

CUANTIFICACION, FRECUENCIA DE DIVISION CELULAR Y PRODUCCION DE BACTERIAS PLANCTONICAS EN EL EMBALSE DEL RIO III - VARIABLES RELACIONADAS*

Miguel A. DI SIERVI, Aldo A. MARIAZZI y Jorge L. DONADELLI**

SUMMARY: Quantification, frequency of dividing cells and production of planktonic bacteria in the Embalse del Río III reservoir. Related variables.

During a whole year (1987-1988), monthly variations of biomass, frequency of dividing cells and production of bacterioplankton were studied in the Embalse del Río III Reservoir (Córdoba, Argentina). Algal biomass and production were measured simultaneously. A significant relationship between bacterial and algal production was observed, being temperature an important regulator factor. Bacterial biomass values did not correlate with their production rates. Low values and variability in the frequency of dividing cells were probably due to methodological difficulties for detecting division in very little cells. These data suggest that the frequency of dividing cells is not a reliable indicator of total active bacteria. Annually bacteria cycled nearly 60% of organic matter produced by phytoplankton in the water column.

INTRODUCCION

Convirtiendo los compuestos orgánicos disueltos y en muy baja concentración en las aguas, en materia orgánica particulada, que puede ser consumida por organismos superiores de la cadena alimentaria, las bacterias heterotróficas reciclan en el sistema, energía que de otra manera se perdería. Diversos autores (Lucas *et al.*, 1981; Newell y Fallon, 1982; Ducklow y Kirchman, 1983; Azam *et al.*, 1983), estimaron en ecosistemas marinos, que entre el 10 y 50% del carbono fijado fotosintéticamente entra en la cadena alimentaria a través del crecimiento bacteriano sobre el carbono orgánico disuelto. Bell y Kuparinen (1984), entre otros, sostienen que los productos de excreción algal parecen mover la mayor fuente de energía para el bacterioplancton.

A partir de la implementación y aplicación del método de incorporación de timidina tritiada en el ADN por parte de Fuhrman y Azam (1980, 1982), se ha logrado un notable avance en el conocimiento de la tasa de movilización de la materia orgánica a través de las bacterias. La mayoría de las investigaciones se han realizado en ambientes marinos (Moriarty y Pollard, 1981; Newell y Fallon, 1982; Fuhrman y Azam, 1980), siendo escasas las referidas a ambientes acuáticos continentales (Riemann *et al.*, 1982; Bell *et al.*, 1983; Lovell y Konopka, 1985).

Para poder aportar nuevos datos sobre esta problemática, el objetivo del presente estudio fue estimar la producción del bacterioplancton a través del consumo de metil-

* Contribución Científica N° 515.

** Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" C. C. 712 - 1900 - La Plata.

ECOSUR	Argentina	ISSN 0325-108X	v. 16	n. 27	págs. 1-12	1990
--------	-----------	-------------------	-------	-------	---------------	------

^3H -timidina y la frecuencia de aparición de bacterias en división, su variación temporal y relaciones con los organismos productores primarios fitoplanctónicos, influencia de la temperatura y el tamaño celular en los resultados finales con el fin de evaluar, en forma tentativa, en que medida las bacterias movilizan la materia orgánica en un embalse eutrófico templado de Argentina.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se desarrolló en el Embalse del Río III, ubicado en el Valle de Calamuchita de la provincia de Córdoba, a $64^\circ 23'$ Oeste y $32^\circ 10'$ Sur. El mismo se encuentra a 529,4 metros sobre el nivel del mar y tiene una superficie de 45,3 km². Se construyó por represamiento del Río Tercero en el año 1936 con fines hidroeléctricos y recreativos; actualmente sus aguas son utilizadas en el enfriamiento de la central termonuclear Embalse. Tiene características de un ecosistema eutrófico y en trabajos anteriores se brindó información sobre aspectos físicos, químicos y biológicos del mismo (Mariazzi, *et al.*, 1981; Nakanishi, *et al.*, 1985).

