

CINETICA DE CONSUMO DE SUSTRATOS ORGANICOS DE BACTERIAS AISLADAS DE LA LAGUNA DE CHASCOMUS

María C. ROMERO y Aldo A. MARIAZZI*

SUMMARY: Kinetic of the uptake of organic substrates of bacteria isolated from Chascomús Pond

Eight bacterial strains were isolated from Chascomús Pond (Buenos Aires Province) and their capacity to growth at low concentrations of glycolate and glucose, as a sole source of organic carbon was evaluated.

Substrate affinities (K_s values) and other kinetic parameters were measured by Wright & Hobbie methodology with ^{14}C -labelled glycollate and ^{14}C -labelled glucose as substrates. Four of the eight pure culture studied followed Michaelis-Menten uptake kinetics giving good straight lines after the Lineweaver-Burke transformation.

V_{\max} values of natural populations and the experimental ones were similar for glycollate; for glucose the experimental values were a little higher. This suggest the possibility of applying the experimental K_s values to natural populations as a way of evaluation of the natural substrate concentration.

INTRODUCCION

La actividad de los microorganismos heterotróficos constituye una función esencial en el balance de materia y energía de los sistemas naturales. El consumo de materia orgánica por las bacterias es uno de los mecanismos básicos a través del cual se reciclan los nutrientes en los ecosistemas.

Mediante el diseño de bioensayos se obtuvo la afinidad por compuestos orgánicos de cepas bacterianas que fueron aisladas de muestras de agua de la Laguna de Chascomús (Provincia de Buenos Aires), evaluándose además la capacidad de las mismas para crecer con esos sustratos orgánicos como única fuente de carbono, a bajas concentraciones, semejantes a las halladas en los ambientes naturales.

La posibilidad de que la concentración experimental de materia orgánica sea de igual orden que la natural, es una de las ventajas indiscutibles de la metodología aplicada (Wright, 1973). Ishida *et al.* (1982) destacaron que las propiedades fisiológicas de las bacterias se ven influenciadas por la concentración de materia orgánica del medio de cultivo. Ellos obtuvieron para una misma cepa, dos y tres valores diferentes de la constante de afinidad (K_s), dependiendo de la concentración de sustrato utilizada y enfatizan la necesidad de usar niveles similares a los hallados en el ambiente natural de cada cepa a experimentar.

Este trabajo tuvo como objetivo demostrar que el consumo de carbono orgánico de la mayoría de las bacterias en ambientes acuáticos naturales y en cultivos *in vitro*

* Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" CC 712 - 1900 La Plata. Contribución N° 486.

| | | | | | | |
|--------|-----------|-------------------|-------|-------|----------------|------|
| ECOSUR | Argentina | ISSN 0325-108X | v. 16 | n. 27 | págs. 31-43 | 1990 |
|--------|-----------|-------------------|-------|-------|----------------|------|

siguen la cinética enzimática de Michaelis-Menten. También se intentó evaluar la magnitud de la constante de transporte activo (K_s) para el glicolato y la glucosa, y la eficiencia de las bacterias para desarrollar con bajas concentraciones de materia orgánica.

MATERIAL Y METODOS

Este estudio se realizó con muestras de agua provenientes de la Laguna de Chascomús (Provincia de Buenos Aires), obtenidas en distintas épocas del año, entre 1988 y 1989.

Las características de las aguas de la laguna se detallan en diversos trabajos (Romero y Mariazzi, 1986; Conzonno y Cirelli, 1985; Dangaus, 1976; Conzonno & Claverie, 1990).

Las muestras de agua se sembraron en Agar-glicolato (Tanaka et al., 1975) por diseminación en superficie y se incubaron a 20°C por 20 días. Luego se seleccionaron colonias con diferentes características morfológicas, las que fueron purificadas por repiques sucesivos. De esta manera se obtuvieron 8 cepas capaces de crecer en presencia de ácido glicólico como única fuente de carbono. Cada uno de los cultivos puros fue repicado en Erlenmeyers con 400 ml de un medio inorgánico conteniendo ácido glicólico como única fuente de carbono y otro con base de glucosa (Tabla 1). Se incubó en estufa a 20°C durante 7 días y luego se procedió a realizar las experiencias de consumo de las bacterias con cada uno de los sustratos, aplicando la técnica de Wright & Hobbie (1966). La concentración inicial de bacterias se determinó mediante la técnica del Número Mas Probable (NMP) y por diluciones sucesivas se obtuvo la numerosidad de las otras dos concentraciones experimentales.

La técnica de los parámetros cinéticos se describe en detalle en Romero & Mariazzi (1986). En el cálculo de las ecuaciones resultantes se trabajó con una probabilidad de error de $P < 0,05$.

La aplicación del método propuesto por Wright & Hobbie (1966) en cultivos puros de bacterias, permite hallar los parámetros cinéticos del consumo, conociendo la concentración de sustrato agregada (A). Mediante la modificación de Lineweaver

TABLA 1

Concentraciones de glucosa y glicolato experimentales

| | μg . glicolato/25 ml | μg gli/l | μg glucosa/25 ml | μg glu/l |
|-------------|---------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| Concentr. 1 | 3 | 120 | 1,0 | 40 |
| 2 | 4 | 160 | 1,8 | 72 |
| 3 | 5 | 200 | 2,6 | 104 |
| 4 | 6 | 240 | 3,4 | 136 |

Burke, del parámetro compuesto ($K_i + S_n$), siendo $S_n = 0$, se obtiene K_i para cada cultivo puro testado. En el caso de la ecuación propuesta por Eadie y Hofstee, la pendiente de la misma, corresponde al valor de la constante de transporte (K_t) (Dowd & Riggs, 1965).

