

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències



Universitat Autònoma de Barcelona

**CARACTERIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES
ENZIMÁTICAS DE LAS COMUNIDADES
MICROBIANAS EN EL LITORAL DEL LAGO
DE CONSTANZA**

Ma. Montserrat Sala i Farré
1995

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Genètica i Microbiologia
Unitat de Microbiologia

CARACTERIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN EL LITORAL DEL LAGO DE CONSTANZA

Memoria redactada para optar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección
Biológicas de la Universidad Autònoma de Barcelona, por

Ma. Montserrat Sala i Farré

Vº Bº
Director de la tesis

Vº Bº
Director de la tesis

Vº Bº
Tutor de la tesis

Dr. Hans Güde

Dra. Dolors Vaqué Vidal

Dr. Jordi Mas Gordi

Bellaterra, Octubre de 1995

A en Juan

Resumen

Una de las características principales de la zona litoral de los lagos es la mayor concentración de materia orgánica debido a producción autóctona, fitoplancton, fitobentos y macrófitos, y a aportes alóctonos de origen terrestre.

Las bacterias juegan un papel básico en la degradación de esta materia orgánica ya que son los principales organismos capaces de utilizarla, y que al ser convertida en biomasa bacteriana, puede ser integrada de nuevo en la cadena trófica. La mayor parte de la materia orgánica presente en ecosistemas acuáticos se encuentra en forma polimérica y no puede ser absorbida directamente por las bacterias por lo que debe sufrir una hidrólisis enzimática previa. Para este propósito, las bacterias producen ectoenzimas específicos cuya actividad será una indicación de la calidad de los substratos que se encuentran hidrolizando.

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la degradación microbiana de los diferentes substratos que se encuentran en la zona litoral del lago de Constanza (agua y sedimento) y compararla con la degradación en el agua pelágica. Además, para poder interpretar mejor los resultados obtenidos en el campo, se llevaron a cabo varios experimentos en el laboratorio.

La producción de los diferentes ectoenzimas para la degradación de los principales substratos que se encuentran en el lago fue seguida in experimentos de laboratorio al añadir cada una de las fuentes de carbono a muestras de lago. Las fuentes fueron algas verdes (*Scenedesmus*), zooplancton, y detritus de diferentes orígenes: macrófitos, algas verdes, hojas de árbol y quitina.

Las algas vivas enriquecieron el medio con carbohidratos pequeños que fueron liberados por las células, mientras que los crustáceos zooplanctónicos, debido a su depredación sobre las algas, contribuyeron con carbohidratos mayores de origen algal y también quitina de su exoesqueleto.

Las comunidades microbianas (bacterias y protozoos) que crecieron sobre detritus vegetales mostraron una sucesión en su composición, y también una sucesión típica de actividades ectoenzimáticas: primero, sucedió la hidrólisis de

moléculas pequeñas y carbohidratos no estructurales (almidón) y posteriormente aparecieron las actividades de hidrólisis de polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa). El proceso sucedió de manera más rápida en el caso de la degradación de substratos autóctonos (algas y macrófitos) que alóctonos (hojas). La mayor temperatura y la presencia de protozoos hicieron que esta sucesión fuera más rápida.

El bacterioplancton presente en el lago mostró concentraciones similares tanto en el epilímnion de la zona pelágica como en el agua litoral. Sin embargo, las bacterias presentes en este último hábitat presentaron una producción y actividades superiores. Las actividades en el agua litoral se caracterizaron también por presentar un rango más amplio a lo largo del año debido a la frecuente resuspensión del sedimento debido a fuertes vientos. La mezcla de la zona litoral debida al viento asociado a las tormentas ayudó a suavizar la heterogeneidad encontrada en los sedimentos litorales. Las comunidades microbianas presentes en estos sedimentos presentaron tasas de hidrólisis de polisacáridos superiores durante el periodo de senescencia de macrófitos y plantas superiores. Las medias anuales de las actividades ectoenzimáticas fueron entre uno y dos órdenes de magnitud superiores a las encontradas en el agua. Sin embargo, las actividades específicas (actividad por célula) fueron muy inferiores en el sedimento. Las comunidades microbianas en la zona litoral del lago de Constanza presentaron mayores actividades de la hidrólisis de substratos poliméricos debido probablemente al superior aporte de materia orgánica.

Resum

Una de les característiques principals de la zona litoral dels llacs és la seva superior concentració de matèria orgànica degut a la producció autòctona, (fitoplàncton, fitobentos i macròfits) i entrades al·lòctones d'origen terrestre.

Els bacteris juguen un paper bàsic en la degradació d'aquesta matèria orgànica ja que són els principals organismes capaços d'utilitzar-la, i que en ser convertida a biomassa bacteriana, pot ésser novament integrada a la cadena tròfica. La major part de la matèria orgànica present en ecosistemes aquàtics es troba en forma polimèrica i no pot ser absorvida directament per les cèl·lules i per això ha de sofrir una hidròlisi prèvia. Per aquest propòsit, els bacteris produeixen ectoenzims específics i la seva activitat serà una indicació de la qualitat dels substrats que estan hidrolitzant.

El principal objectiu d'aquest estudi va ser avaluar la degradació microbiana dels diferents substrats que es troben en la zona litoral del llac de Constança (aigua i sediment) i comparar-la amb la degradació a l'aigua pelàgica. A més, per a poder interpretar millor els resultats obtinguts en el camp, es van dur a terme diversos experiments al laboratori.

En els experiments de laboratori es va seguir la producció dels diferents ectoenzims utilitzats en la degradació dels principals substrats que es troben al llac. Això es va fer afegint cadascuna de les fonts de carboni a mostres d'aigua del llac. Les fonts van ser algues verdes (*Scenedesmus*), zooplàncton i detritus de diferents orígens: macròfits, algues verdes, fulles d'arbre i quitina.

Les algues vives enriqueixen el medi amb carbohidrats petits que van ser alliberats per les cèl·lules, mentres que els crustacis zooplanctònics, degut a la seva depredació sobre les algues, van contribuir amb carbohidrats més grans d'origen algal i també quitina del seu exoesquelet.

Les comunitats microbianes (bacteris i protozous) que van créixer sobre detritus vegetals mostraren una successió en la seva composició, i també una successió

típica d'activitats ectoenzimàtiques: primer, va succeir la hidròlisi de molècules petites i carbohidrats no estructurals (midó) i posteriorment van aparèixer les activitats d'hidròlisi de polisacàrids estructurals (cel.lulosa i hemicel.lulosa). El procés va evolucionar més ràpidament en el cas de la degradació de substrats autòctons (algues i macròfits) que al.lòctons (fulles). La temperatura més elevada i la presència de protozous van fer que la successió fos més ràpida.

El bacterioplàncton que es troba en el llac presentava concentracions similars tant a l'epilímnion de la zona pelàgica com a l'aigua litoral. Els bacteris presents, però, en aquest darrer hàbitat mostraven una producció i activitats superiors. Les activitats a l'aigua litoral es van caracteritzar també per presentar un rang més ampli al llarg de l'any degut a la freqüent ressuspensió del sediment degut a forts vents. La barreja de la zona litoral deguda al vent associat a les tempestes va ajudar a suavitzar l'heterogenitat que es troba en els sediments litorals. Les comunitats microbianes presents en aquests sediments van presentar taxes d'hidròlisi de polisacàrids superiors durant el període de senescència de macròfits i plantes superiors. Les mitjanes anuals de les activitats ectoenzimàtiques van ser entre un i dos ordres de magnitud superiors a les trobades a l'aigua. Les activitats específiques (activitats per cèl.lula), però, van ser molt inferiors al sediment. Les comunitats a la zona litoral del llac de Constança van presentar activitats d'hidròlisi de substrats polimèrics superior a la de la zona pelàgica degut, probablement, a la superior aportació de matèria orgànica.

Summary

A main characteristic of the littoral zone of lakes is the increased concentration of organic matter due to autochthonous production (phytoplankton, phytobenthos, macrophytes) and allochthonous inputs of terrestrial origin.

Bacteria as the primary users of this organic matter play an important role in its degradation and following conversion into bacterial biomass, the organic matter can be returned to be integrated into the trophic chain. The main part of the organic matter present in aquatic ecosystems is found in a polymeric form which cannot be directly absorbed by the cells without previously undergoing enzymatic hydrolysis. For this purpose, bacteria produce specific ectoenzymes and their activity is an indicator of the quality of the substrates undergoing hydrolyzation.

The main purpose of this study was to evaluate the microbial degradation of the different substrates in the littoral zone of Lake Constance (water and sediment) and to compare them with the degradation in pelagic waters. In order to interpret the field results, several experiments were carried out in the laboratory.

The laboratory experiments followed the production of different ectoenzymes used in the degradation of the main natural substrates found in the lake. This was done by adding each carbon source to lake samples. The sources were living algae (*Scenedesmus*), crustacean zooplankton, and detritus of macrophytes, algae, tree leaves and chitin.

Living algae enriched the medium with small carbohydrates released by the cells, while crustacean zooplankton, due to algal grazing, contributed larger carbohydrates of algal origin, and chitin from their exoskeleton.

Microbial communities (bacteria and protozoa) growing on vegetal detritus exhibited a successional composition and also a typical succession of ectoenzymatic activities. First, there was a hydrolysis of small molecules and non structural carbohydrates (starch) which was followed by the hydrolysis of

structural polysaccharides (cellulose and hemicellulose). This process occurred more rapidly with respect to autochthonous substrates than with faster in the case of the autochthonous substrates (algae and macrophytes) than in allochthonous substrates (leaves). Higher temperatures and the presence of protozoans in the samples caused an increase in the speed of the succession.

Bacterioplankton was present in similar concentrations in both the epilimnion of the pelagic and the littoral waters of the lake. However, the bacteria of the latter exhibited increased activities and production. Bacterial activities in the littoral water also showed a higher range, due to the frequent resuspension of the sediment caused by strong winds. The mixing caused by storms helped to decrease the high heterogeneity found in the littoral sediments. The microbial communities present in these sediments showed higher rates of polysaccharide hydrolysis during the period of senescence of macrophytes and higher plants. The annual mean of ectoenzymatic activities were between one and two orders of magnitude higher than those found in the water, however the specific activities (activity per cell) were much lower in the sediment. The microbial communities living in the littoral zone of Lake Constance showed higher activities of hydrolysis of polymeric substrates, presumably due to the higher input of organic matter in this zone.

Zusammenfassung

Eine der Haupteigenschaften der litoralen Zone von Seen ist die erhöhte Konzentration organischen Materials durch autochthone Produktion (Phytoplankton, Phytobenthos, Makrophyten) und allochthone Einträge terrestrischen Ursprungs.

Bakterien als Hauptnutzer dieser organischen Substanz spielen eine wichtige Rolle beim Abbau dieser organischen Komponenten. Die gebildete bakterielle Biomasse kann in die Nahrungskette eingehen. In limnischen Systemen liegt der überwiegende Teil des organischen Materials in Form von Polymeren vor, die nicht direkt von Organismen aufgenommen werden können, sondern in einem ersten Schritt enzymatisch hydrolysiert werden müssen. Zu diesem Zweck produzieren die Bakterien Ektoenzyme, deren Aktivität ein Indikator für die Substanzen ist, die von ihnen hydrolysiert werden.

Das Ziel dieser Untersuchung war es, den mikrobiellen Abbau verschiedener Substrate in der Litoralzone (Wasser und Sediment) vom Bodensee zu bestimmen und mit dem Abbau im Pelagial zu vergleichen. Um eine breitere Interpretationsgrundlage für die im Freiland erhobenen Daten zu schaffen, wurden verschiedene Laborexperimente durchgeführt.

Die Produktion von Ektoenzymen, die die am häufigsten im See vorkommenden Substrate hydrolysieren, wurde im Labor verfolgt, indem diese Substrate den Seeproben zugesetzt wurden. Die Quellen dieser Substrate waren lebende Algen (*Scenedesmus*), planktische Crustaceen und Detritus unterschiedlichen Ursprungs: Makrophyten, Algen, Blätter von Bäumen und Chitin. Lebende Algen reicherten das Medium mit niedermolekularen Kohlenhydraten durch Exudation an, während das Crustaceen-Zooplankton aufgrund ihrer Grazingaktivität sowohl höhermolekulare Verbindungen aus den Algen freisetzen als auch Chitin aus ihren Exoskeletten.

Auf pflanzlichen Substraten wachsende mikrobielle Gemeinschaften (Bakterien und Protozoen) weisen eine typische Sukzession der Zusammensetzung sowie der Ektoenzymaktivität auf: zuerst erfolgt die Hydrolyse kleiner Moleküle und

Nicht-Struktur-Kohlenhydrate (Stärke).

Später erfolgt die Hydrolyse der Struktur-Polysaccharide (Cellulose und Hemicellulose).

Dieser Prozess war bei autochthonem Material (Algen und Makrophyten) schneller als bei allochthonen Material (Blätter). Höhere Temperaturen und die Anwesenheit von Protozoen beschleunigten die Sukzession.

Das Bakterioplankton wies sowohl im Pelagial als auch im litoralen Wasserkörper ähnliche Konzentrationen auf, wobei die Bakterien im Litoral allerdings eine höhere Aktivität und Produktion aufwiesen. Die Aktivitäten im litoralen Wasserkörper erstreckten sich, durch häufige windinduzierte Sediment-Resuspensionen bedingt, über einen weiten Bereich. Die sturmbedingte Durchmischung bewirkte einen teilweisen Ausgleich der in litoralen Sedimenten vorhandenen beträchtlichen horizontalen Heterogenität. Die mikrobiellen Lebensgemeinschaften in diesen Sedimenten wiesen während der Absterbephase von Makrophyten und höheren Pflanzen höhere Hydrolyseraten für Polysaccharide auf. Im Jahresmittel war die Ektoenzymaktivität ein bis zwei Größenordnungen höher als im Wasser.

Die spezifischen Aktivitäten (Aktivität pro Zelle) hingegen waren im Sediment wesentlich geringer. Die mikrobielle Lebensgemeinschaft des Bodensees wies in der Litoralzone erhöhte Hydrolyseaktivitäten für polymere Substrate auf, was wahrscheinlich auf den erhöhten Eintrag organischen Materials zurückzuführen ist.

Agradecimientos

Un treball d'aquestes característiques només pot dur-se a terme gràcies a la col.laboració de tot un seguit de gent que d'una manera o altra m'han ajudat durant aquest temps, tant a Alemanya com a Catalunya.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Hans Güde la confianza que depositó en mí al permitir que me integrara en su grupo de trabajo durante cuatro años. Él ha estado allí siempre que le necesitaba y ha sido un maestro que ha sabido contagiarme todo el cariño que él siente hacia el lago de Constanza.

La Dra. Dolors Vaqué m'ha ajudat en la darrera part de l'el.laboració de la tesi, al llarg del dur procés de tractament de les dades i de correcció. Sense el seu ajut i consells no hagués estat possible aquest treball... els possibles errors que hi trobeu, però, no són culpa seva!

Ich möchte Dr. Helmut Müller die Bereitstellung der Arbeitsräume am Institut für Seenforschung, Langenargen, Landesamt für Umweltschutz Baden Württemberg, bedanken.

Dr. Hans-Bernd Stich getattete mir die Benutzung des Kulturraumes und stellte mir die Algen und das Zooplankton zu Verfügung mit denen ich meine Bakterien "fütterte".

Mit Cordula Wuhrer habe ich nicht nur das Büro geteilt, sondern (trotz meines schlechten Deutschen) auch viele Gespräche über Wissenschaft und Leben geführt.

Ich möchte mich ganz herzlich für die Hilfe von Barbara Haibel, Joe Luppberger und besonders Judith Meichle bedanken, die immer eine große Hilfe im Labor war und die Bakterienzählungen sowie die Produktionsmessungen des Freiwassers durchführte.

Die Makrophyten wurden von Rudi Walser gesammelt. Die Untersuchung über den Einfluß der Temperatur auf den Abbau von Detritus ist ein Resultat unserer Zusammenarbeit.

Mit Dr. Anette Schweizer, Petra Teiber, Michael Weyhmüller und Georg Sauter teilte ich meine arbeitstechnischen Probleme, die sich bei der Arbeit in einem so schwierigen Untersuchungsobjekt wie dem Sediment ergeben. Es war schon eine Art Herausforderung für uns, oder?

Oliver Pfelz kam aus Berlin, um mir bei den Agarplatten zu helfen. Vielen Dank!

Danke auch an Petra Teiber, Michael Weyhmüller, Helga Bentele, Susanne Meyer, Joe Luppberger und Julius Pietruske, die bei jedem Wetter die Proben genommen haben. Ich weiß diese Hilfe, besonders in Anbetracht der kalten Wintertage, sehr zu schätzen.

Although I just shared some months in the lab with Thomas Gries, he's been always there whenever I needed his help... even now with the German translations!.

Bei Maria Zdansevicius möchte ich mich ganz herzlich für die wunderbare Freundschaft in den vier Jahren in Deutschland bedanken und dafür daß sie mich immer wie ein Familienmitglied behandelt hat. Für all das, was sie für mich getan hat, kann ich mich nicht genug bedanken.

El financiamet del treball es va fer mitjancant una beca FPI de posgrau per a l'estranger del Ministeri d'Educació i Ciència. Els darrers mesos he gaudit d'una

beca de la Fundació: "Família Sala Farré". A tots dos els estic molt agraïda.

Finalment, vull agrair als companys de l'Institut de Ciències del Mar el seu recolzament durant la darrera fase de la tesi. Ells m'han ajudat a fer més lleuger tot el procés d'escriptura entre berenar i berenar, i han suportat estoicament tots els meus dubtes, principalment de llenguatge. Especialment voldria agrair a en Pep Gasol els seus comentaris i suggeriments, que han contribuït a millorar el treball. La Heather Blough, la Magda Vila i la Cova Orejas m'han donat un cop de mà amb les traduccions.

I molt especialment m'agradaria agrair als amics i a la família, especialment als pares i la Carmina, els ànims que m'han donat en tot moment durant aquest temps, amb un record molt especial per a la tieta Roser.

Juan ha hecho que este trabajo tenga un sentido y que el esfuerzo haya valido la pena.

A tots vosaltres...

moltes gràcies!

¡muchas gracias!

thank you very much!

vielen Dank!

Lista de abreviaturas utilizadas

APAsa: Actividad de fosfatasa alcalina.

CAPM: Compuestos de alto peso molecular.

CBPM: Compuestos de bajo peso molecular.

DOM: Materia orgánica disuelta.

GWW: Gramos de peso húmedo.

POM: Materia orgánica particulada.

RDOM: Materia orgánica disuelta liberada extracelularmente.

SRP: Fósforo soluble reactivo.

UFC: Unidad formadora de colonias.

Lista de equivalencias al inglés

Muchos términos científicos suelen ser utilizados en inglés en trabajos escritos en otras lenguas. A lo largo de este estudio se ha intentado traducir o utilizar equivalentes de estos términos en castellano. Estas palabras pueden parecer desconocidas por lo que se incluye un listado de sus equivalencias inglesas de uso más común.

Alimentación ineficiente: Sloppy feeding.

Agotamiento: Depletion

Depredación: Grazing.

Excrementos: Fecal pellets.

Fase del agua transparente: Clear-water phase.

Lixiviación: Leaching.

Proliferación algal: Algal bloom.

Cilindro de metacrilato: Core.

Índice

Resumen	I
Agradecimientos	XI
Abreviaturas y equivalencias utilizadas	XIII
Índice	XV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. Descripción del material y métodos utilizados.	9
CAPÍTULO 2. Comunidades microbianas y actividades ectoenzimáticas involucradas en la degradación de detritus.	51
CAPÍTULO 3. Factores que afectan la degradación de detritus: temperatura y depredación bacteriana por protozoos.	81
CAPÍTULO 4. Influencia de algas y protozoos zooplanctónicos sobre las actividades ectoenzimáticas.	109
CAPÍTULO 5. Biomasa y actividad de las comunidades microbianas del agua de la zona litoral.	133
CAPÍTULO 6. Biomasa y actividad de las comunidades bacterianas del sedimento de la zona litoral.	163
CAPÍTULO 7. Caracterización microbiológica de la zona litoral	203
CONCLUSIONES	221
BIBLIOGRAFÍA	227

Zwar weiß ich viel, doch möcht' ich alles wissen.

Goethe

- INTRODUCCIÓN -

Introducción general

Durante las últimas décadas, se ha acentuado el interés sobre el papel de los microheterótrofos en los sistemas acuáticos debido a su papel clave en el reciclado de nutrientes. Las bacterias son los principales organismos capaces de utilizar la materia orgánica para su crecimiento y además, esta materia prodrá ser transferida a niveles tróficos superiores a partir de la depredación (Azam et al. 1983)

Aparte de las condiciones ambientales, tanto el tipo como la concentración de la materia orgánica son los principales factores que influyen en el desarrollo y actividad de las comunidades microbianas heterotróficas.

La materia orgánica que se encuentra en los ecosistemas acuáticos puede estar formada por ácidos orgánicos, aminoácidos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y sustancias húmicas (Münster & Chróst 1990). De esta materia orgánica, sólo una pequeña parte (< 5%) está formada por compuestos de bajo peso molecular (CBPM) y la mayoría está formada por compuestos de elevado peso molecular (CAPM). Las bacterias pueden absorber únicamente los solutos mediante un proceso activo mediante permeasas. Esto significa que tan sólo una pequeña parte de la materia puede ser utilizada por las bacterias, mientras que el resto, formado por CAPM no puede pasar y no puede ser utilizada. Sin embargo, ha sido medida la concentración de CBPM, y ésta es exageradamente baja, en el rango nanomolar y sería limitante para el crecimiento y la producción de las bacterias. Existen, por el contrario, estudios que indican que las bacterias contribuyen de manera significativa a la biomasa del microplancton de ecosistemas acuáticos y que su producción secundaria es similar a la primaria. Existe por ello una contradicción, la que se denomina la paradoja bacteriana: la existencia por un lado de bajas concentraciones de CBPM, y por otro de elevada biomasa y producción bacteriana. Esto indica que las bacterias, aparte de utilizar la CBPM deben ser capaces de utilizar también la CAPM.

Las moléculas de CAPM tienen un tamaño demasiado grande para atravesar la membrana celular y, para poder ser utilizadas, deben sufrir previamente una

transformación en el exterior de la célula, una hidrólisis enzimática.

Los enzimas encargados de romper las moléculas de elevado peso molecular a monómeros en el exterior de la célula se denominan ectoenzimas. Estos ectoenzimas, a veces llamados según los autores enzimas extracelulares o exoenzimas son enzimas que se secretan, cruzan activamente la membrana citoplasmática y se mantienen normalmente adheridos a su productor aunque a veces pueden encontrarse en forma libre (Chróst 1990). Los productores de ectoenzimas son las bacterias, aunque recientemente existen algunos indicios de que algún ectoenzima puede además ser producido en determinados momentos por otros organismos, como pueden ser algas (Francko 1991), protozoos (Vrba et al. 1993, Karner et al 1994) o crustáceos (Vrba & Macháček 1994).

Los ectoenzimas son normalmente enzimas catabólicos inducibles que se sintetizan a un nivel basal en ausencia de sustrato, y están involucrados en la degradación de sustratos poliméricos que no se encuentran siempre disponibles, por lo que los ectoenzimas son sintetizados en presencia del sustrato. La represión de la síntesis tiene lugar por la presencia del producto final de la reacción (Chróst 1991).

La aproximación ectoenzimática se ha mostrado útil para obtener un acercamiento al estudio del flujo de materia orgánica y nutrientes en diferentes ecosistemas: en ríos (Jones & Lock 1989, Marxsen & Witzel 1991, Freeman et al 1990); tanto en el agua de mar (Vives-Regó et al. 1985, Rath et al. 1993) como en sedimentos pelágicos marinos (Meyer-Reil 1981, 1986, 1987, Meyer-Reil & Köster 1992). Aparte de estos ecosistemas, también ha sido estudiada la actividad de algunos ectoenzimas de poblaciones que crecen en el suelo de bosques (Wirth & Wolf 1992), epifíticas (Goulder 1990, Chappel & Goulder 1994), sobre detritos (Sinsabaugh et al. 1981, Tanaka 1993, Kok et al. 1994) o sobre madera sumergida (Scholz & Boon 1993).

En lagos han sido realizados un número considerable de estudios de la actividad ectoenzimática tanto en el agua pelágica (Somville 1984, Chróst et al. 1986, Hoppe et al. 1986, Chróst & Krambeck 1986, Chróst & Overbeck 1987, Pick 1987, Chróst et al. 1989, Münster et al. 1989, Chróst & Overbeck 1990, Münster

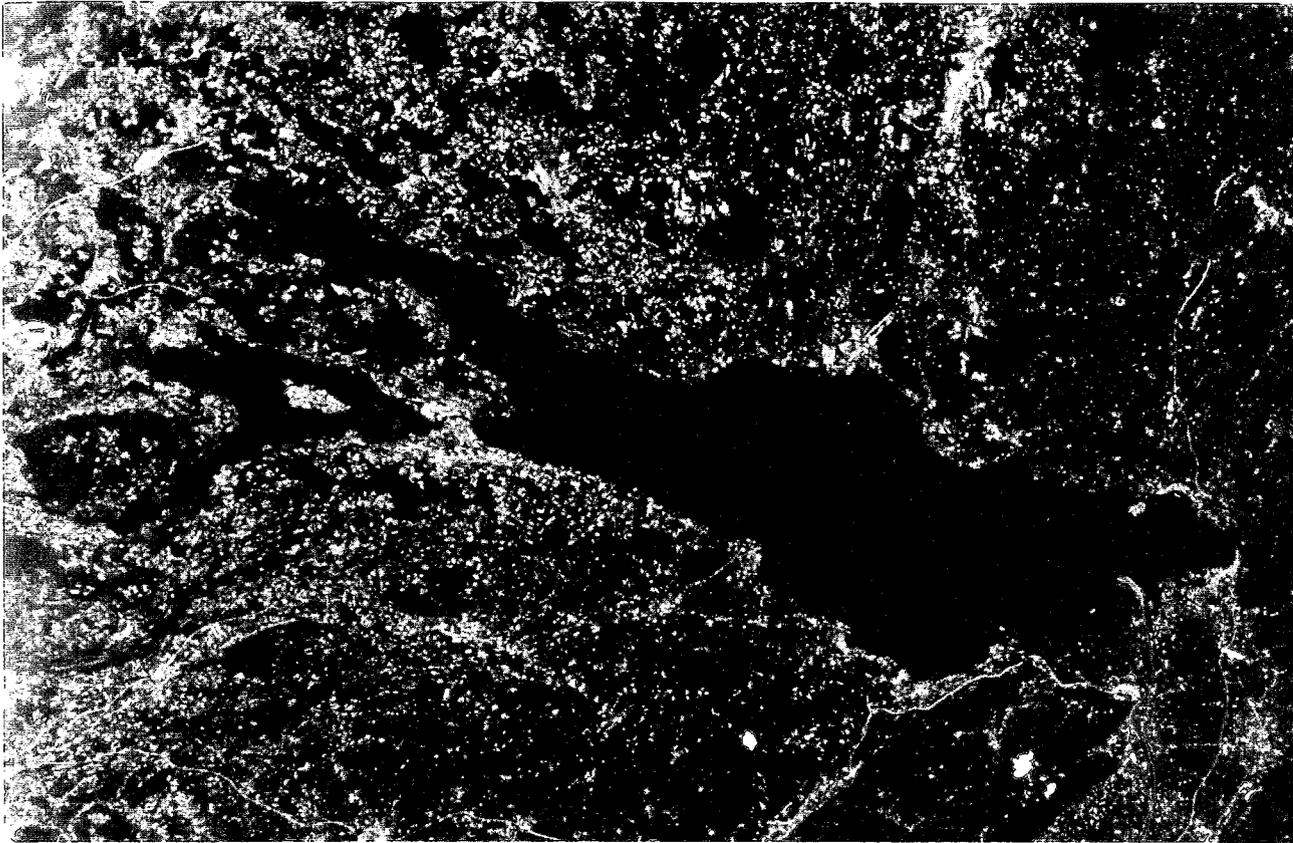


Fig. 1. Fotografía de satélite del lago de Constanza.

et al. 1991, Chróst 1992, Münster 1992, Münster et al. 1992, Vrba 1992, Vrba et al. 1992) como en el sedimento (Hoppe 1983, Hoppe et al. 1986).

A pesar del elevado número de ecosistemas investigados, la zona litoral de los lagos no ha sido, hasta el momento, objeto de un estudio exhaustivo en cuanto a la degradación de la materia orgánica. Las condiciones ambientales de la zona litoral son marcadamente diferentes a las de la zona pelágica, debido principalmente a la acción de las olas, y a la baja profundidad. A diferencia de la zona pelágica, donde la materia orgánica está principalmente producida por el fitoplancton, la zona litoral puede disponer de fuentes de materia orgánica adicionales. Éstas son tanto la producción primaria de macrófitos y epífitos, que es la materia orgánica autóctona, como los aportes de materia alóctona de la orilla del lago y de los ríos que desembocan en él. Ya que la materia orgánica

presente en la zona litoral y pelágica tiene un origen y composición química distinta (Münster & Chróst 1990), en este estudio se ha asumido que la magnitud de las tasas de transformación de la materia orgánica y su utilización microbiana sería distinta en las dos zonas.

El ecosistema objeto de estudio fue el lago de Constanza, del que se conoce bien su hidrografía, química y biología desde hace décadas. Los estudios microbiológicos empezaron a partir de los años 80, y pese a la gran información que se dispone acerca de las comunidades microbianas, los aspectos estudiados no hacen referencia a la importancia que tienen las bacterias en la degradación de substratos orgánicos. Estos procesos tendrán probablemente una mayor importancia en la zona litoral debido a los mayores aportes de materia orgánica. La concesión del proyecto "Estructuras y metabolismo en el litoral del Lago de Constanza", por la Sociedad de Investigación Alemana (DFG), permitió realizar por primera vez un estudio acerca de los procesos metabólicos en el litoral desde el año 1991 hasta el 1994 en el Institut für Seenforschung en Langenargen (Alemania). Entre los aspectos que fueron estudiados en el proyecto, se encuentra la caracterización de la actividad de las comunidades microbianas planctónicas de las zonas pelágica y litoral, así como del sedimento del litoral del lago.

El interés del estudio se centró en conocer las características de las comunidades microbianas, en especial en cuanto a la utilización de los diferentes tipos de materia orgánica que se encuentran en cada período del año. Esta utilización fue determinada de manera indirecta mediante el seguimiento de las actividades ectoenzimáticas responsables de su degradación. Para ello, se investigó previamente cuales eran los ectoenzimas cuya síntesis se ve estimulada en presencia de los tipos de substrato más abundantes que pueden encontrar las bacterias en el litoral.



Fig. 2. Fotografía aérea de la zona del lago Constanza objeto de estudio.

Objetivos

El principal objetivo del trabajo es caracterizar las actividades microbianas en la región litoral del lago Constanza. Para su consecución, sin embargo, han sido propuestos unos objetivos parciales los cuales contribuirán a alcanzar el objetivo final.

1. Adaptar y estandarizar la metodología para la determinación de biomasa y actividad bacteriana, especialmente la de determinación de actividades ectoenzimáticas para ser aplicada tanto en el agua como en sedimentos lacustres.
2. Interpretar los resultados de campo a partir de la detección de manera experimental de los patrones de actividades ectoenzimáticas bajo condiciones ambientales más o menos definidas. A partir de estos experimentos se quiso conocer:
 - a. La calidad de los nutrientes que utilizan las bacterias de los aportes de materia orgánica que ocurren a través de organismos vivos que conviven en el medio con las bacterias, como fitoplancton y zooplancton.
 - b. La producción de actividades ectoenzimáticas para la utilización de los principales tipos de detritus que llegan a la zona litoral: fitoplancton, macrófitos, hojas de plantas superiores y quitina.
 - c. La influencia de la temperatura sobre las actividades ectoenzimáticas para la degradación de detritus.
 - d. La influencia de los depredadores sobre las actividades ectoenzimáticas para la degradación de detritus.
3. Caracterizar la actividad ectoenzimática de las comunidades microbianas en la zona pelágica del lago Constanza durante las distintas fases del ciclo anual que presentan diferentes aportes de nutrientes y características físico-químicas.
4. Caracterizar por primera vez, la abundancia, producción y actividades hidrolíticas de las poblaciones microbianas, tanto del agua como del sedimento, a lo largo de un ciclo anual de la zona litoral del lago Constanza.
5. Determinar las principales características de las poblaciones microbianas de la zona litoral y su importancia para el lago.

Hab' ich doch meine Freude dran!

Goethe

- CAPÍTULO 1 -

Descripción del material y métodos utilizados

1.1. Introducción

El presente estudio tiene como objetivo realizar una caracterización de los parámetros microbiológicos de las poblaciones del litoral del lago Constanza. Para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos, se realizaron varios experimentos en el laboratorio con sistemas más simplificados. Los métodos utilizados tanto en las muestras de campo como en los experimentos se encuentran descritos a continuación. El presente capítulo incluye asimismo una evaluación acerca de la aplicabilidad de los substratos utilizados para la determinación de las actividades ectoenzimáticas.

1.2. Descripción del área de estudio

El lago Constanza es el segundo lago mayor de la Europa prealpina, tanto en área (476 km^2) como en volumen (47 km^3). La profundidad media es de 100 m y la máxima de 252 m. Su costa, de 165 km, limita con tres países: Alemania, Suiza y Austria. El lago se divide en dos partes, el lago inferior y el lago superior (Obersee), siendo en esta última donde se realizó la toma de muestras (Fig 1.1).

En su estado natural era un lago oligotrófico con bajas concentraciones de nutrientes (P total 10 mg m^{-3} , N total 1000 mg m^{-3}), bajas densidades de fitoplancton, alta transparencia del agua y altas concentraciones de oxígeno en el hipolimnion. Algunos de los conocimientos acerca de éste lago han sido resumidos por Geller & Güde (1989). Durante las últimas cuatro décadas, sin embargo, el lago ha sufrido una paulatina eutrofización. En la actualidad, en el área circundante al lago viven 1,5 millones de personas, pero además la existencia de industria y agricultura en su área de influencia hacen que la descarga de agua residual equivalga a la de 3,2 millones de habitantes. Hasta los años 70 la mayor parte del agua entraba en el lago sin ningún tipo de tratamiento, con el consiguiente aporte de fosfato. La respuesta del lago a estos aportes se hizo ya aparente en los 50 cuando fueron detectadas mayores densidades de plancton, cambios en su composición y menor concentración de

oxígeno. Por ello los países limítrofes crearon en 1959 la IGKB (Comisión internacional para la protección del lago de Constanza) cuya principal medida para frenar la eutrofización del lago consistió en el tratamiento de las aguas residuales, incluyendo la precipitación química del P. Los efectos de estas medidas no se hicieron visibles hasta principios de los 80 y se espera que éstas aumenten durante los próximos años. El descenso de la concentración de P no ha repercutido aún en un descenso de la biomasa fitoplanctónica. El inicio del proceso de eutrofización en el lago también se hizo notar en la zona litoral por un cambio en los grupos de algas predominantes y de macrófitos.

La zona litoral en el lago Constanza se define como el área de profundidad inferior a 10 m, y representa para el lago superior aproximadamente el 12 % del área superficial del lago. Esta zona está influenciada por corrientes cuya causa principal es normalmente el viento de oeste pudiendo tener cierta importancia algunos vientos locales como el Föhn. La velocidad de las corrientes varía entre 2 y 10 cm s⁻¹, llegando a aumentar a unos 50 y 60 cm s⁻¹ cuando actúan vientos del sur y oeste respectivamente (Sießegger 1968). Estos vientos son causantes también de la formación de olas en la zona litoral, que crean gran turbulencia y provocan la mezcla de la masa de agua. La acción de las olas puede detectarse hasta profundidades de unos 10 m (Wagner 1968). La turbulencia provoca una disminución de la radiación activa para la fotosíntesis, que se reduce en un factor 1,23 a 2,56 en dependencia de la distancia a la costa. (Oberdorfer 1928). La masa de agua litoral y la pelágica se diferencian también en su temperatura. La zona litoral está en general más caliente a excepción de los meses de Noviembre a Enero, y además, la oscilación de las temperaturas tiene una amplitud muy superior en el agua litoral. La máxima diferencia en la media mensual fue de 4 °C en Marzo de 1961, y las diferencias absolutas variaron entre 2,5 y 8 °C (Mattern 1971).

1.3. Muestreo

Durante 1993 se siguió un ciclo anual en el que se tomaron muestras dos veces al mes en dos estaciones situadas en la parte superior del lago (Fig 1.1). En la

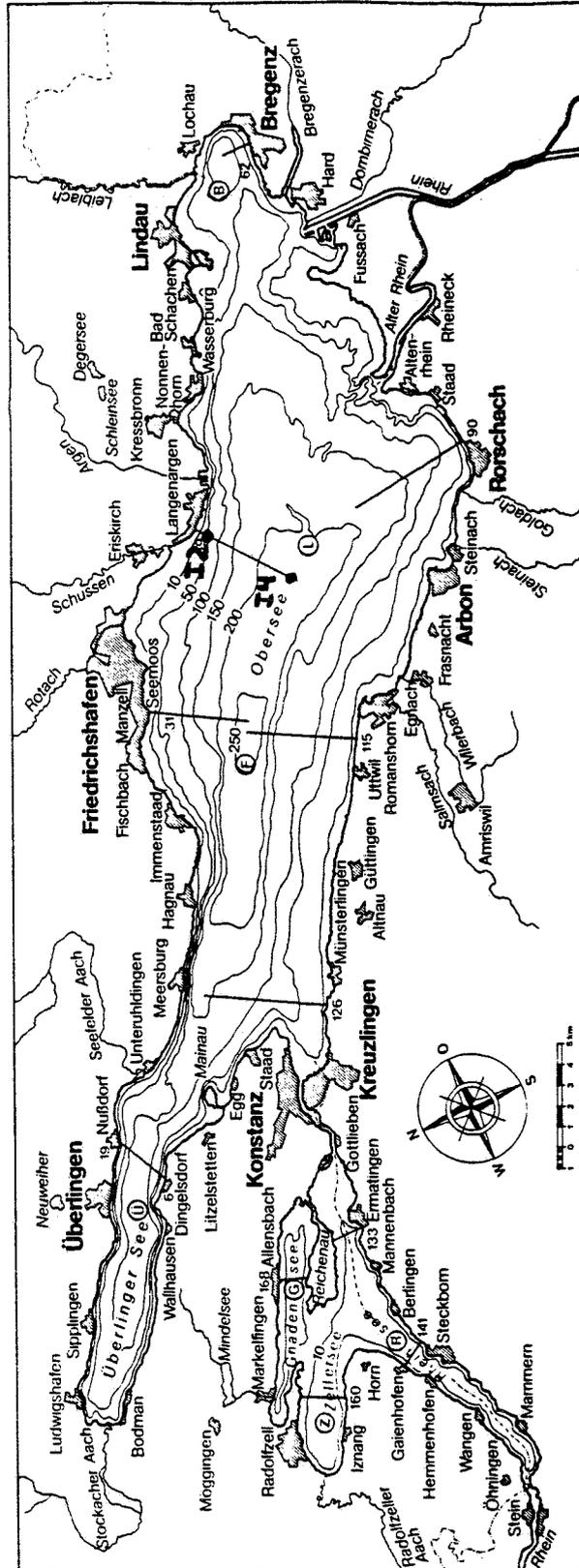


Figura 1.1. Situación de las estaciones de muestreo en el lago Constanza.

primera de ellas, la estación I2, las muestras fueron tomadas tanto de agua como de sedimento, mientras que en la estación I4, sólo de agua.

La estación I2 se encuentra situada a unos 200 m de la costa, en la zona litoral, y su profundidad varía entre 3,5 y 5 m. El sedimento en esta estación es de tipo arenoso, y las muestras fueron tomadas por buceadores mediante tubos de plexiglas de 60 mm de diámetro. Una vez en el laboratorio, se cortó el primer centímetro, que fue el que se utilizó para posteriores análisis. Del agua litoral se tomó una mezcla de los dos primeros metros de la columna de agua. Tanto el sedimento como el agua fueron tratados dentro de un período de 3 h tras su recogida.

La estación I4, elegida como ejemplo de estación en la zona pelágica, está situada a unos 6 km de la costa, entre Langenargen (Alemania) y Arbon (Suiza) y tiene unos 100 m de profundidad de los que fueron muestreados los dos superiores.

Las muestras de agua fueron tomadas con una diferencia máxima de dos días en las dos estaciones, y los de sedimentos en general entre uno y dos días antes de las de agua. El corto espacio de tiempo entre los muestreos permitió la comparación temporal entre los hábitats.

1.4. Características ambientales

Las medidas de temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad del agua fueron realizadas con una multisonda WTW (CB 570) al mismo tiempo que fueron tomadas las muestras.

El contenido de agua del sedimento se determinó por la diferencia de peso entre el sedimento húmedo y el seco, tras secarlo a 100 °C durante 2 h. El contenido de materia orgánica se obtuvo por la calcinación del sedimento seco durante 1 h a 520 °C, al restar el peso del sedimento calcinado del peso del sedimento seco. La concentración de materia orgánica particulada en el agua fue obtenida tras filtrar 100 ml de muestra a través de filtros de fibra de vidrio (GF/F) y seguir con ellos el mismo procedimiento utilizado para el sedimento. El peso del filtro tras la calcinación proporciona la cantidad de materia inorgánica en las

muestras.

La concentración de clorofila *a* fue determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa. Para ello se utilizaron dos eluyentes: una mezcla de acetonitril y agua, y una mezcla de acetona y metanol, siguiendo el método de Mantoura & Llewellyn (1983).

La concentración de carbono y nitrógeno orgánico fueron medidas sólo en las muestras de agua. Para ello, fueron utilizados filtros de fibra de vidrio, que tras pasar por ellos la muestra fueron tratados con vapores de ácido clorhídrico para volatilizar el carbono inorgánico. La concentración de carbono y nitrógeno en los filtros fue medida en un analizador de carbono, hidrógeno y nitrógeno (LECO CHN 800).

La concentración de silicatos disueltos en el agua fue medida, tras la adición de una disolución reductora, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. También fue determinada de manera espectrofotométrica la concentración de fósforo soluble reactivo (SRP), es decir del fósforo inorgánico. Las muestras fueron filtradas a través de filtros de acetato de celulosa, y al filtrado se le añadió ácido ascórbico y reactivo de Vogler (molibdato-ácido sulfhídrico). La absorción de las muestras fue medida a una longitud de onda de 710 nm.

1.5. Recuento de bacterias

1.5.1. Recuento de bacterias en agua

El recuento directo por epifluorescencia es actualmente el método más utilizado para contar las bacterias en sistemas acuáticos. En el presente estudio fue aplicada una modificación del método de Porter & Feig (1980) en la que las muestras de agua fueron fijadas con formaldehído (3 % concentración final v/v) y conservadas en la oscuridad a 4 °C hasta su recuento. Entre 1 y 2 ml de muestra fueron diluidos con agua estéril. Las células fueron teñidas con DAPI (4'6-diamidinofenilindol, Merck), concentración final 0,2 µM. El DAPI es un agente intercalante del DNA ampliamente utilizado para la tinción de

microorganismos en sistemas acuáticos (Porter & Feig 1980). Tras la incubación de las muestras durante 5 min, éstas fueron filtradas a través de filtros Nuclepore de 0,2 μm de diámetro de poro (teñidos previamente con negro de Irgalán) a una presión inferior a -200 mbar. Las células en el filtro fueron contadas mediante un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioskop) con una lámpara de mercurio y un objetivo acoplado (plan-Neofluar 100x/1.30 Oil), siendo el total de aumentos de 1000x. Un mínimo de 200 células fueron contadas por filtro. La concentración de bacterias en la muestra fue calculada dividiendo el número medio de células por campo del microscopio por el volumen de muestra filtrado y multiplicando por el factor de conversión obtenido calculando el número de campos del microscopio por filtro (superficie filtro / superficie campo).

1.5.2. Recuentos de bacterias en sedimento

El recuento de bacterias en el sedimento presenta dificultades adicionales al de muestras acuáticas debido a que muchos de estos microorganismos se encuentran adheridos a partículas. Es necesario por ello añadir modificaciones al método que faciliten la dispersión de las bacterias. La metodología seguida en este trabajo fue la siguiente: el primer centímetro del sedimento fue mezclado y parte de ésta mezcla (3 gramos) fue diluida 1:10 con agua estéril (agua filtrada a través de Nuclepore de 0,2 μm de diámetro de poro). La dilución fue mantenida durante 30 minutos en un agitador magnético, tras los que se dejó reposar 5 minutos para permitir la sedimentación de las partículas de arena de mayor tamaño. El sobrenadante de esta dilución fue utilizado para investigar tanto la concentración de bacterias como las actividades ectoenzimáticas y será denominado como suspensión de sedimento. Una alícuota de esta suspensión fue diluida en agua estéril y fijada con formaldehído (3%) para evitar el crecimiento de las células durante el almacenamiento, que tuvo lugar a 4 °C en la oscuridad, previo a su posterior tratamiento. Uno de los principales problemas en los recuentos de bacterias presentes en sedimento es que éstas suelen encontrarse adheridas a partículas orgánicas o inorgánicas (Velji & Albright 1986). Esta

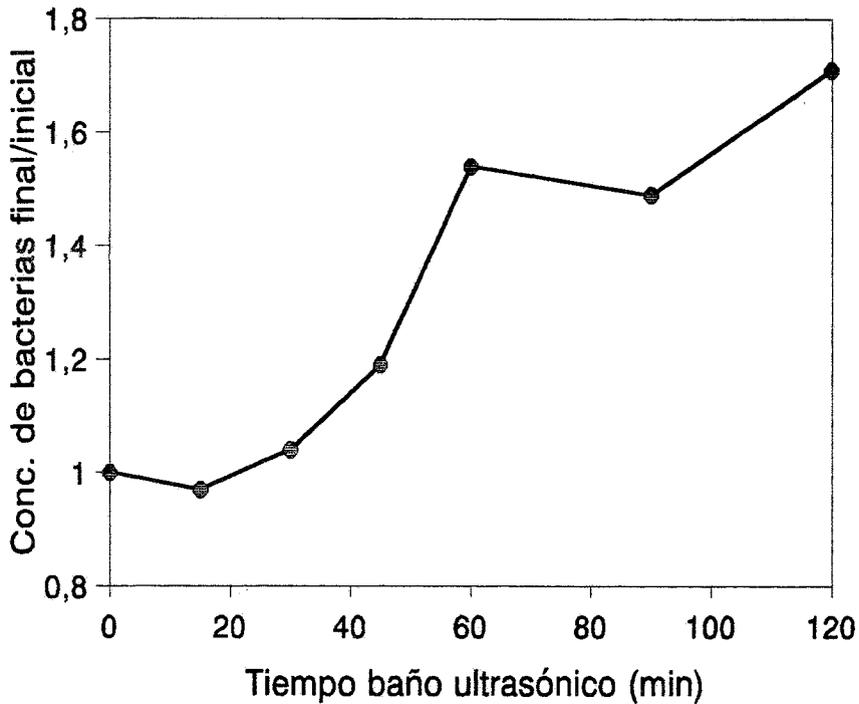


Figura 1.2. Incremento de la concentración de bacterias en el sedimento en dependencia del tiempo de sonicación, en tanto por uno respecto a la concentración a tiempo cero.

adhesión, debida a polímeros extracelulares y/o proteínas, dificulta su recuento ya que las partículas pueden enmascarar las células bacterianas y además puede ser una fuente adicional de error al crearse una mayor heterogeneidad en el filtro. Varios autores han intentado solucionar este problema, mediante el tratamiento de las muestras con ultrasonidos (Duarte et al. 1988). Sin embargo, un tratamiento prolongado puede producir la lisis celular. La dispersión de las células puede ser aumentada mediante la adición de agentes defloculantes, como es el caso del pirofosfato de sodio (Velji & Albright 1986). El tratamiento con este agente (concentración final 0,01 M) seguido de la introducción de las

muestras en un baño sonicador, (Bandelin sonorex-ultraschall TK52 max W/periode=2*160) lleno de hielo, contribuyó a un aumento significativo en los recuentos de bacterias (Fig 1.2). A partir de la curva fue elegido el tiempo de sonicación de 60 min como óptimo ya que es el mínimo tiempo al que se dispersó un máximo de bacterias.

El procedimiento de tinción fue similar al utilizado en el agua, sin embargo fueron necesarias una concentración superior de DAPI (5 μM concentración final) y un mayor tiempo de incubación, de 30 minutos, para una mejor distinción entre las células y las partículas abióticas en el filtro (Schallenberg et al. 1989). La mayor concentración de bacterias presentes en el sedimento en comparación con el agua (unas 1000 veces superior por unidad de volumen) hizo preciso también filtrar un menor volumen de muestra. El número de células contadas por filtro fue de 200, cantidad que no fue posible aumentar ya que el aumento del volumen filtrado repercutía en el aumento de las partículas inorgánicas sobre el filtro, provocando un enmascaramiento de las células bacterianas, y por tanto una infraestima en la concentración. Si bien algunos autores consideran importante realizar correcciones para tener en cuenta la cantidad de bacterias que quedan de esta manera enmascaradas (Schallenberg et al. 1989), los datos presentados en este trabajo no fueron corregidos. Muy probablemente, pues, las abundancias calculadas sean menores de las reales, pero al tratarse siempre de una estación única o de estaciones similares, se supone que el error realizado afectó de manera igual a todas las muestras.

La concentración de bacterias fue calculada tras substrair a la media por campo de las muestras, el número de células por campo de los controles realizados con agua estéril, y teñidos como la suspensión de sedimento.

1.6. Recuentos de protozoos

Los flagelados heterotróficos son los protozoos más abundantes en el lago. Su concentración fue determinada mediante epifluorescencia después del teñido de las muestras con DAPI, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las bacterias. Las muestras de sedimento, sin embargo, no fueron sometidas a

ningún tratamiento químico o ultrasónico ya que éste podría ocasionar un rompimiento de estos organismos, más frágiles que las células procariotas. Los flagelados heterotróficos fueron diferenciados frente a los autotróficos ya que los primeros no poseen clorofila autofluorescencia.

1.7. Producción y actividades bacterianas

La materia orgánica disuelta (DOM) representa el carbono intermedio entre los detritos orgánicos y las bacterias. La dinámica de su utilización será pues una indicación directa de la producción heterotrófica e indirecta de la degradación de detritos. Sin embargo, los compuestos orgánicos disueltos existen en muy bajas concentraciones (unos pocos $\mu\text{g l}^{-1}$), por lo que sus flujos sólo pueden ser seguidos mediante la utilización de marcajes radiactivos.

La actividad de las bacterias fue determinada mediante tres distintas aproximaciones, la medida de la tasa de respiración, de la tasa de incorporación de sustrato y la producción o tasa de síntesis.

1.7.1. Incorporación y respiración de glucosa en agua y sedimento

La técnica básica fue una modificación de la empleada por Meyer-Reil et al. (1978) y consistió en la adición de diferentes concentraciones (de 0,04 a 2,11 nM) de un compuesto marcado radiactivamente, D-(U- ^{14}C) Glucosa ($270 \text{ mCi mmol}^{-1}$) a muestras de agua natural. A partir de la curva de saturación, realizada repetidamente durante los primeros muestreos pudo decidirse tomar como única concentración final 0,14 nM para el resto de los experimentos.

Las muestras fueron cerradas con tapones de goma en los que se había clavado una aguja de la que colgaba un papel de filtro doblado en forma de abanico. La incubación, de 3 h, fue realizada en la oscuridad a temperatura similar a la temperatura de la que provenían las muestras. Transcurrido este tiempo, el papel fue empapado con 500 ml de fenetilamina, para la absorción del CO_2 liberado durante los 30 minutos siguientes a la adición de 400 ml H_2SO_4 2N. La

radioactividad en estos filtros fue una indicación de la glucosa que había sido respirada.

Para estudiar la incorporación de glucosa en las células, las muestras utilizadas para medir la respiración fueron filtradas posteriormente a través de filtros Nucleopore de 0,2 μm de diámetro de poro.

Tanto los filtros usados para la determinación de la incorporación como para la de la respiración fueron transferidos a viales de centelleo con 10 ml de una mezcla de dioxano, etilenglicolmonoetileter y etilenglicol (Zinsser Analytic) y fueron medidos en un contador de centelleo (Packard Tri-Carb 2500 TR).

La actividad y la respiración en las muestras fue calculada substrayéndole la actividad en las muestras fijadas previamente con formaldehído (3 %).

En el caso de los sedimentos, únicamente fue investigada la respiración de glucosa, siendo empleada la misma metodología que se siguió para las muestras líquidas. Una dilución de 1 g del primer centímetro de sedimento en 2 ml de agua estéril, fue incubada durante 3 h en la oscuridad con glucosa radiactiva, siendo la concentración final en la solución de 0,8 nmol l^{-1} .

1.7.2. Producción secundaria

La productividad de las poblaciones fue investigada calculando la incorporación de timidina en las células bacterianas tanto en el agua como en el sedimento. Este método ha sido ampliamente empleado en el lago Constanza (Güde 1988), junto con el de incorporación de aminoácidos (Simon 1984). Existen, sin embargo, varios problemas a la hora de estimar la producción bacteriana, como por ejemplo el grado de incertidumbre en las estimas debido al rango (dos órdenes de magnitud) en que se mueven los factores de conversión de la incorporación de timidina a células producidas (Pollard & Moriarty 1984). Con motivo de evitar la alteración de los resultados originales la producción bacteriana en este trabajo será expresada en moles de timidina incorporados por hora.

1.7.2.1. Producción secundaria en el sedimento

La incorporación de timidina tritiada ha sido considerado un acercamiento válido para la determinación de las bacterias de sedimentos (Moriarty & Pollard 1981, Moriarty 1990). El protocolo utilizado se basa en el método estandarizado por Zlinszky en 1989 para sedimentos del litoral del lago Constanza en su trabajo: "³H-Thymidine incorporation in the littoral of Lake Constance. Calibration experiments" y que fue una modificación del método descrito por Bell & Ahlgren (1987). Éste consistió en la adición de [methyl-³H] timidina de actividad específica 5,0 Ci mmol⁻¹, a submuestras de 0,5 g del centímetro superior de los sedimentos. La timidina radiactiva fue diluida con timidina no radiactiva, variando las concentraciones finales entre 10 y 160 nmol gww⁻¹. La concentración a la cual se obtuvieron los resultados de este estudio es la de 40 nmol gww⁻¹, doble de la de 20 nmol gww⁻¹ sugerida por Zlinszky. Los controles fueron inmediatamente fijados con formaldehído (3 %), en las muestras fue añadido el mismo volumen de agua estéril. Pasada la incubación, de 3 h en la oscuridad a temperatura próxima a la *in situ*, se añadió formaldehído para detener la reacción (agua estéril en los controles). Los tubos fueron centrifugados y la timidina incorporada fue extraída del sedimento mediante la adición de 1,6 ml de NaOH 0,6 N e hirviendo las muestras 30 minutos a 100 °C. Tras la centrifugación a 10000g durante 30 minutos, el pellet se desechó y el sobrenadante fue recuperado para la separación del ADN. Esta separación se llevó a cabo según Bell & Ahlgren (1987). Al extracto obtenido con NaOH se le añadieron 64 µl de HCl y 400 µl de ácido tricloroacético (TCA) 20 %, ambos a 0°C, y fue incubado en hielo durante 20 min. El precipitado fue recuperado como pellet tras la centrifugación (10000 g, 30 min) a 0 °C y lavado con 0.5 ml de TCA (5 %), en hielo, tres veces. El pellet final fue hervido con 2 ml de TCA (5 %) durante una hora para hidrolizar el DNA, y centrifugado (10000 g, 30 min). El sobrenadante fue transferido a viales conteniendo 10 ml de cocktail de centelleo para muestras líquidas (Ready Value, Beckman) y medidos en un contador de centelleo (Packard Tri-Carb 2500 TR).

1.7.2.2. Producción secundaria en el agua

La productividad del bacterioplancton fue investigada mediante la incorporación de timidina según el método calibrado por Zlinski para el bacterioplancton del lago Constanza y descrito previamente por Güde (1988). La metodología consistió en la adición de [methyl-³H] timidina, de actividad específica 82 Ci mmol⁻¹ en una concentración final de 10,5 nM a las muestras del lago. Estas fueron luego incubadas durante 1 h en la oscuridad a temperatura próxima a la in situ, y transcurrido este tiempo, la reacción fue terminada mediante la fijación de las muestras con formaldehído (3 %). Los filtros fueron introducidos en viales de centelleo que contenían 10 ml de cocktail de dioxano, etilenglicolmonoetileter y etilenglicol (Zinsser Analytic) y medidos en un contador de centelleo. La actividad de los filtros fue calculada substrayendo la actividad de los controles, que fueron muestras fijadas previamente a la incubación.

1.8. Actividades ectoenzimáticas

Los enzimas involucrados en la transformación y degradación de substratos poliméricos en el exterior de las células han sido denominados de tres maneras diferentes: ectoenzimas, enzimas extracelulares y exoenzimas, según los autores. La terminología adoptada en este trabajo sigue la propuesta por Chróst (1990). Los ectoenzimas son enzimas que se encuentran unidos a la superficie celular de su productor y que reaccionan sobre substratos poliméricos en el exterior de la célula. Los enzimas extracelulares se encuentran en forma libre y/o adheridos a partículas de detrito, arcilla, etc, pero no a la célula productora. Estos enzimas pueden ser secretados activamente por las células, liberados por lisis celular o por la depredación del zooplancton sobre algas o de protozoos sobre bacterias. A diferencia de los enzimas intracelulares, tanto los ectoenzimas como los enzimas extracelulares actúan en el exterior de la célula. En este trabajo se utilizará el término ectoenzima para describir tanto los enzimas adheridos a la pared celular como a los libres, es decir, cualquier enzima que actúe en el

exterior de la célula.

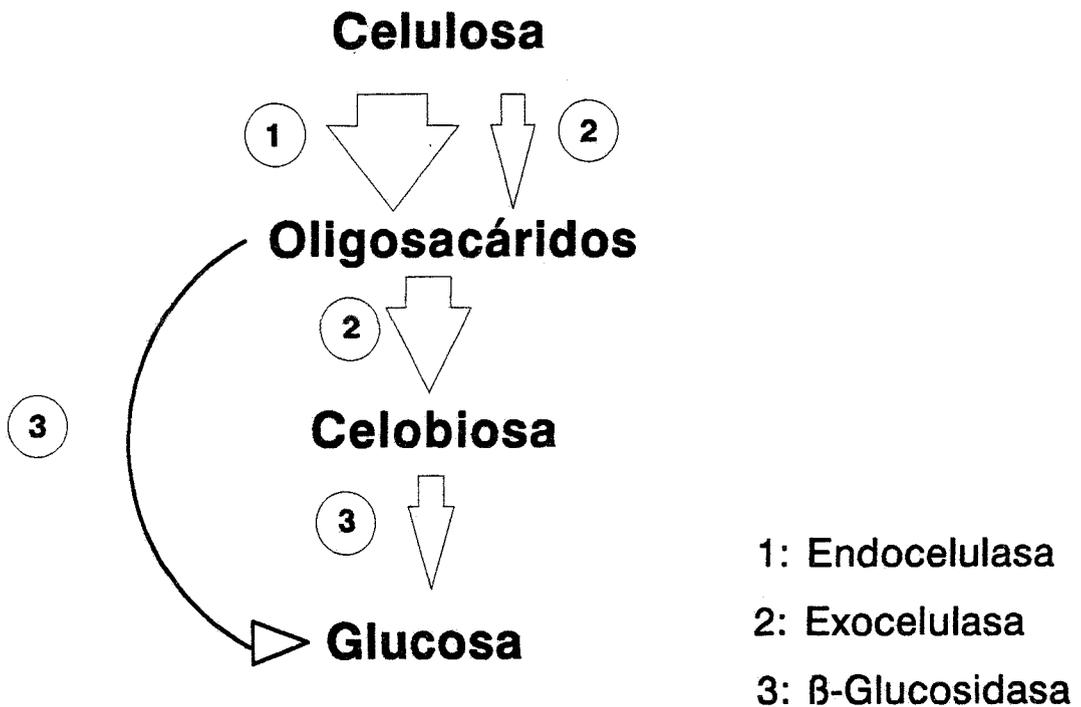


Figura 1.3. Esquema de la degradación de la celulosa y de los enzimas que intervienen en cada uno de los pasos de ésta.

Los enzimas pueden también clasificarse, a parte de según su situación, según los enlaces de la molécula donde ataque. De esta manera, los enzimas que realizan el primer ataque sobre los polisacáridos y que rompen las uniones situadas en el interior de las moléculas y forman fragmentos de tamaño intermedio se denominan endoenzimas. Si, por el contrario éstos atacan la molécula por las uniones situadas en los extremos, éstos se denominan exoenzimas. Chróst (1990) propone los términos endoectoenzima y exoectoenzima para definir los enzimas situados en el exterior de la célula que rompen los enlaces internos o externos de las moléculas de sustrato. En este trabajo, sin embargo, debido a la complejidad de los términos y a que todos los enzimas estudiados son ectoenzimas, se utilizarán los términos endoenzima y exoenzima en lugar de los endoectoenzima y exoectoenzima. Como ejemplo, la figura 1.3 muestra un esquema de la degradación de celulosa y de los

ectoenzimas que actúan en cada paso. En el caso de la degradación de la celulosa, en primer lugar se produce un rompimiento de los enlaces internos de la molécula por una endocelulasa. Una vez las cadenas de celulosa se ven reducidas a oligosacáridos, tiene lugar la actuación de la exocelulasa que ataca los enlaces situados en los extremos de la molécula. El resultado del ataque de la exocelulasa son dímeros, denominados en este caso celobiosa y que finalmente serán reducidos a forma monomérica por la rotura de los enlaces mediante el enzima β -glucosidasa.

Tabla 1.1. Listado de los enzimas investigados, así como de los substratos que hidrolizan y de los substratos utilizados para su estima.

