

ISSN 0327-7755

Aquatec

VOLUMEN N° 7

AÑO 2002

BACTERIAS

por Miguel Di Siervi



Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet"
UNLP-CONICET

Diseño y Composición Gráfica
Claudio della Croce

Impreso electrónicamente por el ILPLA
en el mes de marzo de 2003

Nº de contribución 007

INDICE

BACTERIAS

Determinaciones microscópicas: Epifluorescencia 1-11

MIGUEL DI SIERVI

Estimación de la producción secundaria bacteriana
utilizando microscopía de epifluorescencia: Frecuencia
de bacterias en división (FDC) 11-17

MIGUEL DI SIERVI

Nociones elementales sobre radioisótopos: su empleo en la
determinación de la producción bacteriana 19-42

MIGUEL DI SIERVI

Bibliografía del Dr. ALDO A. MARIAZZI 43-48

POR MIGUEL DI SIERVI

INTRODUCCIÓN

Aunque la primer bacteria fue descubierta en el agua en 1676, posteriormente la bacteriología se desarrolló gracias a las necesidades de la medicina y del conocimiento de que muchas enfermedades eran distribuidas por el agua. Esto dio base a investigaciones generales de las aguas continentales, descubriéndose que las aguas servidas, provenientes de ciudades y hospitales, eran fuente de grandes cantidades de bacterias, siendo la primer etapa a alcanzar; el control de la polución bacteriana del agua. Se iniciaron así investigaciones sobre sistemática, fisiología y ecología de las distintas especies. También recibió un gran impulso la bacteriología del agua a partir de la bacteriología del suelo y veterinaria, debido al interés que suscitara el estudio de enfermedades de las plantas y los animales.

Alguno métodos de la medicina y la agricultura comenzaron a aplicarse al medio acuático, aunque algunos problemas fueron difíciles de encarar, como por ejemplo los inherentes a los ciclos del azufre, del fósforo, carbono, etc. De esta manera la bacteriología del agua debió desarrollarse en forma autónoma, con sus propios problemas y métodos de investigación.

El agua, como medio, tiene características que le son propias, a la vez que muy variables, (temperatura, pH, concentración química, etc.). Por otra parte, el principal problema de la bacteriología del agua no concierne a las bacterias patógenas sino a las heterotróficas nativas. Son ellas las que descomponen la materia orgánica, (proteínas, lípidos, carbohidratos) y dan destino a los productos de tales descomposiciones.

Es bien conocido el rol que juegan las algas en los ambientes acuáticos como productores primarios. También los distintos consumidores han sido objeto de múltiples trabajos de investigación en los cuales se ha llegado a conocer el papel de cada grupo en particular. En este esquema las bacterias fueron en un principio dejadas de lado en la creencia de que su función era absolutamente secundaria. Pero ahora sabemos de la importancia de las bacterias heterotróficas en el ciclo de los nutrientes en el agua, siendo reconocidas como eslabones básicos de la cadena alimentaria. Tal comportamiento fue confirmado en forma evidente a fines de la década del sesenta y principios del setenta usando técnicas de trazadores radiactivos en base a ^{14}C . Las mismas hacen posible el estudio, bajo condiciones "in situ", del consumo de sustratos orgánicos por las comunidades naturales. Pudo demostrarse que los organismos más pequeños asimilaban la mayor cantidad de sustancia orgánica disuelta, cuando esta era agregada a muestras de agua en concentraciones de unos pocos miligramos por litro.

La materia orgánica particulada solamente es utilizada por las bacterias si previamente es hidrolizada a pequeñas moléculas, lo que las obligaría a permanecer cerca de las algas o bien adheridas a las mismas tratando de utilizar sus exudados o la materia producida por su lisis.

Este conocimiento fue mejorado gracias al desarrollo de métodos para determinar también el número de bacterias y su biomasa. Aunque las técnicas microscópicas se usaron por largo tiempo para contar bacterias, el problema de siempre fue reconocer las pequeñas células bacterianas en presencia de detrito y partículas inorgánicas de dimensiones similares, lo que implicaba una inseguridad en la metodología. Sin embargo, una vez que

fue posible colorearlas con colorantes fluorescentes y usar el instrumental óptico adecuado, se pudo desarrollar una técnica específica de conteo de bacterias por medio de la microscopía de fluorescencia por luz reflejada. Esta técnica también nos permite hacer una real estimación del biovolumen y por lo tanto, determinar la biomasa de las poblaciones bacterianas en presencia de otros organismos. De aquí surge la necesidad de conocer la forma en que se establece la relación entre bacterias y otros componentes del ecosistema acuático.

Los nutrientes inorgánicos disueltos (NID), la materia orgánica disuelta (MOD) y la materia orgánica particulada (MOP), pueden sufrir modificaciones, como resultado de la acción bacteriana. El fitoplancton puede proveer a las bacterias, en forma directa de materia orgánica a través de la excreción o de la desintegración de células muertas. Por otro lado, las bacterias, en su conocido papel de mineralizadores, proveen al fitoplancton con nutrientes que pueden ser suministrados en cantidades limitativas. En tales casos, el crecimiento fitoplanctónico puede ser directamente dependiente de la actividad bacteriana.

También son importantes las relaciones entre bacterias y zooplancton. Se sabe que es considerable la pérdida de carbono disuelto derivado de la predación del zooplancton. Este es utilizado por las bacterias, que también colonizan rápidamente la materia fecal excretada. Por otro lado, pueden servir como recurso alimentario único o adicional, de muchos protozoos y aún metazoos.

La MOD, a veces en muy bajas concentraciones en el agua se perdería al no poder ser consumida por la mayoría de los habitantes de los ecosistemas, pero las bacterias están capacitadas para utilizarlas y volverlas a la cadena trófica como MOP (las propias bacterias).

El desarrollo de la Bacteriología en nuestro Instituto de Limnología se inicia con los esfuerzos del Dr. Aldo Mariuzzi, quien intentó aunar criterios en el manejo de la información referida al bacterioplancton dulceacuícola.

Hoy varios discípulos continúan su tarea desarrollando técnicas que como la epifluorescencia y el uso de radioisótopos ofrecen nuevos recursos para el futuro de esta línea limnológica.

Es así como los trabajos aquí presentados hacen referencia a estos últimos tópicos teniendo en cuenta que el estudio del número, tamaño y la actividad de los distintos organismos que componen el plancton, son conocimientos esenciales en cualquier investigación ecológica que pretenda establecer como funcionan estas comunidades tan importantes para la vida de los sistemas acuáticos.

La presente contribución intenta resumir la experiencia de varios años en la utilización de los métodos más comunes y necesarios para evaluar la producción heterotrófica del bacterioplancton. Es mi intención que esta experiencia provea una herramienta más, para superar algunos de los inconvenientes que puedan presentarse en el empleo de estas técnicas y brinde ayuda a quienes se animen a tratar de desentrañar los crípticos caminos de la energía en el llamado "microbial loop".

Miguel Di Siervi

BACTERIAS

DETERMINACIONES MICROSCOPICAS: EPIFLUORESCENCIA

MIGUEL ANGEL DI SIERVI

Bacterias: Determinaciones Microscópicas

El microscopio óptico fue, desde siempre, la herramienta indispensable del microbiólogo, pero tiene la desventaja, además de un cierto grado de subjetividad, que muchas bacterias, aún siendo teñidas o vistas bajo contraste de fase, son irreconocibles al estar mezcladas con detritos de medidas similares. Esto en parte fue subsanado con el desarrollo de técnicas de tinción con colorantes fluorescentes, por ejemplo naranja de acridina, que facilita el conteo de bacterias de aguas naturales aún en presencia de detritos. Este procedimiento fue desarrollado por Francisco *et al.*, (1973) y mejorado luego por Zimmermann y Meyer-Reil (1974) y Hobbie *et al.*, (1977).

Para reducir los errores de subjetividad, es requerimiento básico contar sólo aquellas partículas de forma y tamaño de bacterias y que fluorescen en verde o rojo brillante (Meyer-Reil, 1977).

Epifluorescencia

Una muestra de agua en la que se desea conocer el número de bacterias, se pone en contacto con un fluorocromo (Ej. Naranja de acridina) y luego es filtrada a través de un filtro de membrana negro. Este filtro es luego montado entre porta y cubre objetos y observado en un microscopio especialmente equipado (lámpara, filtros, espejos) para realizar observaciones con epifluorescencia. La siguiente es una muy rápida explicación de su funcionamiento: la luz proveniente de una lámpara especial, se refleja en un espejo dicróico hacia abajo a través del objetivo y se proyecta sobre la membrana, donde excita al colorante que tiñe a las bacterias. Estas fluorescen con una luz, de menor energía (mayor longitud de onda) que la utilizada para la excitación, que pasa a través del objetivo y el espejo hacia el ocular (Fig. 1).

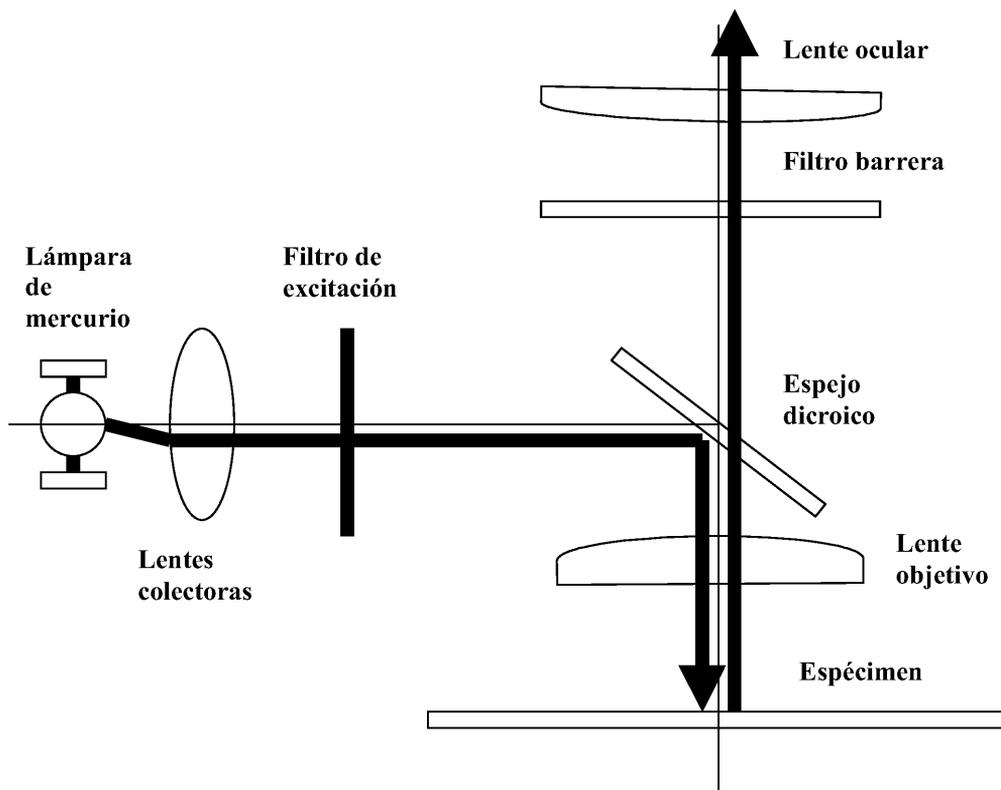


Figura 1: Esquema del camino que sigue la luz (camino óptico) de un microscopio de fluorescencia convencional, donde se puede apreciar la ubicación de los filtros de barrera y excitación.

Filtros

Como primera regla general respecto de los filtros usados para filtrar la muestra, es esencial que no sean autofluorescentes. Si son filtros coloreados en laboratorio se deben controlar, pues hay colorantes negros con considerable fluorescencia. Se debe cuidar que los filtros se humedezcan uniformemente, pues algunas partes pueden ser hidrofóbicas, especialmente si fue tocado por las manos desnudas. Los hay de distintos tipos:

Membranas Celulósicas

Pueden ser de acetato, nitrato y otros ésteres de celulosa. De 100 y 200 μm de espesor. Su matriz es porosa-esponjosa.

Membranas de Policarbonato - Nuclepore

Más finas que las anteriores (10 μm de espesor). Son capas de policarbonato bombardeadas por núcleos de alta energía, dejando poros de tamaño conocido. Su uso es preferible

al de aquellos derivados de celulosa, ya que en estos últimos, las bacterias más pequeñas pueden penetrar en la estructura del filtro y escapar a la posibilidad de ser contados.

Los filtro de policarbonato proveen una superficie plana homogénea y lisa que deja todas las células en su superficie y al mismo nivel, ideal para scanning y conteo microscópico directo.

Importante: cualquiera sea la membrana elegida, uniformar el uso. Debe ser siempre del mismo tipo, de acuerdo al objetivo particular de cada experiencia, pues los resultados pueden ser diferentes.

Colorantes

Coloración de membranas

Se disuelven en 100 ml de agua recién destilada y recientemente hervida, 0,25 gr. de Dylon nro. 8, Ebony Black o Sudan Black y 0,25 gr. de ClNa. Esta solución es filtrada, aún caliente (a 90° C) por Whatman GF/F y luego por filtro de membrana de 0,45 µm de poro. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se agrega ácido acético filtrado por filtro de membrana de 0,22 µm, hasta una concentración final de 2 % (Hobbie *et al.*, 1977). Los filtros coloreados se pueden dejar en el colorante y al momento de usar se enjuagan en agua destilada filtrada por 0,2 µm y se usan aún húmedos.

Procedimiento

La distribución de las bacterias debe ser al azar, por eso lo ideal es filtrar 2 ó 3 cm³ de líquido por cm² de superficie de filtro. El menisco del líquido, de ser poco el volumen, puede dar error por más agua filtrada en la periferia.

Coloración de las bacterias

Naranja de acridina

Se prepara en una concentración de 1gr.l⁻¹ en solución acuosa. Se agrega de manera que la concentración final en el líquido a filtrar sea de 0,01 %. Se deja 5 minutos en contacto y luego se procede a filtrar. (Una gota de la concentración preparada por mililitro de material a filtrar da buena coloración).

Producida la filtración, el filtro se ubica en vaselina líquida entre porta y cubreobjetos (Di Siervi *et al.*, 1995)

Obtención del número de microorganismos por ml (De acuerdo a Jones, 1979):

donde

$$N = \frac{Y A D}{a v}$$

N = el número de organismos por ml. será igual a:

Y = Promedio de conteos por campo.

Se debe diluir la muestra hasta que el número de bacterias sea de 20 a 30 por campo. Se deben contar hasta que la sumatoria esté entre 300 y 400 bacterias contadas y luego realizar el promedio al que se le debe restar el promedio del blanco. Este blanco se debe realizar con todos los elementos y volúmenes con los que luego se trabajará, excepto obviamente la muestra, la que se sustituirá por agua de dilución.