K_i mide la afinidad de cada cepa por el sustrato utilizado, guardando una relación inversa, es decir que cuanto menor es el valor de la constante de transporte, mayor es su afinidad por el compuesto y menor es el tiempo de recambio o tiempo necesario para consumir una determinada cantidad de sustrato. K_i es una constante fisiológica independiente del número de bacterias, concentración de sustrato y de la tasa de espiración o mineralización del mismo. Por ello, en los bioensayos no se evaluó la espiración de $^{14}\text{CO}_2$.

RESULTADOS Y DISCUSION

De las ocho cepas bacterianas que crecieron en agar-glicolato, cuatro de ellas evidenciaron buen desarrollo, dando bioensayos aceptables estadísticamente para glucosa y glicolato al aplicarse la cinética enzimática de Michaelis-Menten (Cepas H, G, A y C). Dos de las cepas tuvieron un comportamiento diferente no siendo su respuesta una hipérbola rectangular propia de una cinética de saturación, sino una respuesta sigmoidea, sin función lineal doble recíproca (cepas B y D). Las dos cepas restantes dieron resultados no asimilables a ninguno de los modelos mencionados, con blancos inusualmente elevados, no pudiendo ser tratadas estadísticamente.

La constante de transporte de la cepa H para el glicolato, fue sensiblemente menor (K_t 0,078 mg gli. l⁻¹) que para la glucosa (K_t 0,105 mg glu. l⁻¹), indicando mayor afinidad por el ácido glicólico, incorporándolo más rápidamente bajo idénticas condiciones. La variación de las constantes obtenidas para cada dilución bacteriana fue de 8,6, 5,1% para las experiencias de glucosa y glicolato respectivamente (Fig. 1).

Las tasas de consumo (V_{\max}) de glucosa (0,0120 mg glu l⁻¹ h⁻¹) fueron el doble de las velocidades para el glicolato (0,0061 mg gli. l⁻¹ h⁻¹) guardando en ambos casos una relación directa con la biomasa bacteriana. Los tiempos de recambio (T_r), por el contrario, tuvieron una relación con la numerosidad de bacterias, y fueron inferiores para la glucosa (8,2 hs) respecto del glicolato (12, 3 hs).

En la tabla 2 se dan las concentraciones bacterianas y los parámetros cinéticos obtenidos en los bioensayos de la cepa G. De los valores de $P < 0,001$ se deduce la bondad del ajuste de los resultados a la modificación de Lineweaver Burke, para las tres diluciones bacterianas y los dos sustratos. V_{\max} y T_r dependieron del número de bacterias presentes, reduciéndose a un medio y un cuarto aproximadamente del valor original de V_{\max} ; o incrementándose proporcionalmente T_r . La velocidad máxima de consumo de glucosa varió entre 0,0216 y 0,0046 mg glu. l⁻¹ h⁻¹, a medida que la biomasa bacteriana disminuyó. El tiempo de recambio, por el contrario, se incrementó en forma inversa, correspondiendo 42 hs para la mayor dilución bacteriana, 20, 3 y 9,7 hs para las diluciones menores. (Fig. 2).

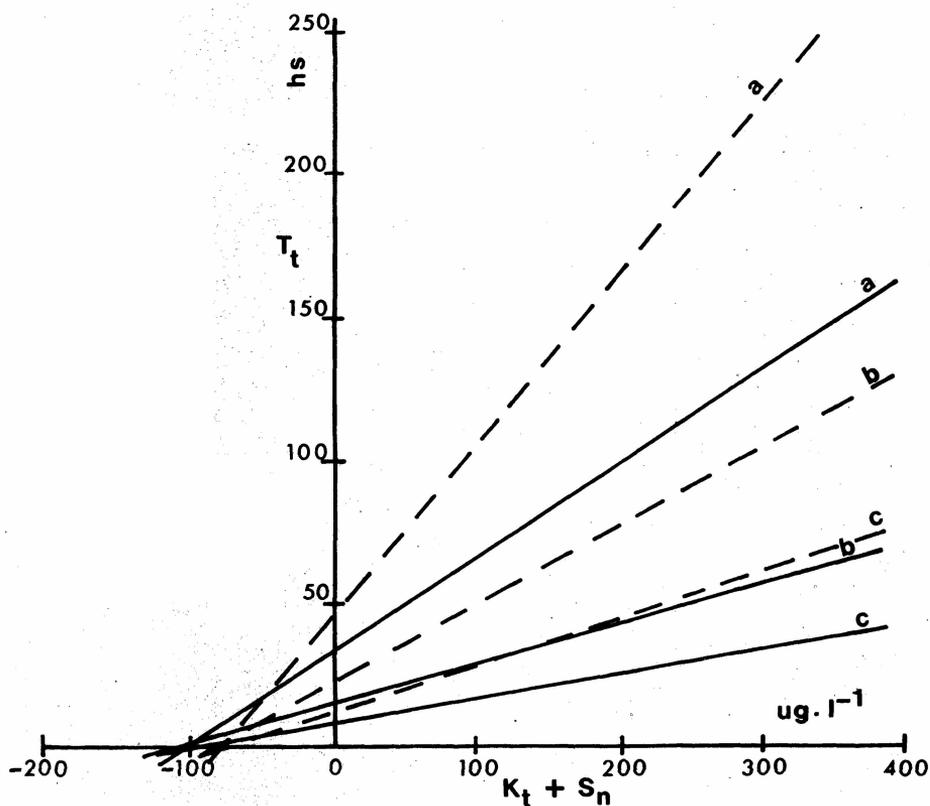


Fig. 1.— Consumo de glucosa (—) y glicolato (---), por la cepa H, con diferentes concentraciones de bacterias (a, b, c; indicadas en la tabla 2).

