

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

- FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS -

BACTERIAS DEL CICLO DEL NITROGENO EN EL EMBALSE DEL
RIO TERCERO (CORDOBA) - FACTORES ECOLOGICOS RELACIONADOS

ALEJANDRO JORGE MARIÑELARENA

Director: Dr. Aldo Amílcar MARIAZZI

Trabajo de Tesis para optar al grado de
"DOCTOR EN BACTERIOLOGIA CLINICA E INDUSTRIAL"

- 1984 -

AUTORIDADES UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

RECTOR:

Ing.Qco. Raúl Adolfo PESSACQ

SECRETARIO GENERAL:

Ing.Qco. Pablo Oscar LUCHESSI

PROSECRETARIO GENERAL:

Sr. Néstor Miguel MASCIOTO

SECRETARIO DE ASUNTOS LEGALES:

Dr. Hugo Jorge PACHECO

SECRETARIO DE ASUNTOS ECONOMICOS-FINANCIEROS:

Cont. Aldo H. ROSSI

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Prof. María Celia AGUADO de CORSICO

AUTORIDADES FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DECANO: Dr. Fortunato B. ISEAS

VICEDECANO: Dra. María E. ETCHEVERRIGARAY

Secretario de Supervisión Administrativa:

Sr. Omar Hugo RAMIREZ

Directora de Enseñanza:

Sra. Haydée C.R. de PERETTO

Directora de Biblioteca:

Srta. Hebe PEDERNERA

Director Económico Financiero:

Sr. Héctor S. MOREIRA

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS

PROFESOR TITULAR "DEDICACION EXCLUSIVA"

ANGULO, Eusebia	Investigadora	Titular
CARROZZA, Jesús S.W.	Íntrod. a la Biofísica	Titular
ETCHEVERRIGARAY, María E.	Virología	Reempl.
MARTIN, Alcides A.	Anat. y Fisiol.Patológica	Titular
MENENDEZ, Néstor A.	Patolog. de Aves y Pilíf.	Interino
PRACCA, Lydia C.	Clínica de Pequeñ.Animales	Titular
QUINTEROS, Indalecio R.	Genética y Biometría	Titular
ZACCARDI, Eduardo M.	Fisiología	Titular

PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiología Especial	Titular
ALBERDI, Cecilio	Tec. y Sanidad Alimentos	Titular
ANDREATTA, Jorge Nelson	Semiología y Propedéutica	Titular
BERTOLINI, José M.	Anatomía Comparada	Interino
DELPRATO, Ismael Oscar	Anat.Descriptiva y Topog.	EMERITO
FERNANDEZ, Enrique	Enfermedades Infecciosas	Asc. 31-12-83
JENSEN, Alicia Dora	Bioestadística	Titular
LED, Jorge Eugenio	Parasit. y Enferm.Parasit.	Interino
MANZULLO, Alfredo	Inmunología I y II	EMERITO
MAROTTA, Eduardo G.	Zoot. Especial I (OSC)	Titular
OCHOA, Mario E.	Director Inst. Sta.Catalina	Interino
OTTINO, Julio F.	Histología y Embriología	Interino
PENNIMPEDE, Enrique F.F.	Inmunología Gral.y Aplic.	Titular
PIOVANO, Nicolás M.	Introduc. a la Bioquímica	Titular
RODRIGUEZ, Benjamín R.	Zootecnia Esp. II (B.y E.)	Titular

PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiología Aplicada	Titular
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos I	Interino
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos II	Titular
BOCCIA, Francisco O.	Patología Q. y Podología	Interino
CARROZZA, Jesús S.W.	Física y Quím. Aplicadas	Reempl.

de ANTONI, Graciela A.	Genética Microbiana	Titular
GIMENO, Emilio Juan	Higiene y Epidem. y S. Públ.	Titular
ISEAS, Fortunato Blas	Patología Médica	Interino
MARTIN, Alcides A.	Patología General	Titular
MARTINO, Olindo A.L.	Salud Pública	Titular
OSTROWSKI, Jorge E.B.	Patología de la Reprod.	Titular
PANZONI, Erico Emir	Economía Agraria	Titular
PEROTTI, Rodolfo M.	Zoot. Esp. III (A. y P.)	EMERITO
SCIAMMARELLA, Alfredo M.	Medicina Operatoria	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION EXCLUSIVA"

BOCCIA, Francisco O.	Clínica de Peq. Animales	Reempl.
BRANDETTI, Eugenio	Patología de Aves y Pilíf.	Reempl.
ERRECALDE, Julio R.	Farmacología F. y Terap.	Interino
IDIART, Julio R.	Anat. y Fisiología Patol.	Titular
LAGRECA, Liliana	Zoot. Gral. y Agrostología	Titular
MONINA, Marta I.	Clínica de Grandes Animal.	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

DIBBERN, Alberto R.	Zoot. Especial II P (B y E)	Interino
DURANTE, Eduardo J.	Servicio C. de Cirugía	Interino
FELDMAN, Raquel E.	Parasit. Comparada	Titular
GIMENO, Eduardo J.	Patología General	Titular
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología II	Interino
GRILLO, Virginia	Zoot. Esp. III P (A. y P.)	Interino
HERRERA CANALES, Félix R.	Anatomía Comparada	Reempl.
MAGGI, Nilda B.	Servicio C. de Cirugía	Reempl.
MARTINO, Juan J.	Microbiología	Titular
NOIA, Miguel A.	Introduc. a la Biofísica	Titular
NOVARINI, Miguel A.	Farmacolog. F. y Terap.	Interino
OLIVA, Graciela A.	Virología	Reempl.
ORTEGA, César F.	Semiología y Propedéutica	Titular
PENNINMPEDE, María T. del A.	Tecnología y S. Aliment.	Titular
REINOSO, Enzo H.	Micología Médica e Ind.	Interino
RUAGER, Jorge	Anatomía y Fisiol. Pat.	Titular
REPETTO SANCHEZ, Olindo	Medicina Operatoria	Reempl.

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE"

BACIGALUPO, Néstor R.	Tec. y Sanidad de los Anim.	Titular
BRAVO BARDALES, Tomás	Economía Agraria	Reempl.
FERNANDEZ de LIGER, J.H.	Clín.de Grandes Animales	Titular
FINOCHIETTO, Héctor D.	Patología Médica	Interino
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología Gral. y A.	Interino
MAGGI, Nilda B.	Patología Quirúrgica y P.	Interino
MALIANDI, Florestán S. (h)	Higiene, Epid. y S.Pública	Titular
MOISO, Alejandro C.	Microbiología	Titular
PRILO LOFEUDO, Graciela E.	Zoot. Especial III (A.y P.)	Interino
RENNER, Juan F.	Clínica de Grandes Animal.	Interino
ROJAS, Edmundo R.	Fisiología	Titular
RUTTER, Bruno	Patología de la Rep.y Obst.	Titular
TARSIA, Elba Elena	Int. a la Biofísica	Titular
TESORIERO, Catalina	Microbiología Especial	Interino
VENTURINI, Lucila M.	Parasit. y Enferm. Parasit.	Interino
VILLAR, Martha E.	Análisis Clínicos I Parte	Interino
VILLAR, Martha E.	Análisis Clínicos II Parte	Interino
YANNARELLA, Francisco G.	Parasitol. y Enferm. Paras.	Interino

JEFE DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION EXCLUSIVA"

BASCHAR, Héctor O.	Clínica de Grandes Animal.	Interino
FONROUGE, Reinaldo D.	Higiene, Epidem. y S.Pública	Interino
RONCINO, Roberto	Sección Radioisótopos	Interino
TEJEDOR, Eugenio D.	Genética y Biometría	Interino

JEFE DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

ALIVERTI, Héctor M.	Zootecnia Espec.II (B.y E.)	Interino
ALLENDE, Miriam G.	Servicio C. de Cirugía	Interino
ALLEVATO, Hugo L.	Higiene, Epidem. y S.Pública	Interino
AMASINO, Carlos F.	Enfermedades Infecciosas	Interino
ARGERICH, María C.	Genética y Biometría	Reempl.
AULICINO, Oscar O.	Tecnología y S. de los A.	Interino
BABUSCI, Máximo	Fisiología	Interino
BAMBILL, Emilia C.	Zoot. Esp. I P (OSC)	Interino
BARRENA, Javier E.	Anatomía Descriptiva y T.	Interino

BERNAGOZZI, Jorge A.	Inmunol.Gral.y Aplicada	Interino
BISCHOFF, Jorge R.	Genética y Biometría	Interino
BUGALLO, Antonio	Farmacol. F. y Terapéut.	Interino
BUTLER, Eduardo A.	Patología Quirúrgica y P.	Reempl.
CARBONE, Cecilia	Animales de Laboratorio	Interino
CASTUMA, María E.	Introduc. a la Bioquímica	Interino
CREDARO, Cristina N.	Análisis Clínicos I P	Interino
del CASTILLO, Federico C.	Histología y Embriología	Interino
DRAGONETTI, Ana María	Clínica de Pequeños Animal.	Interino
FORNER, Jesús J.A.	Tecn. y Sanit. de los Alim.	Interino
FREGOSI, Mario O.	Anatomía Descrip. y Topog.	Interino
FRIGOLI, Alicia E.	Introd. a la Biofísica	Interino
FRIGOLI, Alicia E.	Introd. a la Biofísica	Interino
FUENTES, Leticia S.	Introd. a la Biofísica	Interino
GARCIA VALENTI, Horacio	Zootecnia Esp.III (B.y E.)	Interino
GIANOTTI, Ricardo S.	Tec.y Sanidad de los Alim.	Interino
GIMENO, Eduardo J.	Anat. y Fisiol.Patológica	Interino
GOITIA, Oscar F.	Zootecnia Esp.II (B.y E.)	Reempl.
GONZALEZ, Ester T.	Virología	Interino
GUAJARDO, Margarita H.	Introd. a la Bioquímica	Interino
GUGLIELMETTI, Elda M.C.	Introd. a la Biofísica	Interino
GUGLIELMETTI, Elda M.C.	Física y Química Aplicadas	Interino
IBARGOYEN, Guillermo S.	Patología General	Interino
LACCHINI, Raúl A.	Zootecnia Gral. y Agrostol.	Interino
LINZITTO, Oscar R.	Histología y Embriología	Interino
MARCANTONI, Hugo	Histología y Embriología	Interino
MASSONE, Raúl A.	Clínica de Grandes Animal.	Interino
MILLAN, Margarita D.	Anatomía Descrip. y Topog.	Interino
MONTESINOS RAMOS, Ignacio	Clínica Grandes Animales	Interino
MURO, Alicia M.	Clínica Pequeños Animales	Interino
ORELLANA, Jorge	Histología y Embriología	Interino
PELLON, Horacio S.	Tecnol. y S. de los Aliment.	Interino
PIACENTINI, Enrique	Tecnol. y S. de los Aliment.	Interino
PIAZZA, Delia D.	Microbiología Especial	Interino
PONS, Eduardo E.	Clínica Grandes Animales	Interino
RADMAN, Nilda E.	Parasit.y Enferm.Parasit.	Interino
RAMIREZ, Luis E.	Anat. Descript. y Topog.	Interino
RECALDE, Ricardo J.	Patol.Quirúrgica y Pod.	Reempl.
RIVADAVIA, Carlos A.	Introduc. a la Bioquímica	Interino
SALAS, Laura I.	Semiología y Propedéutica	Reempl.
SALESSI, Enrique	Fisiología	Reempl.

SARA, Raúl C.	Patol.de la Reprod. y O.	Interino
SCAVIA, Ricardo C.	Anatomía Comparada	Interino
TABORCIA, Juan A.	Patología General	Interino
TARABUSSO, Ricardo	Semiología y Propedéutica	Interino
TREBUCQ, Rubén A.	Inmunol. Gral. y Aplicada	Interino
VENTURINI, María C.	Inmunol. Gral. y Aplicada	Interino
VARELA, Juan A.	Microbiología	Reempl.
VOCOS GIMENEZ, Sara T.	Zoot. Esp. II (B. y E.)	Interino

JEFE DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION SIMPLE"

ALLEVATTO, Susana del C.	Zootecn. Gral. y Agrost.	Reempl.
AVILA, Silvia M.	Microbiología Especial	Interino
BERNAGOZZI, Jorge A.	Inmunología Gral. y Aplic.	Interino
CALONGE, Carlos A.	Patología Médica	Interino
CASTAÑEDA, Alberto C.	Clínica de Pequeños Anim.	Interino
CESAR, Norberto	Patología Médica	Reempl.
CUETO, Eduardo R.	Zootecn.Especial II (B.y E)	Interino
CHIARAVALLI, Juan C.	Zootecn.Gral. y Agrostol.	Interino
DELGADO CAFFE, Osvaldo L.	Higiene, Epidem. y S.Públ.	Interino
ELSO, Liliana E.	Enfermedades Infecciosas	Reempl.
FERNANDEZ de LIGER, J.H. (h)	Patología Médica	Interino
FORMENTI, Liliana E.	Microbiología Aplicada	Reempl.
GALLO, Guillermo F.	Fisiología	Interino
GARCIA FRONTINI, María V.	Parasitología y Enferm.Par.	Interino
GIMENEZ, Mabel A.	Zootecnia Especial I (OSC)	Interino
GRAMIGNA, Tomás E.	Taller de Educación	Interino
HERNANDEZ, Zulma H.	Salud Pública	Interino
LACCHINI, Raúl A.	Zootecnia Especial I (OSC)	Interino
LOJO, María E.	Genética Microbiana	Interino
MANACORDA, Ana María	Anatomía Descriptiva y T.	Reempl.
MARILUNGO, Aníbal J.	Medicina Operatoria	Interino
MELANI, Gustavo H.	Patología Médica	Interino
MORRIS, Marta Rita	Micología Médica e Indust.	Interino
NICODEMO, María del C.	Zootecn.Espec. III P (A y P)	Interino
NOSETTO, Edgardo O.	Clínica de Grandes Anim.	Interino
OCAMPO, Jesús M.F.	Introd. a la Biofísica	Interino
PERFUMO, Juan C.	Anatomía y Fisiol.Patol.	Interino
ROMERO, Jorge R.	Parasit. y Enferm.Infec.	Interino
RONSIÑO, Roberto O.	Fisiología	Interino

SANCHO, José J.I.	Medicina Operatoria	Interino
SIMPSON, María I.	Introd. a la Biofísica	Interino
TOBIA, Marta B.	Microbiología Aplicada	Interino
TREBUCQ, Rubén A.	Inmunología I Parte	Interino
TUNES, María del L.	Microbiología	Interino
VALLEJOS, Ethel Victoria	Patología Médica	Interino
VENERE, Rodolfo L.	Zóotec.Gral. y Agrostol.	Reempl.
WARD, Miguel V.	Farmacol. F. y Terapéut.	Reempl.

AYUDANTES DIPLOMADOS "DEDICACION EXCLUSIVA"

AVILA, Silvia M.	Histología y Embriología	Interino
CASTELLANO, María C.	Clínica de Pequeñ.Animal.	Interino
CATALANO, Vicente A.	Histología y Embriología	Interino
CERRUTTI, Augusto S.	Sección Radioisótopos	Interino

AYUDANTES DIPLOMADOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

BERISSO, Marcela M.	Enfermedades Infecciosas	Interino
CABRAL, Marta S.	Tec. y Sanid.de los Alim.	Interino
CAMINO, Ricardo A.	Microbiología Especial	Interino
FLAMINI, Mirta A.	Histología y Embriología	Reempl.
GONZALEZ SANGUINETTI, Silvia	Introd.a la Bioquímica	Interino
HUERTA, Alicia N.	Introd.a la Bioquímica	Interino
MARENGO, Alejandro G.	Higiene Epid. y S.Pública	Interino
MILLAN, Roberto G.	Histología y Embriología	Interino
NOSETTO, Edgardo	Virología	Interino
PETRUCELLI, Miguel A.	Patolog.de Aves y Pilíf.	Interino
RAMIREZ, Luis E.	Clín. de Pequeños Animal.	Interino
RENARD, Jorge L.	Tecnol. y S. de los Alim.	Interino
RIVADENEIRA, Elizabeth	Clínica de Grandes Animal.	Reempl.
RULE, Roberto	Farmacol. F. y Terapéut.	Interino
TABORCIA, Juan A.	Enfermedades Infecciosas	Interino
URQUIOLA, Horacio M.	Fisiología	Reempl.
ZOHUAR, Edith	Clínica de Pequeños Anim.	Interino

AYUDANTES DIPLOMADOS "DEDICACION SIMPLE"

ALONSO, Juan C.	Genética Microbiana	Interino
ALT, Celia M.	Microbiología Especial	Interino
ALLEVATTO, Susana del C.	Zoot.Gral. y Agrostología	Reempl.
ANTONINI, Alicia G.	Genética y Biometría	Interino
APREA, Adriana N.	Médecina Operatoria	Interino
ARCHELLI, Susana Mónica	Parasitol. Comparada	Interino
BISCAYART, Adriana C.	Introduc. a la Biofísica	Reempl.
BORISOFF, Liliana E.	Clínica Grandes Animales	Reempl.
BUSCAGLIA, Celina	Zoot.Especial III (A. y P.)	Int. 1.
CALVO, Carlos J.	Anatomía y Fisiol. P.	Interino
CAMINO, Ricardo A.	Animales de Laboratorio	Interino
CATALANO, Vicente A.	Sección Audiovisuales	Interino
CERRUTTI, Augusto S.	Fisiología	Interino
COLOCCIA PAYBA, Lilian G.	Anat. y Fisiol.Patológica	Interino
CORTEZ, Guillermo F.	Higiene,Épidem. y S.Pública	Interino
COURREGES, Marta M.	Patol. de Aves y Pilíferos	Interino
CUELLO, Carlos E.	Clínica de Grandes Animal.	Reempl.
DELGADO CAFFE, Osvaldo L.	Bioestadística	Interino
DI LEO, Julio A.	Zootecnia Especial I P.	Interino
DOMINELLI, Heraldo A.	Patología Quirúrgica y P.	Interino
FEATHERSTON, Patricia L.	Micología Médica e Ind.	Interino
FERREYRA, Juan C.	Farmacología F. y Terap.	Interino
GALOSI, Cecilia M.	Introd. a la Bioquímica	Interino
GONZALEZ, Ester T.	Microbiología Aplicada	Interino
GUILLEN, Griselda	Análisis Clínicos I P.	Interino
IRASTORZA, Jorge A.	Patología Médica	Reempl.
LASTA, Gregorio	Semiología y Propedéutica	Reempl.
MARTINS, Stella M.	Economía Agraria	Reempl.
MEZZERA, Ana María	Clínica de Pequeños Anim.	Interino
PIAZZA, Delia A.	Microbiología Aplicada	Reempl.
PONZONE, Eduardo A.	Pat.de la Repr.y Obstetr.	Interino
REGGIOSO, Ana María	Introd. a la Biofísica	Interino
ROSSI, Ismael D.	Enfermedades Infecciosas	Reempl.
SANGUINETTI, Héctor R.	Anatomía y Fisiol.Patol.	Interino
SARMIENTO, Alejandro D.	Enfermedades Infecciosas	Reempl.
SENISTERRA, Guillermo R.	Introd. a la Bioquímica	Reempl.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Aldo Mariazzi por la paciente conducción de este proyecto y la confianza depositada en mi persona; a los técnicos del Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" Jorge Donadelli, Mónica Alt, Justina Ponte Gómez y María Teresa Corrales por su valiosa colaboración; al Dr. John G. Jones de Freshwater Biological Association por su inestimable ayuda al discutir los planes y métodos de trabajo y por su importante aporte bibliográfico; al personal a cargo del Centro de Piscicultura Embalse Dr. Marcelo Gache y Lic. Miguel Hechem por su desinteresado e incondicional apoyo; a la Arq. Patricia Mariñelarena por la realización de los gráficos del presente trabajo, y a la Dirección y personal del Instituto de Limnología por su camaradería y estímulo.

A mis padres por su esfuerzo y ejemplo

Este trabajo fue subsidiado con una beca de perfeccionamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y con fondos del convenio establecido entre la Comisión Nacional de Energía Atómica y el Instituto de Limnología de La Plata "Dr. Raúl A. Ringuelet" (ILPLA), para el estudio ecológico del Embalse del Río Tercero en la provincia de Córdoba. Se realizó bajo la dirección del Dr. Aldo A. Mariazzi, llevándose a cabo los trabajos de laboratorio en la Sección Bacteriología del ILPLA, y los trabajos de campo y las experiencias con muestras frescas o inalteradas en las instalaciones que muy gentilmente cediera el personal a cargo del Centro de Piscicultura Embalse.

El tema fue elegido con la intención de contribuir al conocimiento de los ecosistemas acuáticos en general, y en particular, de un aspecto importante de los procesos de evolución y/o deterioro de los mismos. La muy escasa información existente sobre el tema en cuanto a los ambientes de nuestro país sirvió de gran aliciente para impulsar este proyecto.

Debido a ello consideré oportuno incluir a modo de introducción, junto al plan de trabajos y a una descripción concisa del ambiente estudiado, una breve reseña sobre el Ciclo del Nitrógeno, señalando principalmente el tipo de microorganismos que en él intervienen y los procesos que llevan a cabo.

- INDICE -

I. INTRODUCCION.....	1
I.1. EL CICLO DEL NITROGENO.....	1
I.2. PLAN DE TRABAJO.....	6
I.3. EL EMBALSE DE RIO III.....	7
II. OBJETIVOS.....	11
III. MATERIALES Y METODOS.....	12
III.1. ESTACIONES DE MUESTREO.....	12
III.2. METODOS DE OBTENCION DE MUESTRAS.....	13
III.2.1. Métodos de obtención de muestras de agua.....	13
III.2.2. Método de obtención de muestras de la interfase agua-sedimento.....	15
III.2.3. Métodos de obtención de muestras de sedimentos.....	17
III.3. METODO DE DETERMINACIONES FISICO-QUIMICAS.....	19
III.3.1. Temperatura.....	19
III.3.2. Oxígeno disuelto.....	20
III.3.3. pH.....	20
III.3.4. Alcalinidad total.....	20
III.3.5. Amonio, nitritos y nitratos.....	20
III.4. METODOS DE CULTIVO Y CUANTIFICACION DE BACTERIAS.....	22
III.4.1. Bacterias heterotróficas totales.....	24
III.4.2. Bacterias amonificantes.....	24
III.4.3. Bacterias denitrificantes.....	25
III.4.4. Bacterias reductoras de nitratos.....	27
III.4.5. Bacterias nitrificantes.....	29

III.5. METODOS DE AISLAMIENTO Y CLASIFICACION DE BACTERIAS.....	31
III.5.1. Bacterias reductoras de nitratos.....	31
III.5.2. Bacterias denitrificantes.....	32
III.5.3. Bacterias nitrificantes.....	33
III.6. METODOS DE ENSAYOS BIOLOGICOS.....	33
III.6.1. Demanda bioquímica de oxígeno.....	33
III.6.2. Nitrificación.....	35
III.6.3. Reducción de nitratos.....	36
IV. RESULTADOS.....	37
IV.1. PARAMETROS FISICOS Y QUIMICOS.....	37
IV.2. BACTERIAS.....	45
IV.3. CLASIFICACION DE LAS BACTERIAS.....	59
IV.4. ENSAYOS BIOLOGICOS.....	62
IV.4.1. Demanda bioquímica de oxígeno.....	62
IV.4.2. Nitrificación.....	65
IV.4.3. Reducción de nitratos.....	67
V. RESUMEN.....	71
RESULTADOS.....	72
VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	75
VII. BIBLIOGRAFIA.....	81

I. INTRODUCCION

I.1. EL CICLO DEL NITROGENO

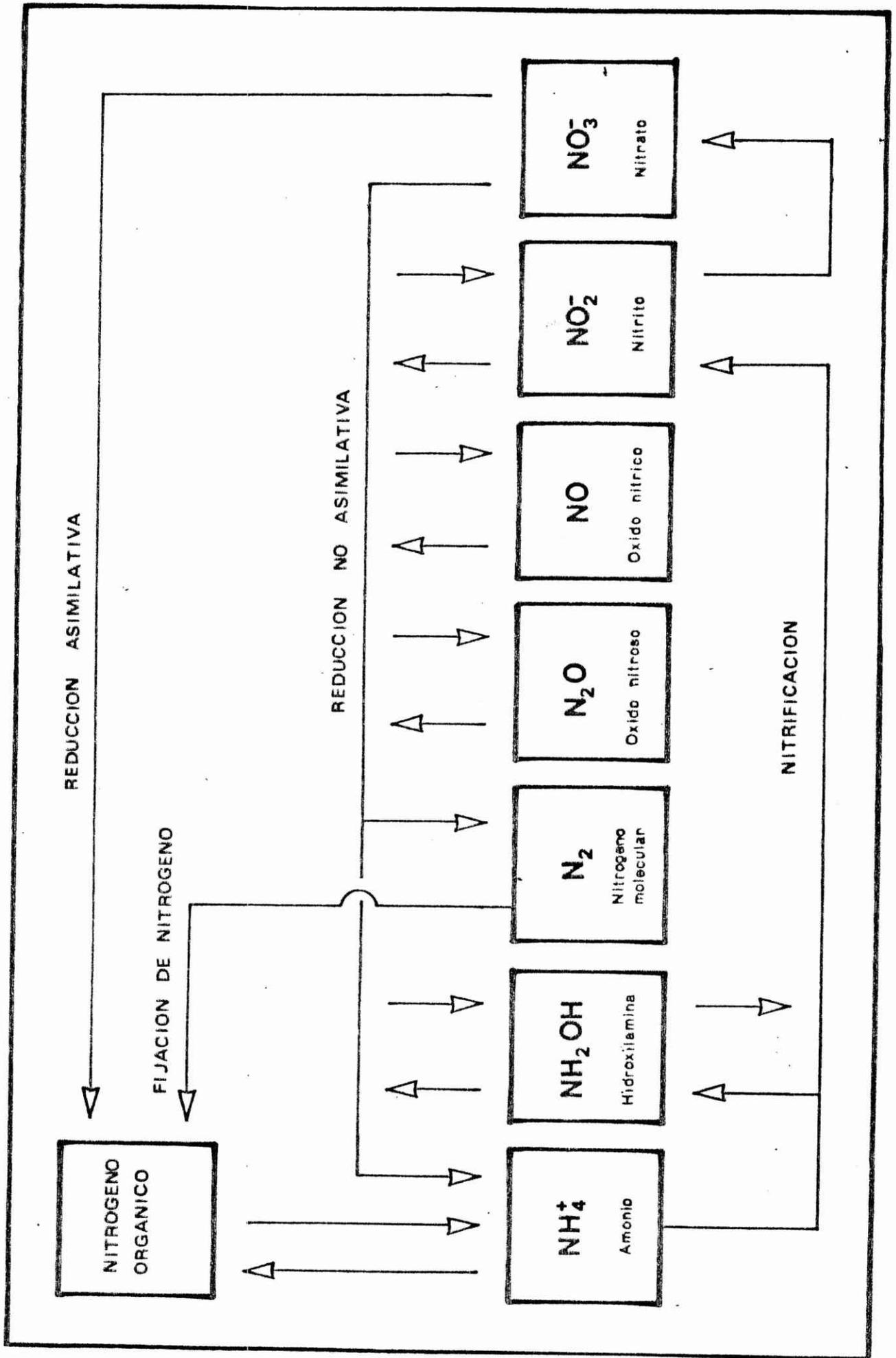
El nitrógeno es un elemento abundante en la naturaleza, que constituye aproximadamente el 79% de la atmósfera. Es también uno de los elementos principales en la composición química de todos los seres vivos junto con el carbono, hidrógeno y oxígeno.