	ECTOENZIMA	SUBSTRATO NATURAL	SUBSTRATO ARTIFICIAL
Endoenzimas	Endoamilasa	Almidón	CM-Almidón-RBB
	Endocelulasa	Celulosa	CM-Celulosa-RBB
	Endoxilanasas	Xilano	CM-Xilano-RBB
	Endoquitinasa	Quitina	CM-Quitina-RBV
Glucosidasas	α -Glucosidasa	Maltosa	4-MUF- α -D-Glucósido
	β -Glucosidasa	Celobiosa	4-MUF- β -D-Glucósido
Exoenzimas	Exocelulasa	Celodextrina	4-MUF- β -D-Celobiopiranosido
	Fosfatasa alcalina	Glucosa-6-P	4-MUF-Fosfato
	Proteasa	Péptidos	4-MUF-p-Guanidinibenzoato

Los métodos que han sido empleados hasta ahora para medir la actividad de ectoenzimas pueden agruparse en tres tipos: espectrofotométricos, fluorométricos y radiactivos. Los métodos espectrofotométricos han sido ampliamente utilizados pero tienen dos principales desventajas, su baja sensibilidad y la necesidad de largas incubaciones, durante las que inevitablemente hay proliferación celular.

Recientemente, se ha extendido el uso de sustratos fluorogénicos (véase Hoppe 1991 para una revisión de ellos), que pueden ser usados en un amplio rango de concentraciones sin pérdida de sensibilidad y precisan cortos tiempos de incubación. La utilización de sustratos radiactivos, a diferencia de las dos anteriores opciones utiliza sustratos sólo ligeramente alterados durante el marcaje, lo que junto a sus cortos tiempos de incubación (minutos) y su gran sensibilidad hacen que sea la metodología más recomendable. Sin embargo, la poca variedad de sustratos radiactivos disponibles comercialmente y su elevado precio hacen que ésta técnica no sea aún muy empleada.

Tabla 1.2. Polisacáridos cuya degradación ha sido investigada, su distribución en la naturaleza y enzimas cuya actividad ha sido investigada.

POLISACÁRIDO	DISTRIBUCIÓN	ENZIMAS
Celulosa	Componente de la pared celular de la célula vegetal.	Endocelulasa Exocelulasa β -Glucosidasa
Almidón	Principal polisacárido de reserva.	Endoamilasa α -Glucosidasa
Xilano	Principal componente de la hemicelulosa. En la pared celular.	Endoxilanasas
Quitina	En hongos, caparazón de zooplancton e insectos.	Endoquitinasa

En este trabajo han sido utilizados dos métodos diferentes, uno fluorimétrico y otro espectrofotométrico. El método fluorimétrico se basa en la utilización de sustratos de metilumbeliferil (MUF) y fue usado para la determinación de las actividades exoenzimáticas. El método espectrofotométrico se utilizó para determinar las actividades endoenzimáticas y para ello se emplearon sustratos de carboximetil. Los ectoenzimas investigados así como su acción y sustratos empleados para su detección se encuentran listados en la tabla 1.1.

La mayor parte de la materia orgánica particulada es de tipo proteico, 20-50 %, y de tipo carbohidrato, 25-40 % (Shailaja & Pant 1986). Por ello fueron determinadas en este trabajo la actividad proteolítica, y siete actividades ectoenzimáticas involucradas en la degradación de carbohidratos. Los polisacáridos cuya degradación fue estudiada, así como su distribución en la naturaleza y los enzimas estudiados se encuentran listados en la tabla 1.2. Además fue estudiada la actividad de fosfatasa alcalina (APA), ya que muchas algas y bacterias responden a la limitación de fósforo produciendo este enzima que les permita degradar substratos fosfomonoéster.

Las medidas de actividades ectoenzimáticas constituyen, para ambos métodos, medidas potenciales ya que fueron realizadas en condiciones óptimas, a temperaturas superiores a las *in situ*. Para acercarnos a la actividad real en el campo, se transformaron los datos a la temperatura *in situ* mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\text{Act. (temp. } in\ situ) = \text{Act. (temp. incub.)} * e^{(A/R)(1/T1-1/T2)}$$

donde T1 y T2 son las temperaturas de incubación e *in situ* en grados Kelvin y R= 8,3454 J mol⁻¹ °K⁻¹. El valor para la energía de activación de Arrhenius fue tomado de López (1993) y éste fue de 61615 J mol⁻¹.

1.8.1. Actividades exoenzimáticas

Uno de los métodos más utilizados para la medida de las actividades es el que consiste en la adición de substratos de metilumbeliferil. Este método se basa en el incremento de la fluorescencia en las muestras a medida que los substratos son hidrolizados, lo que conlleva la producción de la molécula fluorescente 4-metilumbeliferona (Fig. 1.4). La cantidad de substrato hidrolizado será equivalente al incremento de unidades de fluorescencia en las muestras. Este incremento puede ser transformado en actividad enzimática gracias a la recta estándar preparada con 4-metilumbeliferona, el producto final de las reacciones.

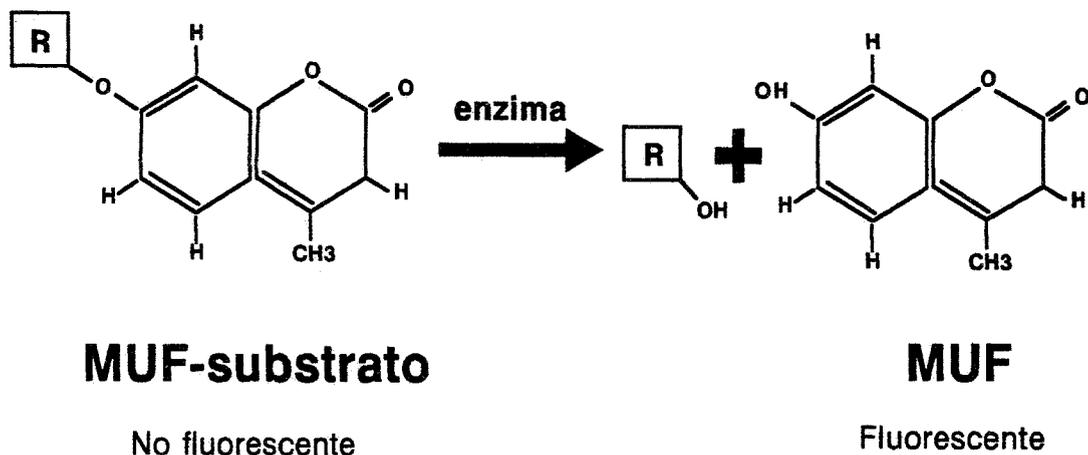


Figura 1.4. Esquema de la actuación de los substratos de metilumbeliferil.

La medida de la fluorescencia se lleva a cabo generalmente utilizando una cubeta. Para este estudio, sin embargo, el método fue estandarizado para la utilización de placas de pocillos, lo que conlleva dos ventajas. Por una parte, debido a las pequeñas cantidades necesarias para llevar a cabo el test, permite un ahorro no sólo en volumen de muestra sino también de reactivos que a veces pueden resultar caros. Asimismo, la miniaturización del test proporciona la posibilidad de realizar 96 aplicaciones simultáneamente, con el consiguiente ahorro de tiempo (Schmitt-Biegel & Obst 1989).

Para cada uno de los substratos de MUF fue preparada una solución madre de concentración final 2,3 mM, mediante la disolución de los substratos en etilenglicolmonometiléter / agua (1:1, v.v). Este es un agente que, aunque agresivo, no tiene un efecto ni excitador ni inhibidor sobre las actividades

enzimáticas (Hoppe 1983). Las soluciones stock fueron guardadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

La fluorescencia en los pocillos fue medida con un lector de placa (Perkin Elmer plate reader) conectada a un fluorímetro (Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS50B) con unas longitudes de onda de excitación y emisión de 365 y 446 nm, respectivamente.

La metodología utilizada para estos tests fue la misma tanto para las muestras de agua como de sedimento. En este último caso, se utilizó la suspensión de sedimento descrita en 1.5.2.

Las muestras de agua o de la suspensión de sedimento fueron incubadas con cada uno de los substratos listados en la tabla 1.1, y con tampón Tris-HCl (concentración final 0.01 M), $\text{pH}= 8.3$, en dos o tres réplicas. Se ensayaron entre 4 y 6 concentraciones de substrato, que oscilaron entre 5 y 600 μM , y se comprobó la linealidad de la reacción midiendo el incremento de unidades de fluorescencia a lo largo de un periodo de tiempo de 3 horas (figuras 1.5 y 1.6). La concentración saturante en el sedimento, para todos los enzimas, a excepción de la proteasa, la cual fue muy variable, se situó alrededor de los 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$. La hidrólisis parecía ser lineal como mínimo durante las 3 primeras horas, por lo que 1 h fue considerada como el tiempo óptimo de incubación para todos los casos.

1.8.2. Actividades endoenzimáticas

Los endoenzimas son los encargados de realizar el primer ataque sobre los polímeros, rompiendo los enlaces internos de las moléculas y liberando oligómeros. La actividad hidrolítica de los endoenzimas involucrados en la degradación de los polisacáridos más abundantes en sistemas naturales fue investigada mediante la metodología empleada por Wirth & Wolf (1992). Se trata de un método de tipo espectrofotométrico basado en la utilización de derivados de polisacáridos marcados covalentemente con azul brillante de remazol (RBB) para almidón, celulosa y xilano, y violeta brillante de remazol (RBV) para quitina. Estos substratos son solubles y precipitan mediante la

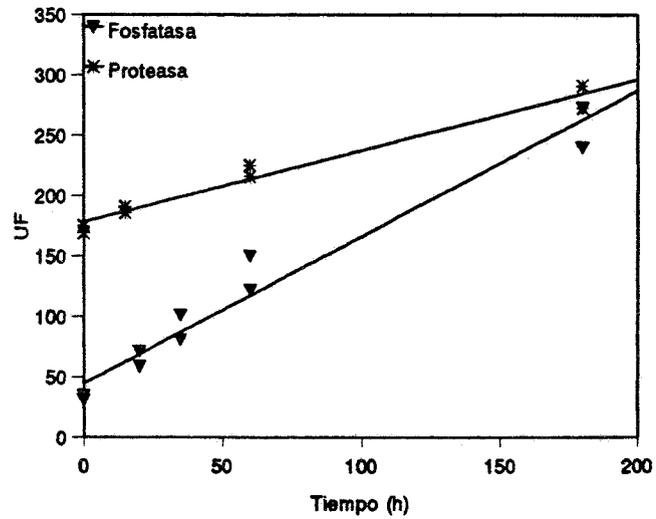
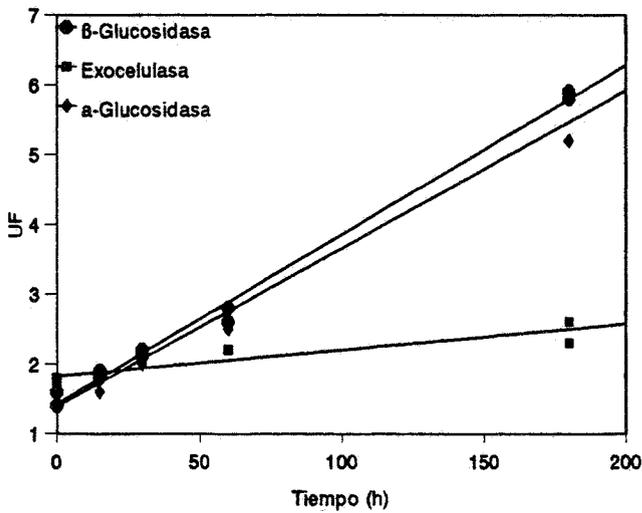
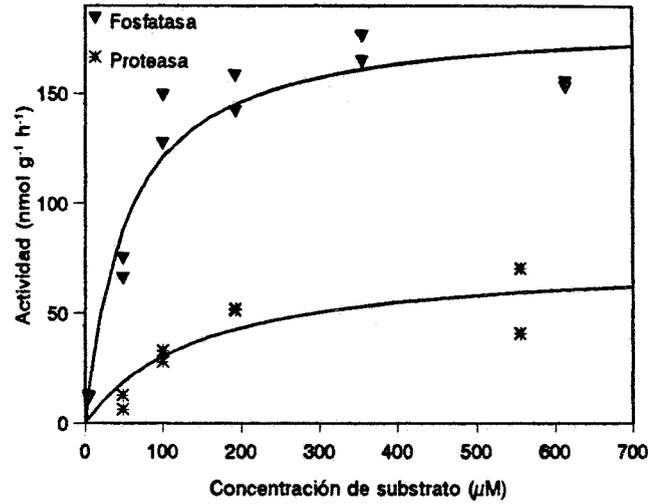
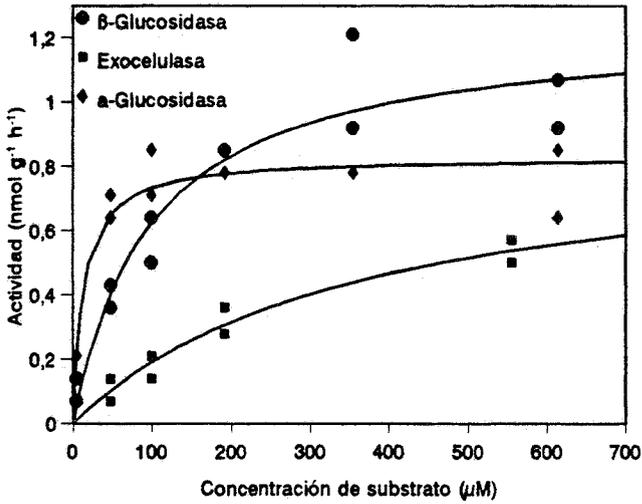


Figura 1.5. Curvas de saturación y linealidad de los ectoenzimas estudiados en el sedimento litoral.

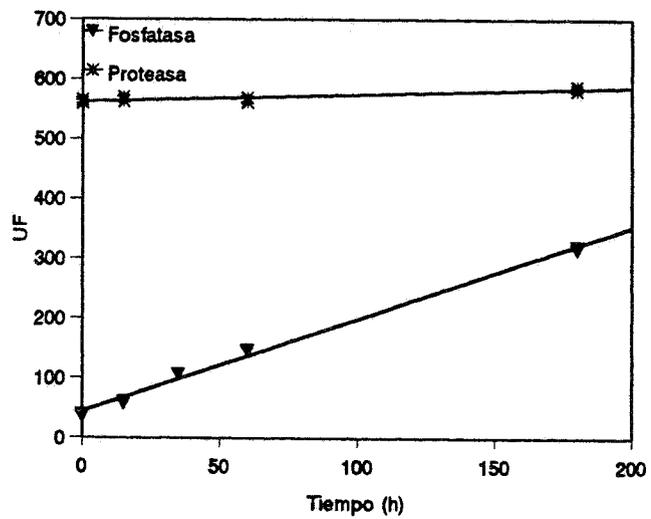
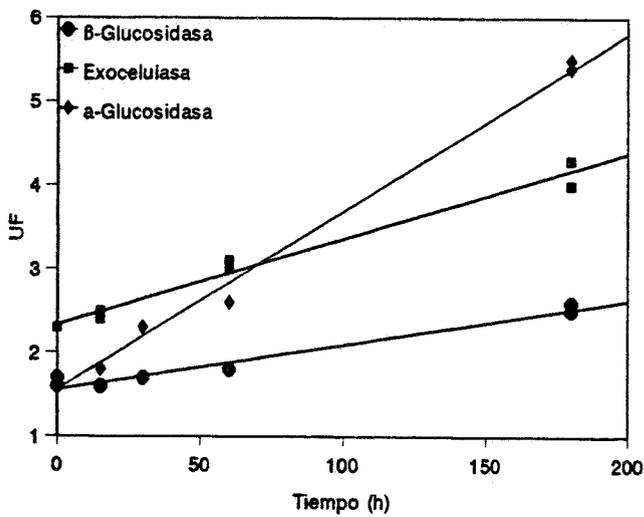
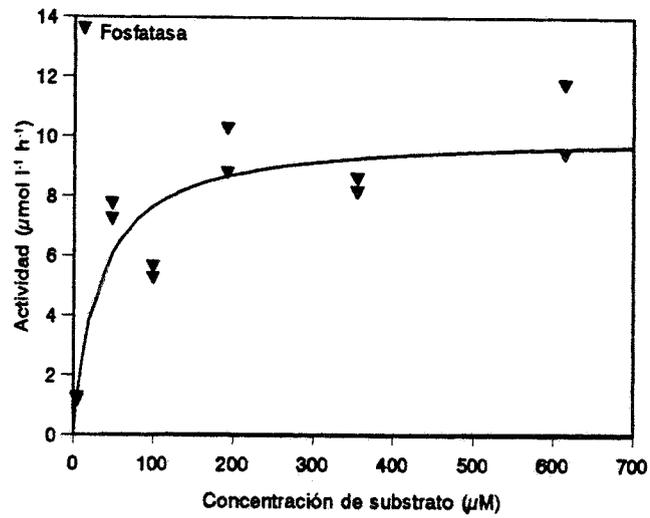
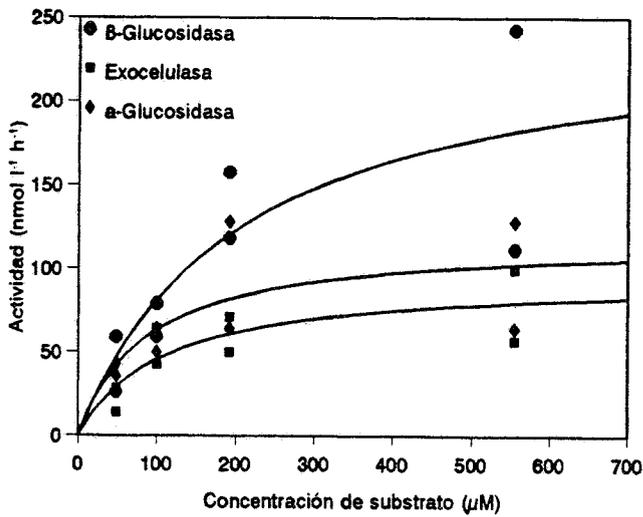


Figura 1.6. Curvas de saturación y linealidad de los ectoenzimas estudiados en el agua.

adición de ácido.

Tanto a las muestras de agua como a las suspensiones de sedimento les fueron añadidos los sustratos específicos (Tab. 1.1) en una concentración final de 0,8 mg l⁻¹ para los sustratos RBB (almidón, celulosa y xilano), y de 0,4 mg l⁻¹ para la CM-quitina-RBV, y tampón Tris-HCl pH= 8.3 (concentración final 0.01 M). La incubación tuvo lugar durante 24 horas a 36 °C en la oscuridad. Para evitar el crecimiento celular durante este tiempo, se añadió un estabilizador, la azida sódica (concentración final 0,2 %). Su adición afecta solamente el crecimiento celular, pero no la actividad enzimática, y sus resultados son mejores que los obtenidos con cloroformo (Siuda, comunicación personal). La reacción fue terminada enfriando las muestras a 0 °C durante 10 min tras la adición de HCl 2N. El pH ácido provoca la precipitación del sustrato no degradado, que puede ser separado mediante centrifugación (a 10000 g durante 5 minutos). La absorbancia del sobrenadante fue medida en un espectrofotómetro (Perkin Elmer 550S) a una longitud de onda de 600 nm para todos los sustratos excepto para quitina que fue de 550 nm.

La actividad de los enzimas fue calculada substrayendo la absorbancia de las muestras a la de los controles, muestras sometidas previamente a una temperatura de 130 °C durante 30 minutos para la inactivación de los enzimas.

1.9. Estudio sobre la aplicabilidad de los sustratos empleados para el estudio de las actividades ectoenzimáticas.

En los últimos años, el estudio de los procesos ectoenzimáticos en medios acuáticos ha suscitado un gran interés, habiendo sido empleados para ello un amplio espectro de métodos y sustratos, véase Chróst (1990) para una revisión de éstos.

Algunos autores (Hoppe 1983, Chróst & Krambeck 1986), sin embargo, han expresado sus dudas acerca de hasta que punto los sustratos utilizados son representativos de las sustancias naturales de este tipo, y si los enzimas que los hidrolizan tienen un espectro amplio o estrecho de acción. La representatividad de los sustratos artificiales utilizados para la determinación de actividades ectoenzimáticas ha sido también cuestionada durante este trabajo por lo que fue diseñado un experimento para evaluarla, comprobando la relación entre la degradación de polímeros y la producción de las actividades ectoenzimáticas correspondientes. El experimento se basó en proporcionar a cultivos bacterianos, una única fuente de carbono, la cual deberían degradar para poder crecer. Para la utilización de esta fuente de carbono, las bacterias necesitarían producir ectoenzimas específicos que hidrolicen este sustrato. Por ello, la detección de crecimiento bacteriano significaría la utilización de la fuente de carbono añadida y a consecuencia de ello la producción de ectoenzimas específicos para hidrolizar ese sustrato.

1.9.1. Material y métodos

El inóculo utilizado en el experimento provenía de un cultivo puro de *Cytophaga* conservado a -80°C . Esta bacteria ha sido identificada como el género principal en la degradación de polisacáridos tanto en cultivos de laboratorio (Güde 1978), en agua dulce (Suberkropp & Klug 1976) como en ambientes marinos (Tanaka 1993). El cultivo fue resucitado con medio nutritivo y posteriormente fue cultivado con medio mineral enriquecido con almidón (500

mg l⁻¹) para acostumbrarlo a la degradación de polisacáridos.

El diseño del experimento se encuentra esquematizado en la figura 1.7. Submuestras (200 µl) de este cultivo fueron usadas como inóculo para cada tratamiento. El medio utilizado fue medio mineral, 50 ml por tratamiento, al que se le añadió una única fuente de carbono. Las fuentes de carbono añadidas fueron almidón, celulosa, celodextrina, xilano, quitina y, como control, glucosa, en concentraciones finales de 500 mg l⁻¹.

Los enriquecimientos fueron incubados 5 días, durante los que fueron tomadas muestras diariamente, para seguir la concentración de bacterias y las actividades ectoenzimáticas. Las actividades estudiadas fueron α-glucosidasa, β-glucosidasa, exocelulasa, endocelulasa, endoamilasa y endoxilanasas. Debido a las dimensiones del experimento, 6 enriquecimientos, y a que los muestreos tuvieron lugar simultáneamente, la actividad quitinolítica solo fue seguida en el cultivo enriquecido con quitina y en el control que contenía glucosa. La metodología seguida para la determinación de estas actividades, así como de la abundancia bacteriana ha sido descrita anteriormente. Las bacterias fueron diferenciadas morfológicamente bajo el microscopio entre las pertenecientes al género *Cytophaga*, muy alargadas y finas, fácilmente distinguibles de las demás células a pesar de que *Cytophaga* puede cambiar su tamaño dependiendo de las condiciones en las que se encuentra creciendo.

1.9.2. Resultados

1.9.2.1. Adición de glucosa

La adición de glucosa fue elegida como control ya que las bacterias no necesitan producir enzimas ya que al tratarse de un monómero, concretamente de una hexosa las células pueden absorverlo fácilmente. La adición de esta fuente de carbono se vio reflejada en un crecimiento de la población bacteriana, como puede observarse en la figura 1.8. El número total de bacterias fue de $2,9 \cdot 10^{10}$

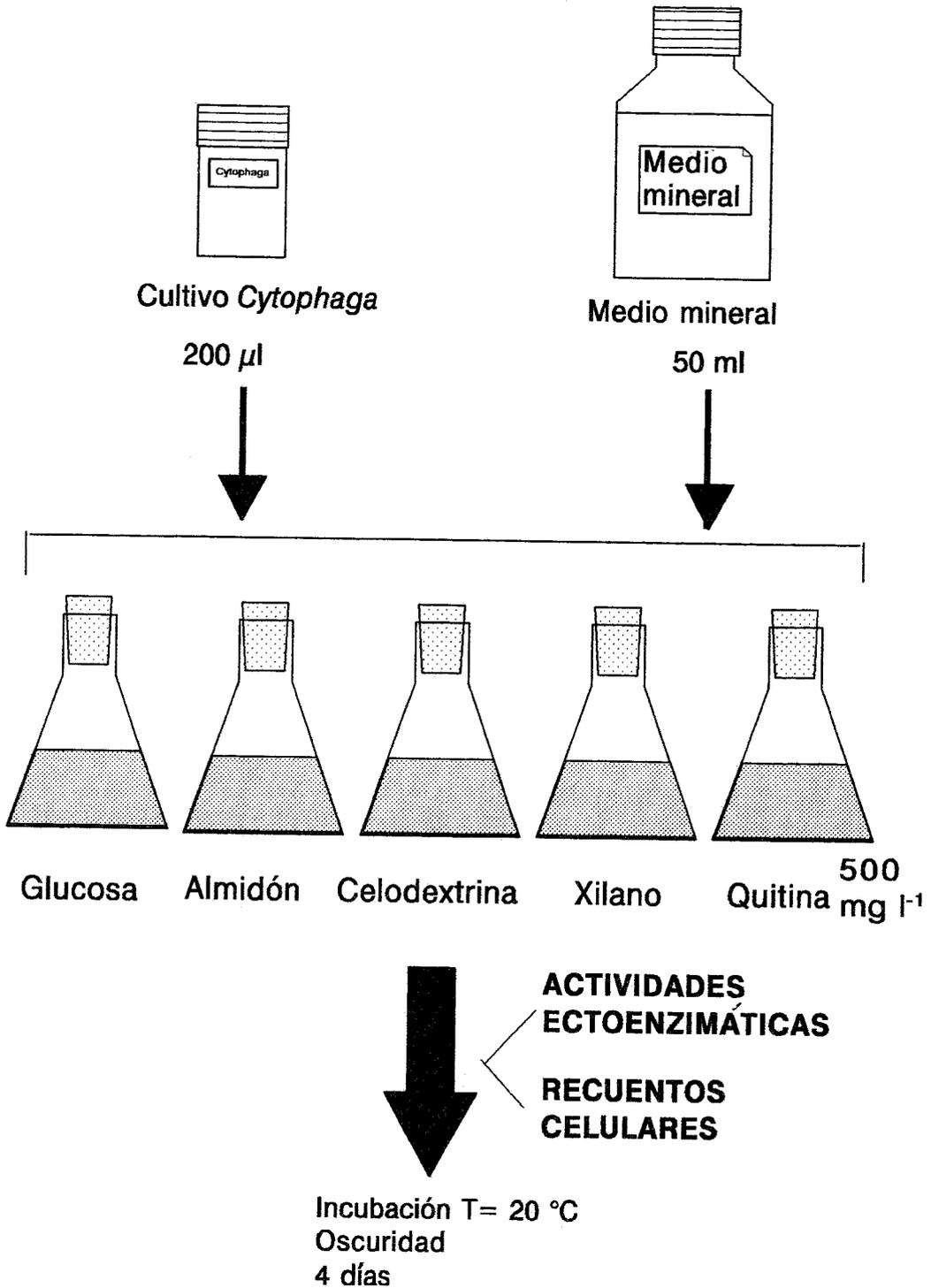


Figura 1.7. Diseño del experimento para comprobar la aplicabilidad de los sustratos utilizados para la determinación de la actividad ectoenzimática en este estudio.

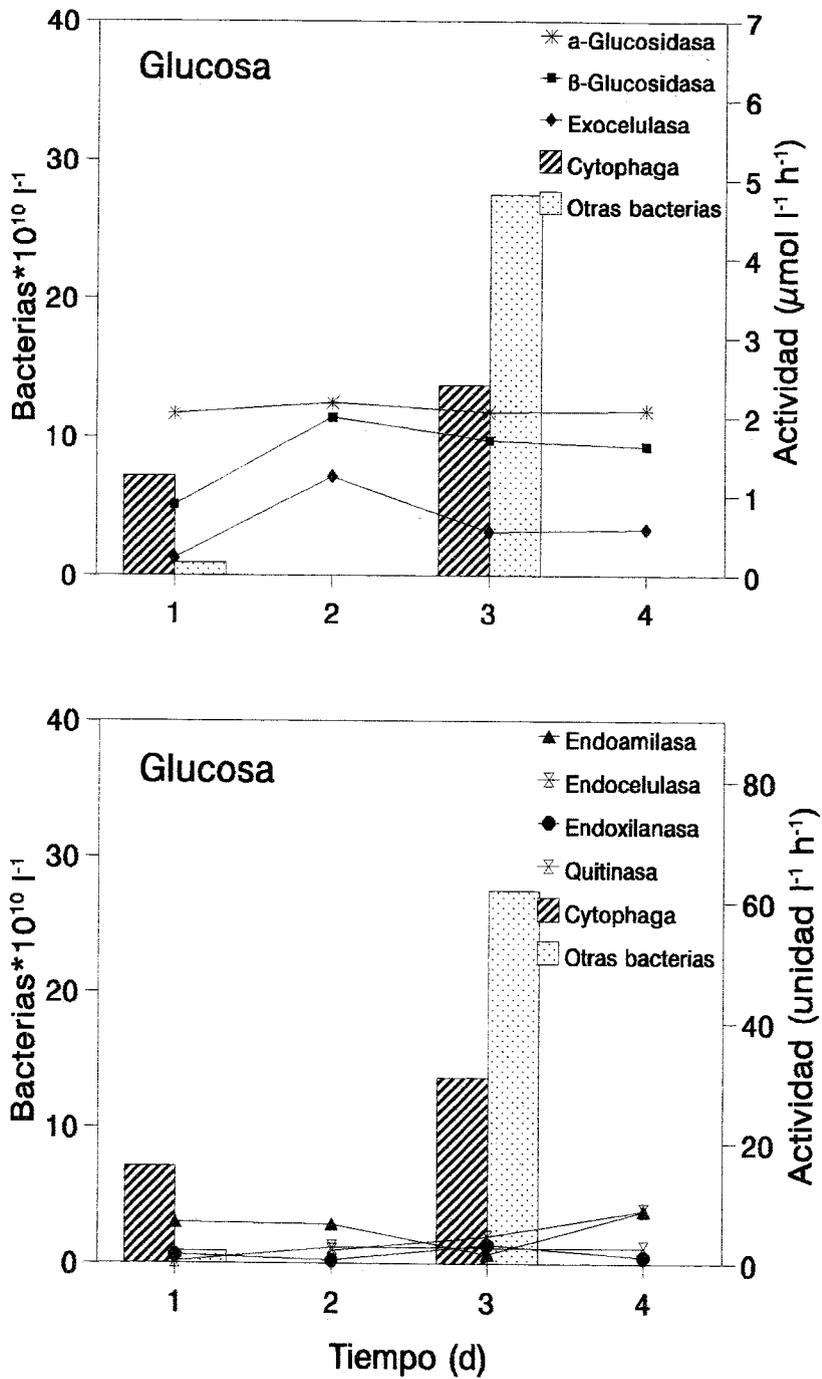


Figura 1.8. Recuentos celulares y actividades ectoenzimáticas en el tratamiento con glucosa.

células l⁻¹ a los 3 días, de las cuales tan solo un tercio pertenecían al género *Cytophaga*. Este cambio en la composición de la población no se detecta durante el primer día, cuando dominan aún los filamentos del tipo *Cytophaga*. A pesar del elevado número de bacterias, las actividades enzimáticas no fueron muy altas debido a que no se necesita ninguna de ellas para el crecimiento de las poblaciones. Estas, sin embargo, no fueron despreciables, y presentaron un nivel basal de actividad que no responde a ningún proceso de degradación. Este contenido basal no presenta grandes oscilaciones con el tiempo de incubación. La relación entre las glucosidasas α/β durante el período de mayor crecimiento fue cercana a 1,20, valor alejado del de 0,73 encontrado por Somville (1984) en las mismas condiciones. El valor numérico de nuestra tasa indicaría el predominio de la actividad α -glucosidasa sobre la β -glucosidasa en condiciones control. Las actividades endoenzimáticas, si bien son bastante bajas, se encuentran dominadas por la endoamilasa, lo que puede indicar, que las células mantengan los enzimas que produjeron durante su período de aclimatación ya que se hicieron crecer con almidón.

1.9.2.2. Adición de celodextrina

La celodextrina es una mezcla de diferentes oligosacáridos (principalmente penta y tetrasacáridos) cuyas cadenas de tipo lineal están constituidas por unidades de glucosa unidas mediante enlaces de tipo β -1,4. Son por tanto oligosacáridos procedentes de la degradación de celulosa, por lo que los enzimas que pueden atacar estas moléculas son exocelulasa, β -glucosidasa y también, aunque en menor grado, endocelulasa. Para una descripción más detallada de los pasos de degradación de la celulosa y los enzimas que intervienen en cada uno de ellos, véase la figura 1.3.

Al igual que en el crecimiento con glucosa, el crecimiento de la población bacteriana fue lento, pero a diferencia de éste, las concentraciones que se alcanzaron fueron bajas, como muestra la Fig. 1.9. La composición de la población también fue diferente ya que las bacterias no pertenecientes al género *Cytophaga* fueron una pequeña minoría. Las actividades ectoenzimáticas que,

en comparación con las del control de glucosa, predominaron, fueron las de degradación de la celulosa y sus derivados, como son la β -glucosidasa, la exocelulasa. El cociente entre α - y β -glucosidasa se situó alrededor de 0,7 en las fechas de mayor crecimiento, indicando una preferencia por la actividad de degradación de oligómeros de tipo celulósicos. También la actividad de endocelulasa aumenta en importancia a medida que transcurre el experimento, llegando a ser la actividad endoenzimática dominante al tercer día. Esto fue debido, además de al aumento de ésta actividad, a la disminución de las actividades de la endoxilanasas, y sobretodo de la endoamilasa. Al igual que en el caso del enriquecimiento con glucosa, parece que la preincubación en almidón provocó una producción de enzimas que se mantuvo incluso después de 3 días de haber ofrecido otra fuente de carbono a éstas bacterias.

1.9.2.3. Adición de almidón

El almidón es el principal polisacárido de reserva de las células vegetales. Se trata de un polímero formado por dos tipos de moléculas, la amilosa y la amilopectina. Ambas tienen una estructura parecida de cadenas de glucosa unidas mediante enlaces α -1,4. La amilosa es una molécula lineal, mientras que la amilopectina posee cadenas laterales y en el punto de ramificación de éstas se encuentran enlaces de tipo α -1,6. La poca importancia numérica de éstos hace que en los estudios de degradación del almidón se estudien los enzimas que rompen los enlaces α -1,4. La degradación del almidón se realiza principalmente mediante amilasas que no parten la molécula hasta monómeros, sino solo hasta el dímero maltosa. Este disacárido es entonces hidrolizado a glucosa gracias a la α -glucosidasa.

La adición de almidón causó un gran crecimiento de la población bacteriana apreciable ya el primer día. El hecho de que las bacterias se hubieran hecho "resucitar" con almidón puede haber sido la causa del rápido crecimiento microbiano (Fig. 1.10) ($4 \cdot 10^{11}$ células l^{-1}), cuando también fueron mayores las actividades ectoenzimáticas. La actividad específica (por célula) fue en general mayor a la calculada en los cultivos a los que les fue añadida otro tipo de fuente

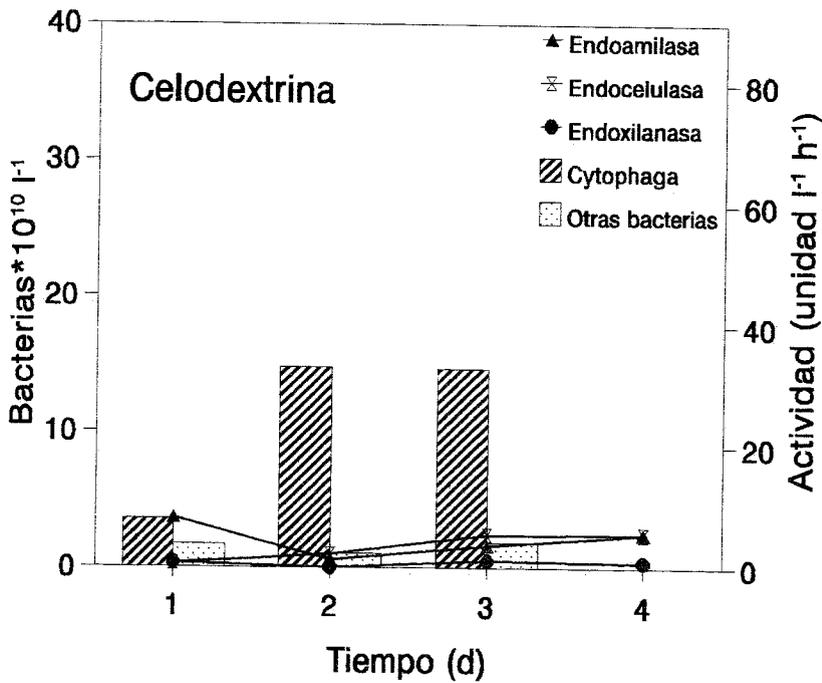
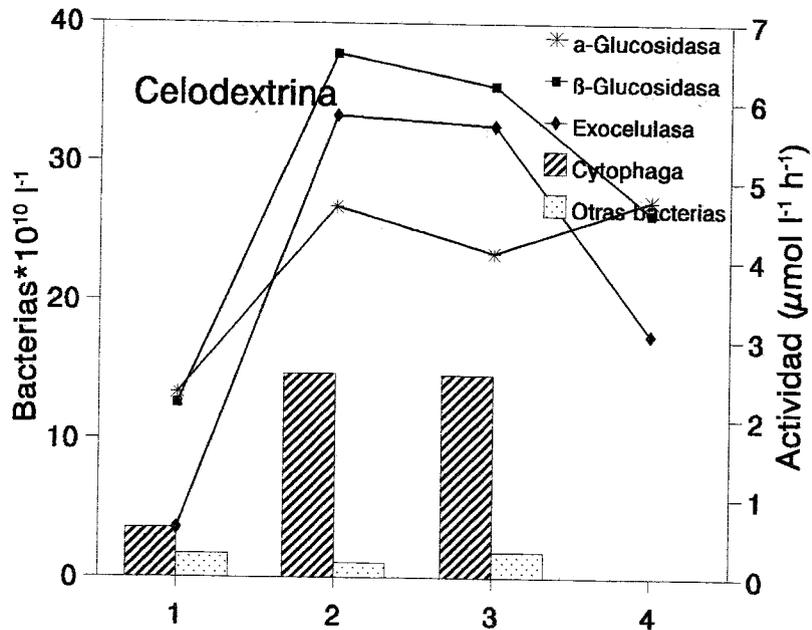


Figura 1.9. Recuentos celulares y actividades ectoenzimáticas en el tratamiento con celodextrina.

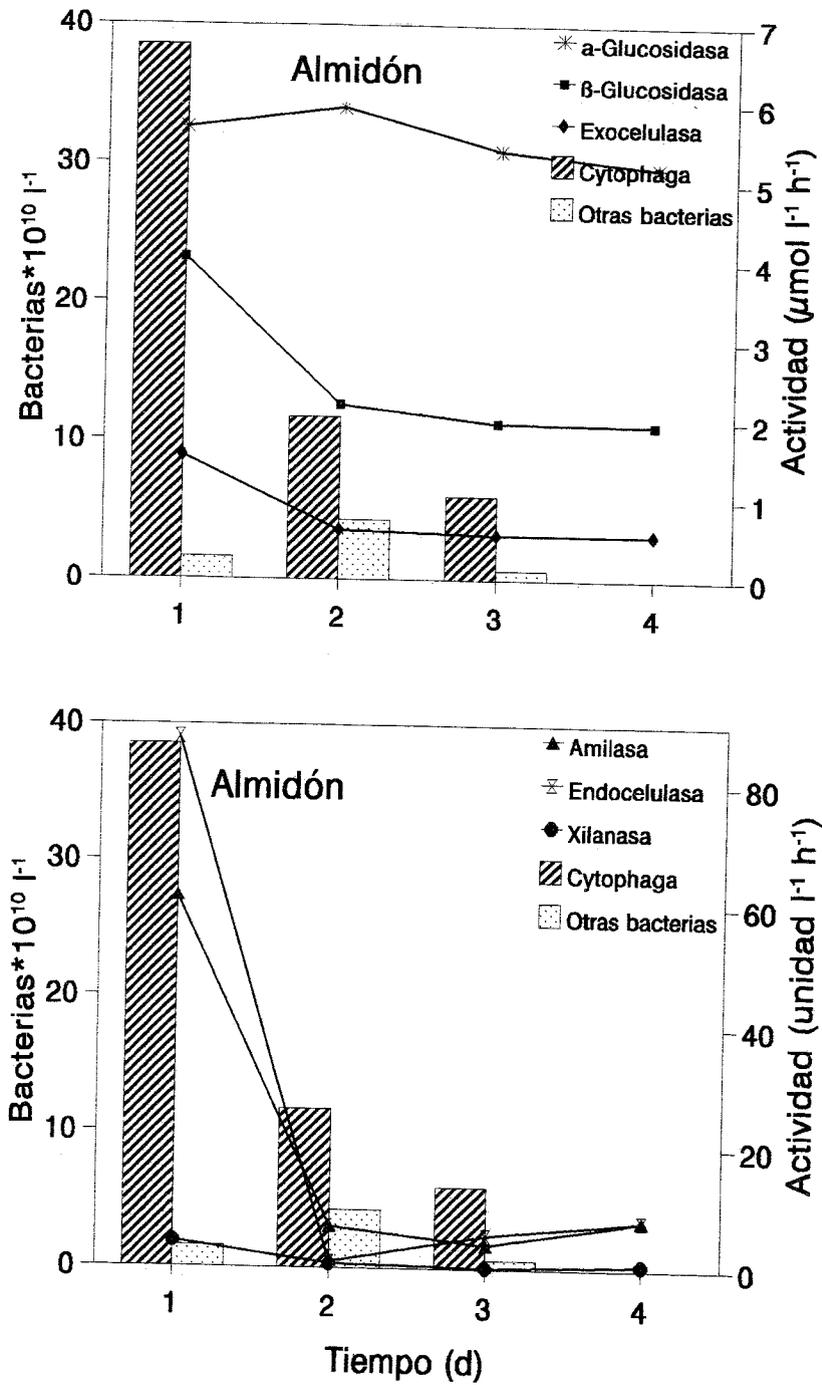


Figura 1.10. Actividades ectoenzimáticas y recuentos celulares en los tratamientos con almidón.

de carbono.

La razón α/β se situó en este día de máximo crecimiento cerca de 1,4, indicando un predominio de la degradación de almidón. Ese mismo día, fue detectada también, como era de esperar, una elevada actividad endoamilasa. Sin embargo aún más alta fue la actividad de la endocelulasa, no necesaria para la degradación de almidón.

1.9.2.4. Adición de xilano

El xilano es un polisacárido estructural del grupo de las hemicelulosas. La hemicelulosa se encuentra formando parte de las paredes vegetales de plantas superiores. De su hidrólisis final se obtiene principalmente monómeros de la pentosa xilosa y algo de arabinosa. Productos intermedios de la reacción son la xilobiosa, la xilotriosa y la xilotetraosa.

La adición de xilano a los cultivos no provocó un gran crecimiento de las poblaciones bacterianas (Fig. 1.11), llegándose tan solo a concentraciones cercanas a $1,3 \cdot 10^{11}$ células l^{-1} de las que un porcentaje considerable no pertenecía al género *Cytophaga*. La actividad de las glucosidasas fue siempre más alta de α - que de β . Si bien la actividad de endoamilasa fue muy superior al resto de actividades endoenzimáticas el primer día de incubación, el segundo y tercero, fue la endoxilanasas la actividad dominante.

1.9.2.5. Adición de quitina

La quitina es un homopolisacárido de estructura lineal de unidades de N-acetyl-D-glucosamina unidas por puentes $\beta(1-4)$ glicosídicos. El dímero de estas unidades es la quitobiosa y el trímero, la quitotriosa. Para la hidrólisis de la quitina se precisa de la endoquitinasa, y, para la degradación del dímero, la quitobiosa, de quitobiasa.

El crecimiento de bacterias conseguido mediante la adición de quitina (Fig. 1.12), fue inferior al alcanzado con las otras fuentes probadas. Las actividades

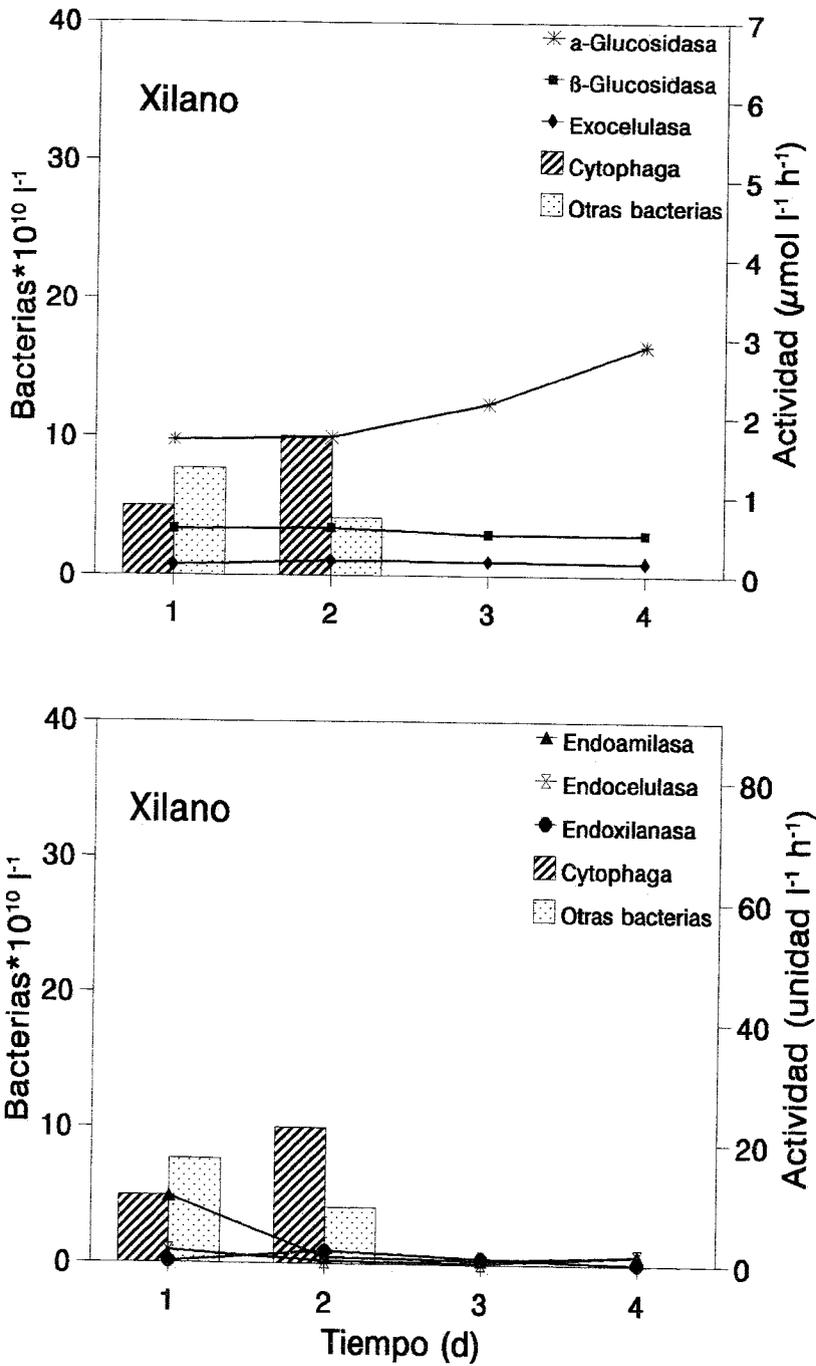


Figura 1.11. Actividades ectoenzimáticas y recuentos celulares en el tratamiento con xilano.

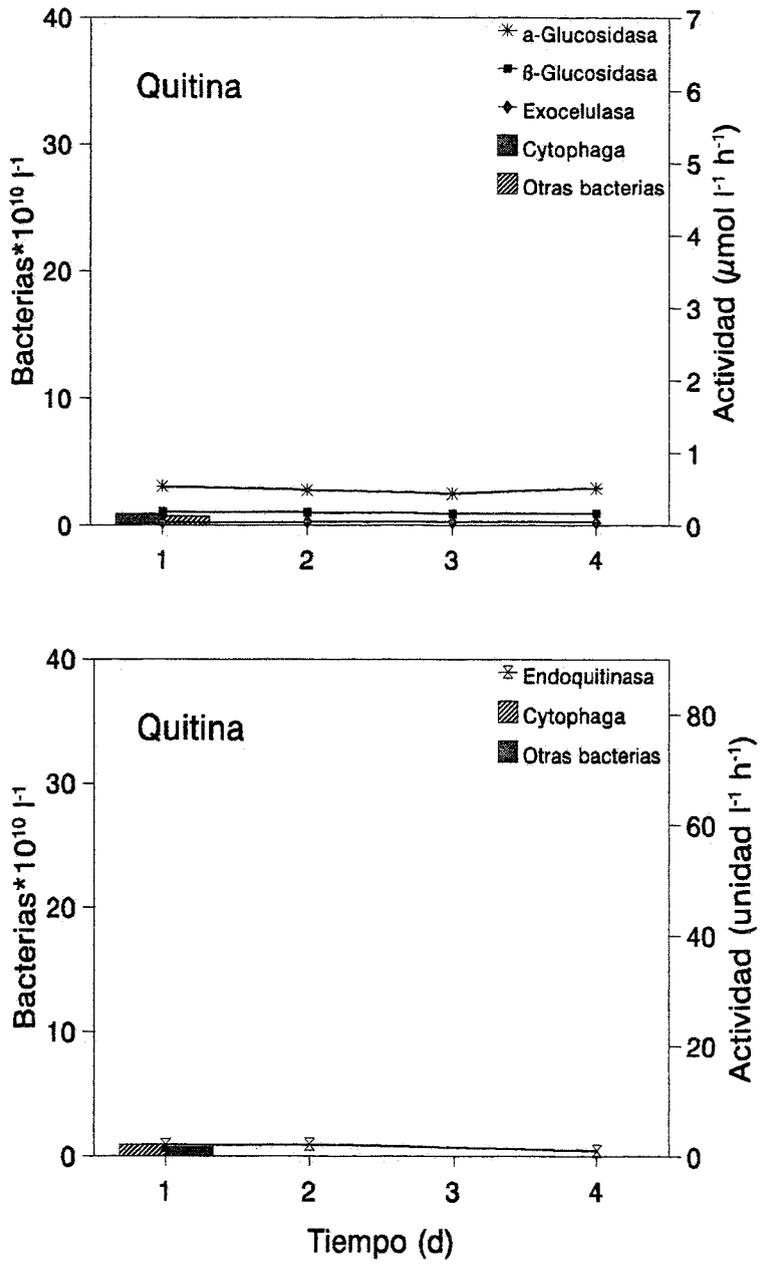


Figura 1.12. Actividades ectoenzimáticas y recuentos celulares en los tratamientos con quitina.

glucosídicas también fueron bajas, siendo la relación α/β muy similar a la medida en el tratamiento con xilano. El único endoenzima estudiado, fue el de mayor relevancia en este caso, la endoquitinasa. Su actividad durante el primer día fue muy superior a la determinada en el cultivo de glucosa. Asimismo, la inferior concentración de bacterias hizo que la actividad específica para este enzima fuera más elevada en el tratamiento con quitina.

1.9.3. Discusión

Si bien la aproximación ectoenzimática se ha visto de gran interés, la aproximación a los procesos de degradación polimérica mediante la tecnología hasta ahora disponible es muy cuestionable. Uno de los problemas que presentan estos métodos es la no discriminación entre los enzimas según su origen (Hoppe 1991). Los ectoenzimas adheridos a la superficie celular o que se encuentran en el espacio periplasmático son producidos por las células para la degradación de polímeros. Los que se encuentran libres pueden haber sido activamente secretados por células intactas, o bien tratarse de enzimas intracelulares que han sido liberados al medio gracias a lesión o lisis celular, o por la alimentación ineficiente (sloppy feeding) de zooplancton sobre algas, o la depredación de protozoos sobre las células bacterianas. Esta no diferenciación puede llegar a ser un problema grave (Wetzel 1990) para enzimas que se encuentran en el interior y exterior de la célula en momentos en que dominan los procesos de depredación y puede hacer cuestionable el cálculo de la actividad específica. Algunos autores intentaron discriminar entre los ectoenzimas adheridos y los que se encuentran libres, mediante filtración. Sin embargo, como se relata en el capítulo 2, la filtración, pese a ser realizada en condiciones de baja presión, puede romper las uniones entre la pared celular y los ectoenzimas, causando una sobreestima de las actividades de los enzimas que se encuentran en forma libre. Otras de las dificultades en la determinación de las actividades enzimáticas en medios naturales son, como describe Chróst (1990), de tipo metodológico. Estas sitúan al investigador en la disyuntiva de llevar a cabo los experimentos según los principios de la enzimología (pH y temperaturas óptimos, y concentración

de substrato saturante y homogénea de substrato), o bien, simulando la situación en las que se encuentra la muestra en la naturaleza (condiciones físicas oscilantes y concentración de substrato limitante y heterogénea). La interpretación de los resultados obtenidos y la relación entre la actividad potencial, obtenida mediante la primera aproximación, y la "real", obtenida mediante la segunda, aún se desconoce. Los experimentos realizados en el presente trabajo fueron llevados a cabo en condiciones de concentración de substrato saturante, y pH y temperatura subóptimos y constantes, lo que suele ser habitual en estudios de sistemas acuáticos y que, al tratarse de condiciones estandarizadas, permiten la comparación de los resultados entre los capítulos. La elección de la metodología a seguir también puede ser problemática. El método ideal para medir las actividades ectoenzimáticas reales consistiría en seguir la disminución en la concentración de substrato natural presente o el aumento de la producción de ectoenzimas en condiciones *in situ*, sin embargo, éste método es difícil de aplicar debido a su imprecisión y dificultades analíticas, y, especialmente, a que el producto liberado en la reacción es consumido inmediatamente por los microorganismos. Estas dificultades hacen que los métodos seguidos para la medida de las actividades ectoenzimáticas en aguas naturales se basen en la utilización de substratos artificiales, que imitan a los naturales y son de sencilla aplicación. De entre estos substratos, recientemente se ha extendido el uso de moléculas fluorogénicas, véase Hoppe (1991) para una revisión de los métodos. Estos substratos presentan, en comparación con otros habitualmente empleados, un gran número de ventajas como reproducibilidad, rapidez, sensibilidad y facilidad de utilización (Hood 1991). Sin embargo, algunos autores han mostrado su incertidumbre a la hora de interpretar los resultados. Chróst & Krambeck (1986), admiten que los substratos fluorogénicos son artificiales y que las actividades que se obtienen mediante su empleo no son necesariamente idénticas a las medidas con substratos naturales.

A partir del acercamiento experimental han podido ser extraídas algunas conclusiones sobre la representatividad de los substratos utilizados, substratos de metilumbeliferilo y de remazol brillante.

La adición de las distintas fuentes de carbono provocó diferentes intensidades de crecimiento de las poblaciones bacterianas presentes en los cultivos. El mayor de ellos se obtuvo con almidón y fue apreciable ya el primer día. La adición de glucosa también provocó un elevado crecimiento que, sin embargo, fue más lento. Además de la velocidad de crecimiento, la composición de la población también fue diferente, dominando ampliamente la presencia de células de *Cytophaga* cuando el almidón estaba presente, mientras que en el caso de glucosa, éstas representaron una minoría. En general, el predominio de las células de *Cytophaga* fue observado en todos los cultivos enriquecidos con polímeros, a diferencia de con el monómero glucosa. Similares observaciones fueron hechas por Güde (1978a) quien, al incubar poblaciones de agua dulce con substratos naturales poliméricos, observó el crecimiento a los tres días de una población de *Cytophaga* que alcanzó el 40 % del total de bacterias heterotróficas. Las células de este género están especializadas en la degradación de polisacáridos, pero sin embargo quizás se encuentren en desventaja frente a otras bacterias cuyo crecimiento esté limitado por la presencia de monosacáridos. En presencia de éstos últimos (por ejemplo de glucosa) dominaron otros tipos de bacterias que podrían llamarse oportunistas. Estos microorganismos, incapaces de degradar los polímeros estudiados, se encontrarían sin embargo, quizás también en los cultivos que los contenían, viviendo posiblemente de manera "parásita", utilizando los monómeros liberados por la acción hidrolítica de los ectoenzimas producidos por *Cytophaga*. Estos resultados parecen, pues, concordar con los de Tanaka (1993) y Güde (1978a, 1978b), que consideraron dicho género de bacterias muy importante para los procesos de degradación de la materia orgánica en ecosistemas acuáticos. En general, las actividades ectoenzimáticas producidas dependieron en cierta manera de la fuente de carbono presente en cada una de los cultivos, y las detectadas en el tratamiento con glucosa fueron consideradas como basales. Estas actividades fueron medidas con dos métodos diferentes, por lo que la valoración de su aplicabilidad debe ser hecha por separado.

Valoración de los substratos de metilumbeliferil.

Tanto la β -glucosidasa como la exocelulasa se encuentran involucradas en el mismo proceso de degradación de la celulosa, por ello su actividad evoluciona de forma paralela en todos los cultivos, siendo siempre mayor la β -glucosidasa ya que rompe dímeros, que son más abundantes.

También era esperable el observado claro predominio de la actividad α -glucosidasa, enzima que rompe la maltosa, en la degradación de almidón. Asimismo, en el cultivo enriquecido con celodextrina (mezcla de diversos oligómeros de celulosa), se detectaron elevadas actividades de β -glucosidasa y exocelulasa. Estos resultados concordarían con los resultados descritos por Somville (1984). Ella estudió, mediante el enriquecimiento con α - o β -glucopiranosidos de comunidades acuáticas bacterianas naturales que, a similares densidades ópticas, la actividad α -glucosidasa era mayor en crecimiento en almidón que en maltosa y éste que en glucosa. De la misma manera, la actividad β -glucosidasa fue superior con celobiosa que con glucosa.

Debe, sin embargo, tenerse en cuenta que las actividades de los ectoenzimas teóricamente "innecesarios" para la degradación de los respectivos hidratos de carbono no fueron bajas. Somville (1984) propone que el cálculo de la tasa entre α -/ β -glucosidasas puede ser una indicación del polisacárido que se está degradando en ese momento. El cálculo de estas tasas en el día de máximo crecimiento dio valores de 1,4, 1,2 y 0,7 para almidón, glucosa y celodextrina, respectivamente. Los valores que se encuentran en la literatura, de 1,11, 0,73 y 0,54 para almidón, glucosa y celobiosa. Las tasas obtenidas en este estudio fueron algo superiores a las de la literatura, quizás debido a que la incubación del cultivo inicial previa al experimento fue realizada en almidón por lo que podría existir una cierta inercia que hiciera que las células siguieran produciendo los enzimas encargados de la hidrólisis de este polisacárido. Quizás esta diferencia podría deberse a que se tratara de poblaciones bacterianas diferentes, un cultivo de *Cytophaga* y una población acuática natural. Sin embargo, existe una cierta concordancia ya que el cociente obtenido al crecer en glucosa se sitúa entre los que se obtienen al crecer en α - y β -glucopiranosidos.

Algunos autores han comprobado la utilidad de estos substratos, con resultados muy positivos. Somville (1984) encontró una inhibición competitiva de la hidrólisis de 4-MU α G y 4-MU β G por los disacáridos homólogos maltosa y

celobiosa respectivamente, demostrando una absoluta especificidad de las glucosidasas. Otro test de la especificidad de los substratos de MUF fue realizado por Hood (1991). El expuso el substrato de MUF específico para la endoquitinasa, a otros enzimas que pueden estar presentes en muestras de agua naturales, la ausencia de fluorescencia indicó la gran especificidad de estos substratos.

Esta especificidad de los substratos no se contradice con nuestros resultados que indican más bien la presencia no de un enzima único para cada degradación sino de la presencia de varios de ellos. Esto hace que sea difícil establecer una correspondencia absoluta entre una actividad ectoenzimática y una fuente de carbono concreta, ya que este enzima se produce a pesar de su teórica innecesidad. Parece tener un mayor sentido la utilización del cociente entre glucosidasas, que da una indicación más real acerca de la composición del polisacárido que se está degradando en cada momento. Vrba (1992) encontró tasas inferiores a las encontradas por Somville (1984) con celobiosa, deduciendo que la hidrólisis de celulosa predomina en el período de estudio en el epilímnion del embalse Rimov.

Así pues, a pesar de algunas dudas sobre la correlación entre las actividades detectadas y las reales, los científicos (Chróst & Krambeck 1896) siguen prefiriendo el uso de estos substratos debido a su alta sensibilidad y rapidez.

Valoración de los substratos de brillante de remazol.

El método utilizado para la determinación de las actividades ectoenzimáticas es un método espectrofotométrico (Wirth & Wolf 1992), menos sensitivo que el método anterior, por lo que a los posibles problemas de interpretación, se le añade también los causados por su menor sensibilidad. La aplicabilidad del método fue ya probada por Wirth & Wolf (1990), al incubar CM-quitina-RBV con endoquitinasa, y observando un incremento de absorbancia, indicación de la acción del enzima.

También se observan en este tipo de ectoenzimas una actividad en todos los casos superior al resto para la actividad amilolítica, posiblemente por las mismas

razones comentadas para la α -glucosidasa. Tanto glucosa como celodextrina podrían actuar de control en estos casos, ya que la celodextrina es un producto de la endocelulasa y no es atacada por ella. En ambos tratamientos se obtuvieron actividades bastante bajas a pesar del elevado crecimiento de la población. En casi todos los cultivos se pasa del predominio de la actividad endoamilasa inicial hacia las actividades que serían esperables en cada caso. Si bien pueden observarse un incremento de las actividades enzimáticas esperadas en algunos de los cultivos, éstas son comparables a las de otras actividades determinadas en los mismos tratamientos y en ningún momento se trata de respuestas drásticas.