Los parámetros cinéticos de esta cepa para el glicolato, experimentaron variaciones semejantes, pero con tiempos de recambio cercanos al doble que para glucosa (20,9 y 86,5 hs); y velocidades de consumo menores (0,0142 y 0,0035 mg gli. $l^{-1} h^{-1}$) para la mayor y menor biomasa bacteriana.

La constante de transporte K_t permaneció prácticamente invariable, dando para esta cepa valores de 0,202 y 0,298 mg gli. l^{-1} , con un coeficiente de variación de 4,0 y 2,7 respectivamente.

De los bioensayos con la cepa A se obtuvo un K_t significativamente menor para glucosa (0,021 mg glu. l^{-1}) con respecto al glicolato (0,198 mg gli. l^{-1}), evidenciando mayor capacidad para consumir glucosa que glicolato bajo idénticas condiciones. El valor de K_t se obtuvo con un 9,5 y 3,5% de fluctuación respectivamente. La relación entre la velocidad de consumo y el tiempo de recambio fue inversa, en función de las diferentes diluciones utilizadas. Mientras las tasas disminuyeron en concordancia con las diluciones bacterianas, los tiempos se incrementaron. Los tres parámetros son

TABLA 2

Resultados experimentales

| bact. ml ⁻¹ | K _t (mg · l ⁻¹) | V _{max} (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹) | T _i (hs) | | cepa |
|---------------------------|--|---|---------------------|---|------|
| 15 · 10 ⁴ (c) | 0,098 | 0,0120 | 8,2 | g | H |
| 7,5 · 10 ⁴ (b) | 0,115 | 0,0075 | 15,4 | l | |
| 3,7 · 10 ⁴ (a) | 0,103 | 0,0030 | 30,3 | μ | |
| 15 · 10 ⁴ (c) | 0,075 | 0,0061 | 12,3 | g | |
| 7,5 · 10 ⁴ (b) | 0,083 | 0,0037 | 22,5 | l | |
| 3,7 · 10 ⁴ (a) | 0,078 | 0,0017 | 46,2 | i | |
| 34 · 10 ⁴ (c) | 0,210 | 0,0216 | 9,7 | g | G |
| 17 · 10 ⁴ (b) | 0,202 | 0,0099 | 20,3 | l | |
| 8,5 · 10 ⁴ (a) | 0,195 | 0,0046 | 42,0 | u | |
| 34 · 10 ⁴ (c) | 0,298 | 0,0142 | 20,9 | g | |
| 17 · 10 ⁴ (b) | 0,290 | 0,0068 | 42,7 | l | |
| 8,5 · 10 ⁴ (a) | 0,305 | 0,0035 | 86,5 | i | |
| 22 · 10 ⁴ (c) | 0,023 | 0,0059 | 3,9 | g | A |
| 11 · 10 ⁴ (b) | 0,019 | 0,0022 | 8,5 | l | |
| 5,5 · 10 ⁴ (a) | 0,021 | 0,0012 | 18,5 | u | |
| 22 · 10 ⁴ (c) | 0,192 | 0,0129 | 14,9 | g | |
| 11 · 10 ⁴ (b) | 0,205 | 0,0079 | 25,8 | l | |
| 5,5 · 10 ⁴ (a) | 0,197 | 0,0036 | 54,5 | i | |
| 8,5 · 10 ⁴ (c) | 0,183 | 0,0183 | 10,1 | g | |
| 4,3 · 10 ⁴ (b) | 0,179 | 0,0093 | 19,7 | l | |
| 2,1 · 10 ⁴ (a) | 0,187 | 0,0047 | 39,0 | u | |
| 8,5 · 10 ⁴ (c) | 0,158 | 0,0185 | 8,5 | g | C |
| 4,3 · 10 ⁴ (b) | 0,167 | 0,0092 | 18,9 | l | |
| 2,1 · 10 ⁴ (a) | 0,165 | 0,0044 | 37,5 | i | |

menores para la glucosa, T_i es 34% inferior, V_{max} un 45% y K_t es sólo el 11% del valor del glicolato. (Fig. 3).

Con glucosa como sustrato, la constante de transporte activo para la cepa C fue 0,183 mg glu. l⁻¹ y con ácido glicólico 0,163 mg gli. l⁻¹, algo inferior, siendo el sistema enzimático más eficiente en el consumo de glicolato (Tabla 2, Fig. 4).