La molécula de nitrógeno elemental (N_2), por ser químicamente inerte, no representa un recurso disponible de este elemento para la mayoría de las formas vivas. Sólo escapan a esta regla, algunas algas unicelulares y algunos grupos de bacterias, pero prácticamente todos los animales, plantas superiores y microorganismos, dependen para su nutrición, de formas combinadas de nitrógeno. Stanier (54).

Las plantas verdes, productores primarios, utilizan compuestos simples de nitrógeno inorgánico para elaborar sus elementos constituyentes que, a su vez, son la fuente, directa o indirecta, de nitrógeno para los demás integrantes de la comunidad (consumidores).

Por esto se deduce fácilmente, que la provisión de nitrógeno para la comunidad viva de un ambiente determinado, depende de la cantidad de nitrógeno inorgánico que se halle disponible en el mismo. De aquí la importancia de la existencia en la naturaleza, de procesos biológicos de recuperación del nitrógeno ya utilizado, el que es extraído de las moléculas orgánicas complejas y devuelto al ambiente en forma de moléculas inorgánicas simples, para su reutilización.

Esta serie de transformaciones conforman el denominado ciclo del nitrógeno. El Esquema 1 representa sus principales pasos y los compuestos involucrados.



Esquema 1: El ciclo del Nitrógeno

Todas las transformaciones son efectuadas por microorganismos.

Las plantas asimilan el amonio o los nitratos para la producción de sus compuestos orgánicos nitrogenados. Wetzel (60); Stanier (54). Si bien los nitratos deben ser reducidos a amonio para su utilización en la célula, es éste el recurso que provee mejor rendimiento para el crecimiento vegetal. Wetzel (60). Durante el metabolismo vegetal no hay excreción importante de compuestos de nitrógeno. Stanier (54).

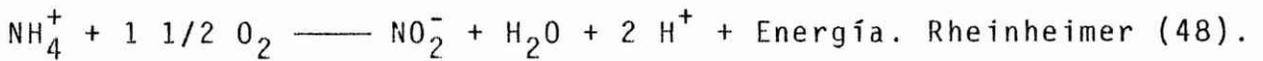
El nitrógeno orgánico producido por las plantas es utilizado por los animales para conformar sus propias proteínas. Estos sí excretan grandes cantidades de nitrógeno en forma de moléculas simples como amoníaco, en el caso de los invertebrados; ácido úrico, los reptiles y las aves; y urea, los mamíferos. Estos dos últimos productos del metabolismo animal, son rápidamente transformados en dióxido de carbono y amonio en los ambientes naturales. Stanier (54).

Cuando una planta o animal muere, el nitrógeno de sus compuestos es liberado mediante una serie de procesos, comunmente llamados putrefacción, mineralización o amonificación, llevados a cabo por numerosos grupos de bacterias heterotróficas y hongos. Lo mismo ocurre con sus productos de excreción. Kuznetsov (34); Rheinheimer (48).

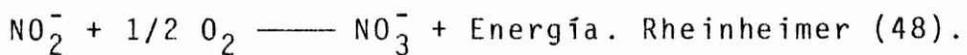
El primer paso de dichos procesos es la hidrólisis de proteínas y ácidos nucleicos con liberación de amino ácidos y bases nitrogenadas. Luego, por decarboxilación o desaminación, según la reacción (pH) del medio, las aminos terminales de los amino ácidos son liberadas como amonio. Kuznetsov (34). Estas transformaciones ocurren en aerobiosis y en anaerobiosis, principalmente en los sedimentos del fondo, en caso de ambientes acuáticos, aunque también en el agua libre en menor proporción.

En el primer caso, sedimentos, el amonio liberado se acumula en el agua intersticial y se liga a las partículas del se dimento por enlaces iónicos. A medida que se produce, se difunde lentamente al agua libre y así, al ambiente. De esta forma puede ser utilizado nuevamente por las plantas o las bacterias para su nutrición.

Por otra parte, el amonio en presencia de oxígeno, puede ser oxidado a nitratos por acción de las bacterias nitrificantes, en el proceso denominado nitrificación. Este consta de dos fases. La primera, también llamada nitritación, consiste en la oxidación de amonio a nitritos, realizada principalmente por bacterias del género *Nitrosomonas* y algunas otras de menor importancia. La ecuación general que representa esta fase es:



En la segunda, llamada de nitratación, los nitritos son oxidados a nitratos, principalmente por bacterias del género *Nitrobacter*. La ecuación general es:



La energía producida en estas reacciones es utilizada por los microorganismos implicados en el proceso para reducir dióxido de carbono y elaborar sus carbohidratos. Estos microorganismos conforman dos grupos de bacterias muy especializadas, quimioautotróficas, aeróbicas obligadas. Estas necesitan amonio, oxígeno y dióxido de carbono para su metabolismo, pero la nitrificación no se detiene, aún en concentraciones de oxígeno tan pequeñas como 0,3 mg/l, pudiendo además, sobrevivir dichas bacterias durante largos períodos en ambientes anóxicos. Wetzel (60).

Los nitratos producidos en el proceso de nitrificación se difunden en el medio ambiente y pueden ser utilizados en distintas formas. Una de ellas es la reducción asimilativa, en la cual los nitratos, previamente reducidos a amonio, son incorporados a las células, tanto de plantas como de bacterias. Otra forma es la reducción no asimilativa, en la cual los nitratos son utilizados por algunas bacterias como aceptor alternativo de electrones, en lugar del oxígeno, para la oxidación de materia orgánica y obtención de energía. Así los nitratos son reducidos a nitritos, reacción catalizada por la enzima de membrana nitrato reductasa. Fenchel (14). Muchas bacterias heterotróficas poseen esta capacidad recibiendo la denominación de "bacterias reductoras de nitratos".

Los nitritos producidos se acumulan en el medio y en presencia de oxígeno pueden ser oxidados nuevamente a nitratos por las bacterias nitrificantes. En anaerobiosis los nitritos pueden sufrir una serie de reducciones sucesivas liberándose nitrógeno molecular como producto final. Este fenómeno se llama denitrificación y sólo algunas especies de bacterias reductoras de nitratos poseen el sistema enzimático para realizarlo, conformando el subgrupo de las bacterias denitrificantes. Stanier (54); Fenchel (14).

Jones (30) menciona, al igual que otros autores, la posibilidad de que, en determinadas circunstancias, la reducción de nitratos pueda continuar hasta producir amonio.

Muchos autores, como Knowles (45), sugieren que la nitrificación y la denitrificación, aunque son reacciones opuestas y se realizan en condiciones de óxido-reducción totalmente diferentes, coexisten en el mismo ambiente. Ello se explica por la formación de micro-habitats anóxicos en el seno de partículas orgánicas dispersas en un ambiente oxigenado.

El nitrógeno gaseoso, producto final de la denitrificación, abandona el sistema en forma de burbujas y se pierde en la atmósfera. Existe un sistema inverso que permite la incorporación de nitrógeno atmosférico al ciclo y se llama fijación de nitrógeno molecular.

Los organismos capaces de fijar nitrógeno molecular son bacterias simbióticas y asimbióticas y algas verde-azuladas.

En los ambientes acuáticos existen numerosas bacterias capaces de fijar el nitrógeno molecular en forma asimbiótica.

Representantes de los géneros *Azotobacter* y *Clostridium*, principalmente, y en condiciones especiales, algunas bacterias fotosintéticas fijan el nitrógeno atmosférico. Wetzel (60); Stanier (54). Frente a la fijación realizada por las algas verde azuladas (Cyanophyta), la actividad bacteriana es habitualmente despreciada. Rheinheimer (48).

En general se asume que las pérdidas de nitrógeno molecular por denitrificación y su ingreso por fijación, se compensan en forma aproximada, si bien, existen casos particulares en que esto no se cumple. Stanier (54).

I.2. PLAN DE TRABAJO

Esta breve reseña sobre los aspectos más importantes del ciclo del nitrógeno en aguas naturales nos permite comprender el papel fundamental que desempeñan las bacterias en los distintos procesos que lo componen.

Durante la realización de este trabajo, y para cumplir lo más ampliamente posible con los objetivos prefijados, se estudiaron seis grupos de bacterias fisiológicamente diferentes. Ellos son: bacterias heterotróficas aeróbicas totales, bacterias amoni-

ficantes, bacterias reductoras de nitratos, bacterias denitrificantes y bacterias nitrificantes (nitritadoras y nitratadoras), cuyas funciones en el ciclo del nitrógeno ya fueron explicadas. Sólo se dejó de lado el grupo de las bacterias fijadoras de nitrógeno molecular contemplando que su actividad suele ser de escasa importancia y que para su estudio hubiese sido necesario incorporar una metodología diferente a la de los restantes grupos fisiológicos.

Se analizó la distribución y concentración de los compuestos inorgánicos de nitrógeno más importantes como amonio, nitritos y nitratos y algunas características físico-químicas de los ambientes donde aquellos se producen y que pudieran influenciar en los procesos involucrados. Se realizaron mediciones de temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad eléctrica, alcalinidad, entre otras.

Finalmente se realizaron ensayos biológicos con muestras inalteradas con el fin de establecer la magnitud de las distintas actividades bacterianas como demanda bioquímica de oxígeno, nitrificación, reducción de nitratos y los factores ambientales que las influncian.

I.3. EL EMBALSE DE RIO III

El embalse del Río Tercero es un lago artificial ubicado en la provincia de Córdoba a 32°11' latitud Sur y 64°13' longitud Oeste, cuyo represamiento se concluyó en 1930. Tiene una superficie, a nivel del vertedero, de 5.426 Has, un volumen de 560 Hm³ y una profundidad máxima de 42,5 m.

Está dividido en dos grandes lóbulos, uno más pequeño al Norte con el punto de mayor profundidad cerca del muro de con-

tención, y otro mayor al Sur, más playo, que recibe a los tres principales afluentes del sistema. Ambos lóbulos se hallan unidos por una garganta estrecha y corta. (Fig. 1).

A orillas de este cuerpo de agua, la Comisión Nacional de Energía Atómica construyó una central de energía termo eléctrica (Centro Nuclear Embalse) accionada por un reactor de fisión nuclear, que se ^{está} pondrá en funcionamiento en 1983 y utilizará el agua del lago para fines de refrigeración. Esta situación puede traer aparejadas una serie de modificaciones ambientales que, aún no siendo catastróficas, pueden producir alteraciones en el actual funcionamiento del ecosistema. Entre esos cambios pueden hallarse involucrados algunos aspectos del ciclo del nitrógeno. Descartando cualquier tipo de accidente, se debe tener en cuenta que un incremento en la temperatura del efluente del sistema de enfriamiento, producirá un incremento en el metabolismo de los organismos en contacto con el mismo.

Por otro lado, es probable que a su paso por el sistema, parte del plancton del agua muera por agresiones mecánicas y térmicas, lo que llevaría a una acumulación de materia orgánica en la zona de salida con el consiguiente aumento de la putrefacción (amonificación), consumo de oxígeno y liberación de nutrientes de nitrógeno, especialmente amonio. Esto a su vez, puede alterar otros fenómenos encadenados como la tasa de productividad primaria, producción de biomasa algal, etc.

Desde el año 1977, por un convenio realizado entre la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), personal del Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" de la ciudad de La Plata se halla abocado al estudio de este ecosistema, con el fin de establecer sus características físico-químicas y biológicas y poder así evidenciar los posibles cambios, si éstos ocurrieran, en años venideros.

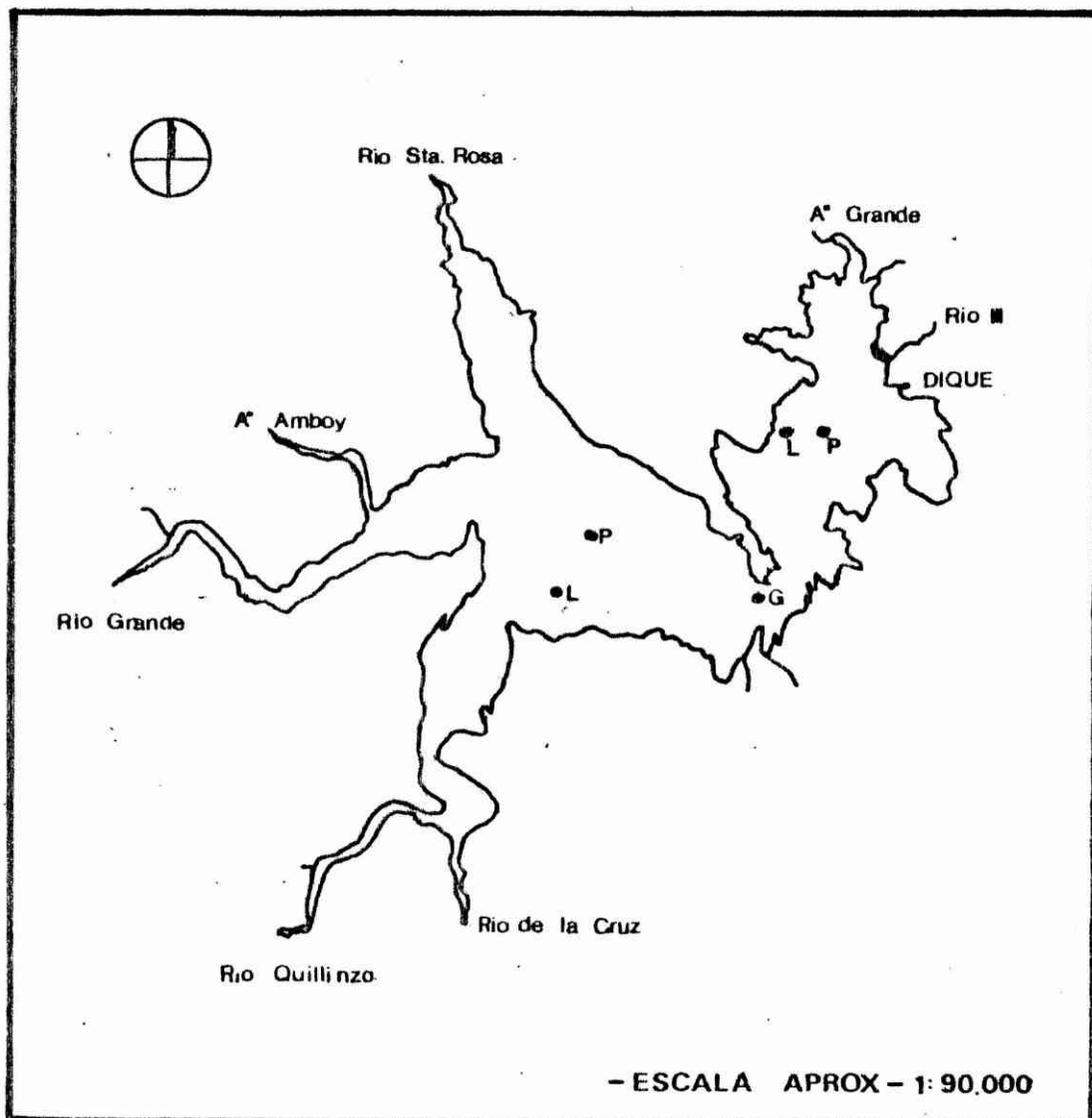


Figura 1: El embalse del Río Tercero, sus principales afluentes y las estaciones de muestreo.
 L = litoral; P = profunda; G = garganta.

Es en este contexto que surge la necesidad de llevar a cabo el presente trabajo, teniendo en cuenta que no existen precedentes de obras similares en nuestro país y que sus resultados pueden ofrecer algún aporte para el conocimiento de los complejos sistemas ecológicos y de los efectos de su alteración.

II. OBJETIVOS

Con este trabajo se pretende contribuir al conocimiento de las bacterias que intervienen en el ciclo del nitrógeno y su cantidad y distribución temporal y espacial en un ambiente acuático continental representativo de nuestro país. Además, mediante el estudio físico-químico de dicho ambiente y de los procesos biológicos involucrados, interpretar los efectos del metabolismo de los microorganismos sobre el medio y los factores del mismo que afectan a las poblaciones de bacterias en estudio.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. ESTACIONES DE MUESTREO

Durante la realización del presente trabajo se tomaron muestras periódicas mensuales en algunos casos y cada dos meses en otros, de agua y sedimentos en distintos lugares del lago. Debido al gran volumen de material necesario para su procesado, no todas las estaciones fueron estudiadas simultáneamente.

Con el fin de poner a punto las técnicas de recuento de las bacterias de los diferentes grupos y para los estudios iniciales en muestras de agua, se fijó una estación en la región central, denominada garganta (G), por considerarse representativa de todo el lago. (Fig. 1). En esta estación, de aproximadamente 20 m de profundidad, se llevó a cabo la primera parte del trabajo. Se analizaron muestras tomadas en la superficie y cerca del fondo, lo que permitió reconocer las características del agua a distintas profundidades y observar diferencias que harían necesarios otros tipos de muestreos. Es por ello, que en el desarrollo de este trabajo se encontrarán resultados referentes a muestras de "fondo", y otros referentes a muestras de la interfase agua-sedimento. Las primeras son muestras tomadas con el muestreador de agua a una distancia de 1 m aproximadamente por encima del fondo, mientras que las últimas son aquellas extraídas a muy pocos centímetros sobre el sedimento, con el aparato diseñado para esos fines.

Cuando se presentó la necesidad de estudiar las características físico-químicas y las poblaciones bacterianas de la interfase agua-sedimento y de los sedimentos de zonas bajas bien oxigenadas y zonas profundas con oxigenación deficiente, fue necesario buscar nuevas estaciones de muestreo. En algunas zonas de poca profundidad se encontraron muchas dificultades para la ex-

tracción de muestras, por presentar el fondo consistencia de tosca o de tierra muy compactada, debiéndose situar otros lugares que permitieran la obtención de gran cantidad de muestras homogéneas, con relativa facilidad y seguridad. Se fijaron entonces, dos estaciones más, una litoral de 8-10 m de profundidad y una profunda de 18-20 m de profundidad, en cada lóbulo del lago (Fig. 1). Las estaciones de 20 m fueron tomadas como representativas de la zona profunda del lago, teniendo en cuenta que, si bien la profundidad máxima es de 42,5 m, el área de fondo que se encuentra por debajo de la cota de 30 m sólo representa algo más del 5% del área total de los sedimentos. Gran parte del trabajo con sedimentos se realizó en las estaciones del lóbulo Norte, utilizando las del lóbulo Sur sólo para fines comparativos.

III.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS

III.2.1. Métodos de obtención de muestras de agua

Las muestras de agua de distintas profundidades se obtuvieron con una botella de tipo Van Dorn (Fig. 2). Consiste en un cilindro de Plexiglas abierto en ambos extremos y dos tapas de goma rebatibles unidas por una banda elástica que pasa por dentro del cilindro. El aparato abierto se introduce en el agua colgado de una cuerda, y se lo deja hundir hasta la profundidad deseada. Una vez allí se deja deslizar por la soga un mensajero consistente en un cilindro de bronce que, cuando llega al aparato, acciona un mecanismo que libera las tapas y éstas cierran los extremos de la botella herméticamente. Luego, se sube hasta la embarcación y por medio de un robinete se toman submuestras.

Las submuestras se colectaron en botellas de vidrio de

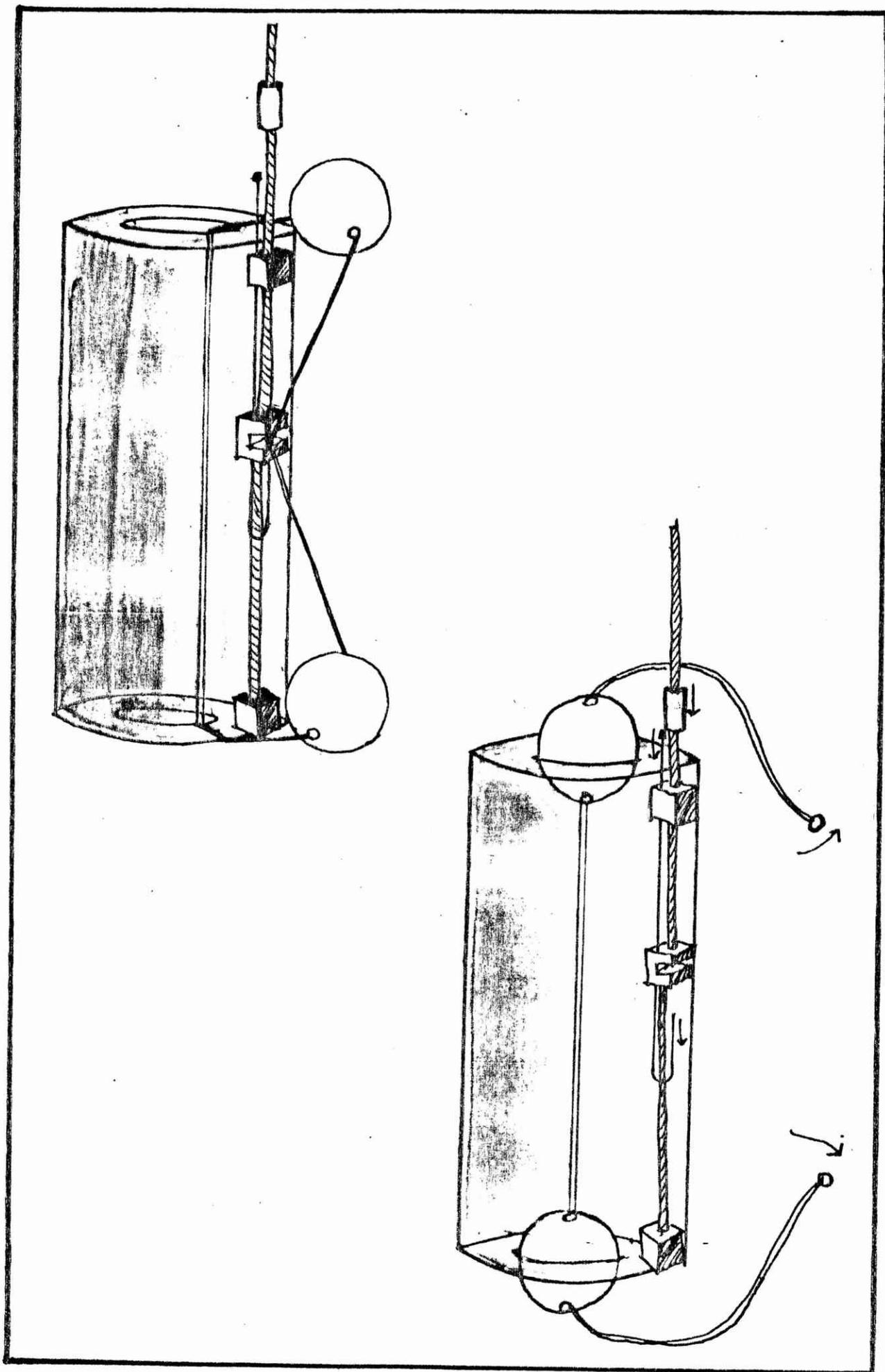


Figura 2: Aparato tipo Van Dorn para la extracción de muestras de agua y detalles de su funcionamiento.

250 ml de capacidad, con tapón esmerilado. En el caso de tratarse de muestras para análisis bacteriológicos, las botellas fueron previamente esterilizadas por calor húmedo. En los casos de muestras para análisis físicos o químicos, las botellas fueron lavadas en el laboratorio y enjuagadas varias veces con el agua de la muestra, antes de ser llenadas definitivamente.