La mayoría de los ectoenzimas que se encuentran en ecosistemas acuáticos son inducibles y éstos, generalmente son sintetizados en una tasa basal en ausencia de sustrato. Cuando el sustrato está presente, se observa un fuerte aumento en la producción del enzima que continúa hasta que desaparece el inductor o el producto enzimático de la catálisis se acumula, volviendo entonces de nuevo al nivel basal (Chróst & Overbeck 1990). Los resultados presentados no muestran siempre esta respuesta drástica sino que algunas veces se trata de una producción de varios enzimas en principio innecesarios para dicha degradación, o bien, de una respuesta bastante débil.

Otro hecho remarcable no solo en este estudio sino a lo largo de todo el trabajo de tesis doctoral es el que se observe claramente el acoplamiento supuesto a priori entre la actividad de los enzimas involucrados en los distintos pasos de la degradación de un mismo polisacárido. En realidad este paralelismo no ha sido observado, como también se describe en la literatura (Sinsabaugh et al. 1981). Estos resultados deben hacernos pensar en la cautela con que debemos interpretar los datos obtenidos. Chróst (1990) precisa que la mayoría de métodos son modificaciones de ensayos aplicados en bioquímica y para cuya adaptación a estudios de ecología microbiana se necesitan varias precauciones. La aproximación ectoenzimática tiene un gran importancia para la mejor comprensión los procesos básicos de descomposición y actividad microbiana en ecosistemas acuáticos. Este campo, sin embargo es relativamente nuevo y aún

deberían ser solucionados, como se ha mostrado en este estudio, muchos problemas de tipo metodológico y de la interpretación ecológica de los resultados. La indudable importancia de los ectoenzimas para el flujo de materia orgánica y nutrientes hacen necesario un avance en este campo en el que los trabajos futuros deberían tratar además de la determinación de las concentraciones de substratos naturales y la utilización de los productos de la reacción.

*Tu nur das Rechte in deinen Sachen;
Das andre wird sich von selber machen.*

Goethe

- CAPÍTULO 2 -

**Comunidades microbianas y actividades
ectoenzimáticas involucradas en la degradación
de detritus**

2.1. Introducción

El detritus se puede definir como partículas de carbono orgánico provenientes de cualquier nivel trófico o aportes de fuentes externas del ecosistema (Wetzel 1972) y que no pueden ser aprovechadas por los organismos. La mayor parte del carbono orgánico de los lagos y del océano no se encuentra en la materia viva, y existe en forma de carbono disuelto (DOC), y, en menor proporción, como carbono orgánico particulado (POC).

Según su origen, los materiales detríticos pueden clasificarse en autóctonos y alóctonos. Las fuentes autóctonas son organismos muertos o dañados, como pueden ser los macrófitos en la zona litoral o el fitoplancton en la pelágica, y también caparzones de crustáceos. Las fuentes alóctonas de detritus son productos de la cuenca de recepción, principalmente debido a la caída de hojas.

La mayor parte del total de la producción primaria de un sistema se transmite hacia otros niveles tróficos a través de la descomposición del tejido muerto y no a través del consumo de tejido vivo. Este proceso de descomposición consta de varias fases. En primer lugar se produce una fragmentación mecánica, seguida de una pérdida de material orgánico soluble, lixiviación, (Polunin 1982, Godshalk & Wetzel 1978). Esta pérdida no es causada por microorganismos (Polunin 1982) pero ellos son capaces de utilizar rápidamente estos compuestos para su metabolismo (Hansen et al. 1986). Posteriormente se produce la colonización por microorganismos, que forman parte esencial en la descomposición de detritus (Kaushik & Hynes 1971, Sridhar & Bärlocher 1993, Mason 1976, Fenchel 1970, Cole & Likens 1979). Por un lado, son capaces de utilizar la materia orgánica que se ha solubilizado (Blum & Mills 1991) y pueden ser consumidos por organismos de niveles tróficos superiores. Por otra parte, las bacterias pueden colonizar las partículas de detritus, para utilizarlas para su metabolismo (Newell et al. 1981). De esta manera, pueden enriquecer los detritus para los animales, al aumentar su contenido en N (Findlay & Tenore

1982, Mann 1988) y P, como se puede ver en el capítulo 3. Las bacterias, sin embargo, no son capaces de absorber directamente sustratos de tipo polimérico, sino que para ello precisan producir ectoenzimas que hidrolizarán los polímeros a monómeros que podrán ser entonces absorbidos.

El diferente origen de los sustratos influye probablemente en la composición de las poblaciones bacterianas y puede inducir, según su naturaleza, los ectoenzimas involucrados en la hidrólisis de las macromoléculas que los componen. El presente trabajo pretende observar la producción de ectoenzimas en la hidrólisis de los diferentes tipos de detritus más frecuentes en la zona litoral. La aparición de cada una de las actividades será una indicación de las moléculas que están siendo utilizadas a lo largo del proceso de degradación de los detritus.

Los sustratos naturales elegidos como principales fuentes de detritus en la zona litoral fueron tanto de tipo no vegetal (quitina) como vegetal (macrófitos, algas y hojas de árbol). Dentro de éste último grupo, a su vez puede distinguirse según su origen, entre detritus alóctono (hojas de árbol) y autóctono (fitoplancton y macrófitos). Los detritus vegetales autóctonos, a su vez, pueden diferenciarse en algas unicelulares (fitoplancton) y pluricelulares (macrófitos). El tipo de detritus posiblemente puede influir en la densidad y composición de la comunidad microbiana que aparece durante su degradación, por lo que el seguimiento de la composición mediante la observación de las colonias permitirá conocer la dinámica de la comunidad a lo largo del proceso de degradación del sustrato suministrado.

Adicionalmente, el análisis de las capacidades hidrolíticas de algunas de las colonias más abundantes en los diferentes tratamientos permitirá conocer si en las bacterias que crecen durante la degradación son todas capaces de hidrolizar los sustratos o si incluso existen bacterias que pueden producir varios tipos de ectoenzimas

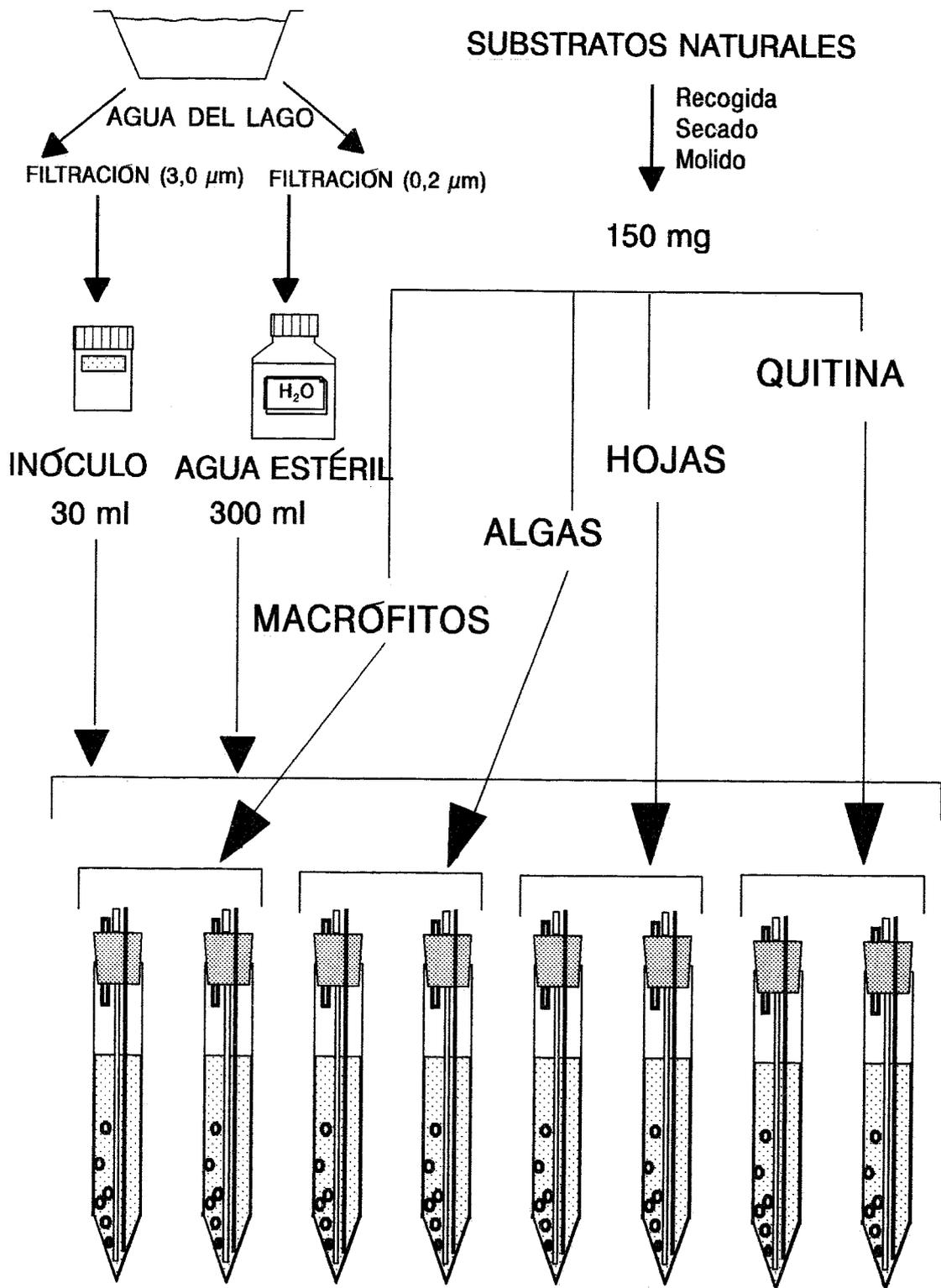


Figura 2.1. Diseño del experimento.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Diseño experimental

Para evaluar la degradación de detritus, poblaciones naturales de bacterioplancton fueron incubadas con algunos de los substratos naturales más frecuentes en el lago, tanto autóctonos (fitoplancton, macrófitos y quitina), como alóctonos (hojas de árbol).

Un total de ocho alícuotas de 30 ml se filtraron a través de filtros Schleicher & Schull de 3,0 μm de diámetro de poro e incubadas en 300 ml de agua del lago estéril (filtrada a través de 0,2 μm). El agua fue enriquecida con cada uno de los substratos naturales cuya degradación fue objeto de estudio (Fig 2.1).

La quitina (poly-N-acetylglucosamina) fue adquirida comercialmente (Sigma) y su origen fue de caparzones de cangrejo. El resto de los substratos fueron obtenidos directamente del lago. El macrófito utilizado fue *Potamogeton perfoliatus*, una de las especies más frecuentes en el lago. Las plantas fueron cosechadas durante otoño de 1993, secadas durante meses al aire y cortadas en fragmentos de menor tamaño con una batidora.

Las hojas secas provenían de chopos (*Populus* sp.) que estaban situados en la orilla del río y que fueron recogidas en los últimos metros del curso del río Schussen, cuya desembocadura dista unos 1,5 km de la estación donde tuvo lugar el muestreo rutinario en la zona litoral. En el momento de la recogida, finales de octubre, las hojas de chopo constituyeron más del 80 % de la biomasa vegetal recolectada, por lo que fueron elegidas como representantes de substrato natural alóctono en la zona de estudio. Estas hojas fueron secadas durante meses al aire, cortadas en pequeños trozos y luego también pasadas por la batidora.

Como ejemplo de alga unicelular, se recogieron acumulaciones de algas que crecían sobre piedras cerca de la orilla. Las piedras fueron raspadas, y la arena fue separada mediante varios lavados. El examen microscópico permitió observar que se trataba prácticamente solo de clorofíceas filamentosas. Las algas fueron secadas durante 30 minutos a 80°C.

Los cuatro substratos fueron finalmente reducidos a un polvo muy fino con un molino (Fritsch pulverisette) durante 20 minutos. El polvo fue calentado durante 30 minutos a 100 grados para disminuir la introducción de protozoos con el substrato.

El experimento se llevó a cabo durante 22 días, durante los cuales los tubos permanecieron en constante aireación a 20 °C y en condiciones de luz muy tenue. Al inicio, cuando se consideró la época de mayor interés, se tomaron

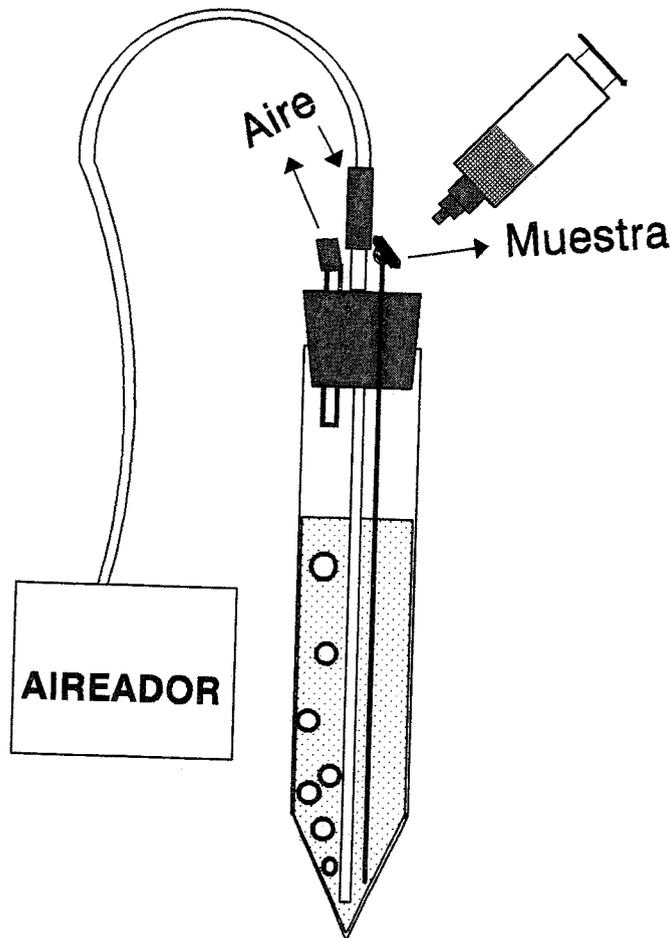


Figura 2.2. Esquema de uno de los tubos, recipientes en los que se realizaron los diferentes tratamientos.

muestras diariamente, mientras que después de la primera semana, cada dos días. La toma de muestras se realizó mediante la extracción de líquido con una jeringa que se conectaba a una larga aguja clavada al tapón cada tubo (Fig. 2.2). De esta manera se evitó abrir los tubos lo que hubiera podido causar la entrada de microorganismos del aire.

2.2.2. Métodos

Las muestras fueron analizadas para conocer la concentración de bacterias, las actividades exoenzimáticas y la cantidad (y tipo) de unidades formadoras de colonias (ufc) totales y las capaces de degradar cada uno de los polisacáridos estudiados.

Para la determinación de las actividades ectoenzimáticas se utilizaron dos métodos distintos, uno espectrofotométrico (Wirth & Wolf 1992), y el otro fluorométrico (Schmitt-Biegel & Obst 1989), que han sido ampliamente descritos en el capítulo 1. Las actividades estudiadas están la mayoría implicadas en la degradación de polisacáridos. Endoamilasa y α -glucosidasa degradan, respectivamente, polímeros y dímeros del almidón. Endocelulasa, exocelulasa y β -glucosidasa están involucrados en la hidrólisis de la celulosa, concretamente del polisacárido, oligosacárido y disacárido, respectivamente. La endoxilanasasa degrada el xilano, polímero de xilosa que forma parte de la hemicelulosa. La endoquitinasa hidroliza moléculas de quitina, que pueden tener su origen en la pared celular de hongos y el exoesqueleto de crustáceos e insectos.

Las placas en las que se determinó el número total de bacterias fueron placas CPS, preparadas con medio mineral al que se le añadieron caseína, peptona y almidón. Estas placas nos servirían de control para saber el total de unidades formadoras de colonias (ufc) que creció en cada momento.

Para conocer la cantidad y tipo de bacterias que en cada momento del experimento eran capaces de degradar un determinado tipo de polisacárido se sembraron las colonias en cuatro tipos de placas, cada una enriquecida con un sustrato diferente: almidón, celulosa, xilano y quitina. Las placas fueron preparadas en dos capas. La capa inferior, de 5 ml, contenía simplemente medio mineral, y la superior (15 ml) contenía una única fuente de carbono. Estas fuentes de carbono fueron los mismos sustratos utilizados en la determinación de las actividades ectoenzimáticas (véase apartado 1.8.2), en una concentración final de 300 mg l⁻¹, para la celulosa, y de 200 mg l⁻¹ para el resto de sustratos. Debido a la coloración de los sustratos, el agar adquirió una tonalidad azulada o rosada, según cual hubiera sido añadido. En este agar coloreado, las bacterias

capaces de degradar ese substrato fueron fácilmente diferenciables por la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, producto de la actividad hidrolítica de dicha bacteria.

Aparte del recuento de estas colonias, también se intentó conocer con más detalle en algunos casos de qué organismos se trataba. De esta manera se realizaron observaciones del aspecto de la colonia, sino también de la morfología celular. Así pues, se aislaron 20 colonias, elegidas bien por su elevada frecuencia de aparición o bien por su capacidad degradativa. Los aislados fueron entonces nuevamente sembrados en cada una de las placas que contenía los substratos para conocer si eran capaces de degradarlos.

2.3. Resultados

Tanto el crecimiento bacteriano como las actividades ectoenzimáticas presentaron un desarrollo bastante similar en los dos enriquecidos con un mismo substrato. Por ello, los resultados serán presentados como la media de los dos enriquecimientos.

2.3.1. Macrófitos

Las poblaciones bacterianas enriquecidas con polvo de macrófitos crecieron hasta cerca de $1 \cdot 10^7$ unidades formadoras de colonias (ufc) ml^{-1} , sin embargo, fue observado un descenso hacia el octavo día de incubación, cuando la concentración fue tan solo de $1 \cdot 10^5$ ufc ml^{-1} . Pasado este mínimo, las poblaciones bacterianas experimentaron un nuevo crecimiento hasta llegar a abundancias similares a las registradas al inicio del experimento.

La actividad de la fosfatasa alcalina (Fig. 2.4) no presentó fuertes oscilaciones durante el período estudiado, variando siempre alrededor de $1000 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Un mínimo de esta actividad a tener en cuenta es el que se observa el día 3, precisamente cuando se observan las mayores concentraciones bacterianas. La actividad proteolítica, aparte de presentar este máximo inicial, presenta otro 3

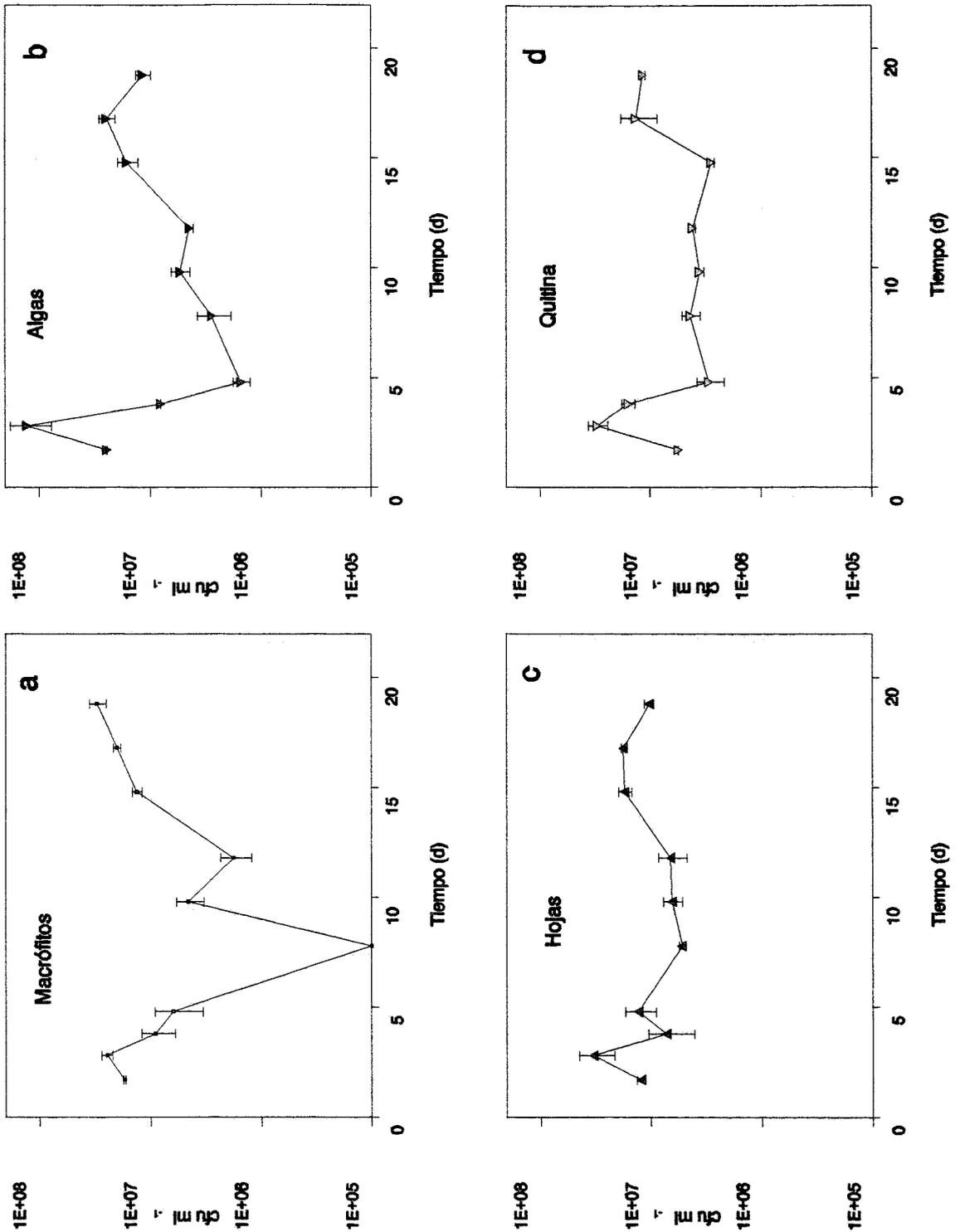


Figura 2.3. Evolución de la concentración de unidades formadoras de colonias en los tubos que contenían macrófitos (a), algas (b), hojas (c), y quitina (d).

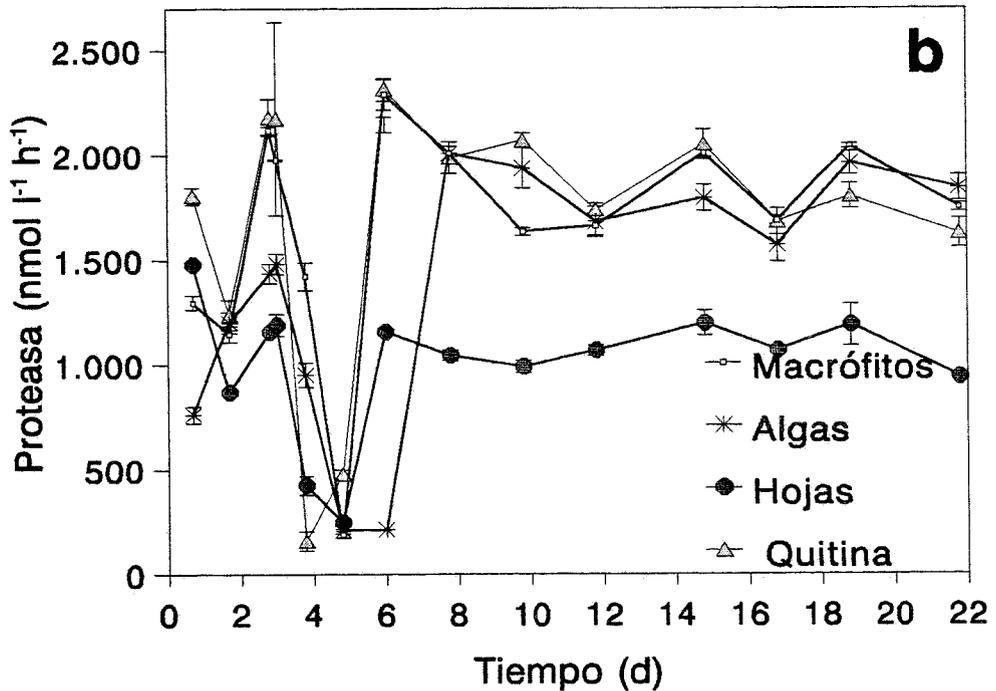
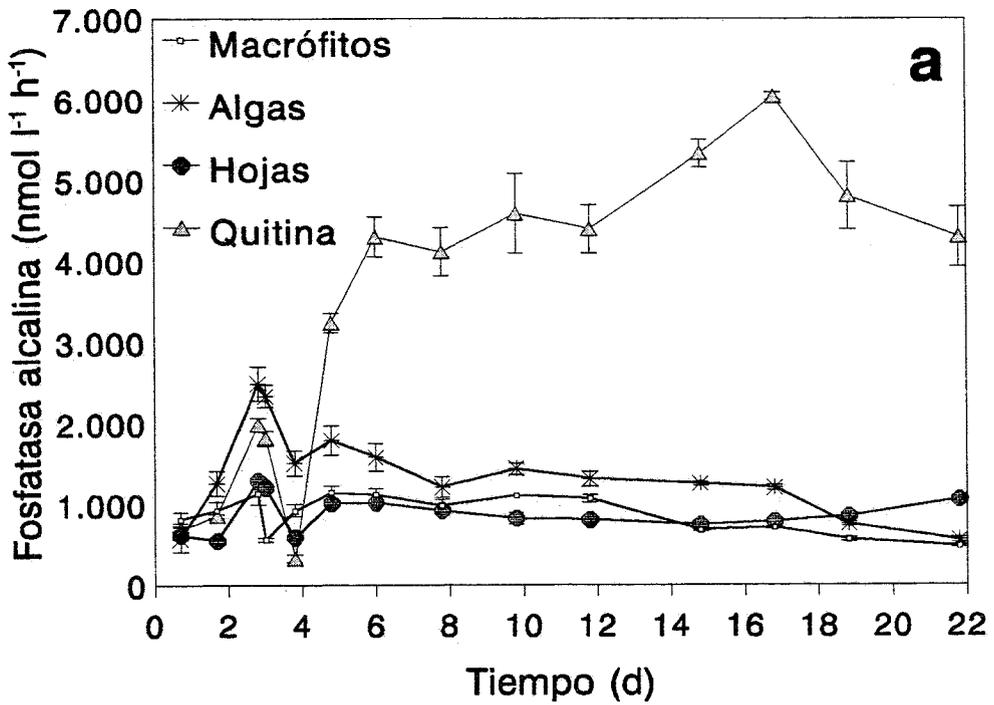


Figura 2.4. Evolución de las actividades de fosfatasa alcalina (a) y proteasa (b) en los diferentes tratamientos. Las barras indican el error estándar (n=4).

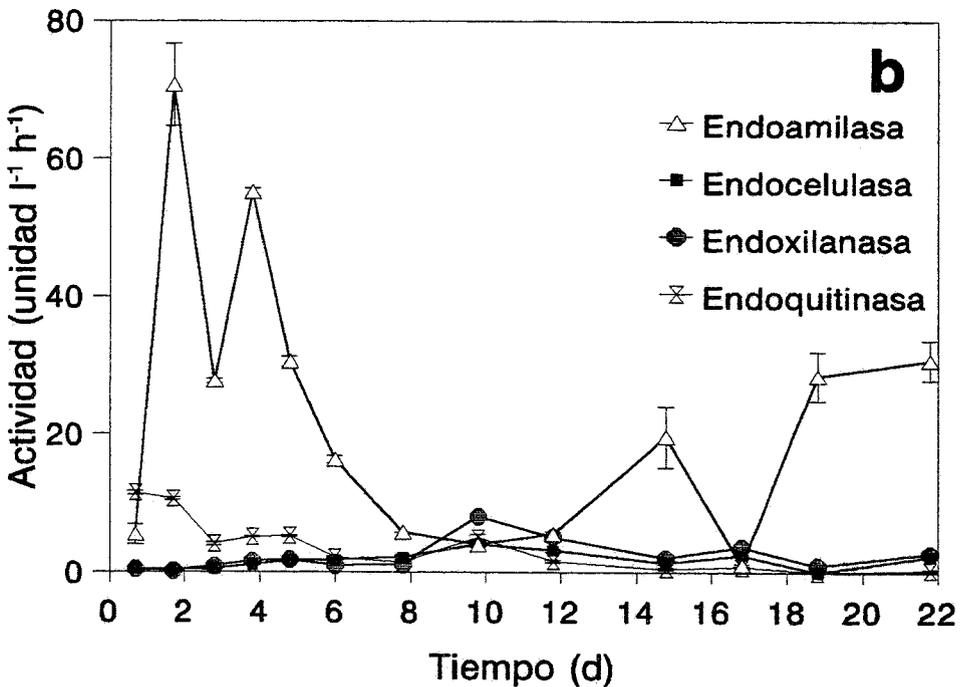
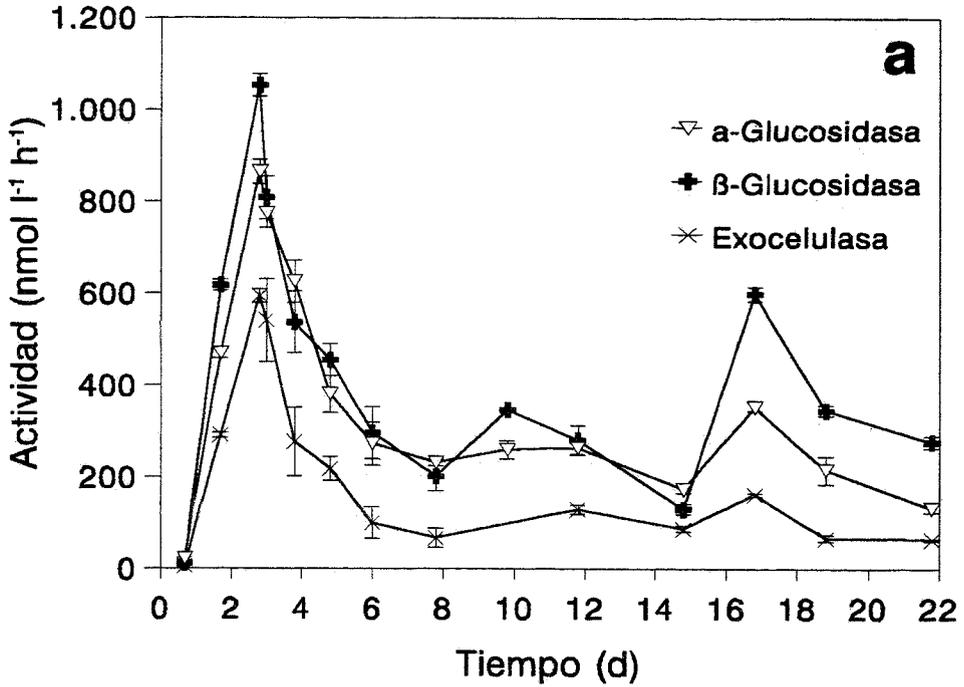


Figura 2.5. Evolución de las actividades de glucosidasas y exocelulasa (a) y de endoenzimas (b) en los enriquecimientos con polvo de macrófitos, como media de las dos réplicas. Las barras indican el error estándar ($n=4$)

La hidrólisis de polisacáridos de macrófitos (Fig 2.5) puede dividirse en dos etapas, que coinciden con las definidas a partir de los recuentos de ufc. Al inicio del experimento, se observa un aumento de las actividades de α -, β -glucosidasa y de exocelulasa que llegan al máximo simultáneamente al tercer día de incubación. Su actividad inicia entonces una disminución que llegará a su mínimo el día 8. A partir de ese día las actividades se mantienen estables hasta el final del experimento, siendo siempre ligeramente superior la actividad de β - que la de α -glucosidasa, y la de exocelulasa la menor.

El desarrollo de los endoenzimas también puede dividirse en las mismas etapas. La primera se ve caracterizada por la dominancia de la actividad de la endoamilasa (que llega a alcanzar las 60 unidades $l^{-1} h^{-1}$), que concluye el día 8. A partir de ese día, aumenta la importancia relativa de endocelulasa, endoxilanas y endoquitinasa, aunque en ningún momento superan las 10 unidades $l^{-1} h^{-1}$. Hacia el final del experimento, se observan oscilaciones de la actividad amilolítica de mayor intensidad.

La degradación de detritus de macrófito ha sido estudiada con más detalle en el capítulo 3, que muestra una sucesión de actividades similar a la observada en este experimento, y además se incluyen el seguimiento de la concentración de algunos nutrientes y de peso seco durante la incubación.

2.3.2. Algas

Al igual que en los enriquecimientos con macrófitos, las bacterias que crecieron con detritus de fitoplancton presentaron un crecimiento rápido hacia el inicio (día 3) y que fue decayendo aunque de manera menos drástica hasta valores alrededor de $1 \cdot 10^6$ ufc ml^{-1} ya durante el quinto día de incubación (Fig. 2.3). Pasado el corto período de bajas concentraciones, las poblaciones microbianas volvieron a crecer de manera lenta.

La actividad de fosfatasa alcalina y proteasa (Fig. 2.4) alcanzaron una actividad cercana a los 2000 $nmol l^{-1} h^{-1}$. Esta última, sin embargo, apenas fue detectada en el periodo entre el día 3 y el 6 de incubación, cuando alcanzó los 100 $nmol l^{-1} h^{-1}$. Como sucedía en el caso de los macrófitos, el desarrollo de las

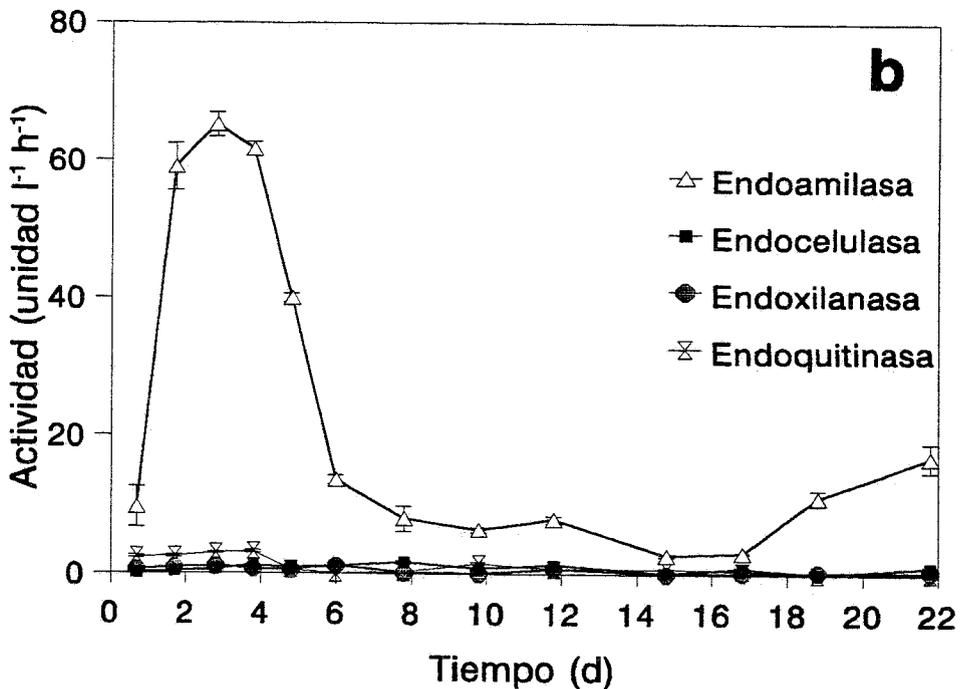
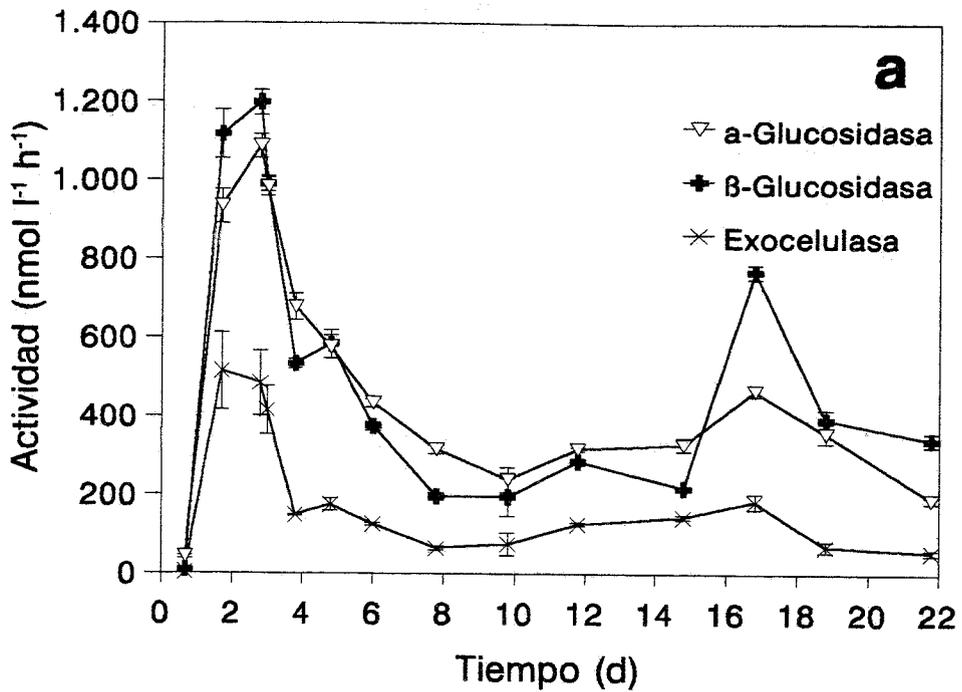


Figura 2.6. Evolución de las actividades ectoenzimáticas en los enriquecimientos con algas. Se indica, mediante barras verticales el error estándar ($n=4$).

actividades de degradación de carbohidratos (Fig. 2.6) puede dividirse en dos etapas separadas por el tiempo en el que se encuentra una concentración momentánea mínima de ufc (hacia el día 4). La primera etapa se caracteriza por la elevada actividad especialmente de la endoamilasa, que alcanza las 60 unidades $l^{-1} h^{-1}$. Tras el descenso, ésta se estabiliza y sigue siendo prácticamente la única actividad endoenzimática de las estudiadas presente en el cultivo.

Durante la primera etapa, se observa también un incremento de actividades glucosídicas en la que pareció dominar ligeramente la β -glucosidasa, con diferentes intensidades en ambos enriquecimientos. En la segunda etapa, sin embargo, se produjo una estabilización de las actividades, pasando a ser dominante entonces la actividad α -glucosídica.

2.3.3. Hojas

La concentración de ufc en los enriquecidos con polvo de hojas secas no presentó grandes oscilaciones en el tiempo (Fig. 2.3), siendo, excepto en un par de ocasiones, cercana a $1 \cdot 10^7$ ufc ml^{-1} .

La actividad de fosfatasa alcalina tiene un máximo inicial a los 3 días, se produce un descenso y luego un rápido aumento hasta cerca de 1000 nmol $l^{-1} h^{-1}$ que se mantiene hasta el final del experimento, y es similar a la de la proteasa. Al igual que en los otros tratamientos, existe un mínimo de actividad proteolítica durante un periodo que en este caso comprende el cuarto y el quinto día de incubación (Fig. 2.4).

El desarrollo de actividades de hidrólisis de carbohidratos (Fig. 2.7) fue algo más lento que en los enriquecimientos con algas y macrófitos, y las actividades que se alcanzaron fueron inferiores. Como en los casos anteriores, la endosacaridasa dominante fue la endoamilasa que, con valores inferiores a 50 unidades $l^{-1} h^{-1}$, fue la más alta durante todo el periodo de estudio. Al inicio, sin embargo, al igual que ocurría en los tubos con macrófitos, se observó una cierta actividad quitinolítica (<10 unidades $l^{-1} h^{-1}$) que descendió a medida que avanzaba el experimento. Tras el pico de endoamilasa aparecen simultáneamente los máximos iniciales de las actividades α -, y β -glucosidasa y después de

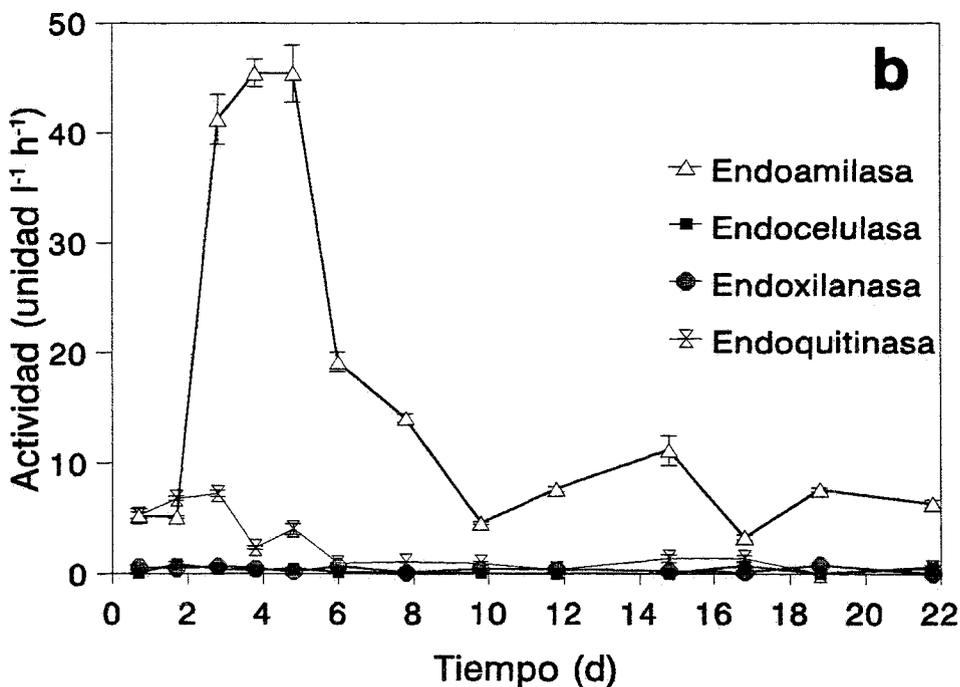
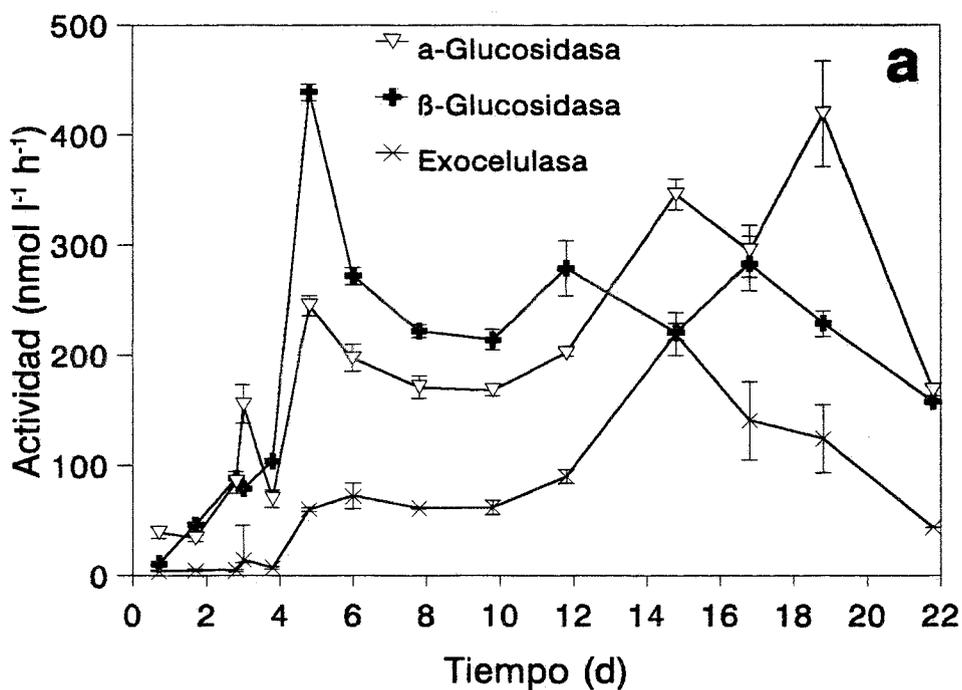


Figura 2.7. Evolución de las actividades glucosidasas y exocelulasas (a) y endoenzimas (b) en los enriquecimientos con hojas de chopo. Las barras verticales muestran el error estándar (n=4).

exocelulasa, cuyas actividades no disminuyen después drásticamente, sino que se mantienen en el nivel alcanzado, y en algunos casos vuelve a aparecer un nuevo máximo unos 10 días después.

2.3.4. Quitina

En los enriquecimientos con quitina se produjo un crecimiento bastante bajo ya que la concentración de ufc's solamente fue superior a $1 \cdot 10^7$ ufc ml^{-1} durante el máximo ocurrido a los 2 y 3 días de incubación (Fig. 2.3).

La actividad proteolítica (Fig. 2.4) presentó, al igual que la abundancia, una cierta estabilidad en el tiempo, con valores cercanos a $2000 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, similares o superiores a los otros tratamientos, donde además crecieron un mayor número de bacterias, siendo con quitina, la actividad específica por tanto mucho mayor. Mucho más clara es la diferencia observada en el caso de la fosfatasa alcalina, ya que ésta actividad es durante la mayor parte del experimento entre dos y tres veces superior a la observada en enriquecimientos con detritus vegetales

Si bien en este caso la actividad amilolítica fue también la más importante de las actividades endoenzimáticas estudiadas, aparece también la actividad quitinolítica, aproximadamente al mismo tiempo, pero con una actividad algo inferior (Fig. 2.8). El máximo de glucosidasas se observa el tercer día, y, a diferencia de los casos ya descritos, es anterior al de endoamilasa. En este primer máximo las actividades de α - y β -glucosidasa son comparables, y pasado éste, desciende la actividad de β -glucosidasa, mientras que la de α -glucosidasa se mantiene con valores muy altos, llegando a representar en algunos momentos el doble de la β -glucosidasa.

2.3.5. Poblaciones microbianas

No tan solo fueron examinadas el número total de unidades formadoras de colonias, sino también se contaron el número de colonias capaces de degradar

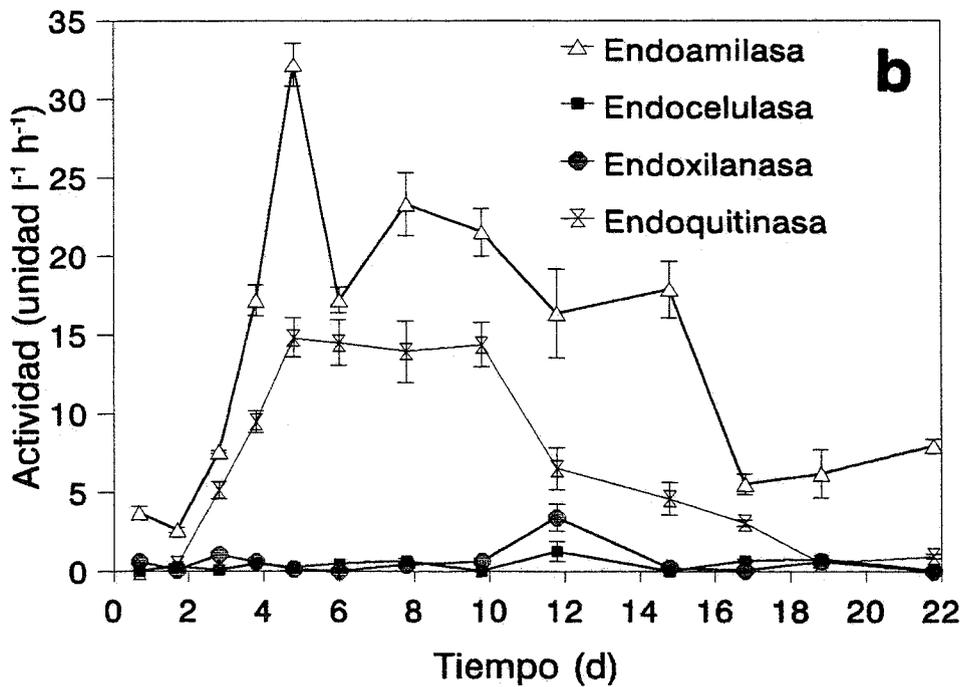
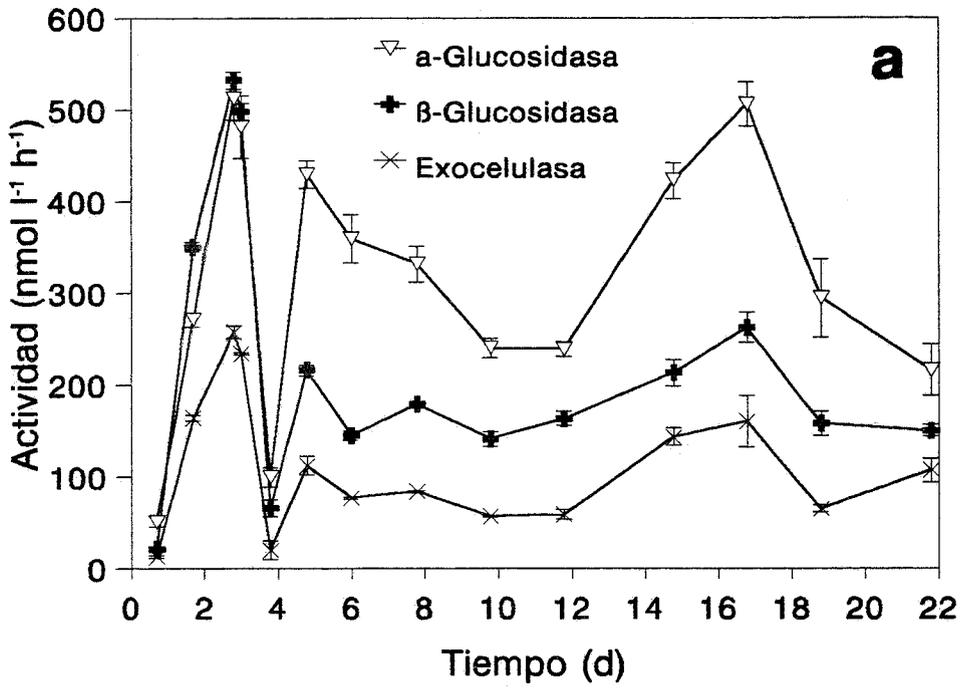


Figura 2.8. Evolución de las actividades glucosidasas y exocelulasa (a) y endoenzimas (b) en los tratamientos con quitina. El error estándar se indica mediante barras verticales ($n=4$).

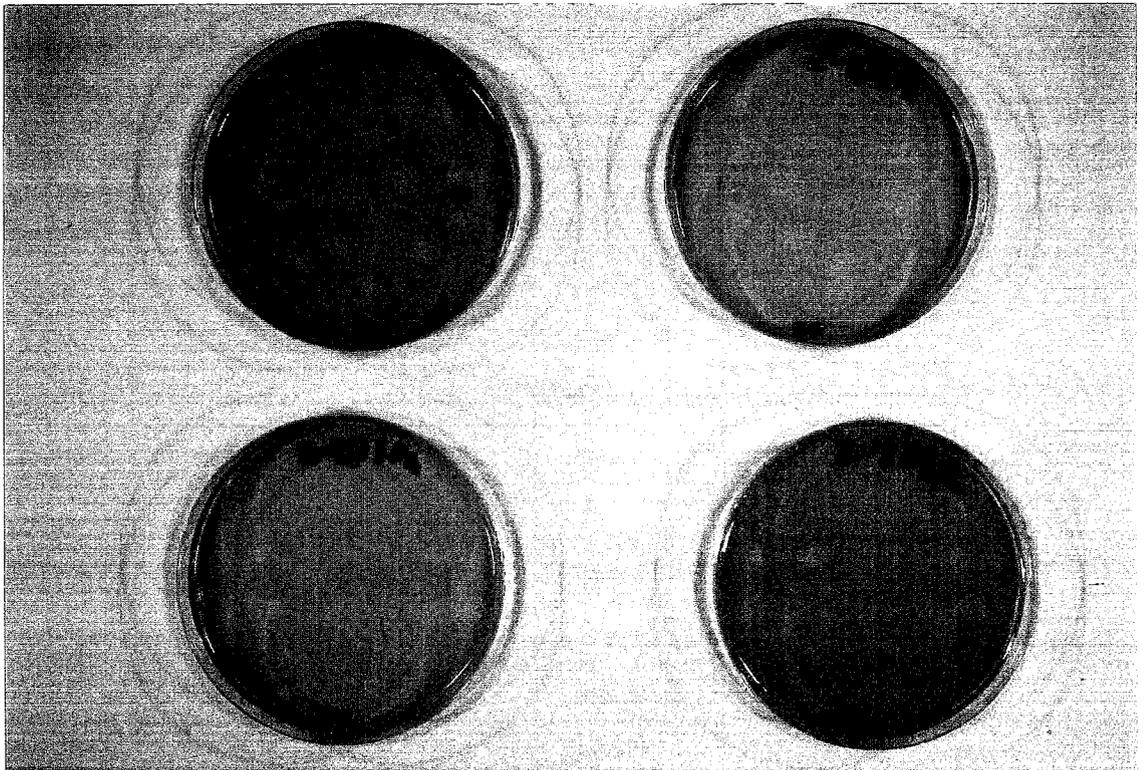
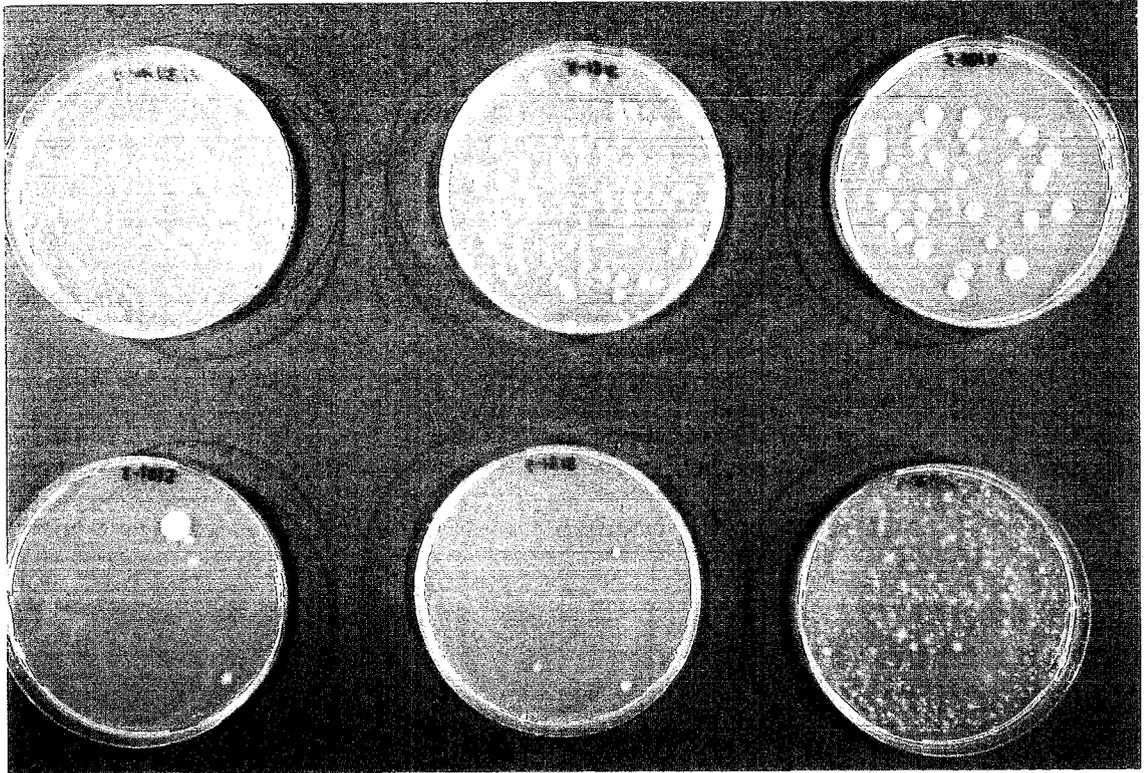


Figura 2.9. Aspecto de las placas en las que se hicieron los recuentos del número total de bacterias (a) y de las que se utilizaron las que eran capaces de hidrolizar cada uno de los sustratos (b)

Tabla 2.1a. Evolución del número de unidades formadoras de colonias capaces de degradar los distintos sustratos en los tratamientos con macrófitos y algas.

Macrófitos								
TIEMPO (d)	Amilolíticos		Celulolíticos		Xilanolíticos		Quitinolíticos	
	A	B	A	B	A	B	A	B
2	>1E5	>1E4	<1E4	<1E4	<1E4	<1E4	<1E4	<1E4
3	2,00E6	2,70E6	<1E6	<1E6	<1E6	<1E6	<1E6	<1E6
4	1,60E6	1,40E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5
5	3,00E5	<1E6	<1E5	<1E6	<1E5	<1E6	<1E5	<1E6
8	<1E6	2,00E5	5,00E5	<1E6	1,00E5	<1E6	1,00E5	<1E6
10	1,50E5	3,70E5	1,30E4	4,00E4	<1E4	<1E4	2,00E4	3,30E4
12	3,70E5	5,00E4	2,00E4	2,00E3	9,00E4	3,00E3	4,40E5	2,10E4
15	2,00E5	1,00E4	1,00E4	<1E4	<1E5	<1E4	5,00E4	6,00E4
17	>1E4	4,00E5	2,00E5	5,00E5	1,10E5	1,00E5	2,80E5	7,00E5
19	2,00E4	1,20E5	3,00E4	<1E4	<1E4	<1E4	<1E4	2,00E4

Algas								
TIEMPO (d)	Amilolíticos		Celulolíticos		Xilanolíticos		Quitinolíticos	
	A	B	A	B	A	B	A	B
2	>1E4	>1E4	<1E4	<1E4	<1E4	<1E4	<1E4	<1E4
3	2,50E7	8,00E6	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	8,00E6	4,00E6
4	5,00E5	2,50E6	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	2,00E5
5	<1E6	2,00E6	<1E6	<1E5	<1E6	<1E5	<1E6	<1E5
8	1,00E5	1,00E5	<1E5	<1E5	1,00E5	5,00E5	1,00E5	<1E5
10	3,70E5	2,50E5	2,40E4	<1E4	<1E3	<1E4	6,00E4	6,00E4
12	3,6E5	3,60E5	5,00E4	2,00E5	<1E4	3,00E4	4,40E6	1,00E4
15	2,1E6	2,00E5	<1E4	5,00E5	<1E4	7,00E4	3,00E5	4,50E5
17	>1E5	>1E5	1,60E6	1,60E6	8,00E4	1,20E5	1,60E6	4,00E5
19	1,00E6	5,00E4	8,00E5	9,00E4	5,00E4	<1E4	1,30E6	2,00E4

Tabla 2.1b. Evolución del número de unidades formadoras de colonias capaces de degradar los distintos substratos en los tratamientos con hojas y quitina.

Hojas								
TIEMPO (d)	Amilolíticos		Celulolíticos		Xilanolíticos		Quitinolíticos	
	A	B	A	B	A	B	A	B
2	>1E4	>1E4	>1E4	>1E4	>1E4	<1E4	>1E4	<1E4
3	9,00E5	3,00E6	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	1,00E5	2,00E5
4	1,20E5	1,30E6	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	7,00E5	1,00E5
5	1,30E6	5,00E6	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5
8	1,00E6	1,90E6	<1E5	<1E5	<1E5	3,00E6	<1E5	<1E5
10	2,00E5	3,00E5	<1E3	<1E3	<1E3	<1E3	2,00E4	6,00E4
12	2,40E5	5,00E5	<1E3	<1E3	<1E3	<1E3	2,80E4	1,90E4
15	9,00E5	9,00E5	4,00E4	7,00E4	7,00E5	<1E4	7,00E4	9,00E4
17	>1E5	>1E5	>1E4	8,00E5	9,00E5	1,00E5	1,30E5	1,60E6
19	5,00E5	1,40E6	8,00E4	9,00E4	1,00E5	1,00E5	<1E4	9,00E4

Quitina								
TIEMPO (d)	Amilolíticos		Celulolíticos		Xilanolíticos		Quitinolíticos	
	A	B	A	B	A	B	A	B
2	>1E4	>1E4	<1E4	<1E4	<1E4	<1E4	>1E4	>1E4
3	9,00E6	5,00E6	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	8,00E5	1,80E6
4	1,00E6	3,00E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5
5	8,00E5	1,10E6	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5
8	2,80E6	1,10E6	<1E5	<1E5	<1E5	<1E5	1,00E5	1,00E5
10	3,50E5	3,20E5	4,00E4	<1E4	3,00E4	6,00E4	2,90E5	1,60E5
12	5,70E4	3,6E5	<1E3	3,00E3	1,00E4	<1E3	2,50E5	1,00E5
15	1,90E6	1,00E5	2,30E5	<1E4	9,00E4	<1E4	2,00E5	2,70E5
17	>1E5	6,00E5	2,00E5	3,00E5	1,00E5	3,00E5	3,40E6	1,60E6
19	1,40E6	1,20E5	2,00E5	4,00E4	1,20E5	<1E4	4,00E5	3,00E4

los polisacáridos estudiados. En la figura 2.9 se muestra una imagen de las placas en las que se contó el número total de colonias, así como de las placas en las que se detectaron las bacterias hidrolíticas mediante de la detección de un halo alrededor. La escasa coloración de las placas que contenían xilano y a veces también de celulosa, hizo que fuera difícil la identificación de los halos transparentes en las colonias que hidrolizan este sustrato. Si bien fueron sembradas diariamente dos diluciones de cada uno de los cultivos para cada uno de los sustratos, en algunos casos no fue posible efectuar los recuentos, debido a una excesiva o a una poca dilución de las muestras (Tab.2.1).