Las pendientes resultantes de la aplicación de la ecuación de Wright & Hobbie, para las tres diluciones bacterianas, son muy semejantes, por lo cual sus velocidades

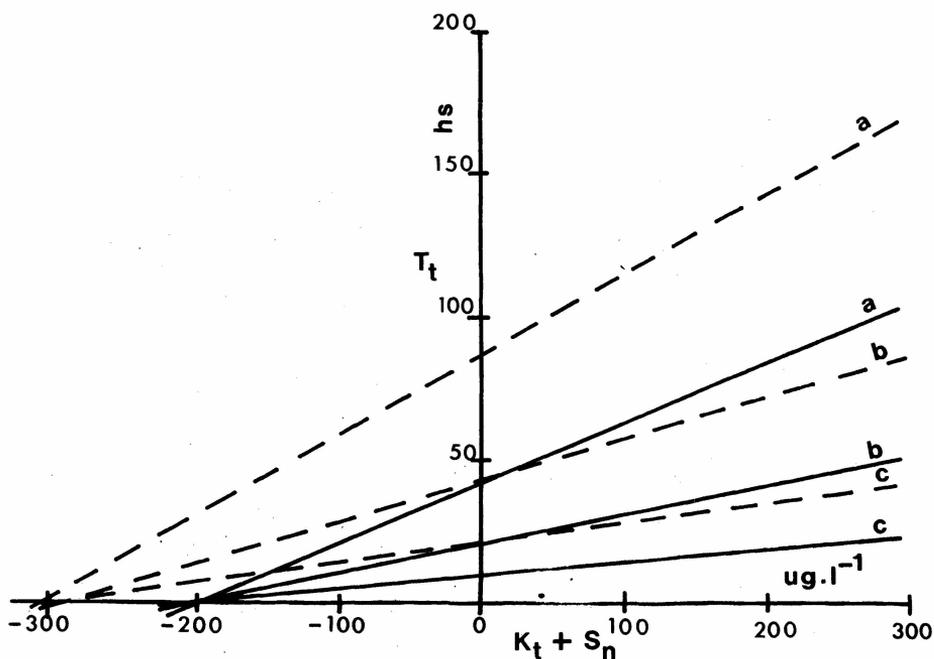


Fig. 2.— Consumo de glucosa (—) y glicolato (---), por la cepa G, con diferentes concentraciones de bacterias.

máximas de consumo son similares ($0,0183 \text{ mg glu. l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $0,0185 \text{ mg gli l}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Una relación igual se obtuvo con el tiempo necesario para consumir ambos sustratos, con tiempos menores (10,1 y 8,5 hs) a mayor biomasa bacteriana y tiempos más prolongados (39,0 y 37,5 hs) con menor numerosidad bacteriana.

En la tabla 3 se dan los resultados de la aplicación de la ecuación de Michaelis Menten:

$$v = \frac{A}{k_t + A} V_{\max} .$$

a las experiencias con la cepa C, y en la figura 5 se grafica dicha respuesta. La gráfica correspondiente a la cepa C es asimilable a una hipérbola rectangular, o sea a la cinética de consumo michaeliana, en la que un incremento del sustrato aumenta la tasa de consumo en las primeras etapas (cinética de primer orden); a medida que se incrementa la concentración de sustrato, el aumento de la tasa es menor, aproximándose a una cinética de orden cero o de saturación. La velocidad real de consumo se aproxima al potencial heterotrófico ($18,5 \text{ mg gli. l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) cuando el sustrato es mayor que el valor de K_i ; por el contrario cuando el compuesto experimentado, en este caso

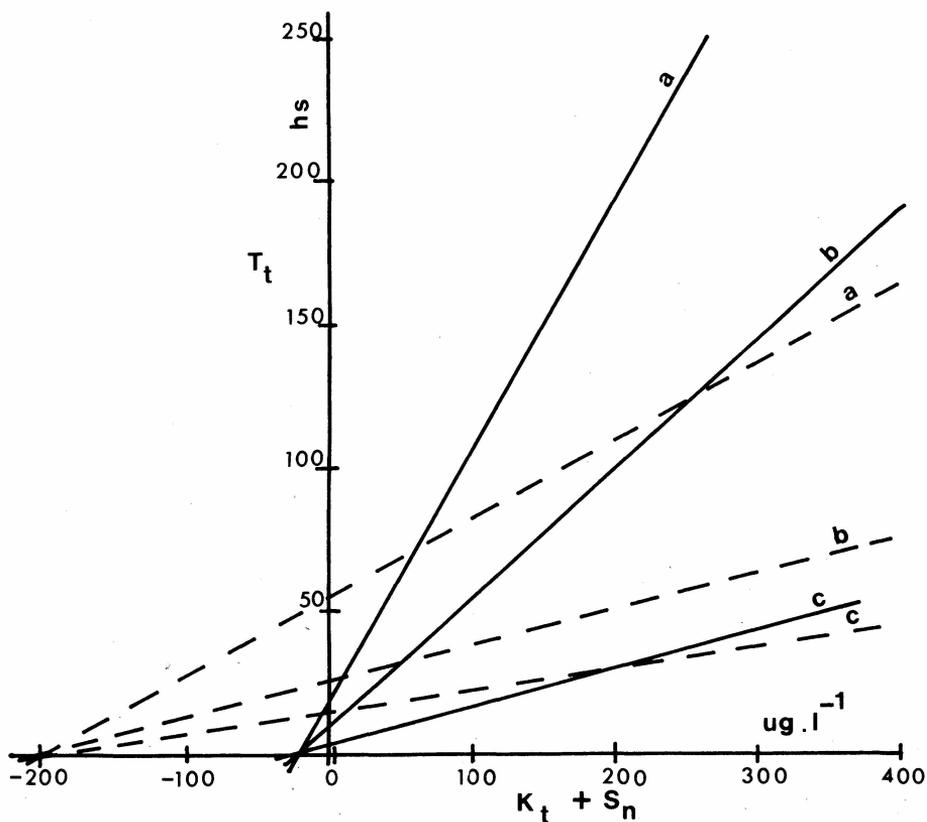


Fig. 3.— Consumo de glucosa (—) y glicolato (---), por la cepa A, con diferentes concentraciones de bacterias.