Las muestras así tomadas fueron transportadas al laboratorio en oscuridad y refrigeradas en los casos en que la temperatura reinante lo hizo necesario. Se procesaron dentro de las seis horas de extraídas.

III.2.2. Método de obtención de muestras de la interfase agua-sedimento.

Para la obtención de muestras de estratos específicos en la interfase agua-sedimento, se diseñó un aparato como el que se indica en la Figura 3. Consiste básicamente en un trípode en cuyo centro sostiene una varilla con perforaciones a intervalos de 1 cm, en número de 100. El aparato consta además de varios tubos de material plástico, uno de cuyos extremos se fija a la perforación de la varilla central que indica la profundidad a que se extraerá la muestra.

El aparato con los tubos así dispuestos se sumerge lentamente en el agua (a fin de evitar turbulencia) suspendido de su parte superior por una soga, y manteniendo los extremos libres de los tubos a bordo. Una vez en el fondo se apoya sobre sus tres patas las que se introducen en el fango, haciendo los discos de tope en casos de sedimentos muy blandos y manteniendo el extremo inferior de la varilla central a ras del fondo. A continuación y luego de unos minutos para que se reestablezca la estratificación, se

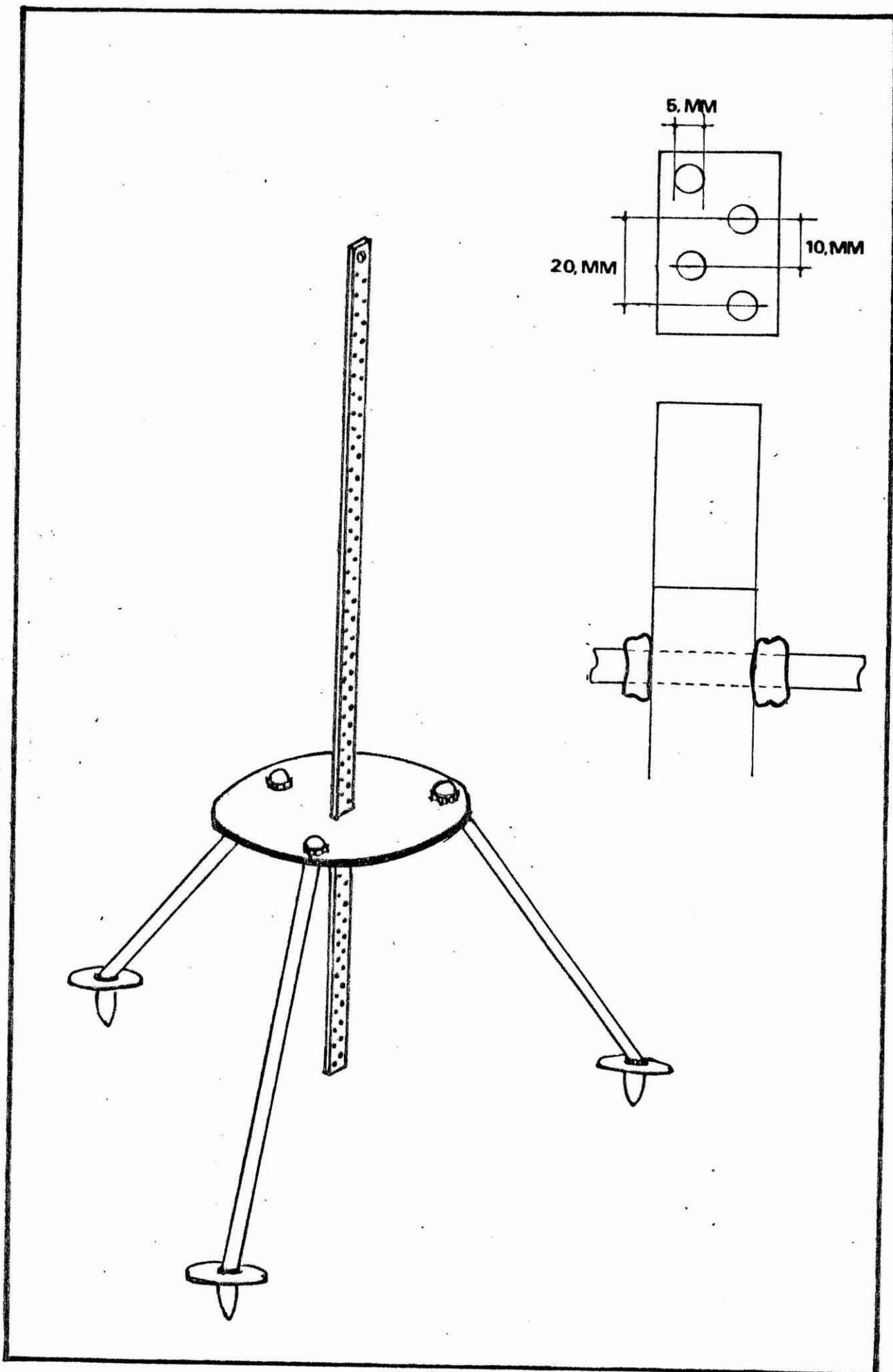


Figura 3: Aparato utilizado para tomar muestras de la interfase agua-sedimento y detalles de su construcción.

procede a succionar desde la embarcación a través de distintos tubos marcados debidamente con la profundidad correspondiente. La extracción se realiza con una pequeña bomba peristáltica manual.

Las muestras así obtenidas se trataron en la misma forma que las demás muestras de agua.

III.2.3. Métodos de obtención de muestras de sedimentos.

Para la obtención de muestras inalteradas de sedimento se construyó un aparato tipo Kajak (Fig. 4). Consta de un cuerpo metálico con una perforación central de 5 cm de diámetro y una tapa desplazable, hacia arriba y hacia abajo, a lo largo de dos ejes también metálicos. En el agujero central y hacia abajo, se le adosa un tubo de material acrílico (Plexiglas) de 5 cm de diámetro y largo variable (aproximadamente 40 cm).

Para extraer el material deseado, se suspende el aparato por la parte superior con una cuerda, se introduce en el agua con la tapa levantada y se deja hundir a una velocidad moderada y constante. Al llegar al fondo, el tubo plástico se introduce en el sedimento sin alterar su estratificación y, por la misma inercia, se libera la tapa que se desplaza hacia abajo y obtura herméticamente la boca superior del tubo. Al retirarlo, jalando de la cuerda, el tubo trae en su interior un cilindro de sedimento de 10-20 cm de longitud y el agua que está inmediatamente sobre él. Antes de sacarlo del agua se obtura la boca inferior del tubo con un tapón de goma y luego, ya sobre la embarcación, se retira el tubo del aparato, se tapa la boca superior con otro tapón de goma y se acondiciona para el traslado al laboratorio.

Los tubos poseen perforaciones cada 1 cm dispuestas en una hilera lateral, que en el momento del muestreo se hallan tapa

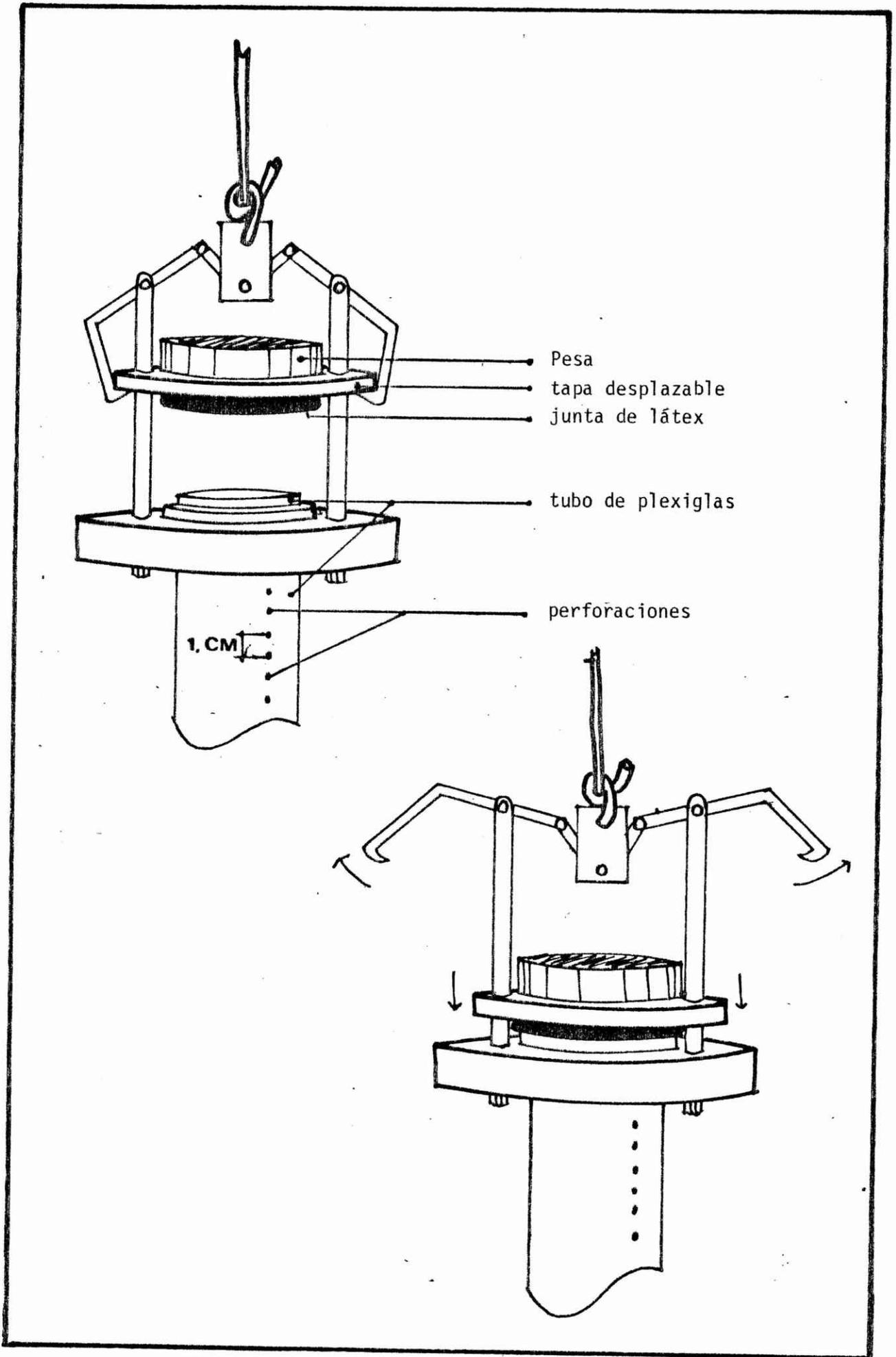


Figura 4: Aparato tipo kajak utilizado para la extracción de muestras de sedimentos y detalles de su construcción y funcionamiento.

das con cinta plástica adhesiva, a través de las cuales es posible extraer submuestras de agua cercana al sedimento mediante jeringas descartables estériles. Algunos autores sugieren que las submuestras de sedimento sean tomadas en la misma forma. Jones (28). En muchas oportunidades, esto no fue posible debido a la consistencia del sedimento, especialmente en las estaciones de baja profundidad. En estos casos se adoptó la siguiente metodología de rutina. Se fijó el tubo mediante abrazaderas a un pie universal. Luego se reemplazó el tapón inferior por un émbolo que ajusta exactamente en el interior del tubo. Se retiró el tapón superior y se desplazó el cilindro de sedimento hacia arriba hasta que afloró en la boca superior. Hecho esto, sobre esta boca del tubo, se colocó una sección de 1 cm de longitud del mismo tubo de acrílico, empujando luego con el émbolo 1 cm más el sedimento. Cuando su superficie igualó el borde del suplemento, se introdujo entre éste y el tubo, una hoja fina de material plástico, cortando así, una rodaja de sedimento de 1 cm de longitud por el diámetro del tubo.

Estas submuestras fueron procesadas en forma apropiada según se utilizaran para estudios químicos o bacteriológicos, cuyos métodos se describen en las secciones correspondientes.

III.3. MÉTODOS DE DETERMINACIONES FISICO-QUÍMICAS

III.3.1. Temperatura.

Se midió en el campo en el momento de la extracción de las muestras con termómetro de mercurio.

III.3.2. Oxígeno disuelto.

Se utilizó el clásico método de Winkler modificado por Alsterberg, tal como está descrito en Standard Methods (53).

III.3.3. pH.

Se determinó con peachímetro electrónico ORION modelo 701 A, siguiendo las instrucciones del manual del instrumento.

III.3.4. Alcalinidad total.

Se determinó titrimétricamente de acuerdo a Standard Methods (53).

III.3.5. Amonio, nitritos y nitratos.

Para las determinaciones en muestras de agua, se filtraron 50 ml de muestra a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F.

Con muestras de sedimentos se procedió de la siguiente manera: se centrifugaron 15 cc durante 30' a 3.500 rpm; luego se recogió y diluyó el volumen de agua sobrenadante hasta 30 cc con agua destilada y deionizada y se filtró como en el caso anterior.

$$\text{Factor de dilución} = \frac{30 \text{ cc}}{\text{Volúmen extraído de sobrenadante}}$$

Las determinaciones químicas fueron realizadas inmediatamente después de la filtración. En caso contrario, las muestras fueron conservadas en congelador a aproximadamente -15°C, durante 3 días como máximo.

El método utilizado para la determinación de concentraciones de amonio se basa en la formación del colorante azul de indofenol, cuya densidad óptica es medida a 660 nm. A 5 ml de muestra filtrada se agrega 1 ml de solución de salicilato de sodio 20% p/v, seguidamente 1 ml de una solución de ferrocianuro de potasio 2% p/v y citrato trisódico 10% p/v en hidróxido de sodio 0,1 N. Finalmente, se adiciona 1 ml de solución de hipoclorito de sodio 1,93% p/v en hidróxido de sodio 0,1 N. El color desarrolla totalmente luego de 2 hs a 27°C. La preparación de los reactivos, blancos y soluciones patrones, requiere el uso de agua recientemente deionizada por columna con resina de intercambio iónico Amberlite IR-120. Las soluciones patrones se realizaron con sulfato de amonio.

Los nitritos presentes en las muestras reaccionan con la sulfanilamida y N-(1-naftil)-etilendiamina formando un colorante azoico cuya intensidad de color es medida en espectrofotómetro a 543 nm.- 5 ml de muestra filtrada son mezclados con 2 ml de una solución buffer de cloruro de amonio 2,6% p/v y tetraborato de sodio 2,1% p/v. Se agregan 0,5 ml de una solución de sulfanilamida 1% p/v en ácido clorhídrico 10% v/v. Luego de 5 ± 1 minutos se adicionan 0,5 ml de N-(1-naftil)-etilendiamina 0,1% p/v. Después de transcurridos 10' se determina la absorvancia utilizando celdas de 1 cm de paso de luz. La curva de calibración se realizó con soluciones patrones de nitrito de sodio.

Los nitratos son reducidos cuantitativamente a nitritos a través de una columna de cadmio cobreado, determinándose luego los nitritos resultantes según el método descripto anteriormente. Para construir la columna reductora se siguieron las instrucciones de Standard Methods (53) modificando las dimensiones de la misma y el flujo de pasaje en razón del pequeño volúmen de muestra utilizado. Se mezclan 10 ml de muestra filtrada con 0,4 ml de

una solución de cloruro de amonio 18% p/v y EDTA 2,3%, y se pasan a través de la columna. Se descartan los primeros 4-4,5 ml y se recogen los siguientes 5 ml, determinando los nitritos obtenidos por reducción de los nitratos presentes en la muestra. La estandarización del método se llevó a cabo utilizando soluciones patrones de nitrato de potasio.

III.4. MÉTODOS DE CULTIVO Y CUANTIFICACION DE BACTERIAS

Algunos grupos de bacterias, como las bacterias nitrificantes, por su calidad de microorganismos autotróficos, presentan dificultades para crecer en medios de cultivo sólidos. Para unificar criterios, se decidió trabajar con medios de cultivo líquidos para todos los grupos de bacterias estudiados, y utilizar como sistema de recuento la técnica de las diluciones múltiples o Número Más Probable (NMP). Esta consiste en sembrar alícuotas de diluciones realizadas a partir de la muestra, en series de tubos que contienen caldo de cultivo estéril. La mayor desventaja de este método reside en que los resultados obtenidos son estimaciones probabilísticas con un porcentaje alto de error. Sorokin y Kadota (52). Este error se puede reducir aumentando el número de tubos sembrados por dilución, o reduciendo los intervalos entre las diluciones. En ambos casos aumenta la cantidad de material utilizado.

En el presente trabajo se realizaron diluciones de 1:10 y se sembraron tres tubos por dilución, esquema que presenta un error standard en las estimaciones del 69%. Aumentando el número de tubos sembrados a cinco por dilución, la cantidad de materiales necesarios aumentaría en un 66,6%, mientras que el error standard se reduciría del 69% al 53% solamente. Lo mismo ocurriría en el caso de reducir el rango de dilución. En vista de ello se adoptó el mencionado esquema.

Las diluciones decimales de las muestras se realizaron en tubos conteniendo 9 ml de agua de lago esterilizada por calor húmedo. Con alícuotas de las mismas, se inocularon series de tubos conteniendo los caldos de cultivo estériles adecuados para cada grupo fisiológico. En todos los casos se sembraron tres tubos con cada dilución de una batería de cinco diluciones consecutivas. En algunos casos excepcionales se sembraron seis diluciones consecutivas para cubrir un rango más amplio (bacterias denitrificantes). En el caso de las bacterias nitrificantes, que presentan números muy bajos en muestras de agua, se sembraron tubos con un mililitro de muestra sin diluir, y en algunos casos se prepararon tubos especiales con 10 ml de caldo de doble concentración, que se sembraron con 10 ml de muestra.

Las diluciones y siembras se realizaron con pipetas de vidrio estériles. En todos los casos se dejaron algunos tubos de medio de cultivo sin sembrar, para ser utilizados como testigos negativos en el momento de las lecturas.

Para el análisis bacteriológico de las muestras de sedimentos se procedió de la siguiente manera: Mediante una pipeta de vidrio de 10 cc cortada y con un émbolo plástico que ajusta en su interior, se tomó 1 cc de sedimento, se colocó en un tubo de ensayo y se llevó a 20 ml con agua destilada estéril. Así se obtuvo una dilución previa 1:20 que fue homogeneizada para lograr una suspensión, a partir de la cual se realizaron las diluciones necesarias para los recuentos.

Los medios de cultivo se prepararon según las fórmulas detalladas más abajo, ajustando su pH con una solución de OHNa 0,1 N. Se distribuyeron en tubos de ensayo pequeños a razón de 3-4 ml por tubo y se esterilizaron en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

III.4.1. Bacterias heterotróficas totales.

El medio de cultivo utilizado fue el OZ (Zobell modificado) cuya fórmula contiene:

Peptona	5 g
Extracto de levadura	1 g
PO ₄ Fe	0,01 g
Agua destilada csp	1000 ml
pH	6,8-7,0

Las diluciones utilizadas para los recuentos en muestras de agua libre fueron 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶. En muestras de interfase agua-sedimento fueron 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷, al igual que para las muestras de sedimento a partir de la dilución previa 1:20 del mismo.

Los tubos inoculados y los testigos se incubaron 10 días a 20°C. Al cabo de ese período se hicieron las lecturas, considerándose positivos, los tubos que presentaban turbidez y negativos, los que se mantenían semejantes a los testigos.

III.4.2. Bacterias amonificantes.

En la primera etapa de este trabajo se utilizó el medio recomendado para este grupo bacteriano en CCIW Manual (40), cuya composición es:

PO ₄ HK ₂	0,2 g
PO ₄ H ₂ K	0,1 g
SO ₄ Mg	0,25 g
Cl ₃ Fe	0,001 g

Glucosa	0,5 g
Peptona	2 g
Agua destilada csp	1000 ml
pH	6,8

Las diluciones utilizadas para las distintas muestras fueron las mismas que en la técnica anterior y el tiempo y temperatura de incubación, similares. La determinación de tubos positivos y negativos se realizó por el agregado de reactivo de Nessler, cuya fórmula es:

Goma arábiga	1,75 g
IK	2 g
I ₂ Hg	2 g
H ₂ O cps	1000 ml

Los cultivos que contienen amonio en solución adquieren, en contacto con dicho reactivo, una coloración amarillo-naranja intensa. Los negativos permanecen inalterados o toman un ligero color amarillo, al igual que los testigos.

Luego de varias pruebas se observó que los resultados positivos de turbidez y contenido de amonio en este medio de cultivo y en el OZ modificado eran muy semejantes, no mostrando nunca diferencias significativas. Es por eso que se decidió continuar con el OZ como único medio para ambas pruebas.

III.4.3. Bacterias denitrificantes.

Como en el caso anterior se adoptó en un primer momento el método propuesto en CCIW Manual (40), cuya composición es:

PO_4HK_2	0,5 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,4 g
SO_4Mg	0,25 g
Cl_3Fe	0,001 g
Cl_2Ca	0,2 g
NO_3K	1 g
Glucosa	10 g
Agua destilada csp	1000 ml

Una vez preparado, se fraccionó en tubos de ensayo y se introdujo en cada uno de ellos una campana de Durham invertida, para atrapar el gas nitrógeno que pudiera producirse. A continuación fueron esterilizados. Antes de proceder a su siembra, se purgaron para extraer el oxígeno disuelto, colocándolos en baño de María, enfriándolos luego rápidamente. Después de sembrados, se les agregó una capa de 1 cm de vaselina líquida estéril para evitar la difusión de oxígeno en el caldo. Estos tubos sembrados y los testigos se incubaron 14 días a 20°C. Transcurrido este período, se procedió a la lectura, tomándose como positivos aquellos que presentaban gas en la campana de Durham, y como negativos, los que no lo presentaban, aunque mostraran desarrollo evidente.

Este caldo de cultivo arrojó resultados poco satisfactorios, ya que se encontraron frecuentemente tubos positivos en diluciones altas y tubos negativos en diluciones bajas de una misma serie, lo que dificultó establecer los números más probables de bacterias.

Por esta razón se decidió cambiar por el medio propuesto en Stanier (55), cuya composición es:

Solución buffer $\text{PO}_4\text{HNa}_2 + \text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (pH 6,8)	40 ml
Extracto de levadura	5 g
Solución de trazas de elementos	1 ml
Glicerol	5 g
Glucosa	5 g
NO_3K	10 g
Agua destilada csp	1000 ml
Agar	3 g

Se decidió utilizarlo sin el agregado de agar para mantener el medio líquido. Como en el anterior medio de cultivo, se agregó a cada tubo la campana de Durham y se lo purgó antes de la siembra, después de la cual, fue cubierto con vaselina estéril.

Se sembró 1 ml de agua sin diluir y alícuotas de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , y 10^{-4} de las muestras de la columna de agua; alícuotas de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} de las muestras de interfase agua-sedimento (aquí se sembraron 6 diluciones para asegurar la obtención de tubos positivos y negativos), alícuotas de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} preparadas a partir de las diluciones 1:20 de las muestras de sedimento.

La incubación y las lecturas se realizaron de la misma forma que con el medio anterior.

III.4.4. Bacterias reductoras de nitratos.

El medio de cultivo utilizado para los recuentos de las bacterias de este grupo es el comunmente recomendado en bacteriología clínica y su composición es:

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
NO ₃ K	10 g
Agua destilada csp	1000 ml

Las diluciones sembradas fueron 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ para muestras de agua libre; 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ para muestras de la interfase agua-sedimento; 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ para muestras de sedimento previa dilución 1:20.

Los tubos sembrados y los testigos fueron incubados por 14 días a 20°C. La determinación de tubos positivos y negativos se realizó por el agregado de reactivo N-(1-naftil) etilendiamina y de polvo de cinc.

El primer reactivo contiene:

HCl conc.	105 ml
Sulfanilamida	5 g
N-(1-naftil) etilendiamina dicloruro	0,5 g
Acetato de sodio	136 g
Agua destilada csp	500 ml

A cada tubo se agregaron 2 o 3 gotas de dicho reactivo, el que en presencia de nitritos forma un compuesto de color rojo intenso, en cuyo caso los cultivos fueron considerados como positivos. En aquellos que no desarrollaron color, se agregó además, una pizca de polvo de cinc para evidenciar si los nitratos del medio de cultivo permanecían como tales o bien habían sido reducidos a nitritos y posteriormente a algún otro compuesto de nitrógeno. El polvo de cinc actúa reduciendo los nitratos a nitritos. En los tubos que desarrollaron color en estas condiciones, los nitratos permanecían como tal, por lo que fueron tomados como negati-

vos, y en los que no lo hicieron fue totalmente reducido, tomándolos también como positivos.

III.4.5. Bacterias nitrificantes.

Para los recuentos de bacterias nitrificantes también se utilizó el medio propuesto en CCIW Manual (40). Su composición química es:

PO_4HK_2	2 g
SO_4Mg	1 g
Cl_2Ca	0,2 g
ClNa	1 g
Solución de trazas de elementos	1 ml
Solución de vitaminas	1 ml
Agua destilada csp	1000 ml

A esta solución mineral se agregó 2 g de sulfato de amonio por litro para realizar el recuento de bacterias nitritadoras en un caso, y 2 g de nitrito de sodio por litro para el recuento de bacterias nitratadoras, en el otro.

Dada la poca cantidad de este tipo de bacterias en el agua libre, se prepararon tubos con 10 ml de caldo de doble concentración, además de aquellos con las cantidades habituales.