A = Área efectiva de filtración.

Por ejemplo si el aparato de filtración tiene un área efectiva de filtrado de 1 cm:

$A = 1 \text{ cm de diámetro, } r: 5000 \mu\text{m}$

$$A = \pi \cdot r^2 = 7,854 \cdot 10^7 \mu\text{m}^2$$

D = Factor de dilución. (1 ml)

a = Área del campo del microscopio.

Se mide, para cada combinación ocular objetivo, el diámetro del campo del microscopio directamente con el portaobjetos graduado.

Por ejemplo para la combinación ocular 12,5 X y objetivo 100 X, el diámetro del campo resultó:

$a = 170 \mu\text{m de diámetro, } r: 85 \mu\text{m}$

$$a = \pi \cdot r^2 = 2,2698 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$$

v = volumen de muestra filtrado.

Medición de Bacterias

Determinar la distancia entre dos líneas del micrómetro ocular

Se debe fijar para cada microscopio en particular, pues varía con las distintas combinaciones ocular-objetivo.

Elementos necesarios

Ocular micrométrico y portaobjetos micrométrico que consta de una grilla de 1 mm con 100 divisiones, (1 división = 10 μm).

Se colocan paralelas las escalas del porta y el ocular, haciendo coincidir las líneas de ceros. Luego se cuentan las divisiones que hay en cada una de las escalas hasta otra pareja de líneas coincidentes (puede ser una segunda o una tercera coincidencia, cuanto más mejor).

De allí que 1 división del ocular: $10 \times p/n$

p = número de divisiones del portaobjetos que coincide con

n = número de divisiones del ocular.

El resultado es el llamado *coeficiente micrométrico* y es propio de cada microscopio y de cada combinación ocular-objetivo.

Para obtener la medida de un objeto microscópico, se multiplica: $C \cdot N$

donde C es el *coeficiente micrométrico* y N el número de líneas que ocupa el objeto en el micrómetro ocular. El resultado final es en μm (Emiliani, 1983).

Biomasa

Los conteos directos indican la cantidad de microorganismos en un volumen específico de agua. En muchos casos, especialmente en aquellos que involucran la productividad, la biomasa de las bacterias debe ser determinada como uno de los componentes de la materia viva soportada por la masa de agua.

La biomasa bacteriana puede ser calculada a partir de los datos obtenidos de los conteos directos y la medida de las células es necesaria para determinar el volumen de cada grupo morfológico.

Para obtener el volumen de cada tipo de bacteria, estas pueden ser asimiladas a esferas (cocos) y cilindros (bacilos), utilizando así la fórmula del volumen de estas figuras geométricas. Si se opta por este criterio, se debe recoger el mayor número de mediciones posibles y agruparlas en varios rangos, teniendo en cuenta el número de casos, para obtener luego el volumen medio. El siguiente ejemplo es aclaratorio del procedimiento:

Cocos

Diámetro (μm)	media del rango	casos (n)	D^3	$D^3 \cdot n$
0,1 - 0,5	0,3	6	0,027	0,162
0,5 - 1,1	0,8	34	0,512	17,408
1,1 - 1,5	1,3	29	2,197	63,713
1,5 - 1,9	1,7	16	4,913	78,608
1,9 - 2,5	2,2	9	10,648	95,832
2,5 - 3,1	2,8	6	21,952	131,712
		100		387,435

El diámetro medio de los cocos usados para el volumen medio se expresa como:

$$\bar{D} = \frac{\sqrt[3]{387,435}}{\sqrt[3]{100}} = \sqrt[3]{3,87435} = 1,5706$$

o lo que es lo mismo
$$\bar{D}^3 = \frac{\sum D^3 \cdot n}{\sum n} = \frac{387.435}{100} = 3.87435$$

Para este ejemplo entonces, el volumen medio de los cocos de acuerdo al volumen de la esfera sería:

$$\bar{V} = \frac{1}{6} \pi \cdot D^3$$

$$\bar{V} = \frac{1}{6} \cdot 3.1416 \cdot 3.87435 \text{ (ó } 1.57006^3) = 2.0276 \mu\text{m}^3$$

No se usa la media aritmética, pues se obtendría un volumen menor. Con los mismos valores del ejemplo anterior sería:

Diámetro (μm)	media del rango (a)	casos (n)	a x n
0,1 - 0,5	0,3	6	1,8
0,5 - 1,1	0,8	34	27,2
1,1 - 1,5	1,3	29	37,7
1,5 - 1,9	1,7	16	27,2
1,9 - 2,5	2,2	9	19,8
2,5 - 3,1	2,8	6	16,8
		100	130,5

$$\bar{D} = \frac{\sum a \cdot n}{\sum n} = \frac{130.5}{100} = 1.305$$

$$\bar{V} = \frac{1}{6} \pi D^3$$

$$\bar{V} = \frac{1}{6} \cdot 3.1416 \cdot 1.305^3 = 1.165 \mu\text{m}^3$$

El volumen obtenido de esta manera presentaría un valor disminuído en más de una tercera parte. (Rodina, 1972).

Bacilos

Para calcular el volumen de los bacilos se utilizará la formula del cilindro:

$$A \cdot h$$

donde

A = área de la circunferencia = $1/4 \pi \cdot D^2$ (ancho del bacilo) y

h = altura (largo del bacilo)

por lo tanto,
$$\bar{V} = \frac{1}{4} \pi \cdot D^2 \cdot h$$

Ancho medio

Dividiendo la fórmula enunciada en dos partes, en primer lugar se obtiene el ancho medio, cuyo cálculo se realizará, al igual que para los cocos, de la forma que se ejemplifica seguidamente:

ancho (μm)	media del interv.	casos (n)	D^2	$D^2 \cdot n$
0,2-0,6	0,4	24	0,16	3,84
0,6-1,0	0,8	46	0,64	29,44
1,0-1,4	1,2	15	1,44	21,60
1,4-1,8	1,6	11	2,56	28,16
1,8-2,2	2,0	4	4,00	16,00
		100		99,04

$$\bar{D} = \frac{\sqrt{99.04}}{100} = \sqrt{0.9904} = 0,995$$

o lo que es lo mismo

$$\bar{D}^2 = \frac{\sum D^2 \cdot n}{\sum n} = \frac{99.04}{100} = 0.99$$

$$\bar{D} = 0.995 = \sqrt{0.99}$$

El valor a usar por lo tanto será:

$$\bar{D}^2 = 0.995^2 \text{ ó } 0.99$$

Si el ancho medio fuese calculado a partir de la media aritmética, el valor obtenido sería menor. Ej.:

ancho (μm)	media del interv.(D)	casos (n)	D.n
0,2-0,6	0,4	24	9,60
0,6-1,0	0,8	46	36,80
1,0-1,4	1,2	15	18,00
1,4-1,8	1,6	11	17,6
1,8-2,2	2,0	4	8,00
		100	90,00

$$\bar{D} = \frac{\sum D \cdot n}{\sum n} = \frac{90,00}{100} = 0,90$$

$\bar{D}^2 = 0,81$ (valor menor al obtenido anteriormente)

Largo medio

En este caso sí se emplea la media aritmética

largo (μm)	media del interv.(h)	casos (n)	h.n
0,2-0,6	0,4	3	1,20
0,6-1,0	0,8	7	5,60
1,0-1,4	1,2	16	19,20
1,4-1,8	1,6	46	73,60
1,8-2,2	2,0	28	56,00
		100	155,60

$$\bar{h} = \frac{\sum h \cdot n}{\sum n} = \frac{155,60}{100} = 1,556$$

Siguiendo con este ejemplo, el volumen medio de los bacilos sería:

$$\bar{V} = \frac{1}{4} \pi \cdot D^2 \cdot h$$

$$\bar{V} = \frac{1}{4} \cdot 3,14 \cdot 0,99 \cdot 1,556 = 1,21 \mu\text{m}^3$$

De utilizarse el ancho obtenido por la media aritmética el resultado final sería:

$$\bar{V} = \frac{1}{4} \cdot 3,14 \cdot 0,81 \cdot 1,556 = 0,99 \mu\text{m}^3$$

Una vez que las dimensiones medias de cada grupo de bacterias ya fue determinado, la biomasa de bacterias puede ser determinada por medio de los datos del conteo directo. El conteo directo da por ejemplo 200.000 cocos y 400.000 bacilos en 1 ml de agua. La biomasa de las bacterias se determinará en forma separada para cada grupo.

Cálculo de la biomasa de los cocos

El volumen medio de los cocos, en una masa de agua dada es, de acuerdo al ejemplo precedente, $2,03 \mu\text{m}^3$. Por lo tanto en un mililitro de agua se tendrán:

$$2.03 \cdot 200.000 = 406.000 \mu\text{m}^3 \text{ de cocos}$$

Cálculo de la biomasa de los bacilos

El volumen medio de los bacilos, en esta misma masa de agua y de acuerdo al mismo ejemplo es de $1,21 \mu\text{m}^3$. Por lo tanto en un mililitro de agua se tendrán:

$$1.21 \cdot 400.000 = 484.000 \mu\text{m}^3 \text{ de bacilos}$$

Carbono celular promedio

Con el fin de expresar la biomasa bacteriana en gramos de carbono por mililitro, es necesario transformar el volumen obtenido en los conteos microscópicos en carbono celular. Hay varios valores en la bibliografía, que hacen referencia al contenido de carbono de las bacterias, siendo uno de los más usados el factor de Watson (Watson *et al.*, 1977), que indica que $1 \mu\text{m}^3$ de bacterias contiene $1,21 \cdot 10^{-13}$ g de carbono. De acuerdo a esto, y también al ejemplo anterior, por regla de tres simple:

Si el volumen promedio de un coco es $2,03 \mu\text{m}^3$, contendrá $2,46 \cdot 10^{-13}$ g de carbono o los $4,06 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ de los cocos determinados para 1 ml de muestra, contendrán $4,9126 \cdot 10^{-8}$ g de C. Un bacilo de $1,21 \mu\text{m}^3$ promedio contendrá $1,46 \cdot 10^{-13}$ g de C y los 484000 bacilos de 1 ml contendrán $5,8564 \cdot 10^{-8}$ g de C. En un ml de agua entonces tendremos $1,0769 \cdot 10^{-7}$ g de C aportado por las bacterias.

Bibliografía

- DI SIERVI, M. A., MARIAZZI, A. A. Y DONADELLI, J. L. 19950. Bacterioplankton and phytoplankton production in a large patagonian reservoir (República Argentina). *Hydrobiologia* 297 (2), 125-131.
- EMILIANI, F. 1983. Medición de microorganismos. En «Microbiología: guía de trabajos prácticos». *Bol Asoc. Cienc. Nat. Litoral*. Vol 3 (2): 21-25.
- FRANCISCO, D. E., MAH, R. A. Y RABIN, A. C. 1973. Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 92: 416-421.
- HOBBIE, J. E., DALEY, R. J. Y JASPER, S., 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (5): 1225-1228.
- JONES, J. G. 1979. A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in fresh water.

- Freshwater Biological Association*. 39: 112 pgs. Windermere. U.K.
- MEYER REIL, L. A. 1977. Bacterial growth rates and biomass production in «*Microbial Ecology of Brackish water Environment*». G. Rheinheimer (Ed.). Springer Verlag. Berlin. pp: 223-235.
- RODINA, A. G. 1972. *Methods in Aquatic Microbiology*. University Park Press. 461 pgs.
- WATSON, S. W., NOVITSKY, T. J., QUINBY, H. L. & VALOIS, F. W. 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 940-947.
- ZIMMERMANN, R. Y MEYER REIL, L. A., 1974. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kiel Meeresforsch.* 30: 24-27.

BACTERIAS

ESTIMACION DE LA PRODUCCION SECUNDARIA BACTERIANA UTILIZANDO MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA: FRECUENCIA DE BACTERIAS EN DIVISION (FDC)

MIGUEL ANGEL DI SIERVI

Frecuencia de bacterias en división (FDC)

En conteo directo de bacterias teñidas con naranja de acridina ha sido aplicado con éxito en una gran variedad de ecosistemas. Sin embargo, es necesario el conocimiento de las tasa de producción bacteriana para cuantificar en ellos el flujo de material y energía a través de las bacterias. Una gran variedad de técnicas han sido usadas para estimar o medir la producción bacteriana, incluyendo métodos de cultivo, radioisotópicos y métodos basados en cambios en los conteos directos o valores de trifosfato de adenosina. Un método simple (sin incubación) y a partir de los conteos directos con naranja de acridina para estimar la producción bacteriana, propuesto por Hagström *et al.* (1979) y apoyado por Newell y Christian (1981), ha sido utilizado con éxito. Estos autores hicieron uso de la relación entre la frecuencia de aparición de células en división (**FDC**) y la tasa de crecimiento. Evidencias teóricas indican que la proporción de células en división en cualquier momento en una población bacteriana, depende de la tasa de crecimiento. Hagström *et al.* (1979), encontraron una relación lineal entre **FDC** y tasa de crecimiento y usaron esta relación para calcular las tasas de crecimiento a partir de mediciones de **FDC**.

Aunque este método ha tenido algunas críticas, su implementación, asociada a los conteos directos, puede llevar a conocer y evaluar en forma rápida, la producción bacteriana de un ambiente determinado.

Procedimiento

Preparación del material

Todo el material de vidrio que se usará con muestras fijadas, debe ser cuidadosamente lavado con alguna solución ácida (la solución sulfocrómica es aconsejable) y enjuagado con agua libre de bacterias (prefiltrada por filtros de 0,2 μm de poro) con formol al 2 % de concentración final. Todo el material de vidrio y el equipo de filtración que se utilizará para coleccionar, procesar e incubar las muestras de bacterias vivas, incluyendo las pipetas para los muestreos periódicos, debe ser lavado en la forma citada y enjuagado con agua libre de bacterias (filtrada) pero sin formol y posteriormente esterilizado por autoclave.

Toma de muestras

El agua a ser analizada, una vez obtenida en frascos estériles, es filtrada por filtros de 3 μm de poro, con el fin de eliminar predadores y algas. Si se desea diluir la población bacteriana, una porción de muestra puede ser filtrada por 0,2 μm para eliminar las bacterias y reincorporada al experimento.

Se preparan submuestras de igual volumen a las que, para acelerar el crecimiento bacteriano, se agregan sustratos nutritivos en distintas concentraciones. Se ponen a incubar (preferiblemente en un agitador a ± 100 rpm) en oscuridad y respetando la temperatura del ambiente al momento de la recolección. Muestras para conteo directo (fijadas con formol 2 %, concentración final) se toman a tiempo cero de cada una de las experiencias y a distintos intervalos de tiempo, hasta que la turbiedad del agua pueda indicar que se ha alcanzado una fase de crecimiento estacionario.