En general se observa que el primer máximo de ufc's se debe a bacterias amilolíticas, que tras este pico suelen mantenerse en unas concentraciones bastante más bajas. Durante este período de predominio de las bacterias amilolíticas, las bacterias celulolíticas, xilanolíticas o quitinolíticas presentaron siempre concentraciones no detectables ($< 1 \cdot 10^5$ ufc's ml⁻¹). La sucesión de actividades en la degradación de las hojas, fue en general más lenta, lo que también se ve reflejado en la sucesión de poblaciones. Si bien aparece un primer pico de bacterias amilolíticas, éste se mantiene durante más tiempo.

Los resultados indican que cuando disminuye la intensidad del máximo de población amilolítica, aparecen, en algunos casos poblaciones bacterianas con diferentes capacidades degradativas que conviven hasta el final del experimento. Así pues, parece que la aparición de un máximo de actividades se corresponde con un aumento del número de bacterias capaces de producir ese enzima, y que no se trata de una elevada producción del enzima por parte de las células ya existentes.

Las bacterias amilolíticas fueron siempre las más abundantes, incluso en los enriquecimientos con quitina donde la actividad quitinolítica fue muy superior que en otros tratamientos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las bacterias amilolíticas representaron alrededor de tan solo un 10 % y nunca más de un 50 % del total de ufc's contadas.

Algunas de las colonias que aparecieron en las placas fueron aisladas para conocer algo más acerca de las poblaciones que crecen durante la degradación

Tabla 2.2. Descripción de algunas de las colonias aisladas de los enriquecimientos, así como de su capacidad de degradación de polisacáridos.

COLONIA	PROCEDECENCIA (DÍA)	COLOR COLONIA	MORFOLOGÍA (MOTILIDAD)	DEGRAD. ALMIDÓN	DEGRAD. CELULOSA	DEGRAD. XILANO	DEGRAD. QUITINA
A	Macrófitos (?)	Amarilla	Cocos (+)	+	+	?	+
B	Algas (8)	Amarilla	Bacilococos (+)	+	+	?	?
C	Macrófitos (4)	Amarilla	Bacilos (+)	+	-	?	-
D	Macrófitos (3)	Blanca	Bacilococos (+)	+	?	?	+
E	Macrófitos (3)	Verde	Bacilococos (+)	-	-	-	-
F	Hojas (4)	Amarilla	Cocos (-)	+	?	?	-
G	Algas (15)	Blanca	Cocos (-)	-	+	-	-
H	Algas (4)	Naranja	Cocos (+)	+	-	+	+
I	Macrófitos (12)	Blanca	Bacilococos (+)	+	+	?	+
J	Hojas (8)	Blanca	Bacilococos (+)	+	-	-	+
K	Quitina (4)	Blanca	Bacilococos (+)	?	?	?	+
L	Quitina (12)	Amarilla	Bacilococos (+)	+	+?	+?	+
M	Algas (5)	Blanca	Cocos (+)	+	-	-	+
N	Macrófitos (3)	Naranja	Cocos (-)	-	-	?	+
O	Algas (5)	Amarilla	?	-	-	?	+
P	Macrófitos (3)	Amarilla	Cocos (+)	+	-	-	-
Q	Macrófitos (12)	Amarilla	Bacilos (-?)	+	-	-	-
R	Macrófitos (12)	Blanca	Cocos (+)	+	-	-	-
S	Quitina (10)	Blanca	Cocos (+)	+	+	?	+
T	Algas (12)	Blanca	Bacilos (+)	?	?	?	?

de los diferentes tipos de detritus estudiados. Los resultados se presentan en la tabla 2.1. La mayoría de las colonias poseen la capacidad de degradar almidón. Esta capacidad la comparten simultáneamente con la de degradar otros tipos de polisacáridos, normalmente de quitina. Es de destacar también la existencia de una colonia (E) incapaz de degradar los azúcares añadidos. La presencia de este tipo de bacterias ha sido ya intuída al calcular el bajo porcentaje que representan las bacterias hidrolíticas respecto al total.

Una vez conocidas las colonias de la tabla, se efectuaron los recuentos de las placas, pero diferenciando cada una de las colonias descritas anteriormente. Los resultados de este análisis de la composición de la población bacteriana para los primeros días de incubación se encuentra en la figura 2.10. Estos muestran que las poblaciones que crecieron con uno u otro substrato natural fueron muy parecidas. Además, parece observarse un predominio inicial de una o pocas bacterias, mientras que a medida que avanza la incubación parece aumentar tipos distintos y favorecer la diversidad en algunos casos.

2.4. Discusión

El elevado crecimiento bacteriano que tuvo lugar en los enriquecimientos, indicado por las elevadas concentraciones de ufc's, muestra que el detritus puede ser una fuente de nutrientes para las bacterias, lo que ya fue observado por diversos autores (Kaushik & Hynes 1971, Sridhar & Bärlocher 1993, Mason 1976, Fenchel 1970). En presencia de todas las fuentes de carbono estudiadas, fue observado un fuerte incremento inicial en la concentración de bacterias como en otros experimentos de degradación de detritus (Tanaka 1991, Oláh 1972, Belova 1993), y no fue detectada la presencia de hongos durante los 28 días de incubación, que suelen aparecer en periodos más avanzados de la descomposición de los detritus, por ejemplo de *Phragmites* (Tanaka 1991). El fuerte crecimiento de bacterias que tuvo lugar durante el inicio de la incubación se produjo probablemente por la utilización del carbono disuelto (DOC) (Oláh 1972), sobretodo de bajo peso molecular, mientras que el particulado (POC) tarda más en ser utilizado, como ocurre durante la degradación de *Peridinium*

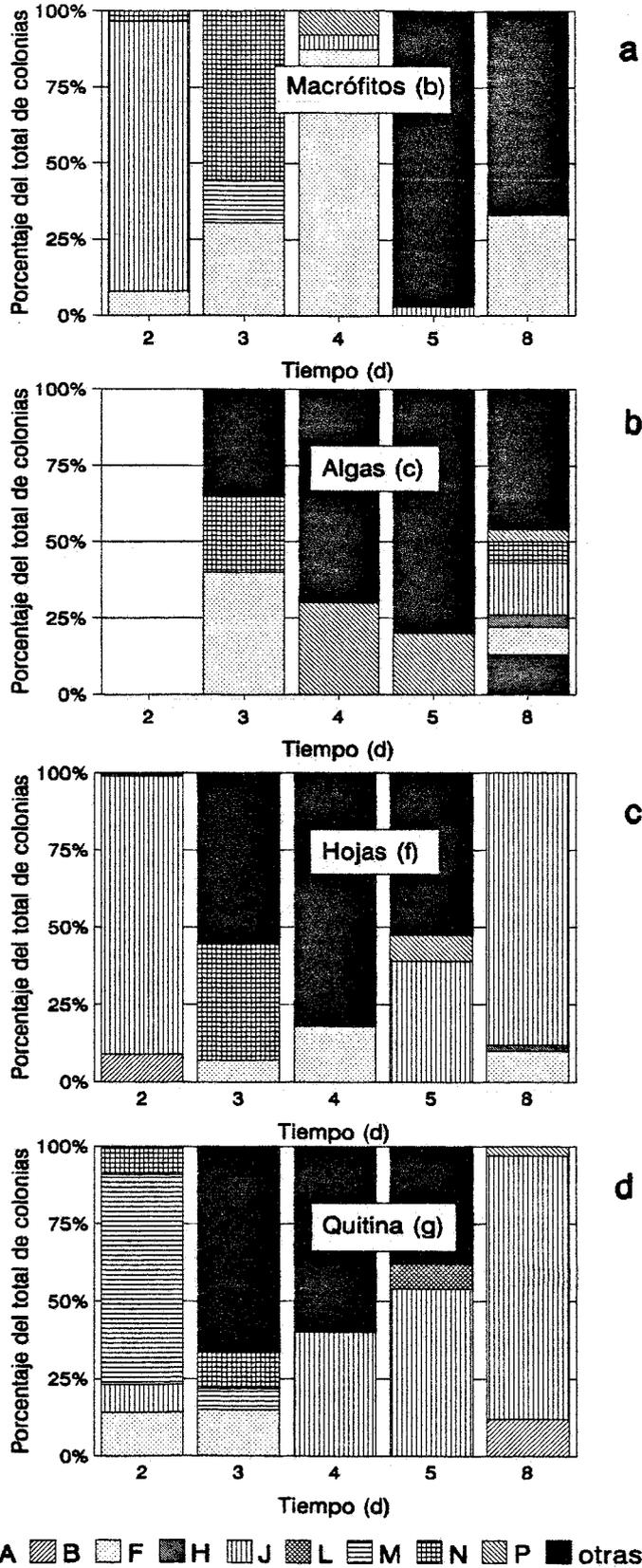


Figura 2.10. Composición de la población bacteriana durante los primeros días del experimento.

(Newell et al. 1981).

Si bien durante el estudio no se tuvo en cuenta la presencia de protozoos, ésta es presumible ya que el inóculo fue filtrado a través de 3 μm de poro con lo que habían podido entrar en el sistema. Su efecto depredador podría ser la causa de la fuerte disminución de la concentración de ufc's entre los 3 y 5 de incubación. Como se observó en el capítulo 3, la presencia de protozoos no afecta el patrón de actividades ectoenzimáticas detectado, tan solo la rapidez de la sucesión de poblaciones y de actividades.

La calidad del detritus añadido puede ser determinante para la aparición de una u otras actividades ectoenzimáticas, incluso entre diferentes géneros de plantas superiores (Hill et al. 1992). Las poblaciones que crecieron con los tres de origen vegetal, macrófitos, algas y hojas secas, presentaron una sucesión e intensidad en las actividades algo diferente a los de la quitina, que tiene un origen animal o fúngico. De entre los endoenzimas estudiados la endoamilasa fue el predominante en todos los casos. Al parecer, los carbohidratos no estructurales, como los azúcares y el almidón son los primeros que se pierden, mientras que los estructurales, que constituyen más de la mitad de la biomasa de las plantas disminuyen más lentamente (Godshalk & Wetzel 1978). De las otras actividades endoenzimáticas, tan solo en presencia de quitina adquirió una importancia similar la quitinolítica. Los enzimas glucosídicos presentaron un máximo inicial tras el cual las actividades volvieron a disminuir en todos los casos. A partir de este momento, en presencia de quitina fue la α -glucosidasa la actividad glucolítica más importante, mientras que con substratos de origen vegetal lo fue la β -glucosidasa. La actividad de fosfatasa alcalina en el tratamiento con quitina alcanzó niveles muy superiores a los otros tratamientos. Esto debe ser muy posiblemente debido a que este sustrato es el único que no contiene fósforo, por lo que existía un fuerte agotamiento de fosforo, y bajo esas condiciones es normal encontrar una fuerte producción de este enzima.

El desarrollo de actividades ectoenzimáticas durante la degradación de detritus vegetales fue muy similar en todos los casos. En general, se observó la misma

sucesión: en los primeros días aparece un pico de actividad α - y β -glucosídica, así como de exocelulasa. Casi simultáneamente aparece un máximo de endoamilasa, que se mantiene durante más tiempo. Estos máximos iniciales de actividades se deben a la utilización preferencial de la DOC comentada anteriormente y que probablemente estaría formada por moléculas de bajo peso molecular (disacáridos u oligosacáridos) y sustancias que se encuentran en el interior de la célula, como almidón.

El tipo de detritus vegetal influyó en la intensidad y la rapidez de la sucesión. La más rápida e intensa se produjo al añadir detritus de algas y de macrófitos, y la más lenta y menos intensa se observó con adiciones de hojas de chopo secas. Una degradación de hojas de *Potamogeton* más rápida en comparación con las de hojas de varios árboles y entre ellos de *Populus* fue observada por Chergui & Pattee (1990), que sugirieron que la colonización bacteriana también debió seguir este orden. Una de las posibles causas de esta diferencia en la colonización puede encontrarse en la distinta concentración de proteínas y de nitrógeno. Enriquez et al. (1993) encontraron una relación lineal y positiva entre las tasas de descomposición y las concentraciones de nitrógeno y fósforo, así como una mejor descomposición del material húmedo que el seco. Las plantas terrestres poseen mayor cantidad de celulosa y lignina, y deben poseer un coeficiente C:N mayor para resistir a los cambios de temperatura y sequedad, razonamiento dado por Polisini & Boyd (1972) para macrófitos flotantes. Las actividades de degradación de polisacáridos estructurales (endocelulasa y endoxilanasas) aparecieron con posterioridad y fueron muy bajas. En una serie de estabilidad, la hemicelulosa ocuparía la primera posición, por delante incluso de la lignina, mientras que la celulosa sería menos estable (Opsahl & Benner 1993). Posiblemente por ello apenas pudo ser detectada actividad xilanolítica (hidroliza el xilano, principal componente de la hemicelulosa), mientras que la de endocelulasa, aunque baja, sí puede apreciarse tras los máximos de glucosidasas y exocelulasa. El hecho que la actividad de endocelulasa aparezca después de la de exocelulasa se debe según Sinsabaugh et al. (1981) a la mayor disponibilidad inicial de carbohidratos lábiles, que hacía que la actividad de endocelulasa estuviera inhibida. Al ser estos agotados, el cociente endocelulasa/exocelulasa aumenta. Esta secuencia de actividades fue también

observada por Belova (1993), y por Sala et al. (1994) durante la degradación de macrófitos.

Las poblaciones que crecieron con los diferentes substratos durante los primeros días de incubación estuvieron formadas básicamente por unos pocos tipos de bacterias. Las colonias conocidas que dominaron durante el inicio de la incubación fueron prácticamente las mismas en todos los enriquecimientos. Durante los días de máxima actividad amilolítica, se detectó la presencia mayoritaria de la colonia de tipo F (Tab. 2.2), capaz de degradar almidón pero no el resto de carbohidratos estudiados. La mayoría de colonias aisladas eran capaces de hidrolizar el almidón y en la mayoría de los casos tenían también otras capacidades hidrolíticas, principalmente de quitina. Incluso durante la fase en que la actividad amilolítica fue la única actividad endoenzimática detectable, las colonias presentes tuvieron capacidad de degradar otros polisacáridos, aunque, sin embargo, parece que no la utilizaron. Algunas de las bacterias con capacidad para hidrolizar celulosa y hemicelulosa pudieron ser del tipo *Cytophaga* o *Pseudomonas*, como detectó Güde (1978) en la degradación de *Potamogeton perfoliatus* en el lago de Constanza, y *Pseudomonas* también se ha encontrado en la degradación de diferentes detritus vegetales (Fukami et al. 1981, Tanaka 1993)

Hay que destacar, sin embargo que las bacterias que predominaron en los experimentos fueron las que eran incapaces de hidrolizar los polisacáridos, que constituyeron por lo general más de un 90 %. Parece pues, que una pequeña parte de la población bacteriana sería responsable de abastecer al resto de bacterias mediante su actividad hidrolítica.

En resumen, la degradación de detritus vegetal sigue un patrón parecido aunque ésta es más lenta con detritus de origen terrestre. Para todos ellos existe una misma secuencia de actividades que indica el orden de utilización de las moléculas. En primer lugar, son consumidos los carbohidratos monoméricos para cuya utilización las bacterias no precisan producir ectoenzimas. Cuando éstos son utilizados, aparecen las actividades de degradación de disacáridos y oligosacáridos, así como del polisacárido almidón, polímero de reserva que se

encuentra en el interior de las células vegetales. Finalmente, aparecen actividades de degradación de polisacáridos estructurales (celulosa y xilano). Las poblaciones bacterianas que intervienen en la degradación son básicamente las mismas, independientemente del tipo de substrato ofrecido y la observación de los tipos de colonias aparecidos sugiere que hay un cambio de una población más homogénea a una con una mayor diversidad. De entre éstas hay algunas capaces de hidrolizar varios polisacáridos, pero la mayoría de ellas no producen las actividades estudiadas y utiliza los productos de la hidrólisis que realizan otras bacterias.

*Wenn alles eben käme,
Wie du gewollt es hast*
Fiedrich de la Motte Fouqués

- CAPÍTULO 3 -

**Factores que afectan la degradación de detritus:
Temperatura y depredación bacteriana por
protozoos**

3.1. Introducción

Los macrófitos constituyen una parte importante de la biomasa de la zona litoral de los lagos (Wetzel et al. 1972) pudiendo llegar a ser la principal fuente de materia orgánica de muchos ecosistemas de agua dulce (Wetzel 1990, Pieczynska 1993). La contribución de los macrófitos a la producción secundaria de las aguas litorales, ocurre sin embargo mayoritariamente a través de la vía de los detritus (Mann 1972). Desde hace ya tiempo, se conoce el papel fundamental que juegan las bacterias en la degradación de los detritus (Mann 1972, Mann 1988, Harrison & Mann 1975) Es especialmente durante la fase inicial, que dura entre uno y dos meses, cuando ocurre la mayor pérdida de peso y se detecta un elevado crecimiento bacteriano (Belova 1993, Tanaka 1991).

Estudios previos (Oláh 1972, capítulo 3) mostraron la existencia de una sucesión de poblaciones bacterianas en la hidrólisis de detritus y la aparición de protozoos que controlan la concentración de bacterias (Sala et al. 1994, Fukami 1985a,b). La influencia de los protozoos en la sucesión de poblaciones bacterianas y actividades ectoenzimáticas que aparecen en la degradación de estos detritus no ha sido hasta ahora estudiada.

Otro de los factores que pueden influir en la descomposición de detritus es la temperatura que parece acelerar el proceso (Kaushik 1971, Godshalk & Wetzel 1978a,b) ya que se observa una más rápida disminución del carbono orgánico disuelto (DOC) y del peso seco. En estos trabajos, sin embargo, no fueron estudiados los efectos a nivel de la población microbiana y de las actividades ectoenzimáticas y que se presumían de importancia debido a la gran influencia de la temperatura en el metabolismo de los lagos.

Para evaluar la influencia de los protozoos y de la temperatura en la degradación de detritus, se prepararon dos experimentos similares al descrito en el capítulo anterior. La temperatura puede afectar la concentración de las poblaciones microbianas y la actividad ectoenzimática de éstas, por lo que la degradación de

detritus transcurrirá posiblemente de manera más lenta a las temperaturas típicas de invierno (5 °C) que a las de verano (20 °C). Los protozoos, mediante su depredación preferente sobre las bacterias libres podran influir en la sucesión de bacterias, lo que también repercutirá posiblemente en la sucesión de actividades observada.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Diseño experimental

Durante otoño fueron recogidos macrófitos mediante buceadores de la especie *Potamogeton pectinatus*, la especie más abundante en el litoral del lago Constanza. Las plantas fueron secadas y reducidas a un polvo muy fino, como se describió en el capítulo 3. Éste fue utilizado como substrato para el crecimiento bacteriano en los dos experimentos.

3.2.1.1. Efecto de la temperatura

Del polvo de macrófitos, fueron añadidos 2,5 g a los recipientes que contenían 5 litros de agua del lago sin tratar. Los recipientes fueron incubados a dos temperaturas diferentes, 5 y 20 °C, habiendo sido hechas dos réplicas para una de ellas. La temperatura fue estabilizada mediante un termostato. La incubación transcurrió durante aproximadamente un mes, en que los recipientes se mantuvieron en luz tenue y en constante aireación. El diseño del experimento se encuentra esquematizado en la figura 3.1.

3.2.1.2. Efecto de los protozoos

En cada uno de los recipientes se añadieron 100 mg del polvo de macrófitos que habían sido previamente calentados a 100 °C durante 30 minutos para destruir

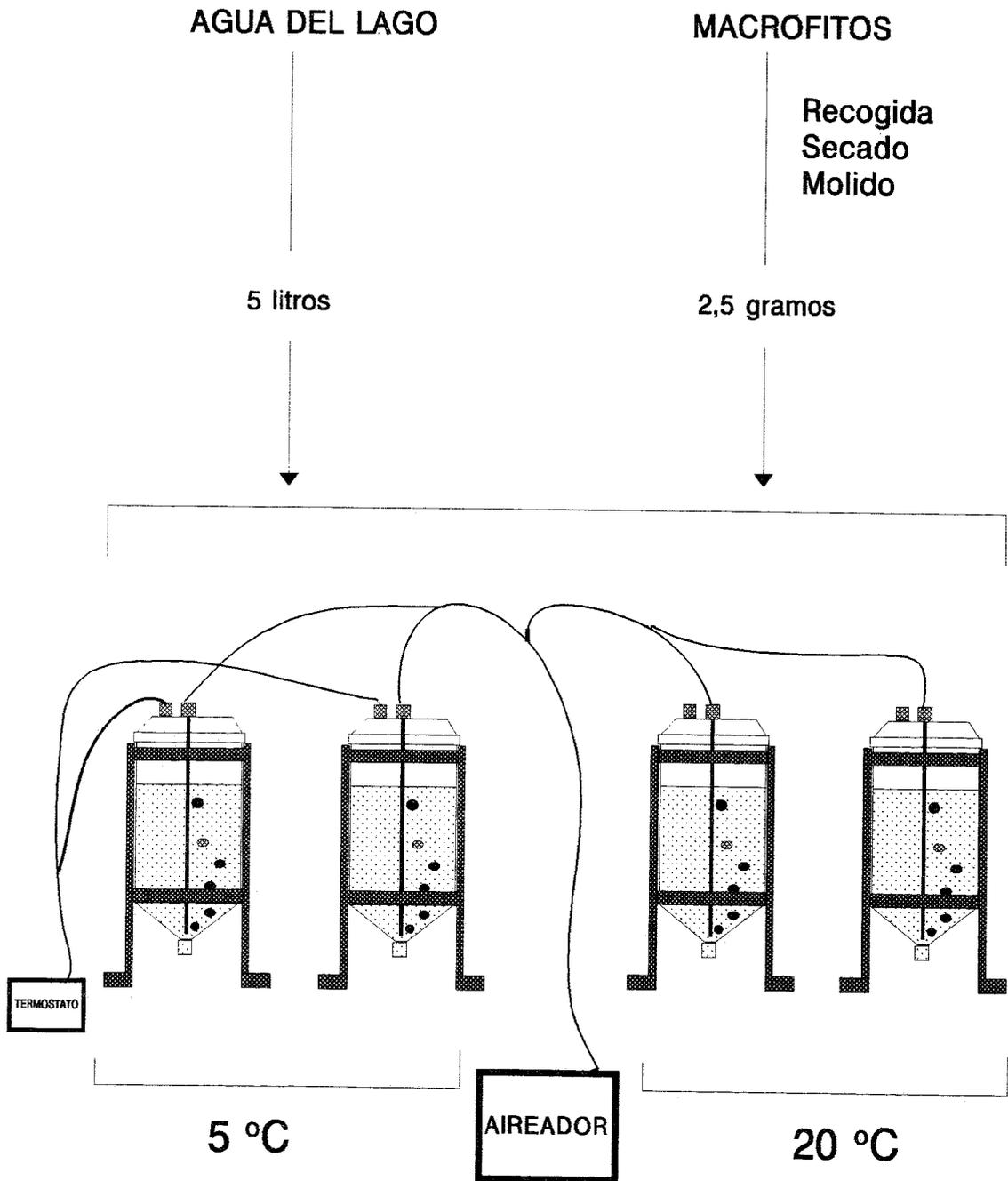


Figura 3.1. Diseño de experimento para evaluar el efecto de la temperatura.

los posibles quistes de ciliados. Además se añadieron 200 ml de agua del litoral del lago Constanza filtrada a través de 0,2 μm para evitar la presencia de microorganismos. El inóculo utilizado, fue diferente para los controles y las muestras: se añadieron 20 ml de agua filtrada a través de filtros Nuclepore de 3 μm de diámetro de poro en las muestras (para conocer el efecto de los flagelados), y de 1 μm en el caso del control, para evitar la presencia de protozoos. El diseño del experimento se encuentra esquematizado en la figura 3.2. La incubación se llevó a cabo durante un mes a 20 °C y en luz tenue.

3.2.2. Métodos

En ambos experimentos se siguieron tanto la concentración de los microorganismos, como varias actividades ectoenzimáticas, que fueron elegidas al ser consideradas importantes para la degradación de detritus de origen vegetal (véase capítulo 2): la α -glucosidasa y β -glucosidasa que degradan disacáridos de la hidrólisis de almidón y celulosa, respectivamente. Exocelulasa rompe oligómeros de celulosa. Endoamilasa, endoxilanasas y endocelulasa son endoenzimas, y por tanto hidrolizan polímeros, de almidón, xilano y celulosa. Para la determinación de la actividad de los endoenzimas se utilizó un método espectrofotométrico (Wirth & Wolf 1990) mientras que para el resto, uno basado en el uso de sustratos fluorogénicos (Schmitt-Biegel & Obst 1989)

La abundancia de bacterias y la de protozoos fueron examinadas mediante recuento directo por epifluorescencia previa tinción de la muestra con DAPI (Porter & Feig 1980) como descrito anteriormente.

En el experimento para conocer el efecto de la temperatura se contó el número de protozoos presentes y además fueron diferenciados en entre los pertenecientes a tres grupos diferentes: flagelados heterotróficos, ciliados y amebas. Además fue calculado su biovolumen mediante su medición y la comparación de su morfología a cuerpos geométricos conocidos.

Además, fueron seguidos también una serie de parámetros químicos como el peso seco, la concentración de fósforo disuelto total (TDP), y la concentración de nitrógeno particulado (PON) y carbono tanto disuelto (DOC) como

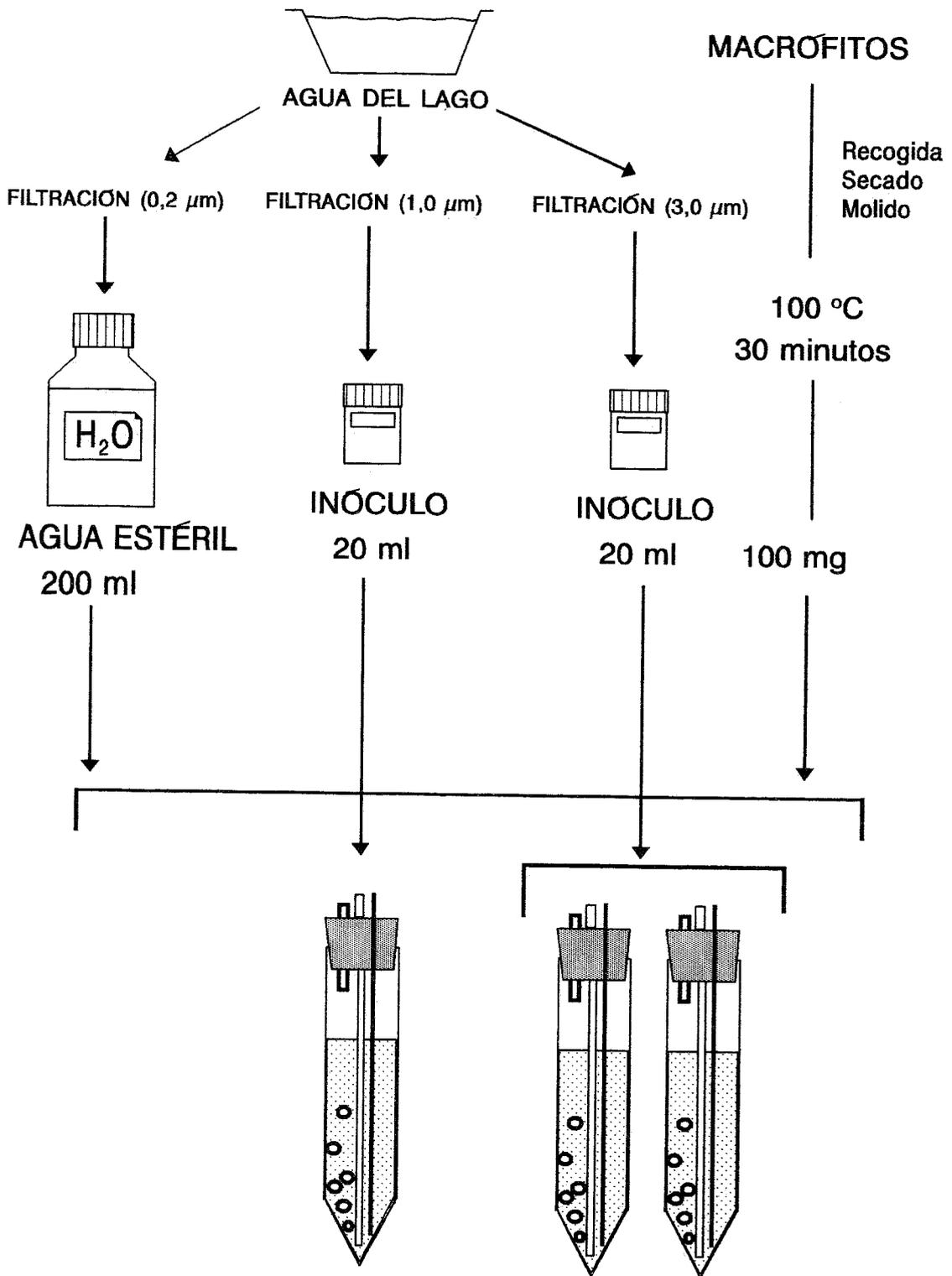


Figura 3.2. Diseño de experimento para evaluar el efecto de la depredación de protozoos sobre las bacterias.

particulado (POC).

3.3. Resultados

3.3.1. Efecto de la temperatura

3.3.1.1. Peso seco

El material de tipo macrofítico añadido en los recipientes experimentó una pérdida de peso durante 42 días. Durante esta degradación pueden diferenciarse tres fases (Fig. 3.3). Inicialmente no existe una pérdida de peso apreciable, sino

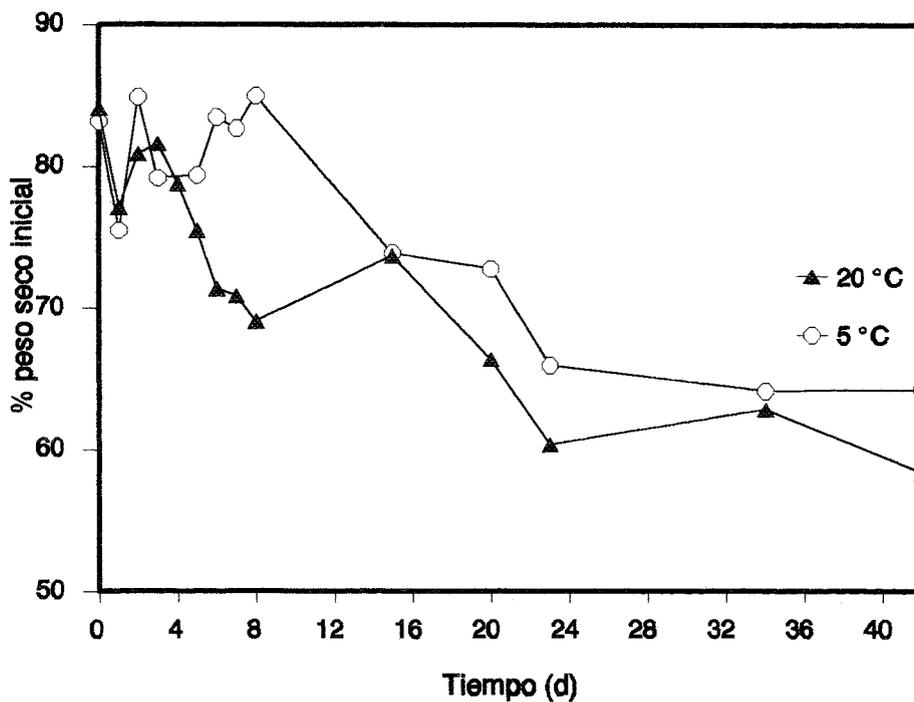


Figura 3.3. Pérdida de peso en los enriquecimientos a 5 y 20 °C, expresada como % del peso seco inicial restante.

unas pequeñas oscilaciones, quizás producto de la diferente colonización bacteriana. Pasada esta fase, empieza una disminución rápida del peso, de aproximadamente el 25 % del peso inicial. Posteriormente, el peso se estabiliza hasta el final del experimento. La temperatura a la que se incubaron los recipientes influyó en la velocidad de descomposición. A 20 °C, el proceso es más rápido, ya que la fase de latencia es más corta (unos 4 días), mientras que a 5 °C dura unos 10 días. En el espacio de tiempo considerado (80 días) la pérdida de peso que se alcanza se sitúa alrededor de un 45 % del peso inicial a 20 °C, mientras que a 5 °C ésta es del 35 %.

Independientemente de la temperatura, hay una importante pérdida de peso no causada por microorganismos sino debida a la solubilización del sustrato (lixiviación) y que representa la pérdida de un 15 % del peso inicial.

3.3.1.2. Parámetros químicos

El carbono orgánico disuelto (DOC) estuvo presente al inicio en una concentración cercana a 9,5 mg l⁻¹. En los recipientes a 20 °C, la concentración de DOC mostró un drástico descenso al inicio del experimento, hasta cerca de la mitad de la concentración inicial durante los días 3 al 6. Pasado este período, la concentración aumenta y se mantiene en valores cercanos a 6 mg l⁻¹ hasta el día 15 en que inicia un nuevo descenso hasta 4,6 mg l⁻¹ que se mantiene hasta el final del experimento. La curva a 5 °C sigue un patrón muy parecido al comentado anteriormente, aunque cada una de las fases es más larga que a la temperatura superior (Fig 3.4a).

El desarrollo de la concentración de fósforo total disuelto (TDP) fue muy parecido a la del carbono total disuelto (Fig. 3.4b). Tras el descenso inicial a 20 °C de una concentración de 2 mg l⁻¹ hasta valores inferiores a 1 mg l⁻¹ del día 2 al 8, se observa un rápido aumento con la concentración de hasta el día 15 cuando ésta supera los 2 mg l⁻¹ y permanece así hasta el día 80. A 5 °C, la concentración de TDP siguió la misma curva que a 20 °C pero bastante más lenta. El descenso inicial no fue inmediato, sino que se retrasó unos 4 días y el posterior aumento fue mucho más lento, e incluso en los 60 días estudiados no

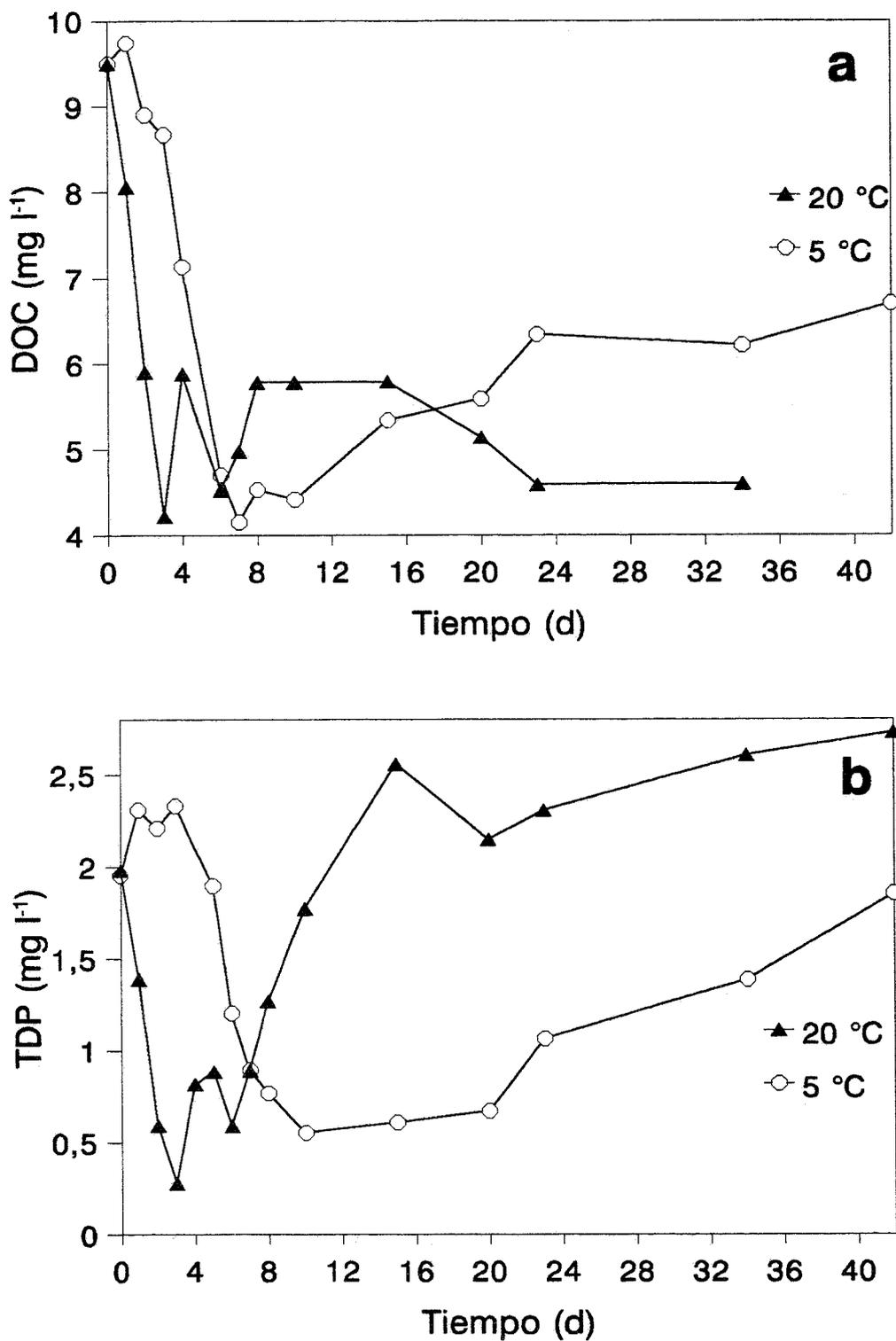


Figura 3.4. Evolución de la concentración de carbono orgánico disuelto, DOC, (a) y del fósforo total disuelto, TDP, (b) en los tratamientos a 20 y 5 °C.

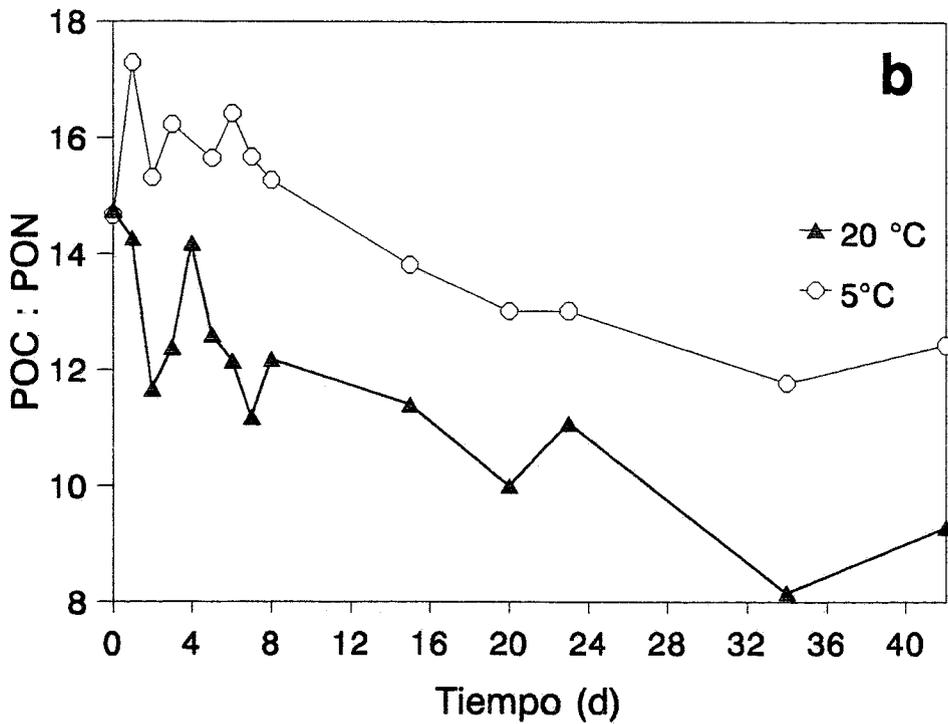
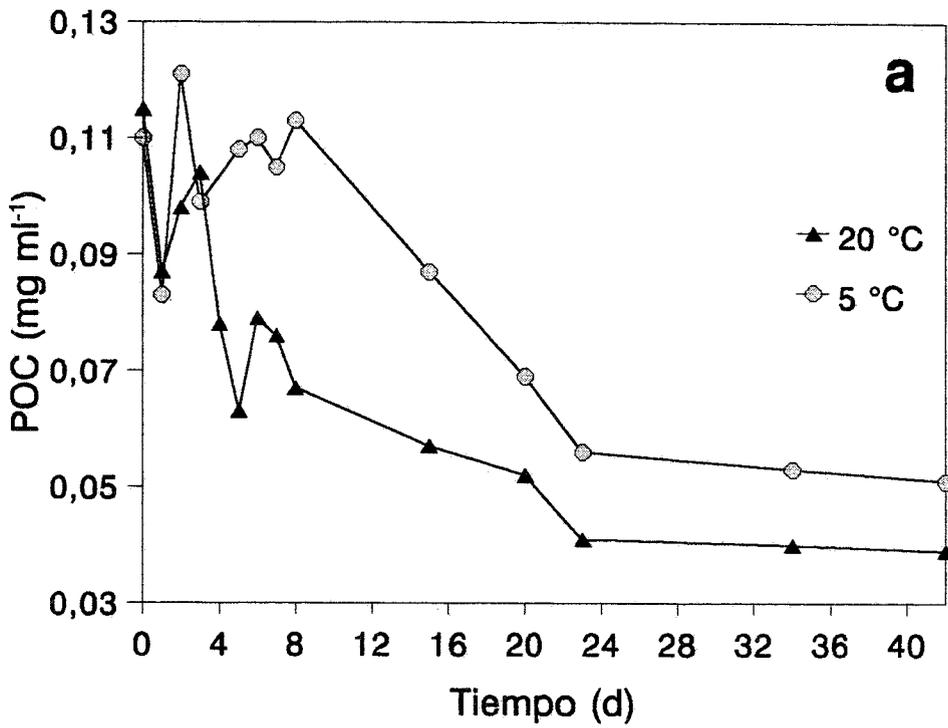


Figura 3.5. Concentración de carbono orgánico particulado, POC, (a) y de la relación de éste con la de nitrógeno, POC:PON, (b) a las temperaturas estudiadas.

se alcanzó el máximo que ya fue observable a los 15 días a 20 °C.

La concentración de carbono orgánico particulado (POC) reflejó la de la pérdida de peso seco (Fig. 3.5a). La disminución de la concentración inicial sucede como mínimo cuatro días antes a 20 que a 5 °C. Además, las concentraciones en las que se mantiene tras el descenso, son superiores a 5 que a 20 °C (alrededor de 0,5 y 0,4 mg ml⁻¹, respectivamente). Más importante que la concentración de POC, es la relación entre el carbono y el nitrógeno, que se representa en la figura 3.5b. Este cociente tiene un valor de 15 aproximadamente al inicio del experimento, y desciende con el tiempo aunque de manera más rápida durante el primer mes. Pasado este tiempo, el cociente se estabiliza cerca de 12 y 9, para 5 °C y 20 °C respectivamente, hasta el final de la incubación.

3.3.1.3. Poblaciones microbianas

El crecimiento de las poblaciones de bacterias y protozoos, fue seguido especialmente durante los 28 primeros días del experimento. Los primeros microorganismos que crecen a 20 °C son las bacterias que llegan a concentraciones superiores a $1 \cdot 10^8$ células ml⁻¹ al segundo día de incubación. Este máximo inicial desciende rápidamente a concentraciones cercanas a la mitad y se mantiene así los primeros cinco días, período que coincide con la aparición de flagelados heterotróficos (HNF) que permanecen en la muestra durante varios días. Unos días después de observarse HNF, aparecieron protozoos mayores (ciliados) cuya depredación sobre éstos hizo probablemente desaparecer la población de flagelados. En el momento en que éstos desaparecen, la población bacteriana experimenta un máximo, y luego fluctúa debido a las diferentes interacciones entre depredadores y posibles presas entre las que hay que incluir también una población de amebas que aparece tras la disminución de la de flagelados y que convive con la de ciliados.

Los recipientes incubados a 5 °C presentan una menor variedad en la composición de microorganismos durante el periodo estudiado (Fig. 3.6b). Las bacterias empiezan a crecer hacia el día 5, y alcanzan su máxima concentración, muy similar a la del primer máximo a 20 °C, hacia el día 8. El descenso de la

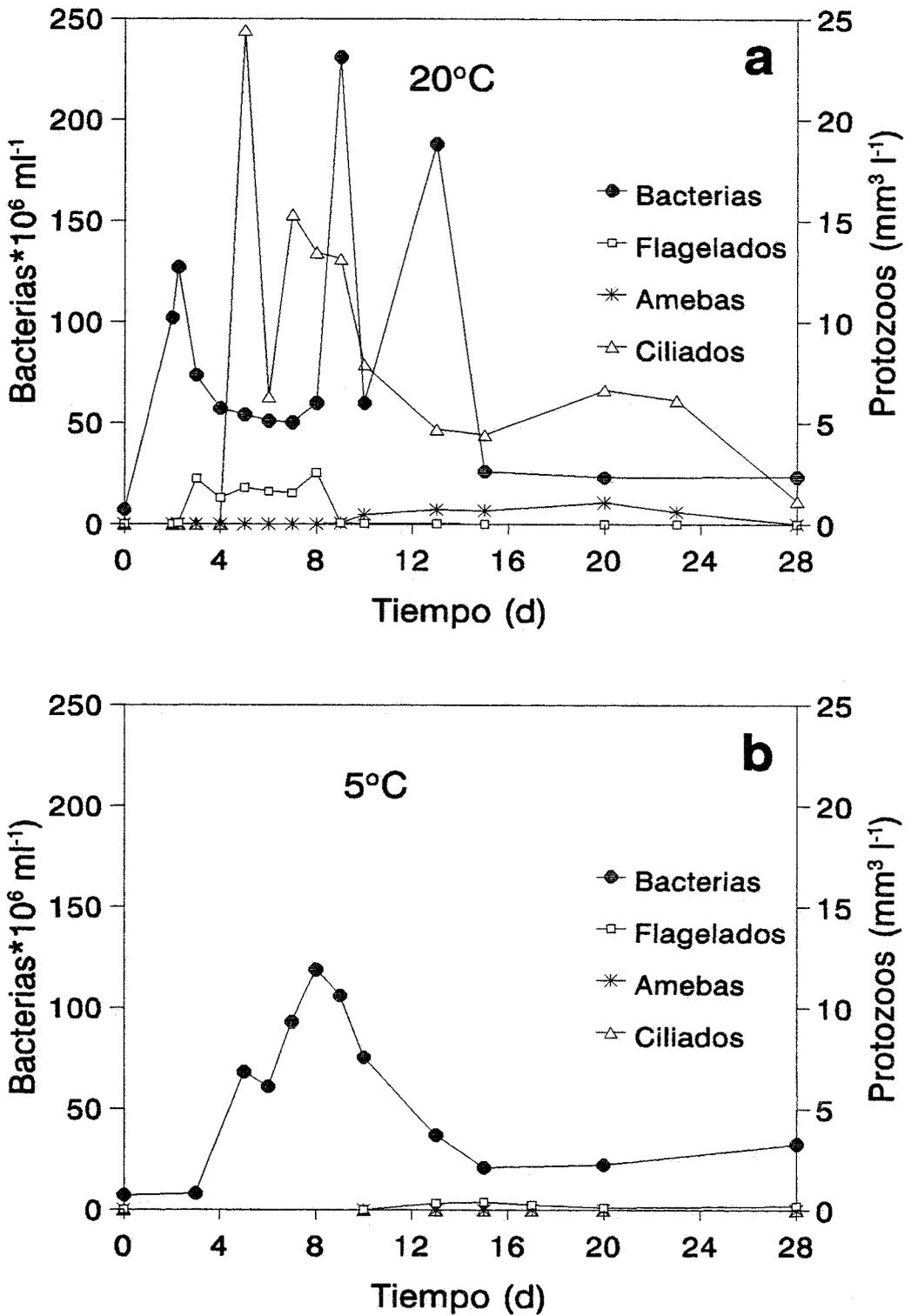


Figura 3.6. Evolución de las poblaciones de bacterias y protozoos en los enriquecimientos incubados a 20 °C (a) y 5 °C (b).

abundancia de bacterias tras este pico, coincide con la aparición en las muestras de una población de flagelados más pequeña que la que lo hace a 20 °C. Si bien en la figura se muestran solo las poblaciones que aparecen durante los primeros 28 días, posteriormente aparecieron también ciliados en los recipientes a 5 °C, aunque su biomasa fue muy inferior a la que se desarrolló a 20 °C.

3.3.1.4. Actividades ectoenzimáticas

Durante el periodo de estudio fue observada en los enriquecimientos a 20 °C una sucesión de actividades de degradación de carbohidratos (Fig. 3.8), como fue descrito en el capítulo anterior para detritus de origen vegetal. Durante los primeros cinco días, aparecen máximos iniciales de la actividad amilolítica así como de las glucosidasas (α y β), que llegaron a niveles similares en los dos casos, cercanos a $1200 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Coincidiendo con la disminución de estas actividades de hidrólisis de moléculas disueltas, empieza a aumentar la actividad de endocelulasa y exocelulasa, que alcanzan máximos de actividad de 10 unidades $\text{l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y casi $200 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, y especialmente de endoxilanasas que tras el máximo al que se llega a los 8 días (de unas 10 unidades $\text{l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) empieza a disminuir.

A 5 °C se observa una sucesión parecida, pero más lenta y menos intensa, de actividades ectoenzimáticas. La mayor lentitud de la sucesión hace que se aprecie mejor el orden de aparición de las actividades ectoenzimáticas. Con anterioridad al día 6 empieza la actividad α -glucosidasa, que alcanza un máximo de $400 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, actividad a la que se aproxima la de β -glucosidasa que aparece el día 7, cuando también aumenta la exocelulasa hasta cerca de $150 \text{ nmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. De entre los endoenzimas, es la amilolítica la que primero aparece y forma un pico de 5 unidades $\text{l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ al mismo tiempo que las glucosidasas. Cuando esta actividad disminuye, empiezan a aumentar las actividades de la endocelulasa y la de endoxilanasas pero no se observa el descenso de las actividades en el espacio de tiempo estudiado. Las actividades estudiadas fueron siempre muy inferiores en los recipientes sometidos a 5 °C que a 20 °C.

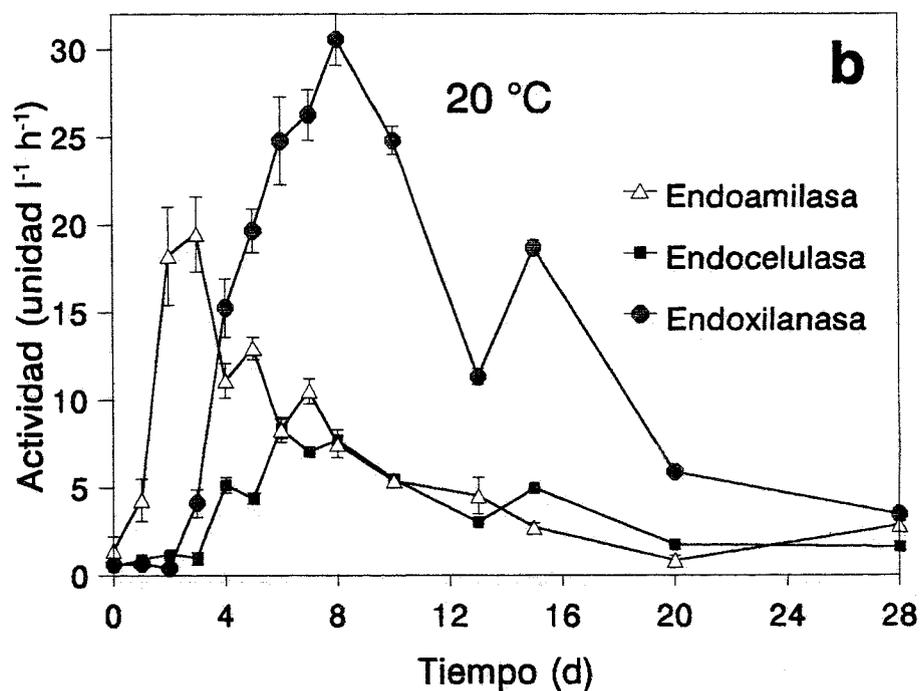
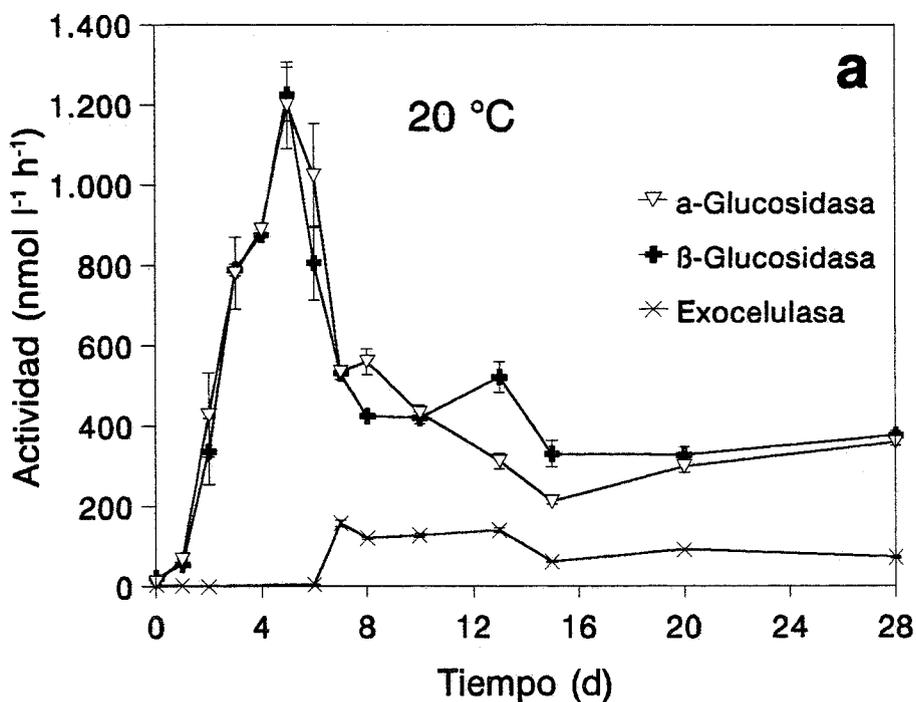


Figura 3.7. Evolución de las actividades glucosidasas y exocelulasa (a) y de endoenzimas (b), en los enriquecimientos incubados a 20 °C.

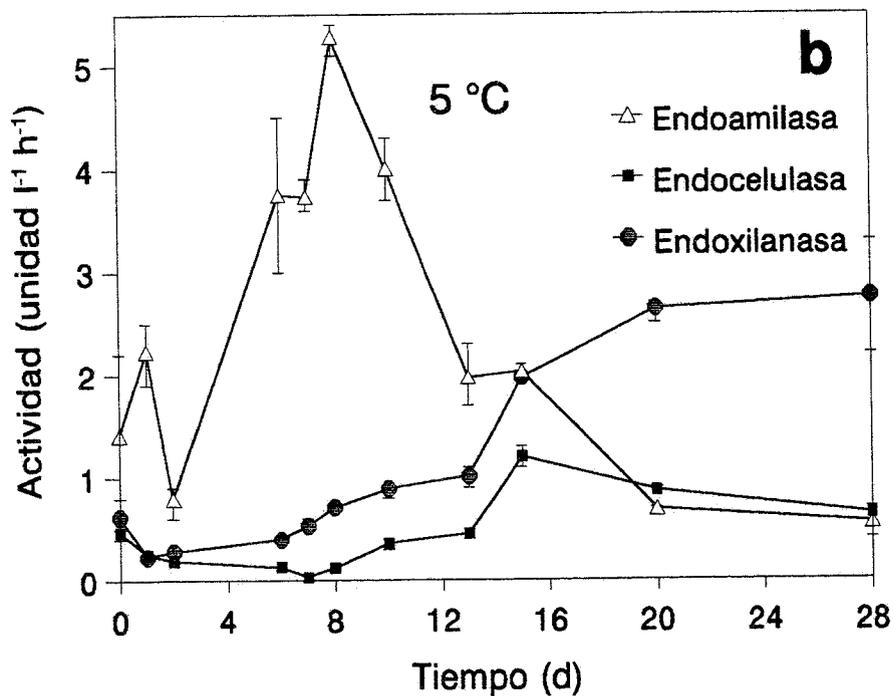
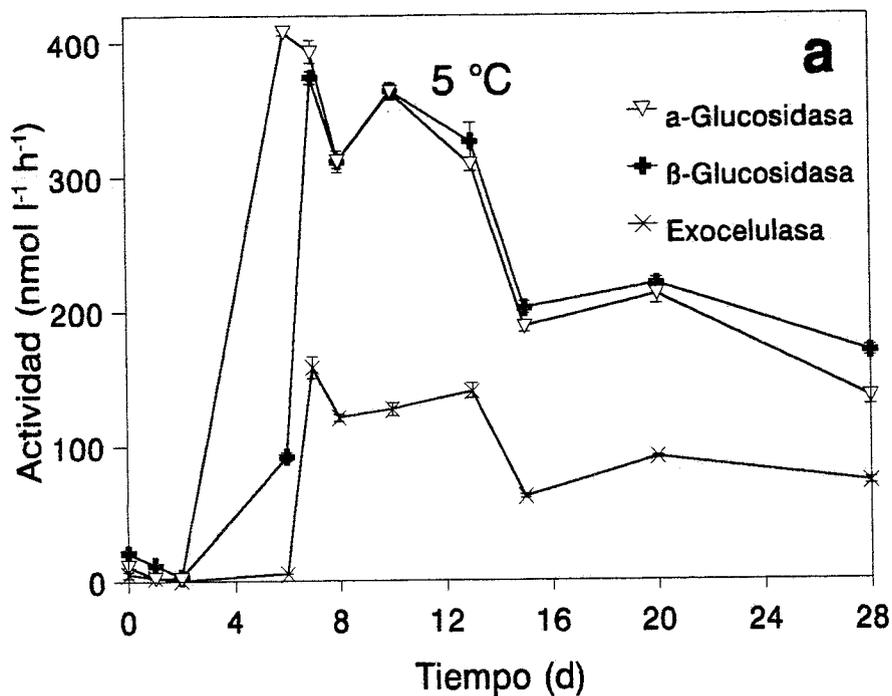


Figura 3.8. Evolución de las actividades de glucosidasas y exocelulasa (a) y de endoenzimas (b) en los tratamientos a 5 °C.

3.3.2. Efecto de los protozoos

De los dos tubos control preparados, tan solo pudo mantenerse libre de protozoos a lo largo de la incubación uno de ellos, por lo que los datos del control carecen de réplica (a). Las dos réplicas con protozoos (b y c), presentaron diferentes concentraciones de éstos, por lo que se prefirió no expresar los resultados como la media de las dos réplicas sino por separado para observar los efectos del distinto grado de depredación.

3.3.2.1. Poblaciones microbianas

Las poblaciones microbianas que se desarrollaron en los tubos fueron únicamente bacterias y flagelados, a diferencia de experimentos previos en los que se observó la presencia también de otros protozoos de mayor tamaño como ciliados y amebas durante una incubación de parecida duración. En este caso, los inóculos fueron filtrados por filtros de tamaño de poro inferior a 3 μm , con lo que los protozoos mayores quedarían retenidos y no pasaron a las muestras. La concentración de bacterias alcanzó valores superiores en ausencia de flagelados. A partir del cuarto día en las muestras que no contenían flagelados, el número de bacterias fue superior a $1 \cdot 10^8$ células ml^{-1} , mientras que en las muestras con flagelados las abundancias bacterianas en el pico fueron 7 y $5 \cdot 10^7$ en c y b, respectivamente. Tras este máximo inicial de bacterias, aparecieron elevadas concentraciones de flagelados (superiores a $1,5 \cdot 10^5$), que en la muestra b disminuyeron de manera rápida a concentraciones cerca de un orden de magnitud inferior a las del pico, y en las que se mantienen hasta finalizar el experimento. En la muestra c, sin embargo, la concentración de flagelados disminuye, aunque de manera más lenta, y su presencia sigue siendo importante hasta el día 15.