Se sembraron 10 ml de muestra, 1 ml de muestra y alícuotas de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} para muestras de agua libre; 1 ml de muestra y alícuotas de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} para muestras de la interfase agua-sedimento; alícuotas de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} hechas a partir de la dilución 1:20 de muestras de sedimento.

Los tubos para recuento de bacterias nitritadoras se incubaron entre 30 y 45 días a 20°C. Matulewich (38). La evaluación de los resultados se realizó tomando alícuotas individuales de los tubos con pipetas Pasteur estériles y colocándolas en una piedra de toque, donde se les agregó una gota del reactivo N-(1-naftil)-etilendiamina. Aquéllas que desarrollaron coloración rosada o roja, indicadora de presencia de nitritos, se registraron como positivas. Mediante este sistema, los tubos negativos podían seguir por algún tiempo en incubación.

Los tubos para recuento de bacterias nitratadoras se incubaron entre 90 y 100 días a 20°C. Matulewich (38). La lectura de los tubos positivos y negativos se realizó adaptando una técnica propuesta en Rodina (49). Consiste, como en el caso anterior, en tomar alícuotas de los caldos sembrados y colocarlas en una piedra de toque. Luego se les agrega igual cantidad de una solución de ácido amidosulfónico al 5% dejando pasar diez minutos para dar lugar a la reacción. En ésta los nitritos son destruídos liberándose nitrógeno molecular. A continuación se agregan gotas de una solución de difenilamina al 0,017% en ácido sulfúrico al 85%, que reacciona con los nitratos formando un anillo de color azul intenso en la interfase del medio de cultivo y la solución de ácido sulfúrico. Las pruebas realizadas permitieron establecer relaciones óptimas que son las siguientes: 1 gota de medio de cultivo + 1 gota de solución de ácido amidosulfónico y, luego de diez minutos, 3 gotas de solución de difenilamina en ácido sulfúrico. Con este método se pudieron detectar concentraciones de 20 mg $N-NO_3^-$ /l en más.

III.5. MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y CLASIFICACION DE BACTERIAS

III.5.1. Bacterias reductoras de nitratos.

Con un ansa en anillo se tomaron alícuotas de caldo de los tubos con reacción positiva y se sembraron en superficie placas de Petri con agar nutritivo (Oxoid), cuya composición es la siguiente:

Extracto de carne	1 g
Extracto de Levaduras	2 g
Peptona	5 g
ClNa	5 g
Agar	15 g
H ₂ O dest.csp	1000 ml

Estas placas fueron incubadas durante una semana a 20°C y luego se aislaron colonias, representativas de los distintos tipos desarrollados, las que fueron purificadas por sucesivos pasajes por agar nutritivo y luego almacenadas en medio de conservación ENA (Difco), que contiene:

Extracto de carne	3 g
Proteosa Peptona	5 g
Triptona	1 g
Agar	4 g
H ₂ O dest.csp	1000 ml

Cuando se acumularon cepas suficientes, se procedió a efectuar las siguientes pruebas: morfología, coloración de Gram, movilidad, posición de flagelos, producción de pigmento, producción de oxidasa, ataque a la glucosa en medio de Hugh y Leifson,

reducción de nitratos a nitritos y reducción de nitratos a nitrógeno molecular. Estas pruebas permitieron la clasificación sistemática en base a una clave de perfiles numéricos elaborada en la Sección Bacteriología del Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet". Di Siervi (12).

III.5.2. Bacterias denitrificantes.

Estas bacterias aeróbicas-anaeróbicas facultativas, desarrollan su sistema enzimático, para respirar nitratos en anaerobiosis, muy lentamente, y lo pierden rápidamente cuando crecen en presencia de oxígeno.

Los primeros intentos de aislamiento fueron realizados en forma similar al grupo anterior, pero se encontraron muchas dificultades para evidenciar la capacidad denitrificante en cepas desarrolladas en presencia de oxígeno. Por este motivo se decidió efectuar los aislamientos por pasajes sucesivos en condiciones anaeróbicas. Para ello, partiendo de los tubos de recuento con reacción positiva, se tomaron alícuotas con pipetas Pasteur estériles y se inocularon, por una parte, tubos con medio líquido como el utilizado en los recuentos y, por la otra, tubos con el medio propuesto por Stanier (55), sellándolos con agar 2% estéril. Estos últimos dieron mejores resultados. Las cepas así aisladas se conservaron en medio ENA para su identificación y clasificación, las cuales se realizaron en igual forma que el grupo anterior.

III.5.3. Bacterias nitrificantes.

A partir de cultivos positivos de ambos grupos, nitritadores y nitratadores, se realizaron diluciones seriadas en los respectivos medios de cultivo, se incubaron a 20°C y fueron analizadas cada semana con las técnicas ya descritas, hasta obtener nuevamente reacción positiva. A partir de estos últimos tubos con resultado positivo se sembraron en superficie placas de Petri con agar nutritivo para evidenciar la posible presencia de bacterias heterotróficas. Aquellos que dieron reacción positiva y no demostraron contener bacterias heterotróficas, se tomaron como base para realizar enriquecimientos.

III.6. METODOS DE ENSAYOS BIOLOGICOS

III.6.1. Demanda bioquímica de oxígeno.

Las pruebas de DBO del agua se realizaron tomando varias muestras de la profundidad a estudiar, en la forma ya descrita en la Sección III.2.

Una de ellas se analizó inmediatamente para establecer la concentración inicial de oxígeno y las botellas restantes se incubaron en oscuridad a la temperatura ambiente. A intervalos fijos se fueron analizando una a una. El método utilizado fue mencionado anteriormente en la Sección III.3.2. Los resultados se expresaron en $\text{mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

En el estudio de DBO para muestras de sedimentos se trabajó con los tubos de acrílico tal cual se tomaron en el campo. Sin alterar su estratificación, se quitó el tapón de la boca superior y sobre el agua se vertieron 10 ml de vaselina líquida estéril. Luego, realizando sifón con un tubo de vidrio acodado y una

manguera de látex, se tomó una muestra en una botella de vidrio de 60 ml con tapón esmerilado y se analizó el contenido de oxígeno. El dato se tomó como oxígeno inicial. Los tubos se incubaron en oscuridad a la temperatura del lago en un baño de agua procedente del mismo. Muestras tomadas a intervalos de 6-8 hs permitieron observar el consumo por diferencia en la concentración de oxígeno.

Se ensayaron distintos métodos de incubación de las muestras. Algunos con agitación constante del agua para evitar que se formasen gradientes de concentración de oxígeno, otros homogeneizando la columna de agua antes de extraer cada muestra y otros sin ninguna de estas precauciones, aunque, en todos los casos, con los tubos sellados con vaselina líquida para evitar la difusión de oxígeno de la atmósfera al agua.

Los resultados mostraron algunas diferencias pero ninguna importante, por lo que se decidió incubar las muestras sin ningún tipo de agitación por razones prácticas.

Los resultados fueron expresados en $\text{mg O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$.

En los casos en que el agua sobrenadante fue escasa, parte del sedimento fue descartado desalojando el tapón inferior y dejando descender la columna de barro por dentro del tubo. Cuando ésta quedó reducida a una longitud de 10-15 cm, se volvió a colocar el tapón inferior y el volumen desplazado se reemplazó con agua del lago cuidando, al agregarla, de no alterar la superficie del sedimento. Luego se procedió a cubrir el agua con vaselina, se tomó la muestra inicial y se pusieron los tubos a incubar.

III.6.2. Nitrificación.

Se realizaron ensayos para cuantificar el proceso de nitrificación en muestras de agua y sedimentos. Para ello se utilizó un inhibidor específico de ese proceso, Allylthiourea, cuya eficacia fue probada por Hall (20).

Para las pruebas con muestras de agua se procedió del siguiente modo: se tomaron tres muestras en botellas de 250 ml de cada lugar a estudiar. En una de ellas se determinaron las concentraciones de amonio, nitritos y nitratos, datos considerados como valores iniciales de la experiencia. Una de las dos restantes se inoculó con 5 ml de una solución de Allylthiourea 0,3 g/l logrando una concentración final de 6 mg/l. Ambas se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente durante 24 hs. Transcurrido este lapso de tiempo se determinaron las concentraciones de los diferentes compuestos de nitrógeno en ambas.

En las experiencias con muestras de sedimentos se procedió en forma semejante, pero con muestras por duplicado. Como en los ensayos de DBO, se trabajó con las muestras intactas en los tubos de acrílico. Se tomaron 6 muestras de cada lugar a estudiar y se analizaron dos para observar las concentraciones de nutrientes iniciales. Dos de los cuatro tubos restantes se inocularon con la misma solución de Allylthiourea hasta lograr una concentración final de 20 mg/l en el sedimento y 5 mg/l en el agua sobrenadante. Hall (20). El inhibidor fue incorporado a los tubos, centímetro a centímetro, a través de las perforaciones laterales mediante el uso de jeringas descartables de 1 cc. Todos los tubos se incubaron entre 12 y 24 hs en oscuridad a temperatura ambiente, luego de lo cual se procedió a su análisis.

III.6.3. Reducción de nitratos

Las experiencias de consumo de nitratos en los sedimentos se realizaron en los tubos acrílicos de muestreo. Se tomaron muestras en cada una de las diferentes estaciones a estudiar, en número variable de acuerdo a la cantidad de réplicas deseadas y al tipo de experiencia a realizar. Una vez en el laboratorio cada muestra fue inoculada con una solución de nitrato de potasio hasta una concentración final aproximada de $10 \text{ mg N-NO}_3 \text{ l}^{-1}$ en el sedimento. La inoculación se realizó centímetro a centímetro con jeringa estéril a través de las perforaciones de los tubos.

En caso de realizar experiencias a temperaturas distintas de la ambiental las muestras fueron colocadas unas horas a la temperatura elegida y luego inoculadas. Hecho ésto, se pusieron en incubación a la temperatura adecuada y en oscuridad, y un par de ellas fue analizado inmediatamente para establecer las concentraciones iniciales de las distintas formas de nitrógeno. Luego, cada 1 ó 2 horas se analizó un par de las mismas para observar la evolución de estos nutrientes.

IV. RESULTADOS

IV.1. PARAMETROS FISICOS Y QUIMICOS

En la Figura 5, están representadas las temperaturas medidas a distintas profundidades a lo largo del año. Las máximas varían entre 24°C y 27°C en la superficie, y 20°C y 23°C en el fondo durante el verano (enero-febrero), y las mínimas entre 8°C y 10°C desde la superficie hasta el fondo en invierno (julio-agosto). Al iniciarse la primavera y aumentar la radiación solar, las capas de agua superficiales aumentan su temperatura, efecto que se prolonga hasta fines del verano produciendo un gradiente térmico de 5-6°C de diferencia entre la superficie y el fondo. Ese gradiente es continuo sin que se note una termoclina marcada.

Con los primeros vientos fríos, las aguas superficiales pierden temperatura, se hunden en las que están inmediatamente debajo y así se homogeneiza toda la columna. Esta situación de enfriamiento y mezcla, continúa hasta el final del invierno.

Se puede decir entonces que el Embalse del Río Tercero se comporta como un lago monomítico, con un período de estratificación aunque no muy marcada en verano, y un período de circulación en invierno.

En la Figura 6, se puede observar la distribución anual del oxígeno disuelto en las distintas profundidades. Las zonas próximas a la superficie se mantienen durante todo el año con concentraciones próximas al límite de saturación, íntimamente ligado a la temperatura, sobrepasándolo en algunas ocasiones en las zonas de mayor productividad primaria. Mariazzi et al. (37). Durante el invierno la concentración de oxígeno disuelto en la columna de agua se mantiene uniforme debido a que el lago circula y el oxígeno producido en la zona fótica, tiene acceso a los estratos más profundos no productivos. Además el consumo de oxígeno en el

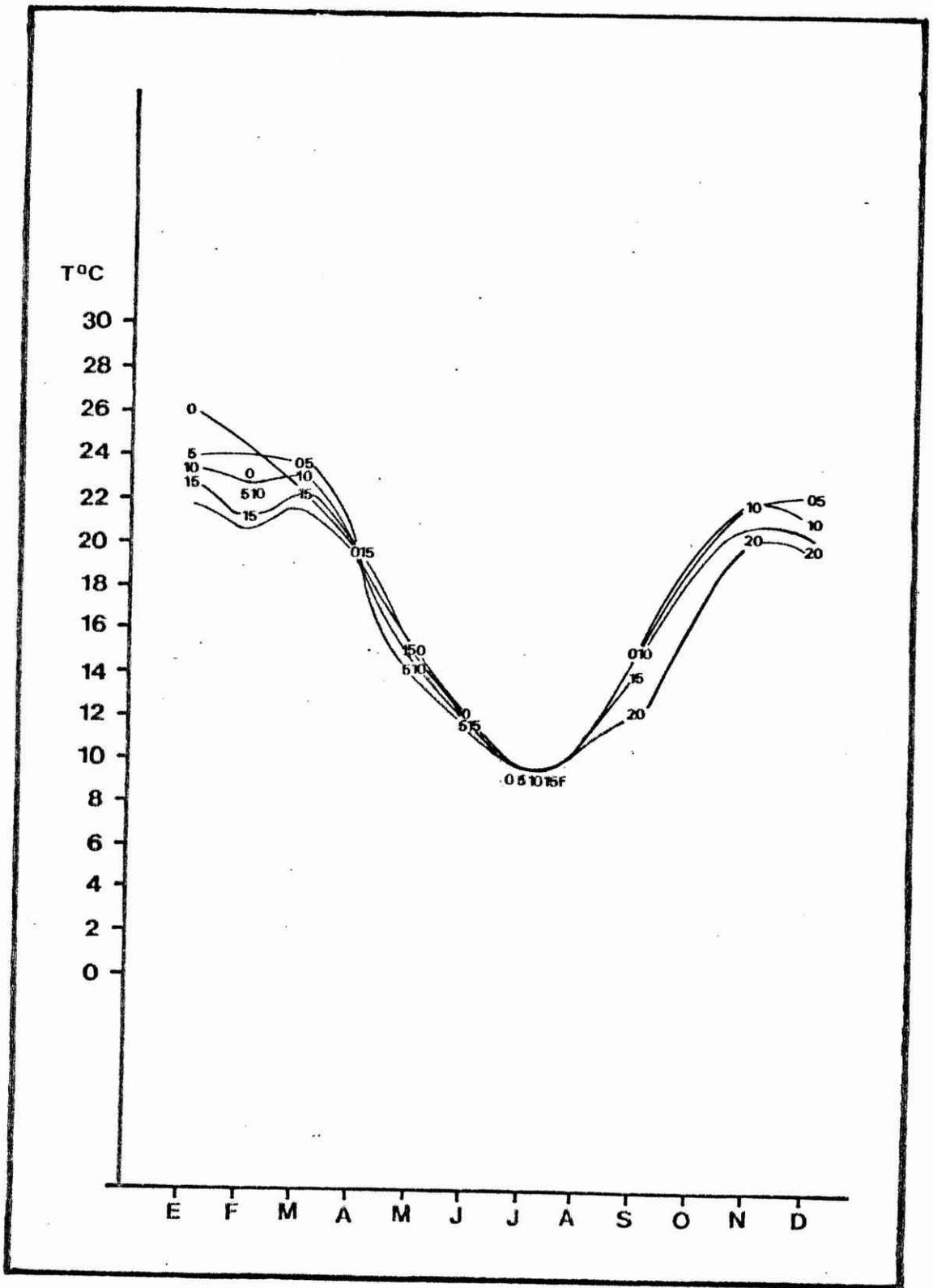


Figura 5: Distribución anual de la temperatura. Los números indican profundidad en metros. F = fondo.

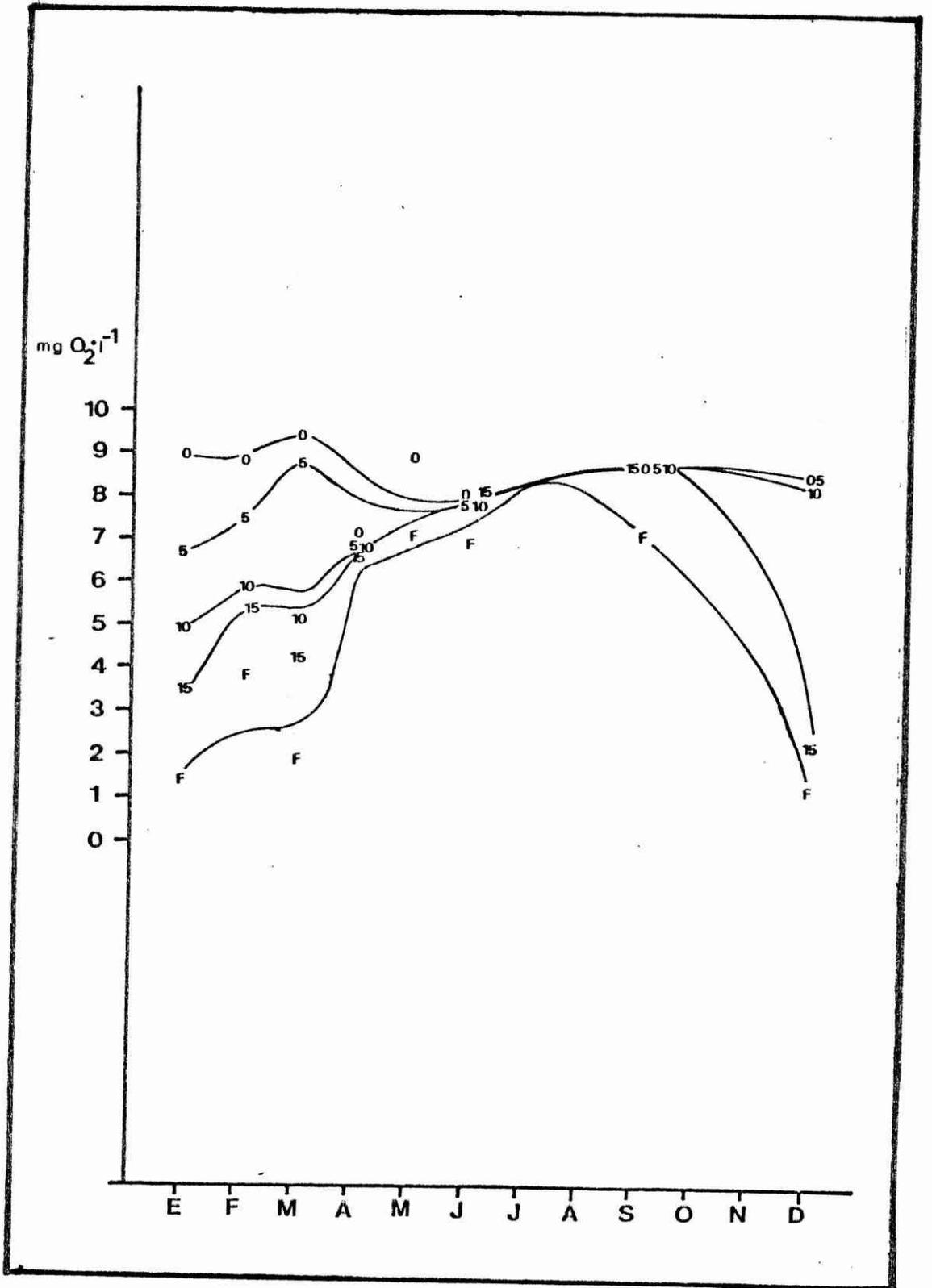


Figura 6: Distribución anual del oxígeno disuelto. Los números indican profundidad en metros. F = fondo.

agua y en los sedimentos es mínimo en ese período del año. (Sección IV.4.1.). En esta época, hallamos concentraciones de 7 a 9 mg $O_2 \cdot l^{-1}$ en todas las profundidades, valores que pueden disminuir levemente en muestras tomadas muy cerca del fondo.

Con los primeros calores, la circulación se interrumpe y comienza a notarse déficit de oxígeno en las zonas más profundas, situación que se agudiza con el avance del verano por falta de aporte de las zonas productivas y porque con el aumento de la temperatura el consumo de oxígeno por las poblaciones bacterianas se incrementa notablemente. (Sección IV.4.1.). En verano es común hallar concentraciones de 8-9 mg $O_2 \cdot l^{-1}$ en superficie, y 0-1 mg $O_2 \cdot l^{-1}$ cerca del fondo en zonas profundas. Esta situación se revierte con el final del verano al mezclarse nuevamente el lago.

La temperatura y el oxígeno disuelto son dos variables de gran importancia en los fenómenos biológicos estudiados en el presente trabajo. La temperatura influye directamente sobre la velocidad de reacción de los procesos biológicos, mientras que la presencia de oxígeno es imprescindible para algunos de esos procesos (nitrificación) y perjudicial para otros (denitrificación). Cuando el objeto de estudio fueron muestras de sedimentos, se debió prestar especial atención a estos aspectos, sobre todo a las concentraciones de oxígeno disuelto. En la Figura 6, se puede apreciar que durante el período de estratificación, mientras el sedimento en una zona del lago con 20 m de profundidad puede estar ex puesto a condiciones de 0 mg $O_2 \cdot l^{-1}$, el de una zona litoral con 10 m de profundidad puede hallarse en presencia de 5 o más mg $O_2 \cdot l^{-1}$. Estas diferencias en las condiciones ambientales podrían aca rrear diferencias en las poblaciones bacterianas o en su activi- dad, es por eso que se decidió estudiar muestras de sedimentos de zonas litorales y de zonas profundas, a fin de evaluar esa posibi- lidad. Además, respecto de las concentraciones del oxígeno disuel

to, se observó que en la interfase agua-sedimento siempre existe un tenor de oxígeno inferior que en el agua libre de la misma profundidad. Estas diferencias son pequeñas en los meses invernales pero pueden ser marcadas en el verano, especialmente en zonas de poca profundidad. Como ejemplo de ello se puede mencionar que en febrero de 1983, mientras que en el agua libre a 10 m de profundidad había $5,24 \text{ mg } O_2 \cdot l^{-1}$, a 1 cm sobre el sedimento en una zona con algo menos de 10 m de profundidad se detectaron $3,88 \text{ mg } O_2 \cdot l^{-1}$. En junio del mismo año, los valores para idénticas muestras fueron de $7,87 \text{ mg } O_2 \cdot l^{-1}$ y $7,65 \text{ mg } O_2 \cdot l^{-1}$ respectivamente. Este fenómeno no parece ser tan importante en las zonas profundas donde las concentraciones de oxígeno son escasas de por sí en la época estival.

El pH en general es ligeramente alcalino y su distribución obedece a un esquema semejante a los de temperatura y oxígeno disuelto. En el verano se observa un gradiente con valores entre 6,0 y 6,2 en las proximidades del fondo carente de oxígeno, y entre 8,3 y 8,5 en las zonas de mayor productividad primaria, cerca de la superficie. Luego de la época de mezcla, su distribución es homogénea con valores entre 7,0 y 7,5. Lo mismo ocurre con la conductividad eléctrica y las concentraciones de carbonatos y bicarbonatos. Estas variables se hallan íntimamente relacionadas al pH, a la temperatura y a las concentraciones de aniones y cationes en el agua y pese a sus variaciones anuales, no muestran valores que representen un condicionamiento para el normal desarrollo de las poblaciones bacterianas y de los procesos que éstas realizan.

En aguas libres las concentraciones de amonio y nitratos fueron muy fluctuantes, oscilando el amonio entre 0 y $200 \text{ } \mu\text{g } N\text{-NH}_4^+ \cdot l^{-1}$ y los nitratos entre 0 y $100 \text{ } \mu\text{g } N\text{-NO}_3^- \cdot l^{-1}$. Los picos máximos de ambos compuestos se observaron en mayo durante la época

de mezcla. Las concentraciones de nitritos fueron generalmente in detectables en muestras de aguas libres.

En las Figuras 7a y 7b, están representadas las cantidades de los distintos compuestos de nitrógeno encontrados a lo largo del año en la interfase agua-sedimento en estaciones litorales y estaciones profundas. El amonio presenta concentraciones entre 100 y 300 $\mu\text{g N-NH}_4^+.1^{-1}$ durante casi todo el año con excepción del período de mezcla en que cae por debajo de esos límites llegando a cantidades apenas detectables en algunas ocasiones. En esa época se presenta un pico exagerado en las concentraciones de los nitratos con valores de 220-260 $\mu\text{g N-NO}_3^-.1^{-1}$, mientras que durante el resto del año se encuentra en concentraciones entre 0 y 50 $\mu\text{g N-NO}_3^-.1^{-1}$.

Los nitritos rara vez superan los 20 $\mu\text{g N-NO}_2^-.1^{-1}$.

En los sedimentos se presenta un esquema similar, si bien las concentraciones halladas son considerablemente mayores (Figs. 8a y 8b). Se observa una gran acumulación de amonio durante gran parte del año, con concentraciones que superan en algunos casos los 10 mg $\text{N-NH}_4^+.1^{-1}$, y un descenso brusco a niveles a veces no detectables en la época de mezcla. Como en el caso anterior, en esta época se observan las mayores concentraciones de nitratos, ascendiendo a más de 2 mg $\text{N-NO}_3^-.1^{-1}$ en muestras de la zona profunda, y a más de 5 mg $\text{N-NO}_3^-.1^{-1}$ en muestras de la zona litoral. Durante el resto del año se encuentran concentraciones entre 0 y 0,5 mg $\text{N-NO}_3^-.1^{-1}$.

Las concentraciones de amonio siempre son mayores en las muestras de zonas profundas que en las de zonas litorales mientras que lo inverso ocurre con las concentraciones de nitratos.