Conteos y cálculos

Los conteos directos se realizarán por el procedimiento de coloración para epifluorescencia con naranja de acridina (Hobbie *et al.*, 1977). Para el cálculo del número total de células, se diluirá la muestra hasta que contenga entre 30 y 40 bacterias por campo, contándose un total de entre 300 y 400 bacterias. Para **FDC**, las células serán consideradas en división cuando se vea una invaginación en su pared celular, pero no un espacio de separación claro entre las células hijas (Foto). Se contarán un total de entre 30 y 40 células en división por preparado.

Para calcular de **FDC** de cada alícuota, se realizará la siguiente operación: **(1)**

$$\frac{\text{media del número de células en división por campo}}{\text{media del número de células totales por campo}} \times 100$$

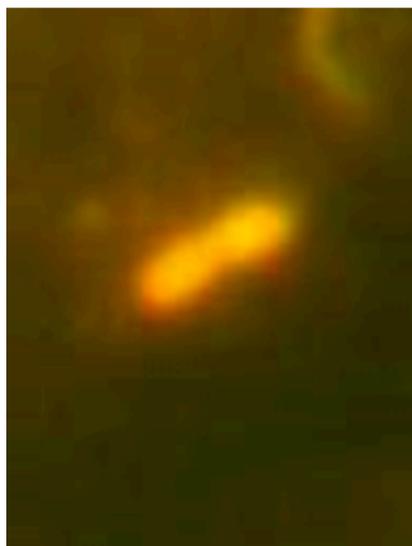


Imagen de bacteria en división, coloreada con naranja de acridina. Aumentada 1250 veces.

La tasa instantánea de crecimiento (μ) se calcula a partir de las diferencias entre las densidades medias de bacterias por mililitro en las distintas alícuotas de cada submuestra de acuerdo a la siguiente fórmula (Newell & Christian, 1981): **(2)**

$$\mu = [0,69 (\log N_{t_2} - \log N_{t_1})] / 0,301 t_{2-1}$$

donde N_{t_2} es la densidad celular media a tiempo 2, N_{t_1} es la densidad celular media a tiempo 1 y t_{2-1} es el intervalo en horas entre tiempo 1 y tiempo 2.

Entre los valores de **FDC** a tiempo 1 y μ o $\ln \mu$ para t_{2-1} se realiza un análisis de regresión para cada submuestra, con las siguientes salvedades: solamente se utilizarán los valores que se estime que se encuentran dentro del período de crecimiento exponencial de la población para cada tratamiento y en estos cálculos no se usa el tiempo cero.

De las rectas obtenidas utilizando los valores μ o $\ln \mu$, se preferirá aquella que obtenga un mayor coeficiente de correlación (r^2). También puede considerarse una sola recta de regresión que agrupe los valores de **FDC** y $\ln \mu$ o μ de todas las submuestras incubadas con sustratos, si es que cumplen las consideraciones enunciadas anteriormente

El volumen celular se calculará aplicando las fórmulas matemáticas de la esfera para los cocos y del cilindro para los bacilos (Rodina, 1972)(Ver detalles en Determinaciones microscópicas. Epifluorescencia; Di Siervi, 2002).

Algunos conceptos que se deben conocer antes de calcular la producción secundaria bacteriana a partir de la **FDC** son:

Tasa de crecimiento exponencial: K

Tasa de crecimiento instantáneo: μ

Concepto general

Como el crecimiento en bacterias es logarítmico, este se va dando continuamente, en cada momento el crecimiento bacteriano está ocurriendo, es por eso que K representa el crecimiento por hora, pero si se necesita el crecimiento instantáneo, la forma de conocerlo es acortando la diferencia entre $t_t - t_0$ y $N_t - N_0$, por eso queda un espacio infinitesimal, que es el que se calcula usando diferenciales (dN, dt), lo que se expresa por μ en vez de K . Los valores de μ se expresan como h^{-1} .

Explicación teórica. Tiempo medio de generación

Tiempo necesario para que la masa celular o el número de células se duplique.

El crecimiento (número de individuos vs. tiempo) debe ser representado en forma semilogarítmica, preferiblemente en base 2. Estos valores se calculan a partir del log en base 10 utilizando la siguiente fórmula:

$$\log_2 N = \frac{\log_{10} N}{\log_{10} 2} = \frac{\log_{10} N}{0,301}$$

Si N_0 es el tamaño de una población a tiempo 0 y N_t a tiempo t , el número de generaciones ocurridas en ese lapso estará dada por:

$$N_t = 2^{kt} \cdot N_0$$

donde K = tasa constante de crecimiento exponencial, o sea, es el número de duplicaciones por unidad de tiempo y se expresa usualmente como el número de duplicaciones por hora. La forma logarítmica de esta ecuación es:

$$\log_2 \frac{N_t}{N_0} = kt$$

A partir de esta fórmula se deduce K : *la tasa de crecimiento exponencial*:

$$K = \frac{\log_2 N_t - \log_2 N_0}{t}$$

Por lo tanto *el número de duplicaciones por hora* de una población se puede calcular sustrayendo el log en base 2 de una población inicial al log en base 2 de una población final y dividido por el tiempo transcurrido en horas. Si no se dispone de tablas en base 2, para agilizar el cálculo se hacen todos en base 10 y se divide por 0,301 ($\log_{10} 2$), entonces:

$$K = \frac{\log_{10} N_t - \log_{10} N_0}{0,301.t}$$

El uso de esta ecuación puede ilustrarse con un ejemplo específico. Una población bacteriana se incrementa de 1×10^2 a 1×10^9 células en 10 horas. La tasa exponencial de crecimiento será: $(9-2)/3.01 = 2.33$ generaciones por hora.

A veces es conveniente expresar la *tasa de crecimiento por el tiempo medio de duplicación*, es decir, *el tiempo para que la población sea el doble*. Ese valor es el recíproco de la constante = $1/k$.

A veces, especialmente para el cálculo de la cinética del crecimiento en cultivos continuos es necesario utilizar otra constante, la *tasa constante de crecimiento instantáneo* (μ) que se deduce así:

dN = cambio de N en un pequeño incremento de tiempo t , es proporcional a N , así como a μ , por lo tanto:

$$\mu N = \frac{dN}{dt}$$

La integración de esta ecuación entre N_t y N_0 nos da esta ecuación de crecimiento:

$$N_t = e^{\mu t} N_0$$

cuya forma logarítmica es:

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = \mu t = \text{tasa constante de crecimiento instantáneo}$$

La *tasa constante de crecimiento instantáneo* representa el aumento relativo de la población por unidad de tiempo cuando la velocidad del crecimiento correspondiente a tiempo 0 permanece inalterada. Su valor recíproco $1/\mu$, es el tiempo de generación instantáneo, es decir, el *tiempo necesario para que se duplique la población*. La relación numérica entre K y μ es:

$$N_t = 2^{kt} \cdot N_0; \quad N_t = e^{\mu t} \cdot N_0$$

Combinando dichas ecuaciones y despejando se obtiene:

$$\begin{aligned} \mu &= K \cdot (\ln 2) \\ \mu &= 0,69 \cdot K \end{aligned}$$

Por lo tanto, $1/\mu$ es $1/0,69 \cdot K$ o sea 1,45 veces el tiempo de generación medio (Stanier *et al.*, 1973).

Cálculo de la producción secundaria bacteriana. Ejemplo Práctico

Se realizan las experiencias en laboratorio, con distintas concentraciones de nutrientes agregados al agua. Para cada uno de ellos, a través del conteo directo se obtienen los valores de bacterias totales a distintos tiempos (N_{t1} , N_{t2}) como así también los porcentajes de células en división, (**FDC**), de acuerdo a la fórmula (1). Se calculan los valores de μ y $\ln \mu$, (preferiblemente estos últimos, pues dan mejor r^2), que se obtienen de la fórmula (2), para cada intervalo de tiempo. Una vez obtenidos estos resultados, se procede a realizar rectas de regresión para cada uno de los experimentos teniendo en cuenta que en el eje de las ordenadas irán los distintos valores obtenidos de (1) (en los tiempos 1) y en el de las abscisas los valores calculados con (2). Si las pendientes obtenidas dan valores semejantes, pueden ser promediadas o elegir la que dé un valor r^2 más alto o también puede realizarse una general con todos los valores obtenidos. Finalmente se obtendrá una recta:

$$\ln \mu = m \cdot \text{FDC} + b$$

Esta fórmula de la recta será usada como fórmula para los cálculos finales.

Posteriormente, para la muestra de la que se desee conocer la producción secundaria bacteriana, se requerirá solamente conocer los valores de bacterias totales y su **FDC**. Incorporando en la fórmula de la recta este valor se obtendrá un $\ln \mu$, que se transforma en μ , y luego $1/\mu$.

Una población de x bacterias se duplica cada $1/\mu$ horas, por lo que la producción de bacterias en un mililitro y por hora se obtiene dividiendo:

$$\frac{\text{Bact. totales} \cdot \text{ml}^{-1}}{1/\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}} = \text{Bacterias} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Esta producción de bacterias puede transformarse, a su vez, en producción de carbono, ($\text{mgC}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$). Los pasos serían los siguientes:

Si por ejemplo una población de $3,7\times 10^6$ bacterias. ml^{-1} se duplica cada 64 horas, la producción será de $5,78\times 10^4$ bacterias por mililitro y por hora. Si el volumen medio de esas bacterias fuera de $0,12\ \mu\text{m}^3$, $5,78\times 10^4$ bacterias tendrán un volumen de $6,9\times 10^3\ \mu\text{m}^3$.

$$\begin{aligned}\text{Si } 1\times 10^{12}\ \mu\text{m}^3 &= 1\ \text{cm}^3 \\ 6,9\times 10^3\ \mu\text{m}^3 &= 6,9\times 10^{-9}\text{cm}^3\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Si } 1\ \text{cm}^3 &= 0,087\ \text{g C (Ferguson \& Rublee, 1976)} \\ 6,9\times 10^{-9}\text{cm}^3 &= 6,034\cdot 10^{-10}\ \text{gC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\end{aligned}$$

$$\text{ó } 6,034\cdot 10^{-7}\ \text{mgC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$$

$$\text{ó } 6,034\cdot 10^{-4}\ \text{mgC}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$$

La producción será entonces de $0,6\ \text{mgC}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$

Bibliografía

- FERGUSON, R. L. & P. RUBLEE. 1976. Contribution of bacteria to standing crop of coastal plankton. *Limnol. Oceanogr.* 21: 141-145.
- HAGSTRÖM, A., U. LARSSON., P. HÖRSTEDT & S. NORMARK. 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 805-812.
- HOBBIE, J. E., R. J. DALEY & S. JASPER. 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (5): 1225-1228.
- NEWELL, S. Y. & R. R. CHRISTIAN. 1981. Frequency of dividing cells as an estimator of bacterial productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1): 23-31.
- RODINA, A. G. 1972. *Methods in Aquatic Microbiology*. University Park Press. 461 pgs.
- STANIER, R., M. DOUDOROFF & E. A. ADELBERG. 1973. *General Microbiology*. The McMillan Press Ltd. London & Basingstoke. 873 pgs.
- DI SIERVI, M. 2002. Bacterias. Determinaciones Microscópicas: Epifluorescencia. *Aquatec* 7: 1-10.



BACTERIAS

NOCIONES ELEMENTALES SOBRE RADIOISÓTOPOS: SU EMPLEO EN LA DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN BACTERIANA

MIGUEL ANGEL DI SIERVI

Introducción

Las bacterias acuáticas pueden incrementar y disminuir su actividad en rangos mayores a la de otros organismos. Si las condiciones del ambiente son favorables, ellas crecen rápidamente y si son desfavorables, se mantienen en estado latente. Es por ello que, demostrar la presencia de un número determinado de células por mililitro en un ambiente no nos dice nada acerca de su tasa de producción. Por esta razón, cuando se trata de interpretar el flujo de energía, debe conocerse su actividad, más que su mera presencia.

El proceso continuo de muerte o depredación sobre bacterias, ocurre al mismo tiempo que la producción, por eso es que ni el estado de equilibrio ni los cambios en el número de bacterias reflejan necesariamente producción bacteriana o carencia de la misma.

Se debe tener en cuenta, que las bacterias responden en forma rápida y evidente a cambios en las condiciones ambientales. El requisito esencial, por lo tanto, para medir la actividad bacteriana "*in situ*", debe ser el de no alterar significativamente las condiciones naturales.

La tendencia ideal de una curva de crecimiento de un cultivo bacteriano es de crecimiento inicial lento, luego exponencial, más tarde estacionaria y finalmente decreciente. Estos estados ideales se identifican con cultivos en laboratorio, pero en ambientes naturales, la situación es más compleja, con bacterias en varios estados de crecimiento al mismo tiempo.

La expresión final de crecimiento de una bacteria es la división celular y un incremento en el número y biomasa de células viables en la comunidad. Antes de que las células se

dividan debe haber una síntesis de componentes celulares nuevos, paredes membranas, proteínas, ARN y por supuesto ADN. Así, crecimiento puede ser definido como el incremento de un componente particular de la biomasa de las células, que culmina con la división celular.

Las condiciones necesarias para la aplicación de un método ideal que evalúe la tasa de crecimiento de bacterias en la naturaleza pueden enunciarse de la siguiente manera:

- a.- Especificidad para las bacterias.
- b.- Debe ser aplicable a una variedad de estados de crecimiento.
- c.- La tasa de crecimiento no debe alterarse con la manipulación experimental.
- d.- Debe demostrar precisión y sensibilidad en incubaciones cortas.

El empleo de la metil-³H-timidina, cumple con un gran porcentaje de las premisas del método ideal.

El crecimiento de los microorganismos es un complejo que encierra síntesis de proteínas, de ARN y de ADN y que usualmente culmina en la división celular. La síntesis de ADN es directamente proporcional a la tasa de división en bacterias. El inicio de una replicación depende de las condiciones de crecimiento. Esta relación entre crecimiento y síntesis de ADN significa que la medida de la tasa de síntesis de ADN es una buena medida de la tasa de crecimiento bacteriano.

El consumo de timidina, la asimilación en los constituyentes celulares y la incorporación al ADN, son todos procesos diferentes y la tasa de ocurrencia de cada uno varía entre los organismos. La incorporación de timidina en el ADN, a través de la timidina quinasa, es el proceso final que nos permite distinguir la actividad bacteriana de la de otros organismos y así reconocer la utilidad de la timidina en la medición de la tasa de crecimiento heterotrófico.

La timidina quinasa es una enzima de la que carecen los hongos y las cianobacterias (algas verde azuladas). Está también ausente del núcleo de varias algas eucariotas y microalgas marinas. Algunos protozoos quizás contengan dicha enzima, pero su contribución es probablemente pequeña, si su ADN resulta marcado, en experimentos con incubaciones cortas.

De este modo, el uso de timidina provee información específica acerca del crecimiento de bacterias heterotróficas, la cual no había sido posible de obtener hasta ahora, y cumple con el primer criterio anteriormente señalado.

