater. *J. Ecol.* 50: 733-759.
- Willoughby, L. G. & V. G. Collins. 1966. A study of the distribution of fungal spores and bacteria in Blelham Tarn and its associated streams. *Nova Hedwigia* 12: 150-171.
- Willoughby, L. G., A. D. Pickering & H. G. Johnson. 1984. Polycell-gel assay of water for spores of Saprolegniaceae (fungi), especially those of the *Saprolegnia* pathogen of fish. *Hydrobiologia* 114: 237-248.

Recibido/Received/: 19 de febrero 1996.  
Aceptado/Accepted/: 29 de octubre 1996.