Las concentraciones de nitritos también fueron siempre bajas.

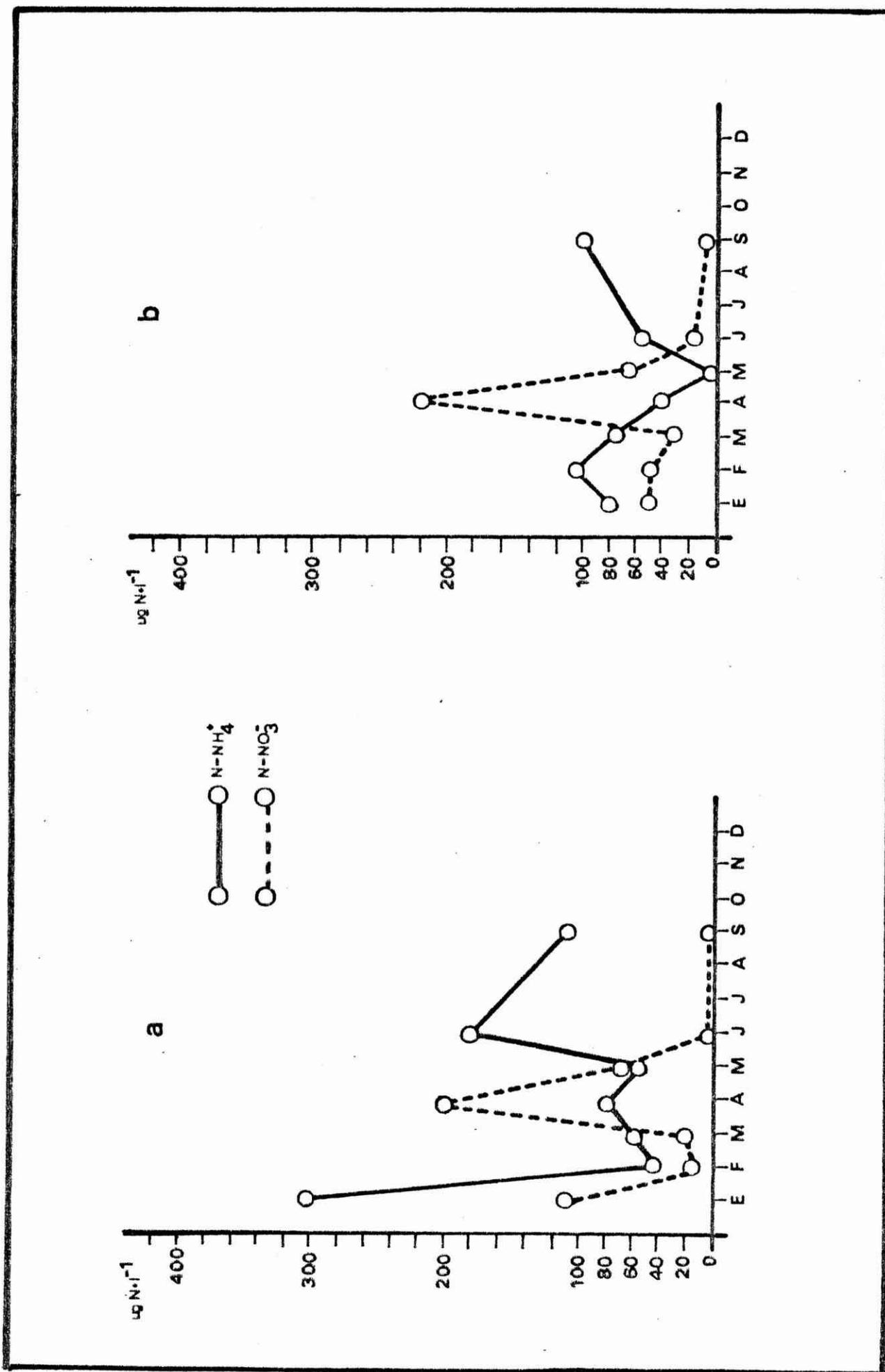


Figura 7: Concentraciones de amonio y de nitratos en muestras de la interfase agua-sedimento.
a = zona profunda; b = zona litoral.

IV.2. BACTERIAS

En la Figura 9, están representadas las cantidades de bacterias heterotróficas totales, amonificantes, reductoras de nitratos, y denitrificantes, contadas en distintas épocas del año en aguas superficiales. En ella se puede observar que la distribución temporal de los tres primeros grupos es semejante, presentando todos sus números máximos de individuos durante la primavera (setiembre-noviembre) y los mínimos en invierno (junio-julio). Las curvas resultantes de unir los recuentos de cada grupo son semejantes a la curva anual de temperatura (Fig. 5) que parece ser el factor principal en el control de esas poblaciones. Las bacterias denitrificantes presentan una distribución algo diferente, ya que los recuentos más elevados no fueron los de la primavera sino los de la época de mezcla del lago (marzo-mayo) que corresponde con la época de mayor concentración de nitratos en el agua (Sección IV.1). A su vez el recuento más pobre se realizó en noviembre, época de muy baja concentración de nitratos, aunque también fueron bajos los de invierno (junio-julio).

Los valores máximos y mínimos encontrados para cada grupo fueron:

- Bacterias heterotróficas totales: más de 10^4 bact./ml en setiembre-noviembre, y 2×10^2 bact./ml en julio.
- Bacterias amonificantes: 7×10^3 bact./ml en noviembre, y 7×10^1 bact./ml en julio.
- Bacterias reductoras de nitratos: 4×10^3 bact./ml en noviembre, y 2×10^2 bact./ml en julio.
- Bacterias denitrificantes: 2×10^2 bact./ml en marzo-abril, y 4×10^0 bact./ml en noviembre.

Los recuentos de los mismos grupos en muestras de agua del fondo son en general más elevados que los anteriores y sus va

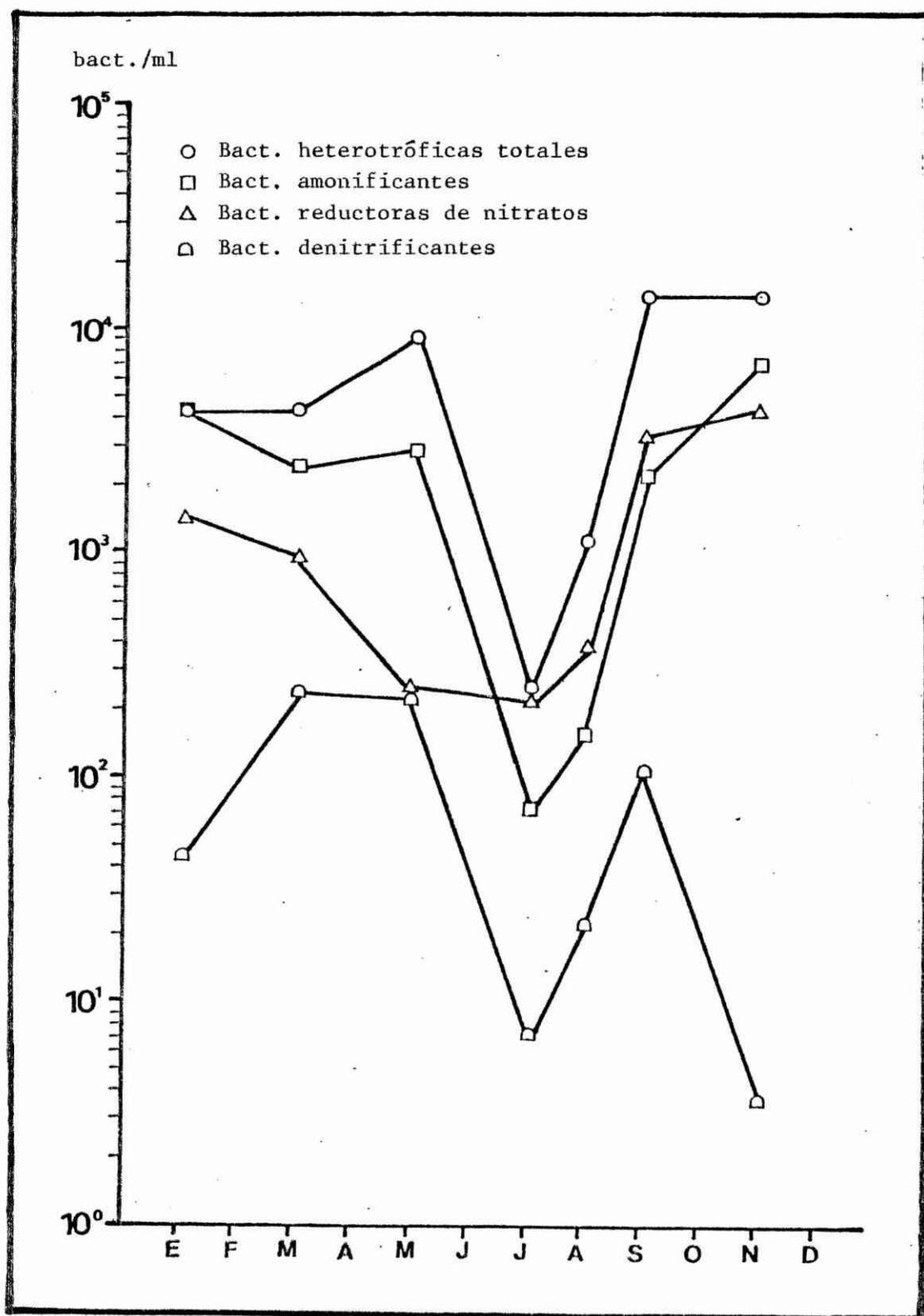


Figura 9: Distribución anual de varios grupos de bacterias heterotróficas en muestras de aguas superficiales (bact./ml).

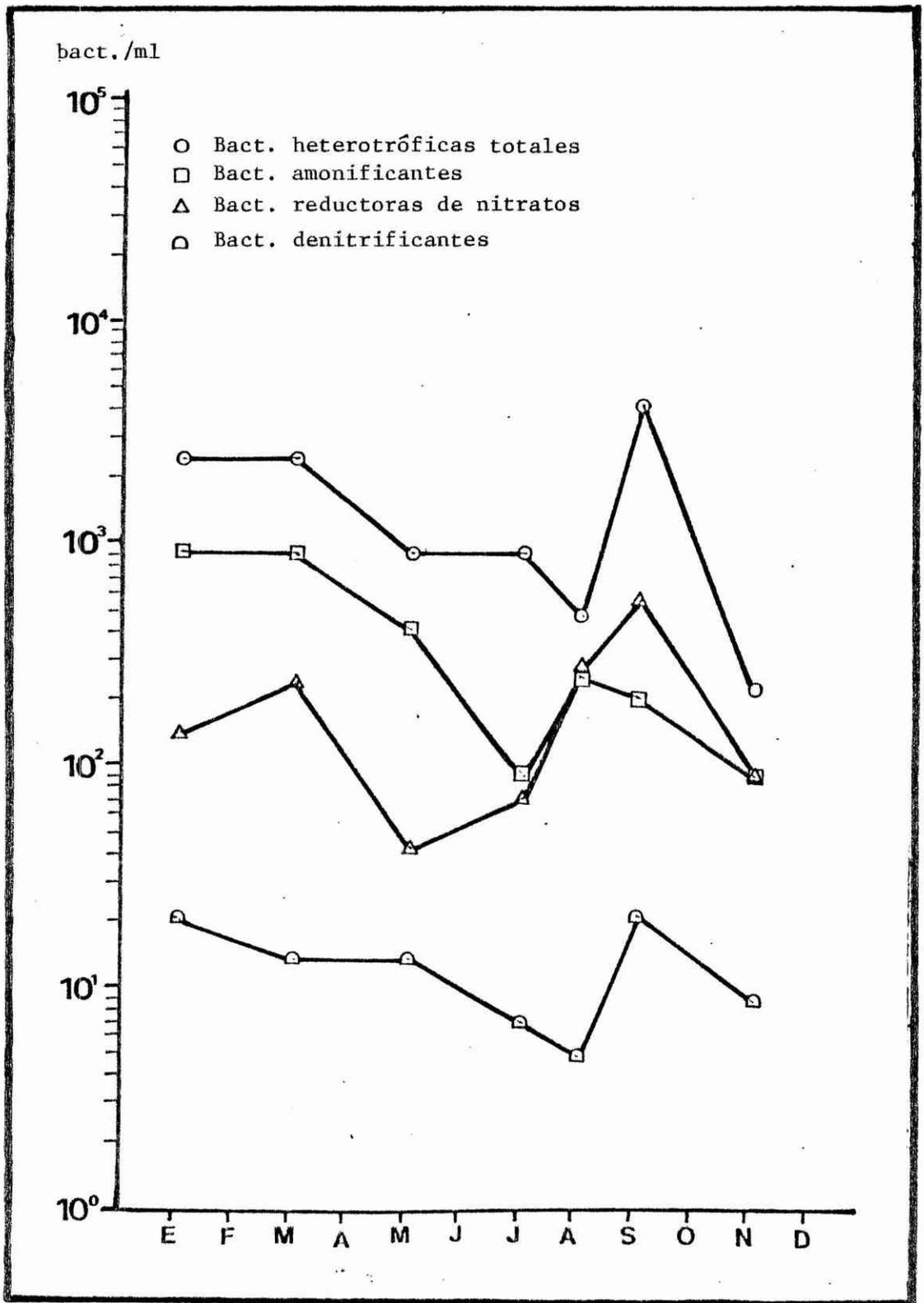


Figura 10: Distribución anual de varios grupos de bacterias heterotróficas en muestras de agua próximas al fondo (bact./ml).

riaciones anuales no son tan marcadas (Fig. 10). Los picos máximos siguen siendo en primavera (setiembre) con excepción de las bacterias amonificantes que presentan los mayores números en verano (enero). Los mínimos varían en los distintos grupos hallándose recuentos bajos en invierno y en noviembre en todos.

Las bacterias denitrificantes tienen una distribución mucho más uniforme que en la superficie y también presentan sus concentraciones más elevadas en setiembre.

Los números máximos y mínimos hallados fueron:

- Bacterias heterotróficas totales: $4,3 \times 10^4$ bact./ml en setiembre, y 2×10^3 bact./ml en noviembre.
- Bacterias amonificantes: 9×10^3 bact./ml en verano, y 9×10^2 bact./ml en invierno.
- Bacterias reductoras de nitratos: 6×10^3 bact./ml en setiembre, y 4×10^2 bact./ml en otoño.
- Bacterias denitrificantes: 2×10^2 bact./ml en setiembre, y 5×10^1 bact./ml en agosto.

Las bacterias nitrificantes se encuentran en concentraciones muy bajas en las muestras de agua, tanto en superficie como en el fondo. Los valores máximos se hallaron en los meses de setiembre y noviembre con recuentos de 50 bact./ml y los mínimos en julio con recuentos de 20-30 bacterias cada 100 ml de muestra.

La distribución de los distintos grupos en muestras de la interfase agua-sedimento es mucho menos uniforme que en las muestras de agua libre. Recuentos realizados en la misma época en años consecutivos, o en el mismo año con días o semanas de diferencia, arrojaron resultados muy dispares.

Si observamos los recuentos de bacterias heterotróficas totales y amonificantes (Fig. 11) vemos que los valores más altos encontrados en cada mes obedecen al mismo esquema que los recuentos de aguas libres. Los números de bacterias por mililitro son

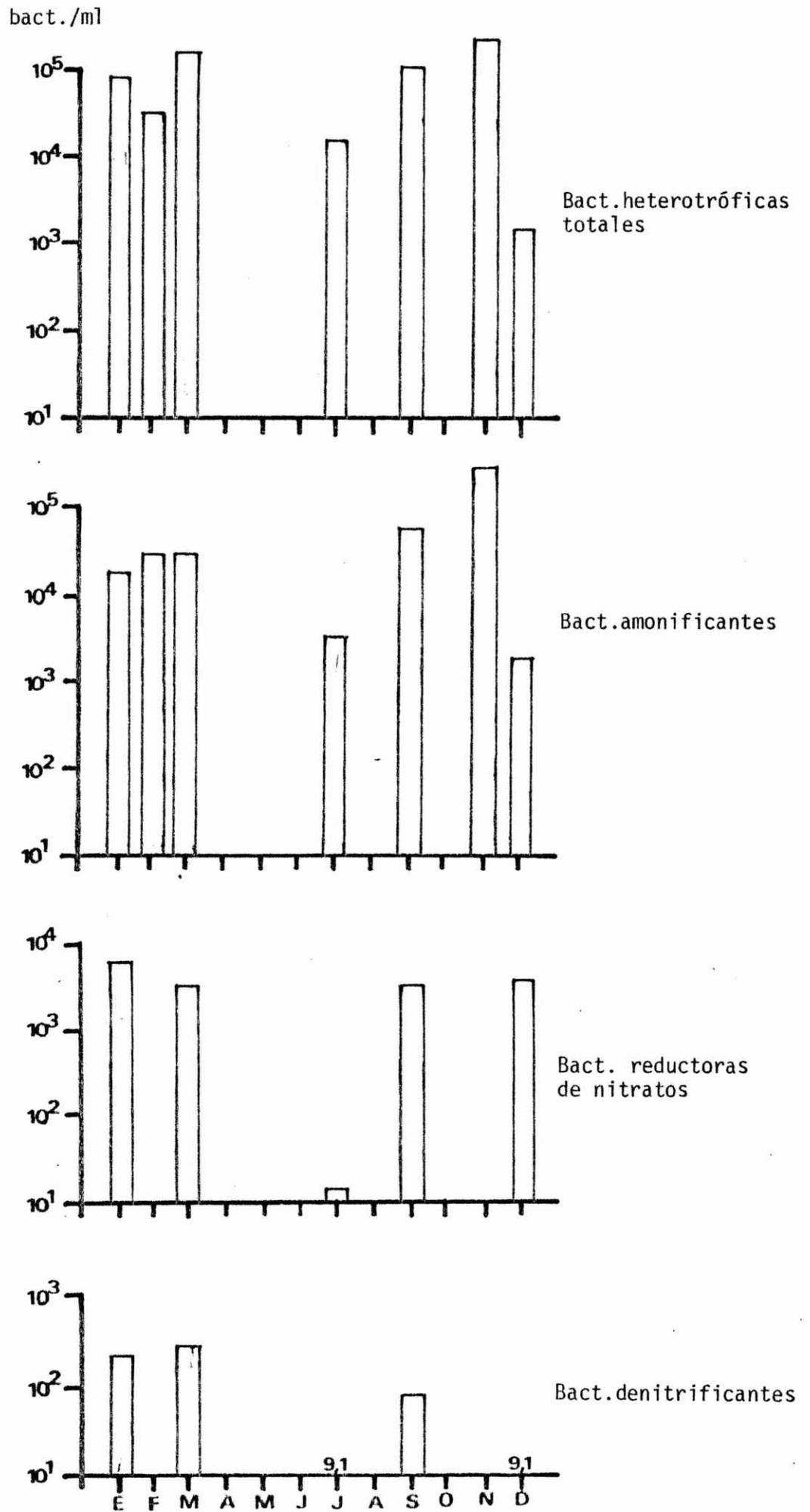


Figura 11: Distribución anual de varios grupos de bacterias heterotróficas en muestras de la interfase agua-sedimento (bact./ml).

más altos que en las muestras de fondo, siendo los máximos de 5×10^5 bact./ml en noviembre y los mínimos de $3-4 \times 10^3$ bact./ml en verano, presentando ambos grupos también números bajos en el invierno (julio). Las bacterias reductoras de nitratos presentaron valores máximos de $1-2 \times 10^4$ bact./ml en verano y mínimos de 2×10^1 bact./ml en invierno (Fig. 11). En este grupo se observaron algunas diferencias entre las muestras de zonas litorales y profundas. En las zonas litorales las concentraciones de bacterias fueron en general algo mayores, y en las zonas profundas fueron más parejas a lo largo del año con excepción de las muestras tomadas en invierno.

En los recuentos de bacterias denitrificantes esas diferencias se hallan más exageradas. Los números de bacterias oscilaron entre 4×10^2 y 0 bact./ml. La concentración más elevada en muestras de zona profunda se encontró en marzo y la más baja en invierno y diciembre con 9,1 bact./ml. En la zona litoral las máximas fueron en julio y setiembre y la mínima en diciembre con 0 bact./ml.

Las bacterias nitrificantes cuyos recuentos se graficaron en la Figura 12, presentan sus valores más elevados en primavera y verano con 5×10^2 y 10^3 bact./ml para las bacterias nitrificadoras, y $10^1-6 \times 10^1$ para las bacterias nitratadoras.

Lamentablemente no existen datos correspondientes a la época de mezcla (marzo-abril) en que se encuentran las concentraciones más elevadas de nitritos y nitratos (Sección IV.1.), y de nitrificación (Sección IV.4.2.).

La distribución anual de las bacterias en sedimentos es bastante diferente de las poblaciones bacterianas en aguas. Las cantidades de bacterias por mililitro de sedimento se mantienen más constantes durante el año y todos los grupos presentan sus valores máximos en la época de mezcla (marzo-abril). No se encuentra

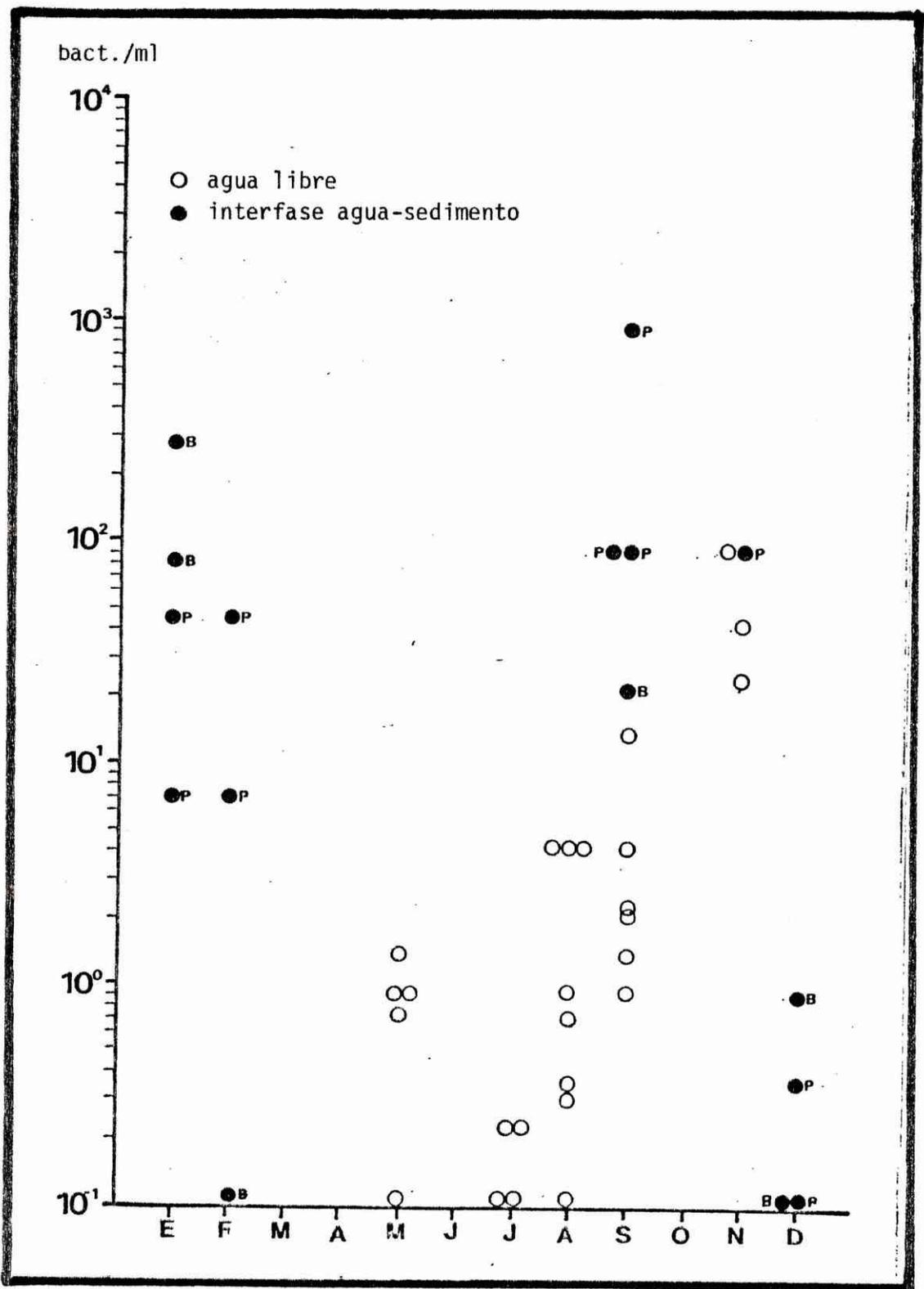


Figura 12 a: Distribución anual de bacterias nitrificadoras en muestras de aguas libres y de la interfase agua-sedimento.
 B = zona baja o litoral; P = zona profunda.