El nucleótido timidina, tiene una sola función en las células bacterianas, que es la participación en la síntesis de ADN. La medición de dicha síntesis, se adapta para cumplir con los demás criterios citados.

Bases Teóricas. Enzimología

Es oportuno aquí, exponer detalladamente las bases teóricas en las que se asienta la técnica que emplea **metil-³H-timidina**, propuesta por Fuhrman y Azam (1980).

En principio, la medición de la tasa de crecimiento o producción secundaria del bacterioplancton, usando la síntesis de ácidos nucleicos es simple, incluye la tasa de incorporación de precursores radiactivos a una macromolécula.

La utilización de timidina tritiada, demostró ser ideal para este tipo de trabajo. Es rápida y eficientemente tomada por bacterias, es estable durante su utilización, es convertida rápidamente en nucleótidos y marca el ADN con muy poca o ninguna dilución por «pools» intracelulares.

Hay dos formas principales de biosíntesis de nucleótidos en las células:

1. La “*de novo*” en la cual los nucleótidos son sintetizados a partir de componentes celulares básicos.

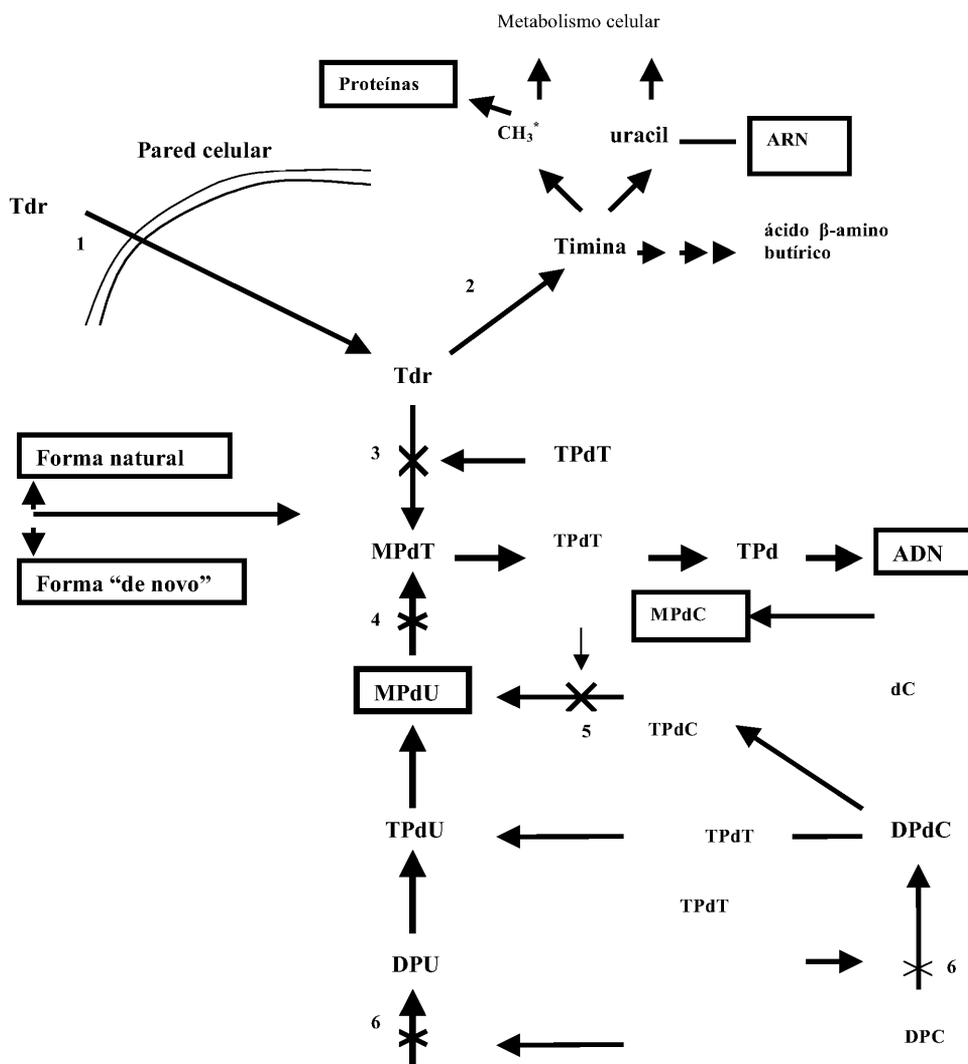


Figura 1. Caminos metabólicos del nucleótido timidina: *Tdr*, timidina; *MPdT*, *DPdT* y *TPdT*, timidina mono, di y trifosfato respectivamente; *MPdU*, *DPdU* y *TPdU*, desoxiuridina mono, di y trifosfato respectivamente; *dC*, desoxicitidina; *MPdC*, *DPdC* y *TPdC*, desoxicitidina mono, di y trifosfato respectivamente. Enzimas: (1) mecanismo de transporte activo; (2) timidina fosforilasa; (3) timidina quinasa; (4) timidilato sintetasa; (5) desoxicitidilato deaminasa; (6) ribonucleosido reductasa.

- La forma *silvestre* o *natural*, en la cual las bases libres y los nucleósidos se obtienen de la degradación de nucleótidos en exceso o ácidos nucleicos que son reconvertidos en trifosfatos de nucleótidos.

La timidina no se obtiene en la síntesis “*de novo*”, sino que se sintetiza monofosfato de timidina a partir del monofosfato de deoxiuridina (MPdU), por la timidilato sintetasa. (Fig. 1).

En la forma silvestre o natural, la timidina es fosforilada para formar monofosfato de timidina (MPT), por la timidina quinasa. La base (timina) es convertida a nucleósido (timidina), por la acción de la timidina fosforilasa (Fig. 2). Para esto es necesaria la desoxirribosa-1-fosfato, la cual a menudo es suplida por otro nucleósido, por ejemplo, desoxiadenosina. A menos que haya un adecuado suministro de desoxirribosa-1-fosfato, esta reacción no se produce, y de hecho, puede predominar la reacción contraria. A esto se debe que se use la timidina y no la timina, como precursor para medir la síntesis de ADN.

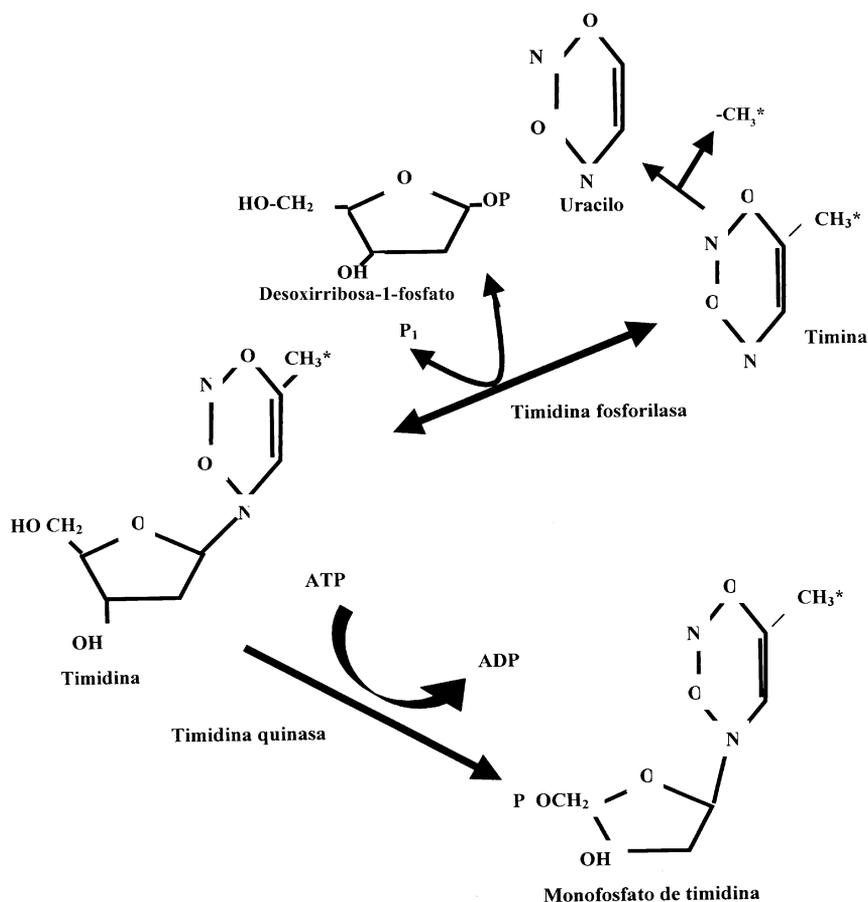


Figura 2. Reacciones y estructuras de algunos compuestos que involucran a la timidina. La ubicación de la marca de tritio se muestra con un asterisco (*).

De aquí surgen dos observaciones fundamentales a saber:

1. Muchos de los átomos marcados pueden perderse por catabolismo de la timina y luego, por pérdida del grupo metilo durante una posterior degradación de la timina. No hay una forma directa por la cual el tritio se incorpore al ARN o al ADN, después de la degradación de la timina. El grupo metilo marcado entra en el “pool” general de metabolitos en la célula y eventualmente puede ser distribuido a todos los componentes, incluyendo ARN y ADN, pero estaría considerablemente diluido. Además, en experiencias con incubaciones cortas, tales marcaciones no específicas son insignificantes.
2. El principal mecanismo para la dilución del isótopo en el ADN es la acción de la timidilato sintetasa, por la cual el MPT deriva del MPdU y se mezcla con el MPT formado por la timidina quinasa a partir de la timidina.

Durante la conversión a trifosfato de timidina (TPT), el isótopo puede ser diluido por la síntesis de nucleótidos a partir de otros recursos diferentes al precursor agregado y es aquí que puede ocurrir la mayor dilución del isótopo en las células en crecimiento.

Como el difosfato de desoxitimidina (DPdT) y el trifosfato de desoxitimidina (TPdT) se sintetizan solamente a partir del MPT, el isótopo no puede ser diluido en DPdT y TPdT.

Hay formas en las cuales, nucleótidos de citidina pueden ser convertidos en timidina a través de TPdU o MPdU (Fig. 1).

Hay evidencias de que la ADN polimerasa está asociada con un número de nucleótido-quinasas y que sus actividades son mayores cuando las enzimas se juntan. Esto significa que hay comportamientos funcionales de precursores de nucleótidos dentro del complejo multienzimático en el cual altas concentraciones de precursores están disponibles en el sitio donde son usados, por ejemplo, replicaciones de ADN.

Probablemente todos los organismos regulan la biosíntesis de nucleótidos para prevenir una innecesaria formación de trifosfatos de nucleótidos.

Hay interacciones complejas entre muchos nucleótidos, involucrando activación o inhibición de ciertas enzimas biosintéticas. El TPT es un regulador importante de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos y esto significa que el tamaño del “pool” de TPdT debe ser estrechamente regulado para actuar de esa manera.

Hay dos caminos para la síntesis “de novo” de nucleótidos de timidina, uno vía nucleótidos de citidina y otro a partir de nucleótidos de uridina. Ambos son regulados por el TPdT, que actúa como inhibidor de la ribonucleósido reductasa y desoxicitidilato deaminasa.

Un incremento en el “pool” de TPdT, hará lenta o frenará el suministro de MPdT por la síntesis «de novo», dependiendo del tamaño del “pool”. Cuando se realizan mediciones de tasas de crecimiento en ambientes naturales, se debe agregar suficiente timidina al medio, para inhibir completamente la síntesis “de novo”. Así se puede prevenir la dilución isotópica.

Conceptos básicos

Dado que la forma de obtener la producción secundaria bacteriana que se detallará a continuación, es mediante el método de trazadores radiactivos, (**metil-³H-timidina**), es menester conocer el significado de algunos conceptos básicos de física nuclear y radiactividad. Estos serán desarrollados en forma muy superficial, ya que un conocimiento más profundo del tema, excede las expectativas de este capítulo, pero es necesario conocer y saber distinguir los distintos elementos y formas de desintegración radiactivas que el hombre maneja actualmente.

Fundamentos de física nuclear y estructura atómica

Las sustancias pueden clasificarse en *simples* y *compuestas*.

Las *sustancias simples* son las que no pueden ser llevadas a un estado más elemental, Ej.: oxígeno, hidrógeno, yodo, calcio, etc.

Son *sustancias compuestas* aquellas que se logran descomponer en dos o más o que pueden prepararse por la unión de dos o más sustancias simples.

Desde muy antiguo se tenía la idea de que la materia estaba constituida por partículas elementales llamadas átomos.

Hasta finales del siglo pasado se sostuvo, entre otros conceptos, que los átomos eran idénticos entre sí y diferentes de los de otras sustancias, que eran indivisibles, que no podían ser creados ni destruidos ni transformados unos en otros. Pero a la luz del descubrimiento de la radiactividad se tuvo evidencia de que el átomo está constituido por partículas más pequeñas y de que podían transformarse de unos en otros. Por otro lado se comprobó que los átomos de una sustancia simple pura no son necesariamente idénticos. Así el carbono de la naturaleza está constituido por dos clases de átomos que difieren en sus masas respectivas. Los más livianos son los más abundantes (98,89 %) y se conocen como átomos de carbono 12 y los menos abundantes (1,107 %) conocidos como carbono 13 son más pesados.

Lo que puede decirse es que *átomo* es la porción más pequeña de materia que puede obtenerse de una sustancia por procedimientos exclusivamente químicos.

Molécula puede definirse como la partícula más pequeña de una sustancia, que puede existir normalmente como tal.

Peso molecular de una sustancia es la relación entre el peso de una molécula de la sustancia para la cual se está definiendo el peso molecular y la doceava parte del peso del átomo de carbono. El peso molecular de una sustancia se obtiene de la suma de los pesos atómicos de los elementos constituyentes incluidos tantas veces como entren en la molécula. Ej.: La molécula de agua (H₂O) está constituida por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, el peso molecular del agua será:

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Hidrógeno} \times 2 & = & 1,00797 \times 2 & = & 2,01594 \\
 \text{Oxígeno} & = & 15,9994 & & = 15,99940 \\
 & & & \hline
 & & & & = 18,01534
 \end{array}$$

Molécula gramo o mol de una sustancia, es una masa de la misma expresada en gramos igual a su peso molecular. Ej: un mol de agua es 18,01534 gramos.

Estructura del átomo

La imagen más simple del átomo es la que lo presenta constituido por un núcleo central, cargado positivamente, que concentra prácticamente toda la masa del átomo, y una serie de electrones girando alrededor del mismo en distintas órbitas

Los electrones son partículas muy livianas cargadas negativamente y cada átomo los posee en cantidad suficiente para neutralizar la carga positiva del núcleo.