El presente trabajo se desarrolló entre enero de 1987 y enero de 1988, con relevamientos mensuales en una estación central del lago (Fig. 1). Las muestras se

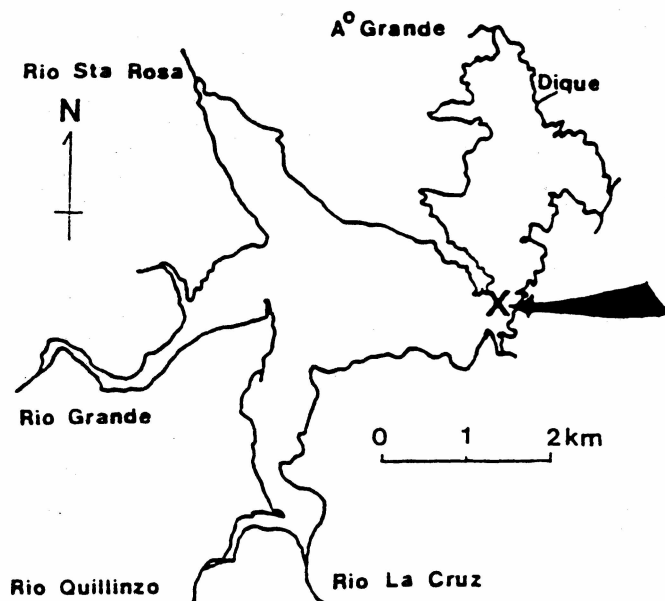


Fig. 1.— Embalse del Río Tercero. Estación de muestreo.

obtuvieron con un aparato tipo van Dorn de dos litros de capacidad a las profundidades de 0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; y 20 metros.

La temperatura fue medida metro a metro en toda la columna de agua mediante un termistor. La zona fótica se determinó con un fotómetro subacuático Li-Cor 192 SB.

El número de bacterias fue estimado por microscopía de epifluorescencia. Las muestras se preservaron con formol al 2% (concentración final) en viales de vidrio limpios y esterilizados y fueron refrigeradas hasta el momento del recuento, el cual no se extendió a más de dos semanas desde la obtención de las muestras. Todas las soluciones y diluyentes fueron esterilizadas por filtración por 0,2 μm , efectuando controles de cada una de ellas por medio de blancos. Las alícuotas de muestras se diluyeron hasta obtener un máximo de 30 bacterias por campo microscópico, coloreadas con naranja de acridina al 0,01% (concentración final) y filtradas por filtros de membrana Nuclepore de 0,2 μm de poro, previamente coloreados con Sudan Black, para obtener un adecuado contraste. Los filtros se montaron, entre porta y cubre, con aceite de inmersión Cargill. Los campos microscópicos para el recuento fueron elegidos al azar, contándose un máximo de 400 bacterias en total. Aquellas bacterias que mostraban una invaginación pero no una clara división entre las células, se sumaron en un mínimo de 10 campos hasta totalizar 40 bacterias. Su porcentaje respecto del total de bacterias, fue utilizado para estimar la frecuencia de células en división. El volumen celular, se estimó midiendo largo y ancho de un mínimo de 100 bacterias por muestra (Rodina, 1972), convirtiéndolo en biomasa multiplicando por el factor $1,21 \times 10^{-13} \text{ grC} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ (Watson, *et al.*, 1977). Para todas estas determinaciones se utilizó un microscopio Zeiss Standard 14 equipado con lámpara halógena de 12 volts, 100 watts y filtros de excitación en azul BP 455, 490; divisor de rayos FT 510 y filtros supresores LP 520 y BG 38.

Para la medición de la producción secundaria bacteriana por el método de incorporación de metil- ^3H -timidina, se obtuvieron muestras de las 10 profundidades consideradas, en recipientes de vidrio de 250 ml, previamente lavados con ácido clorhídrico al 10%, siendo refrigeradas y transportadas al laboratorio. En el mismo se fraccionaron y se inocularon con timidina (80 Ci/mmol), hasta una concentración final de 5 nM. La incubación se realizó en el laboratorio, en un baño con circulación de agua del lago y en la oscuridad. Luego de una hora de incubación, las muestras se fijaron con 0,4 ml de formol neutralizado y filtrado. Los blancos se prepararon agregando el formol inmediatamente después de la inoculación del material radiactivo.

Cada una de las muestras fijadas, se puso en contacto con 10 ml de solución de ácido tricloroacético al 10% enfriado en baño de hielo. Luego de 10-15' a 3-5 °C, se filtró por Millipore de 0,2 μm de poro, enjuagando al finalizar la filtración con 3 porciones de 5 ml de una solución de ácido tricloroacético frío al 5%. El filtro se colocó en un desecador durante 24 hs y posteriormente se puso en contacto durante 30' con acetato de etilo, para provocar su disolución, añadiéndose seguidamente, 10 ml de solución centelleadora con base de tolueno. La actividad se midió en un contador de centelleo líquido Beckman LS-100C, corrigiéndose los conteos por el