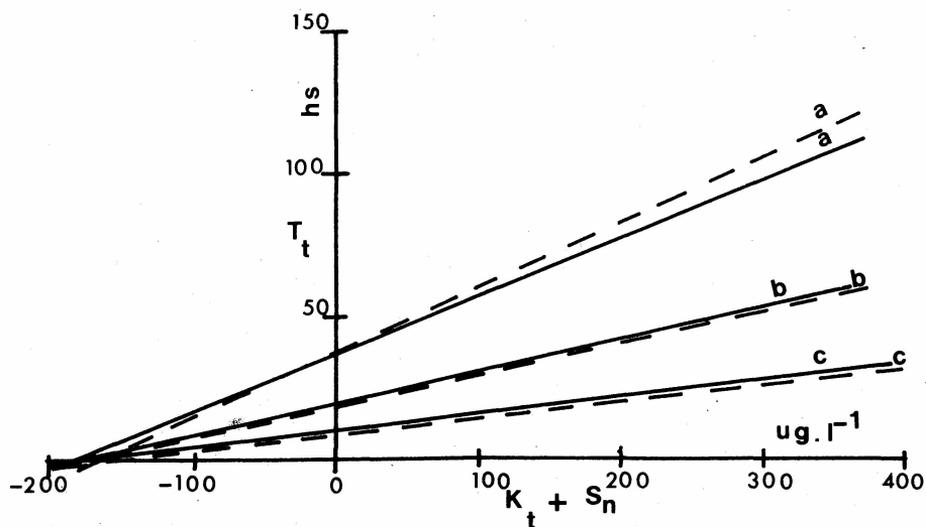


Fig. 4.— Consumo de glucosa (—) y glicolato (---), por la cepa C, con diferentes concentraciones de bacterias.

TABLA 3
Resolución de la ecuación de Michaelis-Menten, a la cepa C (respuesta hiperbólica)

| A µg gli . l ⁻¹ | $\frac{A}{K_t + A}$ µg gli . l ⁻¹ | V _{real} µg gli . l ⁻¹ . h ⁻¹ |
|---|---|---|
| 73 | 0,3093 | 5,72 - 2,85 - 1,40 |
| 125 | 0,4340 | 8,03 - 3,99 - 1,91 |
| 221 | 0,7523 | 13,91 - 6,92 - 3,31 |
| 321 | 0,8359 | 15,07 - 7,49 - 3,58 |
| K _t 163 µg gli . l ⁻¹ | V _{max} | 18,5 - 9,2 - 4,4 µg gli . l ⁻¹ . h ⁻¹ |

el glicolato, está en el nivel inferior a la constante de afinidad de dicha cepa, la velocidad real es proporcional a su concentración. En la figura 5 se destaca la constante de transporte con su desvío, $K_t = 0,163 \pm 0,008$ mg gli . l⁻¹ (variación del 5%). Por definición, K_t es la concentración a la cual la velocidad de asimilación de un sustrato es la mitad de su velocidad máxima teórica, o según la terminología propuesta por Wright & Hobbie (1966), de su potencial heterotrófico. La tasa máxima fue de 18,5 µg gli l⁻¹ h⁻¹ y su valor medio de 9,25 µg gli . l⁻¹; gráficamente se obtuvo una velocidad real de 10,4-9,8 µg gli . l⁻¹, o sea muy próximas entre sí.

La aplicación de la ecuación de Michaelis Menten a los resultados de la cepa B (Tabla 4), dieron líneas con formas S o sigmoidal. La constante de afinidad por el glicolato fue $K_t = 0,669 \pm 0,907$ mg gli . l⁻¹, valor muy superior al de las demás cepas ensayadas y con una desviación standard alta, por lo cual su valor medio no es significativo. La teoría supone que K_t no es función de la numerosidad de bacterias, supuesto que en este caso no se cumple, como tampoco el que la tasa de consumo disminuya a medida que la población bacteriana se reduce, guardando V_{max} una relación inversa.

La aplicación de la teoría de la cinética enzimática a una población bacteriana natural, nos lleva a interpretar la respuesta hiperbólica como aquella deriva de la actividad dominante de una sola especie, o en el caso de una comunidad a una respuesta uniforme de las diversas bacterias presentes (Overbeck & Witzel, 1975).

La respuesta sigmoidea, según Vaccaro & Jannasch (1967) representa un consumo multirreaccional por varias especies o un consumo no lineal de una única cepa por interacción de sus subunidades enzimáticas (Koshland *et al.*, 1966), mas que a efectos inusuales ambientales sobre el sustrato (Vaccaro & Jannasch, 1966). Análogamente al criterio enzimático, el consumo del sustrato puede requerir de otros compuestos específicos; Martin & MacLeod (1984) estudiaron el crecimiento bacteriano de cepas aisladas de ambientes naturales observando que algunas de ellas