El núcleo de densidad enorme, está constituido por dos tipos de partículas elementales: neutrones y protones. La naturaleza de las fuerzas que mantienen a protones y neutrones unidos en el núcleo y que son de corto alcance, no se conocen muy bien, aunque se suele admitir que los nucleones se mantienen unidos dentro del núcleo, mediante el intercambio que realizan de partículas especiales llamadas mesones.

Otro constituyente del átomo es el electrón, que se conoció a fines del siglo pasado como la unidad mínima de electricidad negativa. La masa en reposo del electrón es aproximadamente 1840 veces menor que la masa del átomo de hidrógeno.

Podemos resumir la imagen atómica en esta forma: el átomo consta de un núcleo constituido por neutrones, protones y mesones. En órbitas externas se ubican los electrones en un número que iguala a los protones, lo que asegura la neutralidad del átomo entero.

Número atómico-Número de masa

El número de protones que posee el núcleo se conoce como número atómico que se designa con la letra **Z** y determina las propiedades químicas del elemento. Cada elemento particular tiene un número atómico. El número de neutrones en el núcleo se simboliza con la letra **N**.

El número total de nucleones (neutrones más protones) en el núcleo de un átomo se llama número de masa y se simboliza con la letra **A**. Es el número entero más cercano al peso atómico de un átomo en particular.

El símbolo utilizado para representar especies nucleares es el símbolo químico del elemento con el número atómico como subíndice a la izquierda y abajo y el número de masa a la izquierda y arriba. A veces se suele omitir el número atómico, ya que queda indicado por el símbolo Ej.: Carbono 14 = ^{14}C ; Tritio = ^3H .

Nucleido

Se llama nucleido a una especie atómica, que está definida por su número de masa, su carga nuclear y su estado energético.

Isótopos

Todos los nucleidos que tienen la misma carga nuclear (igual **Z**) se llaman isótopos del elemento respectivo. Los isótopos de un elemento tienen todos el mismo número de protones pero distinto número de neutrones y con esto, naturalmente, diferente número de masa. Como el número **Z** configura su comportamiento químico, se comportan de la misma manera.

Ejemplos de isótopos: ^{12}C y ^{14}C ; ^2H y ^3H .

Elemento

Se llama elemento a la mezcla *natural* de isótopos con el número atómico correspondiente. Hay elementos (aluminio, iodo, flúor, sodio, fósforo) que están constituidos por un solo isótopo, pero la mayoría de los elementos se componen de varios *isótopos estables*, llegando el estaño a estar constituido por diez isótopos. Salvo raras excepciones, la abundancia relativa de los isótopos que constituyen un elemento es siempre la misma independientemente de su origen.

Estabilidad nuclear

Es interesante conocer la relación de neutrones a protones en los nucleidos naturales, o sea los estables, que son aquellos que no desintegran.

En los nucleidos estables de bajo número de masa, la relación neutrón a protón se aproxima a la unidad. Cuando el número de protones en el núcleo es mayor de 20, la relación de neutrones a protones en nucleidos estables es siempre mayor que la unidad. Para el nucleido estable más pesado, tal como ^{208}Pb , la relación de neutrones a protones es ligeramente mayor que 1,5.

Radiactividad

Los átomos existentes en la naturaleza pueden agruparse en dos grupos: estables e inestables. Estables son aquellos que no cambian espontáneamente en el tiempo. A esta clase pertenecen los átomos que constituyen el iodo natural. Si se tienen 10^6 átomos de iodo natural, estos pueden intervenir en numerosas y variadas reacciones químicas, pero a través del tiempo se tendrán 10^6 átomos de iodo natural. Los átomos inestables pierden identidad por transformación en otros, tal es el caso del iodo 131 (^{131}I), cuyos átomos no se encuentran en la naturaleza. En este caso si dispusiéramos en el día de hoy de 10^6 átomos de ^{131}I , después de 8,05 días tendríamos 5×10^5 átomos, después de 16,1 días tendríamos $2,5 \times 10^5$ átomos, y al cabo de 64,4 días sólo tendríamos 3905 átomos, el resto de los átomos se han transformado en isótopos de xenón 131 (^{131}Xe). También en la naturaleza existen núcleos inestables, ejemplo de los mismos son el radio 226 (^{226}Ra), el uranio natural (^{238}U), el torio (^{232}Th), el potasio 40 (^{40}K) y otros.

El fenómeno mediante el cual el núcleo se transforma espontáneamente en otro (en el caso indicado, iodo en xenón) recibe el nombre de desintegración radiactiva. En cada desintegración radiactiva el núcleo pierde aproximadamente una milésima parte de su carga en forma de radiación. Algunos núcleos mediante una sola desintegración alcanzan la estabilidad, se transforman en núcleos estables, otros necesitan sufrir sucesivas desintegraciones. Al nucleido que sufre la desintegración se le suele llamar nucleido madre, y al producto de la misma nucleido hija. Puesto que a la transformación de los núcleos va acompañada de emisión de radiaciones, a los núcleos inestables se los llama también núcleos radiactivos o activos.

La desintegración radiactiva no es afectada, salvo contadas excepciones, por fenómenos físicos o químicos.

Los núcleos pueden desintegrar por distintos mecanismos, emitiendo en cada caso distintos tipos de radiaciones o partículas (partículas alfa, partículas beta, neutrinos, radiaciones electromagnéticas, neutrones).

Entre los elementos naturales, son radiactivos todos los que tienen número atómico mayor que 83: rubidio 87 (^{87}Rb), samario 147 (^{147}Sm), gadolinio 152 (^{152}Gd), hafnio 174 (^{174}Hf), platino 190, 192 (^{190}Pt , ^{192}Pt), plomo 204, 210 (^{204}Pb , ^{210}Pb) y algunos otros con número atómico menor: potasio 40 (^{40}K), vanadio 50 (^{50}V).

Debido a que hay una gran variedad de núcleos y además que estos núcleos desintegran por distintos mecanismos, también hay una gran variedad de períodos de semidesintegración, tantos como nucleidos activos naturales y artificiales existen. Algunos nucleidos tienen períodos del orden de 10^9 años y otros de microsegundos. En el ejemplo mencionado anteriormente, del ^{131}I , este tiene un período de 8,05 días.

Se define entonces como *período de semidesintegración* (T) al tiempo que debe transcurrir para que un número estadísticamente significativo de átomos de un nucleido se reduzca a la mitad, mediante desintegraciones radiactivas.

Existe otra constante también utilizada en radiactividad, llamada constante de desintegración radiactiva (λ) y que está conectada matemáticamente con el período de semidesintegración por la siguiente relación:

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T} = \frac{0,693}{T} \quad (1)$$

Distintos tipos de Desintegración Radiactiva

Como ya se vió, no todo lo que es radiactivo ofrece el mismo tipo de desintegración. A fin de completar la información, seguidamente se hará una síntesis de los distintos tipos de desintegración radiactiva.

Desintegración alfa (α)

Es característica de los núcleos pesados con número atómico mayor que 82, aunque hay algunos que también desintegran por α a pesar de tener un **Z** menor, por ej.: samario 147 (Sm 147, con **Z** = 62). La mayoría de los emisores α conocidos se encuentran entre los nucleidos activos naturales. Las partículas α son núcleos de helio, constituidos por dos neutrones y dos protones, y por lo tanto con dos cargas positivas, de ahí que el nucleido hija presente un **Z** dos unidades menor que el núcleo madre y un número de masa (**A**) cuatro unidades menor.

Desintegración beta (β)

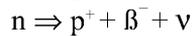
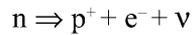
Si la relación de neutrones a protones de un nucleido es mayor o menor que la que corresponde a la estabilidad en la zona de la tabla a la cual pertenece el nucleido, este desintegra por beta, que puede ser negativa o positiva.

En la beta negativa se emite una partícula que es un electrón similar a los orbitales pero dotado de velocidad cinética. En el segundo caso se emite un positrón, que es una partícula de carga y masa en valor absoluto igual a la del electrón pero de signo positivo.

Desintegración beta negativa (β^-)

Cuando la relación de neutrones a protones de un nucleido es mayor que la correspondiente a la estabilidad ($n/p > 1$), un neutrón del núcleo puede transformarse en un protón, y emitirse una partícula beta negativa y un neutrino. El neutrino es una partícula sin carga y de masa despreciable.

La transformación de un neutrón en un protón puede esquematizarse así:



donde

n : símbolo del neutrón

p⁺: símbolo del protón

e⁻: símbolo del electrón

β⁻: símbolo de la partícula beta negativa

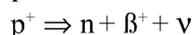
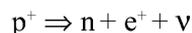
ν : símbolo del neutrino

El nucleido hija tiene un número atómico una unidad mayor que el núcleo madre y conserva el número de masa

La energía de las partículas beta emitidas por un radionucleido dado, puede variar desde valores cercanos a cero hasta un valor máximo (energía máxima, que es valor que generalmente aparece tabulado), determinado por la transformación nuclear involucrada en cada caso. Esto significa que todos los radionucleidos madres que desintegran por beta, se transforman en el radionucleido hija, emitiendo partículas de distinta energía, donde unas son de energía máxima y las demás de energía menor. Esa diferencia de energía es llevada por el neutrino. En resumen, las partículas beta emitidas por un nucleido beta emisor presentan un espectro de energías.

Desintegración beta positiva (β^+)

Cuando la relación de neutrones a protones de un nucleido es menor que la que corresponde a la estabilidad ($n/p < 1$), este puede desintegrar por beta positiva o captura electrónica. No existen en la naturaleza emisores beta positivo.



donde

n: símbolo del neutrón

p⁺: símbolo del protón

e⁺: símbolo del positrón

β⁺: símbolo de la partícula beta positiva

ν: símbolo del neutrino

El positrón es una partícula cargada positivamente y con una masa igual a la del electrón.

En este caso de desintegración el núcleo hija tiene un número atómico menor en una unidad que el núcleo madre y el número de masa se conserva.

Desintegración por captura electrónica

Los átomos con exceso de protones pueden bajar esta relación no sólo por desintegración beta positiva, sino capturando un electrón orbital. Esta transformación nuclear recibe el nombre de captura electrónica y en ella un protón se transforma en un neutrón. También se emite un neutrino, pero como el electrón es capturado de un estado energética definido, los neutrinos son monoenergéticos, a diferencia de la desintegración beta negativa o beta positiva en que presentan un espectro de energías.

La captura electrónica va siempre acompañada de la emisión de rayos X, característicos del átomo producido por la transformación nuclear.

Rayos X

Como consecuencia de la captura de un electrón por el núcleo (generalmente de la capa K, ya que esta es la más cercana al núcleo), queda en la órbita un espacio que es ocupado por un electrón de una órbita más externa, dando lugar a la emisión de un rayo X, cuya energía está dada por la diferencia de energía de unión del electrón en ambas órbitas. Como el salto de electrones de una capa produce un vacío en otra más externa y así sucesivamente, se tendrá un espectro característico de rayos X del nucleido producido en el proceso nuclear.

Desintegración por neutrones

En la fisión nuclear, que tiene lugar espontáneamente en los núcleos pesados con una relación de neutrones a protones muy grande, un núcleo se fisiona en general en dos fragmentos asimétricos, emitiéndose en promedio dos neutrones por fisión. Los fragmentos que tienen exceso de neutrones respecto a la estabilidad, se libran por emisión directa de ellos, transformándose en otros nucleidos, los que a su vez se acercan a la estabilidad eliminando los neutrones a través de desintegraciones beta negativas.

Desintegración gamma e isomérica

Un núcleo al desintegrar por alguna de las formas ya descritas puede dejar al núcleo hija en su estado fundamental (mínima energía) o en diferentes estados o niveles excitados. En estos niveles los valores de energía en exceso sobre el que tiene en estado fundamental, se pierden con la emisión de uno o más rayos gamma. Es decir, los rayos gamma emitidos por los núcleos radiactivos tienen energías bien definidas correspondientes a transiciones entre niveles de los mismos.

Los rayos gamma son ondas electromagnéticas similares en sus propiedades a los rayos X. La diferencia fundamental radica en que mientras los rayos X tienen su origen en las órbitas electrónicas, los rayos gamma se emiten como resultado de una reordenación espontánea de los nucleones en el núcleo.

Los rayos gamma y los rayos X son de la misma naturaleza que la luz pero poseen una longitud de onda mucho menor. Se emiten en forma de fotones o cuantos de energía que se

propagan con la velocidad de la luz. Un nucleido con emisión gamma el el Cromo 51 ($^{51}_{24}\text{Cr}$) que desintegra por captura electrónica a Vanadio 51 ($^{51}_{23}\text{V}$).

El 91 % de los núcleos de vanadio se forman en su nivel fundamental y el 9 % restante se crean en un estado excitado a 0,3198 Mev sobre el fundamental, desexcitándose mediante la emisión de un rayo gamma de 0,3198 Mev.

Transición isomérica

Son isómeros aquellos nucleidos que tienen el mismo número de masa y el mismo número atómico, difiriendo en su contenido energético. El estado más energético recibe el nombre de *metaestable* y el fenómeno mediante el cual un nucleido pasa del metaestable al *fundamental* por emisión de rayos gamma recibe el nombre de *transición isomérica*.

El estado excitado o metaestable y el fundamental constituyen lo que se conoce como *par isomérico*. Cabe preguntar cuando se considera que son nucleidos isómeros? y cuando niveles excitados de un mismo nucleido?

Se consideran isómeros cuando el nivel excitado posee vida medible.

Conversión interna

La emisión de rayos gamma puede estar reemplazada o acompañada por la emisión de electrones de conversión interna.

Ocurre cuando un núcleo excitado, en lugar de desexcitarse por emisión de rayos gamma, expulsa un electrón orbital con energía igual a la de la excitación del núcleo menos la energía de unión del electrón en su órbita, de ahí que los electrones de conversión interna sean monoenergéticos.

Puesto que la conversión interna deja un vacante en una órbita electrónica, esta transformación se presenta acompañada por la emisión de rayos X características. La conversión interna compite con la desexcitación gamma.

Leyes de Desintegración Radiactiva

La desintegración radiactiva obedece a las leyes de la probabilidad y es independiente de influencias exteriores como presión, gravedad, temperatura, campos eléctricos o magnéticos y tratamientos químicos de la sustancia activa.

El número de átomos de una sustancia radiactiva que desintegran durante una pequeño intervalo de tiempo, es proporcional al número de átomos presentes en la sustancia y al intervalo de tiempo considerado.

$$- \Delta N = \lambda N \Delta t$$

donde

ΔN : número de átomos que desintegran

N : número de átomos activos en la sustancia

Δt : intervalo de tiempo

λ : constante de proporcionalidad, llamada constante de desintegración radiactiva y mide la probabilidad de que un átomo particular desintegre en la unidad de tiempo. Es caracterís-

tica de cada nucleido activo. Tiene como dimensión tiempo⁻¹ (s⁻¹; m⁻¹; h⁻¹; a⁻¹).