método de relación de canales con estándar externo. Para el cálculo final ($\text{mg C} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$), se siguió la metodología empleada por Bell, *et al.* (1983). Para emplearla, es necesario un factor de conversión. Se debe tener en cuenta, que hay dos formas de obtenerlo: a partir de la tasa de crecimiento bacteriano o calcularlo conociendo la tasa de consumo de timidina. En la práctica, se obtienen valores mayores cuando se considera el consumo de material radiactivo, respecto de los valores calculados por el aumento en el número de bacterias. Es por eso que para evitar errores debido a una mala interpretación del factor, lo que motivaría una evaluación desacertada de la producción bacteriana, en este trabajo se hará mención a dicha producción, considerándola como un rango, calculado por dos factores, tratando de este modo de englobar al verdadero resultado producido en el ambiente. Para tal fin, se siguieron los cambios en el número de bacterias, volumen celular promedio y consumo de ^3H -timidina en dos muestras de agua del lago obtenidas a 10 metros de profundidad, en abril de 1987. En ambos experimentos, fueron llenados dos frascos, cada uno conteniendo 500 ml de agua, previamente filtrada por red de plancton de 30 μm de poro. Submuestras de 10 ml, inoculadas con 6,6 nM de metil- ^3H -timidina e incubadas por una hora, fueron obtenidas a distintos tiempos entre 0 y 20 horas. Por otro lado, otras submuestras, también de 10 ml, fueron fijadas inmediatamente con formol (2% concentración final) y destinadas a conteo directo. El factor de conversión, asumiendo una relación lineal entre \ln de N y \ln de V con el tiempo, fue calculado por la fórmula:

$$C = \mu \frac{N(o)}{V(o)}$$

donde N(o) y V(o) son las interceptas en el eje de las y de las rectas de regresión entre del número de bacterias y consumo en el tiempo, siendo μ la pendiente de dichas rectas (Kirchman *et al.*, 1982).

La clorofila fue estimada por la técnica de Lorenzen (1967), mientras que para las mediciones de la producción primaria y carbono orgánico excretado, las muestras, de 0; 1; 2,5; 5; y 7,5 metros, fueron fraccionadas en botellas de 60 ml (dos claras y una oscura), agregándoseles luego 500 μl de una solución de NaHCO_3 de 4 $\mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$. Las incubaciones, de cuatro horas, se efectuaron "in situ", cubriendo todo el período de luz. Posteriormente se fijaron con un mililitro de formol neutralizado. La retención de las algas se efectuó por filtración de todo el volumen a través de filtros de membrana de 0,45 μm de poro. Los filtros se colocaron en desecador y una vez secos se siguió el mismo procedimiento que para aquellos de producción secundaria.

Del agua filtrada en las experiencias anteriores, y para conocer la cantidad de carbono orgánico excretado, se tomaron por triplicado, alícuotas de 3 ml de cada una de las muestras, las que fueron colocadas en viales de centelleo y se acidificaron a pH 1-2 con 75 μl de HCl 1 N, haciéndose burbujear aire para favorecer la eliminación de CO_2 no utilizado. Luego se agregó a cada submuestra, 10 ml de solución Bray, midiéndose la radiactividad en la forma ya detallada precedentemente.

Todas las referencias que se hacen a valores de producción primaria en los párrafos siguientes, incluyen los referidos al carbono orgánico fijado y liberado por las algas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los factores de conversión considerados en el año de muestreo llevado a cabo en el Embalse del Río Tercero, período 87/88, fueron $4,3$ y $5,4 \times 10^9$ células por nanomol de timidina utilizado, sugiriendo que los valores de producción secundaria, sean considerados como implícitos dentro del rango por ellos determinado. Fue así que se observaron máximos de producción primaria en noviembre y enero de cada año en coincidencia con los máximos valores registrado de temperatura. La clorofila no presentó grandes variaciones a lo largo del año, con máximos en febrero de 1987 y enero de 1988 (Fig. 2A); hubo un aumento invernal (junio y julio), en momentos en que la producción primaria registró dos de los tres valores más bajos del año. Uno de los máximos registros de bacterias y su biomasa (Fig. 2B), coincidió con el pico de clorofila de julio, pero fueron también altos los valores correspondientes a enero 87/88 y febrero. La producción bacteriana hasta los 20 metros, presentó los valores más altos en enero 87 y marzo, con un rango entre 1409 y $2457 \text{ mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$, siendo el mínimo en julio, cuyo valor estuvo entre 300 y $380 \text{ mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$, vinculándose estos valores a algunos de los máximos y mínimos de producción primaria, carbono orgánico excretado y temperatura.

