

Comparación de medios de cultivo con salinidad controlada en la enumeración de bacterias heterotróficas en una laguna costera

Rubén Sommaruga

Facultad de Humanidades y Ciencias, Departamento de Hidrobiología, Sección Limnología, Tristán Narvaja 1674, Montevideo, Uruguay.

(Rec. 19-X-1988. Acep. 21-II-1989)

Abstract: An efficiency comparison for counts of viable heterotrophic bacteria in a coastal lagoon was done for three media with different salinities. Water samples were taken along the salinity gradient (range 1-28 ‰), with and without lagoon communication with the sea. In all cases, the estuarine medium with intermediate salt concentration gave the highest values of colony forming units and is more reliable.

Key words: salinity, heterotrophic-bacteria, coastal lagoons.

Tradicionalmente los métodos utilizados para la enumeración de las poblaciones bacterianas acuáticas han sido divididos en conteos directos e indirectos (Colwell *et al.* 1975). Los primeros han tenido un notorio adelanto con la aplicación de la microscopia de epifluorescencia que permite distinguir claramente entre detritus y bacterias. Dentro de los segundos, el método clásico ha sido la determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar. Generalmente, se ha realizado por la técnica de vaciado (Spread Plate) sobre la superficie del agar, como consecuencia de la conocida termosensibilidad de las bacterias acuáticas. Sin embargo, éste ha sido severamente criticado, por ser un método que sólo permite contar una pequeña fracción de la población total (Taga & Matsuda 1974). A pesar de esto, todavía hoy es ampliamente utilizado pues constituye un parámetro adicional y el único que permite aislar bacterias viables (Buck 1979).

Un problema más se suman ambientes estuarinos y lagunas costeras, en los cuales existe un

gradiente marcado de salinidad y donde la elección de un único medio de cultivo, que sea representativo para todo el sistema, se hace difícil. Generalmente se han utilizado para el análisis bacteriológico del agua dulce, así como de agua de mar y moluscos, el agar para recuento en placa (PCA), que no tiene concentración de sales alguna (APHA 1970, 1985). Aún en estudios ecológicos realizados en ambientes de salinidad variable, se han utilizado casi sin excepción medios para agua dulce o marinos (Trousselier & Balcux 1981).

Weiner, Hussong & Colwell (1980) han formulado un medio estuarino, el cual resultó exitoso al comparar los conteos con el PCA y otro medio estuarino, sin embargo el ámbito de salinidad examinado fue solo entre 7 y 14‰. Por lo tanto el presente trabajo, tiene como objetivo estudiar comparativamente la eficiencia en el conteo, de tres medios de cultivo con distinta salinidad, en un ambiente de alta variabilidad en este parámetro.

La investigación fue realizada en la Laguna de Rocha, ubicada al Sureste del Uruguay entre los $34^{\circ}32' - 34^{\circ}38' S$ y los $54^{\circ}12' - 54^{\circ}22' W$ (Fig.1). Constituye un cuerpo de agua somero con una profundidad media de 0.58 m y un área de *ca.* 72 km². Sus principales tributarios son los arroyos Rocha y Las Conchas que desembocan en la zona Norte. La comunicación con el océano está restringida por la presencia de una barra paralela a la costa, la cual se abre de forma natural o por la acción del hombre. Su principal característica es la variabilidad hidrodinámica como consecuencia de los períodos de apertura de la barra, y de lluvias. En la dirección Norte-Sur presenta un marcado gradiente horizontal de salinidad, no existiendo en el sentido vertical, debido a su escasa profundidad.

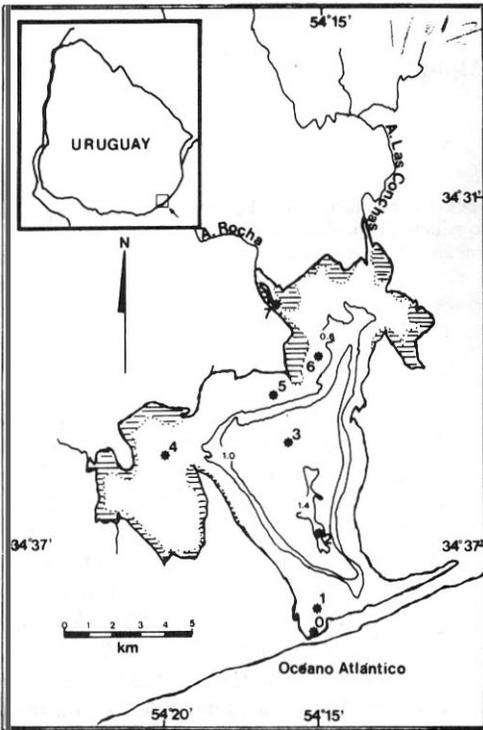


Fig. 1 Ubicación de la Laguna de Rocha y estaciones de muestreo.