Si el valor de Δt es suficientemente pequeño y se pasa al primer miembro, se obtiene:

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N = A \quad \text{o según (1)}$$

$$\frac{0,693}{T} N = A \quad (2)$$

Al valor $-dn/dt$, que es la velocidad de desintegración de una fuente activa al tiempo t (el signo negativo indica que son átomos que desaparecen), se lo conoce con el nombre de *Actividad* y se lo designa con la letra A . Por lo tanto *Actividad* es el número de átomos que desintegran por unidad de tiempo. A este valor se lo suele designar también *Actividad Absoluta* para diferenciarlo de la *Actividad Media o Relativa*, que se designará como A_m .

Integrando la expresión (2) y dándole forma exponencial se obtiene:

$$\frac{N}{N_0} = e^{-\lambda t}$$

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad (3)$$

donde

N : número de átomos activos presentes al tiempo t , o sea, átomos que no han desintegrado al cabo de un tiempo t .

N_0 : número de átomos activos presentes al tiempo $t = 0$ (tiempo inicial)

e : 2,718..., base de los logaritmos naturales.

La expresión (3) nos permite calcular si se tiene un número significativo de átomos, cuantos de ellos quedarán después de transcurrido un tiempo t . En cambio es imposible conocer cuanto vivirá un átomo particular.

Si se multiplican ambos miembros de la ecuación (3) por λ se tiene:

$$\lambda N = \lambda N_0 e^{-\lambda t}$$

y de allí

$$A = A_0 e^{-\lambda t}$$

$$A = A_0 e^{-0,693 t/T}$$

donde

A : velocidad de desintegración o actividad al tiempo t

A₀: velocidad de desintegración o actividad al tiempo inicial (t = 0)

Esta expresión indica que la actividad a un tiempo t, de una fuente activa constituida por N átomos, es proporcional a la actividad de la fuente a tiempo t = 0, instante en el cual había N₀ átomos, y permite calcular la actividad de una fuente a tiempo t conociendo la actividad inicial de la misma (t = 0).

La actividad será expresada en desintegraciones por unidad de tiempo (des/min; des/seg).

Unidades de Radiactividad

La unidad de actividad es el curio o curie. La definición es: El curie es una unidad de radiactividad, definida como la cantidad de cualquier nucleido radiactivo en el cual el número de desintegraciones por segundo es $3,7 \times 10^{10}$.

Se utilizan submúltiplos y múltiplos del curie (Ci): el microcurie (μ Ci) igual a la milonésima parte del curie, el milicurie (mCi) equivalente a la milésima parte del curie, el Kilocurie (KCi) equivalente a mil curies y el megacurie (MCi) igual a un millón de curies. Otras unidades pequeñas menos utilizadas son: el nanocurie (nCi) igual a 10^{-9} curies y el picocurie (pCi) igual a 10^{-12} curies.

$$\begin{aligned} 1 \text{ Ci} &= 3,7 \times 10^{10} \text{ des/seg} = 2,22 \times 10^{12} \text{ des/min} \\ 1 \text{ mCi} &= 3,7 \times 10^7 \text{ des/seg} = 2,22 \times 10^9 \text{ des/min} \\ 1 \mu\text{Ci} &= 3,7 \times 10^4 \text{ des/seg} = 2,22 \times 10^6 \text{ des/min} \\ 1 \text{ KCi} &= 3,7 \times 10^{13} \text{ des/seg} = 2,22 \times 10^{15} \text{ des/min} \\ 1 \text{ MCi} &= 3,7 \times 10^{16} \text{ des/seg} = 2,22 \times 10^{18} \text{ des/min} \end{aligned}$$

Actividad Medida o Actividad Relativa. Eficiencia

Muy pocos instrumentos son capaces de determinar actividades absolutas, en general lo que indican son actividades relativas tal que

$$A_m = C A$$

o lo que es lo mismo

$$\frac{A_m}{A} = C \quad (1)$$

donde

A_m = actividad medida

A = actividad absoluta

C = factor de eficiencia

El factor C, y por lo tanto la actividad relativa medida, es función del nucleído medido, de las características del detector de actividad y de las condiciones experimentales de trabajo. Si se determina el factor C, es posible dar valores de actividad absoluta a pesar de haber sido determinado experimentalmente un valor relativo.

Este factor, llamado factor de eficiencia es siempre menor a la unidad y se suele expresar en porcentaje, diciéndose en ese caso que con un determinado equipo y en condiciones particulares de trabajo, un nucleído se mide con una eficiencia de tanto por ciento.

$$100 C = \text{eficiencia}$$

y por lo tanto, si sustituimos en (1)

$$\text{eficiencia \%} = 100 \frac{A_m}{A}$$

Así como las actividades absolutas se expresan en desintegraciones por unidad de tiempo, las actividades relativas se expresan en cuentas por unidad de tiempo, comúnmente cuentas por minuto. El coeficiente C está dado en cuentas por desintegraciones.

Ejemplo:

Un equipo detector determina para un nucleído problema una A_m de 1000 cuentas/min. Si el aparato detector actúa con una eficiencia del 10% ¿que actividad absoluta tendrá ese nucleído?

$$A_m = C A$$

$$A = \frac{A_m}{C} = \frac{1000 \text{ c/min}}{10/100 \text{ c/des}} = 10.000 \text{ des/min.}$$

La actividad absoluta será de 10.000 des/min., que si se desea se puede transformar en unidades de radiactividad:

$$\frac{2,22 \times 10^6 \text{ des/min.}}{10.000 \text{ des/min.}} \times \frac{1 \mu\text{Ci}}{x} = \frac{10.000}{2,22 \times 10^6} = 4,5 \times 10^{-2} \mu\text{Ci}$$

Centelleo Líquido

Uno de los problemas en la medición del nucleidos cuya energía beta máxima es baja es la absorción y otro la dispersión de las radiaciones emitidas que provoca cualquier material que encuentran a su paso. La absorción y dispersión depende de algunos factores como ser la configuración de la fuente radiactiva, la composición química de la muestra, la ventana del detector y el aire interpuesto entre éste y la fuente.

La absorción disminuye notablemente si se disuelve la muestra con el centelleador en un solvente adecuado. Al medir la muestra en solución se logra tener los átomos radiactivos completamente rodeados de moléculas centelleadoras, es decir que se tiene prácticamente una geometría 4π . De aquí que una de las ventajas de los centelleadores líquidos sea la mayor eficiencia y sensibilidad para medir emisores beta de baja energía.

Ofrece también otras ventajas, tales como que generalmente es más sencillo disolver un material dado, que preparar muestras sólidas adecuadas a las condiciones de medición o llevarlas al estado gaseoso. Además se puede trabajar con volúmenes relativamente grandes.

Principio de operación del Contador de Centelleo Líquido

El líquido centelleador consiste en una solución diluida de uno o más compuestos fluorescentes disueltos en un solvente.

La partícula radiactiva entrega su energía al solvente, el cual la transfiere a los solutos fluorescentes, que ceden esa energía como un centelleo de luz visible o ultravioleta. Esta luz interactúa con un fotocátodo de un tubo fotomultiplicador y da origen a un pulso eléctrico que es amplificado, analizado, clasificado de acuerdo a su tamaño y registrado.

La muestra

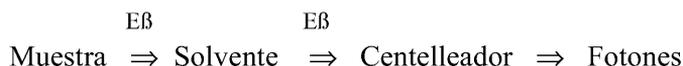
La muestra que va a ser medida en un contador de centelleo líquido debe ser considerada como el conjunto de cuatro factores: el solvente, el centelleador, el material radiactivo y el recipiente.

1. *El solvente* tiene dos funciones, disolver los solutos fluorescentes y la muestra y transferir la energía de la partícula radiactiva al centelleador.

El solvente debe disolver el material radiactivo a analizar para obtener buena eficiencia. Comúnmente se usa tolueno, xileno y en el caso de muestras acuosas el dioxano. El agregado de dioxano disminuye la eficiencia, de manera que para mejorarla se agrega naftaleno, que aumenta la transferencia de energía beta al centelleador.

Las muestras depositadas sobre papel de filtro, tal como secciones de papel cromatográfico pueden medirse depositando la tira entera en el líquido centelleador o luego de disolverlo con algún solvente (como en el caso de los filtros usados para las muestras de agua de incubaciones de producción primaria o producción secundaria bacteriana).

La otra función del solvente es transferir la energía de la partícula beta al centelleador. En este caso el solvente actúa como intermediario absorbiendo la energía beta y entregándola al centelleador. El proceso es el siguiente:



Si el solvente absorbe en gran medida los fotones producidos por el centelleador, se produce una disminución en el tamaño de los impulsos. Se dice que el solvente produce “quenching” de color.

Por otro lado si el solvente absorbe energía de las partículas beta y no la entrega a moléculas centelleadoras, se produce también disminución en el tamaño de los impulsos. En este caso, se dice que se produce “quenching” químico o térmico.

2. *El centelleador* convierte la energía de las partículas beta en energía luminosa o sea en fotones de luz visible o ultravioleta, siendo el número de fotones emitidos proporcional a la energía absorbida en el medio. El centelleador más usado es el PPO (2-5 difenil-oxazol).

Generalmente se agrega una sustancia fluorescente secundaria, para llevar la longitud de onda de los fotones emitidos por la primaria a una región donde el fotomultiplicador posee mayor sensibilidad. De este modo, aumenta la eficiencia de medición. El más usado es el dimetil POPOP (2 - 2'p - fenilen - 4 metil 5 feniloxazol).

3. *El material radiactivo*. Los nucleidos que se miden con mayor frecuencia en los contadores de centelleo líquido son los emisores beta de baja energía.

4. *El recipiente* debe ser transparente a la radiación emitida por los centelleadores. Cuando los recipientes son de vidrio, contienen ^{40}K , isótopo radiactivo del potasio natural por lo que no es aconsejable su uso debido a que aumentan considerablemente el fondo. Generalmente se usan recipientes de vidrios especiales (más baratos que los de cuarzo) o de polietileno, pero pueden ser solubles a los solventes empleados.

Equipos electrónicos

Constan de un fotomultiplicador, preamplificador, amplificador, analizador de altura de pulsos, escalímetro. El principio de operación del contador de centelleo líquido se basa en la suposición de que al salir de los amplificadores, los impulsos son proporcionales a la altura de la energía de las radiaciones beta que los originaron.

La partícula beta entrega energía al centelleador que la devuelve en forma de fotones,

los que en el fotocátodo del tubo multiplicados se convierten en fotoelectrones. Estos llegan al ánodo y producen un pulso de una altura determinada. Se puede resumir:

$$1 \text{ partícula} \Rightarrow n \text{ fotones} \Rightarrow 1 \text{ pulso}$$

Es decir, el número de pulsos en la unidad de tiempo es proporcional a la velocidad de desintegración, es decir a la actividad.

Quenching

Se distinguen dos mecanismos de quenching: *químico* y *de color*. En ambos casos se produce una disminución en el tamaño de los impulsos.

Los compuestos coloreados, especialmente aquellos que son amarillos en solución, interfieren absorbiendo la luz emitida produciendo quenching de color, y los compuestos tales como el tetracloruro de carbono interfieren tanto en la transferencia de energía del solvente al centelleador como en la emisión de luz por el mismo.

Dado que la mayoría de las muestras producen quenching en distintos grados, especialmente a altas concentraciones, la eficiencia de medición puede variar de una muestra a la otra. Es importante estimar la eficiencia de medición en cada muestra. Esto se logra generalmente mediante el método de relación de canales y el método del standard interno.

Método de relación de canales. Se basa enteramente en el análisis de altura de pulsos. Se requiere un equipo de por lo menos dos canales. Uno de los canales se fija de manera de cubrir totalmente el espectro de impulsos para la muestra sin “quenching” del isótopo a medir. El segundo canal se ajusta de modo que registre sólo una fracción de esos impulsos generalmente aquellos que son mayores a la altura promedio.

Mientras la composición química de la muestra y las condiciones de trabajo se mantengan invariables, la relación de actividades aparentes en los dos canales será la misma, independientemente de la actividad absoluta de la muestra.

Cuando se produce “quenching”, disminuye el número de fotones emitidos y algunos de los pulsos más grandes se convierten en pulsos más pequeños. Por lo tanto, la relación de cuentas en los dos canales va a variar.

Se prepara una serie de muestras conteniendo igual actividad de un nucleido determinado y cantidades crecientes del agente que produce «quenching».

Se miden en los dos canales elegidos y se calcula la relación de actividades aparentes de las distintas muestras. Estas relaciones se grafican en función de la eficiencia de medición obtenida en el canal más ancho.

Muestras desconocidas pueden ser medidas en esos mismos canales y por referencia a esta curva standard se puede obtener la eficiencia de medición correspondiente.

Método del standard interno. Cuando se requiere un dato más preciso de la eficiencia, es útil determinarla para cada isótopo en cada muestra.

Se prepara la muestra por duplicado y se agrega a una de ellas una cantidad conocida del mismo nucleído con el que se trabaja en una forma que no suma más “quenching”.

Como la actividad absoluta del standard interno es conocida y se supone que su medi-

ción será afectada por el «quenching» al igual que la de la muestra, se puede calcular así la eficiencia:

Se registra la actividad en el contador de centelleo de la muestra problema a la que se le sustrae el valor de ruido o fondo. Se tiene entonces la actividad medida de la muestra:

$$A_M$$

Por otro lado, se registra el valor del duplicado de la muestra al que se le agregó el standard y se le sustrae el valor de fondo, obteniéndose entonces un valor en el que estarán sumadas las actividades relativas de la muestra y el standard:

$$A_{M+St}$$

Posteriormente se obtiene por sustracción la actividad relativa del standard (A_{St}):

$$A_{M+St} - A_M = A_{St}$$

Como se conoce la actividad absoluta del standard (a_{St}) se puede obtener la eficiencia (**Ef**):

$$\frac{A_{St}}{a_{St}} \times 100 = Ef$$

Ahora conociendo la eficiencia se calcula la actividad absoluta de la muestra (A):

$$\frac{A_M}{Ef} = A$$

Forma práctica de obtener la producción secundaria bacteriana

La producción secundaria bacteriana, es importante por la cantidad de material que aporta a niveles tróficos superiores. Asimismo, el carbono producido por las bacterias puede ser medido en el tiempo y el espacio, mediante técnicas que emplean trazadores radiactivos. Siendo la que utiliza metil-(³H)-timidina, una de las más convenientes, por las razones ya apuntadas al principio de este trabajo, la producción secundaria bacteriana puede ser expresada así:

$\mu\text{gC.l}^{-1}.\text{h}^{-1} = \text{nmol. de metil-}(^3\text{H})\text{-timidina en el extracto insoluble en ácido tricloroacético} \times \text{factor de conversión (células} \times \text{nmol.)} \times \text{carbono celular promedio} \times 60 / \text{tiempo de incubación (minutos)}.$

nmol. de metil-}(^3\text{H})\text{-timidina en el extracto insoluble en ácido tricloroacético}

Cuando se desea conocer la producción bacteriana de un cuerpo de agua en particular, las muestras deben ser tomadas de un lugar que sea representativo del mismo o si se desea conocer algún tipo de diferencias, lugares que a priori se especule que tienen distintas características bacterianas (desembocadura de un río o arroyo, balneario, desagües, etc.).