Al realizar los recuentos de bacterias, se diferenció también entre las bacterias que se encuentran adheridas y las que se encontraban en forma libre. Los resultados de esta diferenciación muestran que a partir del momento en que aumenta la concentración de flagelados, aumenta también el porcentaje de

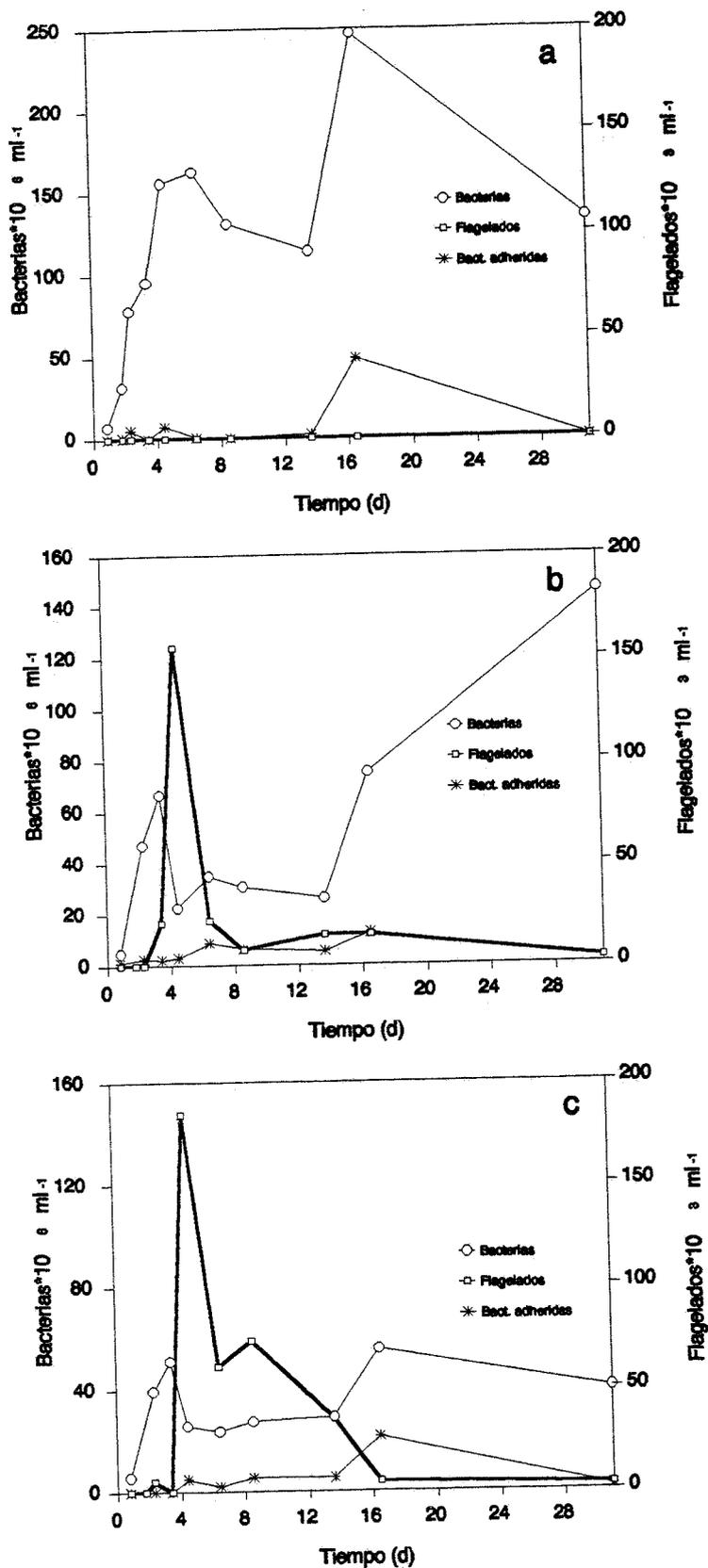


Figura 3.9. Concentración de bacterias, bacterias adheridas y flagelados en las muestras (b y c) y en el control (a).

bacterias que se encontraban adheridas a partículas. Este porcentaje, entre el 0 y el 10% antes del máximo de protozoos, aumentó después de éste y aunque osciló bastante, se situó alrededor del 20%, con valores máximos del 38%. En el control, sin embargo, éstas fueron casi siempre entre el 0 y el 5%.

El análisis de las muestras al microscopio óptico, proporcionó una idea de las morfologías dominantes en la población bacteriana. En el control crecieron inicialmente casi exclusivamente pequeños cocos libres, y aunque aparece una mayor variedad de formas con el tiempo, siempre dominan las bacterias de pequeño tamaño y libres.

En las muestras con protozoos, al inicio también se encuentran las bacterias libres aunque en este caso se trata de bacilocosos bastante grandes. Coincidiendo con la aparición de HNF en las muestras, aumenta el número de bacterias adheridas y empieza a aparecer una gran variedad de formas, que incluye largos filamentos. Cuando acaba la presión de los protozoos, empiezan de nuevo a aparecer células libres.

3.3.2.2. Actividades ectoenzimáticas

Las actividades investigadas mostraron una sucesión similar en los tres recipientes: la sucesión de actividades en las muestras comenzaba con un primer pico de actividad amilolítica, seguido de la aparición de actividades de degradación de carbohidratos de menor tamaño (α -glucosidasa, β -glucosidasa y exocelulasa). Los máximos que aparecen para finalizar son los de endocelulasa y endoxilanasas. Este patrón de sucesión es el mismo al observado durante la degradación de substratos vegetales (ver capítulo 3).

Debido a que la concentración bacteriana fue mayor en ausencia de depredadores, era de esperar que las actividades específicas, en el caso que los protozoos no tuvieran ninguna influencia sobre las actividades ectoenzimáticas, fueran mayores en el control. El único caso en que esto fue así, fue en el de la β -glucosidasa. Esta actividad alcanzó los 8000 nmol l⁻¹ h⁻¹, a los 5 días de incubación, mientras que en las muestras con HNF, ésta fue aproximadamente el 50 % de ésta. Las actividades de α -glucosidasa o de exocelulasa, fueron de

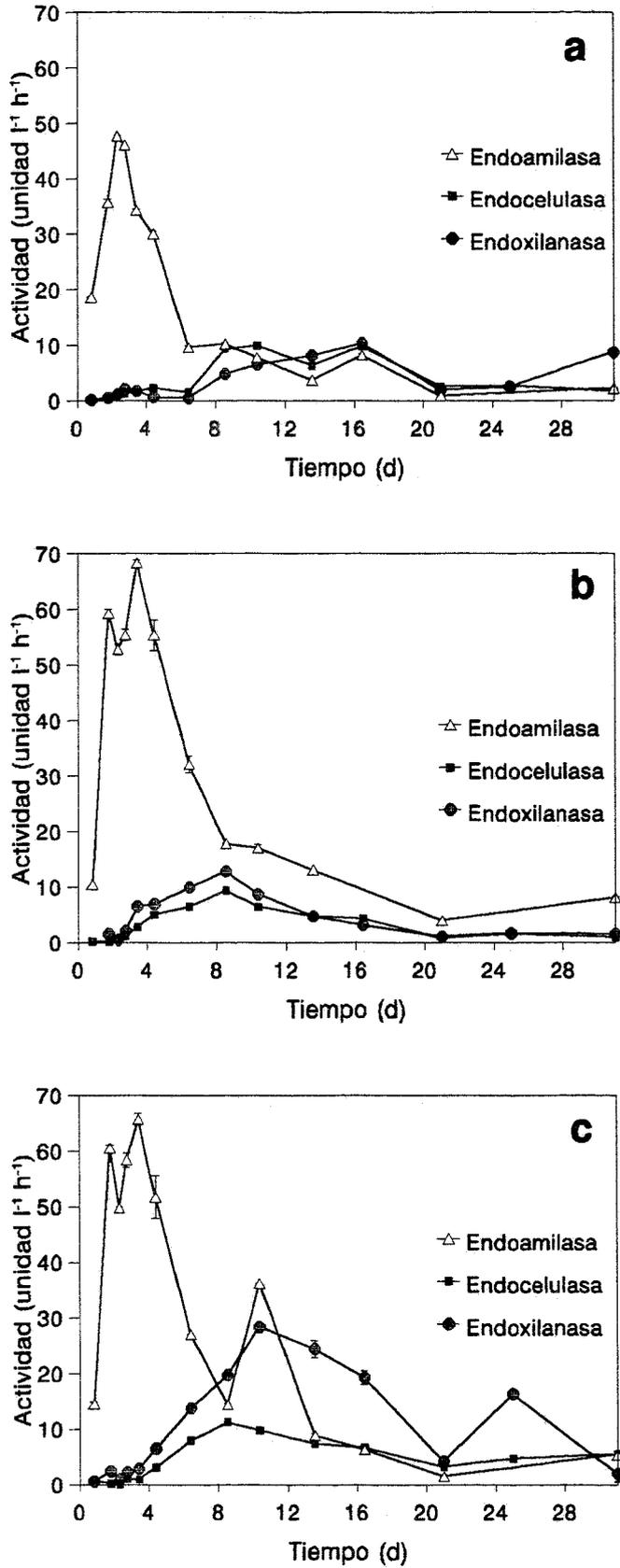


Figura 3.10. Evolución de las actividades de glucosidasas y exocelulasa en las muestras (b y c) y en el control sin protozoos (a).

una intensidad comparable, tanto en el control como en las muestras lo que indicaría que la actividad específica es mayor en presencia de flagelados heterotróficos.

Las actividades de degradación de polisacáridos fueron, en general mayores con protozoos. La actividad amilolítica mostró un máximo de menor intensidad y la aparición de las actividades xilanolíticas y celulolíticas fue bastante posterior en comparación a la de con HNF..

El hecho de que la concentración de HNF sea diferente en las muestras debe, posiblemente, provocar diferencias en la intensidad de las actividades. Efectivamente, en la muestra b, cuya abundancia de flagelados heterotróficos fue más reducida, en número y tiempo, se observó una actividad más parecida a la de a (sin HNF) que a la de c, que presentó una abundancia de flagelados más intensa y durante más tiempo.

3.4. Discusión

Durante la fase inicial de la degradación fue observado un fuerte crecimiento de bacterias libres. Oláh (1972) realizó observaciones similares durante la degradación de material de *Phragmites* molido y supuso que este período de intenso crecimiento bacteriano se produjo por la utilización de sustancias orgánicas disueltas. Newell et al. (1981) confirma estas observaciones y afirma que los microorganismos utilizan preferentemente la DOC que la POC. Los valores de la concentración de carbono orgánico disuelto reafirman que el DOC liberado en esta fase a través de la lixiviación (Polunin 1982, Opsahl & Benner 1993) efectivamente disminuyó rápidamente, coincidiendo con el incremento de la abundancia bacteriana que también hizo disminuir la concentración de fósforo inorgánico total, TDP, (Walser et al. 1994). Las bacterias parecen pues actuar como sumidero de nutrientes (Güde 1985, Jürgens & Güde 1990), en este caso de TDP, al mismo tiempo que contribuyen a aumentar el valor nutritivo del detritus.

La segunda fase de esta degradación se caracterizó por una elevada actividad de endoamilasa y α -glucosidasa, es decir de degradación de almidón y sus

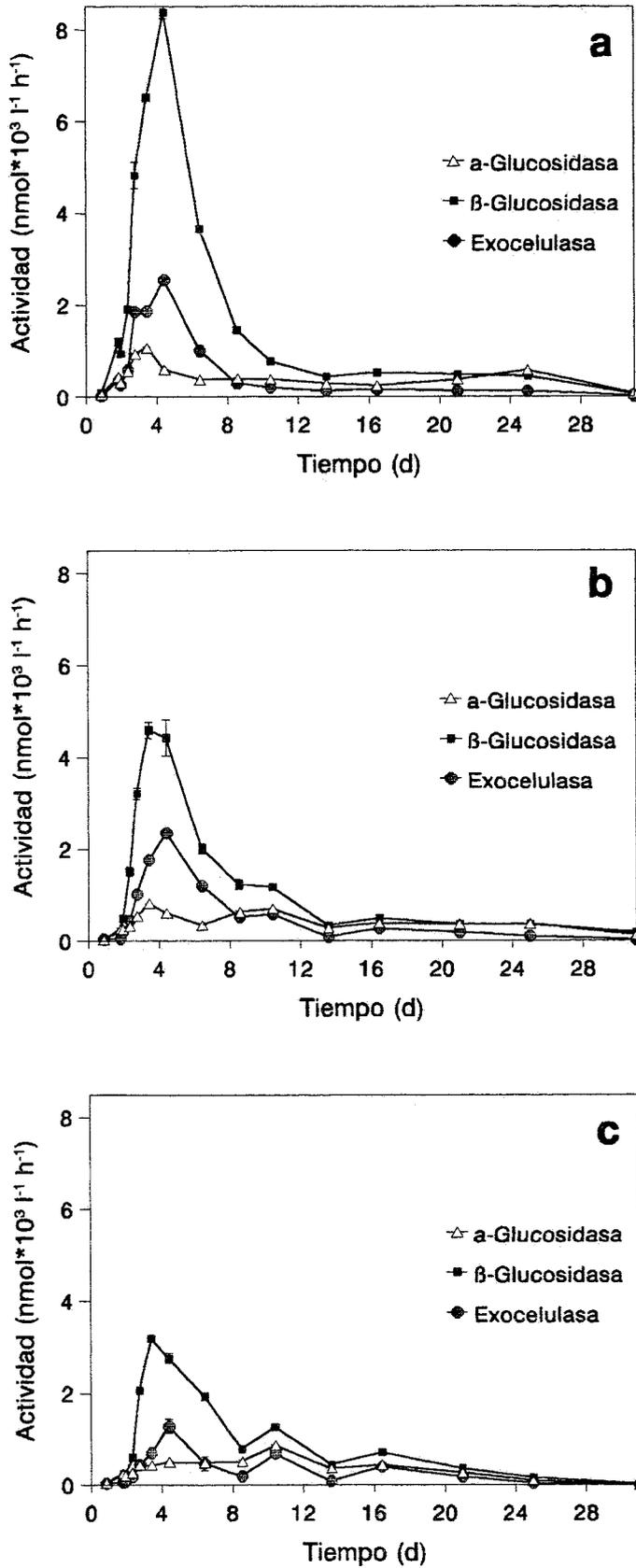


Figura 3.11. Actividades ectoenzimáticas de hidrólisis de polisacáridos en las muestras con protozoos (b y c) y en el control (a).

derivados. Muy parecidas fueron las observaciones hechas durante la degradación de *Potamogeton pectinatus* en experimentos de campo por Belova (1993), lo que indica que la hidrólisis de carbohidratos no estructurales (azúcares libres y almidón) precedió a la de los estructurales (Godshalk & Wetzel 1978b). Varios autores (Gunatilaka et al. 1990, Fukami et al. 1981) sugirieron también que durante la primera fase de descomposición de *Phragmites*, fueron los carbohidratos lábiles los que estimularon el crecimiento bacteriano.

Tras la primera fase caracterizada por un elevado crecimiento bacteriano, se observó un descenso en la proporción de bacterias libres respecto a las adheridas a substrato, hecho también constatado por Oláh (1972) y Gunatilaka et al. (1990) durante la degradación de detritus de *Phragmites*, o Fukami et al. (1981) de *Chlorella*. Este hecho coincidía con la aparición de una población de depredadores, y con el drástico descenso de las actividades de degradación de substratos disueltos. Existen dos posibles explicaciones para ello: los substratos disueltos fácilmente utilizables ya han sido consumidos y/o las bacterias libres fueron depredadas selectivamente por parte de los protozoos favoreciendo las poblaciones bacterianas que se encontraban adheridas. Solo tras la aparición de protozoos en las muestras se observa una liberación de nutrientes lo que refuerza la idea de la importancia de los flagelados heterotróficos en la regeneración de nutrientes (Güde 1985, Jürgens & Güde 1990).

Durante la sucesión de las poblaciones microbianas se observó que durante el período de dominio inicial de flagelados heterotróficos, la concentración de bacterias se mantuvo en un nivel bajo constante. En las posteriores etapas de la sucesión, cuando amebas y ciliados fueron los protozoos dominantes, la abundancia bacteriana mostró mayores oscilaciones, cuya causa debe buscarse en que la presión depredadora era realizada no solo sobre las bacterias sino también sobre sus consumidores principales, los flagelados. Durante esta tercera fase en el proceso de descomposición, se observaron altas actividades de degradación de celulosa (endocelulasa) y de xilano (endoxilanasas). Estas actividades estarían muy probablemente inhibidas durante las fases iniciales de la degradación debido a la disponibilidad de carbohidratos lábiles, de menor

peso molecular, que una vez agotados aumentó la actividad de endocelulasa y endoxilanasas. La combinación de estas actividades puede verse como indicación de la hidrólisis de polisacáridos estructurales (Sinsabaugh et al. 1981, Tanaka 1993). Esta fase coincidió, además, con la fase de mayor pérdida de peso, como también observaron Belova (1993) y Tanaka (1991).

Como era de esperar, las velocidades de degradación de las partículas de detritus de macrófitos fueron mucho más lentas a 5 °C, como indicaron las curvas de peso seco y de carbono orgánico particulado. El material "envejeció", es decir, fue más rápidamente utilizado, a mayor temperatura, como indica el inferior cociente C:N del material particulado a 20 °C.

La sucesión temporal de las poblaciones microbianas así como la de las actividades ectoenzimáticas estudiadas mostraron un patrón muy similar a ambas temperaturas. Esta sucesión, sin embargo, fue mucho más lenta y de una intensidad menor a 5 °C que a 20 °C. Güde (1978) observa también durante la degradación de detritus de *Scenedesmus* la aparición de bacterias amilolíticas, celulolíticas y xilanolíticas con un desfase en la aparición de máximos de éstas a 20 °C y 5 °C de unos 10 días. Los carbohidratos estructurales son hidrolizados más rápidamente a 25 °C que a 10 °C (Godshalk & Wetzel 1978b), como puede verse de manera indirecta por el desarrollo de las actividades de los ectoenzimas para su degradación (endocelulasa y endoxilanasas) a ambas temperaturas.

El experimento diseñado para evaluar el efecto de los protozoos fue pensado para determinar la existencia de una relación causal entre la aparición de protozoos y el desarrollo de actividades de hidrólisis de polisacáridos estructurales durante la degradación de detritus. Esta idea había sido sugerida a partir de los resultados del experimento acerca del efecto de la temperatura, en los que se observaba la aparición de actividades de hidrólisis de polisacáridos estructurales coincidiendo con el crecimiento de HNF.

La población de HNF que se desarrolló en las muestras ejerció un control sobre la abundancia bacteriana, cuya concentración fue muy inferior a la de los controles, como también observan Harrison & Mann (1975). La depredación por

parte de los flagelados heterotróficos estuvo muy probablemente centrada sobre las bacterias que se encontraban viviendo en forma libre, y que eran fundamentalmente pequeños cocos, que parecen tener ventaja competitiva en la utilización de substratos disueltos (Linley & Field 1982). Efectivamente, el porcentaje de bacterias adheridas aumenta a partir de la aparición en las muestras de elevadas concentraciones de HNF, que causan la disminución de la concentración de bacterias libres (Robertson et al. 1982, Gunatilaka et al. 1990, Newell et al. 1981). Además, esta presión hace que la comunidad bacteriana presente una mayor variedad de morfologías, como también observaron Biddanda (1988) y Biddanda & Pomeroy (1988) en la degradación de detritus de fitoplancton. Jürgens & Güde (1994) describen una sucesión microbiana similar en microcosmos y sugieren que la presión depredadora de los flagelados heterotróficos hace que predominen las bacterias resistentes a la depredación, en este caso debido a que se encuentran adheridas a partículas. La aparición de protozoos asociados a partículas de detritus en la naturaleza ha sido anteriormente descrita (Fenchel 1970). Además, los flagelados heterotróficos, mantienen una población más activa ya que las actividades específicas de las bacterias que crecen en ausencia de HNF son mucho menores. Al parecer las bacterias de la columna de agua que se encuentran libres tienen una mayor abundancia pero una actividad menor que las adheridas (Marvalín et al. 1989) y la proporción de bacterias con capacidad hidrolítica era mucho mayor (Fukami et al. 1981)

La escasa proporción de bacterias adheridas (a partículas o en agregados) en los controles (sin protozoos) hacen difícil pensar que se hayan formado agregados a partir de materia orgánica disuelta durante la incubación (Alber & Valiela, 1994) lo que hubiera provocado la disminución del número de bacterias libres, sino que más bien se debe a la colonización de partículas de macrófito.

La sucesión de actividades observada en el experimento anterior, en presencia de protozoos, se observa también en ausencia de ellos. En este caso, la principal diferencia es que las actividades de hidrólisis de polisacáridos estructurales aparecen más tarde. La disminución de la degradación de compuestos disueltos frente a la de particulados se debe muy probablemente a la acción de los

protozoos. Estos, mediante su depredación selectiva sobre las bacterias libres (Sich 1991) hacen que la mayor parte de la población pase a encontrarse a partículas de macrófito. Esta adhesión física se ha mostrado necesaria para la degradación de estos substratos (Geesey & White 1990). La posibilidad de que parte de los ectoenzimas sean producidos por los nanoflagelados, recientemente observado por Karner et al. (1994), no puede ser confirmada ni eliminada a partir de los resultados de este estudio.

En resumen, durante la degradación de polvo de *Potamogeton pectinatus* fue observada una sucesión, tanto de las actividades ectoenzimáticas como de las poblaciones involucradas en ella. Existe una sucesión en las poblaciones bacterianas, en que se pasa de una fase inicial predominio de las poblaciones bacterianas libres a una en que fue mayor la proporción de bacterias que se encuentran colonizando partículas. Esta segunda fase caracterizada por la existencia de bacterias adheridas, coincidió con la aparición de protozoos bacterívoros. Las poblaciones de protozoos también mostraron una sucesión en la que primero crecieron flagelados, y luego ciliados y amebas.

En cuanto a las actividades, en primer lugar se observaron actividades de degradación de compuestos solubles y fácilmente hidrolizables, como el almidón. El final de esta fase coincide con la aparición de protozoos en las muestras y con la aparición de elevadas actividades de degradación de polisacáridos estructurales como celulosa y hemicelulosa. Este orden de degradación refleja la diferente estabilidad de los carbohidratos presentes en la célula vegetal (Opsahl & Benner 1993).

La temperatura tuvo una fuerte influencia sobre la velocidad de degradación, así como en la densidad de las poblaciones y la intensidad de las actividades. Si bien fue observada la misma sucesión de poblaciones y de actividades con independencia de la temperatura, a 5 °C la sucesión fue mucho más lenta y menos intensa. La más rápida degradación de los detritus que se produce a altas temperaturas puede ser debida a la más rápida colonización y degradación de las partículas detríticas por parte de los microorganismos.

La depredación por protozoos también hizo que la sucesión fuera más rápida. Su aparición tras el fuerte crecimiento bacteriano favoreció el desarrollo de poblaciones adheridas, frente a las libres que eran consumidas, que degradaron el material detrítico particulado, y que en ausencia de protozoos representaban un porcentaje muy bajo respecto al total. La presencia de protozoos no entorpece el proceso de degradación de macrófitos mediante el consumo de las bacterias responsables de ello, sino que parecen mantener la comunidad bacteriana metabólicamente activa y facilitan la colonización de las partículas detríticas, causando posiblemente una pérdida de peso del material debido a su consumo.

Alles Lebendige bildet eine Atmosphäre um sich her.

Goethe

- CAPÍTULO 4 -

Influencia de algas y crustáceos zooplanctónicos sobre las actividades ectoenzimáticas

4.1. Introducción

Una cierta parte del carbono orgánico producido por las algas es liberada directa o indirectamente al medio extracelular (Fogg 1966, Chróst 1978, Cole et al. 1982, Chróst 1983, Chróst & Faust 1983, Watanabe 1984, Baines & Pace 1991, Siuda et al. 1991). Las bacterias son capaces de utilizar esta fuente de materia orgánica y transformarla en parte en biomasa bacteriana (Azam et al. 1983). Por ello, ésta no constituye solo una importante vía de nutrición bacteriana (Kato 1994), sino que se trata también de un importante proceso de conservación de la energía en la comunidad planctónica, porque de otra manera se perdería entre un 10 y un 50 % del carbono producido mediante la fotosíntesis (Münster & Chróst 1990). Sin embargo, según su mayor o menor complejidad química, parte de este carbono liberado podrá ser utilizado por las bacterias tras la hidrólisis enzimática de moléculas complejas a substratos monoméricos. Por ello, la utilización bacteriana de muchos de los compuestos liberados depende fuertemente de la presencia de ectoenzimas hidrolíticos. Aunque por lo general se asume que las bacterias son los principales productores de ectoenzimas, hay una evidencia que tanto algas como zooplancton pueden al menos contribuir en parte a la producción de estos enzimas (Chróst 1992). Las actividades observadas en las diferentes clases de tamaño puede proporcionar conclusiones sobre las actividades metabólicas de los diferentes grupos de organismos.

Las actividades ectoenzimáticas dan una indicación de la utilización de las diferentes partes de la materia orgánica. Según los diferentes mecanismos de liberación de materia orgánica como la excreción activa, senescencia (autólisis), lisis por parásitos o rompimiento de células durante la depredación (Cole 1982), la calidad de los productos liberados puede diferir substancialmente. Ya que la producción de enzimas es inducible, la detección de los diferentes ectoenzimas puede considerarse también como una indicación del tipo de productos orgánicos extracelulares utilizados por las poblaciones bacterianas.

Evidentemente, es muy difícil interpretar los patrones de actividad obtenidos a

partir de datos de campo únicamente. Por ello, se intentó mejorar la bases para la interpretación de los estudios de campo llevados a cabo en el Lago Constanza (Sala & Güde, en preparación) mediante aproximaciones experimentales como la que se presenta en este estudio. Para este propósito, determinamos las actividades de varios ectoenzimas bajo condiciones ambientales constantes aplicando diferentes tratamientos que se diferenciaban según los organismos presentes: bacterias, algas y crustáceos zooplanctónicos algívoros, que se añadieron ya sea solos o bien en una combinación de ellos. Al comparar las actividades observadas en los distintos tratamientos, examinamos en primer lugar la influencia del carbono algal excretado en ausencia de zooplancton, y en segundo lugar la influencia de la alimentación de éste. Finalmente, se esperó obtener alguna indicación acerca de los principales productores de los enzimas estudiados al diferenciar las actividades en diferentes clases de tamaño.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Diseño del experimento

El experimento se basó en incubar botellas llenas con 100 ml de agua epilimnética (de 2 m de profundidad) del lago de Constanza, libre de organismos al haber sido prefiltrada a través de 0,2 μm de diámetro de poro. Las botellas fueron inoculadas con poblaciones naturales de bacterias contenidas en 1 ml de la misma muestra de agua prefiltrada a través de filtros de 0,8 μm . Las botellas fueron preincubadas a 20 °C durante 20 h para permitir el crecimiento bacteriano. Pasado este tiempo se añadieron a 4 de las botellas 20 ml de una suspensión densa de células de *Scenedesmus* que crecía en medio Chu 12, una modificación de Müller (1972). La suspensión de algas se obtuvo al concentrar el cultivo unas cuatro veces, tras dos sucesivas centrifugaciones y lavados. Para los controles sin algas, el concentrado se filtró a través de 3 μm , y 20 ml del filtrado fueron añadidos a las botellas. A dos de las botellas se añadieron también 10 individuos adultos de *Daphnia magna* que crecieron con *Scenedesmus* como alimento. Todas las

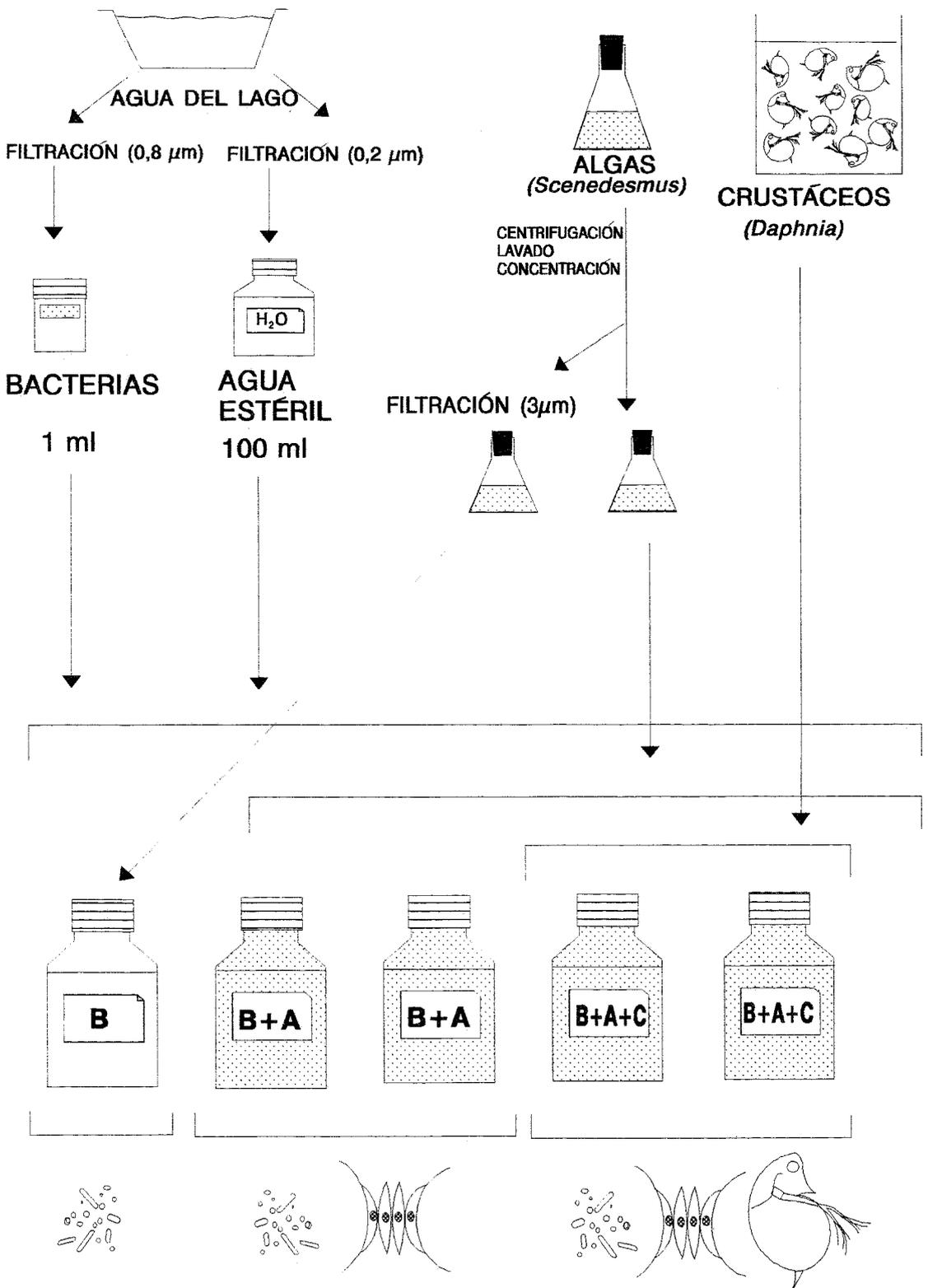


Figura 4.1. Diseño del experimento.

botellas fueron incubadas a 20 °C en una especie de noria (Ferris wheel) que permitía la rotación de las botellas a unas 30 vueltas por hora y bajo condiciones de luz tenue. La concentración de células y las actividades ectoenzimáticas en las botellas fueron seguidas diariamente durante 6 días. El diseño del experimento se encuentra esquematizado en la Fig. 4.1.

4.2.2. Parámetros estudiados

Las botellas fueron examinadas diariamente para seguir la producción de varias actividades ectoenzimáticas: α -glucosidasa, β -glucosidasa que rompen dímeros de glucosa, de origen amilolítico y celulolítico respectivamente; exocelulasa, que hidroliza oligómeros de celulosa; las endosacaridasas endoamilasa, endocelulasa, y endoquitinasa principales responsables de la degradación de los polisacáridos almidón, celulosa y quitina. También fueron estudiadas las actividades de fosfatasa alcalina (APasa), inducible en ausencia de fósforo inorgánico. Las actividades fueron investigadas con dos métodos diferentes, uno fluorométrico (Schmitt-Biegel & Obst 1989) y otro espectrofotométrico (Wirth & Wolf 1992). Adicionalmente en cinco ocasiones las muestras fueron fraccionadas en diferentes tamaños para poder averiguar cual era la fracción en la que se encontraba una mayor actividad de algunos ectoenzimas. El fraccionamiento tuvo lugar mediante filtración gravitacional a través de filtros de 3,0 μm de diámetro de poro, para determinar la actividad en la fracción de bacterias (las células de *Scenedesmus* miden aproximadamente 10 μm , por lo que quedan retenidas). La diferencia entre la actividad total y la actividad de este filtrado sirvió para conocer cual era la actividad enzimática ligada a las algas. Con el propósito de separar los enzimas asociados básicamente a células bacterianas, y los libres, se filtró de nuevo a través de filtros de 0,2 μm de diámetro de poro.

Al mismo tiempo, fueron seguidas la concentración de bacterias y de algas en las botellas, ambas mediante el recuento celular con un microscopio de fluorescencia, tras la tinción de la muestra con DAPI (Porter & Feig 1980) según el protocolo descrito en el capítulo anterior.

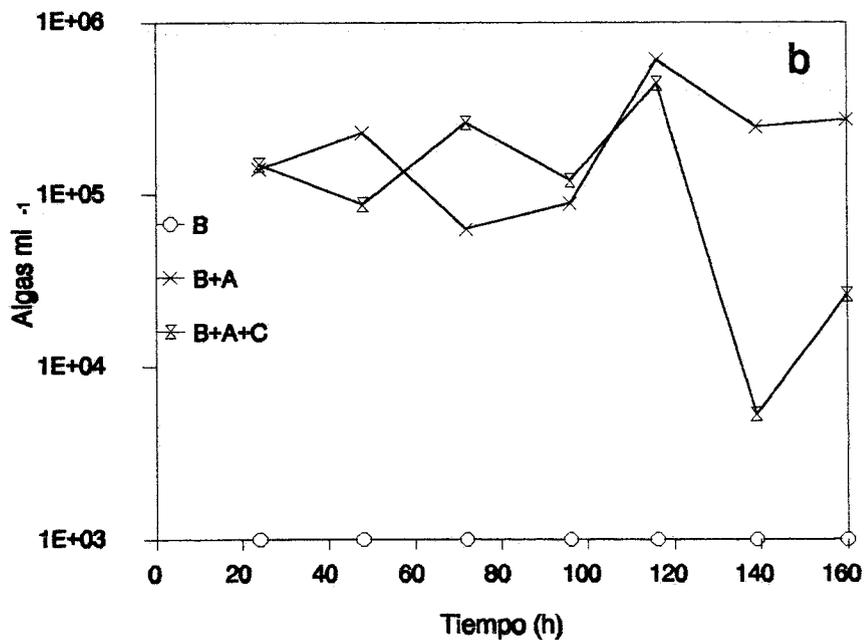
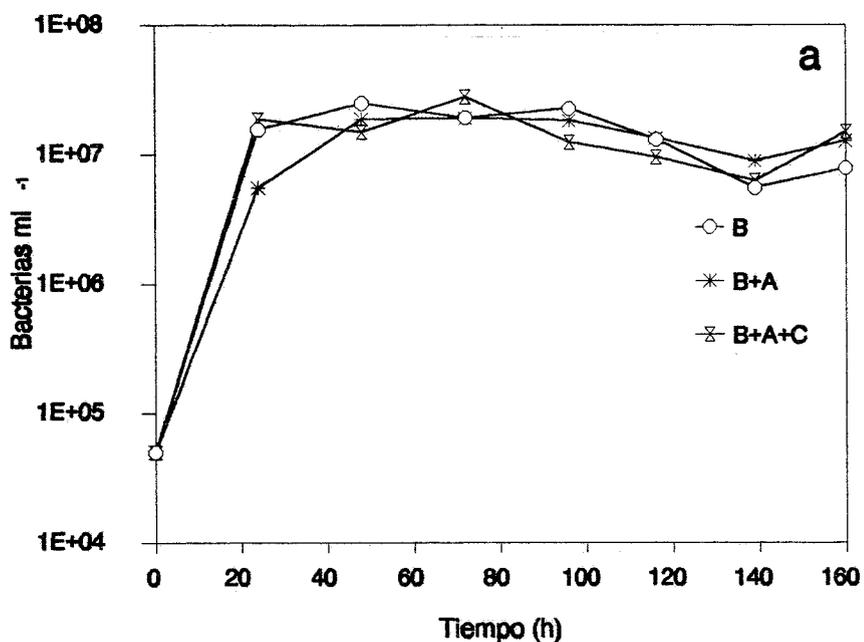


Figura 4.2. Concentraciones de bacterias (a) y algas (b) en las botellas control, que solo contenían bacterias, B, en las que se añadió *Scenedesmus*, B+A, y en las que contenían zooplancton, B+A+C.

4.3. Resultados

4.3.1. Efecto de las algas

Las poblaciones bacterianas mostraron un fuerte incremento un día después de la incubación tanto en presencia como en ausencia de algas. La concentración alcanzada en este tiempo era cercana a 10^7 células ml^{-1} y se mantuvo en este nivel durante el resto del experimento (Fig. 4.2). La abundancia de células de *Scenedesmus* fluctuó entre 10^5 y 10^6 células ml^{-1} durante el período de incubación. Las actividades ectoenzimáticas transcurrieron de forma bastante similar en los dos replicados en los que se añadieron las algas (Fig. 4.3). La mayor parte de las actividades fueron más elevadas en presencia de algas a lo largo del período de incubación. Existen, sin embargo en algunos casos, variaciones en el tiempo que pueden obedecer a la combinación de procesos de liberación y utilización de los substratos. Los efectos directos de la presencia de algas pueden ser mejor apreciados al inicio de la incubación, a las 48 horas del inicio del experimento, es decir a las 24 horas de las adiciones, cuando se produjo el máximo crecimiento bacteriano. Para simplificar la comparación, se representaron las actividades específicas (actividades por célula bacteriana a las 48 horas del inicio del experimento, a las 28 h de la adición de las algas, en los cultivos. Estos resultados se muestran en la Fig. 4.4. Para probar la existencia de diferencias según el tratamiento, es decir, si las actividades específicas eran distintas en los cultivos con algas, se realizó un test de ANOVA de dos entradas, cuyos resultados se muestran en la tabla 4.1.

En presencia de algas, se observó un incremento de β -glucosidasa ($p= 0,0054$), quitinasa ($p= 0,0364$), y, aunque significativo en el límite, de α -glucosidasa ($p= 0,0567$). Los resultados parecen indicar que también se produce un incremento de la actividad endocelulasa, endoamilasa (y fosfatasa alcalina), pero según el análisis estadístico las diferencias entre tratamientos no fueron significativas. Las

posibles causas del incremento de algunas de estas actividades pueden ser intuídas conociendo la situación de los enzimas (libres, bacterianos o algales), lo que podría ser una indicación de su procedencia.

Este fraccionamiento de las muestras (Fig. 4.7) puso de manifiesto que no existía prácticamente actividad glucosídica en la fracción algal, mientras que por el contrario más del 60 % de la actividad APAsa se encontraba en la fracción algal.

4.3.2. Efecto de *Daphnia*

En las botellas en las que se añadió *Daphnia*, las concentraciones algales fluctuaron durante los cinco primeros días en el mismo rango (entre 10^5 y 10^6 ml^{-1}) que en los controles que no contenían estos cladóceros. Tras 120 h, sin embargo, se observó una disminución drástica a menos de 10^4 células ml^{-1} en las botellas con depredadores. Por el contrario, las abundancias bacterianas no se vieron afectadas durante este período y se encontraron en un rango similar de 10^7 células ml^{-1} como en los controles sin zooplancton (Fig. 4.2).

Para observar el efecto de los tratamientos, fueron comparadas las actividades ectoenzimáticas después de ser observada una fuerte disminución de la concentración de algas (Fig. 4.2). A lo largo del experimento, las actividades de α - y β -glucosidasa, exocelulasa así como de fosfatasa alcalina, evolucionaron de manera similar en presencia y en ausencia de zooplancton (Fig. 4.5). El resto, endoamilasa, endocelulasa y endoquitinasa, presentaron oscilaciones más evidentes y evoluciones diferentes en ambos tratamientos.

Observando las actividades específicas en el momento en que la concentración de algas disminuye drásticamente, parece que, en términos generales la actividad específica de degradación de polisacáridos aumenta con la depredación por zooplancton (Fig. 4.6). Por ejemplo, presentan diferencias la endoamilasa ($p=0,0100$), endocelulasa ($p=0,0096$) y endoquitinasa ($p=0,0437$) y también es significativamente superior la actividad de exocelulasa ($p=0,0008$), que hidroliza oligosacáridos de celulosa). Por otro lado, con la depredación parece que disminuyeron las actividades de APAsa. Comparando la actividad en la fracción

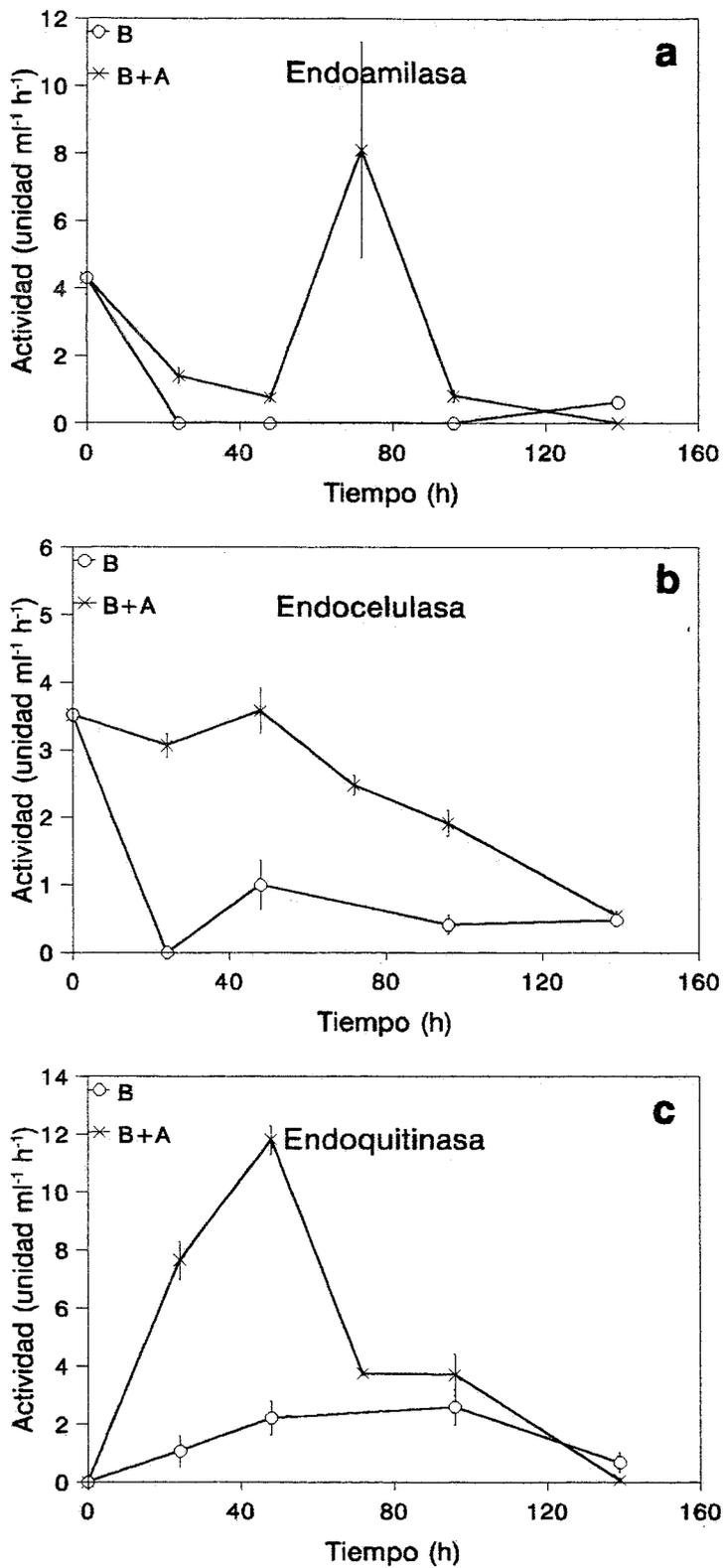
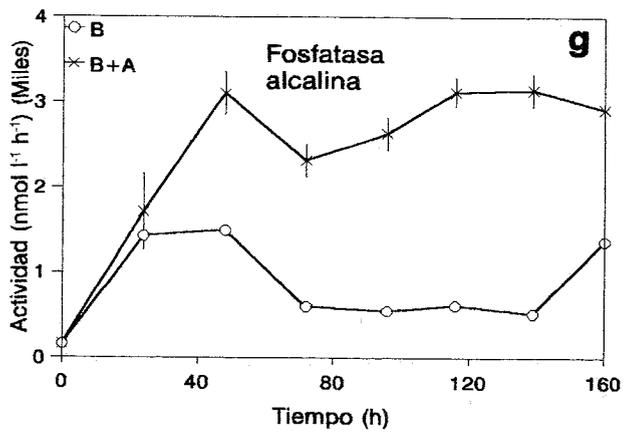
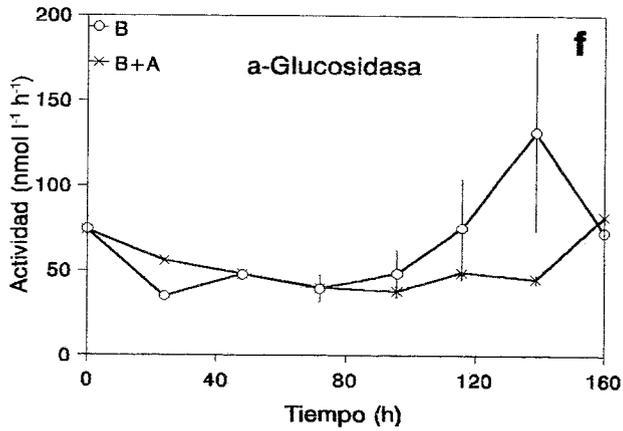
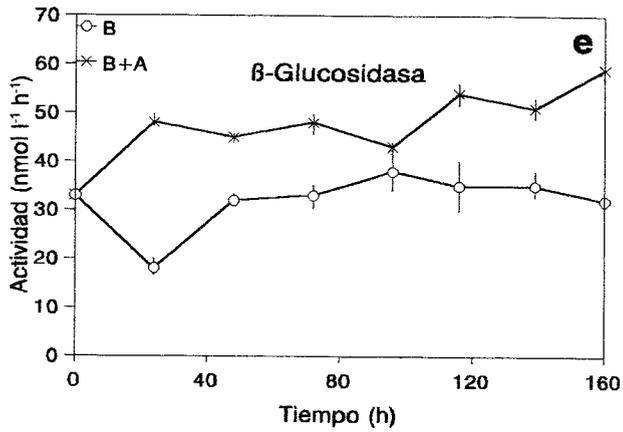
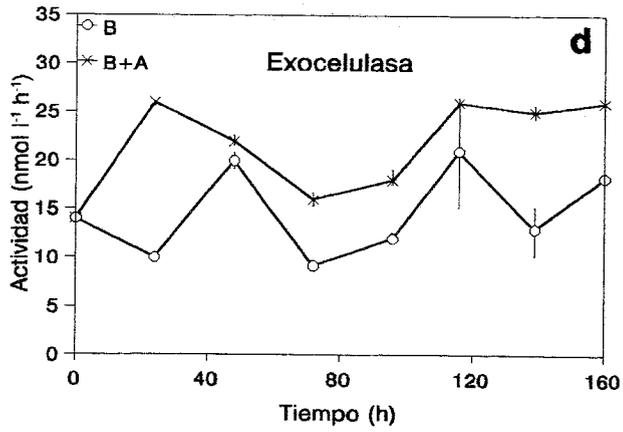


Figura 4.3. Evolución de las actividades ectoenzimáticas en los cultivos control (B) y en los que se añadieron algas (B+A). Las barras indican el error estándar entre réplicas.



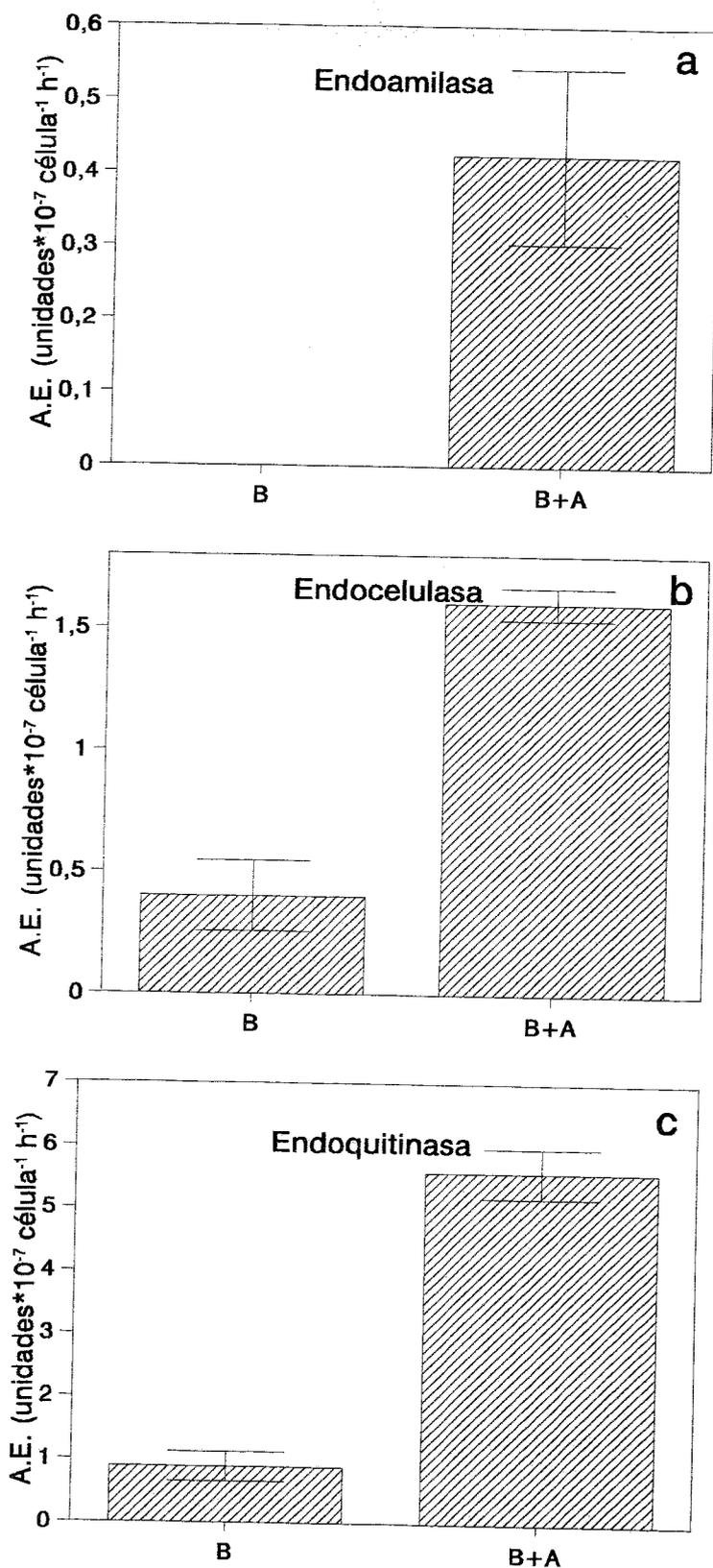
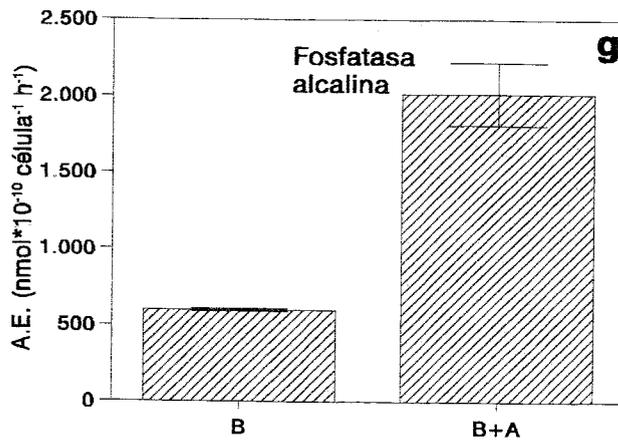
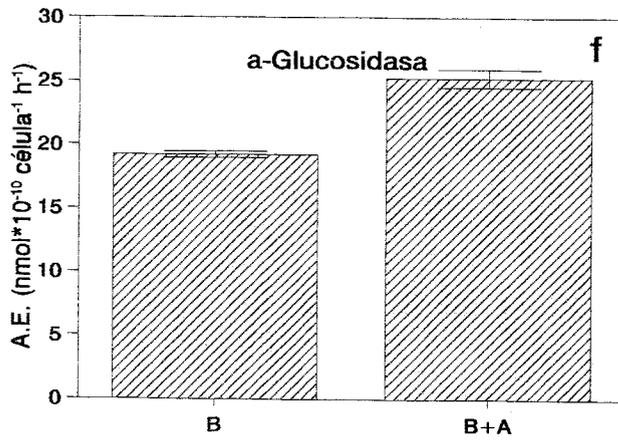
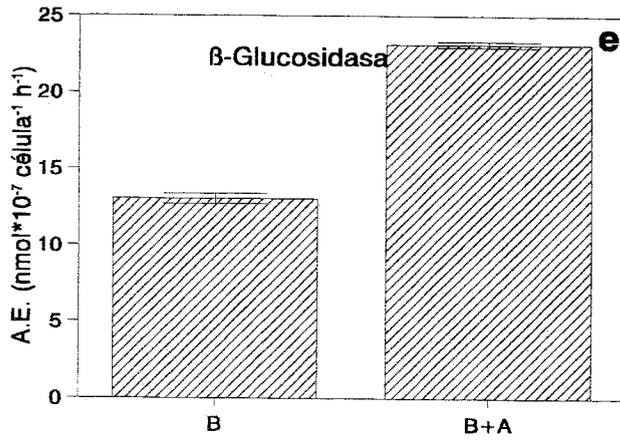
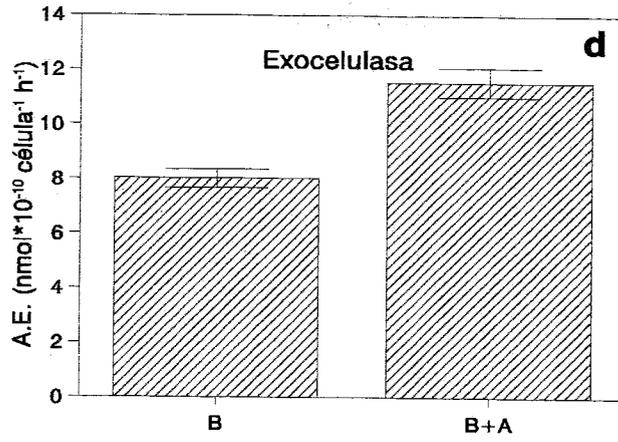


Figura 4.6. Comparación entre las actividades ectoenzimáticas específicas en las botellas de bacterias con algas (B+A) o sin ellas (B) durante la fase de máximo crecimiento bacteriano.



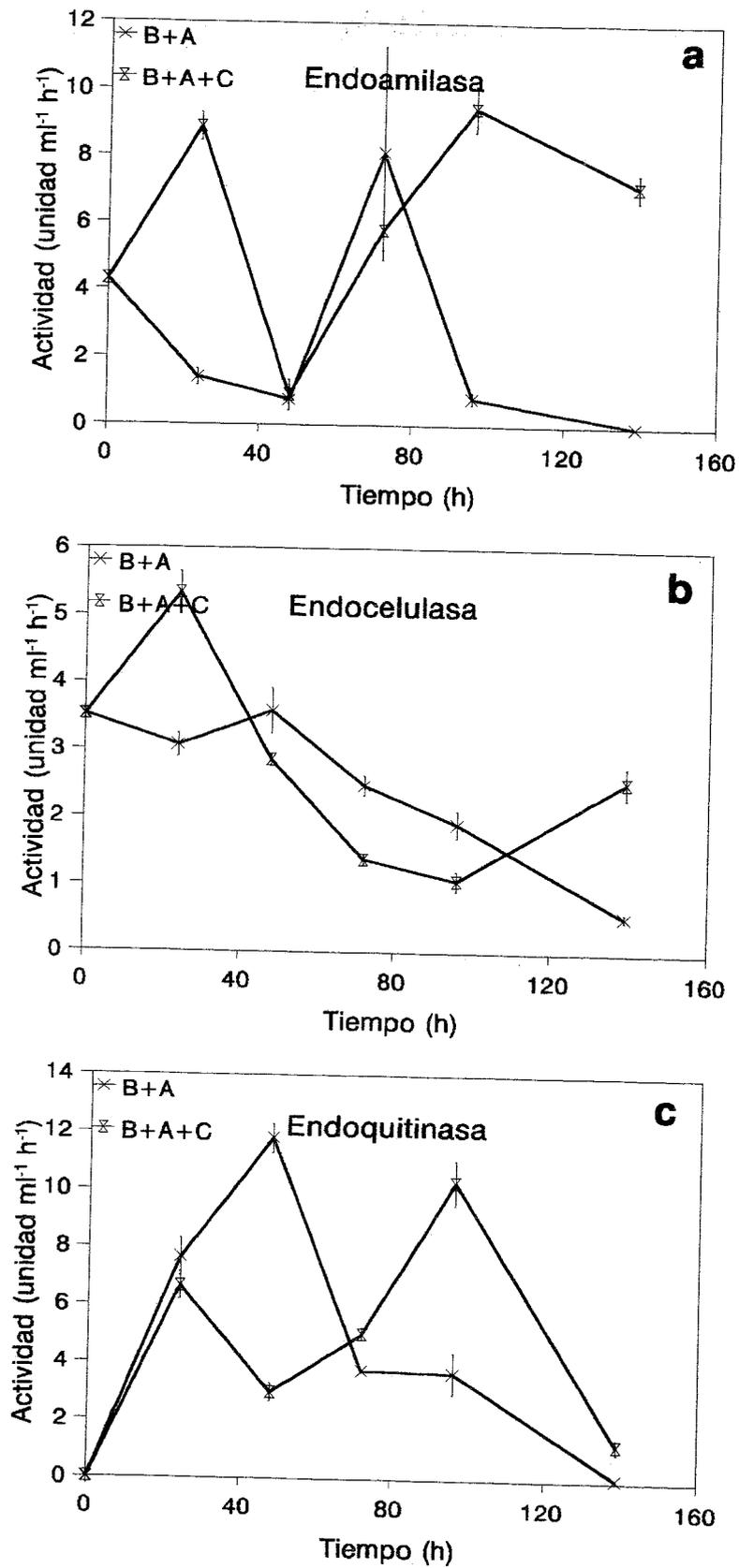
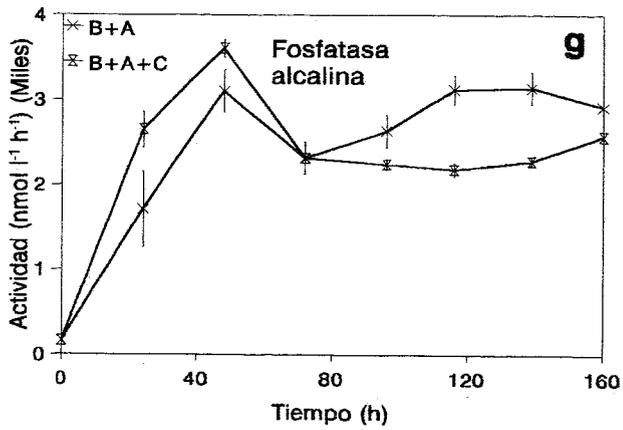
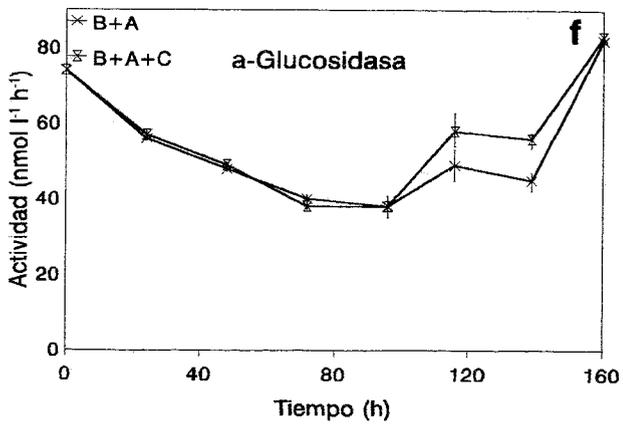
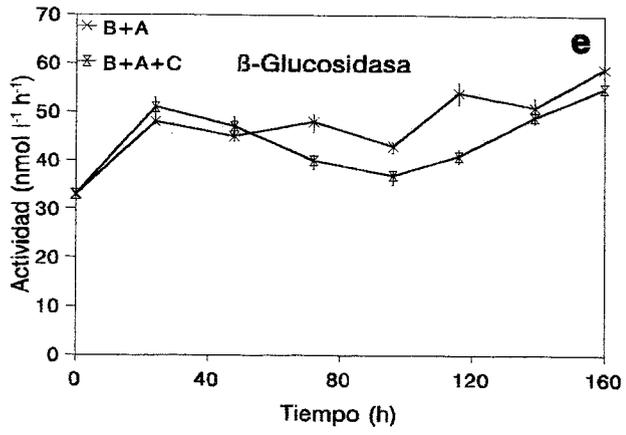
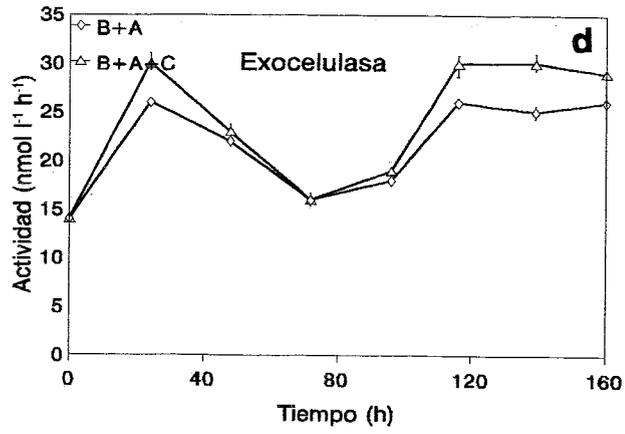


Figura 4.5. Evolución de las actividades ectoenzimáticas en las botellas con (B+A+C) y sin (B+A) crustáceos. Las barras indican el error estándar.