Muestras de agua superficial (*ca.* 20 cm) fueron tomadas en estaciones ubicadas a lo largo del gradiente salino (Fig.1). El período de estudio fue de febrero a julio de 1987, abarcando situaciones de apertura y cierre de la barra, totalizando 36 muestras. Las muestras fueron obtenidas utilizan-

do botellas de vidrio de 200 ml esterilizadas, siendo trasladadas en cámaras con hielo a *ca.* 4°C y procesadas en un lapso no mayor a las 5 h. En el laboratorio, 1 ml de la muestra fue diluida 1:5 o 1:10 en agua peptonada al 1% (p/v). Luego de una enérgica agitación (30 s), se realizaron las posteriores diluciones. Seguidamente 0.1 ml fue sembrado por triplicado en agar para recuento en placa (Britania), en agar marino de ZoBell (Marineagar 2216E, Difco) y en agar estuarino (11.22 g de caldo marino (Difco) y 15 g de agaren 1 litro de agua deionizada) por la técnica de vaciado. Las salinidades de los medios especificadas en sus fórmulas originales son 0, 31.0 y 9.4 ‰, respectivamente. La incubación se realizó a 20°C durante 7 días, luego de los cuales se realizaron los conteos.

Las densidades de células viables variaron entre 100 y 23750 UFC ml⁻¹ para los conteos realizados en agar marino (AM), entre 125 y 24400 UFC ml⁻¹ para el PCA, mientras que para el agar estuarino (AE) lo hicieron entre 1670 y 140620 UFC ml⁻¹. Los valores de UFC obtenidos mediante los tres tratamientos y la salinidad, se muestran para cada estación en el Cuadro 1. Para determinar si había diferencias significativas entre los tres tratamientos, se hizo un análisis de Varianza (ANOVA). Los datos fueron previamente transformados al logaritmo decimal, para obtener una distribución de errores normal y homogeneidad de varianza. El Cuadro 2 muestra los resultados del ANOVA.

Tomando todos los datos provenientes de diferentes estaciones de muestreo, distintos meses y por lo tanto distinta salinidad, el resultado del análisis indica que la diferencia entre los tres tratamientos es significativa ($P < 0.01$).

La comparación del número de UFC ml⁻¹ entre los tres tratamientos dentro de cada muestreo y para todo el ámbito de salinidad (1-28 ‰) muestra en todos los casos la superioridad en números de los conteos realizados en el AE. El Cuadro 3 resume el promedio, desvío estándar, y coeficiente de variación, de los distintos tratamientos.

Como se puede observar, los promedios de los conteos realizados con el AE resultan superiores y el desvío estándar y coeficiente de variación menores, demostrando una más alta confiabilidad de los resultados en comparación a los obtenidos con el AM y PCA. Por último, para comprobar estadísticamente la superioridad del AE, las medias de los tres tratamientos fueron contrastadas mediante el uso del análisis de Tukey (Sokal

CUADRO 1

Unidades formadoras de colonias (UFC) de los tres tratamientos y salinidades correspondientes en las estaciones muestreadas

Est.	Sal. %	Agar Marino UFC/ml	Agar Estuarino UFC/ml	Agregar para recuento en placa UFC/ml
0	28.0	2970	13770	565
	19.7	5625	14500	2250
	6.9	1095	2760	210
	17.0	1035	4275	420
	16.2	2250	3825	795
1	28.1	2500	6000	1500
	16.5	23750	25750	22125
	27.7	5330	15670	4030
	9.0	14000	28000	13600
	7.4	900	19300	425
2	23.3	2750	8000	250
	15.7	125	4000	375
	9.3	1000	3330	1000
	8.3	7560	54600	3130
	7.2	2675	25325	1650
3	14.5	3750	14125	3250
	12.4	100	1670	1000
	19.9	17050	140620	15200
	7.2	2650	6375	1325
	7.6	2960	31760	1360
4	14.2	3500	24375	1000
	13.0	875	14000	500
	8.5	5200	29920	1760
	8.0	1200	19280	7440
5	13.8	2250	11500	500
	15.4	8750	19875	15125
	7.9	1900	12400	650
	4.6	3440	22280	1680
6	12.0	1250	12750	500
	7.8	3125	7125	125
	5.3	425	10575	8050
	3.7	2000	35200	6800
7	2.3	825	3795	360
	1.0	3280	31280	24400
	1.2	1550	49000	12875
	1.7	2750	2875	1000