Las muestras pueden ser filtradas para eliminar posibles consumidores de bacterias, e incubadas, preferiblemente “*in situ*” en frascos de vidrio, luego del agregado de timidina tritiada en una concentración que inhiba la síntesis “*de novo*” e impida la “*silvestre*”. Tanto esta concentración como así también el tiempo de incubación, dependerán del ambiente sobre el que se trabaje y deben ser establecidos en ensayos de puesta a punto de la metodología.

Pasado el tiempo de incubación, las muestras se fijan con formol (concentración final 2%), lo que da un margen de tiempo antes de comenzar el procesado final.

Las muestras son filtradas a través de filtros de 0,22 μm de poro. Posteriormente, sobre el filtrado, se hace pasar ácido tricloroacético enfriado (menos de 3 °C). Este procedimiento permite que solo queden sobre el filtro las macromoléculas de proteínas, ARN y ADN. Se asume que solamente estas últimas están marcadas con ^3H .

El filtro es retirado del aparato de filtración y puesto en un recipiente para centelleo líquido. Son desecados en vacío y luego tratados con 1 ml de acetato de etilo hasta su disolución (unos 30 minutos aprox.). Se agrega líquido de centelleo y se lee en un aparato para centelleo líquido.

Las lecturas son corregidas (ver “*quenching*”) y los moles de timidina incorporados se calculan así:

$$\text{moles: (des/min)/(AS)} \times 4,5 \times 10^{-13}$$

donde

des/min: son las desintegraciones por minuto sobre el filtro

AS: es la actividad específica de la solución de timidina usada en Ci/mmol.

$4,5 \times 10^{-13}$: es el número de curies por desintegración (1Ci/2,22 $\times 10^{12}$ des/min)

Factor de conversión (células x nmol.). El factor de conversión es necesario para estimar la producción de carbono orgánico a través de la incorporación de timidina. Su función es determinar una relación entre los incrementos en los conteos directos con naranja de acridina y los cambios en la tasa de incorporación de timidina en las poblaciones bacterianas en ausencia de bacterióvoros.

La base de las experiencias en las que se establecerá el factor de conversión, es similar a las que son sometidas las muestras de campo. Es decir incubaciones de agua del mismo

lugar del que se extraerán las muestras con radioisótopo, filtrado y lectura.

La diferencia está en que al agua a incubar se le puede sumar algún nutriente a fin de activar el crecimiento bacteriano. De esta incubación se extraerán a distintos horarios, alícuotas para conteo microscópico directo y otras que serán procesadas de la forma ya comentada. La idea es obtener una pendiente que relacione el número de bacterias con la utilización del material marcado radiactivamente.

Cálculo del factor de conversión. La hipótesis postula la existencia de una relación lineal entre la tasa de consumo y la producción bacteriana. Esto implica que consumo y producción están íntimamente relacionados, lo cual puede ser expresado, de acuerdo a las ecuaciones de Kirchman *et al.*, (1982) y Bell *et al.* como:

$$v(t) = C^{-1} dN(t)/dt \quad (1)$$

donde

$v(t)$: consumo del compuesto marcado.

$dN(t)/dt$: es la producción de células.

C : es el factor de conversión (células por mol).

La tasa de consumo μ puede ser definida como:

$$dN(t)/dt = \mu \cdot N(t) \quad (2)$$

donde

μ es la tasa de consumo.

La ecuación (1) puede ser sustituida en base a la ecuación (2) para dar

$$C = \mu \cdot N(t)/v(t) \quad (3)$$

A $t = 0$. El factor de conversión puede ser calculado por la siguiente ecuación:

$$C = \mu \cdot N(0)/v(0) \quad (4)$$

donde

μ : es la tasa específica de crecimiento (h^{-1}) determinada por las regresiones de las tasas de consumo y abundancia.

$N(0)$: es el número de bacterias que incorpora el compuesto marcado al comienzo del experimento.

$v(0)$: es la intercepta en y de la regresión de la tasa de consumo.

Resumiendo, de la incubación base se obtienen submuestras a distintos horarios, se mide

el consumo y se realiza una recta de regresión de consumo vs. tiempo y número de bacterias vs. tiempo. Las dos pendientes, deberían ser iguales. En caso contrario se deben hacer correcciones (generalmente sumar el aumento del volumen bacteriano). A partir de μ y el punto en el cual esta pendiente corta el eje y en ambas regresiones, se obtienen $N(0)$ y $v(0)$ y se calcula el factor de conversión en base a la ecuación (4).

Finalmente, conociendo los nmoles de timidina incorporados en el ADN, el número de bacterias presentes en la muestra y de allí el carbono celular promedio, además del factor de conversión que unirá estos valores, y teniendo en cuenta el tiempo de incubación, se está en condiciones de obtener la producción secundaria bacteriana en μg de carbono por litro y por hora de un cuerpo de agua natural.

El siguiente ejercicio ejemplifica todo el procedimiento:

Se parte de tres frascos (**a**, **b** y **c**, este último fijado con formol que será utilizado como blanco) con 50 ml de muestra, incubados durante 4 horas con una concentración de 2,5 nM de metil- ^3H -timidina. Luego de las cuatro horas, las muestras (**a** y **b**) se fijan con formol (2 % concentración final). Se procede a filtrar por filtros de 0,2 μm de poro, se extraen las macromoléculas con ácido tricloroacético y posteriormente los filtros son puestos en viales para centelleo líquido. Se agrega el líquido de centelleo elegido y se ponen los viales en un contador.

El frasco (**a**) arrojó 5562 c/min

El frasco (**b**) arrojó 8260 c/min

El frasco (**c**) arrojó 478 c/min

Si se considera una eficiencia del 34 %

$$\begin{array}{r}
 a = 16358,82 \text{ des/min} \\
 b = 24294,12 \text{ des/min} \\
 \hline
 40652,94 \div 2 = 20326,47 \text{ des/min promedio} \\
 \text{restando el blanco} \quad \quad \quad - 1405,88 \\
 \hline
 \text{La incubación promedio} = 18920,59 \text{ des/min}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{r}
 \text{Si } 2,22 \times 10^6 \text{ des/min} \text{ ————— } 1 \mu\text{Ci} \\
 18920,59 \text{ des/min} \text{ ————— } x = 8,522788 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}
 \end{array}$$

Comercialmente, la metil- ^3H -timidina viene en distintas concentraciones. Si la que se está empleando tiene una concentración de 80,2 Ci/mmol o lo que es lo mismo 80,2 $\mu\text{Ci/nmol}$, entonces:

$$\begin{array}{r}
 80,2 \mu\text{Ci} \text{ ————— } 1 \text{ nmol} \\
 1 \mu\text{Ci} \text{ ————— } x = 0,01247 \text{ nmol}
 \end{array}$$

¿Cuántos nmoles tendría la muestra del ejemplo?

$$\begin{array}{r} 1 \mu\text{Ci} \text{ ————— } 0,01247 \text{ nmol} \\ 8,522788 \times 10^{-3} \mu\text{Ci} \text{ ————— } x = 1,06279 \times 10^{-4} \text{ nmol} \end{array}$$

Pero este número corresponde a 50 ml (volumen incubado) y a 4 horas de incubación. Para llevar el valor obtenido a un litro se debe multiplicar por 20. Eso dará por resultado $2,12558 \times 10^{-3}$ y para llevarlo a una hora debe ser dividido por cuatro, lo que da: $5,31 \times 10^{-4} \text{ nmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Usando el factor de conversión calculado por Bell *et al.*, (1983), que es de $2 \times 10^9 \text{ cel.nmol}^{-1}$, al multiplicarlo por el valor obtenido antes se obtiene la producción de células bacterianas:

$$5,31 \times 10^{-4} \text{ nmol.l}^{-1}.\text{h}^{-1} \times 2 \times 10^9 \text{ cel.nmol}^{-1} = 1.062.000 \text{ cel.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

Si se considera un volumen bacteriano promedio de $0,098 \mu^3$ se obtendrá el volumen de bacterias en un litro:

$$1.062.000 \text{ cel.l}^{-1}.\text{h}^{-1} \times 0,098 \mu^3.\text{cel}^{-1} = 104.076 \mu^3.\text{l}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

De aquí es posible obtener la producción bacteriana en carbono. Para ello, es necesario un factor que lleve a relacionar el volumen celular con el contenido en carbono de las bacterias. Este valor es muy engorroso de obtener en forma práctica, motivo por el cual generalmente se usan los ya calculados por investigadores que trabajaron especialmente en ellos. Hay varios en la bibliografía, y uno de los más empleados es el de Watson *et al.*, (1977), que considera que $1 \mu\text{m}^3$ de bacterias contiene $1,21 \times 10^{-13} \text{ gr. de carbono}$.

Por lo tanto

$$\begin{array}{r} 1 \mu\text{m}^3 \text{ ————— } 1,21 \times 10^{-13} \text{ gr C} \\ 104.076 \mu\text{m}^3 \text{ ————— } x = 1,2593 \times 10^{-8} \text{ gr. C.l}^{-1}.\text{h}^{-1} \end{array}$$

Esta producción, que puede parecer muy pequeña, no es tal si se tiene en cuenta que al cabo del día se producirán:

$$1,2593 \times 10^{-8} \text{ gr.C.l}^{-1}.\text{h}^{-1} \times 24 = 3,022 \times 10^{-7} \text{ gr. C.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$$

Si en un m^3 hay 1000 litros, entonces

$$3,022 \times 10^{-7} \text{ gr.C.l}^{-1}.\text{d}^{-1} \times 1000 = 3,022 \times 10^{-4} \text{ gr.C.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$$

Considerando un cuerpo de agua como por ejemplo el Embalse Ramos Mexía, El Chocón, con un volumen de $2,02 \times 10^{10} \text{ m}^3$, la producción en este caso en un día sería de:

$$2,02 \times 10^{10} \text{ m}^3 \times 3,022 \times 10^{-4} \text{ gr.C.m}^{-3}.\text{d}^{-1} = 6,105 \times 10^6 \text{ gr.C.d}^{-1}$$

O lo que lo mismo 6,105 toneladas de carbono por día. En un año la producción sería de 2.228 toneladas de carbono. Si a esto se suma el hecho de que la producción aumenta a niveles que superan la producción primaria en épocas de altas temperaturas, como así también, que las bacterias producen en ese nivel tanto de día como de noche y que la eficiencia como formadoras de material orgánico particulado es de sólo el 60 %, la cantidad final de material reciclado puede llegar a ser sorprendente.

Bibliografía

- BELL, R. T., AHLGREN, G. M. & AHLGREN, I. 1983. Estimating bacterioplankton production by measuring (³H)thymidine incorporation in a eutrophic swedish lake. *Appl. Environ. Microbio.* 45: 1709-1721.
- FRANCISCO, D. E., MAH, R. A. Y RABIN, A. C. 1973. Acridine orange epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 92: 416-421.
- FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1085-1095.
- HOBBIE, J. E., DALEY, R. J. Y JASPER, S., 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (5): 1225-1228.
- KIRCHMAN, D. DUCKLOW, H. W. & MITCHELL, R. 1982. Estimates of bacterial growth from changes in uptake rates and biomass. *Appl. y Environ. Microbiol.* 44 (6): 1296-1307.
- PARSONS Y STRICKLAND. 1962. On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in seawater. *Deep Sea Res.* 8: 211-222.
- WATSON, S. W., NOVITSKY, T. J., QUINBY, H. L. & VALOIS, F. W. 1977. Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 940-947.
- ZIMMERMANN, R. Y MEYER REIL, L. A. 1974. A new method for fluorescence staining of bacterial populations on membrane filters. *Kiel Meeresforsch.* 30: 24-27

BACTERIAS

BIBLIOGRAFIA DEL Dr. ALDO A. MARIAZZI

POR MIGUEL ANGEL DI SIERVI

INTRODUCCION

El 9 de setiembre de 2002 se cumplieron siete años de la lamentada y temprana desaparición del Dr. Aldo A. Mariazzi, quien fuera el creador del laboratorio de Microbiología del Instituto de Limnología “Dr Raúl A. Ringuelet”, ILPLA.

Los estudios limnológicos en cuerpos de agua de los que se carecía de información básica y la utilización en los mismos de nuevas técnicas de investigación fueron unas de sus tantas inquietudes. Es a partir de ello que se hace necesaria la publicación de una lista de sus trabajos, como una forma de difundir su trayectoria, dedicada con afán al estudio e investigación de los cuerpos de agua de nuestro país.

La siguiente es una apretada síntesis de su *Curriculum Vitae*.

Nacido en la ciudad de Chivilcoy, provincia de Buenos Aires, el 23 de marzo de 1943, se trasladó a la ciudad de La Plata para realizar sus estudios universitarios, donde se graduó, en la Facultad de Ciencias Naturales y Museo como Licenciado en Zoología en mayo de 1968. Continuó sus estudios de postgrado, egresando de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata con el título de Bacteriólogo Clínico e Industrial en diciembre de 1970. Especializado en bacteriología limnológica, su tesis doctoral «Estudio bacteriológico en ecosistemas lacustres subalpinos. Ecología y taxonomía de microorganismos con actividad lipolítica» lo llevó a ser el primer Doctor en Bacteriología Clínica e Industrial egresado de la Universidad de La Plata, en noviembre de 1975.

Desde al año 1966, en que comenzó sus tareas como técnico contratado del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Pcia. de Buenos Aires, sus trabajos se orientaron siempre a la investigación de las relaciones de las bacterias acuáticas con su medio ambiente. Fue así como en el año 1968 ingresó como Investigador Asociado con dedicación exclusiva, a cargo del Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Limnología de la Universidad Nacional de La Plata, cargo que mantuvo en forma interina y por concurso desde 1972. A partir de 1975 fue jefe de Trabajos Prácticos con dedicación exclusiva, del Instituto de Limnología de la UNLP. Su ingreso a la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas fue en el año 1977, como Investigador adjunto. A partir de 1981 y hasta su muerte se desempeñaba como Investigador Independiente de CONICET.

Toda su carrera la desarrolló en el Instituto de Limnología de La Plata, hoy llamado “Dr. Raúl A Ringuelet” en honor a su creador y de quien el Dr. Mariazzi fue uno de los discípulos, además de integrante del plantel de profesionales que dio origen a esta institución. En ella llegó a formar parte del Consejo Asesor (1986-1987), teniendo luego el honor de ser su Director entre los años 1987 y 1989.