Asumiendo que la eficiencia de crecimiento bacteriano es de un 60% (Calow, 1977), las bacterias reciclaron, teniendo en cuenta los dos factores de conversión, entre 1570 y $1316 \text{ mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ en marzo y enero 87 respectivamente en la zona fótica, siendo los valores para toda la columna de agua, en esas mismas fechas, de 4100 y $2950 \text{ mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ (Tabla 1). Tales valores corresponden al 34 y 17% de la producción primaria, considerando solamente la zona iluminada, estando entre el 88 y el 38% la utilización del carbono de origen algal, hasta los 20 metros. (Fig. 3).

Con 13 perfiles a lo largo del año, se pudieron realizar cálculos estimativos de la producción primaria y producción bacteriana de todo este período. En el mismo, la producción primaria fue de $1167,3 \text{ gC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ y la producción bacteriana se estableció entre 114 y $143 \text{ gC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ en la zona fótica y 356 - $433 \text{ gC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$ hasta los 20 metros de profundidad. Si se considera la eficiencia de la utilización de materia orgánica disuelta, en la formación de materia orgánica, particulada, se obtienen valores que variaron entre 189 - 238 y 590 - $721 \text{ gC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{a}^{-1}$, correspondientes a porcentajes del 16 al 20% y 50 al 62% para las dos profundidades citadas, respectivamente, lo cual evidenció que una parte muy importante del carbono fijado por las algas fue canalizado a través de las bacterias. Como dato comparativo, en el trabajo de Riemann (1983: Tabla 3), se presentan los datos de varios ambientes eutróficos, relacionándose en ellos la producción algal y la bacteriana. Estos datos sustentan los hallados en la presente investigación en cuanto a la importancia de las bacterias en el reciclado de la materia orgánica disuelta.