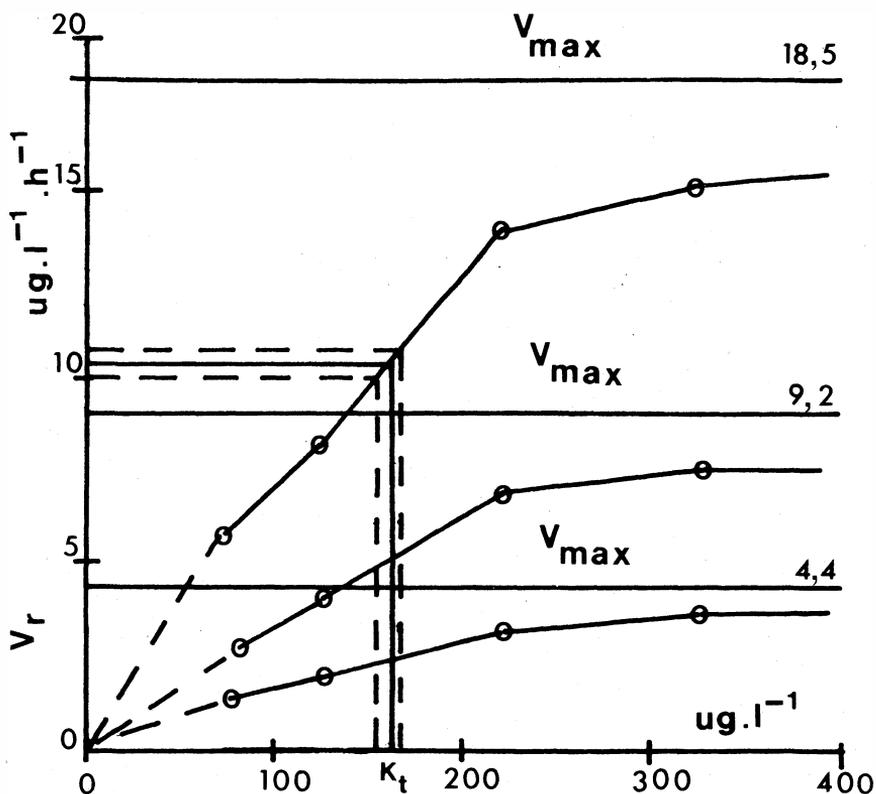


Fig. 5.— Curva de saturación, para el consumo de glicolato, de la cepa C.

TABLA 4
Resolución de la ecuación de Michaelis-Menten, a la cepa B (respuesta sigmoidea)

| A | $\frac{A}{K_t + A}$ | V_{real} |
|---|---------------------------------------|---|
| $\mu\text{g gli} \cdot \text{l}^{-1}$ | $\mu\text{g gli} \cdot \text{l}^{-1}$ | $\mu\text{g gli} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ |
| 73 | 0,0984 | 2,10 - 1,25 - 0,51 |
| 125 | 0,1574 | 2,45 - 2,20 - 1,23 |
| 221 | 0,2483 | 6,70 - 4,30 - 2,62 |
| 321 | 0,3239 | 11,93 - 5,93 - 5,10 |
| K_t 669 $\mu\text{g gli} \cdot \text{l}^{-1}$ | V_{max} | 14,5 - 10,2 - 4,6 $\mu\text{g gli} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ |

no crecían con glicolato como única fuente de carbono, requiriendo otra fuente orgánica para su desarrollo. Esta interpretación o la de Koshland *et al.* (1966) explican la respuesta de las cepas B y D, siendo los resultados de ésta última semejantes a los descriptos para la primera.

La interpretación de K_t y V_{max} en poblaciones heterogéneas naturales no es fácil (Vaccaro & Jannasch, 1967; Hamilton & Preslan, 1970), por el contrario la determinación de los parámetros cinéticos en cultivos puros da resultados de interpretación más real (William, 1973).

Comparando las constantes de transporte para el glicolato de cada una de las cepas estudiadas se observa que, la cepa H mostró mayor afinidad por este sustrato, las otras tres fueron menos eficientes, con valores de K_t mayores, dando en promedio una constante de 0,184 mg gli. l⁻¹ para las cuatro cepas conjuntas. En la tabla 5 se da a su vez, el valor de las constantes en micromoles (μ M) y en unidades de carbono (μ g C l⁻¹). Wright (1970) observó que las bacterias cultivadas en laboratorio exhibían también la misma cinética de transporte que la hallada en muestras de aguas naturales, y obtuvo un K_t de 0,13 mg gli. l⁻¹ trabajando con una cepa aislada de Gravel Pond (Manchester, Mass.), cuerpo de agua ligeramente eutrófico.

Ishida & Kadota (1981) aplicaron la metodología al consumo de ¹⁴C-aminoácidos, ¹⁴C-ácido glicólico y ¹⁴C-glucosa con 18 cepas aisladas del Lago Biwa (Japón). Todas las cepas consumieron glicolato sugiriendo una interacción entre las bacterias y el fitoplancton. El consumo de glucosa resultó significativamente inferior al de glicolato.

Las constantes de transporte para la glucosa fueron levemente superiores (cepas H y C), semejantes a las del glicolato (cepa G) o muy inferiores (cepa A), expresadas en mg l⁻¹. Debe destacarse que las constantes promedio para cada sustrato expresadas en unidades de carbono son 47,2 μ g glu. l⁻¹ y 41,6 μ g C gli. l⁻¹, o sea prácticamente iguales. De esto se desprende que más allá del sustrato utilizado, la afinidad bacteriana por el carbono orgánico posee un valor constante (Tabla 5).