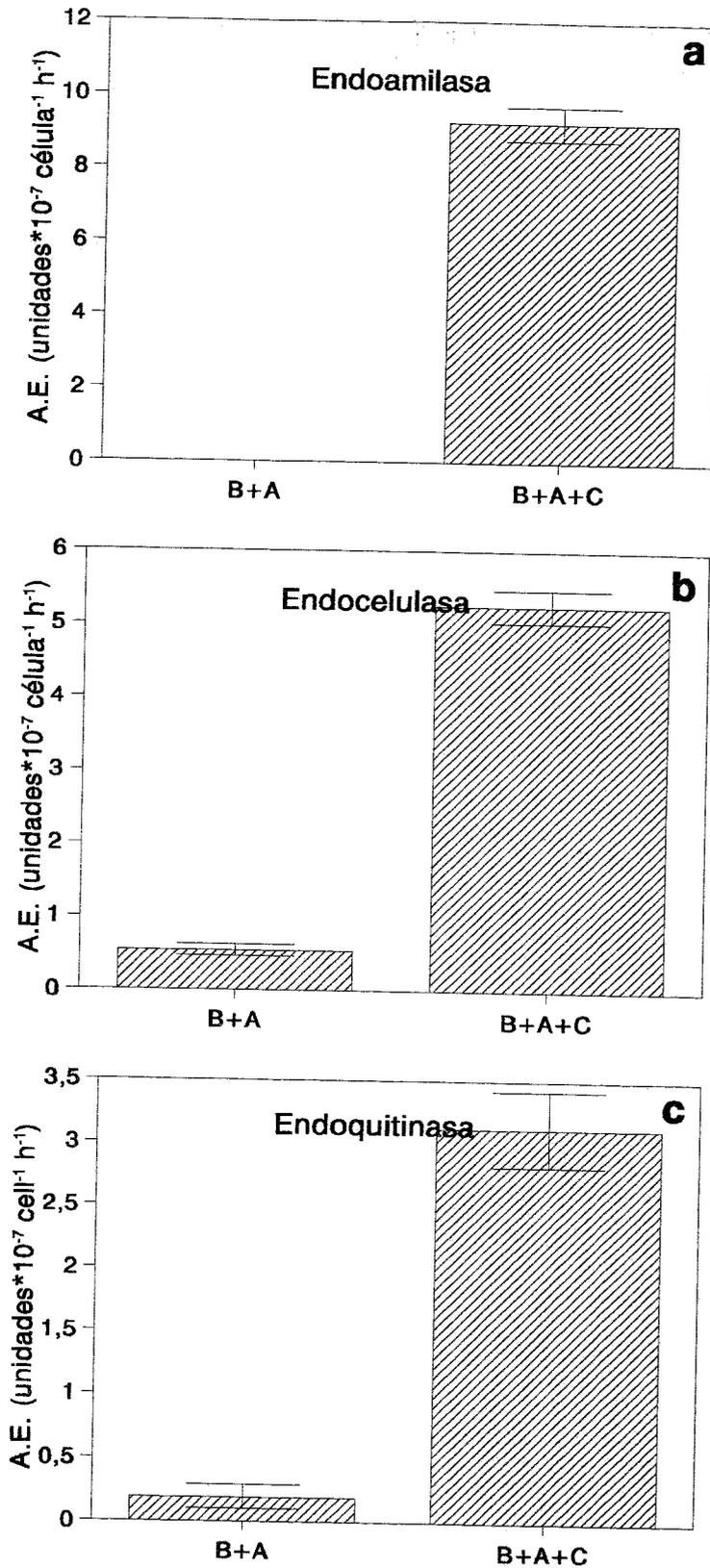
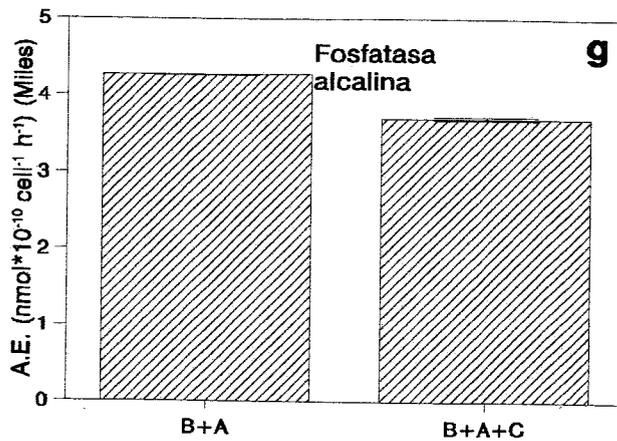
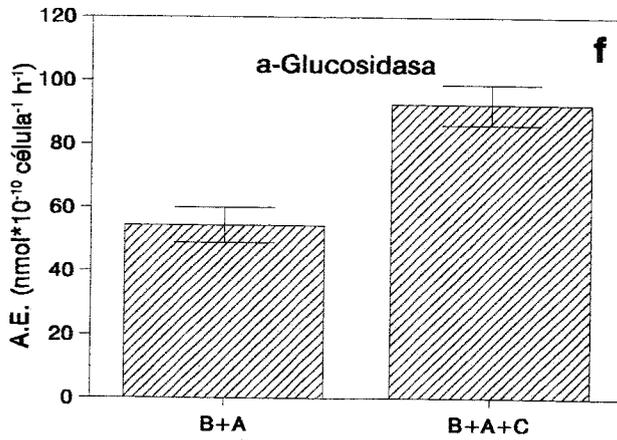
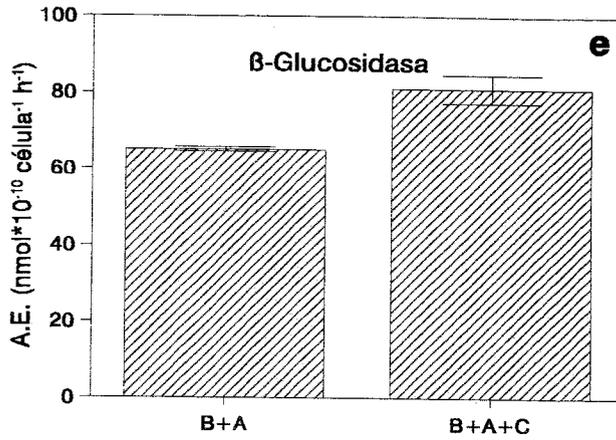
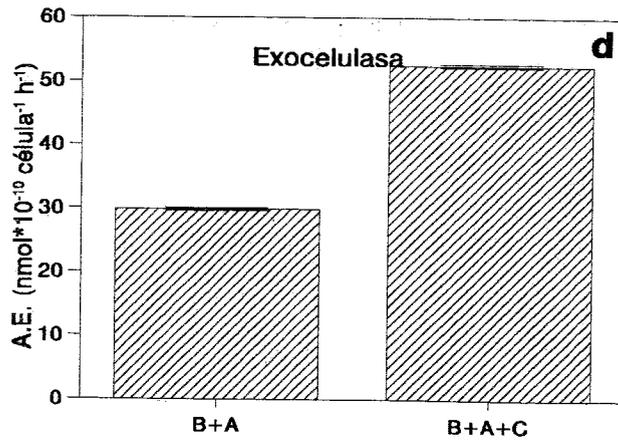


Figura 4.7. Comparación entre las actividades ectoenzimáticas específicas de las botellas con zooplancton (B+A+C) o sin él (B+A) durante la fase de máxima presión depredadora.



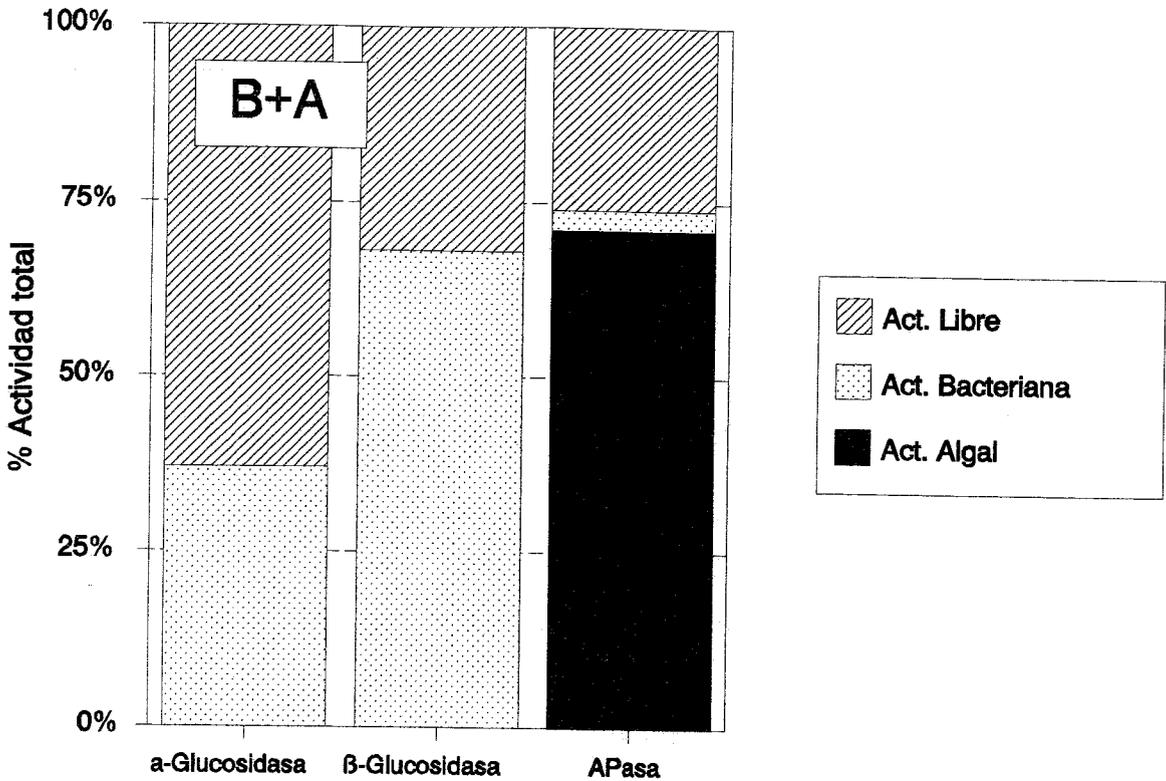


Figura 4.7. Fraccionamiento de la actividad ectoenzimática a las 72 h del inicio del experimento en una de las botellas que contenía algas.

libre en las botellas con y sin zooplancton, parece improbable que los aumentos de actividad observados en presencia de depredadores sea debido a la liberación de enzimas intracelulares o digestivos (Fig. 4.8).

4.4. Discusión

La materia orgánica disuelta liberada por las algas (RDOM) es frecuentemente

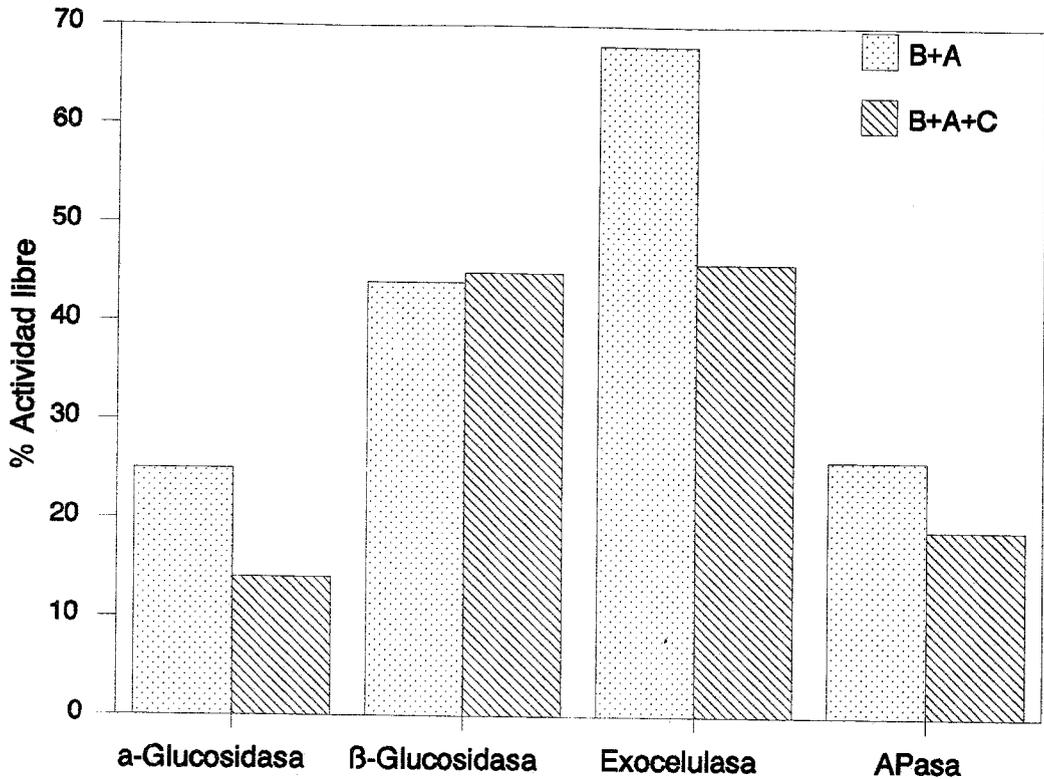


Figura 4.8. Porcentaje de actividad extracelular ($< 0,2 \mu\text{m}$) en los cultivos con zooplancton, algas y bacterias (B+A+C), y sólo con algas y bacterias (B+A).

una mezcla compleja (Wiebe & Smith 1977) de moléculas de diferente tamaño. La composición de la RDOM varía no solo entre hábitats (Sondergaard & Schierup 1982a, Chróst 1981, Cole et al. 1984) sino también entre diferentes especies de algas. Incluso en una misma especie la calidad de los productos liberados puede variar dependiendo del estado fisiológico de las algas. (Sondergaard & Schierup 1982b, Obernosterer & Herndl 1995). Las bacterias utilizan preferentemente substratos de bajo peso molecular (Chróst 1981) que pueden ser o bien absorbidos directamente como es el caso de los compuestos monoméricos o bien necesitan la acción de un ectoenzima como en el caso de los compuestos diméricos u oligoméricos. Se observaron actividades más altas de glucosidasas en presencia de células de *Scenedesmus*, mientras que, con la

excepción de la quitinasa, las actividades relacionadas con la degradación de polisacáridos se mantuvieron en niveles comparativamente bajos cuando las algas estaban presentes. Esto sugiere que los carbohidratos liberados por las algas eran principalmente de bajo peso molecular. Chróst (1992) y Obernosterer & Herndl (1995) observaron también un incremento de estas enzimas cuando las bacterias se encontraban creciendo en substratos de RDOM. Sin embargo, no se encuentra una explicación para el incremento de la actividad quitinasa ya que las algas verdes no producen compuestos del tipo quitina.

El fraccionamiento de las muestras proporcionó información acerca del posible origen de los ectoenzimas, pero la interpretación de los resultados debe ser muy cautelosa ya que puede tener varias fuentes de error. Estos errores pueden aparecer debido a que se trabaja cerca del límite de detección del método, a que pueden existir posibles contaminaciones de bacterias, así como la rotura de los enlaces que unen los enzimas a las paredes bacterianas debido a la presión utilizada para la filtración, lo que provocaría una sobreestimación de la actividad libre. Para la detección de la actividad en la fracción algal no fue necesario el uso de presión sino que fue realizada por filtración gravitacional lo que impidió el rompimiento de las uniones entre ectoenzimas y células.

Los experimentos de fraccionamiento por tamaños revelaron que la mayor parte las actividades de glucosidasa se encontraron o bien libres o bien en la fracción bacteriana, es decir $> 0,2 \mu\text{m} < 3 \mu\text{m}$, lo que sugiere que las bacterias fueron las principales productores de estos enzimas. Por el contrario, la mayoría de la APAsa estaba ligada a la fracción algal ($> 3 \mu\text{m}$). Por ello puede concluirse que en este caso, el incremento de la actividad de APAsa no estaba inducido por un incremento de la producción ectoenzimática de las bacterias sino que ésta fue más bien introducida directamente en el sistema con el inóculo de algas. Esta conclusión concuerda con los trabajos de Siuda & Chróst (1987) y Chróst & Overbeck (1987), aunque otros autores, encontraron la mayoría de la actividad APAsa en la fracción bacteriana (Francko 1991, Boon 1993, Francko 1983). La sugerencia que en este sistema estudiado la mayor parte de la actividad de fosfatasa alcalina tuvo un origen algal se vio reforzada además por los resultados observados durante la depredación por zooplancton. En este caso, se observó una

disminución de la actividad APAsa coincidiendo con el descenso del número de algas causado por la fuerte presión depredadora del zooplancton.

A diferencia de APAsa, se encontraron fuertes incrementos especialmente de las endoenzimas que degradan polisacáridos cuando el zooplancton se encontraba presente en el sistema. Esto sugiere, por encima de todo que las diferentes o adicionales fuentes de carbono fueron puestas a disposición de las bacterias gracias a la actividad depredadora del zooplancton. Un mecanismo importante que proporciona fuentes de carbono adicionales para las bacterias puede ser la alimentación ineficiente o "sloopy feeding" (Lampert 1978), por la que una parte substancial del contenido intracelular de las algas puede ser liberado al medio exterior. Esto podría explicar especialmente el fuerte incremento observado de las actividades de amilasa, ya que las células algales contenían altas cantidades de almidón que fue hecho accesible a las bacterias debido al rompimiento de las células causado por la depredación.

Mientras que la excreción algal es un mecanismo que proporciona carbono en forma de materia orgánica disuelta (DOM) principalmente, se supone que el zooplancton, mediante la alimentación ineficiente y la producción de pelotas fecales aumenta además el pool de materia orgánica particulada (POM), ya que la mayoría de los polisacáridos de la pared celular no pueden ser digeridos por los crustáceos y por ello son liberados al medio extraular con las heces. Ya que la mayoría de fragmentos celulares de contenido celulósico serían liberados por este mecanismo, esto podría explicar el aumento de actividades endo- y exocelulasa. También podría proporcionarse una respuesta similar para el incremento de quitinasas observado: como los crustaceos contienen exoesqueletos quitinosos, los restos (por ejemplo, exuvias liberadas tras la muda) podrían servir también como una fuente adicional de carbono particulado para las bacterias. Este incremento en la actividad quitinolítica podría también ser interpretado como una señal relacionada con las actividades de la muda del zooplancton, como sugeriría el trabajo recientemente publicado sobre la liberación de un enzima quitinolítico por el zooplancton (Vrba & Macháček 1994). Este enzima, una β -N-acetilglucoaminidasa tenía su origen de crustáceos

zooplanctónicos.

Este ejemplo muestra que especialmente en el caso de la combinación experimental de bacterias, algas y zooplancton no es sencillo obtener una respuesta inequívoca acerca del origen de los ectoenzimas. Por ello no puede ser excluida la posibilidad que al menos parte de las actividades observadas sean debidas a la liberación de enzimas digestivos por el zooplancton o de enzimas intracelulares de algas liberados por el rompimiento celular. En este caso, sin embargo, una parte del incremento de actividad debería detectarse en la fracción disuelta.

En resumen, los patrones de actividades observados sugieren que en ausencia de depredadores, la disponibilidad del carbon algal se limita solo a los productos de excreción, lo que en el caso del cultivo de *Scenedesmus* utilizado parece que consistió principalmente de sustancias de bajo peso molecular (mono- u oligómeros) la utilización de los cuales no requiere la acción o solo de un tipo de ectoenzima. El ejemplo de APAsa muestra que también las algas mismas pueden contribuir en parte al patrón de enzimas observado. Las actividades de depredación del zooplancton afectaron fuertemente los patrones enzimáticos observados, caracterizados por mayores actividades de degradación de polisacáridos y menores actividades APAsa. Aunque al menos en el caso de la quitinasa no puede excluirse una participación del zooplancton, los patrones mostrados parecen más bien estar causados por actividades bacterianas. Se considera que éstas están influenciadas por la disponibilidad adicional de fuentes de substrato fundamentalmente poliméricas que fueron accesibles para las bacterias mediante la alimentación ineficiente o por la defecación. Esta conclusión concuerda con la visión de que la vía indirecta a través de la predación es a menudo un mecanismo más importante de fuente de carbono bacteriano (Güde et al. 1985, Güde 1988, Arndt et al. 1992) que el aporte via excreción de carbono de algas. Además, el zooplancton algívoro puede también contribuir a la regulación de las comunidades bacterianas por la influencia en la calidad de los compuestos de carbono utilizables por las bacterias. En el lago Constanza,

por ejemplo, es de esperar que, coincidiendo con el mayor impacto de depredación sobre las algas por *Daphnia* al final de la proliferación algal de primavera, se produzca un cambio de poblaciones bacterianas que utilizan moléculas de pequeño tamaño durante el crecimiento de algas de primavera hacia otras que utilizan compuestos poliméricos cuando éste es consumido.

Es lächelt der See, er ladet zum Bade.

Schiller

- CAPÍTULO 5 -

**Biomasa y actividad de las comunidades
microbianas del agua de la zona litoral**

5.1. Introducción

El lago Constanza ha sido motivo de estudio desde hace décadas. Hasta la fecha se tiene ya una amplia información en lo que se refiere a su hidrografía, química y biología, que ha sido recientemente resumida por Geller & Güde (1989). A partir de los años 80, se ha descrito también la distribución de la abundancia y actividad de las bacterias en el lago (Simon & Tilzer 1982, Güde et al 1985, Güde 1986, 1988, 1990, Simon & Tilzer 1987, Simon & Rosenstock 1992, Schweitzer 1993, Rosenstock & Simon 1994). El presente es, sin embargo el primer trabajo que incluye un ciclo estacional de actividades ectoenzimáticas, y, por consiguiente, un seguimiento de la actividad microbiana heterotrófica del bacterioplancton en la hidrólisis de materia orgánica presente en el lago.

El objetivo del estudio en el agua pelágica fue obtener valores comparativos para el agua litoral. Por ello, y dada la poca variabilidad horizontal, fue muestreada únicamente una estación y a una sola profundidad (de 0 a 2 m) que se puede considerar más o menos representativa para el agua epilimnética, la zona metabólicamente más activa en cuanto a la producción primaria y a la actividad heterotrófica. La variabilidad horizontal dentro de la zona pelágica no es muy importante, por lo que los resultados de una estación podrán considerarse válidos para la zona epilimnética al menos en cuanto a la sucesión estacional.

A diferencia del de la zona pelágica, se conoce muy poco acerca del bacterioplancton de la zona litoral. Es de suponer que en el agua litoral tenga lugar una gran actividad metabólica debido a que existe un mayor aporte de nutrientes tanto autóctonos (fitoplancton y macrófitos fundamentalmente) como alóctonos (restos de plantas superiores senescentes) y que la temperatura del agua suele ser más elevada. La cercanía, además, del sedimento puede tener un papel importante para las poblaciones del agua, especialmente durante episodios de intenso viento que puedan causar una resuspensión del sedimento, como observaron recientemente Chróst & Riemann (1994). Estas características diferenciales de la zona litoral tendrán una influencia en las poblaciones

microbianas que habitan en el agua litoral y que se verán reflejadas en su biomasa, producción y actividad.

5.2. Material y métodos

Para conseguir el objetivo previsto, se tomaron muestras de la columna integrada de los dos metros superiores de la columna de agua pelágica y de la litoral. La estación pelágica (I4) estaba situada en el centro del lago, entre Langenargen (Alemania) y Arbon (Suiza) y tiene unos 200 m de profundidad. La estación litoral se encontraba frente al Institut für Seenforschung, a unos 200 m de la costa y su profundidad oscilaba entre los 3,5 y 5 metros.

Los parámetros que fueron investigados durante un ciclo estacional fueron la abundancia de las comunidades microbianas mediante la determinación de la concentración de clorofila *a* (Mantoura & Llewellyn 1983), que fue indicador de la biomasa de fitoplancton, y mediante recuentos celulares de bacterias y de flagelados heterotróficos por epifluorescencia (Porter & Feig 1980). También se determinó la producción bacteriana por la incorporación de timidina en el DNA de las células, y la actividad respiratoria y la capacidad para incorporar sustratos, en este caso glucosa, indicador de actividad metabólica, según una modificación del método seguido por Meyer-Reil et al. (1978).

Por primera vez, se realizó un ciclo estacional en el lago Constanza de la producción de actividades ectoenzimáticas necesarias para la degradación de polímeros, principales componentes de la materia orgánica disuelta (Münster & Chróst 1990). Gracias a los ectoenzimas, las bacterias son capaces de hidrolizar compuestos que, de otra manera no podrían ser absorbidos (Chróst 1990). Los enzimas investigados fueron: fosfatasa alcalina (se produce en ausencia de SRP), proteasa (hidroliza péptidos), endoamilasa y α -glucosidasa (hidrolizan polímeros y dímeros de almidón, respectivamente), endocelulasa, exocelulasa y β -glucosidasa (degradan polímeros, oligómeros y dímeros de celulosa, respectivamente), endoxilanasas (hidroliza xilano), endoquitinasa (degrada quitina). Los métodos utilizados para la determinación de sus actividades fueron de dos tipos: uno basado en la utilización de sustratos fluorescentes de metilumbeliferilo (MUF) para α - y β -glucosidasa,

exocelulasa, proteasa y APasa (Schmitt-Biegel & Obst 1989), y el otro es un método espectrofotométrico que utiliza substratos brillantes de remazol (Wirth & Wolf 1992).

Además de estas variables microbianas, fueron también consideradas una serie de parámetros físico-químicos como la temperatura y conductividad del agua, la concentración de fósforo reactivo disuelto SRP, silicatos, carbono orgánico particulado (POC), nitrógeno orgánico particulado (PON), materia orgánica particulada (POM), materia inorgánica particulada (PIM). En el capítulo 1 se encuentra una descripción más detallada de los métodos y la situación de las estaciones muestreadas.

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente mediante un análisis de la varianza, que permitía evaluar la existencia de diferencias entre la media de cada una de los períodos en los que fue dividido el ciclo estacional y la media del resto del año. Además, fueron realizadas correlaciones entre los parámetros determinados dentro de una misma masa de agua para detectar la existencia de similitudes en los ciclos.

5.2. Resultados

5.2.1. Dinámica estacional de las comunidades y actividades microbianas en el agua pelágica.

Para el estudio de la dinámica estacional, el ciclo anual fue dividido en cinco etapas que se corresponden con cinco períodos bien definidos del lago con características marcadamente diferentes, y que fueron previamente descritas por Sommer et al. (1986). Éstas fueron: la fase de proliferación algal de primavera (algal spring bloom), la fase del agua transparente (clear-water phase), la fase de proliferación algal del verano, el otoño y el invierno.

El establecimiento de la estratificación térmica al inicio de la primavera, permite el crecimiento masivo del fitoplancton. Asimismo, existe una disminución en la concentración de nutrientes, principalmente del fósforo soluble reactivo (SRP).

Este período se conoce como la fase de proliferación algal de primavera, y duró entre el 24 de marzo y el 6 de mayo. A principios de Junio, sin embargo, empieza una depredación masiva sobre las poblaciones de fitoplancton, que las reduce a concentraciones mínimas. Este período se denomina fase del agua transparente debido a la práctica desaparición de las algas en el agua y que se mantuvo hasta el 16 de junio. Posteriormente, al llegar el verano, aparecen de nuevo altas concentraciones de algas en el plancton, formando el bloom de verano que se mantiene hasta el 8 de septiembre, momento en el que se inicia el período denominado de otoño, a pesar de que no coincide exactamente con la estación del año. Durante el otoño, la abundancia algal inicia un descenso que alcanza sus mínimos en invierno (del 23 de noviembre al 23 de Marzo), etapa durante la cual se mantiene en un nivel muy bajo.

El ciclo anual de cada uno de los parámetros determinados se encuentra representado en las figuras 5.1 a 5.4 y los resultados del análisis de la varianza en la tabla 5.1.

5.2.1.1. Parámetros físico-químicos

El lago Constanza es un lago cálido monomíctico, con una holomixis hacia marzo. Durante el invierno la temperatura fue muy inferior a la del resto del año, manteniéndose estable de diciembre a abril alrededor de los 5 °C. Hacia el verano empezaron a aumentar la temperaturas, llegándose a los 22 °C de máxima anual.

La composición iónica del agua, se corresponde a la del agua dulce standard y tiene calcio y bicarbonato como componentes principales. La conductividad del agua fue bastante estable a lo largo del año variando solo entre 252 y 292 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Fig. 5.1)

La concentración de clorofila *a*, indicador de la biomasa algal viva, presentó valores significativamente superiores durante el bloom de primavera, con dos picos de 22,6 y 14,0 $\mu\text{g l}^{-1}$ a finales de marzo y abril respectivamente. La ausencia de medidas durante el invierno impiden la observación de los predecibles bajos valores, y su relevancia a nivel estadístico.

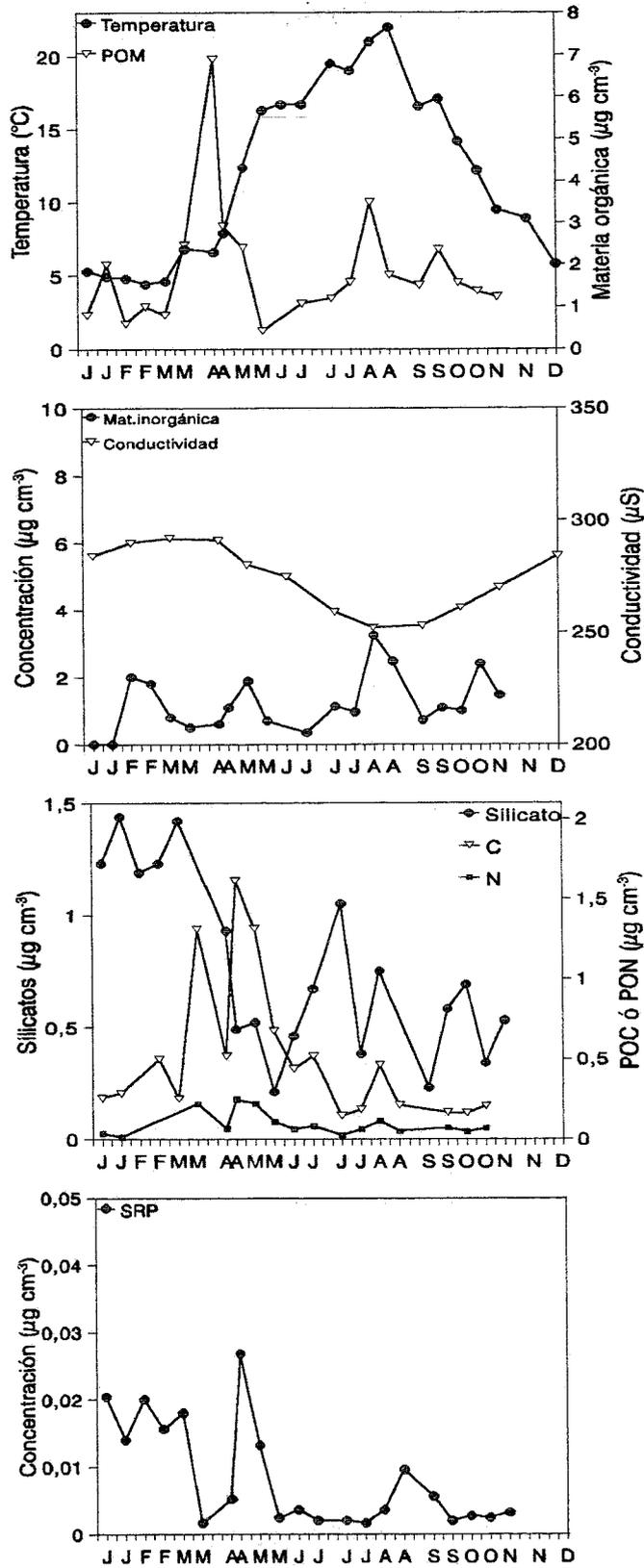


Figura 5.1. Ciclo anual de los parámetros físico-químicos investigados en el agua pelágica durante el ciclo estacional.

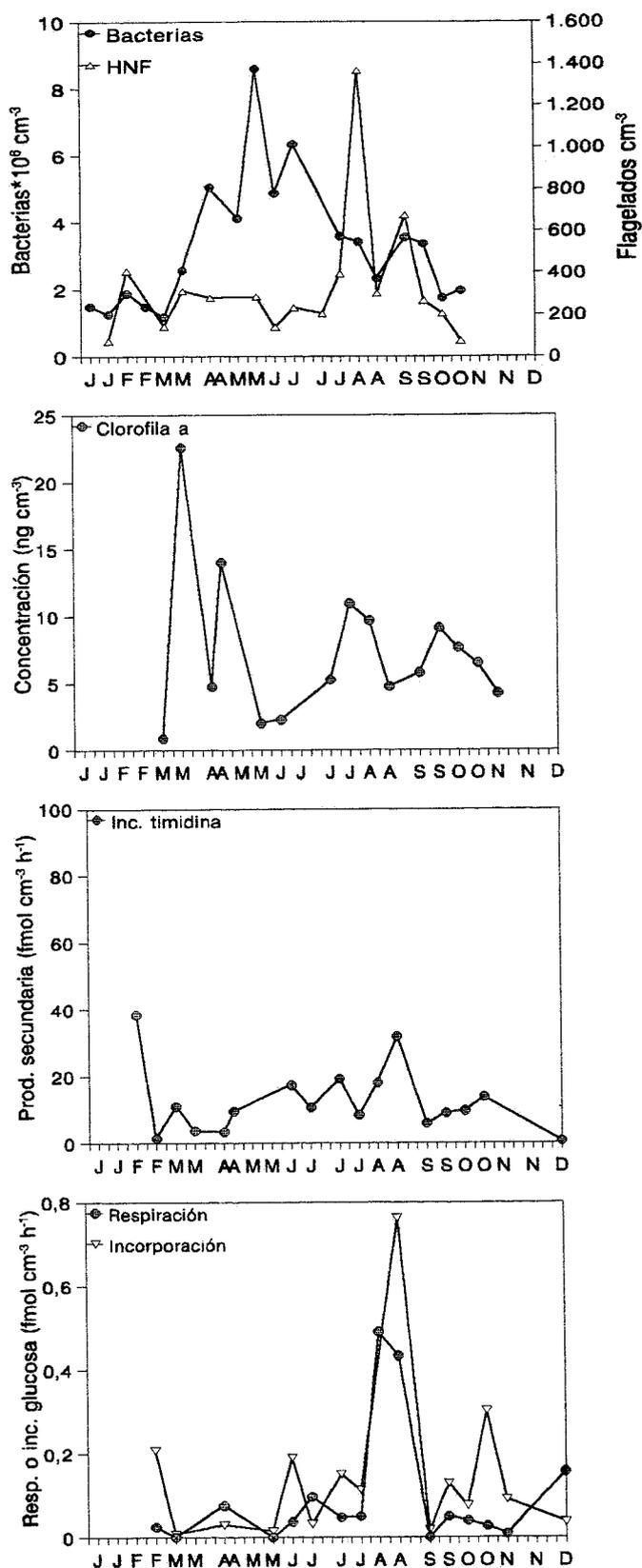


Figura 5.2. Ciclo anual de la concentración, producción y actividad de las poblaciones microbianas en el agua pelágica durante 1993.

La cantidad de materia orgánica particulada presente en el agua, cuyo rango osciló entre $0,4 \mu\text{g cm}^{-3}$, en mayo, un máximo muy pronunciado de $6,9 \mu\text{g cm}^{-3}$, fue al igual que la concentración de clorofila a también significativamente mayor durante el bloom de primavera. Tanto la presencia de carbono como de nitrógeno particulados siguieron un patrón bastante similar y alcanzaron las concentraciones más elevadas durante el máximo de primavera cuando éstas fueron muy superiores al resto del año. La concentración de silicatos alcanzó, por el contrario los máximos valores a principio del ciclo, entre 1 y $1,5 \mu\text{g cm}^{-3}$, y que éstas descendieron durante la primavera hasta llegar al mínimo de $0,23 \mu\text{g cm}^{-3}$ a finales de mayo.

La concentración de SRP (fósforo soluble reactivo) fue durante el invierno elevada y bastante estable. Sin embargo, durante marzo descendió y se mantuvo baja durante el periodo muestreado.

La concentración de materia inorgánica particulada presentó pocas oscilaciones y éstas no coincidieron con las fases estudiadas. El rango en el que osciló fue entre 0 y $3,24 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Las concentraciones más altas de oxígeno se alcanzaron durante el bloom de primavera, y a lo largo del año osciló entre 9,9 y $15,3 \mu\text{g cm}^{-3}$.

5.2.1.2. Comunidades microbianas heterotróficas

La abundancia de bacterias en el agua pelágica fue superior durante los meses de primavera y verano (Fig 5.2a). Durante los meses de invierno se registraron las concentraciones más bajas ($< 2 \cdot 10^6$ células cm^{-3}), que fueron creciendo a medida que aumentaba la temperatura. A finales de primavera e inicio de verano se registraron las mayores abundancias, con un máximo de $8,6 \cdot 10^6$ células cm^{-3} el 18 de Mayo. Las concentraciones fueron significativamente inferiores durante el invierno, y superiores, durante la fase del agua transparente.

Los nanoflagelados heterotróficos (HNF) constituyen un grupo taxonómicamente heterogéneo que consume bacterias y picoplancton autotrófico. Su concentración no presenta grandes variaciones durante el año, oscilando entre 74 y 400 células cm^{-3} , a excepción del máximo de 1365 células cm^{-3} de principios de agosto, que

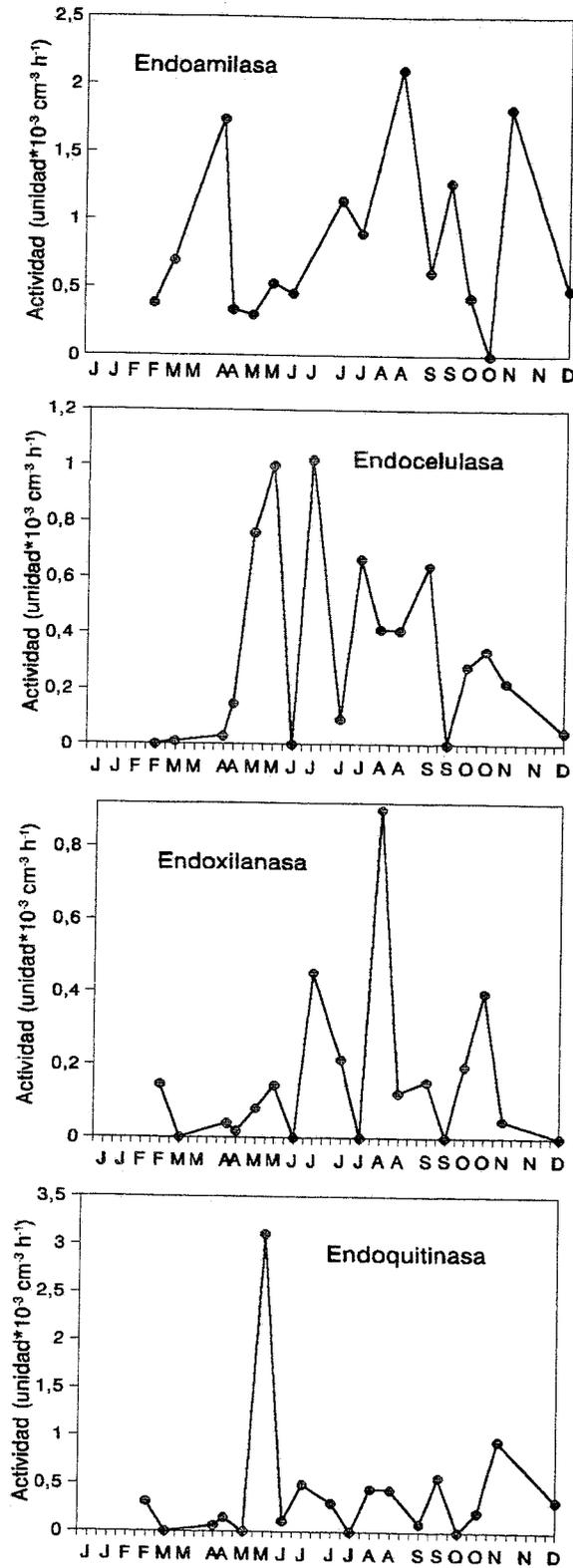


Figura 5.3. Ciclo anual de algunas actividades ectoenzimáticas determinadas en el agua pelágica durante el ciclo estacional.

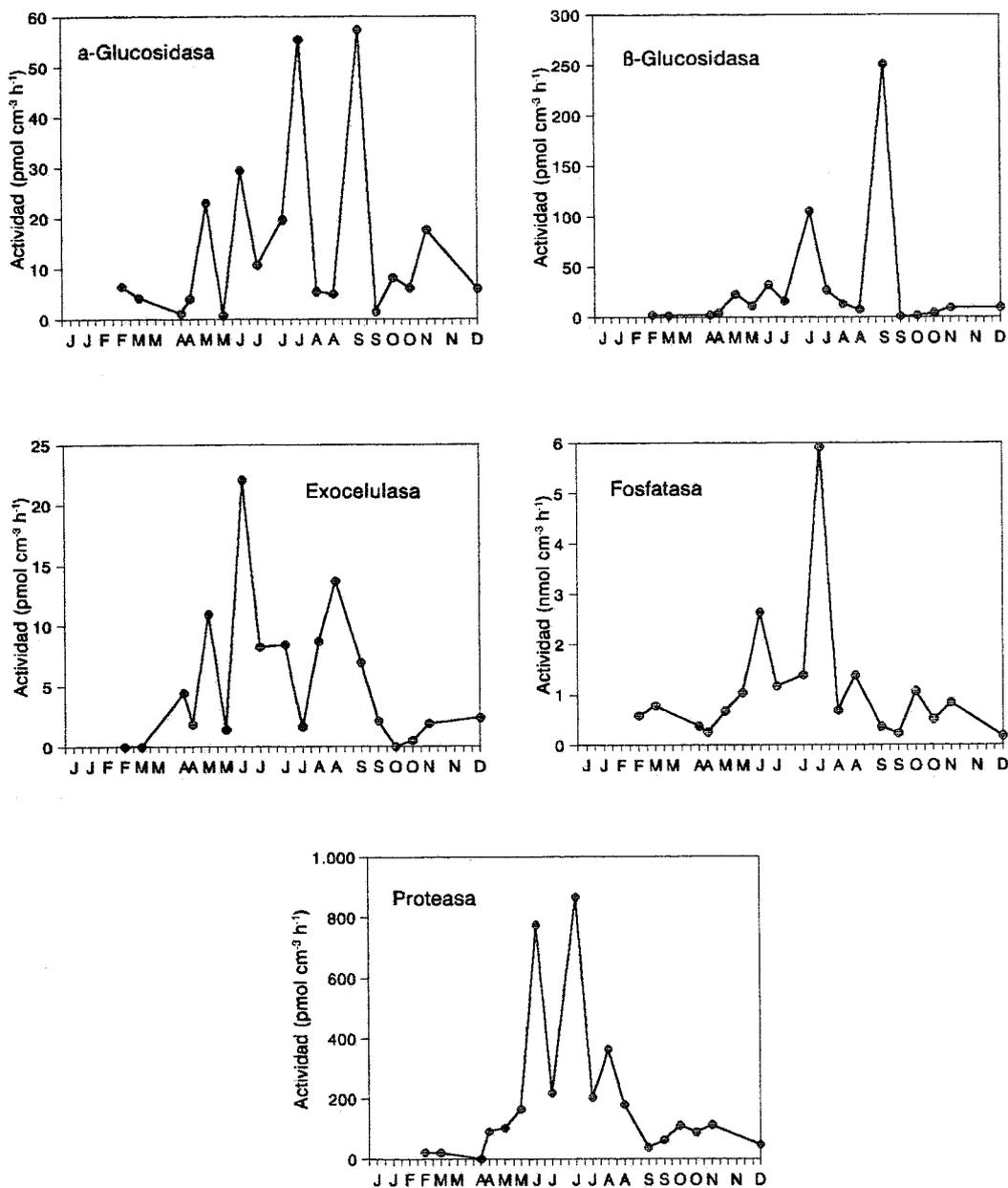


Figura 5.4. Ciclo anual de algunas actividades ectoenzimáticas determinadas en el agua pelágica durante 1993.

coincide con el descenso en la abundancia bacteriana (Fig 5.2).

5.2.1.3. Actividad y producción microbiana

La incorporación de timidina tritiada presentó dos claros máximos de alrededor entre 30 y 40 fmol cm⁻³ h⁻¹, uno, difícil de interpretar, a principios de febrero, y el otro a finales de agosto.

La actividad metabólica heterotrófica fue medida mediante la incorporación y la respiración de sustratos, en nuestro caso de la glucosa radiactiva, presentando ambos unos valores más altos durante a finales de agosto en que los máximos fueron de 0,5 fmol cm⁻³ h⁻¹ de glucosa respirados y de 0,8 fmol cm⁻³ h⁻¹.

5.2.1.4. Actividades ectoenzimáticas

Las actividades de los endoenzimas involucrados en la degradación de carbohidratos, se caracterizaron, en general, por fuertes oscilaciones. La actividad más importante de ellas fue la endoamilasa, que alcanzó máximos cercanos a las 2 unidades*10⁻³ cm⁻³ h⁻¹, mientras que los valores máximos de endocelulasa y endoxilanasas fueron aproximadamente la mitad de éstos. La actividad quitinolítica apenas superó las 0,5 unidades*10⁻³ cm⁻³ h⁻¹, salvo a finales de mayo cuando se observó un máximo que alcanzó las 3,11 unidades*10⁻³ cm⁻³ h⁻¹. Fue debido a este máximo que la actividad durante la fase del agua transparente fue significativamente superior a la del resto del año. El resto de actividades involucradas en la degradación de polisacáridos, presentaron oscilaciones no explicables por las diferentes fases anuales. Las actividades α - y β -glucosidasas oscilaron siempre en el mismo orden de magnitud, a excepción de dos máximos de β -glucosidasa, a principios de junio y, sobretudo, de septiembre cuando estos fueron unas 10 veces superiores a los de α -glucosidasa. La actividad de la exocelulasa, inferior a las anteriores, alcanzó a principios de junio 22,6 pmol cm⁻³ h⁻¹.

Tabla 5.1. Parámetros cuyas medias fueron significativamente diferentes a las del resto del año para cada fase, ya sean mayores (superior) o menores (inferior) analizadas mediante un análisis de la varianza.

AGUA PELAGICA	Proliferac. algal de primavera	Fase del agua transparente	Proliferac. algal de verano	Otoño	Invierno
SUPERIOR	Clorofila a POM POC PON	Bacteria Endoquitinasa	Prod. Bact. Resp. Glu. Fosfatasa Proteasa Temperatura		SRP Silicatos
INFERIOR					Bacteria Temperatura

La fosfatasa alcalina fue significativamente superior durante la fase de proliferación algal del verano, cuando también se observó el máximo, el 19 de

julio, de $5,91 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. La actividad proteolítica también fue significativamente diferente durante los meses de verano, cuando los resultados fueron claramente mayores a los anuales. Durante ese período se llegó a actividades alrededor de los $800 \text{ pmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

5.2.2. Dinámica estacional de las comunidades y actividades microbianas en el agua litoral.

5.2.2.1. Parámetros físico-químicos

En general, las características físico-químicas del agua litoral presentaban claras diferencias estacionales. El factor más claro, como era de esperar, fue la temperatura (Fig. 5.5). El rango se situó entre $2,8$ y $21,6$ °C, alcanzando valores máximos en verano y mínimos en invierno, cuando también fue mínima la conductividad del agua, que varió entre 239 y $339 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ durante el año.

La concentración de clorofila *a* presentó dos máximos anuales. El de primavera alcanzó los $16,1 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ y duró de finales de marzo a principios de mayo. El segundo, de verano, alcanzó la concentración anual más elevada ($18,3 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) a finales de agosto. En invierno se observaron los valores más bajos, alrededor de $1,5 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$. La cantidad de materia orgánica particulada presente en el agua, cuyo rango osciló entre $3,6 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$, en febrero, y $38 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$, fue también significativamente mayor durante los meses de verano. Tanto la presencia de carbono como de nitrógeno particulados siguieron un patrón bastante similar durante el año, siendo durante la proliferación algal de primavera cuando éstas fueron muy superiores al resto del año. Por el contrario, las concentraciones de silicatos fueron las más bajas durante el período de marzo a junio, hasta $0,2 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$. Aunque el máximo anual, de $15 \text{ } \mu\text{g cm}^{-3}$ se registró el 6 de julio, en invierno fue cuando estas concentraciones fueron más elevadas, descendiendo a medida que se acercaba la primavera. Parecido fue también el desarrollo anual de la concentración de SRP (fósforo soluble reactivo). Las concentraciones más altas se observaron durante los meses de invierno, que, sin embargo, no contuvieron el máximo anual, de $42 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, que tuvo lugar a finales de julio. Los

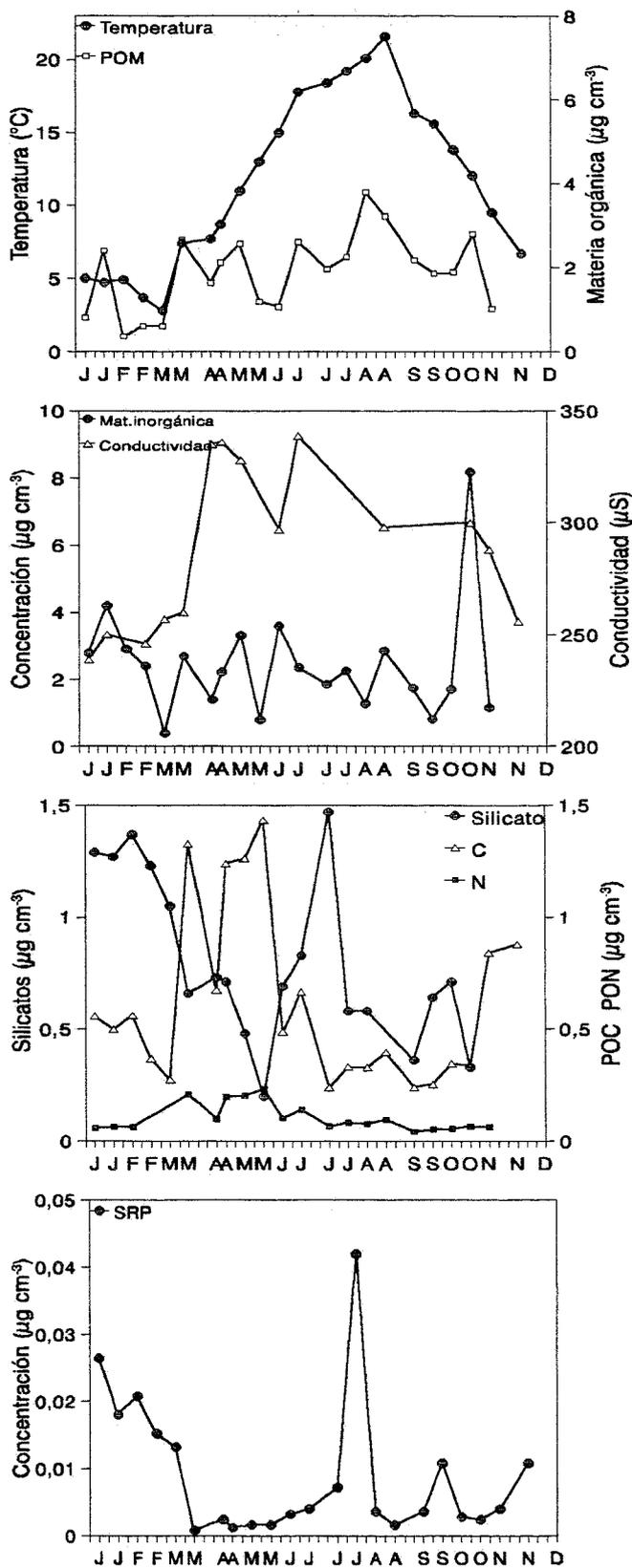


Figura 5.5. Ciclo anual de los parámetros físico-químicos investigados en el agua litoral durante 1993.

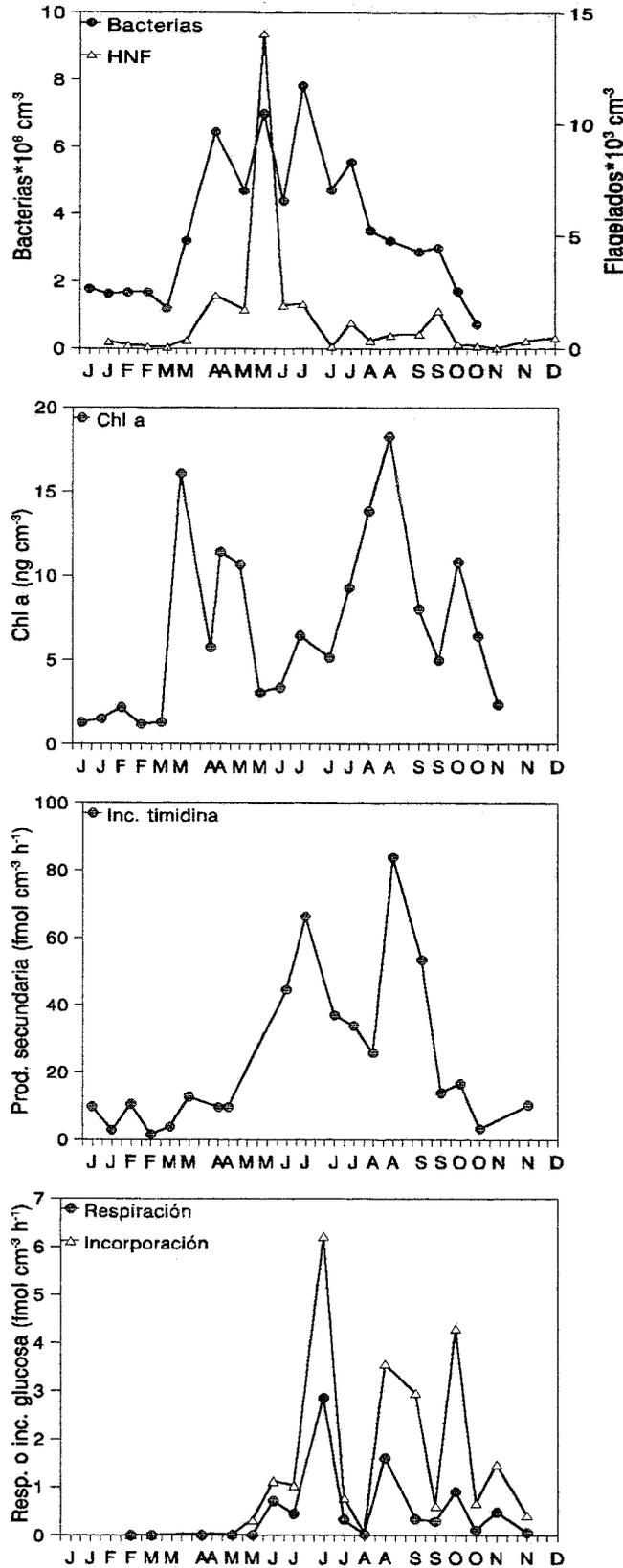


Figura 5.6. Ciclo anual de las poblaciones, producción y actividad microbianas seguidas en el agua litoral.

parámetros mencionados hasta ahora presentaron una cierta estacionalidad, basada en el análisis estadístico de los datos.

El resto de parámetros físico-químicos, sin embargo, no fueron significativamente diferentes entre las fases estudiadas, si bien presentaron oscilaciones que también deben ser tenidas en cuenta. La concentración de materia inorgánica particulada presentó frecuentes oscilaciones durante el año pudiendo ser destacada la elevada concentración ($8,18 \mu\text{g cm}^{-3}$) registrada el día 19 de octubre, y que al coincidir también con un elevado valor de materia orgánica puede hacer pensar que fue debido a la acción del viento que removió el sedimento durante una tormenta, lo que pudo haber puesto partículas en suspensión.

5.2.2.2. Comunidades microbianas heterotróficas

La abundancia de bacterias heterotróficas en el agua litoral fue superior durante la primavera e inicio del verano, con una concentración máxima anual de $7,81 \cdot 10^6$ células cm^{-3} el 16 de junio. Durante los meses de invierno se registraron las concentraciones más bajas ($< 2 \cdot 10^6$ células cm^{-3}), que aumentaron fuertemente a medida que avanzaba el año.

La concentración de flagelados heterotróficos osciló a lo largo del año entre 20 y 2367 células cm^{-3} , alcanzándose, sin embargo un máximo de $14,07 \cdot 10^3$ células cm^{-3} a finales de mayo.

5.2.2.3. Actividad y producción microbiana

La producción bacteriana presentó dos claros máximos de 66,3 y 83,8 $\text{fmol cm}^{-3} \text{h}^{-1}$. La máxima producción fue observada durante los meses de verano mientras que los valores mínimos se alcanzaron durante el invierno.

La actividad metabólica heterotrófica fue medida mediante la incorporación y la respiración de sustratos, en nuestro caso de la glucosa radiactiva. Ambas actividades variaron de manera paralela durante el año. Siendo siempre la

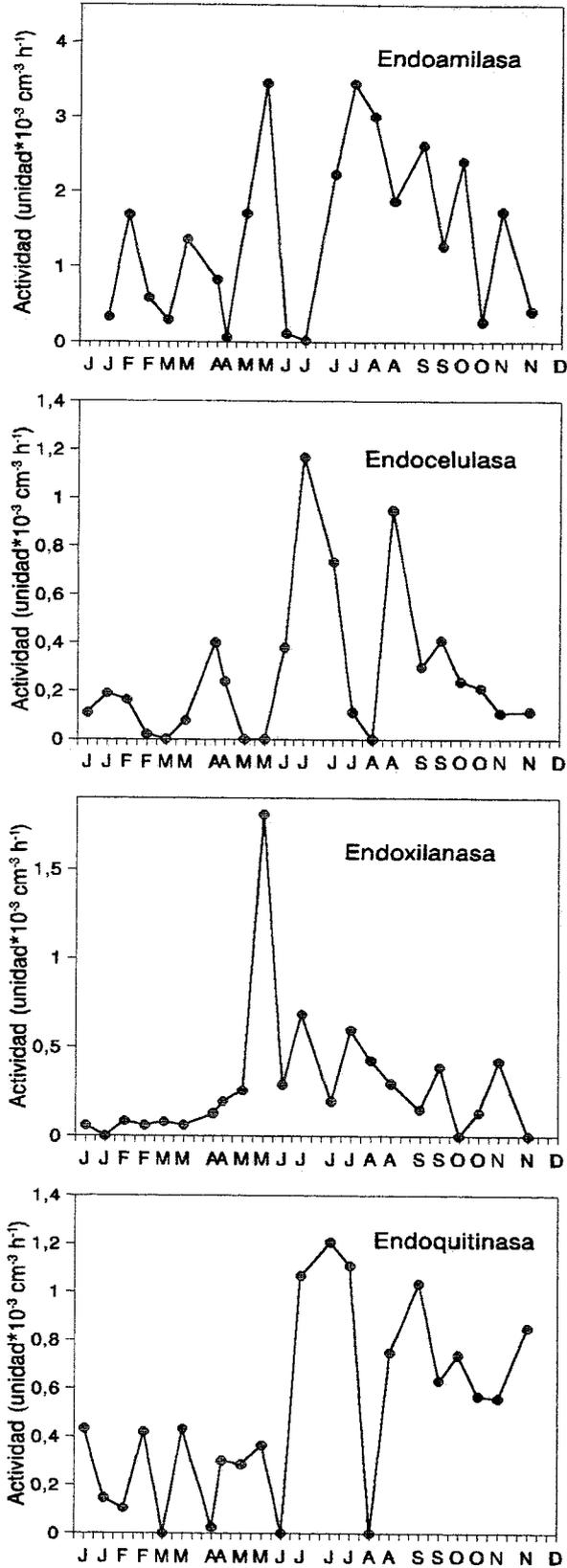


Figura 5.7. Ciclo anual de algunas de las actividades ectoenzimáticas en el agua litoral durante 1993.

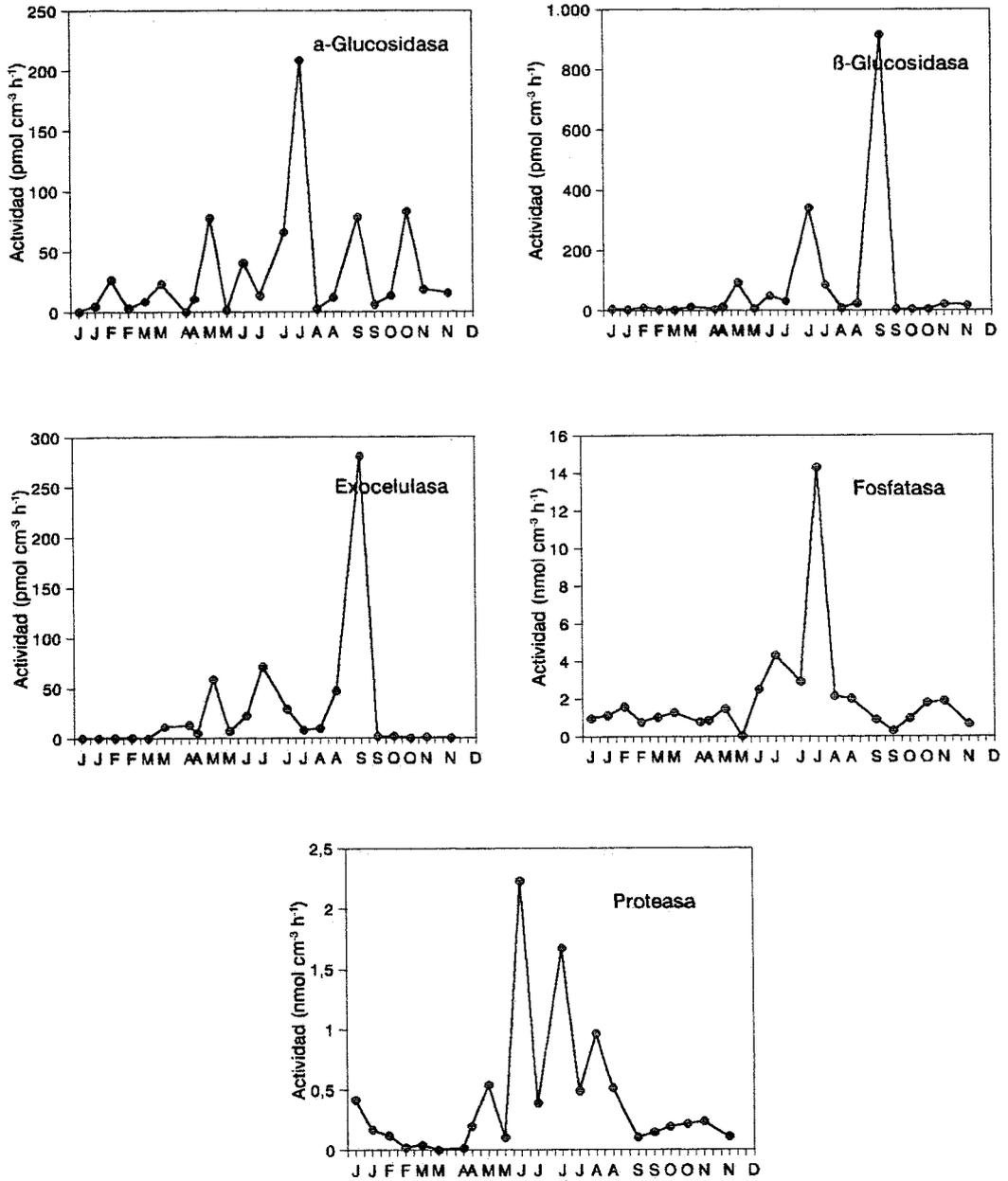


Figura 5.8. Ciclo anual de algunas actividades ectoenzimáticas determinadas en el ciclo estacional del agua litoral.