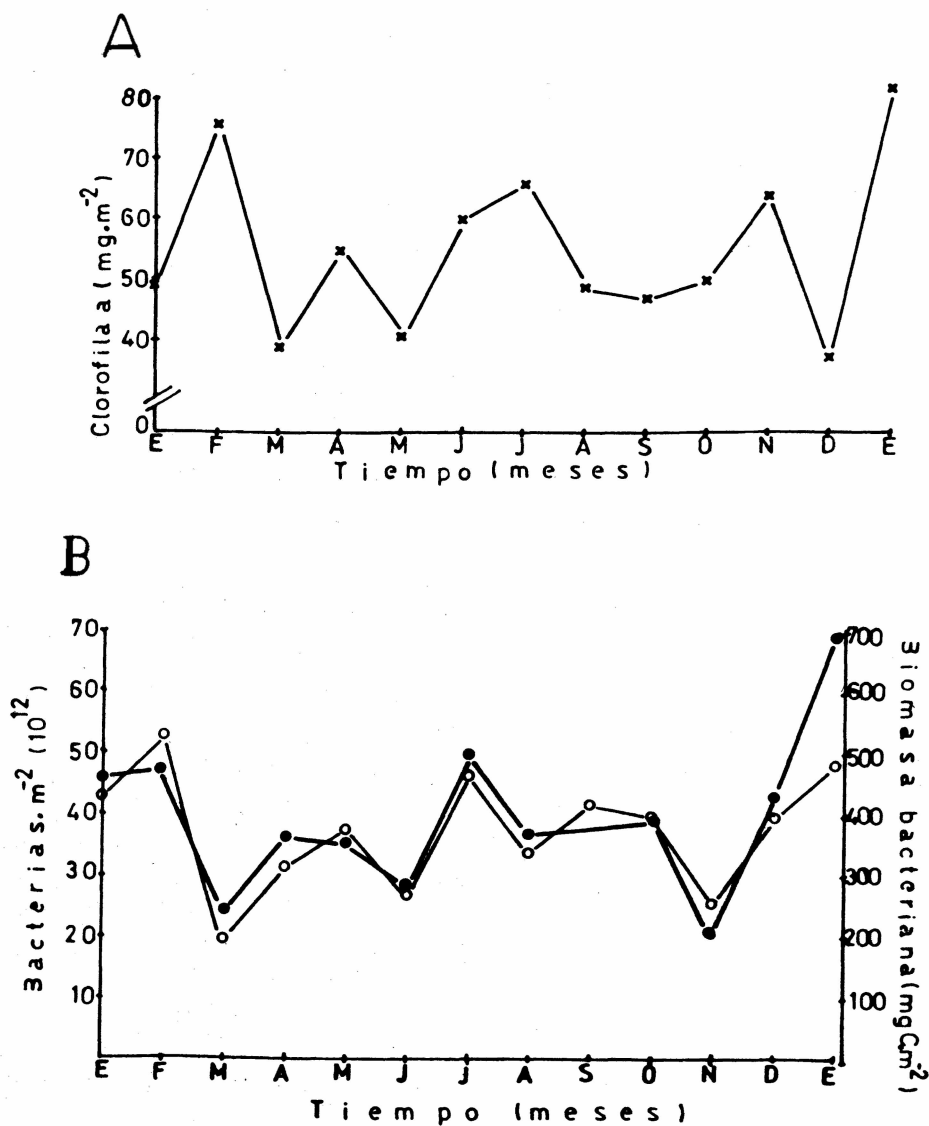


Fig. 2.— Variación estacional de: (A) clorofila y (B) número de bacterias —●— y biomasa bacteriana —○—.

El número de bacterias totales, no presentó grandes variaciones estacionales, con excepción de pequeños picos observados en enero y julio de 1987 y uno algo más marcado en enero de 1988. También pudo observarse, que hubo una disminución en el número de bacterias totales en noviembre, justamente cuando la producción secundaria estaba en franco aumento. Esto pone en evidencia que no todas las bacterias visualizadas son productoras, ya que diferentes porcentajes de ellas, en las

TABLA 1

Valores de temperatura, producción primaria y producción secundaria bacteriana

Fecha	Temp.	A	B	C	D	E
Enero 1987	23,5	4637	630	1409	1050	2348
			790	1769	1316	2948
Febrero	23	3947	348	1126	580	1786
			437	1405	729	2340
Marzo	22	2794	750	1956	1250	3260
			942	2457	1570	4094
Abril	18,9	3472	277	1181	462	1968
			348	1483	580	2472
Mayo	15	1761	202	806	336	1686
			252	1011	421	1343
Junio	12,1	1478	105	416	176	693
			132	522	220	870
Julio	11,6	1347	109	302	182	503
			137	379	228	632
Agosto	10,4	885	95	328	158	547
			119	412	198	687
Setiembre	12,8	1795	165	619	276	1032
			208	778	346	1296
Octubre	16,5	3552	253	688	422	1147
			318	865	530	1440
Noviembre	20,4	5212	173	782	289	1304
			218	983	363	1638
Diciembre	21,1	3606	437	969	728	1616
			549	1217	915	2029
Enero 1988	23,1	4423	244	1073	407	1788
			306	1348	511	2246

A: Producción primaria ($\text{mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$)B: Prod. Bacteriana en la zona fótica ($\text{mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$)C: Prod. Bacteriana de 0 a 20 metros ($\text{mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$)D: Reciclado por las bacterias en zona fótica (60% efic.) ($\text{mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$)E: Reciclado por las bacterias de 0 a 20 metros (60% efic.) ($\text{mgC} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$)

distintas épocas del año, se encontrarían muertas o inactivas, o que aquellas productoras, no pueden ser detectadas, debido a su pequeñez, con un microscopio óptico. Esto motivaría la falta de relación observada entre el número de bacterias totales y lo producido por ellas. Este concepto es sustentado por Krambeck, *et al.* (1981), quienes sugieren que los valores estimados de producción bacteriana pueden incluir cierto error debido al limitado conocimiento del volumen celular promedio de cada muestra. Dichos autores estimaron que la presencia de bacterias de volúmenes