Las constantes de afinidad por la glucosa halladas por otros autores (Tabla 6) tuvieron diferencias significativas, debiendo evaluarse en cada caso el tipo de bacteria utilizada en el bioensayo, las concentraciones de sustrato y las características tróficas del cuerpo de agua del cual fueron aisladas.

Desde el punto de vista del consumo de carbono orgánico, las bacterias oligocarbofilicas poseen valores bajos de K_t y por lo tanto mayor afinidad por los sustratos (Ishida & Kadota, 1981); las bacterias saprofiticas, con K_t mayores, son menos eficientes para consumir los sustratos orgánicos cuando ellos se encuentran en bajas concentraciones. A su vez, las oligocarbofilicas pueden ser obligadas o facultativas, poseyendo estas últimas, más de una cinética de consumo (Ishida *et al.*, 1982; Akagi & Taga, 1980; Akagi *et al.*, 1977); explicando así los rangos de variación de las constantes halladas en los bioensayos por distintos autores. Los mayores valores de la constante de afinidad son los dados por Akagi & Taga (1979), que mediante autoradiografía demostraron que las cepas oligocarbofilicas se diferencian de las saprófitas, no solo en el valor de las constantes sino también en la velocidad con que incorporan y metabolizan los sustratos. Mientras Wright & Hobbie (1965)

TABLA 5

Constantes de transportes, de cada cepa, para la glucosa y el glicolato

| cepa | K_t glicolato | | | K_t glucosa | | |
|------|--------------------------|---------|---------------------------|--------------------------|---------|---------------------------|
| | mg gli . l ⁻¹ | μ M | μ C . l ⁻¹ | mg glu . l ⁻¹ | μ M | μ C . l ⁻¹ |
| A | 0,198 | 2,02 | 48,5 | 0,021 | 0,12 | 8,4 |
| C | 0,163 | 1,66 | 39,8 | 0,183 | 1,02 | 73,2 |
| H | 0,078 | 0,79 | 18,9 | 0,105 | 0,58 | 42,0 |
| G | 0,298 | 3,04 | 81,6 | 0,202 | 1,12 | 80,6 |

TABLA 6

Constantes de transporte halladas en este estudio y por otros autores

| | K_t mg glu . l ⁻¹ | μ M |
|---|-----------------------------------|---------|
| Wright & Hobbie (1965) | 0,007 | 0,04 |
| Overbeck (1975) | 0,328-0,859 | 1,8-4,8 |
| Moaledj (1975); Moaledj & Overbeck (1980) | 0,040 | 0,22 |
| | 0,220 | 1,22 |
| | 0,090 | 0,50 |
| | 0,340 | 1,89 |
| Akagi & Taga (1979) | 2,450 | 13,60 |
| | 0,648 | 3,60 |
| Kooij <i>et al</i> (1982) | 1,441 | 0,80 |
| Ishida <i>et al</i> (1982) | 0,012 | 0,07 |
| Resultados del presente estudio | 0,021 | 0,12 |
| | 0,183 | 1,02 |
| | 0,105 | 0,58 |
| | 0,202 | 1,12 |

dan un valor de afinidad de 0,007 mg glu . l⁻¹ para una cepa aislada del Lago Erken (oligotrófico); Moaledj (1975) y Moaledj & Overbeck (1980) demostraron, con bacterias aisladas de PluBsee (eutrófico), que el rango de afinidad por la glucosa oscilaba entre 0,040 y 0,340 mg glu . l⁻¹, comparándolo con una típica bacteria saprofítica (Overbeck, 1975) con K_t de 8 μ M para una especie y 10 veces menor para otra, utilizando concentraciones experimentales de sustrato de 25 μ g C l⁻¹. A su vez, Ishida *et al.* (1982) compararon la eficacia del crecimiento de bacterias oligocarbófilas con cepas saprofíticas, observando que todas poseían dos o tres

TABLA 7

Parámetros cinéticos (V_{max} , T_p) halladas experimentalmente y su valor promedio con muestras naturales

| cepa | V_{max} , mg . l ⁻¹ . h ⁻¹ | | | | T_p , hs | | | |
|------|--|-----------|---------------|-------|--------------|------|---------------|-----|
| | experimental | | prom. natural | | experimental | | prom. natural | |
| | glucosa | glicolato | glu | gli | glu | gli | glu | gli |
| A | 0,006 | 0,012 | 0,010 | 0,014 | 18,5 | 54,5 | 27 | 69 |
| C | 0,018 | 0,019 | | | 39,0 | 37,5 | | |
| H | 0,012 | 0,006 | | | 33,8 | 46,2 | | |
| G | 0,022 | 0,014 | | | 42,0 | 86,5 | | |

constantes de transporte, dependiendo de la concentración de sustrato experimental. las experiencias del presente estudio se realizaron con un concentración máxima de glucosa de 1,4 μ M, semejante al valor de sustrato más bajo de Ishida *et al* (1982); comparable por lo tanto la afinidad de las cepas ensayadas con la constante obtenida a menor concentración de sustrato.

Por su parte, Overbeck & Witzel (1975) sostienen que las poblaciones naturales se dividen en grupos con mecanismos de transporte marcadamente diferentes para los sustratos, y para cada concentración específica de un compuesto orgánico hay un mecanismo propio que trabaja más eficientemente.

De los resultados expuestos deducimos que, la afinidad de las cepas y consecuentemente sus K_t pueden verse alterados por las concentraciones de sustratos experimentales, por lo cual la directa extrapolación de resultados con altas concentraciones, no es correcta, destacándose la importancia de trabajar con niveles de carbono orgánico cercanos a los del medio en estudio.