Tabla 5.2. Parámetros cuyas medias fueron significativamente diferentes a las del resto del año para cada fase, mayores (superior) o menores (inferior) analizadas mediante un ANOVA.

	Proliferac. algal de primavera	Fase del agua transparente	Proliferac. algal de verano	Otoño	Invierno
AGUA LITORAL					
SUPERIOR	POC PON	Bacteria HNF Endoxilanasas	Clorofila a Prod. Bact. Resp. Glu. Fosfatasa Proteasa Endoamilasa POM Temperatura		Silicatos
INFERIOR		Prod. Bact.		PON	Clorofila a Prod. Bact. Temperatura Conductividad

incorporación superior a la respiración. Las máximas actividades se encontraron a principios de julio, y fueron de 2,86 y 6,21 $\text{fmol cm}^{-3} \text{h}^{-1}$ para la incorporación

y la respiración respectivamente, siendo la respiración significativamente superior durante la fase de proliferación algal de verano.

5.2.2.4. Actividades ectoenzimáticas

La mayoría de los actividades de los ectoenzimas estudiados, a excepción de la endoquitinasa, presentaron su máxima actividad durante los meses entre mayo y agosto (Figs. 5.7 y 5.8). Es por ello que algunas actividades fueron significativamente superiores durante la fase de proliferación algal del verano, como la endoamilasa, la fosfatasa alcalina y la proteasa, y otro durante la fase del agua transparente, la endoxilanasas. De entre ellos, el caso más claro es el de la proteasa, cuya actividad se vió incrementada durante los meses de mayo a julio hasta $2,23 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. La actividad de fosfatasa alcalina cuyo valor extremo se alcanzó el 19 de julio, de $14,3 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, presentó una mayor actividad durante el verano, siendo destacable que el valor mínimo se detectó el 18 de mayo ($44 \text{ pmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$).

Las actividades glucosídicas de α - y β -glucosidasa se movieron en general dentro del mismo orden de magnitud, a excepción del valor extremo de β -glucosidasa ($914 \text{ pmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) del día 8 de septiembre. En este día, la actividad exocelulasa presentó también un valor máximo de actividad, $280 \text{ pmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$), siendo el resto del año en general algo inferior a las de glucosidasas. De entre los endoenzimas, la actividad más elevada fue la de endoamilasa, que llegó a las $3,45 \text{ unidades} \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. La media de la actividad endocelulolítica fue unas cinco veces inferior. Alrededor de esos mismos valores osciló también la actividad quitinolítica, cuya actividad no presentó claras tendencias a lo largo del año. La actividad de la endoxilanasas, fue en general inferior, excepto el día 18 de mayo, durante la fase del agua transparente, cuando se registró un máximo de $1,81 \text{ unidades} \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$.

5.2.3. Relaciones entre los parámetros físico-químicos y biológicos estudiados en el agua litoral.

Los datos obtenidos en el agua litoral durante 1993 fueron trabajados estadísticamente mediante un análisis de correlación. Las correlaciones con un nivel de significación $p < 0,05$ se encuentran listadas en las tablas de 5.3 a 5.5.

5.2.3.1. Comunidades microbianas

La abundancia de bacterias en el agua litoral parece estar en gran manera influida por la presencia de depredadores, es decir de nanoflagelados, y también por su propia producción celular. La correlación con la temperatura también es positiva, así como lo son también las de la conductividad del agua y su concentración de nitrógeno particulado.

La densidad de la población de nanoflagelados, está relacionada positivamente con la de bacterias y con la producción de éstas. También hay una correlación directa entre la concentración de nanoflagelados y la conductividad del agua, la concentración de nitrógeno particulado, y, de manera inversa con la concentración de silicatos.

La abundancia de fitoplancton, indicada por la concentración de clorofila *a*, presentó una elevada dependencia de la temperatura. La, también, buena correlación con la concentración de materia orgánica particulada, puede ser una indicación de que ésta última está formada en su mayor parte por material fotosintetizador vivo. Una relación también causal podría establecerse entre la producción bacteriana y la concentración de clorofila *a*. Posiblemente, la excreción de productos por parte de las algas facilite el crecimiento de las bacterias.

De manera inversa se correlacionan tanto la concentración de fósforo soluble reactivo y de silicatos, posiblemente debido a la utilización por parte de las algas, principalmente diatomeas, de estos nutrientes inorgánicos para su metabolismo.

Tabla 5.3. Correlaciones significativas para las poblaciones microbianas en el agua litoral. Se indica el coeficiente de correlación, r , y el nivel de significación: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

	Variable	r
Bacterias	HNF	0,759***
	Prod.Bact.	0,711**
	Conductividad	0,655*
	Temperatura	0,531*
	PON	0,573*
HNF	Prod.Bact.	0,542*
	PON	0,565*
	Silicatos	-0,605*
	Conductividad	0,618*
Clorofila a	POM	0,795***
	Temperatura	0,742***
	SRP	-0,640**
	Conductividad	0,659*
	Prod.Bact.	0,612**
	Silicatos	-0,479*

5.2.3.2. Actividad y producción microbiana

El factor más relacionado con la producción bacteriana es la temperatura, aunque también la concentración de bacterias y de clorofila parecen jugar un papel muy importante. Se obtuvieron, asimismo, correlaciones directas con la abundancia de nanoflagelados (HNF) y con la incorporación y la respiración de glucosa.

La incorporación de glucosa y la tasa de respiración estuvieron positivamente correlacionadas entre ellas y con la producción bacteriana, también lo están con la temperatura.

En general pues, se observa una relación entre la actividad y producción bacterianas con la temperatura.

Tabla 5.4. Correlaciones significativas para la producción y actividad de las poblaciones del agua litoral. Se indica el parámetro de correlación, r , y el nivel de significación: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

	Variable	r
Prod. Bact.	Temperatura	0,823***
	Bacteria	0,711**
	Clorofila a	0,612**
	Respir.Gluc.	0,767**
	Incorp.Gluc.	0,705**
	HNF	0,542*
Resp.Glucosa	Temperatura	0,640*
	Incorp.Gluc.	0,924***
	PON	-0,585*
Incorp.Gluc.	Temperatura	0,652**
	PON	-0,533*

5.2.3.3. Actividades ectoenzimáticas

La temperatura presentó una correlación directa con varias de las actividades ectoenzimáticas, como la de β -glucosidasa, fosfatasa y proteasa.

Algunos de los ectoenzimas estudiados mostraron correlaciones con la concentración de bacterias, siendo ello quizás una indicación que la síntesis de los enzimas no fue debida a ningún estímulo exterior, sino proporcional a las variaciones en el número de células, y por tanto independiente del tipo de substratos existentes. Este fue el caso de la β -glucosidasa y de la exocelulasa. Precisamente las actividades ectoenzimáticas que no covariaron ni con la temperatura ni con la abundancia bacteriana son las que presentan un posible interés a la hora de evaluar la degradación de polímeros. En este grupo se

Tabla 5.5. Correlaciones significativas de las actividades ectoenzimáticas en el agua litoral. Se indica el parámetro de correlación: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

	Variable	r
α -Glucosidasa	Proteasa	0,488*
β -Glucosidasa	Bacterias	0,474*
	Prod. Bact	0,722***
	Incorp. Gluc.	0,621**
	Proteasa	0,489*
	Temperatura	0,548*
Exocelulasa	Bacterias	0,645**
Endocelulasa	Endoquitinasa	0,500*
	Resp. Gluc.	0,565*
	Incorp. Gluc.	0,621**
Fosfatasa	Prod. Bact.	0,469*
	Proteasa	0,491*
	Temperatura	0,504*
Proteasa	Bact. Prod.	0,628**
	Incorp. Gluc.	0,502*
	Temperatura	0,640**

encuentran las endosacaridasas, cuya actividad realmente pudo estar regulada por el diferente tipo de substratos disponible en cada momento.

El resto de actividades ectoenzimáticas presentaron correlaciones especialmente entre ellas, y a menudo, aparte de con la temperatura i/o la concentración de bacterias, también con la producción de éstas.

5.3. Discusión

Los resultados de los parámetros químicos y biológicos indican que el año 1993 fue un año normal, es decir, comparable a los años anteriores.

Durante el invierno, el agua pelágica presentó elevadas concentraciones de nutrientes, como SRP y silicatos. Las temperaturas fueron bajas y la concentración de bacterias alcanzó los mínimos anuales (Pomeroy & Wiebe 1993). Con la estratificación térmica, a inicios de primavera se produjo un drástico incremento en la concentración de clorofila *a* que también representó un aumento en la concentración de C y N, posiblemente por el aumento de la biomasa fitoplanctónica. El máximo algal que ocurre en primavera consistió principalmente de diatomeas como muestran datos de otra estación pelágica (Gries 1995). Las diatomeas sedimentan comparativamente más rápido que las otras algas y presentan también una concentración de carbohidratos menor. Ello puede explicar que no se detecten elevadas actividades de los ectoenzimas involucrados en la hidrólisis de polisacáridos durante este período.

La finalización del máximo algal de primavera ocurrió posiblemente debido a la disminución de la concentración de nutrientes (Weisse et al. 1990) o bien a la degradación por cladóceros (Tilzer 1984). La abundancia de cladóceros aumentó fuertemente durante este período, especialmente la de *Daphnia* (IGKB 1995). En el capítulo 2, se muestra experimentalmente el incremento de la actividad quitinolítica en presencia de *Daphnia* y que también ha sido observado en este estudio en la zona pelágica, aunque debe tenerse en cuenta que se trata de un máximo formado por un solo punto en ambos casos. Vrba et al. (1992) observaron una correlación entre la actividad quitinolítica y la biomasa de zooplancton. Posiblemente se haya producido un enriquecimiento con quitina del caparazón de *Daphnia*, debido a la muda o al contenido de restos quitinosos en los excrementos. Alternativamente podría tratarse, como ha sido descrito recientemente por Vrba & Macháček (1994) de un enzima producido por *Daphnia*.

Durante el verano se produce otra proliferación de fitoplancton, sin embargo de

distinta composición que el de primavera. Éste está formado por principalmente por crisofíceas (sobre todo *Dynobryon*), algas verdes y cianofíceas. Estas algas contienen una mayor cantidad de polisacáridos que las diatomeas y además no sedimentan tan rápidamente y por ello se mantienen durante más tiempo en el epilimnion. Es precisamente durante o después de la proliferación de algas del verano cuando se registraron los valores más altos de actividades de hidrólisis de polisacáridos, como endoamilasa, endocelulasa y endoxilanasas. La actividad proteolítica fue elevada solo al inicio del crecimiento de estas algas. Esto nos sugiere que durante el verano y el otoño aumenta la importancia en el epilimnion de la degradación de carbohidratos poliméricos. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Rosenstock & Simon (1993) que vieron que durante invierno y primavera, los aminoácidos libres cubrían casi el 100 % de las demandas del crecimiento bacteriano, mientras que durante el verano y el otoño una parte importante debe estar cubierta por substratos poliméricos. Durante el verano, se observan también elevadas actividades de fosfatasa alcalina, que pueden estar debidas a la baja concentración de fósforo que tiene lugar en el lago Constanza (Güde 1991) y en otros lagos. Es también durante este período cuando se ve una mayor actividad bacteriana, tanto de incorporación como de respiración de glucosa.

Así pues, el patrón de actividades ectoenzimáticas en la zona pelágica muestra, sorprendentemente unas bajas actividades durante la proliferación algal de primavera. Cuando se produce la máxima abundancia de *Daphnia*, se observa también una muy elevada actividad quitinolítica. La degradación de carbohidratos aumenta en importancia durante verano y otoño, mientras que la actividad proteolítica disminuye a finales de verano. Los niveles de actividad de fosfatasa alcalina son elevados cuando la concentración de P en el lago se mantiene muy baja.

Las características físico-químicas descritas para el agua litoral son muy parecidas a las descritas para el agua pelágica. Sin embargo pueden observarse algunos rasgos diferenciales. Por ejemplo, la mayor conductividad de sus aguas, indicación de la cercanía de la estación a la desembocadura del río Schussen. La

mayor y también más oscilante concentración de materia inorgánica recuerda la cercanía de la masa de agua al sedimento litoral, que puede resuspenderse debido a fuertes vientos. Esta resuspensión causa un efecto estimulador de las tasas de actividad hidrolítica microbiana durante espacios cortos de tiempo (Chróst & Riemann 1994) en ecosistemas costeros. Estos dos características aportes de materia, tendrán sin duda influencia en los parámetros microbiológicos del agua litoral.

Las bacterias que crecieron en el lago, así como su concentración fueron muy similares a las del agua pelágica. Su productividad fue mayor durante los meses de verano. Tanto la respiración como la incorporación de glucosa fueron más elevadas a partir de junio, y en todos los casos muy superiores a las detectadas en el agua pelágica.

La actividad ectoenzimática estuvo caracterizada principalmente por una mayor oscilación de los valores y una mayor actividad. Los endoenzimas presentan en general una mayor actividad durante el verano y el otoño, concretamente a partir de junio, como endoamilasa, endocelulasa y endoxilanasas. Este último enzima, sin embargo, alcanza un máximo en mayo coincidiendo con un máximo de la concentración de flagelados heterotróficos. La endoquitinasa no presenta ningún pico durante la fase del agua transparente, sino que su actividad es superior a partir de junio, y en general presenta varios picos. El incremento de la actividad quitinolítica podría ser debido a la influencia de las larvas de insectos que suelen encontrarse en cantidades abundantes en esta zona en el lago Constanza (Reiss 1968), y tratarse quizás de enzimas de muda o bien un aumento de un aumento en la concentración de quitina en el agua.

El agua litoral, debe además estar influida por el crecimiento de fitobentos. Este, formado principalmente por diatomeas pennales, adquiere su máxima importancia durante la primavera, descendiendo durante el verano (Teiber 1995). La actividad de fosfatasa alcalina, por lo general superior durante el verano, se sitúa dentro de niveles similares a los del agua pelágica, aunque existe un máximo a finales de julio, que coincide con un máximo en la concentración de SRP. Este elevado valor de SRP durante el periodo de agotamiento del P resulta sorprendente. Si bien no debe ser excluida la existencia de un error metodológico, puede tratarse de la llegada de agua del río Schussen, que

frecuentemente se detecta en la estación y que influye los parámetros químicos medidos. El hecho de que en el agua pelágica se observe un valor también superior de APasa pero no de SRP en el mismo tiempo, hace pensar que se debió tratar más probablemente de un error metodológico.

Las actividades de α - y β -glucosidasa y exocelulasa adquieren especial importancia tan solo durante los meses de verano, mientras que el resto del año las actividades eran bajas. Estas actividades presentaron unas oscilaciones mucho más amplias que en el agua pelágica. La actividad proteolítica sigue un curso muy similar a la del agua pelágica, con valores más altos durante el verano, aunque las actividades son mucho más elevadas.

Al igual que en el agua pelágica, durante la proliferación algal de primavera no se produce un incremento de las actividades de hidrólisis de carbohidratos, sino que éstas ocurren a partir de los meses de verano, posiblemente por las mismas razones expuestas para el agua pelágica. A excepción de quizás alguna actividad ectoenzimática como endoquitinasa o endocelulasa, todos los parámetros bacterianos fueron encontrados en un nivel más elevado que en la zona pelágica. Estos resultados sugieren que, aunque el ciclo anual de los parámetros es similar al del agua pelágica, deben existir factores adicionales que controlan los procesos de degradación microbianos. Uno de ellos es presumiblemente la mayor cantidad de carbono en la zona litoral, y la mayor cantidad y tipos de sustratos que pueden estar disponibles para las bacterias. Por otro lado, la mezcla frecuente de agua y sedimento puede incrementar durante cortos episodios de tiempo la concentración tanto de materia orgánica como inorgánica.

Da rast der See und will sein Opfer haben.

Schiller

- CAPÍTULO 6 -

**Biomasa y actividad de las comunidades
microbianas del sedimento de la zona litoral**

6.1. Introducción

Si bien es conocida la importancia de las bacterias en ecosistemas acuáticos (Williams, 1981), a diferencia del agua, los estudios microbiológicos en sedimentos litorales han sido muy escasos (Mallo et al. 1993, López 1993, Starink 1995). Este hecho resulta sorprendente ya que en ellos tiene lugar una intensa actividad metabólica debido a la producción primaria del fitobentos, de macrófitos y los aportes continentales. Este superior aporte de materia orgánica y el hecho que la concentración bacteriana sea unos tres órdenes de magnitud superior, hace pensar en el posible potencial heterotrófico de los sedimentos litorales, donde las bacterias pueden jugar un papel fundamental. Pese a esta reconocida importancia, las poblaciones bacterianas de los sedimentos del litoral del lago Constanza han sido objeto de estudio únicamente en dos ocasiones (Deufel 1971, Soecknick et al. 1970). El proyecto "Estructuras y metabolismo de la zona litoral del lago Constanza" ha permitido realizar un estudio de la zona litoral en el que el sedimento ha sido especialmente tenido en consideración. El proyecto incluye diversos aspectos como el estudio del fitobentos (Teiber 1995), de los macrófitos (Walser & Güde 1995) y potencial redox (Weyhmüller 1995), así como de las actividades microbianas (este trabajo). Al tratarse de un trabajo en cierta manera pionero, los objetivos fueron el realizar una descripción general de las características de las poblaciones microbianas que se encuentran en el sedimento. Uno de los aspectos tratados fue la heterogeneidad del sedimento a diferentes escalas y la influencia de una tormenta sobre ésta. El objetivo central del trabajo fue, sin embargo, el estudio de la dinámica estacional de la abundancia y actividades microbianas. Para ello fue escogida, por razones logísticas, una única estación, que fue tomada como ejemplo de estación litoral, y de la que fue estudiado siempre el centímetro superior, considerado el más activo.

6.2. Material y métodos

La zona del litoral muestreada se encuentra en la parte norte del lago Constanza, y se sitúa entre las ciudades de Lindau y Friedrichshafen. En cada uno de los estudios fueron muestreadas una o varias estaciones, cuya situación se encuentra en la figura 6.1. En el ciclo anual fue muestreada únicamente la estación I2.

Las muestras fueron tomadas manualmente con tubos de plexiglas de 35 mm de diámetro. Los parámetros investigados fueron la abundancia, respiración y producción bacteriana así como la actividad de varios ectoenzimas: α -glucosidasa (involucrado en la hidrólisis de almidón, β -glucosidasa, exocelulasa (hidrolizan oligosacáridos de celulosa), fosfatasa alcalina, que hace accesible el fósforo orgánico, y la proteolítica. Además se estudió la degradación de polisacáridos de almidón, celulosa, xilano y quitina, mediante el estudio de los ectoenzimas: endoamilasa, endocelulasa, endoxilanasas y endoquitinasa.

La concentración de bacterias fue estimada mediante el recuento de las células al microscopio de epifluorescencia, previo tratamiento ultrasónico para su dispersión, y posterior tinción. Este método es una modificación del método de Schallenberg et al (1989). La producción bacteriana fue determinada mediante la incorporación de timidina tritiada en el ADN de las células, aplicando el protocolo estandarizado para sedimentos del litoral del lago Constanza por Zlinski (datos no publicados). Para la determinación de la respiración se siguió una modificación del método utilizado por Meyer-Reil et al. (1978). La actividad ectoenzimática fue determinada mediante dos métodos diferentes uno basado en el uso de sustratos fluorogénicos, adaptación del método usado por Schmitt-Biegel & Obst (1989) a los sedimentos del litoral por Sala & Güde (1993b), u otro basado en un método espectrométrico (Wirth & Wolf 1992).

Estos métodos de estima de la concentración, producción y actividad ectoenzimática se encuentran descritos de manera más detallada en el capítulo 1, donde se describen también la metodología para la determinación de la concentración de clorofila y de materia orgánica.

Para el análisis de los resultados fueron utilizados tres tipos de tratamientos: análisis de correlación entre parámetros; análisis de varianzas de doble entrada para comparar las medias de un periodo del ciclo respecto a la del resto; y un

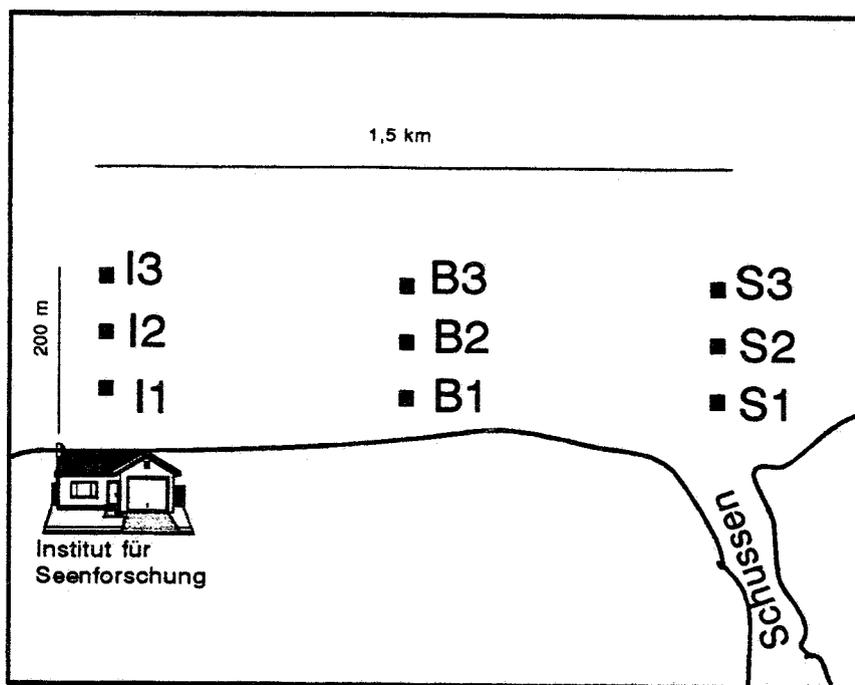


Figura 6.1. Situación de las estaciones de muestreo.

test de Tukey que analiza la existencia de diferencias entre pares de datos. Además, para comparar las dinámicas entre parámetros, se realizó un análisis de correlación (log-log) de Pearson.

6.3. Resultados

6.3.1 Heterogeneidad en los sedimentos litorales

La heterogeneidad en el agua ha sido estudiada en diversas ocasiones (Owen

1989, Lehman & Scavia 1982, Mackas et al. 1985), incluso para el bacterioplancton (Mitchell & Fuhrman 1989, Duarte & Vaqué, 1992, Pedrós-Alió & Sala, 1990). En el sedimento, se intuye que la heterogeneidad puede ser muy importante (Jones 1982). Este trabajo pretende, por tanto, obtener una idea inicial acerca del alcance de la heterogeneidad, de la variabilidad temporal (días) y de la de la influencia del viento sobre ambas.

Los diferentes aspectos han sido estudiados en experimentos por separado.

Los aspectos estudiados han sido:

- 6.3.1.1. Heterogeneidad horizontal a pequeña escala
- 6.3.1.2. Heterogeneidad vertical a pequeña escala
- 6.3.1.3. Heterogeneidad intraestacional
- 6.3.1.4. Heterogeneidad interestacional
- 6.3.1.5. Variabilidad temporal
- 6.3.1.6. Efecto de las tormentas sobre la heterogeneidad vertical
- 6.3.1.7. Efecto de las tormentas sobre la heterogeneidad intraestacional
- 6.3.1.8. Efecto de las tormentas sobre la heterogeneidad interestacional
- 6.3.1.9. Efecto de las tormentas sobre la variabilidad temporal

Las muestras tomadas durante la serie de 1993, cuyos resultados se muestran en el capítulo 10, fueron tomadas siempre en la misma estación (I2). Esta misma estación fue la elegida para investigar la heterogeneidad a 1 cm de distancia (a pequeña escala) y a unos 10 cm (intraestacional). Asimismo, en el apartado dedicado a la heterogeneidad interestacional se observaron los efectos de las aguas de un río contaminado (Schussen) que desemboca aproximadamente cerca de 1.5 km al oeste de esta estación.

6.3.1.1. Heterogeneidad horizontal a pequeña escala

En los muestreos rutinarios fueron tomados los sedimentos con cilindros de metacrilato de los que el centímetro superior fue cortado, mezclado y utilizado para las determinaciones químicas y biológicas. Por ello se consideró interesante el investigar la existencia de heterogeneidad dentro de un área pequeña.

Tabla 6.1. Media y desviación entre las actividades ectoenzimáticas medidas en 9 cm² adyacentes en nmol gww⁻¹ h⁻¹. CV es el coeficiente de variación.

ENZIMA	Media	Desv. típica	CV
α-Glucosidasa	0.555	0.482	86.81
β-Glucosidasa	0.540	0.238	44.02
Exocelulasa	0.285	0.186	65,42
Fosfatasa	8.372	4.143	49.49
Proteasa	24,91	10.73	43.06

La muestra de sedimento de estudio fue tomada durante el mes de febrero de 1994. El primer centímetro del sedimento fue separado, y de éste fueron cortados 9 cubos de 1 cm de arista. De cada uno de los cubos fue realizada una suspensión de sedimento, como descrito en el capítulo 1 y se determinó la actividad de varios ectoenzimas. Los resultados de la media, desviación típica y coeficiente de variación (CV) de las nueve submuestras han sido resumidos en la tabla 6.1.

Los coeficientes de variación obtenidos para estas variables en sedimentos litorales oscilan entre el 43 y el 87 %, lo que indica la existencia de una elevada heterogeneidad a nivel de centímetros. Esto nos informa de que debemos interpretar con precaución los resultados que obtenemos de las muestras de campo del sedimento litoral de la estación objeto de nuestro estudio.

Para probar estadísticamente la existencia de diferencias entre las submuestras, se realizó un análisis de la varianza. Los resultados mostraron que existían diferencias dentro de un mismo cilindro tanto para fosfatasa ($p= 0,0253$) como

para proteasa ($p < 0,0001$).

Así pues podemos concluir la existencia de una alta heterogeneidad horizontal incluso a nivel de centímetros, con un coeficiente de variación superior a un 40 %.

6.3.1.2. Heterogeneidad vertical a pequeña escala

Durante el ciclo estacional fue siempre estudiado el centímetro superior, ya que se consideró que este era la zona metabólicamente más activa. Para confirmar esta suposición, fue investigada la heterogeneidad vertical realizando un perfil de los 5 centímetros superiores del sedimento. Para ello se tomó un cilindro de sedimento de la estación S2 y fue cortado en rebanadas de 1 cm de grosor. En el primero, tercero y quinto fueron determinadas varias actividades ectoenzimáticas.

Tabla 6.2. Perfil vertical de actividades ectoenzimáticas (en $\text{nmol gww}^{-1} \text{h}^{-1}$) para los 5 cm superiores de la estación S2 en Agosto.

Profundidad	α -Glucos.	β -Glucos.	Exocelul.	Fosfatasa
0-1 cm	4.48	2.41	0.98	8.30
2-3 cm	3,13	1.57	0.43	5.97
4-5 cm	2.18	1.13	0.51	5.33

Los resultados, que se muestran en la tabla 6.2 confirman la existencia de un gradiente vertical de las actividades ectoenzimáticas estudiadas. Un análisis de la varianza mostró la existencia de diferencias a nivel vertical para los enzimas estudiados, a excepción de la exocelulasa ($p = 0,0521$). Siendo, en el caso de β -glucosidasa y de fosfatasa, el centímetro superior significativamente diferente a los dos inferiores ($p < 0,05$, mediante un test de Tukey). En el caso de la α -

glucosidasa, actividad dominante de las que hidrolizan carbohidratos estudiada, se observa un claro perfil en descenso con la profundidad. La suma de las actividades glucosídicas, como de la actividad fosfatasa disminuyen con la profundidad. En el primer caso, se observa el mayor cambio entre el tercer y el quinto centímetro, de cerca de 6 a casi 2 $\text{nmol gww}^{-1} \text{h}^{-1}$. La fosfatasa, por el contrario, presenta las mayores diferencias entre el primer y el tercer centímetro (de 8 a casi 6 $\text{nmol gww}^{-1} \text{h}^{-1}$). Los resultados indican pues la existencia de un fuerte gradiente en los primeros cinco centímetros del sedimento.

6.3.1.3. Heterogeneidad intraestacional

Dentro de una misma estación pueden encontrarse ondulaciones en la superficie del sedimento. Estas ondulaciones provocan la existencia de dos zonas una superior y una inferior, que pueden diferenciarse ópticamente por la acumulación de una capa de detritus y algas en ésta última. Esta heterogeneidad visiblemente apreciable nos induce a pensar que ésta podría traducirse en diferencias en la concentración y actividad de las bacterias. Para comprobar esta hipótesis, fueron tomadas dos muestras en la estación I2 y distantes unos 10 cm una de la otra. La subestación inferior (tabla 6.3), donde se acumulaban detritus, contenía una concentración de bacterias más de tres veces menor a la de la subestación superior. Estas poblaciones bacterianas presentaban, sin embargo, una producción y una actividad fosfatasa mucho más alta que en la subestación superior. Ambas con diferencias significativas mediante un análisis de la varianza, $p=0,0459$ y $p=0,0254$, respectivamente. La actividades β -glucosidasa y exocelulasa no presentaron diferencias significativas, lo que podría indicar que las actividades específicas de las poblaciones de la subestación superior fueron mayores. La actividad de α -glucosidasa presentó diferencias significativas en ambas subestaciones. Su valor en la subestación superior era dos veces superior al de la inferior, mientras que el número de bacterias era unas cinco veces mayor, por lo que la actividad específica era más alta en la subestación inferior. Así pues, en este ejemplo se pone de manifiesto la existencia de una heterogeneidad dentro de una misma estación de muestreo. La zona inferior de

Tabla 6.3. Recuentos, producción y actividades bacterianas en sedimentos provenientes de dos subestaciones distantes 10 cm una de la otra. Se indica también la desviación estándar.

Parámetro	Inferior	Superior
Conc. Bacteriana	0,13	0,52
Prod. Bacteriana	41,68±25,63	<1
Act.ectoenzimáticas		
α-Glucosidasa	0,62±0,09	1,27±0,75
β-Glucosidasa	0,60	0,48±0,37
Exocelulasa	0,68±0,95	0
Fosfatasa	3,50±1,00	2,15±0,87

Concentración de bacterias: células*10⁹ gww⁻¹

Producción: incorporación de timidina, en fmol gww⁻¹ h⁻¹

Actividades ectoenzimáticas: nmol gww⁻¹ h⁻¹

la ondulación del sedimento se caracterizó por presentar poblaciones bacterianas menos densas pero más activas en cuanto a su producción y en la degradación de substratos derivados de la hidrólisis de la celulosa que las de la zona superior. La zona inferior presentaban también una más elevada actividad de fosfatasa alcalina, para la que una posible causa podría ser que esta estación presentara una mayor población fitobentónica, potencial productora de este enzima.

6.3.1.4. Heterogeneidad interestacional

La influencia de un río contaminado sobre los sedimentos, fue estudiada en tres

ocasiones distintas. Para ello fue muestreada un área de 1500 m x 300 m, y dentro de ésta se escogieron 9 estaciones: las estaciones I se encontraban frente al Institut für Seenforschung, e incluyen a la estación donde se realizaron los muestreos de rutina (I2). Las S distaban aproximadamente 1,5 km de las I y estaban situadas en la desembocadura del río Schussen, río que aporta al lago unos $10,7 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de agua (IGKB 1994). Las B se encontraban entre I y S, aproximadamente equidistantes a ambas. Las estaciones fueron numeradas según la distancia que las separaba de la línea de la costa. Las estaciones 1 se encontraban a unos 100 m, las 2 a unos 150 m, y las 3 a unos 200 m de la orilla. La situación de las estaciones se encuentra representada en la figura 6.1. El objetivo principal de estos estudios fue el describir la importancia del río Schussen sobre la estación de muestreo de sedimento habitual, mediante la detección de un gradiente de actividades de estaciones más alejadas a más cercanas a la desembocadura. Para ello fueron muestreadas nueve, tres y dos estaciones en diferentes meses y años.

A. Febrero 1994

En este fecha se tomaron muestras en nueve estaciones en las que, aparte de los parámetros biológicos se midieron algunos parámetros ambientales y cuyos valores se encuentra en la tabla 6.4. El curso que el agua del río sigue en el lago puede detectarse por la elevada conductividad de sus aguas. En este día de muestreo parece que el agua del río transcurrió de manera prácticamente perpendicular a la costa ya que en las estaciones S se detectaron conductividades mayores de $600 \mu\text{S}$. El sedimento en las estaciones S presentaba posiblemente un grano de mayor tamaño por la depositación de arena arrastrada por el río Schussen, y esta acumulación se ve también reflejada por una menor profundidad de la columna de agua en las estaciones, inferior a 1 m. La temperatura, de alrededor de $5 \text{ }^\circ\text{C}$, no presentó demasiadas diferencias entre estaciones, aunque en el transecto S ésta fue unas cuatro décimas superior. Una de las posibles explicaciones sería que este transecto presentara una mayor abundancia de fitobentos, que podrían producir la fosfatasa alcalina. Esta, sin embargo, es tan solo una hipótesis ya que no fue determinada la concentración de algas en las muestras.

Tabla 6.4. Parámetros medidos en las 9 estaciones muestreadas el 3/02/94. La situación de las estaciones se encuentra descrita en el texto.

Estación	Prof.	Temp.	Conduct.	Contenido de agua	SRP
I1	1,1	4,7	346	15,89	3,2
I2	1,6	4,7	324	14,93	1,5
I3	1,2	4,8	324	14,13	1,5
B1	0,8	4,6	341	15,87	-
B2	1,3	4,7	329	15,53	1,5
B3	2,7	4,7	325	15,33	1,8
S1	0,4	5,2	632	12,81	1,6
S2	0,6	5,1	637	12,46	1,5
S3	1,0	5,1	646	15,64	1,8

Profundidad de agua: m

Temperatura del agua: °C

Conductividad del agua: μS

Contenido de agua: % del peso húmedo

SRP: Fósforo soluble reactivo ($\mu\text{g gww}^{-1}$)

La concentración de bacterias, figura 6.2, aumenta a medida que nos alejamos del río Schussen y también en dirección a la costa. El análisis de la varianza entre las estaciones mostró que no existían diferencias debidas a la distancia de las estaciones respecto a la costa. Cuando se consideraron las diferencias entre transectos tampoco se encontraron en general diferencias entre ellos. El único caso fue el de la actividad fosfatasa, cuya alta significación ($p= 0,0000$) indicó la existencia de diferencias entre transectos, siendo en el I superior al de los otros. El test de Tukey, que permitía la comparación entre pares mostró la existencia de diferencias entre I y los otros dos transectos, siendo en éste unas cuatro veces superior. Una de las posibles explicaciones sería que este transecto tuviera una mayor concentración de fitobentos, que podría producir también fosfatasa alcalina. Esto es, sin embargo solo una hipótesis ya que no fue

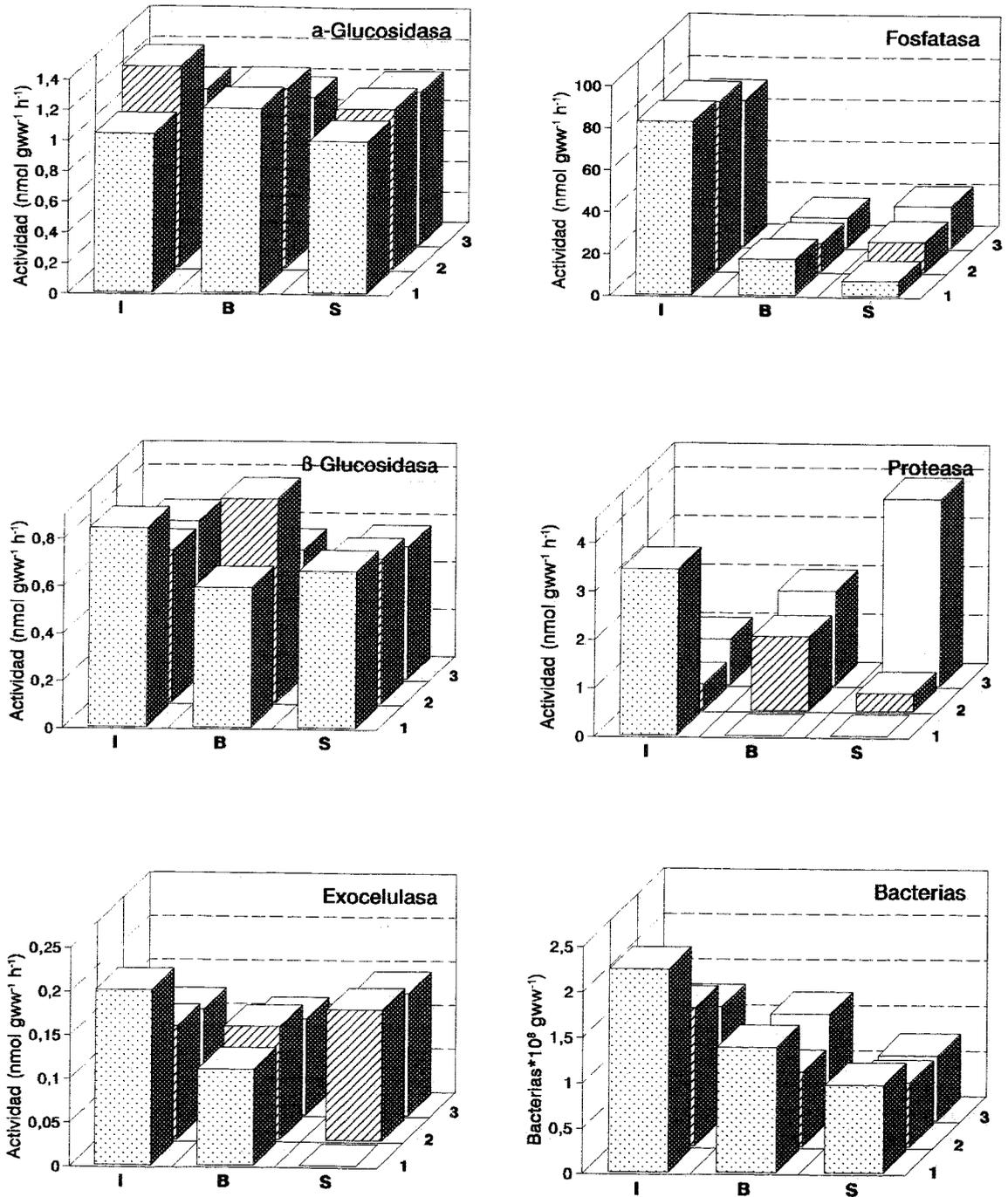


Figura 6.2. Actividades ectoenzimáticas en sedimentos de 9 estaciones tomados durante febrero de 1994.

determinada la abundancia de algas en el estudio. La actividad proteolítica aparece variable según los transectos. Si bien en el I se detecta una actividad superior en la estación más costera, en B y S ésta aumenta en dirección al centro del lago. Con los datos actualmente disponibles, no parece posible encontrar una posible explicación a este hecho.

B. Noviembre de 1993

En esta ocasión fueron determinadas las actividades de ocho ectoenzimas en las estaciones I2, B2 y S2 (figura 6.3). Las actividades de α -, β -glucosidasa y exocelulasa fueron también muy bajas, por lo que las conclusiones deben ser tomadas con cautela. Con los datos fue realizado un análisis de la varianza para los parámetros, el cual reveló diferencias significativas para todas las actividades excepto la de la β -glucosidasa y la de exocelulasa. Los resultados del test de Tukey nos indicaron entre que estaciones existían éstas diferencias ($p < 0,05$). Las actividades de endocelulasa y endoxilanasas, extremadamente bajas, no parecen seguir un patrón horizontal marcado, sino que se caracterizan por tener una actividad prácticamente nula en la estación B. La estación más activa fue S2 (0,048 unidades $gww^{-1} h^{-1}$) e I2 (0,026 unidades $gww^{-1} h^{-1}$) para la endocelulasa y endoxilanasas, respectivamente. Las actividades de endoamilasa (rango: 0,178 - 0,700 unidades $gww^{-1} h^{-1}$) y proteasa (2,26 - 5,39 $nmol gww^{-1} h^{-1}$) mostraron un aumento de actividad en dirección a la desembocadura del río, siendo las diferencias significativas solo entre las estaciones I y S. La estación I fue claramente diferente al resto en el caso de α -glucosidasa y fosfatasa, donde se obtuvieron concentraciones de 1,32 y 48,52 $nmol gww^{-1} h^{-1}$, respectivamente. Las estaciones B y S no presentaron en ambos casos diferencias significativas. En este día de muestreo, los resultados indican que existía una mayor actividad endoamilasa y proteolítica, mientras que en la más alejada se detectaron mayores actividades de α -glucosidasa y de fosfatasa alcalina. Sin embargo, las bajas actividades hacen que sea muy arriesgado tomar conclusiones a partir de ellos.

C. Agosto-Septiembre 1992

Durante este período fueron estudiadas las diferencias en la concentración de

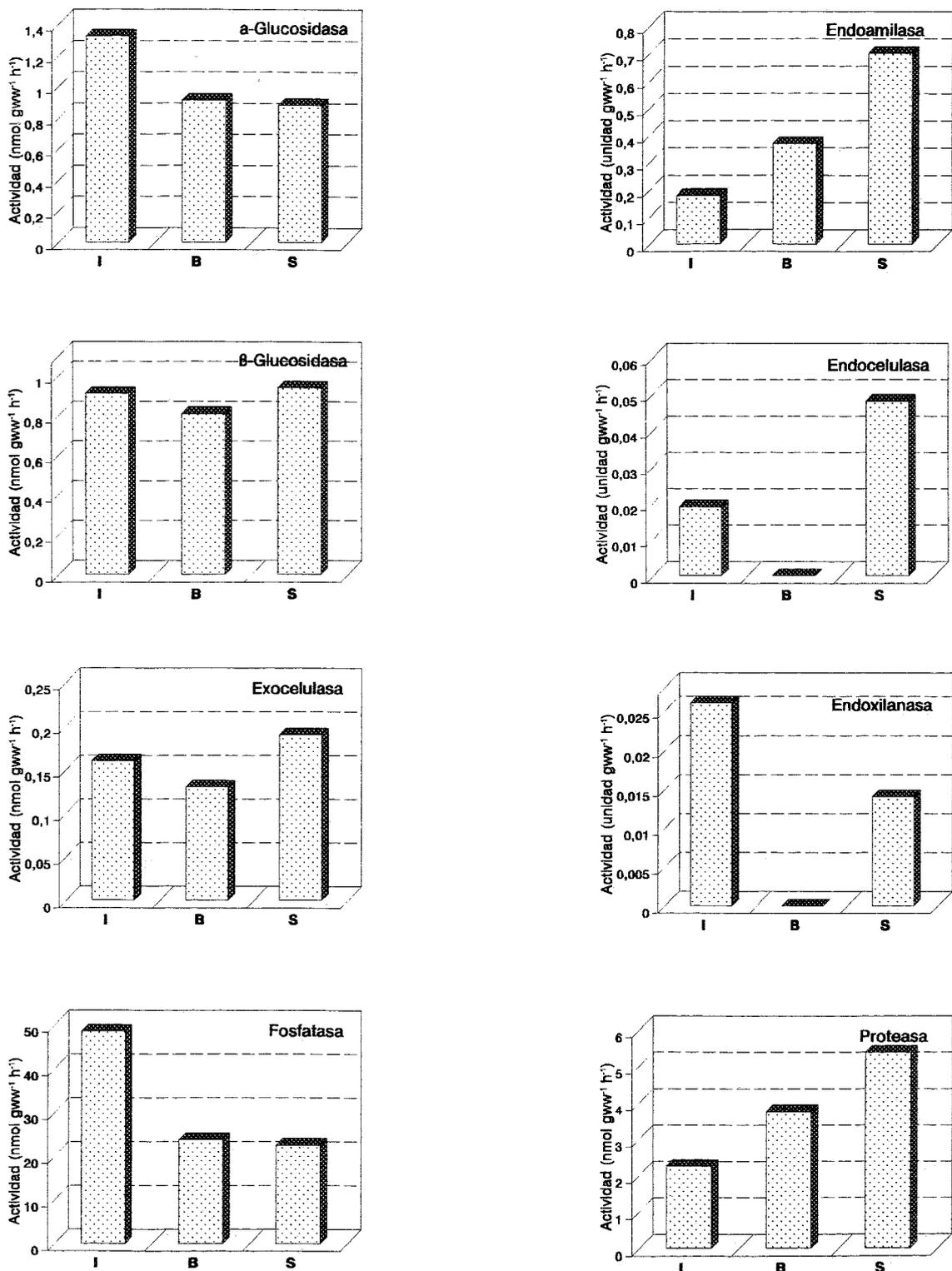


Figura 6.3. Actividades ecto- y endoenzimáticas en 3 estaciones (I2, B2, S2) situadas a 150 m de la costa y distantes unos 750 m una de otra.

bacterias, producción secundaria y actividades ectoenzimáticas en la región del Instituto al río Schussen mediante la comparación de las estaciones I2 y S2. Las muestras fueron tomadas en cinco ocasiones durante 21 días en Agosto/Septiembre de 1992 (Fig. 6.4).

El análisis de la varianza de la serie temporal entera entre las dos estaciones mostró que de los parámetros estudiados, solo presentaba diferencias significativas la producción bacteriana ($p= 0,0048$). Cuando en la serie se eliminó el valor del día 21, justo después de una tormenta, las diferencias entre las dos estaciones dejaron de ser significativas ($p= 0,2510$). Los resultados indican, que durante este período no existieron diferencias entre las estaciones I2 y S2 en el período estudiado.

Los resultados de cada uno de los ejemplos anteriores (A, B y C) han sido resumidos en la tabla 6.5. Se han escogido los resultados de las estaciones centrales de los transectos más alejados, I2 y S2 entre las que se esperaba encontrar evidencias más evidentes. En el caso del mes de agosto, se señala el rango de los tres días de muestreo, no incluyéndose el inmediatamente posterior a la tormenta, que será tratado más adelante, cuando se analice por separado el efecto de ésta. Si bien la concentración de bacterias no fue tratada estadísticamente ya que no se hicieron réplicas, puede apreciarse que, en general, la abundancia de bacterias, tanto en verano como en otoño, es superior en la estación S2.

En el rango entre los tres días de toma de muestras estudiados durante el mes de agosto, no se encuentran diferencias significativas entre ambas estaciones para los parámetros estudiados. En noviembre, sin embargo, es cuando más difieren las dos. Durante este período, la estación I2 se caracterizó por presentar mayores actividades de α -glucosidasa y fosfatasa, y menores de endoamilasa, endocelulasa y proteasa. En el mes de febrero, solo se observaron diferencias en cuanto a la actividad de fosfatasa, esta vez, también mayor en la estación I2. La influencia del río Schussen parece observarse de igual manera en primavera y verano. En otoño, sin embargo, es cuando se observan el mayor número de diferencias entre ambas estaciones, algunas mayores en la estación I2 y otras en

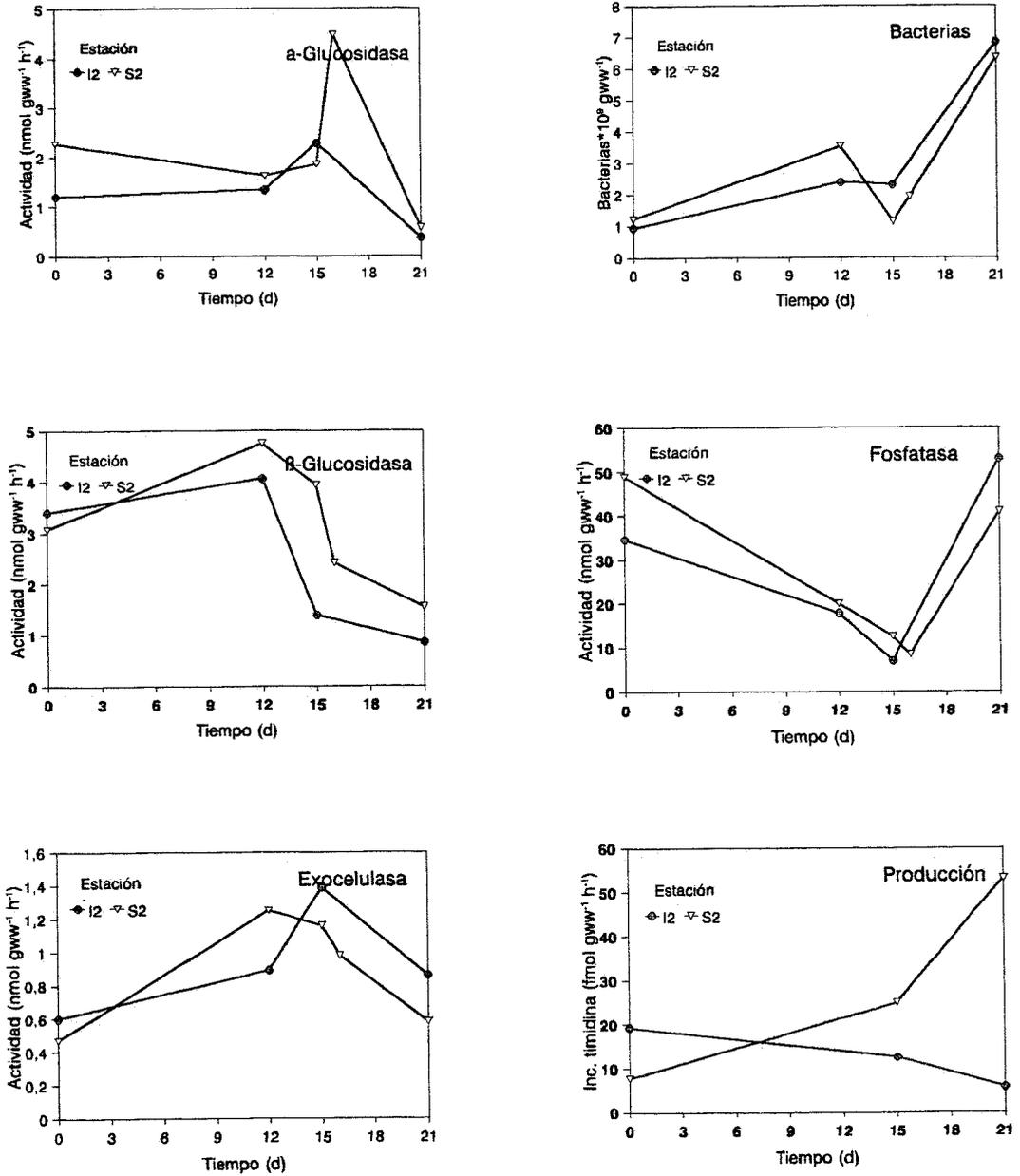


Figura 6.4. Abundancia y actividades microbianas durante un periodo de 20 días en las estaciones litorales I1 y S2.

la S2. Por lo general, sin embargo no se encontraron las claras diferencias de actividad microbiana entre las dos estaciones a lo largo del año.

Tabla 6.5. Medias de biomاسas y actividades en las estaciones I2 y S2 en los diferentes periodos de estudio. En negrita se señalan las que son significativamente mayores.

Enzima	Mes	I2	S2
α-Glucosidasa⁽²⁾	Febrero	1,32	1,05
	Agosto	1,33-2,28	1,62-4,48
	Noviembre	1,22	0,88
β-Glucosidasa⁽²⁾	Febrero	0,64	0,61
	Agosto	1,39-4,06	3,07-4,75
	Noviembre	0,91	0,94
Exocelulasa⁽²⁾	Febrero	0,13	0,15
	Agosto	0,6-0,97	0,47-1,25
	Noviembre	0,16	0,19
Endoamilasa⁽¹⁾	Noviembre	0,178	0,700
Endocelulasa⁽¹⁾	Noviembre	0,019	0,048
Endoxilanasasa⁽¹⁾	Noviembre	0,026	0,014
Fosfatasa⁽²⁾	Febrero	80,50	14,36
	Agosto	6,98-34,64	12,54-48,96
	Noviembre	48,52	22,43
Proteasa⁽²⁾	Febrero	0,54	0,36
	Noviembre	2,26	5,39
Bacterias	Agosto	0,94-2,38*10 ⁹	1,14-3,53*10 ⁹
	Noviembre	1,52*10 ⁸	7,10*10 ⁸
Producción. Bact.	Agosto	24,8-44,6	46,3-79,4

Actividades ectoendoenzimáticas⁽¹⁾: unidades gww⁻¹ h⁻¹

Actividades ectoexoenzimáticas⁽²⁾: nmol gww⁻¹ h⁻¹

Bacterias: células gww⁻¹

Producción bacteriana: fmol gww⁻¹ h⁻¹

6.3.1.5. Variabilidad temporal

El ciclo anual realizado durante 1993 y cuyos resultados serán comentados más adelante, el muestreo tuvo lugar dos veces al mes, lo que nos proporcionaba una idea de las variaciones estacionales de las actividades bacterianas en los sedimentos. Sin embargo, mediante estos muestreos no pudo conocerse la variabilidad en un espacio de tiempo más corto.

Para ello fueron estudiados los parámetros de actividad en dos estaciones, I2 y S2 en cinco ocasiones en un período de 21 días en Agosto/ Septiembre de 1992 (figura 6.4). La situación meteorológica estuvo calmada durante este período, a excepción de una tormenta que tuvo lugar el día 20. El análisis de la varianza entre los tres días de muestreo previos a la tormenta señala la no existencia de diferencias entre los días para la mayor parte de los parámetros estudiados: abundancia de bacterias ($p= 0,1451$), producción bacteriana ($p= 0,7523$), y actividad α -glucosidasa ($p= 0,0956$). Por el contrario, tres de las actividades ectoenzimáticas si presentan diferencias en el tiempo, éstas son la β -glucosidasa ($p= 0,0122$), exocelulasa ($p= 0,0045$) y especialmente la fosfatasa ($p < 0,0001$) la cual mediante un test de Tukey reflejó diferencias significativas entre todos los días. Parece, que la biomasa y la productividad son parámetros más constantes en el sedimento, mientras que las actividades varían más rápidamente, dependiendo de la calidad y cantidad de los nutrientes que en cada momento estén disponibles para estas bacterias.

6.3.1.6. Efecto de la tormenta sobre la heterogeneidad vertical a pequeña escala

Para poder evaluar la influencia de la tormenta sobre la heterogeneidad fueron realizados dos perfiles verticales de actividades ectoenzimáticas (Fig.6.5). Los sedimentos fueron tomados en la estación S2 cinco días antes y unas horas después de la tormenta. Los sedimentos fueron tratados como se describe en el apartado 6.3.1.2.

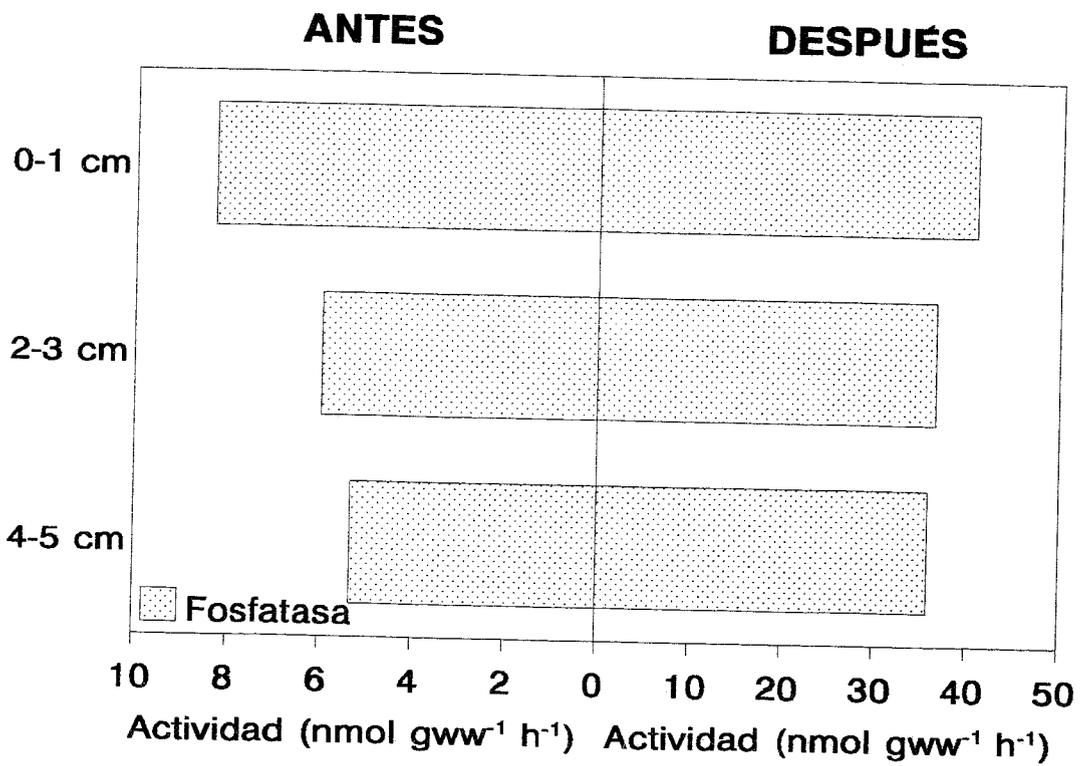
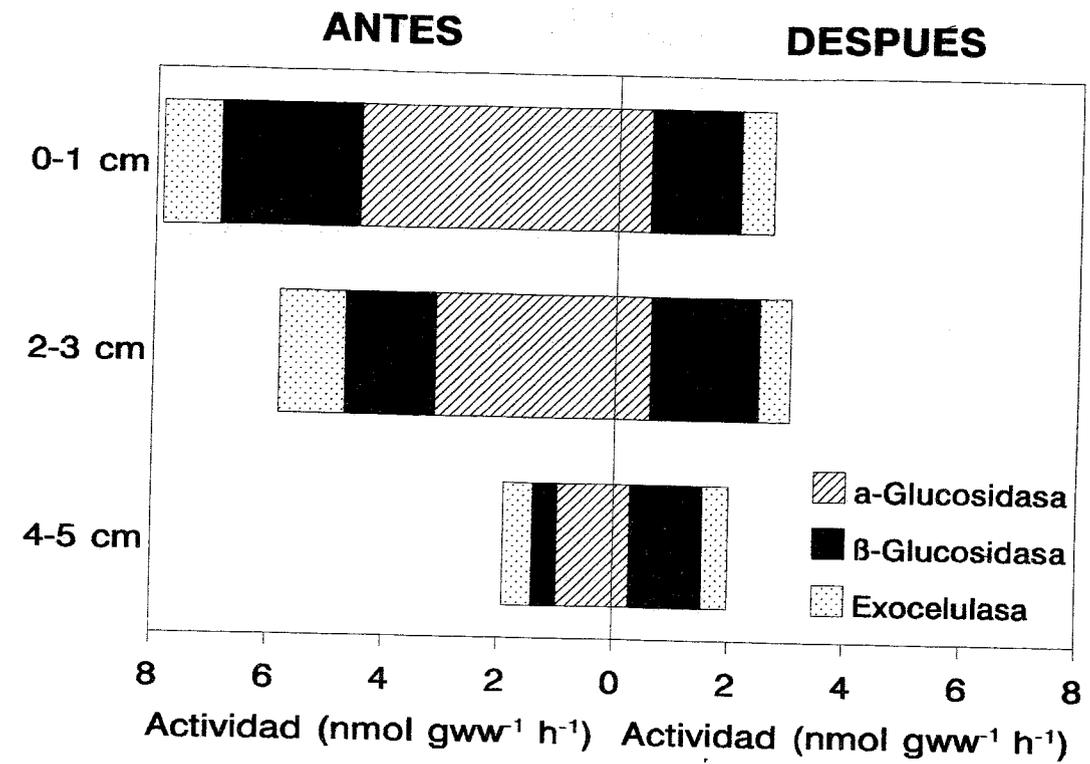


Figura 6.5. Perfil vertical de actividades antes y después de la tormenta.