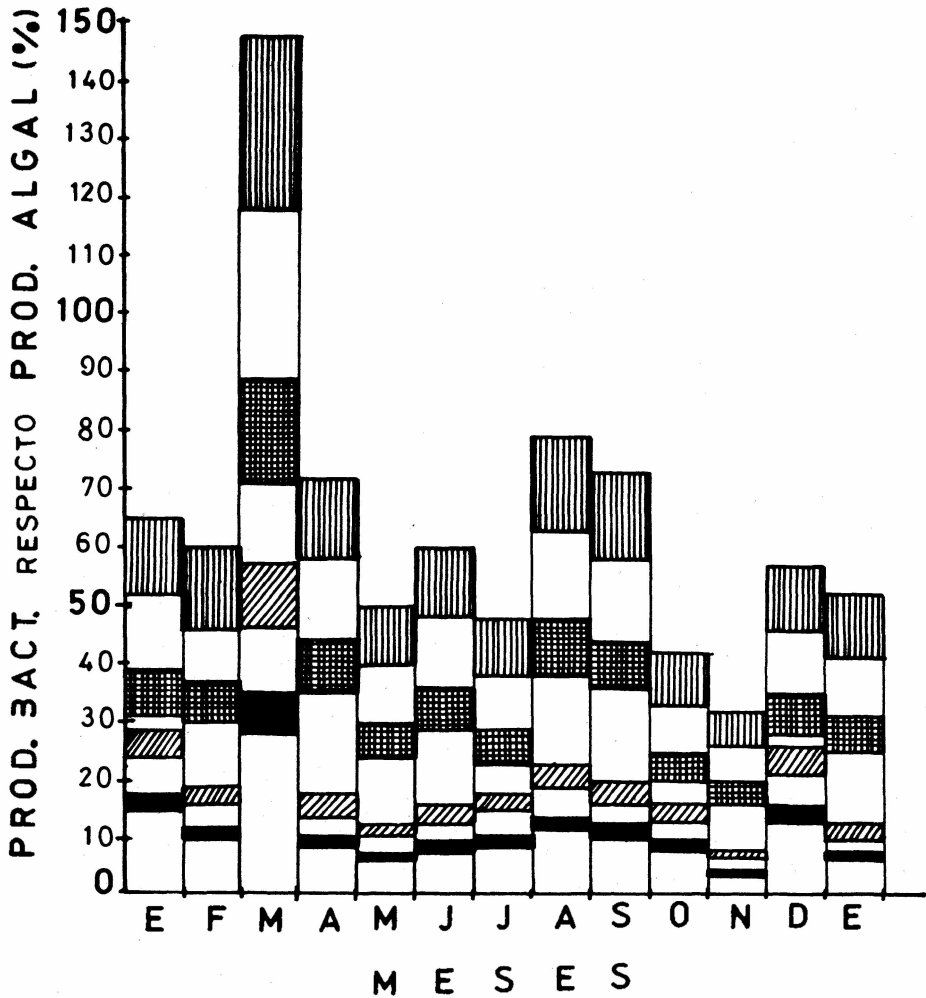
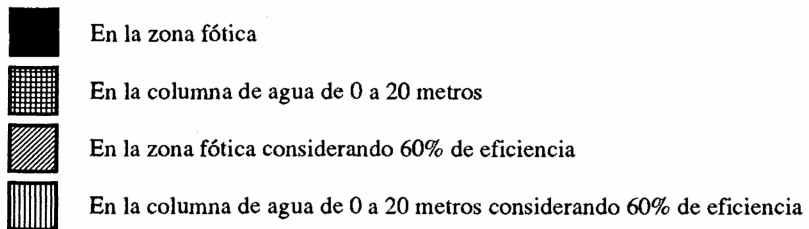


Fig. 3.-- Valores correspondientes a los porcentajes de la producción secundaria bacteriana respecto de la producción primaria.



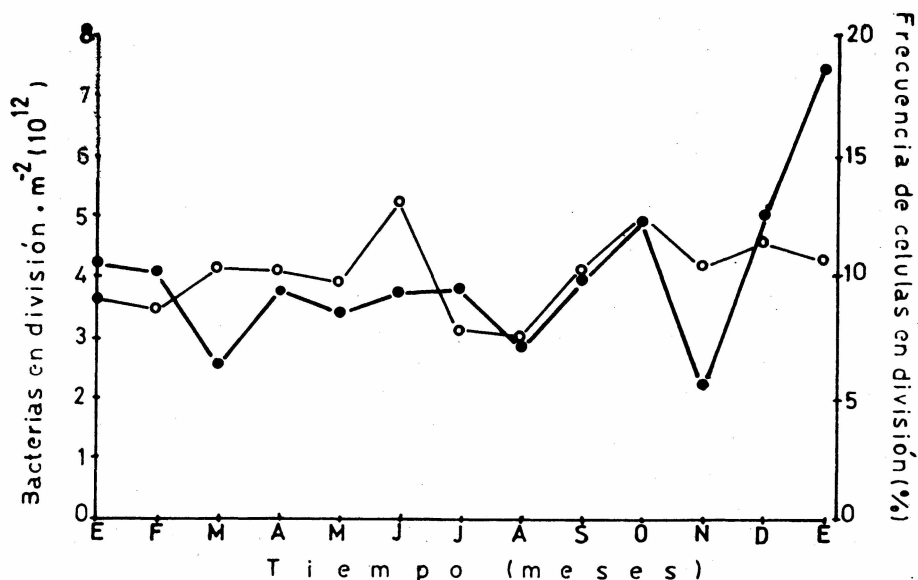


Fig. 4.— Número de bacterias en división (—●) y frecuencia de división celular (porcentaje respecto de las bacterias totales) (---○)