Varias becas lo llevaron a completar e intercambiar sus conocimientos con prestigiosos científicos del mundo. En 1973 - 1975 fue becario externo del CONICET en el Istituto Italiano di Idrobiologia, Pallanza, Italia. En 1975, como becario del British Council tuvo como lugar de trabajo el Windermere Laboratory, Freshwater Biological Association, Gran Bretaña. En el año 1985 fue becario de postdoctorado de la Japan Society for the Promotion of Science, en la Facultad de Agriculture de la Universidad de Kyoto, Japón.

Fue director de becarios, tesis y investigadores, pues muchos noveles científicos encontraron en él una valiosa guía en sus trabajos; y aún posibilitó el viaje de muchos de ellos al exterior, ofreciéndoles desinteresadamente sus múltiples contactos internacionales.

Autor de 50 trabajos científicos e innumerables de orden técnico, fue un ferviente impulsor del estudio a largo plazo de los cuerpos de agua continentales, a fin de observar en ellos la influencia del hombre. Uno de esos trabajos, fue en el que estuvo abocado desde el año 1977, el estudio de los efectos pre y post operacionales de la central atómica, sobre el Embalse de Río Tercero,

Estableció una importante red de contactos internacionales con la comunidad científica habiendo alcanzado un amplio reconocimiento dentro de su especialidad. Tuvo un gran talento para tomar nuevas ideas e instrumentarlas dentro de su grupo de trabajo del Instituto de Limnología, a quienes dio los fundamentos de las investigaciones sobre ecología microbiana que hoy están desarrollando.

Con la desaparición de Aldo Mariazzi, hemos perdido no solo un amigo sino también a un inspirado colega, cuyo protagonismo en la investigación microbiológica será difícil de reemplazar.

LISTA BIBLIOGRÁFICA

Trabajos realizados

1. AGUIRRE, W. G., T. G. DORTA, M. TOBÍA, C. GÓMEZ, M. PRÍO & A. A. MARIAZZI. 1971. Aislamiento y estudio de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de distinto origen. *Analecta Veterinaria III*: 145-154.
2. AGUIRRE, W. G., A. A. MARIAZZI, M. TOBÍA & G. RAMIREZ GRONDA. 1971. Investigación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae en aguas costeras de un sector del Río de la Plata. *V Congreso Latinoamericano de Microbiología*, Punta del Este, Uruguay.
3. MELCHIORRI SANTOLINI, U., R. BERTONI, G. MAESTRONI & A. A. MARIAZZI. 1975. Distribution of pelagic bacterial populations and related ecological factors in a deep lake. *Proc. Ist. Internat. Congr. Internat. Assoc. Microbiol. Soc.* 2: 385-394.
4. GARIBOGLIO, M. A., A. A. MARIAZZI & L. S. MONTICELLI. 1977. Estudio bacteriológico de una zona del Río de la Plata destinada a uso recreacional. *Limnobiós 1*: 167-175.
5. MARIAZZI, A. A. 1977. Contribución al conocimiento de bacterias lipolíticas en ecosistemas lacustres subalpinos. *Limnobiós 1*: 153-158.
6. MARIAZZI, A. A. & V. H. CONZONNO. 1980. Distribución de clorofila-*a* y producción fotosintética del fitoplancton en el Embalse del Río Tercero. I. Primeros resultados. *Limnobiós 2*: 54-67.
7. MARIAZZI, A. A., M. C. ROMERO, E. VILLALOBOS, M. A. DI SIERVI Y A. J. MARIÑELARENA. 1980. Estudio bacteriológico en el Embalse del Río Tercero (Prov. de Córdoba, Argentina). Factores ecológicos y predicciones sobre efectos térmicos. *Limnobiós 2*: 89-110.
8. MARIAZZI, A. A., M. C. ROMERO & V. H. CONZONNO. 1981. Producción primaria, bacterias, nutrientes y otros factores ecológicos en el Embalse del Río Tercero (Córdoba). *Limnobiós 2*: 153-177.
9. MARIAZZI, A. A., V. H. CONZONNO & M. C. ROMERO. 1981. Distribución temporo-espacial de bacterias heterotróficas, clorofila, seston, y parámetros químicos (Embalse del Río Tercero, Córdoba). *Limnobiós 2*: 193-205.
10. CONZONNO, V. H., A. A. MARIAZZI, M. A. CASCO, R. ECHENIQUE, H. A. LABOLLITA & M. PETROCCHI. 1981. Estudio limnológico en el Lago Pellegrini (Río Negro, Argentina). *Ecosur* 8: 153-170.
11. DI SIERVI, M. A. & A. A. MARIAZZI. 1982. Uso de perfiles numéricos para la identificación de bacterias gram negativas en ambientes lacustres. *Limnobiós 2*: 330-332.
12. MARIAZZI, A. A., M. C. ROMERO, M. NAKANISHI & V. H. CONZONNO. 1983. Influencia de la temperatura sobre la tasa de fotosíntesis, en el Embalse del Río Tercero (Prov. de Córdoba, Argentina). *Limnobiós 2*: 419-429.

13. ROMERO, M. C., A. A. MARIAZZI & M. NAKANISHI. 1983. Relación entre la tasa de fotosíntesis fitoplanctónica y la intensidad luminosa en el Embalse del Río Tercero (Prov. de Córdoba, Argentina). *Limnobiós* 2: 431-438.
14. MARIAZZI, A. A., M. A. DI SIERVI, M. C. ROMERO & M. NAKANISHI. 1983. Distribución espacial y estacional de pigmentos fotosintéticos en la zona eufótica del Embalse del Río Tercero. *Limnobiós* 2: 464-470.
15. ROMERO, M. C. & A. A. MARIAZZI. 1983. Natural glucose concentrations determined by dilution bioassay in Río Tercero Dam (Córdoba, Argentina). *Limnobiós* 2: 513-517.
16. MARIAZZI, A. A. & M. C. ROMERO. 1983. Estimación de la actividad heterotrófica en tres ecosistemas acuáticos con distinto grado de trofismo. *Ecosur* 10: 61-77.
17. ROMERO, M. C. & A. A. MARIAZZI. 1984. Heterotrophic consumption by planktonic bacteria and algae in Embalse del Río Tercero (Córdoba, Argentina). *Ecosur* 11: 29-38.
18. MARIAZZI, A. A., M. C. ROMERO & P. M. ARENAS. 1984. Contribución del nanoplancton a la producción primaria y pigmentos fotosintéticos en el Embalse del Río Tercero (Córdoba, Argentina). *Ecosur* 11: 19-29.
19. NAKANISHI, M., A. A. MARIAZZI, V. H. CONZONNO, E. CLAVERIE, M. A. DI SIERVI & M. C. ROMERO. 1985. Primary production studies on a reservoir, Embalse del Río Tercero, Argentina. *Mem. Fac. Sci., Kyoto Univ. Ser. Biol. Vol. X N° 1*: 49-62.
20. MARIAZZI, A. A., M. C. ROMERO, V. H. CONZONNO & M. A. DI SIERVI. 1985. Ritmo diario de la fotosíntesis, respiración, pigmentos y bacterias heterotróficas (Embalse del Río III, Córdoba, Argentina). *Ecosur* 12/13: 25-35.
21. ROMERO, M. C. & A. A. MARIAZZI. 1985. Heterotrophic bacterial uptake on glucose and glycollate in an eutrophic pond (Chascomús, Argentina). *Ecosur* 12/13: 111-121.
22. DI SIERVI, M. A., A. A. MARIAZZI & M. T. CORRALES. 1986. Diversidad de cepas viables gram negativas del Embalse del Río III (Córdoba, Argentina). *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Lit.* 17:1-5.
23. MARIAZZI, A. A., V. H. CONZONNO, J. ULIBARRENA, J. C. PAGGI & J. L. DONADELLI. 1987. Limnological investigation in Tierra del Fuego. *Biol. Acuát.* 10: 1-74.
24. ROMERO, M. C., P. M. ARENAS & A. A. MARIAZZI. 1987. Dinámica de la excreción fitoplanctónica de materia orgánica (Laguna de Chascomús, Prov. de Bs. As., Argentina). *Ecosur* 14/15: 73-80.
25. ROMERO, M. C., A. A. MARIAZZI & P. M. ARENAS. 1987. Condiciones de luz subacuática como factores alse del Río Tercero (Córdoba, Argentina). *Oecología acuática* 9: xx-yy, 1-7.
26. ROMERO, M. C., A. A. MARIAZZI & A. J. MARIÑELARENA. 1987/88 The relationship between bacterial heterotrophic activity and algal autotrophic activity in Embalse del Río III

- reservoir (Córdoba, Argentina). *Ecosur*: v: 14/15. n° 25/26. Págs. 63-71.
27. FUKAMI, K., S. OHARA, Y. ISHIDA & A. A. MARIAZZI. 1988. A modified MPN method for counting oligotrophic bacteria by using naturally occurring organics. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1659-1663.
 28. MARIAZZI, A. A., M. C. ROMERO & V. H. CONZONNO. 1988. Ciclo anual y heterogeneidad espacial de procesos autotróficos y heterotróficos, y caracteres físico químicos del Embalse del Río Tercero. *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Lit.* 19: 167-181.
 29. MARIAZZI, A. A. 1989. Ezequiel Ramos Mexía Reservoir. En: *Data Book of World Lake Environments. A Survey of the State of World Lakes*. Edited by Lake Biwa Research Institute & International Lake Environment Committee-United Nations Environment Programme, Otsu, Japan.
 30. MARIAZZI, A. A., M. C. ROMERO, V. H. CONZONNO & A. J. MARIÑELARENA. 1989. Results of a limnological study in a reservoir previous to the functioning of a nuclear power plant (Embalse del Río III, Argentina). *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Lit.* 20: 57-68.
 31. DI SIERVI, M. A., A. A. MARIAZZI & J. L. DONADELLI. 1990. Cuantificación, frecuencia de división celular y producción de bacterias planctónicas en el Embalse del Río III. Variables relacionadas. *Ecosur* 16 (27): 1-12.
 32. ROMERO, M. C. & A. A. MARIAZZI. 1990. Cinética de consumo de sustratos orgánicos de bacterias aisladas de la Laguna de Chascomús. *Ecosur* 16 (27): 31-44.
 33. MARIAZZI, A., V. CONZONNO, R. ECHENIQUE & H. LABOLLITA. 1991. Physical and chemical characters, phytoplankton and primary production of Ezequiel Ramos Mexia Reservoir (Argentina). *Hydrobiologia* 209: 107-116.
 34. MARIAZZI, A. A., M. A. DI SIERVI & J. L. DONADELLI. 1991. Bacterial secondary production and it relation with primary production in the Embalse del Río Tercero Reservoir, Argentina. *Hydrobiologia* 211: 57-64.
 35. CONZONNO, V. H. & A. A. MARIAZZI. 1991. Eutroficación en el Embalse del Río Tercero (Córdoba). Influencia de la Central Nuclear. *Biología acuática* 15: 38-39.
 36. CONZONNO, V. H. & A. A. MARIAZZI. 1991. Distribución horizontal del fósforo, nitrógeno, clorofila y producción primaria en el Embalse Ezequiel Ramos Mexía. *Biología acuática* 15: 74-75.
 37. MARIAZZI, A. A., J. L. DONADELLI, P. M. ARENAS, M. A. DI SIERVI & C. BONETTO. 1992. Impact of a nuclear power plant on water quality of Embalse del Río Tercero Reservoir (Córdoba, Argentina). *Hydrobiologia* 246: 129-140.
 38. MARIAZZI, A. A., A. DIPPOLITO, P. BATISTONI, M. A. DI SIERVI & C. BONETTO. 1993. Effect of a nuclear power plant on Embalse del Río Tercero Reservoir. A long term survey. 5th International Conference on the Conservation and Management of lakes "Stressa 93". pp 144-147. En: Giussani & Callieri (Eds) *Strategies for lake ecosystems*

beyond 2000. Stressa. Italia. 598 pp.

39. LÓPEZ, H. L. & A. A. MARIAZZI. 1994. Limnology in Argentina: an historical account. *Forum* 4(3): 169-178.
40. DI SIERVI, M. A., A. A. MARIAZZI & J. L. DONADELLI. 1995. Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico. Aspectos metodológicos. *Biología acuática* 18: 1-13. Contribución Científica N° 484.
41. DI SIERVI, M. A., A. A. MARIAZZI & J. L. DONADELLI. 1995. Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico. Importancia de las bacterias libres y adheridas. *Biología acuática* 18: 14-22. Contribución Científica N° 520.
42. DI SIERVI, M. A., A. A. MARIAZZI & J. L. DONADELLI. 1995. Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico. Variaciones espacio-temporales y relaciones con la producción primaria. *Biología acuática* 18: 23-32. Contribución Científica N° 509.
43. DI SIERVI, M. A., A. A. MARIAZZI & J. L. DONADELLI. 1995. Medición de la producción bacteriana en un embalse patagónico. Variaciones en cortos periodos de tiempo. *Biología acuática* 18: 33-42. Contribución Científica N° 619
44. DI SIERVI, M. A., A. A. MARIAZZI & J. L. DONADELLI. 1995. Bacterioplankton and phytoplankton production in a big patagonic reservoir (República Argentina). *Hydrobiologia* 297(2): 125-131.
45. CONZONNO, V. H., A. A. MARIAZZI & M. C. ROMERO. 1995. Penetración de la luz y su relación con la clorofila y eficiencia fotosintética en el Lago Pellegrini (Río Negro, Argentina). *Rev. Asoc. Cienc. Nat. Lit. Vol* 26 (1): 1-7.
46. MARIÑELARENA, A. J & A. A. MARIAZZI. 1995. Bacteriología: Técnicas de laboratorio. En: Lopretto, E.C. y G. Tell (Editores). *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Ediciones Sur, La Plata.
47. MARIÑELARENA, A. J. & A. A. MARIAZZI. 1995. Bacteriología acuática. En: Lopretto, E.C. y G. Tell (Editores). *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Pags 79-84. Ediciones Sur, La Plata.
48. MARIÑELARENA, A. J. & A. A. MARIAZZI. 1995. Cuantificación de bacterias heterotróficas viables. En: Lopretto, E. C. y G. Tell (Editores). *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Pags 85-93. Ediciones Sur, La Plata.
49. MARIÑELARENA, A. J. & A. A. MARIAZZI. 1995. Cuantificación de bacterias indicadoras de contaminación fecal. En: Lopretto, E. C. y G. Tell (Editores). *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio*. Pags 95-104. Ediciones Sur, La Plata.
50. MARIAZZI, A. A., M. A. DI SIERVI, J. L. DONADELLI & L. ALBINO. 1998. Annual cycle of bacterial numbers, biovolumes and productivities in the Exequiel Ramos Mexía Reservoir (Río Negro, Argentina). *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 26: 1631-1635.