Comparando las tasas de consumo máximas (Tabla 7) de ambos sustratos de las cuatro cepas en laboratorio y la tasa de consumo promedio natural, se deduce que la velocidad de asimilación del glicolato en los bioensayos fue similar a la obtenida con muestras naturales. A su vez la velocidad de consumo (V_{max}) de glucosa de las cepas, fue en promedio poco superior a la obtenida con las muestras de la laguna; indicándonos esta comparación, la posibilidad de aplicar el valor K_t experimental a las experiencias con poblaciones naturales, y estimar indirectamente la concentración natural de sustrato.

Respecto al tiempo de recambio (T_p), se observa que para ambos sustratos estuvo en un orden semejante a los promedios de los bioensayos y la muestra natural.

BIBLIOGRAFIA

AKAGI, Y., TAGA, N. & SIMIDU, V. 1977. Isolation and distribution of oligotrophic bacteria. *Can J. Microbiol.* 23: 981-987.

- AKAGI, Y. & TAGA, N. 1980. Uptake of D-glucose and L-proline by oligotrophic and heterotrophic marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 26: 454-459.
- CONZONNO, V. H. & FERNANDEZ CIRELLI, A. 1985. Soluble humic substances from the affluents of Chascomús Pond (Argentina). *Arch. Hydrobiol.* 109: 305-314.
- CONZONNO, V. H. & CLAVERIE, E. F. 1990. Chemical characteristics of the water of Chascomús Pond (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Limnological implications. *Rev. Brasil. Biol.* 50: 15-21.
- DANGAUS, N. V. 1976. Descripción sistemática de los parámetros morfológicos considerados en las lagunas pampásicas. *Limnobiós.* 1: 35-39.
- DOWD, J. E. & RIGGS, D. S. 1965. A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetics constants from various linear transformations. *J. Bio. Chem.* 240: 863-869.
- HAMILTON, R. D. & PRESLAN, J. E. 1970. Observations of heterotrophic activity in the eastern tropical Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 15: 394-401.
- ISHIDA, Y. & KADOTA, H. 1981. Growth patterns and substrate requirements of naturally occurring obligate oligotrophs. *Microb. Ecol.* 7: 123-130.
- ISHIDA, Y., IMAI, I., MIYAGAKI, T. & KADOTA, H. 1982. Growth and uptake kinetics of a facultatively oligotrophic bacterium at low nutrient concentrations. *Microb. Ecol.* 8: 23-32.
- KOOIJ, D., ORANJE, J. P. & HIJNEN, A. M. 1982. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in tap water in relation to utilization of substrates at concentrations of a few micrograms per liter. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:1086-1095.
- HOSHLAND, D. E., NEMETLY, G. & FILMER, D. 1966. Comparison of experimental binding data and the theoretical models in proteins containing subunits. *Biochem.* 5:365-385.
- MARTIN, P. & MAC LEOD, R. A. 1984. Observations on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1017-1022.
- MOALEDJ, K. 1978. Qualitative analysis of an oligocarbophilic microflora in the Pluensee. *Arch. Hydrobiol.* 82:98-113.
- MOALEDJ, K. & OVERBECK, J. 1980. Studies on uptake kinetics of oligocarbophilic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* 89: 303-312.
- OVERBECK, J. 1979. Studies on heterotrophic functions and glucose metabolism of microplankton in Pluensee. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 13:56-57.
- OVERBECK, J. & WITZEL, K. P. 1975. New approaches for measuring microbial activities in the lake ecosystem. *Proc. 1st. Int. Congr. IAMS* 2:222-228.
- ROMERO, M.C. & MARIAZZI, A. A. 1985. Heterotrophic bacterial uptake on glucose and glycollate in an eutrophic pond (Chascomús, Argentina). *Ecosyst. Health* 12/13:111-121.
- TANAKA, A., NAKANISHI, M. & KADOTA, H. 1975. Distribution and activity of glycollate utilizing bacteria in the water column in Lake Biwa. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 41: 251-256.
- VACCARO, R. F. & JANNASCH, H. W. 1966. Studies on heterotrophic activity in seawater based on glucose assimilation. *Limnol. Oceanogr.* 11:596-607.
- VACCARO, R. F. & JANNASCH, H. W. 1967. Variations in uptake kinetics for glucose by natural populations in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 18:159-165.
- WILLIAMS, P. J. 1973. The validity of the application of simple kinetic analysis to heterogeneous microbial populations. *Limnol. Oceanogr.* 18: 159-165.
- WRIGHT, R. T. & HOBBIE, J. E. 1965. The uptake of organic solutes on lake water. *Limnol. Oceanogr.* 10: 22-28.
- WRIGHT, R. T. & HOBBIE, J. E. 1966. Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ecology* 47: 447-464.
- WRIGHT, R. T. 1970. Glycollate acid uptake by planktonic bacteria. En D. W. Hood (ed.) organic matter in natural waters pp. 521-536. *Inst. Mar. Sci. Alaska*.
- WRIGHT, R. T. 1973. Some difficulties in using ¹⁴C-organic solutes to measure heterotrophic bacterial activity. En H.L. Stevenson & R. R. Colwell (eds.) *Belle W. Baruch Library in Marine Science. Vol. 1 Estuarine Microbial Ecology.* Univ. South Carolina Press., Columbia, South Carolina.