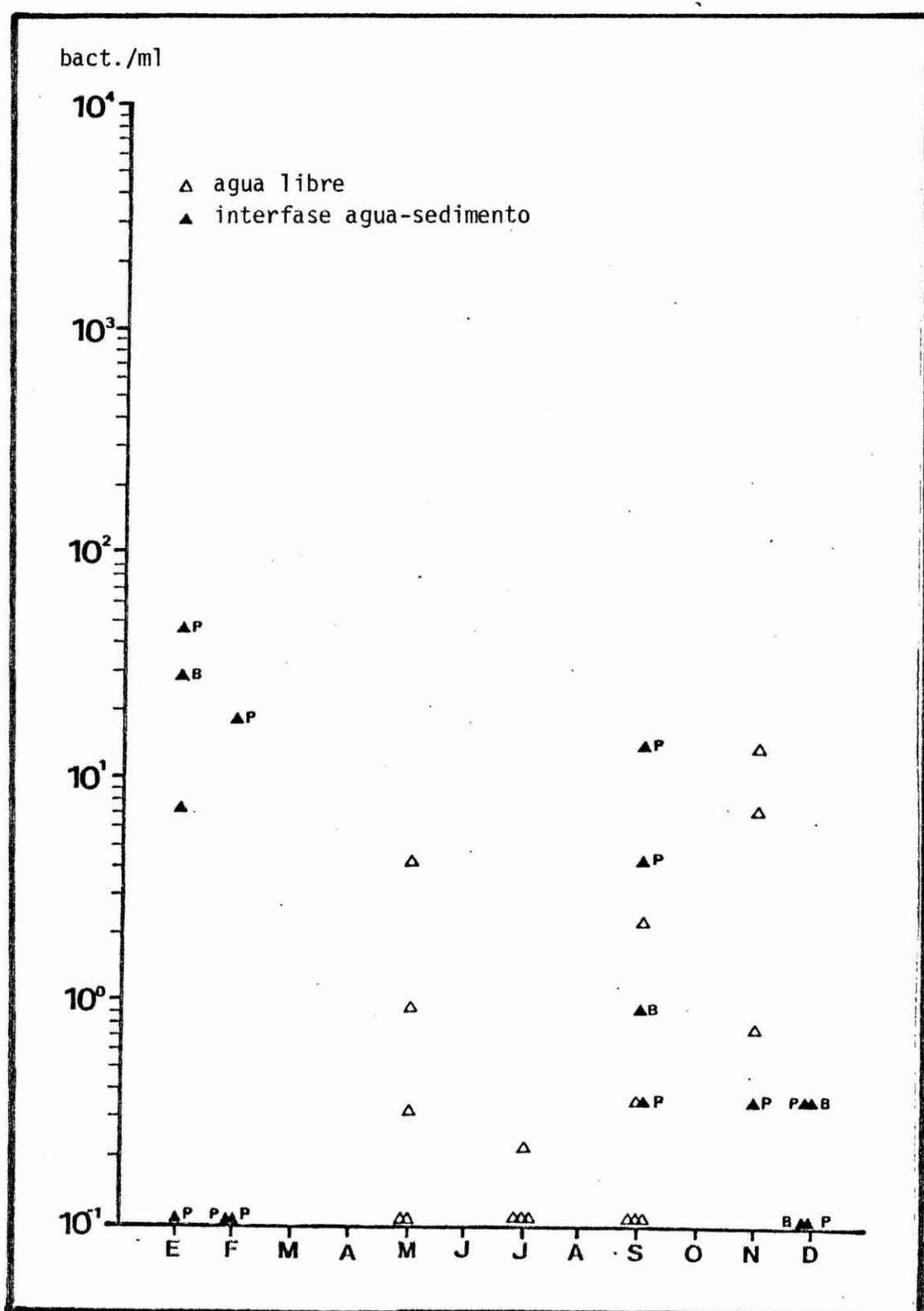


Figura 12 b: Distribución anual de bacterias nitratoras en muestras de aguas libres y de la interfase agua-sedimento.
 B = zona baja o litoral; P = zona profunda.

ron diferencias significativas entre los recuentos de zonas litorales y zonas profundas.

Las bacterias heterotróficas totales se hallan en cantidades de 10^7 bact./ml durante todo el año con un máximo de 6×10^7 bact./ml. (Fig. 13). Las bacterias amonificantes presentan una distribución y cantidades semejantes, (Fig. 14), ya que en muchos recuentos sumaron el cien por ciento de las heterotróficas.

Las bacterias reductoras de nitratos y las denitrificantes (Figs. 15 y 16), muestran un esquema similar con recuentos parejos durante el año pero el pico máximo de marzo-abril se destaca más claramente que en los casos anteriores. Este pico coincide como en el caso de las muestras de interfase con las máximas concentraciones de nitritos y nitratos (Sección IV.1.), y las máximas tasas de nitrificación (Sección IV.4.2.). Los valores más elevados encontrados fueron de $9,2 \times 10^6$ bact. reductoras de nitratos/ml y $4,8 \times 10^6$ bact. denitrificantes/ml, en la época de mezcla, y los mínimos de 7×10^2 bact./ml para ambos grupos en julio, aunque los promedios en esa época superaron generalmente las 10^3 bact./ml.

La distribución de las bacterias nitrificantes no es tan pareja como para los grupos anteriores (Fig. 17). Estas presentan su máximo en abril-mayo, una disminución en invierno y luego aumentan nuevamente en setiembre mostrando los recuentos más pobres en la época de verano (diciembre-febrero). Los máximos oscilan alrededor de 3×10^6 bact./ml y coinciden con las concentraciones máximas de nitratos (Sección IV.1.), con las tasas máximas de nitrificación (Sección IV.4.2.), y con la época de mezcla que es cuando el oxígeno accede a los sedimentos. Los recuentos mínimos se registraron en verano con cantidades de 3×10^3 bact./ml en diciembre y 7×10^3 bact./ml en enero.

No se hallaron diferencias significativas entre muestras

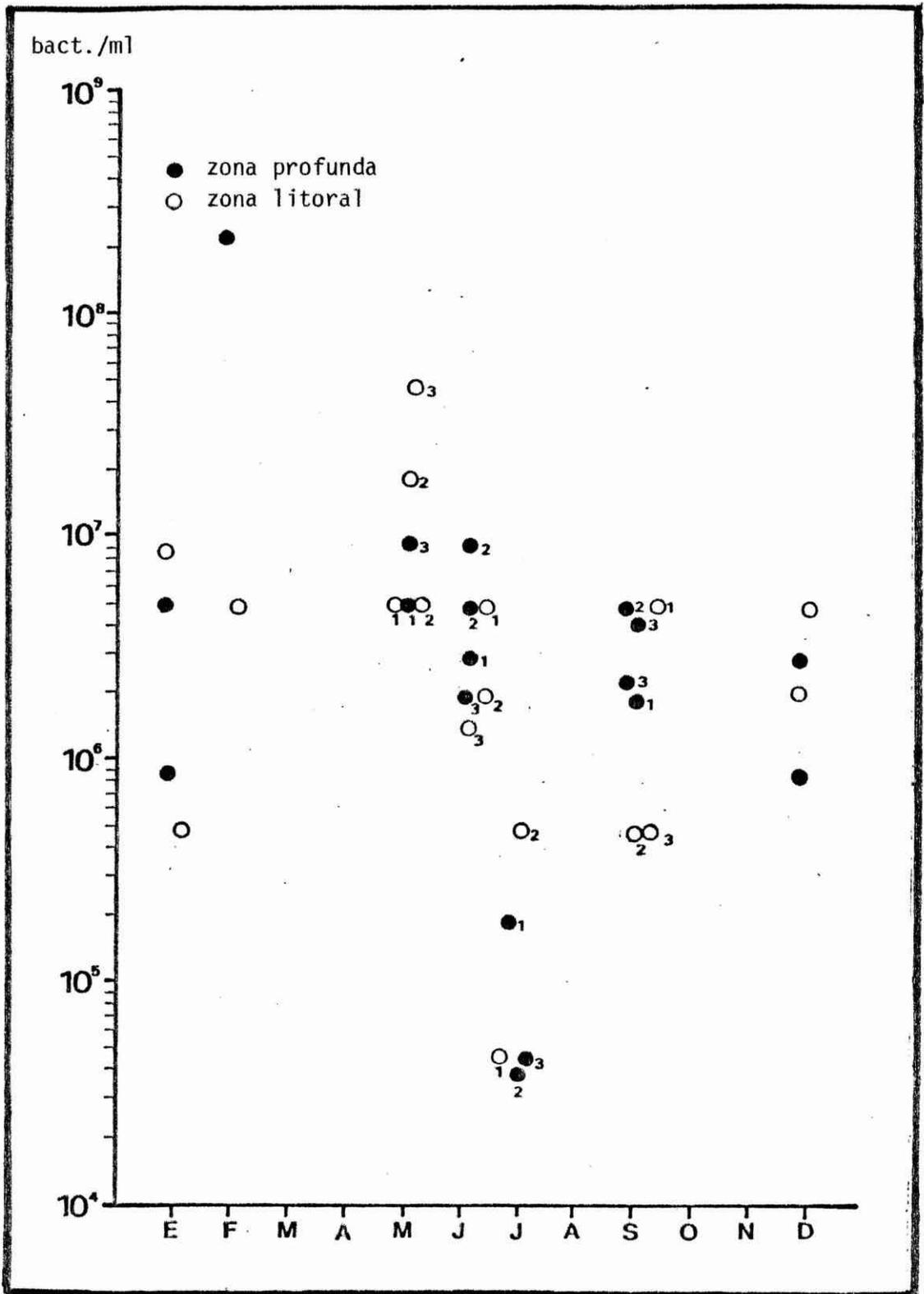


Figura 14: Distribución anual de bacterias amonificantes en muestras de sedimentos. Los números indican profundidad en centímetros en el sedimento.

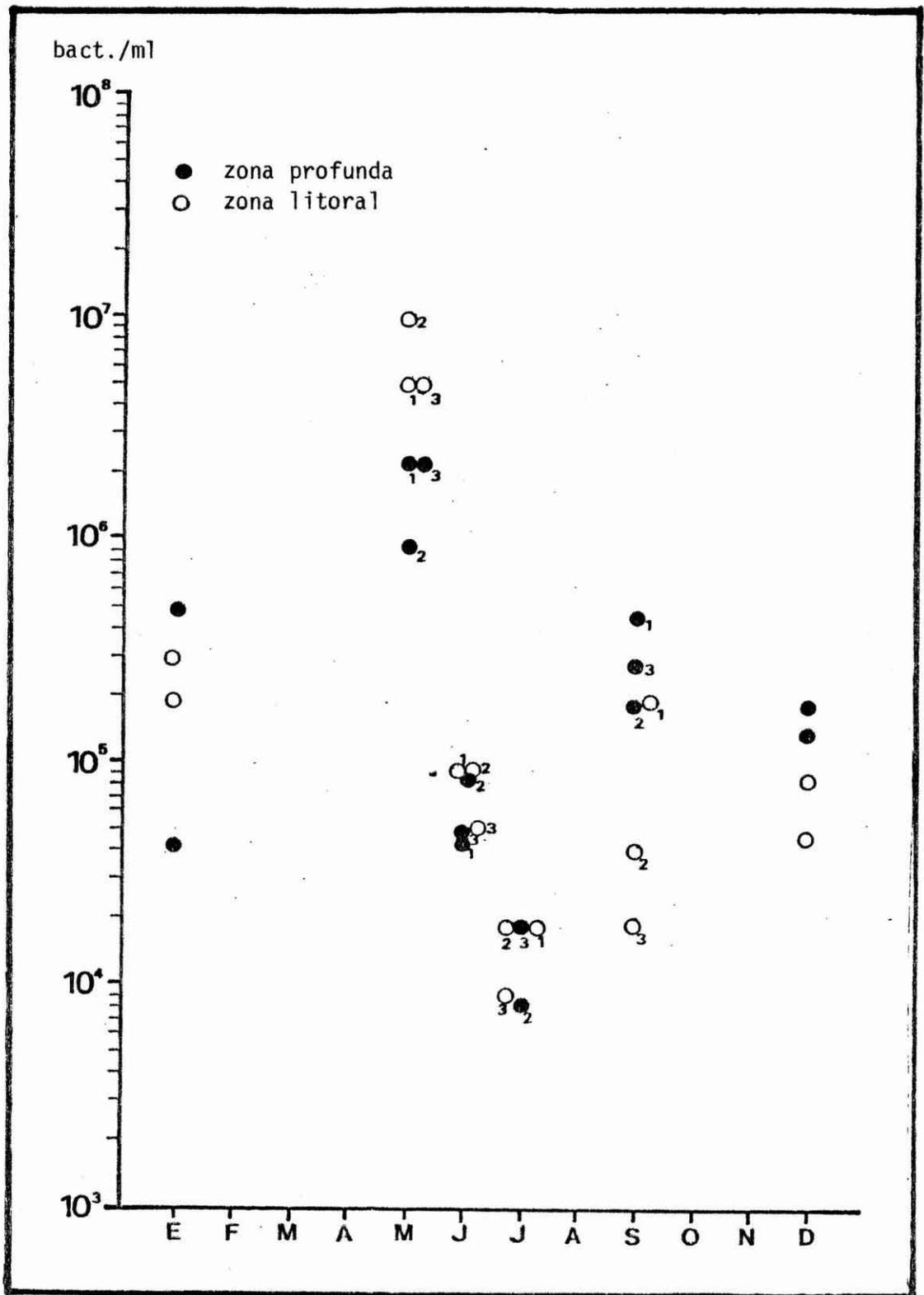


Figura 15: Distribución anual de bacterias reductoras de nitratos en muestras de sedimentos. Los números indican profundidad en centímetros en el sedimento.

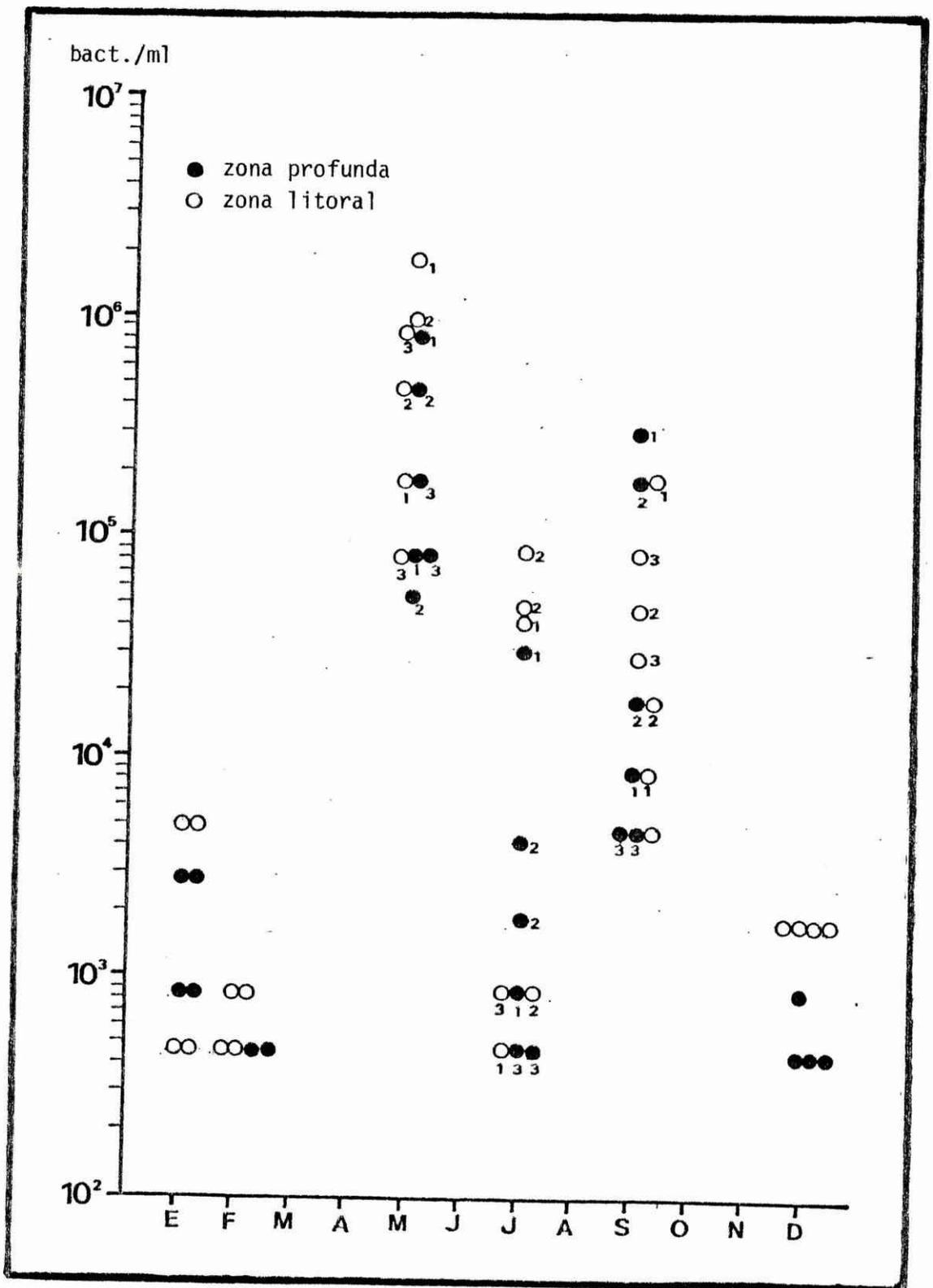


Figura 17: Distribución anual de bacterias nitrificantes en muestras de sedimentos. Los números indican profundidad en centímetros en el sedimento.

de zonas litorales y zonas profundas, aunque sí, entre las poblaciones de bacterias nitritadoras y nitratadoras siendo los recuentos de estas últimas generalmente inferiores y en algunas ocasiones hasta diez veces menores.

IV.3. Clasificación de las Bacterias.

En estudios previos realizados en la Sección Bacteriología del Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" con muestras de agua del Embalse del Río Tercero se aislaron, purificaron y tipificaron numerosas cepas de bacterias heterotróficas, Gram negativas. Parte de los resultados de dichos trabajos sobre un total de más de 650 cepas se hallan graficados en la Figura 18. Se puede observar que el género mejor representado es *Flavobacterium*, que constituye más del 35% de los aislamientos tanto de muestras superficiales como de fondo. Le siguen en importancia *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Cytophaga*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, con, aproximadamente, el 10% de los aislamientos cada uno, y en menor proporción individuos de los grupos enterobacterias, *Aeromonas-Vibrio*, 5% cada uno, y de los géneros *Chromobacterium* y *Alcaligenes*, 0,5% cada uno. Los mismos géneros se pueden considerar como representantes de las bacterias amonificantes si se tiene en cuenta que en muchos recuentos, especialmente en muestras de sedimentos, las bacterias amonificantes resultaron ser el cien por ciento de las heterotróficas totales. Por otro lado ambos grupos fueron cultivados en caldos proteicos, principalmente con base de peptona lo que indica su capacidad para metabolizar esa fuente de materia orgánica.

Para el estudio sistemático de las bacterias reductoras de nitratos y denitrificantes se hicieron 115 aislamientos a partir de tubos de recuento de esos grupos con resultados positivos.

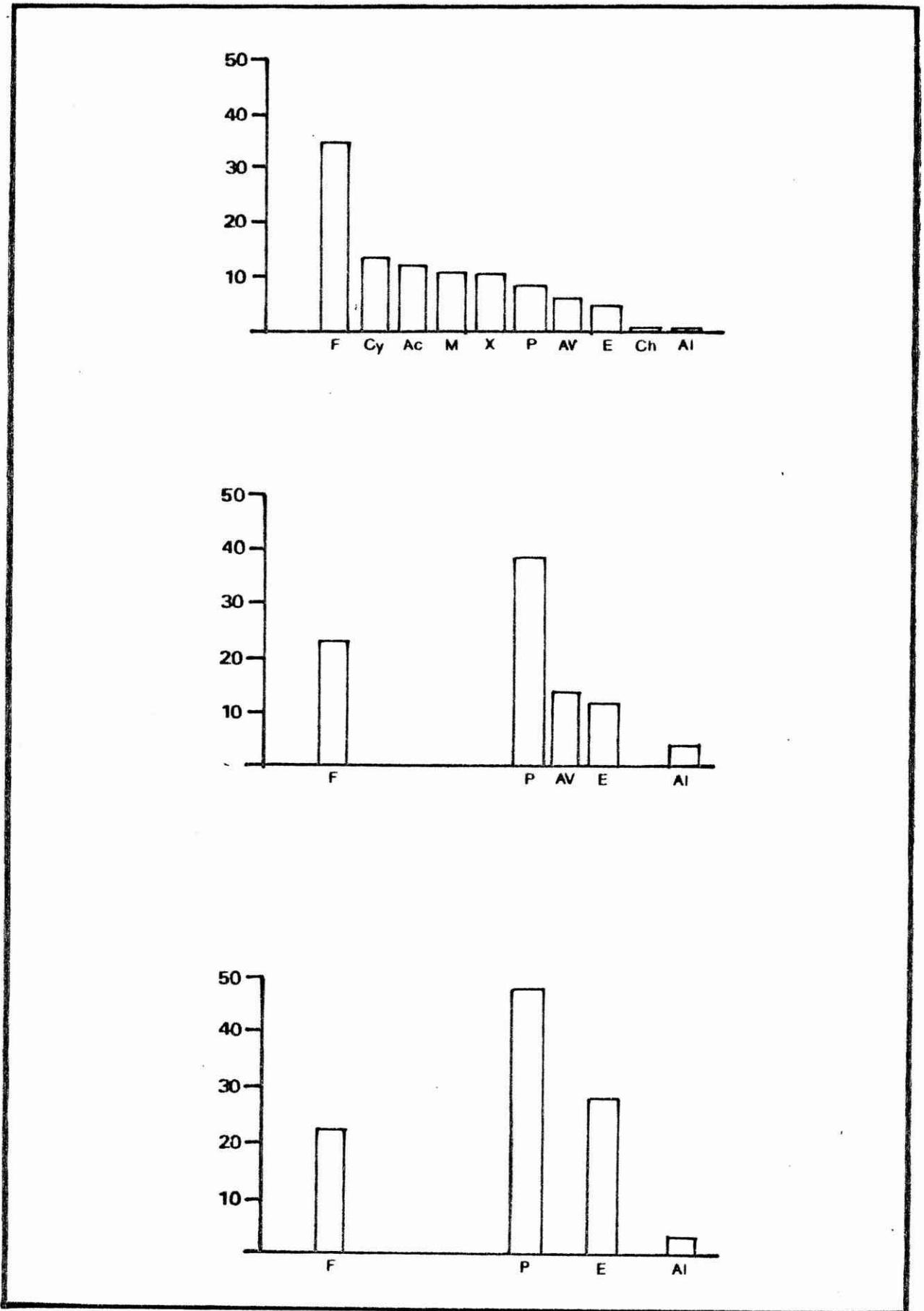


Figura 18: Cantidad de bacterias de diversos géneros expresados como porcentaje del total de los aislamientos para los distintos grupos. F = *Flavobacterium*; Cy = *Cytophaga*; Ac = *Acinetobacter*; M = *Moraxella*; X = *Xhantomonas*; P = *Pseudomonas*; AV = grupo *Aeromonas-Vibrio*; E = enterobacterias; Ch = *Chromobacterium*; AI = *Alcaligenes*.

Sólo 92 resultaron ser cepas de bacterias Gram negativas con capacidad para reducir nitratos a nitritos y entre éstas sólo 34 cepas mostraron capacidad para producir nitrógeno molecular a partir de nitratos.

De las 85 cepas reductoras de nitratos tipificadas (Fig. 18), las cantidades y porcentajes fueron: 32 (37,6%) *Pseudomonas*; 19 (22,4%) *Flavobacterium*; 18 (21,1%) enterobacterias; 11 (13%) *Aeromonas-Vibrio*; 3 (3,5%) *Alcalígenes*; y 2 (2,4%) *Moraxella*.

Se lograron identificar 32 cepas de bacterias denitrificantes y estas fueron: 15 (46,9%) *Pseudomonas*; 9 (28,1%) enterobacterias; 7 (21,9%) *Flavobacterium*; y 1 (3,1%) *Alcalígenes*. Lamentablemente, no se logró concretar la clasificación sistemática de las bacterias nitrificantes. Esta se realiza exclusivamente en base a características morfológicas. Bergey's Manual (5). Debido a su condición de bacterias autotróficas sólo crecen en medios minerales y lo hacen muy lentamente, Matulewich et al. (38), por lo que resulta muy dificultoso mantener cultivos puros y lograr densidades altas de bacterias para realizar los estudios taxonómicos.

De cualquier manera, como se dijo antes (Sección III.5.3.), se lograron cultivos que demostraron capacidad para oxidar amonio a nitritos, y nitritos a nitratos, y en los que no se pudo demostrar presencia de bacterias heterotróficas cuando se sembraron con ellos caldos ricos en materia orgánica. Según Lees (35), esta evidencia es suficiente para comprobar la presencia de bacterias nitrificantes.

IV.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

IV.4.1. Demanda bioquímica de oxígeno.

Las experiencias realizadas demostraron que la DBO tanto de muestras de agua como de sedimento presentan una marcada dependencia de la temperatura. En muestras de agua de la interfase agua-sedimento incubadas a 24°C se observó un consumo de 0,5-0,6 mg O₂.l⁻¹.d⁻¹ mientras que muestras semejantes incubadas a 19°C consumieron 0,10-0,15 mg O₂.l⁻¹.d⁻¹. Lo mismo se observó cuando se estudiaron muestras de sedimento. En la Figura 19, se presentan las rectas de regresión correspondientes al consumo de oxígeno en función de la temperatura, para una serie de muestras de sedimento tomadas en una estación litoral y una estación profunda en distintas épocas del año e incubadas a la temperatura ambiental de ese momento. Se observa que los sedimentos de ambas profundidades se comportan en forma semejante consumiendo 100-150 mg O₂.m⁻².d⁻¹ a 11°C, y 550-600 mg O₂.m⁻².d⁻¹ a 23°C. Experiencias realizadas con muestras semejantes, tomadas en el mismo momento, e incubadas a las temperaturas mencionadas arrojaron como resultados: muestras litorales 130 mg O₂.m⁻².d⁻¹ a 11°C y 680 mg O₂.m⁻².d⁻¹ a 23°C; muestras profundas 150 mg O₂.m⁻².d⁻¹ a 11°C y 520 mg O₂.m⁻².d⁻¹ a 23°C.