CUADRO 2

Resultado del análisis de Varianza. Grados de libertad (gl), suma de cuadrados (SC), cuadrados medios (CM)

Fuente de variación	g.l.	SC	CM	Fo
Tratamientos	2	16.234	8.117	29.191
Error	105	29.297	0.278	
Total	107			

CUADRO 3

Datos estadísticos de los tres tratamientos. Valor de las unidades formadoras de colonias transformado en base al \log_{10}

Tratamiento	X ± D.E.	C.V. %	n
Agar marino	3.382 ± 0.516	15.30	36
Agar estuarino	4.109 ± 0.425	10.40	36
Agar para recuento en placa	3.216 ± 0.621	19.30	36

X = media
D.E. = desvío estándar
C.V. = coeficiente de variación

CUADRO 4

Resultados del análisis de Tukey

Tratamientos	Agar estuarino	Agar marino	Agar para recuento en placa
Agar para recuento en placa	0.893	0.1654	-
Agar estuarino	0.727	-	-
Agar marino	-	-	-

$\Delta 0.05 = 0.296$; $\Delta 0.01 = 0.371$

& Rohlf 1979). Los resultados (Cuadro 4) muestran que el valor calculado de Tukey es menor que el resultado de la diferencia entre la media del AE menos las del AM y PCA, concluyendo que solo hay diferencias significativas entre las medias del AE con los otros dos tratamientos.

En conclusión, el medio de cultivo denominado agar estuarino, resultó el más efectivo en la

cuantificación de bacterias viables, así como más confiable en los resultados obtenidos para el ámbito ampliado de salinidad estudiado. Esta mayor efectividad podría estar relacionada a su concentración intermedia de sales. Su utilización como herramienta adicional en el estudio de poblaciones bacterianas heterotróficas se recomienda para sistemas estuarinos de igual salinidad.

AGRADECIMIENTOS

A Roland Psenner del Departamento de Ecología Microbiana del Instituto de Limnología de Mondsee, Austria, por la lectura y sugerencias hechas al manuscrito. A Walter Norbis por su colaboración durante el análisis estadístico.

REFERENCIAS

American Public Health Association. 1970. Recommended procedures for the examination of seawater and shellfish. 4th ed. Nueva York.

American Public Health Association. 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater. 15th ed. American Public Health Association, Washington DC.

Buck, J.D. 1979. The plate count in aquatic microbiology, p.19-28. *In* J.W. Costerton & R.R. Colwell (eds.). Native aquatic bacteria: Enumeration, activity and ecology, ASTM STP 695, Am. Soc. Test. Mater.

Colwell, R.R., R.K. Sizemore, J.F. Comey, R.Y. Morita, J.D. Nelson, J.H. Pickar, J. Schwarz, S.D. Van Valkenburg, J.D. Walker. & R.T. Wright. 1975. Marine and estuarine microbiology manual. Univ. Park Press, p. 29-31.

Sokal, R.R. & J. Rohlf. 1979. Biometría. Blume, Madrid. 832 p.

Taga, N. & O. Matsuda. 1974. Bacterial population attached to plankton and detritus in seawater, p.443-448. *In* R.R. Colwell & R.Y. Morita (eds.). Effects of the ocean environment on microbial activities. Univ. Park Press, Baltimore.

Troussellier, M. & B. Balcux. 1981. Approche méthodologique pour l'analyse de peuplements bactériens hétérotrophes des étangs littoraux. *Acta Oecologica* 1: 63-74.

Weiner, R.M., D. Hussong & R.R. Colwell. 1980. An estuarine agar medium for enumeration of aerobic heterotrophic bacteria associated with water, sediment and shell fish. *Can. J. Microbiol.* 26: 1366-1369.