muy pequeños conduciría a una sobreestimación de volúmenes medios celulares medidos por microscopía de epifluorescencia. Por otro lado, Fuhrman (1981), sostiene que las bacterias se colapsan al prepararlas para microscopía electrónica de barrido y consecuentemente la epifluorescencia no brindaría una información tan equivocada como posiblemente sea aquella obtenida por microscopía electrónica. En el presente trabajo no se detectaron apreciable diferencias en el ancho y largo de las células, que puedan dar una variación estacional del volumen medio celular.

Respecto de los porcentajes de bacterias en división, estos fueron poco variables durante el año de estudio, oscilando entre 7,5 y 13%. Esto dió como resultado que el número total de bacterias y por consiguiente la biomasa de las mismas, se correspondieran con los valores de bacterias en división (Fig. 4). Ello indicaría, tal como se dijo en el párrafo anterior, que un gran porcentaje de la producción secundaria es realizado por células no detectables al microscopio óptico, o que aquellas en estado de división pueden ser confundidas con una sola célula de tamaño mayor. Por lo tanto, el número de bacterias totales difiere del de aquellas activas, haciendo de muy difícil utilidad la comparación de los conteos directos con lo producido por ellas.

Los cálculos de la producción bacteriana anual se basan en datos obtenidos en un muestreo al mediodía, para cada mes. Si se asume este valor como representativo del promedio diario de producción bacteriana, se debe considerar que la misma puede aumentar durante la noche y la mañana (Riemann *et al.*, 1984). En el Embalse Ramos Mexía, se pudo comprobar que tal posibilidad era cierta, alcanzando dicha produc-

ción sus registros más altos al atardecer, a la madrugada y antes del amanecer, (Di Siervi, 1989).

La temperatura osciló entre 25 °C en enero y 10,5 °C en agosto y tuvo una clara influencia sobre la tasa de producción bacteriana y también sobre la producción primaria, presentando coeficientes de correlación de 0,84 y 0,91 respectivamente. Los cambios estacionales de la producción secundaria bacteriana siguieron estrechamente el comportamiento de la producción primaria y aquí no puede descartarse la influencia de los productos orgánicos de excreción algal, los que serían rápidamente utilizados por las bacterias, especialmente en la zona fótica, transformando esta materia orgánica disuelta en material particulado (en la forma de biomasa bacteriana), quedando así disponible como fuente alimentaria para otros organismos.

CONCLUSIONES

El cambio anual y paralelo de la tasa de producción bacteriana y el ciclo de crecimiento algal, sugieren que la población bacteriana, depende de la producción primaria como un recurso accesible y continuo de materia orgánica disuelta o de nutrientes inorgánicos o de ambos a la vez. Para la utilización de tales recursos, la célula no sólo debe estar en el sistema sino que debe ser activa. Con los conteos directos, se obtiene nada más que el número de bacterias, pero sin llegar a conocer su estado fisiológico. La no concordancia de un alto número de bacterias en algunos meses en los que la producción fue baja, estaría indicando que no todas las bacterias son activas en el invierno. Con el incremento de la temperatura, aumenta la cantidad de células activas, aunque disminuya el número total. Quizás pueda justificarse de forma semejante la discrepancia observada algunos meses entre producción primaria y clorofila, como puede también conjeturarse que, ante una temperatura adecuada, existe una estrecha relación entre presencia y actividad de bacterias y algas, dando como resultado que a un aumento de la producción primaria le siga un aumento de producción secundaria, asimismo sustentado por el carbono orgánico excretado, que tiene un comportamiento similar al de la producción algal.

Durante el ciclo estudiado, un 40% promedio, del carbono fijado por las algas fue reciclado a través de las bacterias. Considerando que la producción bacteriana puede ser mayor en determinadas horas del día, los valores estimados podrían resultar superiores, incrementando considerablemente el porcentaje calculado.

Considerando lo opuesto del comportamiento entre el número de bacterias y su producción, así como el recuento de células en división, poco efectivo debido al pequeño tamaño de las mismas, se sugiere que la producción medida a través del consumo de timidina, debería compararse con el número de bacterias activas y no con el total de células presentes en la muestra. Teniendo en cuenta las irregulares fluctuaciones también encontradas a lo largo del año en la biomasa algal, y el regular ritmo de la producción primaria, se puede considerar que la temperatura constituiría el factor determinante del ciclo anual de ambas producciones.