En la Figura 20, se representa el contenido de oxígeno disuelto en el agua sobre el sedimento en función del tiempo en muestras de la estación litoral (L) y la estación profunda (P) tomasadas en el mismo momento e incubadas a distinta temperatura. Aquí nuevamente se puede apreciar la semejanza en el consumo de oxígeno por ambos tipos de muestras y la diferencia de consumo de las mismas al variar la temperatura. Esa paridad en el consumo de oxígeno es coincidente con los recuentos bacterianos realizados, cuyas cifras no difieren en valores significativos entre las mues-

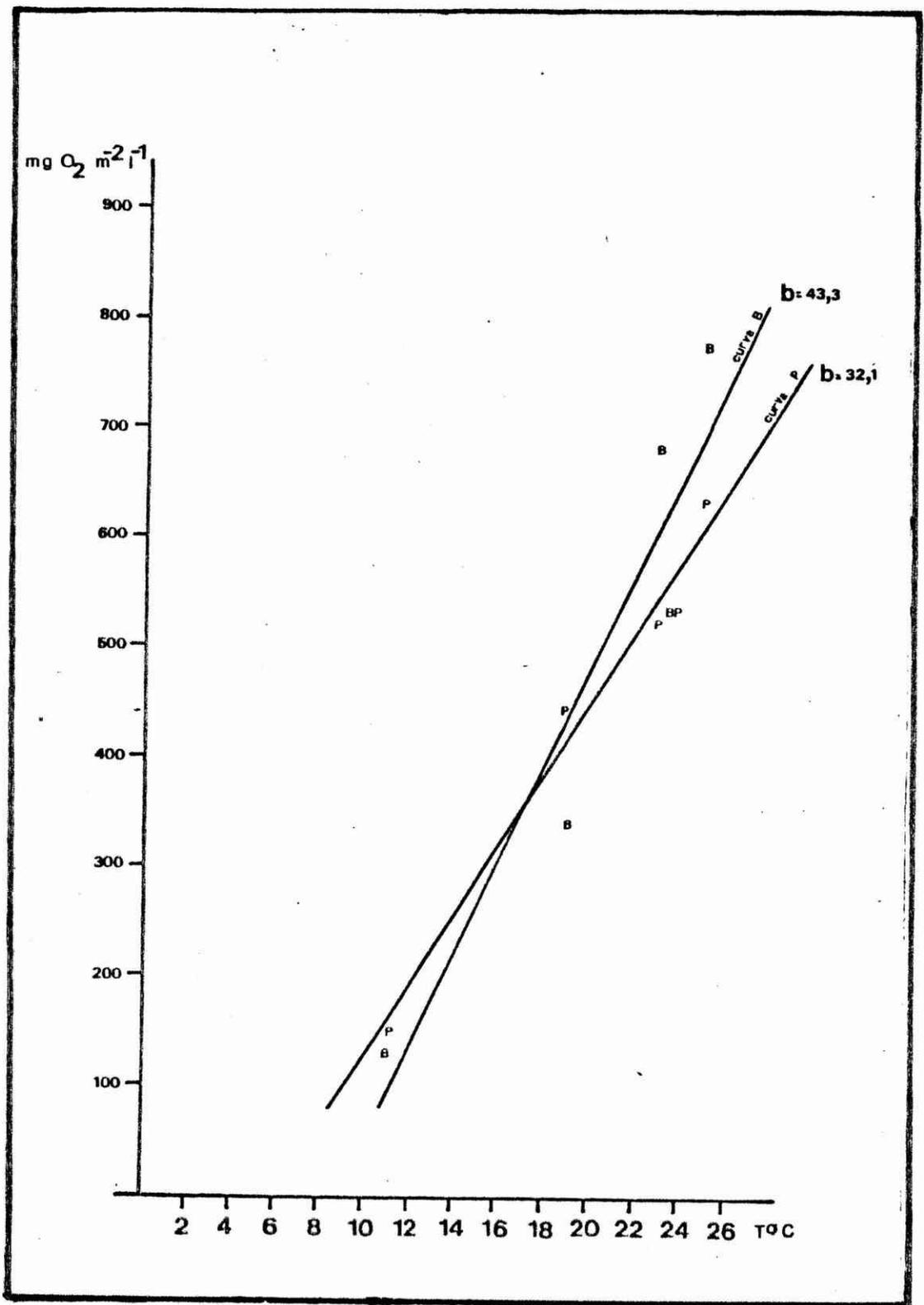


Figura 19: Curvas de regresión trazadas en base a experiencias de consumo de oxígeno por muestras de sedimento realizadas a distintas temperaturas.
 B = zona baja o litoral; P = zona profunda.

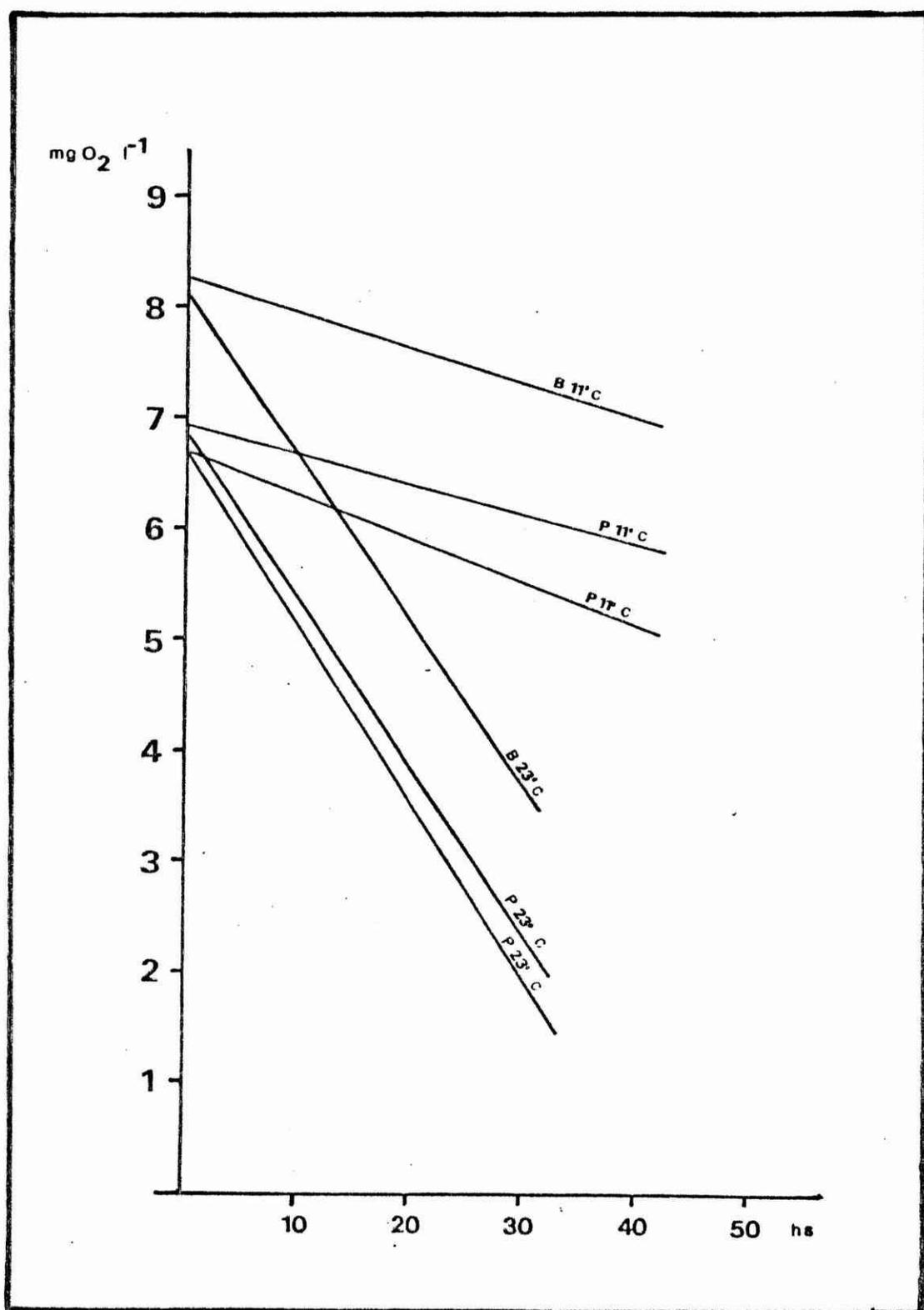


Figura 20: Curvas de consumo de oxígeno por muestras de sedimento idénticas incubadas a distintas temperaturas. B = zona baja o litoral; P = zona profunda.

tras de zonas litorales y profundas. Por otro lado las diferencias de consumo dependientes de la temperatura nos permiten explicar las deficiencias de oxígeno halladas en las zonas profundas durante el verano y de los gradientes de concentración de dicho elemento encontrados en las proximidades del fondo.

IV.4.2. Nitrificación.

La nitrificación medida en muestras de agua alcanzó valores entre 0,01 y 0,09 mg N.l⁻¹.d⁻¹. Estas cantidades se hallaron en el agua libre en setiembre a las profundidades de 5 y 10 m. En enero sólo las muestras próximas al fondo evidenciaron nitrificación. En muestras de la estación litoral el valor más elevado fue de 0,028 mg N.l⁻¹.d⁻¹ a 10 cm sobre el fondo y en muestras de la estación profunda 0,088 mg N.l⁻¹.d⁻¹ a 25 cm del fondo. Las diferencias entre ambas estaciones podrían estar vinculadas con las concentraciones de oxígeno que son generalmente bajas en esa época del año.

La tasa de nitrificación en sedimentos más elevada se observó en mayo, (Fig. 21), coincidiendo con las máximas concentraciones de nitratos encontradas (Sección IV.1.), con los recuentos más altos de bacterias nitrificantes (Sección IV.2.) y con la época de aporte de oxígeno a los sedimentos (Sección IV.1.). En ese momento los valores fueron de 94 mg N.m⁻².d⁻¹ en el primer centímetro de la estación litoral y 32,2 mg N.m⁻².d⁻¹ en el primer centímetro de la estación profunda, correspondiendo a una temperatura de incubación de 15°C.

En junio se realizaron experiencias incubando muestras de ambas profundidades a diferentes temperaturas. Las tasas de nitrificación en el primer centímetro de muestras de zonas litorales

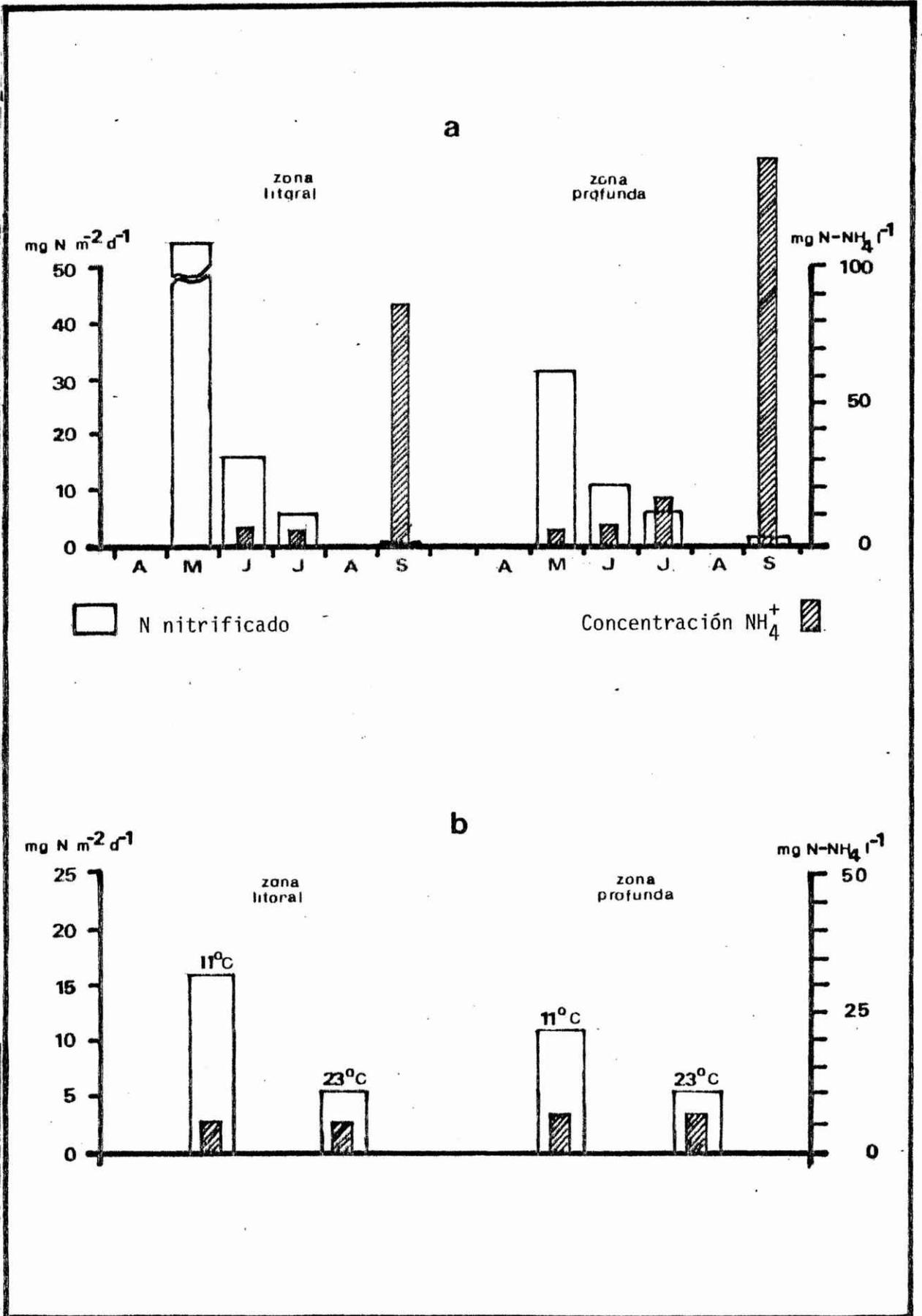


Figura 21: Resultados de diferentes experiencias de nitrificación con muestras de sedimentos. a = en distintas épocas del año a la temperatura ambiente; b = en un mismo momento incubando muestras idénticas a distintas temperaturas.

y zonas profundas fueron de $16,2 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ y $10,8 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ respectivamente a 11°C y para los mismos tipos de muestras de $5,28 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ y $5,4 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ a 23°C .

En las experiencias de julio realizadas a $8,5^{\circ}\text{C}$ se nitrificaron $5,7 \text{ mg N.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ en el primer centímetro de muestras de la zona litoral tanto como de la zona profunda.

IV.4.3. Reducción de nitratos.

En las Figuras 22 y 23 se hallan representados los resultados de una experiencia de reducción de nitratos realizada con muestras de las estaciones litoral y profunda. Muestras de ambas estaciones por duplicado fueron incubadas a 11°C y a 23°C .

En ellas se puede observar que, en todas las muestras e independientemente de la temperatura, hay un rápido descenso en la concentración de nitratos y un incremento marcado en la concentración de nitritos. Las concentraciones de amonio descienden levemente en las muestras de la zona litoral mientras que aumentan considerablemente en las muestras de la zona profunda. Si bien la temperatura contribuye a que los fenómenos mencionados se vean moderadamente aumentados en las muestras incubadas a 23°C , es obvio que las diferencias halladas se deben a diferencias intrínsecas entre muestras de distintas zonas.

Estos resultados concuerdan con los expuestos en Jones (30), donde se explica que los principales productos de la reducción de nitratos son amonio en la zona profunda y nitrógeno en la zona litoral, independientemente de los números de bacterias reductoras de nitratos y denitrificantes que se encuentren. Las zonas profundas parecerían tener un mayor potencial para reducir los nitratos a amonio y el mismo estaría ligado a las mayores con

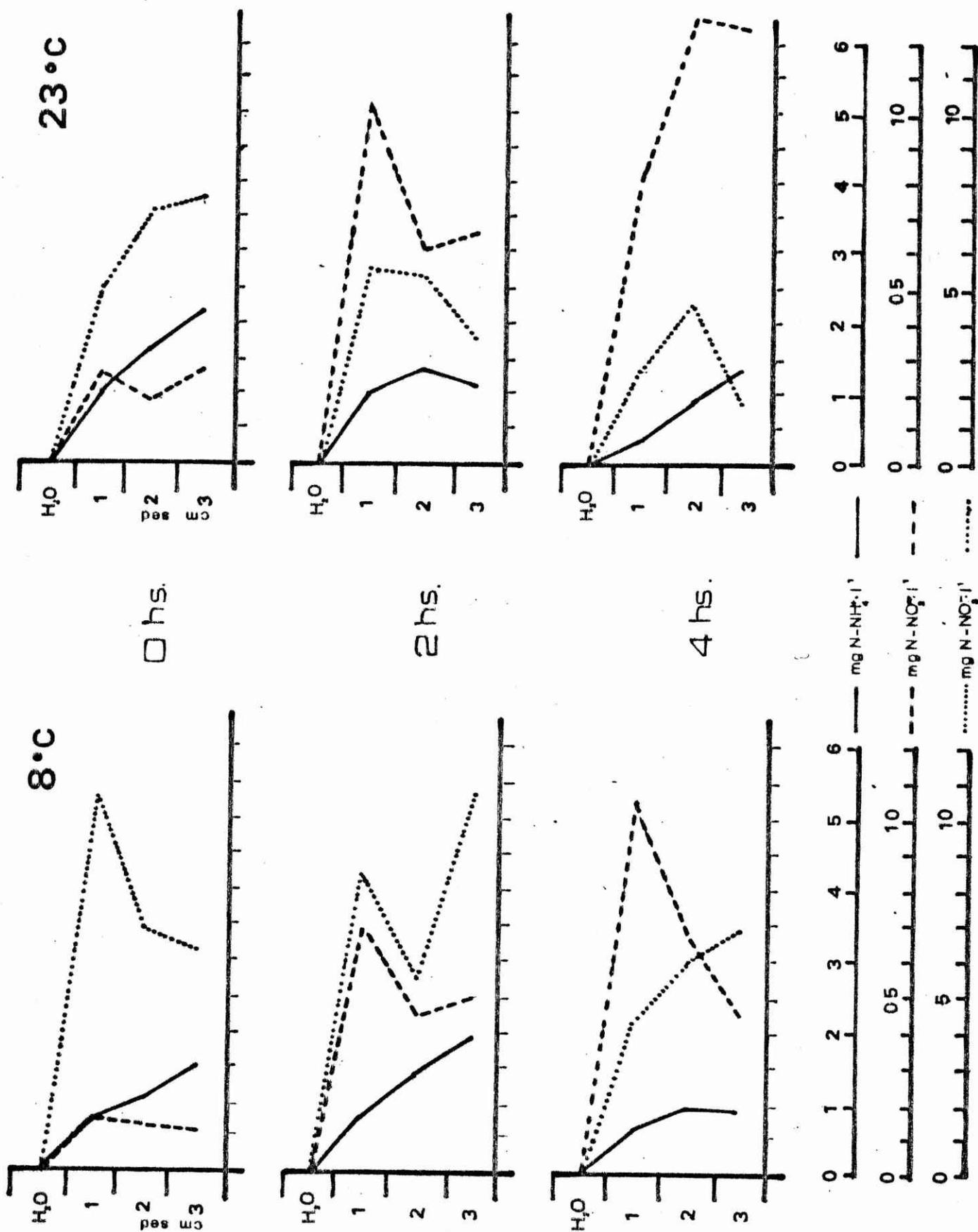


Figura 22: Resultados de experiencias de reducción de nitratos realizadas con muestras de sedimentos de la zona litoral incubadas a distintas temperaturas.

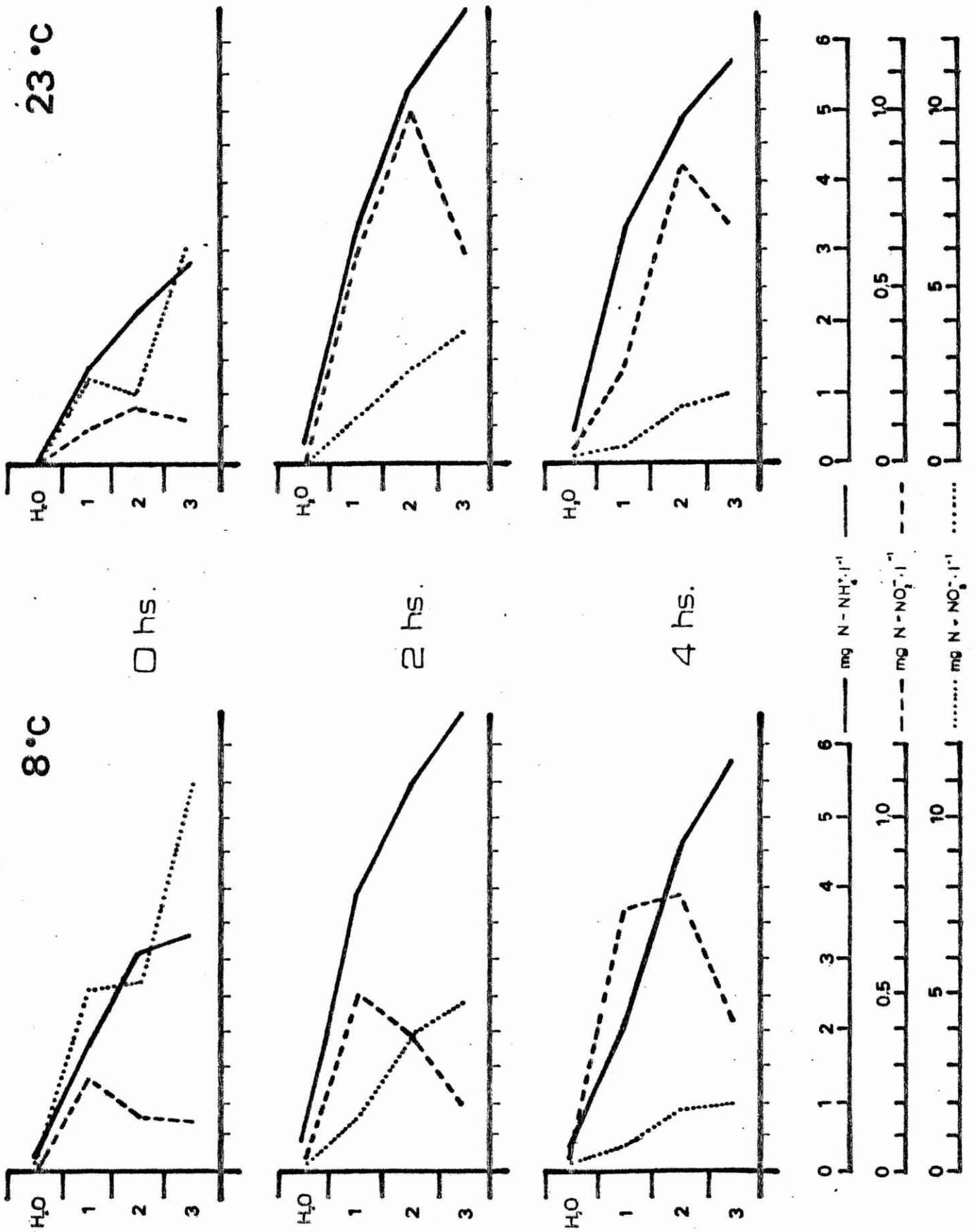


Figura 23: Resultados de experiencias de reducción de nitratos realizadas con muestras de sedimentos de la zona profunda incubadas a distintas temperaturas.

centraciones de materia orgánica que en ellas se hallan. En las zonas con menor concentración de nutrientes, como son las litorales, el principal producto sería el nitrógeno molecular. En ambos casos el nitrito aparece como un producto intermedio. La diferencia radicaría en que, aunque en ambas zonas se produjeran cantidades iguales de nitrógeno molecular y amonio, este último sería rápidamente reciclado en la zona litoral donde el proceso de nitrificación ($\text{NH}_4 \text{ — NO}_3^-$) es más activo, y el nitrato producido se volvería a reducir dada la gran avidéz de los sedimentos por ese compuesto. Si se tiene en cuenta que en cada una de estas reducciones alguna porción del nitrógeno involucrado se pierde como nitrógeno elemental, es lógico esperar mayores cantidades de esta forma en zonas litorales, y mayores concentraciones de amonio en zonas profundas donde la nitrificación es generalmente menor.

V. RESUMEN

Por medio de un muestreo bimensual se pudieron conocer algunos aspectos del Embalse del Río Tercero, particularmente en lo que se refiere al ciclo del Nitrógeno. Con una botella de tipo Van Dorn se tomaron muestras de agua de distintas profundidades, con un aparato diseñado "ad hoc" se muestrearon estratos específicos de la interfase agua-sedimento y con un muestreador tipo Kajak se tomaron muestras del sedimento. Las estaciones de muestreo se ubicaron en lugares representativos del embalse en zonas litorales, poco profundas y con aguas bien oxigenadas durante todo el año, y zonas profundas que presentan déficit de oxígeno en la proximidad de los sedimentos en verano.