REFERENCIAS

- AZAM, F., FENCHEL, T.; GRAY, J. G.; MEYER-REIL, L. A. & THIGSTAD, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- BELL, R. T.; AHLGREN, G. M. y AHLGREN, I. 1983. Estimating bacterioplankton production by measuring (³H)-thymidine incorporation in a eutrophic Swedish lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1709-1721.
- BELL, R. T. & KUPARINEN, J. 1984. Assessing phytoplankton and bacterioplankton production during early spring in Lake Erken, Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1221-1230.
- CALOW, P. 1977. Conversion efficiencies in heterotrophic organism. *Biol. Rev.* 52: 385-409.
- DI SIERVI, M. A. 1989. Producción heterotrófica del bacterioplancton en el Embalse Exequiel Ramos Mexía, Pcia. de Neuquén, con especial referencia a sus relaciones biológicas. trabajo de tesis par a optar al título de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Univ. Nac. de La Plata.
- DUCKLOW, H. W. & KIRCHMAN, D. L. 1983. Bacterial dynamics and distribution during a spring diatom bloom in the Hudson River Plume, USA. *J. Plank. Res.* 5: 333-355.
- FUHRMAN, J. A. 1981. Influence of method on the apparent size distribution of bacterioplankton cells: epifluorescence microscopy compared to scanning electron micrographs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 103-106.
- 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.
- FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120.
- KIRCHMAN, D. H.; DUCKLOW, H. & MITCHELL, R. 1982. Estimates of bacterial growth rates and biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1296-1307.
- KRAMBECK, C.; KRAMBECK, H. J. & OVERBECK, J. 1981. Microcomputer-assisted biomass determination of plankton bacteria on scanning electron micrographs. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 142-149.
- LORENZEN, C. J. 1967. Vertical distribution of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12: 343-346.
- LOVELL, C. R. & KONOPKA, A. 1985. Seasonal bacterial production in a dimictic lake as measured by increases in cell numbers and thymidine incorporation. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 492-500.
- LUCAS, M. I.; NEWELL, R. C. & MELIMIROV, B. 1981. Heterotrophic utilization of mucilage released during fragmentation of kelp (*Ecklonia maxima* and *Laminaria pallida*). II. Differential utilization of dissolved organic components from kelp mucilage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 4: 43-55.
- MARIAZZI, A. A.; ROMERO, C. M.; VILLALOBOS, E.; DISIERVI, M. A. y MARIÑELARENA, A. 1981. Estudio bacteriológico en el Embalse del Río Tercero (Prov. de Córdoba, Argentina). Factores ecológicos y predicciones sobre efectos térmicos. *Limnobiós.* 2: 89-110.
- MORIARTY, D. J. W. & POLLARD, P. C. 1981. DNA synthesis as a measure of bacteria productivity in seagrass sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5: 151-156.
- NAKANISHI, M.; MARIAZZI, A. A.; CONZONNO, V. H.; CLAVERIE, E.; DI SIERVI, M. A. & ROMERO, M. C. 1985. Primary production studies on a Reservoir, Embalse del Río Tercero, Argentina. *Mem. Fac. Sci. Kyoto Univ. Ser. Biol.* 10: 49-62.
- NEWELL, S. Y. & FALLON, R. D. 1982. Bacterial productivity in the water column and sediments of the Georgia (USA) coastal zone: estimates via direct counting and parallel measurement of thymidine incorporation. *Microb. Ecol.* 8: 33-46.
- RIEMANN, B. 1983. Biomass and production of phyto- and bacterioplankton in eutrophic lake Tystrup, Denmark. *Freshwat. Biol.* 13: 358-367.
- RIEMANN, B.; FUHRMAN, J. A. & AZAM, F. 1982. Bacterial secondary production in freshwater measured by ³H-thymidine incorporation method. *Microb. Ecol.* 8: 101-114.

- RIEMANN, B.; NIELSEN, P.; JEPPESEN, M.; MARCUSSEN, B. & FUHRMAN, J. A. 1984. Diel changes in bacterial biomass and growth rates in coastal environments, determined by means of thymidine incorporation into DNA, Frequency of dividing cells (FDC) and microautoradiography. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 17: 227-235.
- RODINA, A. G. 1972. Methods in aquatic microbiology. *Univ. Park Press*. Lancaster, Penna, 461 p.
- 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: 940-946.