En las muestras de agua se determinó la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, el pH, la alcalinidad total, la conductividad eléctrica y las concentraciones de nutrientes de nitrógeno como amonio, nitritos y nitratos. Se realizaron también recuentos de bacterias heterotróficas totales, amonificantes, reductoras de nitratos, denitrificantes y nitrificantes (nitritadoras y nitratadoras). En las muestras de sedimentos se analizaron las concentraciones de nutrientes de nitrógeno y se cuantificaron los grupos bacterianos mencionados. En el laboratorio se realizaron aislamientos, purificación y tipificación de cepas, a partir de los tubos de recuento con resultados positivos, de los distintos grupos fisiológicos de bacterias. Finalmente, se realizaron experimentos destinados a cuantificar algunos procesos bioquímicos bacterianos, como la demanda bioquímica de oxígeno, la nitrificación y la reducción de nitratos que son aspectos fundamentales del ciclo del nitrógeno.

La temperatura determina una época de estratificación no muy pronunciada en verano, con 24-27°C en la superficie que disminuye gradualmente en 5-6°C hasta el fondo, y una época de mezcla (mayo) y circulación durante el invierno con 7-8°C en toda la columna de agua. Ello explica que el oxígeno que se produce por fotosíntesis en la zona fótica, se distribuya en forma homogénea ($7-9 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$) entre la superficie y el fondo durante la época de circulación y que en el verano sea común hallar altas concentraciones de oxígeno en la superficie ($8-9 \text{ mg O}_2 \cdot \text{l}^{-1}$) y concentraciones muy bajas o nulas en zonas profundas, debido a que las capas de agua de distinta densidad no se mezclan. Lo mismo ocurre con la distribución de los otros parámetros químicos estudiados. Los nutrientes en cambio presentan concentraciones de 0-200 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \cdot \text{l}^{-1}$ y 0-100 $\mu\text{g N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1}$ durante todo el año y sus picos más altos se observaron en la época de mezcla al romperse la estratificación. Los nitritos siempre se hallan en concentraciones apenas detectables. Las bacterias presentan en general sus concentraciones máximas en setiembre y las mínimas en invierno. Los recuentos obtenidos en muestras superficiales fueron: bacterias heterotróficas totales/ml 10^4 en setiembre y 2×10^2 en julio; bacterias amonificantes/ml 7×10^3 en noviembre y 7×10^1 en julio; bacterias reductoras de nitratos/ml 4×10^3 en noviembre y 2×10^2 en julio; bacterias denitrificantes/ml 2×10^2 en marzo-abril y 4×10^0 en noviembre. Como se puede observar, los valores máximos de este último grupo coinciden con la época de mayor concentración de nutrientes. En las muestras próximas al fondo las concentraciones de bacterias son algo más elevadas y las variaciones estacionales menos notorias. Las bacterias nitrificantes se encuentran en cantidades muy bajas en las muestras de agua.

En las muestras de la interfase agua-sedimento se observó muchas veces un gradiente en la concentración de oxígeno, debido seguramente al elevado consumo de ese elemento por parte del fondo. Las concentraciones de nutrientes son más altas que en el agua libre, hallándose $100-300 \mu\text{g N-NH}_4^+.1^{-1}$ durante casi todo el año y siendo apenas detectable en la época de mezcla. Los nitratos presentaron inversamente un pico de $220-260 \mu\text{g N-NO}_3^-.1^{-1}$ en la época de mezcla y concentraciones de $0-50 \mu\text{g N-NO}_3^-.1^{-1}$ el resto del año. Las concentraciones de amonio fueron mayores en muestras de la zona profunda, y los picos de los nitratos en las muestras de las zonas litorales. Las bacterias presentan concentraciones en orden de magnitud mayores que las halladas en las muestras de aguas profundas, siendo las proporciones entre los distintos grupos, semejantes. Las bacterias nitrificantes se encuentran mejor representadas con máximos de 10^3 bact. nitritantes/ml y 6×10^1 bact. nitratantes/ml.

En los sedimentos los nutrientes mostraron un comportamiento similar al de la interfase agua-sedimento pero las concentraciones fueron notablemente mayores. El amonio presentó concentraciones de varios miligramos por litro, superando en algunos casos los $10 \text{ mg N-NH}_4^+.1^{-1}$ y los picos de nitratos en la época de mezcla fueron de $2 \text{ mg N-NO}_3^-.1^{-1}$ en la zona profunda y de $5 \text{ mg N-NO}_3^-.1^{-1}$ en la zona litoral. Las bacterias presentan en los sedimentos, una distribución anual mucho más pareja que en el agua, siendo las cantidades de microorganismos mil veces superiores. Los números máximos de todos los grupos se encontraron en la época de mezcla y fueron: bact. heterotróficas totales y bact. amonificantes, 6×10^7 por ml; bact. reductoras de nitratos, $9,2 \times 10^6$ por ml; bact. denitrificantes, $4,8 \times 10^6$ por ml; bact. nitrificantes, 3×10^6 . No se hallaron diferencias significativas entre las cantidades de bacterias en muestras de zonas litorales y de zonas profundas.

Como resultado de los aislamientos de bacterias heterotróficas realizados se observó que el género *Flavobacterium* nuclea el 35% de las cepas purificadas y le siguen en importancia *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Cytophaga*, *Pseudomonas* y *Xantomonas* con el 10% aproximadamente cada uno. Entre las bacterias reductoras de nitratos y denitrificantes los géneros más importantes fueron *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y enterobacterias.

La demanda bioquímica de oxígeno depende íntimamente de la temperatura habiéndose establecido que las muestras de sedimento tanto de zonas litorales como de zonas profundas consumen 100-150 mg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$ a las temperaturas del invierno y 550-600 mg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$ a las de verano lo que contribuye notablemente al déficit de oxígeno observado en esta época en las zonas profundas.

Las tasas más elevadas de nitrificación se observaron en los sedimentos en la época de mezcla, momento en que el oxígeno tiene acceso al fondo del lago luego del verano. Los valores hallados fueron de 94 mg $N \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$ en muestras de sedimento de la zona litoral, y 32,2 mg $N \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$ en muestras semejantes de la zona profunda a una temperatura de 15°C. Por otra parte se observó que la nitrificación es más intensa en los sedimentos de la zona litoral, relacionado probablemente con las concentraciones de oxígeno disponibles y de materia orgánica en los sedimentos. También se encontraron mayores tasas de nitrificación a temperaturas moderadas que a las temperaturas del verano debido probablemente a una competencia por el oxígeno entre las bacterias nitrificantes y las bacterias heterotróficas. Los nitratos son reducidos en los sedimentos rápidamente, independientemente de la temperatura y tanto en la zona litoral como en la profunda. Mientras en esta última la reducción de nitratos resulta en un marcado incremento en las concentraciones de amonio, no ocurre lo mismo en la zona litoral en la que se supone que los nitratos son reducidos principalmente a nitrógeno molecular.

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

El embalse del Río Tercero presenta un ciclo térmico anual que determina movimientos de las masas de agua que básicamente consisten en un período de circulación entre la superficie y el fondo durante el invierno y un período de estancamiento o estratificación durante el verano. Este fenómeno influye a su vez en forma importante en la distribución del oxígeno disuelto en el agua. La temperatura incrementa la velocidad de los procesos biológicos aumentando en primavera y verano la cantidad de productores primarios y la materia orgánica particulada, Mariazzi et al. (36), pero también las poblaciones bacterianas que se nutren de ésta y que consumen oxígeno (Sección IV.4.4.). Además, al aumentar la temperatura, la capacidad del agua de contener oxígeno en solución disminuye. Ello determina que en verano, sumando la falta de aporte de oxígeno de las zonas productivas al aumento de actividad bacteriana, las zonas profundas del lago presenten un déficit de oxígeno, algunas veces marcado. Los sedimentos de zonas profundas expuestos a carencia de oxígeno durante una parte del año, presentan diferencias con los sedimentos de zonas litorales que se hallan todo el año en contacto con agua bien oxigenada. Los primeros presentan color oscuro y consistencia limosa, mientras que los últimos, color pardo claro y predominancia arenosa. Los fenómenos que en ellos ocurren son también diferentes en algunos casos. Si bien la degradación de la materia orgánica y las transformaciones de los compuestos de nitrógeno se producen también en el agua libre, es en los sedimentos donde estos procesos ocurren con mayor intensidad. Prueba de ello son las concentraciones halladas en los distintos niveles (Sección IV.1.), y, como se explica más adelante, también en este aspecto hay diferencias entre sedimentos profundos y litorales.

Las bacterias heterotróficas están bien representadas en el agua libre. Su distribución en las muestras superficiales guarda cierta semejanza con la variación térmica si bien existen muchos otros factores que pueden regularla, especialmente la cantidad de materia orgánica particulada que también aumenta con la temperatura. La presencia de altos números de bacterias reductoras de nitratos no condice con las concentraciones de esa forma de nitrógeno halladas en aguas libres, pero debe tenerse en cuenta que estos microorganismos son heterotróficos y no deben obligadamente obtener su energía de ese recurso salvo cuando las condiciones ambientales así lo exigen. Las bacterias denitrificantes forman el grupo menos representado entre las heterotróficas y su distribución presenta los recuentos más elevados en la época de mezcla. Ello coincide con el momento de mayor producción de nitratos y otros autores que hallaron resultados similares, Fischer (15), lo asocian con la época en que gran parte de la biomasa planctónica muere dando lugar a la mineralización y a la formación de microambientes anaeróbicos en el seno de partículas orgánicas dispersas en el agua. Las poblaciones de bacterias halladas en muestras de fondo (próximamente a 20 m) fueron en general más voluminosas y su distribución más pareja en las distintas épocas del año. Para explicarlo debe tenerse en cuenta que los cambios térmicos son más moderados en las profundidades, y fundamentalmente que existe un constante aporte de materia orgánica particulada proveniente de las zonas superficiales por sedimentación y de nutrientes en solución provenientes del fondo. Las bacterias nitrificantes son muy escasas en aguas libres seguramente debido a las bajas concentraciones de sustrato presentes. Las concentraciones apenas detectables de nitritos en aguas y aún en sedimentos, se deben a que la oxidación de nitritos a nitratos procede mucho más rápido que la oxidación de amonio a nitritos y las bacterias ni-

tratadoras, si bien se encuentran en concentraciones menores que las nitritadoras, oxidan inmediatamente todos los nitritos producidos, Fenchel (14). Además, en presencia de oxígeno, la concentración de amonio disponible es el factor limitante de la nitrificación.

Los mismos argumentos expresados para explicar el incremento en las poblaciones bacterianas en las muestras de fondo son aplicables a las muestras de la interfase agua-sedimento. En las Figuras 7a y 7b se puede observar la mayor concentración de nutrientes en esa zona. Debe tenerse en cuenta por otra parte, que al ser tomadas este tipo de muestras tan cerca del fondo (1 cm), cualquier alteración del mismo podría producir turbulencias con la consiguiente resuspensión de gran número de partículas y bacterias.

En los sedimentos hubo una distribución anual de las poblaciones bacterianas más uniforme que en aguas libres. Todos los grupos presentan sus números máximos de bacterias aproximadamente en la época de mezcla, formando un pico que sobresale de los recuentos realizados en otras épocas del año (Figs. 13, 14, 15, 16 y 17). Ese pico no es tan importante en los casos de bacterias heterotróficas totales y amonificantes, pero sí lo es para las bacterias reductoras de nitratos y, más todavía, para las bacterias denitrificantes, al menos en los sedimentos de zonas profundas. Las bacterias nitrificantes también presentan sus números máximos en esta época, pero los recuentos del resto del año no son tan constantes como para los otros grupos.

El hecho de hallar poblaciones estables de bacterias heterotróficas a lo largo de todo el año se puede deber a que los sedimentos conforman un ambiente más estable que el agua libre. Además los procesos de putrefacción o mineralización se llevan a cabo tanto en forma aeróbica como anaeróbica, lo que explica que

no haya diferencias notables entre las poblaciones de estos grupos de bacterias en sedimentos de zonas litorales y profundas. Algunas diferencias se notaron entre las poblaciones de bacterias denitrificantes de estas dos zonas. Las bacterias nitrificantes mostraron los recuentos más altos entre el otoño (máximo) y la primavera. Ello se debe a que en la época de mezcla el agua bien oxigenada que se enfría en la superficie, accede al fondo que contiene gran cantidad de amonio acumulado permitiendo la nitrificación. Esta situación se mantiene hasta la primavera en que comienza a faltar el oxígeno nuevamente. Si recordamos que las bacterias nitrificantes son microorganismos aeróbicos obligados es lógico esperar los recuentos más bajos en verano como efectivamente ocurre.

Según Sorokin y Kadota (52) el consumo de oxígeno es un índice directo de la mineralización de materia orgánica. Los resultados de las experiencias de DBO (Fig. 19) muestran que, las muestras de zonas litorales y profundas consumen aproximadamente lo mismo a igual temperatura. Teniendo en cuenta que no existe gran diferencia entre las poblaciones bacterianas heterotróficas de ambas zonas y que la mineralización no depende del tenor de oxígeno, se puede decir que este proceso ocurre de igual forma durante todo el año en uno y otro lugar. La intensidad, como lo demuestra la DBO, dependerá de la temperatura. Ello debería resultar en una acumulación de amonio constante en los sedimentos de todo el lago, pero esto no ocurre así debido al proceso de nitrificación, al menos en parte.

Los resultados de las experiencias realizadas para cuantificar la nitrificación, señalan que este proceso ocurre con mayor intensidad en los sedimentos de las zonas litorales que se encuentran todo el año en contacto con agua de elevado contenido de oxígeno. Además, aunque el incremento de la temperatura estimula

el metabolismo de las bacterias nitrificantes, se observa que las tasas de nitrificación más bajas son las encontradas en las experiencias realizadas con temperaturas propias del verano. Fenchel (14), explica resultados similares diciendo que al incrementarse la temperatura, se incrementa la competencia por el oxígeno por parte de las bacterias heterotróficas, por lo que desciende la cantidad de amonio oxidado. El consumo excesivo en verano puede reducir la penetración del oxígeno en los sedimentos a unos pocos milímetros, Hargrave (22), pero siempre los sedimentos de la zona litoral reciben mayor aporte de este elemento presentando mejores condiciones que los de la zona profunda para que se realice la oxidación del amonio. Así se explica que se encuentren concentraciones más elevadas de esa forma de nitrógeno en las muestras de zonas profundas que en las de zonas litorales. Por otro lado se pudo comprobar con las experiencias de reducción de nitratos que este producto de la nitrificación es rápidamente reducido en ambos tipos de muestras a medida que es producido. La vía de reducción es



si bien existen otros productos intermedios muy poco estables y de difícil detección. Ahora bien, según Jones (30) el principal producto de esa reducción en las zonas litorales sería el nitrógeno molecular mientras que en las zonas profundas, el amonio. Esto constituye un elemento más para explicar las diferencias halladas entre zonas litorales y profundas.

No existe seguridad respecto a que se produzca más amonio en las zonas profundas que en las litorales como producto de la reducción de nitratos. Lo que sí se sabe es que existe mayor acumulación. La explicación dada consiste en suponer que, al ser

la nitrificación más activa en la zona litoral, el amonio producido puede ser reoxidado y vuelto a reducir perdiéndose en estos pasajes una proporción de nitrógeno en forma de nitrógeno molecular, fenómeno que no ocurriría o lo haría en mucho menor escala, en la zona profunda.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1- Aaronson, S. 1970. Experimental microbial ecology. Academic Press - Inc. (London) Ltd. 236 pp.-
- 2- Alexander, H. & Clark, F.E. 1965. Nitrifying bacteria. Methods of soil analysis 2. Chemical and microbiological properties. Black, C.A. Ed.-
- 3- Anderson, J.H. 1965. Studies on the oxidation of ammonia by *Nitrosomonas*. Biochem. J. 95:688-698.-
- 4- Belser, L.W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 33:309-333.-
- 5- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1974. R.E. Buchanan, N.E. Gibbons, ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 8th ed. 1.246 pp.-
- 6- Boström, B. 1981. Factors controlling the seasonal variation of nitrate in lake Erken. Int. Revue ges. Hydrobiol. 66(6):821-836.-
- 7- Brock, T.D. 1970. Biology of microorganisms. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 737 pp.-
- 8- Buswell, A.M.; Shiota, T.; Lawrence, N. & Van Meter, I. 1954. Laboratory studies on the kinetics of the growth of *Nitrosomonas* with relation to the nitrification phase of the B.O.D. test. Appl. Microbiol. 2:21-25.-
- 9- Cavari, B.Z. 1977. Nitrification potential and factors governing the rate of nitrification in Lake Kinneret. Oikos 28:285-290.-
- 10- Christofi, N.; Preston, T. & Stewart, W.D.P. 1981. Endogenous nitrate production in an experimental enclosure during summer stratification. Water Res. 15:343-349.-
- 11- Curtis, E.J.C.; Durrant, K. & Harman, N.N.I. 1975. Nitrification in rivers in the Trent Basin. Water Research, 9: 255-268.

- 12- Di Siervi, M.A. & Mariazzi, A.A. 1982. Uso de perfiles numéricos para la identificación de bacterias Gram negativas de ambientes lacustres. Limnobios, 2(5):330-332.-
- 13- Edberg, N. & Hofsten, B.V. 1973. Oxygen uptake of bottom sediments studied "in situ" and in the laboratory. Water Research 7:1285-1294.-
- 14- Fenchel, T. & Blackburn, T.H. 1979. Bacteria and mineral cycling. Academia Press. 225 pp.
- 15- Fischer, E. 1972. Seasonal changes of the number of nitrogen cycle bacteria in bottom sediments of a pool. Pol. Arch. Hydrobiol. 19(1):37-52.-
- 16- Golterman, H.L. 1971 (Third Printing). Methods for chemical analysis of fresh waters. IBP Handbook N° 8. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 166 pp.
- 17- Graetz, D.A.; Keeney, D.R. & Aspiras, R.B. 1973. Eh status of lake sediment-water systems in relation to nitrogen transformations. Limnol. Oceanogr. 18(6):908-917.-
- 18- Gundersen, K. & Mountain, C.N. 1973. Oxygen utilization and pH change in the ocean resulting from biological nitrate formation. Deep Sea Research 20:1083-1091.
- 19- Hall, G.H. 1982. Apparent and measured rates of nitrification in the hypolimnion of a mesotrophic lake. Appl. Environ. Microbiol. 43(3):542-547.
- 20- Hall, G.H. 1982. Measurement of nitrification rates in lake sediments: comparison of the nitrification inhibitors Nitrapyrin and Allylthiourea. Manuscrito inédito.
- 21- Hall, G.H. & Jeffries, C. 1982. The contribution of nitrification in the water column and profundal sediments to the total oxygen deficit of the hypolimnion of a mesotrophic lake (Grasmere, English Lake District). Manuscrito inédito.
- 22- Hargrave, B.T. 1972. Oxidation-reduction potentials, oxygen concentration and oxygen uptake of profundal sediments in an eutrophic lake. OIKOS 23:167-177.

- 23- Hayes, F.R. & MacAulay, M.A. 1959. Lake water and sediment. V. Oxygen consumed in water over sediment cores. Limnol. Oceanogr. 4(3):291-298.-
- 24- Henriksen, K. 1980. Measurements of in situ rates of nitrification in sediments. Microb. Ecol. 6:329-337.-
- 25- Henriksen, K. . A method for measuring nitrification rates in undisturbed sediment cores by use of N-SERVE, a specific inhibitor of the nitrification process.-
- 26- Henriksen, K.; Hansen, J.I. & Blackburn, T.H. 1981. Rates of nitrification, distribution of nitrifying bacteria, and nitrate fluxes in different types of sediments from danish waters. Marine Biology 61:299-304.-
- 27- Horsley, R.W. 1979. The heterotrophic, nitrate-reducing bacterial flora of Grasmere, English Lake District. J. Appl. Bacteriol. 46:507-520.-
- 28- Jones, J.G. 1979. Microbial nitrate reduction in freshwater sediments. J. Gen. Microb. 115:27-35.-
- 29- Jones, J.G. 1979. A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in freshwater. Freshwater Biological Association. Scientific Publication N° 39. 112 pp.-
- 30- Jones, J.G. & Simon, B.M. 1981. Differences in microbial decomposition processes in profundal and littoral lake sediments, with particular reference to the nitrogen cycle. J. Gen. Microbiol. 123:297-312.-
- 31- Keeney, D.R. 1972. The fate of nitrogen in aquatic ecosystems. The University of Wisconsin, Eutrophication Information Program. Literature Review N° 3.-
- 32- Keeney, D.R.; Chen, R.L. & Graetz, D.A. 1971. Importance of denitrification and nitrate reduction in sediments to nitrogen budgets of lakes. Nature 233:66-67.-
- 33- Klapwijk, A. & Snodgrass, W.J. 1982. Experimental measurement of sediment nitrification and denitrification in Hamilton Harbour, Canada. Hydrobiologia, 91:207-216.

- 34- Kuznetsov, S.I. 1970. The microflora of lakes and its geochemical activity. Carl H. Oppenheimer Ed. 503 pp.-
- 35- Lees, H. 1952. The biochemistry of the nitrifying organisms. *Biochem. J.* 52:134-139.-
- 36- Mariazzi, A.A.; Conzonno, V.H. & Romero, M.C. 1981. Distribución temporo-espacial de bacterias heterotróficas, clorofila, seston y parámetros químicos (embalse del Río III-Córdoba). *Limnobiós*, 2(3):193-205.-
- 37- Mariazzi, A.A.; Romero, M.C. & Conzonno, V.H. 1981. Producción primaria, bacterias, nutrientes y otros factores ecológicos en el embalse del Río Tercero (Córdoba). *Limnobiós*, 2(3):153-177.-
- 38- Matulewich, V.A.; Strom, P.F. & Finstein, M.S. 1975. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Appl. Microb.* 29(2): 265-268.-
- 39- Methods for chemical analysis of water and wastes. Environmental Research Center. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. 1976.-
- 40- Methods for microbial analysis of waters, wastewaters, and sediments. Canada Centre for inland waters, Burlington, Ontario.-
- 41- Nakajima, T. 1982. Distribution of denitrifying bacteria and its controlling factors in freshwater environments. *Jap. J. Limnol.* 43(1):17-26.-
- 42- Niewolak, S. 1970. Seasonal changes on nitrogen-fixing and denitrifying bacteria in the bottom deposits of the Iwala lakes. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 17(30):509-523.-
- 43- Parker, R. 1976. Estadística para biólogos. Cuadernos de Biología. OMEGA, S.A. Ed. Barcelona. 136 pp.-
- 44- Parkinson, D.; Gray, T.R.G. & Williams, S.T. 1971. Methods for studying the ecology of soil micro-organisms. IBP Handbook N° 19. Blackwell Scientific Publication, Oxford. 116 pp.-

- 45- Patriquin, D.G. & Knowles, R. 1974. Denitrifying bacteria in some shallow-water marine sediments: enumeration and gas production. Can. J. Microbiol. 20:1037-1041.-
- 46- Payne, W.J. 1981. Denitrification. Wiley-Interscience, New York. Ed.-
- 47- Reddy, K.R. & Patrick, W.H. Jr. 1976. Effect of frequent changes in aerobic anaerobic conditions on redox potential and nitrogen loss in a flooded soil. Soil Biol. Biochem. 8:491-495.-
- 48- Rheinheimer, G. 1974. Aquatic microbiology. John Wiley & Sons Ed. 180 pp.-
- 49- Rodina, A.G. 1972. Methods in aquatic microbiology. R.R. Colwell Ed. 461 pp.-
- 50- Rowe, R.; Todd, R. & Waide, J. 1977. Microtechnique for most-probable number analysis. Appl. and Envir. Microbiol. 33(3):675-680.-
- 51- Sinha, S.E. 1968. Study of nitrification in cultures of nitrifying bacteria. Journal of the Indian Society of Soil Science 16:337-340.-
- 52- Sorokin, Y.I. & Kadota, H. 1972. Techniques for the assesment of microbial production and decomposition in freshwaters. IBP Handbook N° 23. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 111 pp.-
- 53- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. A.P.H.A. - A.W.W.A. - W.P.C.F. Amer. Publ. Health Ass. Inc., New York. 1975.-
- 54- Stanier, R.Y.; Doudoroff, H. & Adelberg, E.A. 1971. General Microbiology, Thirth Edition. MacMillian Ed. London.-
- 55- Stanier, R.Y.; Palleroni, R.J. & Doudoroff, H. 1966. The aerobic pseudomonas: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43:159-271.-
- 56- Stewart, W.D.P.; Preston, T.; Peterson, H.G. & Christofi, N. 1982. Nitrogen cycling in eutrophic freshwaters. Phil. Trans. R. Soc. London B 296:491-509.-

- 57- Tirén, T. 1976. Denitrification in sediment-water system of various types of lakes. SIL-UNESCO Symposium "Interactions between sediments and freshwater". Amsterdam, September 6-10, 1976.-
- 58- Tirén, T.; Thorin, J. & Nommik, H. 1976. Denitrification measurements in lakes. Acta Agr. Scand. 26:175-184.-
- 59- Van Kessel, J.F. 1977. Factors affecting the denitrification rate in two water-sediment systems. Water Res. 4:259-267.
- 60- Wetzel, R.G. 1975. Limnology. W.B. SAUNDERS COMPANY. 743 pp.-

Artículo 11° del Reglamento de Tesis:

"La Facultad no se hace solidaria de las opiniones vertidas en una Tesis".