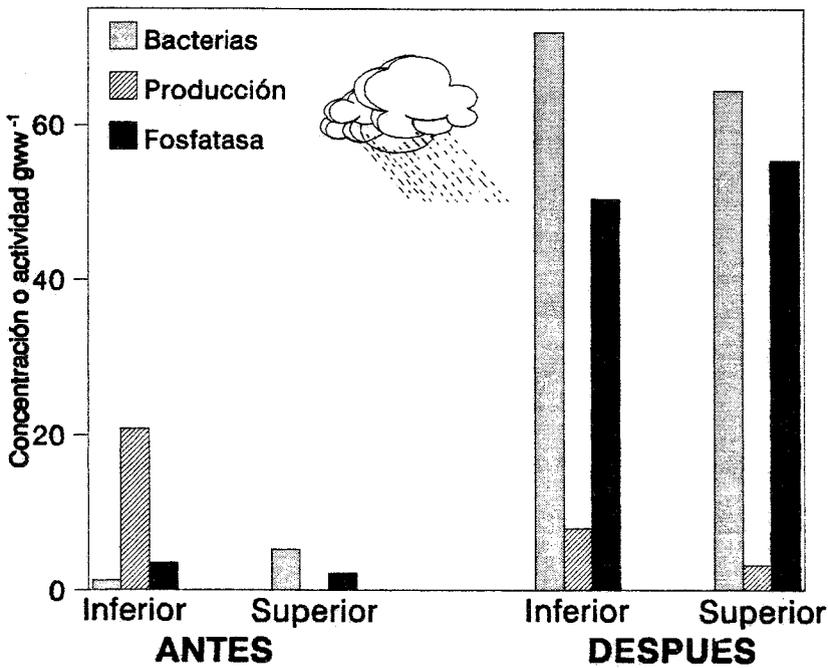
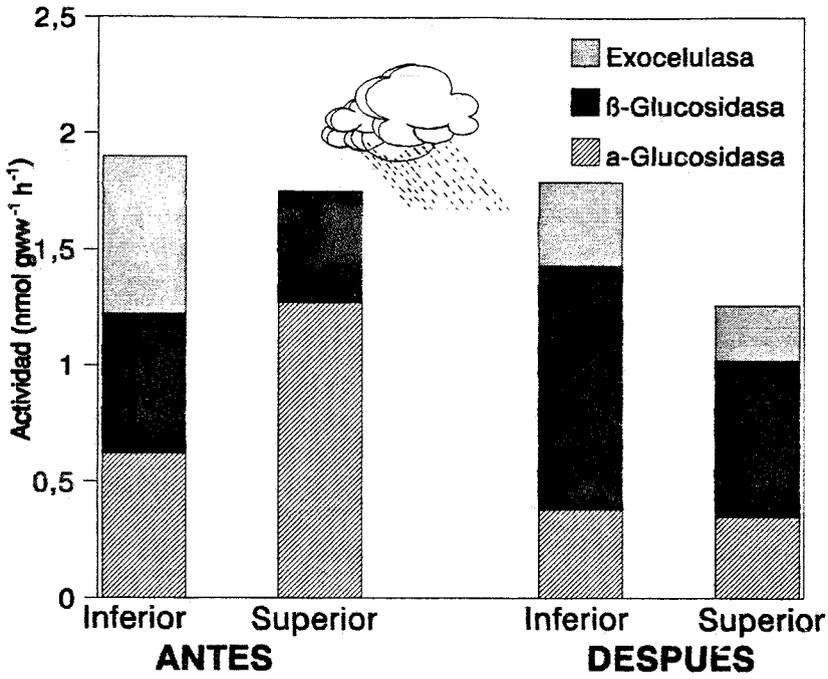
Como ya descrito en ese apartado, la única actividad que no presentó diferencias en el perfil vertical fue la de exocelulasa, y tampoco lo hizo tras la tormenta ($p=0,4212$), a pesar de que se produjo una disminución de las actividades en los tres primeros centímetros. La actividad de la fosfatasa alcalina presentó un perfil vertical más homogéneo ($p=0,1398$), siendo todas las profundidades no significativamente diferentes entre sí (análisis de Tukey, $p < 0,05$), posiblemente debido a la mezcla del sedimento. Menos explicable es el gran incremento de su actividad, unas cinco veces, que tuvo lugar en todas las profundidades estudiadas.

Las actividades glucosídicas, por el contrario, disminuyeron tras la tormenta, muy especialmente la α -glucosidasa. Ambas presentaron diferencias antes y después de las tormentas a pesar de esta clara disminución. En ambos casos el centímetro más activo fue el primero, mientras que el tercero y quinto mostraron actividades más bajas y no diferentes estadísticamente (test de Tukey, $p < 0,05$). Tras la tormenta, la actividad β -glucosídica fue claramente diferente en todas las profundidades, mientras que la actividad α -glucosidasa fue igual los dos primeros centímetros, como antes de la tormenta.

La tormenta provoca un aumento de la actividad fosfatasa y una disminución de las glucosídicas. Considerando la suma de actividades de degradación de carbohidratos estudiadas, tras la tormenta se observa un perfil más suavizado de la suma de actividades α - y β -glucosidasa, exocelulasa, y también de la fosfatasa alcalina. En el caso de las glucosidasas, se pasa de un predominio de la actividad α - a β -glucosidasa.

6.3.1.7. Efecto de la tormenta sobre la heterogeneidad intraestacional

Las muestras fueron tomadas en una misma estación pero en dos subestaciones diferentes: inferior y superior. La diferencia, a simple vista entre ambas era la acumulación de una capa de detrito en la primera. Unos días antes de la tormenta acontecida, la subestación inferior presentaba una menor abundancia de bacterias, pero unas actividades de producción e hidrólisis, en general mayores. Entre la toma de muestras del día "antes" y el "después" pasaron 5



Concentración: bacterias*10⁸ gww⁻¹
 Producción: incorp. timidina (fmol gww⁻¹ h⁻¹)
 Actividad fosfatasa: nmol gww⁻¹ h⁻¹

Figura 6.6. Parámetros medidos en dos subestaciones distantes unos 10 cm antes y después de la tormenta.

días, habiéndose producido durante la noche entre el cuarto y el quinto, una importante tormenta con un fuerte viento asociado.

La comparación entre ambas estaciones realizada con los datos de los días anteriores y del posterior a la tormenta indican que en general tras la tormenta aumenta la concentración bacteriana y la actividad de fosfatasa alcalina (Fig. 6.6). El resto de los parámetros no sufrió ningún efecto general.

Mediante un análisis de la varianza se evaluaron las diferencias entre las dos estaciones después de la tormenta. Las actividades fosfatasa y α -glucosidasa, y la producción bacteriana, que antes fueron significativamente diferentes, tras la tormenta dejaron de serlo, con $p= 0,7928$, $p= 0,2163$ y $p= 0,5662$, respectivamente. La actividad exocelulasa no fue diferente ni antes ni después de la tormenta. Mención aparte merece la actividad β -glucosidasa, que solo experimentó diferencias entre puntos de muestreo tras la tormenta, cuando ésta fue mayor en la zona inferior. Lo que puede ser observado es que la proporción de cada uno de los ectoenzimas de degradación de carbohidratos ha sido alterada, y que ahora es la misma para todos los enzimas. Parece, en general, que la tormenta afecta disminuyendo la heterogeneidad entre las dos subestaciones debido a que el viento asociado a ella mezcla el sedimento, igualando o al menos suavizando las diferencias entre subestaciones.

6.3.1.8. Efecto de la tormenta sobre la heterogeneidad interestacional

Los efectos de la tormenta sobre la heterogeneidad interestacional han sido evaluados a partir de los resultados mostrados en la figura 6.4. En este estudio se observaba tras la tormenta en ambas estaciones un aumento de la concentración de bacterias y de la actividad de fosfatasa, mientras se observa una disminución de la actividad de los ectoenzimas de degradación de carbohidratos. La producción bacteriana, sin embargo, parece verse afectada de diferente manera en ambas estaciones.

El análisis estadístico de los datos, mediante un análisis de la varianza, mostró que las dos estaciones tenían una producción bacteriana diferente. Cuando a la serie le fueron eliminados los valores del día de muestreo posterior a la

tormenta, ésta no fue significativamente diferente entre ambas estaciones. La tormenta parece influir de manera diferente en las dos estaciones. Mientras que tras ésta disminuye la producción bacteriana en I2, en la S2, aumenta fuertemente. Para el resto de parámetros estudiados, sin embargo, la influencia de la tormenta no fue tan aparente.

El efecto de la tormenta como nivelador de la heterogeneidad comentado para el caso de subestaciones no parece ser tan claro cuando se comparan estaciones que distan más de un kilómetro. Probablemente, a este nivel juega un papel importante la existencia de una propia heterogeneidad dentro de una misma estación.

6.3.1.9. Efecto de la tormenta sobre la variabilidad temporal.

La variabilidad temporal, en ausencia de fenómenos tormentosos no parecía ser muy importante, ya que tan solo existieron diferencias significativas en las actividades β -glucosidasa, exocelulasa y fosfatasa durante el período de estudio (15 días), ver capítulo 6.3.3. Para conocer si la tormenta afectó de alguna manera esta variabilidad temporal, fueron añadidos a la serie los valores medidos unas horas después a ésta. El análisis de la varianza mostró esta vez la existencia de diferencias significativas en todos los parámetros, α -glucosidasa ($p < 0,0001$), β -glucosidasa ($p < 0,0001$), exocelulasa ($p < 0,0001$), fosfatasa ($p < 0,0001$) y concentración bacteriana ($p = 0,0029$), pero no en la producción bacteriana ($p = 0,9245$). Tras la tormenta, pues, las actividades hidrolíticas mostraron diferencias respecto a las determinadas antes.

La comparación de las actividades entre el día después de la tormenta y las determinadas cinco días antes de ésta, mostraron también diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0,05$) en la mayoría de los casos. Las actividades de degradación de carbohidratos fueron significativamente inferiores tras la tormenta, mientras que la actividad de la fosfatasa como la concentración de bacterias aumentaron significativamente. El efecto sobre la producción bacteriana fue, sin embargo, inapreciable.

6.3.2. Dinámica de las comunidades y actividades microbianas en el sedimento litoral.

En el ciclo anual del agua pelágica, y también del agua litoral, (capítulo 5), pudieron ser distinguidos una serie de períodos repetibles anualmente y con características bien diferenciadas. Los escasos conocimientos que se tienen aún acerca del sedimento litoral no parecen indicar la existencia de una semejante división temporal del ciclo. Sin embargo, con motivo de poder comparar el paralelismo entre los procesos que tienen lugar en el agua y lo que acontece en el sedimento litoral, se dividió el ciclo en los mismos períodos descritos. La cuestión propuesta era conocer si los acontecimientos que tenían lugar en el agua en cada momento del ciclo sucedían también de manera parecida en el sedimento. Estas periodos fueron: la fase de proliferación algal de primavera, la fase del agua transparente, la fase de proliferación algal del verano, el otoño y el invierno (Sommer et al. 1986).

Aparte de esta división, adicionalmente fueron también diferenciadas otras fases, caracterizadas por el diferente tipo de aportes de materia orgánica que tienen lugar. Estas fases fueron: la proliferación de fitobentos (de inicios de febrero a finales de marzo), la fase de crecimiento de macrófitos (de finales de mayo a principios de agosto), la senescencia de macrófitos (de principios de agosto a finales de septiembre) y la senescencia y caída de hojas de plantas superiores (de finales de septiembre a principios de noviembre).

Las figuras 6.7 a 6.9 muestran los datos obtenidos en el ciclo. Los resultados del análisis de la varianza para evaluar las diferencias entre la media del período analizado y la media anual del resto del año se incluyen en la tabla 6.6. La tabla 6.7 muestra también las diferencias pero entre los periodos definidos para el sedimento.

6.3.2.1. Parámetros físico-químicos

La temperatura en el sedimento litoral fue medida en la superficie de éste y

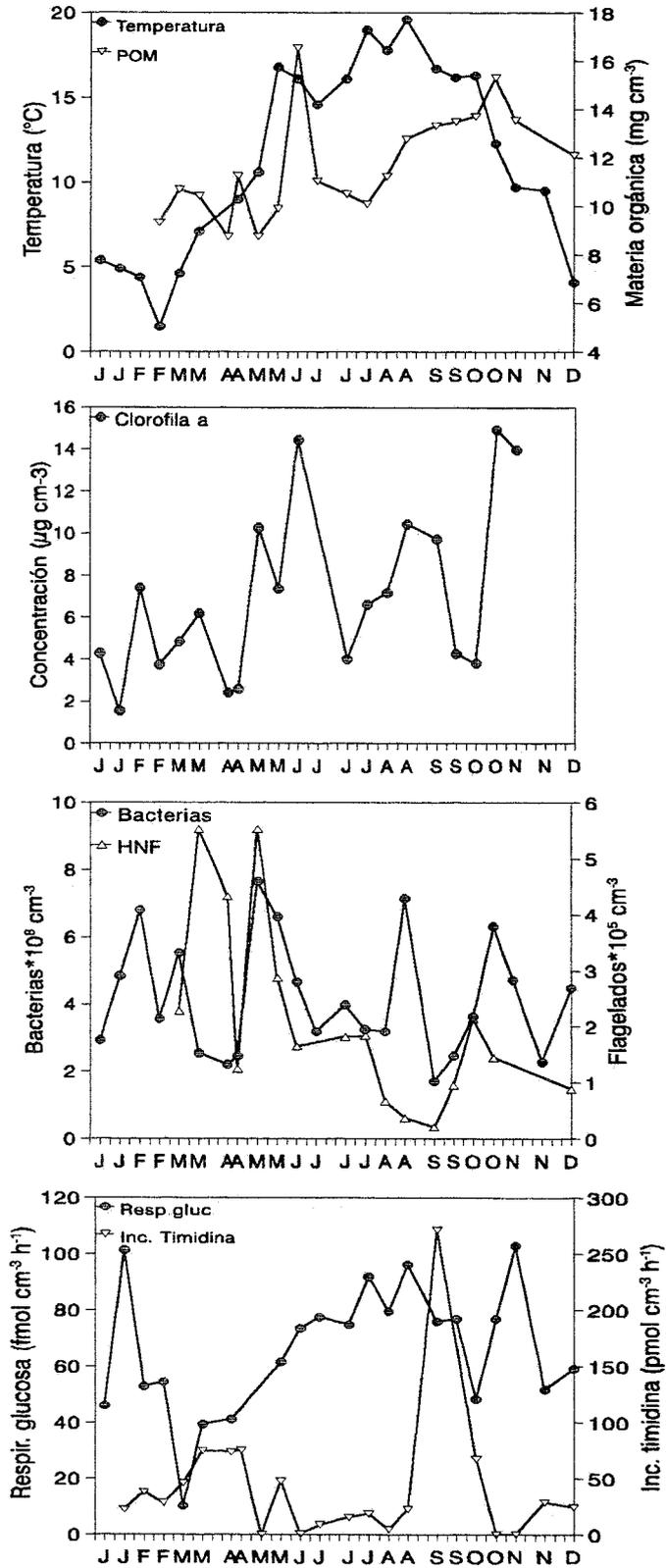


Figura 6.7. Ciclo anual de los parámetros físico-químicos, y abundancia producción y respiración de las comunidades microbianas investigados en el sedimento litoral durante 1993.

varió entre 1,5 °C a finales de febrero, y 19,6 °C a finales de agosto. Los valores máximos y mínimos fueron registrados, al igual que en la columna de agua, durante verano e invierno, respectivamente.

La materia orgánica particulada (POM) alcanzó el máximo anual a principios de junio (16,54 mg cm⁻³). Sin embargo la concentración fue significativamente mayor durante el período de otoño, muy probablemente debido al aporte de detrito de tipo vegetal, tanto de plantas superiores como de macrófitos senescentes. La baja concentración de POM durante los meses de invierno y primavera parece indicar que el aporte de materia orgánica particulada de fitobentos y quizás fitoplancton no se ven reflejados en la concentración de materia orgánica particulada del sedimento. La mayor concentración de POM se observa en otoño, especialmente durante la fase de senescencia de las hojas. La concentración de clorofila *a*, entre 1,54 y 14,95 µg cm⁻³ presentó grandes oscilaciones dentro de cada período, sin que pudiera observarse un patrón característico a lo largo del año.

6.3.2.2. Comunidades microbianas heterotróficas

La abundancia de bacterias en los sedimentos (entre 1,71*10⁸ y 6,60*10⁸ células cm⁻³), al igual que la de concentración de clorofila, no parece seguir ningún patrón estacional, sino que presenta grandes oscilaciones. Existe, sin embargo un corto intervalo en el que la densidad de bacterias fue baja (durante el período de finales de marzo a finales de abril). En este período es precisamente cuando se detectó una mayor presencia de protozoos, tanto de flagelados heterotróficos (HNF) como de ciliados (datos no mostrados). Los HNF, cuya concentración a lo largo del año se encuentra alrededor de 10⁵ células cm⁻³, llegaron a aumentar 6 veces su presencia durante ese período. Aunque este resultado puede sugerir que los HNF podrían regular la concentración bacteriana, recientemente ha sido descrito que la depredación sobre las bacterias es negligible para el control de la abundancia de bacterias en los sedimentos litorales (Starink 1995)

6.3.2.3. Actividad y producción heterotrófica

Tabla 6.6. Parámetros cuyas medias fueron significativamente diferentes a las del resto del año en cada período, analizadas mediante un ANOVA.

SEDIMENTO LITORAL	Proliferac. algal de primavera	Fase del agua transparente	Proliferac. algal de verano	Otoño	Invierno
SUPERIOR	HNF	Exocelulasa Proteasa	Endocelulasa Endoquitinasa β -Glucosidasa Exocelulasa Fosfatasa Proteasa Temperatura	Endoamilasa Endoxilanasas POM	
INFERIOR	POM				Endoamilasa Endoxilanasas α -Glucosidasa β -Glucosidasa Exocelulasa Temperatura

Tabla 6.7. Parámetros cuyas medias fueron significativamente diferentes a las del resto del año en cada período, analizadas mediante un ANOVA.

SEDIMENTO LITORAL	Proliferación fitobentos	Proliferación macrófitos	Senescencia macrófitos	Senescencia Hojas
SUPERIOR		Temperatura Ó-Glucosidasa β-Glucosidasa Exocelulasa Proteasa	Temperatura β-Glucosidasa Endoamilasa Endoxilanas	POM
INFERIOR	Temperatura Resp. Gluc.			Fosfatasa

La respiración de glucosa, indicadora de la actividad microbiana, fue claramente superior durante la segunda mitad del año, con valores crecientes desde primavera. En invierno existe una gran variabilidad alcanzándose tanto un máximo como el mínimo ($101,4$ y $10,3$ $\text{fmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente), y a medida que avanzó el año, va aumentando la respiración hasta cerca de 80 $\text{fmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, que fue el nivel aproximado en el que se mantuvo durante verano y otoño. La producción bacteriana determinada mediante la incorporación de timidina tritiada presentó un valor extremo el 8 de septiembre (271 $\text{pmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$). Durante marzo y abril, las actividades se acercaron a los 70 $\text{pmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, mientras que el resto del año las actividades fueron bastante más bajas. Los valores de producción, sin embargo deben ser tomados con mucha precaución. Por razones desconocidas, en el rango de de concentraciones utilizadas no fue alcanzada la saturación. A las elevadas concentraciones empleadas, no puede ser excluida la posibilidad de que la timidina sea también incorporada por otros organismos, aparte de las bacterias, como las algas. Por ello no es conveniente interpretar los valores de producción en el sedimento.

6.3.2.4. Actividades ectoenzimáticas

En general, la mayoría de las actividades ectoenzimáticas fueron mínimas durante el invierno y mayores durante el verano, siguiendo un curso parecido al de la temperatura. En el caso de endoamilasa y endoxilanasas, si bien también presentaron sus mínimos en invierno, fueron superiores durante el otoño, cuando alcanzaron valores de $503,4$ y $25,9$ $\text{unidades} \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

La actividad de los otros endoenzimas, endocelulasa y endoquitinasa se situó en el mismo rango que el de la endoxilanasas. La endoquitinasa, sin embargo presentó un máximo de $90,4$ $\text{unidades} \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, formado por un único punto a principios de julio.

El rango en el que se midieron las actividades glucosidasas, tanto α - como β - fue similar, con máximos cercanos a 2000 $\text{pmol cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Los valores extremos de la exocelulasa fueron la mitad de los anteriores. Las tres actividades fueron

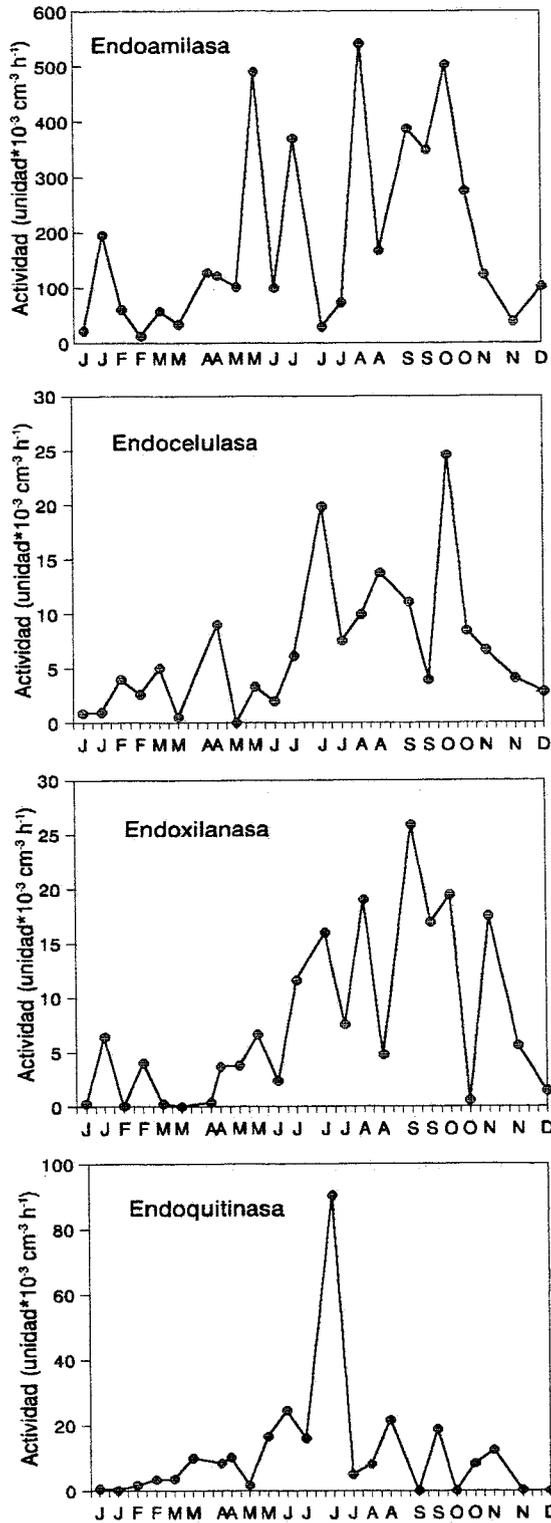


Figura 6.8. Ciclo anual de algunas actividades ectoenzimáticas determinadas en el sedimento litoral durante 1993.

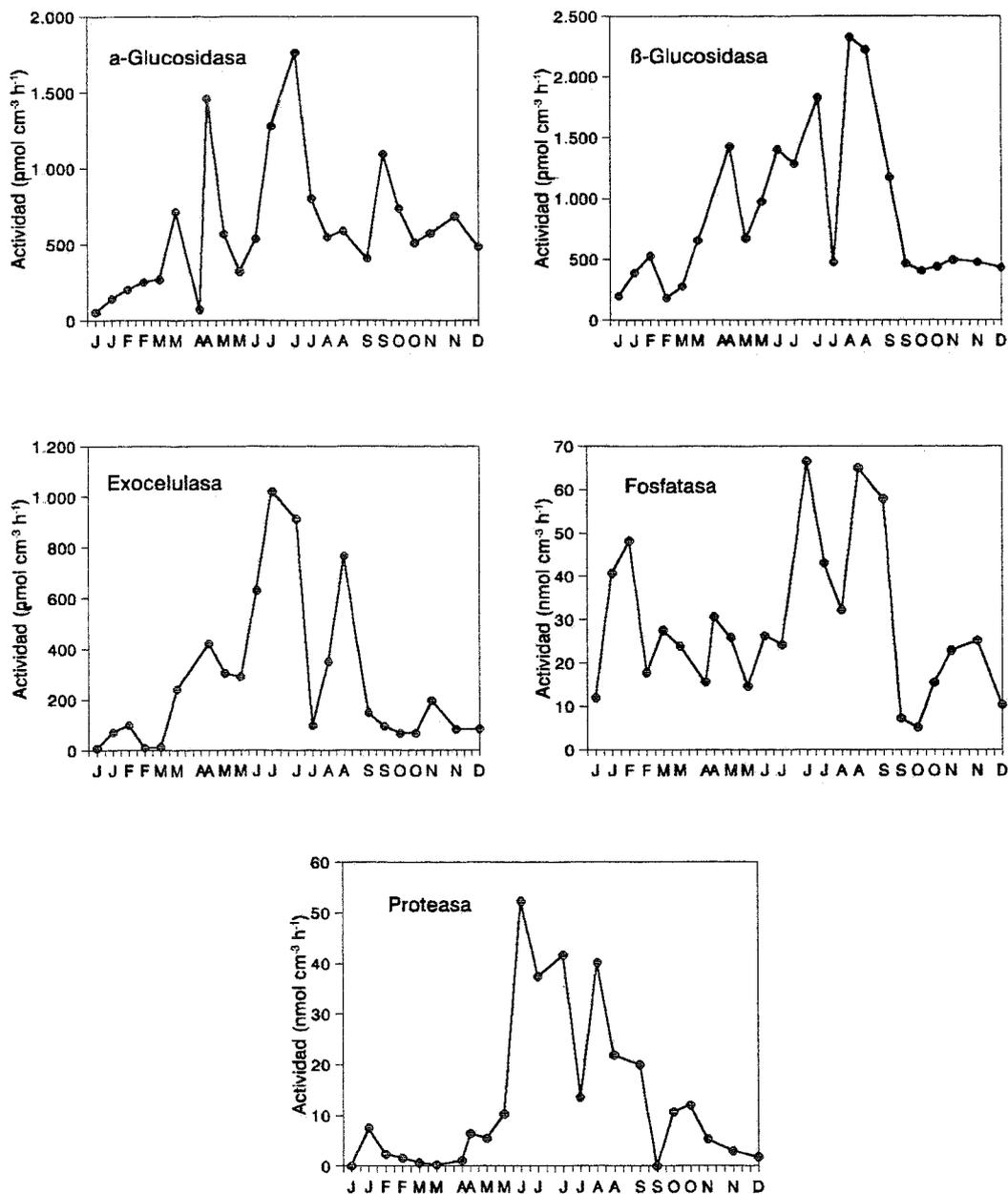


Figura 6.9. Ciclo anual de algunas actividades ectoenzimáticas determinadas en el sedimento litoral durante 1993.

mínimas durante el invierno, y, las tres mostraron elevadas actividades durante la proliferación de macrófitos, como es el caso también de la actividad proteolítica.

La actividad APAsa fue superior durante el verano y se mantuvo relativamente elevada durante el resto del año.

6.3.3. Relaciones entre los parámetros físico-químicos y biológicos estudiados.

Ya que todos los análisis y medidas en el sedimento fueron realizados en las mismas muestras, los ciclos anuales para los parámetros pudieron ser comparadas mediante un análisis de correlación (log-log). Los resultados de algunas de las correlaciones significativas ($p < 0,05$) se presentan en la tablas 6.8 a 6.10.

6.3.3.1. Comunidades microbianas

Las poblaciones del sedimento parecen evolucionar de manera independiente al resto de parámetros considerados en este estudio, ya que únicamente fue observada una única correlación, y muy débil (Tab. 6.8).

La abundancia de bacterias en el sedimento no presentó relaciones con ninguna

Tabla 6.8. Correlaciones significativas entre los parámetros investigados en el sedimento, su coeficiente de correlación (r), nivel de significación (p) y tamaño de la muestra (n).

Variable	Variable	r
Clorofila a	POM	0.522*

de las variables examinadas, indicando su posible independencia de los factores estudiados, incluso de sus depredadores más directos, los flagelados heterotróficos. Estos, tampoco presentaron una covariación con el resto de parámetros considerados. La biomasa de algas, indicada por la concentración de clorofila *a*, presentó una correlación positiva con la de materia orgánica particulada, aunque más débil que en el agua, posible indicación de que la materia orgánica particulada tiene diversos orígenes.

6.3.3.2. Actividad y producción heterotróficas

Si bien la concentración de bacterias no se encontró relacionada con la temperatura, la respiración de éstas si lo estuvo, presentando valores en general más elevados en verano. La producción bacteriana, sin embargo, no se vio afectada por la temperatura a lo largo del ciclo anual.

Tabla 6.9. Correlaciones significativas para la respiración y producción bacteriana en el sedimento.

	Variable	r
Prod. Bact.	Endocelulasa	0,681**
Resp. Gluc.	Temperatura	0,480*
	Exocelulasa	0,485*

Parece, pues que, aparte de la temperatura, para la respiración los factores que regulan la actividad bacteriana no se encuentran entre los parámetros estudiados, o bien se trate de una combinación de varios de ellos.

6.3.3.3. Actividades ectoenzimáticas

La mayor parte de las actividades estudiadas presentaron correlaciones positivas con la temperatura o con la actividad de otros enzimas. De entre los que

Tabla 6.10. Correlaciones significativas para las actividades ectoenzimáticas. Se indica r, el parámetro de correlación, y el nivel de correlación como *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Variable	Variable	r
α -Glucosidasa	Temperatura	0,531**
	Exocelulasa	0,556**
Endoamilasa	Temperatura	0,598**
	β -Glucosidasa	0,431*
β -Glucosidasa	Temperatura	0,683***
	Exocelulasa	0,540**
	Fosfatasa	0,519*
Exocelulasa	Temperatura	0,598**
	Resp. Glu.	0,485*
	β -Glucosidasa	0,540**
Endocelulasa	Prod. Bact.	0,681**
Fosfatasa	β -Glucosidasa	0,519*
	Proteasa	0,444*
Proteasa	Fosfatasa	0,444*

hidrolizan carbohidratos, para α - y β -glucosidasa, endoamilasa y exocelulasa fueron detectadas correlaciones bastante buenas con la temperatura, y también entre ellas. La actividad de fosfatasa alcalina covarió de manera positiva con la actividad de β -glucosidasa y con la proteolítica.

Aparte, otros enzimas variaron de manera similar a la de parámetros de actividad general, como es el caso de exocelulasa que lo hizo con la respiración bacteriana, y la de endocelulasa con la producción secundaria. Dos de los enzimas estudiados, la endoxilanasasa y la endoquitinasasa, no presentaron correlaciones con ninguno de los parámetros considerados.

6.4. Discusión

Los resultados de los diversos acercamientos descritos nos permiten obtener una idea acerca de la heterogeneidad en cuanto a los parámetros microbianos del sedimento litoral del lago Constanza. Como podía haber sido supuesto, existe una heterogeneidad, y esta puede ser apreciada tanto a nivel horizontal como vertical. En la escala vertical puede detectarse ya la existencia de un perfil descendente como mínimo en los primeros cinco centímetros. Esta fuerte disminución en la actividad bacteriana en la parte superior del sedimento ya fue comentada por otros autores (Marxsen & Fiebig 1991, Hall et al. 1972). Las diferencias que se observan a nivel horizontal se aprecian incluso entre muestras distantes solo unos milímetros y esta se sitúa entre un 40 y un 80 %.

El ejemplo de comparación entre dos estaciones distantes solo centímetros y ópticamente distinguibles por la acumulación de detritus en una de ellas, indica la existencia de una población bacteriana menos densa pero más activa en la estación donde se acumulaba el detritus. De Haan et al. (1993) observaron actividades ectoenzimáticas (proteolítica y celulolítica) más elevadas en zonas donde existía una acumulación detrítica.

La comparación entre estaciones situadas a distinta distancia de la desembocadura del río Schussen no proporcionó el claro gradiente que era de esperar. Este hecho puede ser debido a la existencia de una heterogeneidad a menor escala que haya enmascarado el gradiente, o bien tratarse de una ausencia de diferencias. Esta última explicación parece reafirmada por observaciones recientes de Güde (comunicación personal) que ha instalado una boya de medición continua de parámetros físico-químicos. Mediante los datos obtenidos, se ha observado que las aguas del río Schussen llegan a la estación I2 con mayor frecuencia de la que se había creído hasta ahora. Esta observación hace pensar que sus sedimentos estarían muy influenciados por las partículas del río Schussen, y por ello, el supuesto gradiente hacia la desembocadura no se haya puesto de manifiesto.

La variabilidad en espacios cortos de tiempo no parece ser muy importante, y solo se ve aumentada tras episodios de fuertes vientos asociados comunmente

a las tormentas. Estas tormentas que tienen lugar en la zona del lago de Constanza suelen ir acompañadas de un fuerte viento que provoca una mezcla de la columna de agua vertical y que, dependiendo de su intensidad, pueden llegar hasta a remover el sedimento litoral. Este hecho tiene lugar con frecuencia y puede ser observado por el enturbamiento de las aguas debido a la resuspensión del sedimento. El efecto de la tormenta consiste básicamente en igualar las diferencias existentes en escala de centímetros, tanto a nivel horizontal como vertical, igualando como mínimo los cinco primeros centímetros del perfil. El efecto de la tormenta ha sido observado en esta estación en otra ocasión (Weyhmüller 1995) por la destrucción del gradiente redox en los 5 mm superiores debido a la mezcla de los sedimentos. El gradiente, sin embargo se recuperó entre 16 y 24 h tras la tormenta.

La gran abundancia de bacterias en el sedimento litoral del lago Constanza fue ya notada por Soecknick et al. (1970) que también señalaron una mayor presencia en sedimentos situados en la desembocadura del río Schussen, muy cercana a nuestra estación. En ella, se reciben aportes de materia orgánica, especialmente particulada, para cuya utilización las bacterias deberán producir ectoenzimas que hidrolicen de manera específica estas moléculas. Por lo general, puede notarse que estas actividades son mucho más elevadas, por unidad de volumen, que las registradas en el agua y, además, presentan una elevada variabilidad en el tiempo, debida muy probablemente a la acción del viento descrita. A pesar de su elevada variabilidad, puede apreciarse, sin embargo, que, por lo general, las actividades fueron bajas durante el invierno y más altas durante la segunda mitad del año. A principios de primavera, se desarrolla en la zona pelágica un crecimiento masivo de algas y que, aunque con menor intensidad, también puede observarse en la zona litoral. Durante este período, en el que el agua presenta sus máximas concentraciones de materia orgánica, en el sedimento se alcanzan los mínimos. Al parecer, la materia orgánica que podría llegar al sedimento vía sedimentación del fitoplancton parece no afectar demasiado la concentración total de POM del sedimento. El momento en que se detectó una mayor concentración de materia orgánica fue en el otoño, cuando

el sedimento puede recibir aportes de material vegetal senescente, tanto de macrófitos como de hojas de plantas superiores arrastradas por los ríos y que se depositan en el sedimento. Este incremento de la concentración de POM en otoño, coincide bastante bien con el aumento a partir de agosto de la actividad de endoamilasa, endocelulasa, y muy especialmente de endoxilanas. Este incremento de actividades sugiere que la POM que se encuentra en otoño es de origen vegetal (ver capítulo 2), y muy especialmente proviene de plantas superiores, más ricas en hemicelulosa, que es el substrato de la xilanas.

Cabe destacar también la ligera correlación existente entre la concentración de materia orgánica particulada y de clorofila α , que muy probablemente indica que cierta parte del carbono particulado proviene del fitobentos que crece en el sedimento.

El resto de actividades que degradan carbohidratos: α -glucosidasa, β -glucosidasa y exocelulasa, tienen su máximo durante la primavera y están posiblemente más influidos por la temperatura o por la calidad de la materia orgánica, en este caso de los productos extracelulares liberados por el fitobentos. La concentración de fitobentos, compuesto principalmente por diatomeas, presentó un máximo durante los meses de febrero y marzo (Teiber 1995). La calidad de la materia quizás por la materia extracelular liberada por el fitobentos, que suponemos de una calidad parecida a la liberada por algas planctónicas como *Scenedesmus* (ver capítulo 3). Fosfatasa y proteasa, al igual que en el agua, presentaron su mayor actividad durante los meses de verano, posible indicación de su dependencia de la temperatura. A diferencia de como fue observado en el agua, no se detectaron correlaciones significativas entre las actividades ectoenzimáticas y la concentración de materia orgánica, la abundancia bacteriana y el contenido de clorofila α , como tampoco se observó en las comunidades microbianas que crecen en madera sumergida (Scholz & Boon 1993). Las dos medidas utilizadas como actividad general, la respiración y la producción bacteriana no estuvieron correlacionadas entre sí, ni tampoco con la biomasa, como observó, sin embargo, Marxsen (1988) en sedimentos de río, pero no en sedimentos litorales marinos (van Duyl & Kop 1990). Por lo general, la producción microbiana estaba dominada tanto por el aporte de nutrientes (Meyer-Reil 1987, Moriarty 1990), como por la temperatura (De Flaun & Mayer 1983, Boström 1991) y

comúnmente por ambos (Mallo et al. 1993, Hall et al. 1972). Sin embargo, las correlaciones entre las actividades bacterianas y estos parámetros podrían tratarse de artefactos (Bird & Duarte 1989).

Al calcular la respiración por célula, se observa una baja tasa de respiración celular o bien que el número de bacterias respiradoras es bajo en el sedimento, lo que nos hace sospechar que hay muchas bacterias inactivas, lo que fue observado Marxsen (1988).

Así pues en el sedimento litoral del lago Constanza existe heterogeneidad incluso a nivel de centímetros, tanto vertical como horizontal. Esta heterogeneidad, sin embargo, parece disminuir cuando existen episodios de fuerte viento que provocan la mezcla del sedimento, y así la suavización de las diferencias existentes.

*Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche
erforscht zu haben und das Unerforschliche ruhig zu verehren.*

Goethe

- CAPÍTULO 7 -

Caracterización microbiológica de la zona litoral

7.1. Introducción

Este estudio es el primero que incluye un ciclo anual en el que ha sido seguido de manera simultánea las actividades hidrolíticas de degradación de la materia orgánica en la zona litoral (agua y sedimento) y en la zona pelágica de un ecosistema acuático. Si bien los resultados han sido analizados por separado para cada uno de los hábitats en los capítulos anteriores, en el presente, se muestra un análisis comparativo entre todos ellos.

Este capítulo pretende mostrar una comparación tanto a nivel global como en cuanto a la dinámica de cada uno de los parámetros estudiados. Este enfoque global tan sólo puede representar una aproximación muy general debido a la falta de más datos de otras zonas del lago. El trabajo no pretende pues hacer un balance cuantitativo sino averiguar las características y los rasgos más importantes en cuanto a los procesos de degradación microbiana en la región litoral.

7.2. Resultados

Los parámetros investigados de manera común en el agua pelágica, litoral y en el sedimento fueron: la concentración de bacterias, de nanoflagelados heterotróficos, de clorofila α , la respiración y la producción bacteriana (medida mediante la incorporación de timidina) y la actividad de varios ectoenzimas necesarios para la degradación de diversos substratos: α -glucosidasa, β -glucosidasa, exocelulasa, fosfatasa alcalina, proteasa, endoamilasa, endocelulasa, endoxilanasas y endoquitinasa. Adicionalmente, tanto en el agua litoral como pelágica fueron seguidas una serie de características fisico-químicas como la conductividad y el pH del agua, de fósforo reactivo disuelto (SRP), silicatos, nitrógeno particulado (PON), carbono particulado (POC). La actividad bacteriana en el agua fue determinada, además de mediante los métodos citados anteriormente, mediante la determinación de la incorporación de glucosa.

Las unidades han sido referidas siempre a una unidad de volumen, el centímetro

cúbico, para poder facilitar la comparación entre los hábitats. En el sedimento, éste se refiere al centímetro superior, que es el que fue estudiado.

Los resultados incluyen, por un lado, la comparación de los parámetros microbianos y ambientales del agua y del sedimento estudiados, entre las comunidades planctónicas de la zona litoral y pelágicas, semejanza entre el agua y el sedimento de la zona litoral, y por el otro la de las dos masas de agua. Esta comparación se llevó a cabo tanto a nivel global, comparando la media y la desviación anuales, como de la dinámica de dichos parámetros a lo largo del año.

7.2.1. Comparación entre actividades y biomasa entre el agua litoral y el agua pelágica.

7.2.1.1. Comparación entre las medias anuales

A partir de los datos obtenidos en el ciclo, fueron calculadas la media anual (\bar{x}), la desviación típica (desv) y el rango en el que oscilaron cada uno de los parámetros, y cuyos resultados se incluyen en las tablas 7.1 y 7.2. Además, mediante un análisis de la varianza se comprobó la existencia de diferencias significativas entre las medias anuales de cada uno de los parámetros para las dos masas de agua. Debe ser tenido en cuenta que algunos de ellos fueron determinados en tres ocasiones menos durante el invierno en el agua pelágica. Esto puede significar que, debido a las bajas actividades que suelen detectarse en invierno, para este hábitat la media haya podido estar sobreestimada.

El análisis de la varianza realizado mostró que, de los factores físico-químicos investigados, solamente la concentración de materia inorgánica presente en el agua fue diferente ($p=0,0053$), siendo mayor en el agua litoral. La cercanía del sedimento y su resuspensión debido al viento, fueron muy probablemente la causa de esta mayor concentración, y también de las fuertes oscilaciones que presenta ésta en el agua litoral. El rango del fósforo reactivo (SRP) y la conductividad del agua, es más amplio en el agua litoral. Por el contrario, tanto la concentración de materia orgánica como la de carbono orgánico oscilan dentro de márgenes más amplios en el agua pelágica.

Tabla 7.1. Número de muestras (n), medias anuales (x), desviación típica (desv) y rango de los parámetros estudiados en el agua pelágica.

AGUA PELÁGICA	n	x	desv	rango
Bacterias (células*10 ⁶ cm ⁻³)	16	3,50	1,97	1,2-8,58
Clorofila a (µg cm ⁻³)	15	0,007	0,006	0,001-0,023
Flagelados (células cm ⁻³)	16	334	311	74-1365
Endoamilasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	16	0,82	0,62	0-2,11
α-Glucosidasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	18	15	17	1-57
Endocelulasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	18	0,34	0,35	0-1,02
Exocelulasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	18	5,0	6,0	0-22
β-Glucosidasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	18	29	61	1-251
Endoxilanas (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	18	0,16	0,23	0-0,90
Endoquitinasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	18	0,42	0,72	0-3,11
Fosfatasa (nmol cm ⁻³ h ⁻¹)	18	1,11	1,33	170-5912
Proteasa (nmol cm ⁻³ h ⁻¹)	18	0,19	0,25	0,001-0,87
Prod. Bact. (fmol cm ⁻³ h ⁻¹)	16	12,7	10,5	0,7-38,4
Resp. Gluc. (fmol cm ⁻³ h ⁻¹)	16	0,10	0,15	0-0,49
Incorp. Gluc. (fmol cm ⁻³ h ⁻¹)	16	0,13	0,19	0-0,76
POM (µg cm ⁻³)	19	1,93	1,44	0,4-6,9
PIM (µg cm ⁻³)	19	1,28	0,83	0-3,24
Carbono total (µg cm ⁻³)	17	0,53	0,46	0,15-1,61
Nitrógeno total (µg cm ⁻³)	15	0,10	0,07	0,01-0,25
C:N ratio	15	6,5	5,1	2,4-23,7
Silicatos (µg cm ⁻³)	18	0,7	0,4	0,2-1,4
SRP (µg cm ⁻³)	20	0,008	0,008	0,002-0,027
pH	11	8,37	0,41	7,3-8,8
Temperatura (°C)	22	12,2	5,9	4,4-22,0
Conductividad (µS)	11	273	15	252-292

Tabla 7.2. Número de muestras (n), medias anuales (x), desviación típica (desv) y rango de los parámetros estudiados en el agua litoral.

AGUA LITORAL	n	x	desv	rango
Bacterias (células*10 ⁶ cm ⁻³)	19	3,50	2,08	0,71-7,81
Clorofila a (µg cm ⁻³)	21	0,007	0,005	0,001-0,018
Flagelados (células cm ⁻³)	20	1403	3077	20-14064
Endoamilasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	21	1,42	1,13	0-3,45
α-Glucosidasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	22	32	48	0-209
Endocelulasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	22	0,27	0,31	0-1,17
Exocelulasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	22	26	60	0-281
β-Glucosidasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	22	75	201	1-914
Endoxilanas (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	22	0,29	0,39	0-1,81
Endoquitinasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	22	0,50	0,39	0-1,21
Fosfatasa (nmol cm ⁻³ h ⁻¹)	22	2,03	2,90	0,05-14,36
Proteasa (nmol cm ⁻³ h ⁻¹)	22	0,40	0,56	0-2,23
Prod. Bact. (fmol cm ⁻³ h ⁻¹)	19	23,6	23,6	1,5-83,8
Resp. Gluc. (fmol cm ⁻³ h ⁻¹)	17	0,48	0,75	0-2,86
Incorp. Gluc. (fmol cm ⁻³ h ⁻¹)	17	1,39	1,80	0-6,21
POM (µg cm ⁻³)	21	1,88	0,93	0,36-3,80
PIM (µg cm ⁻³)	21	2,43	1,64	0,40-8,18
Carbono total (µg cm ⁻³)	22	0,62	0,38	0,24-1,43
Nitrógeno total (µg cm ⁻³)	19	0,10	0,06	0,04-0,23
C:N ratio	19	6,3	2,4	3,7-13,5
Silicatos (µg cm ⁻³)	19	0,8	0,4	0,2-1,5
SRP (µg cm ⁻³)	22	0,009	0,010	0,001-0,042
pH	7	8,34	0,37	7,7-8,9
Temperatura (°C)	22	11,6	5,8	2,8-21,6
Conductividad (µS)	14	288	37	239-339

Tabla 7.3. Número de muestras (n), medias anuales (x), desviación típica (desv) y rango de los parámetros estudiados en el sedimento litoral.

SEDIMENTO LITORAL	n	x	desv	rango
Bacterias (células*10 ⁶ cm ⁻³)	23	418	176	170-765
Clorofila a (µg cm ⁻³)	20	7,0	4,1	1,6-15,0
Flagelados (células cm ⁻³)	16	2,8E5	3,1E5	20-14064
Endoamilasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	23	186	170	12-541
α-Glucosidasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	23	610	437	53-1761
Endocelulasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	23	6,4	6,3	0-24,6
Exocelulasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	23	273	293	7-1022
β-Glucosidasa (pmol cm ⁻³ h ⁻¹)	23	835	632	182-2329
Endoxilanasas (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	23	7,57	7,75	0-25,9
Endoquitinasa (unidad*10 ⁻³ cm ⁻³ h ⁻¹)	23	11,4	18,8	0-90,4
Fosfatasa (nmol cm ⁻³ h ⁻¹)	23	28,6	17,5	5,2-66,4
Proteasa (nmol cm ⁻³ h ⁻¹)	23	12,8	15,5	0-52,3
Prod. Bact. (fmol cm ⁻³ h ⁻¹)	21	41E3	59E3	0-271E3
Resp. Gluc. (fmol cm ⁻³ h ⁻¹)	21	66	23	10-103
POM (µg cm ⁻³)	19	11730	2170	8750-16540
Temperatura (°C)	23	11,3	5,6	1,5-19,6

Las comunidades microbianas presentaron una densidad y desviación similar, tanto la concentración de bacterias como la de clorofila *a*. La abundancia de nanoflagelados heterotróficos fue en general similar, con la excepción de un único punto máximo de concentración en el agua litoral que no se ve reflejado en el agua pelágica.

Las medias anuales de las actividades ectoenzimáticas no fueron significativamente diferentes en ningún caso para los dos hábitats. En las muestras de agua pelágica, las muestras fueron tomadas a partir de febrero, por lo que faltan algunos valores del invierno. Adicionalmente, se compararon también las medias anuales del período de finales de febrero hasta diciembre. El análisis de la varianza para comparar la media en este período tampoco

mostró diferencias significativas para ninguna de las actividades entre los dos

Tabla 7.4. Relación entre la media anual de los parámetros determinados en los tres hábitats.

	Pel. : Lit : Sed		
Bacterias	1 :	1 :	119
Clorofila a	1 :	1 :	1000
Flagelados	1 :	4,2 :	838
Endoamilasa	1 :	1,7 :	227
α -Glucosidasa	1 :	2,1 :	40,7
Endocelulasa	1 :	0,8 :	18,8
Exocelulasa	1 :	5,2 :	54,6
β -Glucosidasa	1 :	2,6 :	28,8
Endoxilanasas	1 :	1,8 :	47,3
Endoquitinasa	1 :	1,2 :	27,1
Fosfatasa	1 :	1,8 :	25,8
Proteasa	1 :	2,1 :	67,4
Prod. Bact.	1 :	1,9 :	3228
Resp. Gluc.	1 :	4,8 :	660
Inc. Gluc.	1 :	11 :	---
POM	1 :	1 :	6077

Pel: Agua pelágica

Lit: Agua litoral

Sed: Sedimento litoral

hábitats. Los máximos anuales alcanzados fueron siempre superiores en el agua litoral, con la única excepción de la actividad quitinolítica, cuyo máximo durante

la fase del agua transparente en el agua pelágica no se observó en el agua litoral.

La producción bacteriana estuvo cercana a la significación ($p= 0,0806$) y es superior en el agua litoral. La actividad bacteriana medida mediante la incorporación de glucosa fue significativamente más alta en la zona litoral ($p= 0,0095$), así como la respiración de glucosa también cercana a la significación ($p= 0,0521$).

Estos resultados sugieren que, si bien la abundancia de bacterias y el ambiente en el que se encuentran no es muy diferente, a excepción de una mayor concentración de materia inorgánica, las bacterias que se encuentran en la zona litoral presentan una mayor actividad y crecimiento que en la zona pelágica (Tab. 7.4). La similaridad entre las actividades ectoenzimáticas en ambos hábitats sugiere que la calidad y cantidad de sustratos accesibles para las bacterias es muy parecida en ambos hábitats, aunque en algunos casos la variabilidad de estos aportes puede ser mayor en el agua litoral (se observan oscilaciones más amplias en las actividades) ya que disponen de fuentes adicionales de materia orgánica.

7.2.1.2. Comparación entre las dinámicas anuales

Los resultados de la correlación entre los parámetros comunes estudiados en el agua de las dos estaciones se encuentran en la tabla 7.5.

La dinámica anual de los factores físico-químicos fue muy parecida en ambas masas, siendo detectadas diferencias significativas solamente en la de la concentración de fósforo soluble reactivo y la de materia inorgánica particulada. Se observaron correlaciones significativas entre los dos hábitats para los parámetros temperatura, carbono y nitrógeno ($p<0,001$), así como entre los materia orgánica disuelta y el fósforo reactivo disuelto ($p< 0,01$).

Tanto la concentración de bacterias como la concentración de clorofila *a* mostraron correlaciones entre ambas masas de agua, $p= 0.0000$ y $p= 0.0003$, respectivamente. La concentración de nanoflagelados, sin embargo, no lo hizo, debido posiblemente al máximo registrado en el agua litoral y que no tuvo su

Tabla 7.5. Correlaciones significativas (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) de los parámetros entre agua litoral y pelágica. Coeficiente de correlación (r) y tamaño de muestra (n).

AGUA LITORAL-PELAGICA	n	r
Bacterias	18	0,878***
Clorofila a	15	0,809***
Flagelados	16	0,195
Endoamilasa	15	0,272
α -Glucosidasa	17	0,433
Endocelulasa	17	-0,251
Exocelulasa	17	0,337
β -Glucosidasa	17	0,925***
Endoxilanasas	17	-0,141
Endoquitinasa	17	0,112
Fosfatasa	17	0,546*
Proteasa	17	0,889***
Prod. Bact.	16	0,469
Respiración	13	0,234
Incorporación Glu.	15	0,285
POM	20	0,609**
PIM	18	-0,289
POC	18	0,875***
PON	16	0,755***
Silicatos	18	0,915***
SRP	21	0,219
Temperatura	21	0,948***

Tabla 7.6. Rango de la actividad de β -glucosidasa en diversos estudios.

Lugar de muestreo	Rango de actividad	Referencia
Lago Plußsee (E)	1-8 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Chróst et al. 1989
Embalse Rimov (O)	3,0-8,0 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Vrba 1992
Lago Mekkojärvi (P)	4,4-68 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Münster 1992
Mar Caribe (O)	1,8 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Rath et al. 1993
Lago Mekkojärvi (P)	20-130 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Münster et al. 1992
Lago Plußsee (E)	10-80 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Chróst & Overberck 1990
Sedimento río Breitenbach	5,1-6,8 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Marxsen & Witzel 1991
Sedimento profundo Atlántico	0,1 nmol cm ⁻³ h ⁻¹	Poremba 1995
Sedimento profundo Atlántico	0,8 nmol cm ⁻³ h ⁻¹	Poremba & Hoppe 1995
Lago de Constanza (M)	1-251 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Este estudio
Litoral lago de Constanza (M)	1-914 nmol l ⁻¹ h ⁻¹	Este estudio
Sedimento litoral l. Constanza	0,2-2,3 nmol cm ⁻³ h ⁻¹	Este estudio

O: oligotrófico

M: mesotrófico

E: eutrófico

P. polihúmico

réplica en el agua pelágica.

Las dinámicas de producción y actividad bacterianas fueron diferentes entre los dos hábitats, como también lo fueron la mayoría de las actividades ectoenzimáticas. Dos de ellas, β -glucosidasa y proteasa, presentaron, sin embargo, coeficientes de correlación cercanos a 0,9, con niveles de significación

inferiores a 0,0001 para todos los casos. Estas fuertes correlaciones no son sorprendentes debido a la dependencia que mostraron estas enzimas de la temperatura. La actividad de fosfatasa alcalina también siguió un ciclo parecido en ambos hábitats, con un coeficiente de correlación de 0,5457. Las seis actividades restantes, todas ellas relacionadas con la hidrólisis de carbohidratos, evolucionaron, por el contrario, de manera diferente en las dos masas de agua.

7.2.2. Comparación entre actividades y biomasa entre el sedimento y agua litoral.

7.2.2.1. Comparación entre las medias anuales

Tanto las medias como la desviación típica y el rango de los parámetros estudiados en el agua y el sedimento litoral, se encuentran en las tablas 7.2 y 7.3 respectivamente. Para establecer una comparación entre los márgenes en los que oscilaron los resultados y los datos propios, fue elegido como ejemplo el enzima β -glucosidasa, del que se encuentra un mayor número de referencias en la bibliografía (Tab. 7.6). La comparación muestra que el margen de valores en los que osciló la actividad β -glucosídica en el lago Constanza, tanto en agua como en sedimento, es más amplio de los niveles encontrados en otros hábitats, posiblemente debido a que se dispone de un mayor número de valores de los que se presentan en la bibliografía. Si bien el margen de actividades es muy amplio, a excepción de en dos valores, la actividad no sobrepasó los 40 nmol l⁻¹ h⁻¹. Este rango situaría tanto al agua pelágica como a la litoral del lago Constanza con valores superiores a los obtenidos en sistemas oligotróficos (embalse, mar Caribe) (Tab. 7.6), e inferiores a los encontrados en sistemas eutróficos y polihúmicos. El sedimento litoral investigado en este estudio presenta una actividad β -glucosídica superior a la del sedimento profundo marino, pero inferior a la del sedimento de río.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en el agua y el sedimento litoral

se aprecia claramente que éstas fueron, en todos los casos muy superiores en el sedimento. El único parámetro cuyo rango es similar en ambos hábitats es la temperatura, en que la media fue alrededor de 22-23 °C.

La abundancia de bacterias en el sedimento fue cerca de dos órdenes de magnitud superior que en el agua pelágica, y también fueron superiores las de flagelados heterotróficos y la concentración de clorofila α unos tres órdenes de magnitud (Tab. 7.4).

Las poblaciones microbianas presentaron actividades ectoenzimáticas más elevadas en el sedimento. Por lo general, fueron entre 18 y 70 veces superiores. El sedimento presenta una cantidad de materia orgánica particulada mayor, cerca de 4 órdenes de magnitud superior a la del agua litoral. Sorprendentemente, se observó una elevada producción y respiración bacteriana en el sedimento, que, como ha sido comentado anteriormente (capítulo 6) puede haber sucedido debido a que la incorporación de timidina haya sido realizada no solo por parte de las bacterias sino también de otros organismos como algas.

7.2.2.2. Comparación entre las dinámicas anuales

A pesar de las claras diferencias cuantitativas observadas en las biomásas y actividades de los dos hábitats, podría existir una similitud en el desarrollo de las curvas anuales. Por ello se examinó la existencia de alguna correlación para cada uno de los parámetros. Los resultados de este test se encuentran en la tabla 7.7.

Como era de esperar, la temperatura mostró una dinámica prácticamente idéntica en el agua litoral y el sedimento, con un coeficiente de correlación de $r= 0,959$. Tanto el desarrollo de la abundancia de bacterias como su producción y respiración a lo largo del año fueron diferentes entre los dos hábitats de la zona litoral, así como la concentración de flagelados y la de clorofila α .

De las actividades ectoenzimáticas determinadas, las únicas que tuvieron una evolución similar fueron la de α -glucosidasa, β -glucosidasa y fosfatasa alcalina, que mostraron coeficientes de correlación de 0,484, 0,536, y 0,460, respectivamente.

Tabla 7.7. Correlaciones de los parámetros estudiados (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). entre agua y sedimento litoral. Parámetro de correlación (r) y tamaño de la muestra (n).

AGUA-SEDIMENTO LITORAL	n	r
Bacterias	19	-0,219
Clorofila a	20	0,229
Flagelados	14	0,137
Endoamilasa	21	0,051
α -Glucosidasa	22	0,484*
Endocelulasa	22	0,259
Exocelulasa	22	0,387
β -Glucosidasa	22	0,536*
Endoxilanasas	22	-0,089
Endoquitinasa	22	-0,134
Fosfatasa	22	0,460*
Proteasa	21	-0,025
Prod. Bact.	16	-0,268
Resp. Gluc.	14	0,441
POM	18	0,080
Temperatura	20	0,959***

7.3. Discusión

7.3.1. Comparación entre el agua litoral y pelágica

La única característica físico-química que puede diferenciar el agua pelágica del agua litoral es la mayor concentración de materia inorgánica en la primera, debido muy posiblemente a la resuspensión de partículas del sedimento a causa

de los movimiento de agua ocasionados por el viento. Las bacterias que viven en estas aguas se encuentran en concentraciones similares a lo largo del año, aumentando en verano y con valores inferiores en invierno y que en ambos hábitats se encuentran rodeadas de la misma abundancia de algas y depredadores (Fig. 7.4).

Las actividades tanto de fosfatasa alcalina como la proteolítica siguen una dinámica igual en ambos hábitats, lo que indica que la concentración de fósforo inorgánico y de aminoácidos varía de manera similar en el tiempo. La hidrólisis de cada uno de los carbohidratos, sin embargo, parece seguir pautas diferentes, dependiendo de la calidad de los substratos que se encuentran disponibles para las bacterias a cada momento en las estaciones. Las medias anuales no fueron diferentes en los dos hábitats para todos los ectoenzimas, aunque sí fueron en general más elevadas en la zona litoral, en que la media fue hasta cinco veces superior (Tab. 7.4). En general se observó un rango más amplio en los valores registrados en el agua litoral y también unos valores más elevados, a excepción de la actividad quitinolítica, que presentó un máximo en la estación pelágica durante la fase del agua transparente presumiblemente debido a la presencia de cladóceros (ver capítulos 2 y 5). Salvo esta excepción, pues, se alcanzaron valores más elevados en el agua litoral, lo que, teniendo en cuenta que la concentración de bacterias es similar, significaría que las bacterias que allí se encuentran son más activas en la degradación de la materia orgánica.

Sin embargo, donde puede observarse más claramente la mayor actividad de las bacterias del agua litoral es en los datos de respiración e incorporación de glucosa, y de producción. La evidencia que se obtiene a partir de los resultados obtenidos de que las bacterias del agua de la zona litoral presentan actividades ectoenzimáticas superiores a las del agua pelágica ha sido también observada por Hoppe et al (1983) en una laguna tropical (Ciénaga Grande) de Colombia. Ellos compararon la zona central de la laguna con la zona más productiva de manglares, donde el aporte de materia orgánica era superior. Gajewski & Chróst (1995), sin embargo, muestrearon regularmente dos estaciones de un lago en un lago eutrófico (Mikolajski) y no observaron diferencias en los niveles de actividad ectoenzimática en las dos zonas. La explicación que dieron para este resultado fue que los aportes de materia orgánica extras que tienen lugar en la

zona litoral (tanto los de POM como la DOM) podrían disturbar la tasa C:N y C:P natural necesaria para el metabolismo microbiano, debido al predominio de C en esta materia orgánica.

7.3.2. Comparación entre el agua y el sedimento litoral

Las características a nivel de microescala en la zona litoral difieren mucho entre el agua o el sedimento. Por unidad de volumen se encuentra una mayor densidad de bacterias, unas cien veces superior en el sedimento que en el agua sobre éste, y también fueron mayores la concentración de clorofila *a*, flagelados y materia orgánica. La actividad de los ectoenzimas estudiados fue también superior en todos los casos en el sedimento, destacando especialmente, en comparación con el agua, la actividad proteolítica y la de hidrólisis de polisacáridos, especialmente de almidón. La actividad específica de estas bacterias fue, sin embargo, inferior a la del agua. Sería esperable un resultado similar para el caso de la producción o la respiración, pero por razones desconocidas no se obtuvo. Tibbles et al. (1992) detectaron efectivamente una superior productividad en el sedimento pero el número de bacterias fue mayor que en el agua. La abundancia y actividad de estas bacterias pareció además evolucionar, por lo general, de manera absolutamente diferente en ambos hábitats, excepto tres de las actividades. Así pues, parece que a pesar de su cercanía, los sucesos que suceden en ambos hábitats acontecen de manera independiente uno del otro. En comparación con el agua, el sedimento presentó una elevada actividad ectoenzimática por unidad de volumen, que sin embargo si se contara por célula sería muy inferior (Marxsen & Witzel 1991). Esta disminución puede ser quizás en parte debida a la adsorción de enzimas en la materia orgánica de partículas en el sedimento (Reichardt 1988). Otra característica general fue la gran variabilidad de estas actividades ectoenzimáticas que puede reflejar la importante influencia de fenómenos atmosféricos como el viento o los aportes continentales de nutrientes.

7.3.3. Comparación entre la zona litoral y la zona pelágica

La zona litoral se caracteriza por unas mayores oscilaciones debido a la mayor influencia de los factores meteorológicos (por ejemplo las tormentas, capítulo 6). Los parámetros físico-químicos determinados en el agua litoral presentaron valores muy similares a los de la pelágica. El número de bacterias evoluciona de manera idéntica en ambas masas de agua pero estas comunidades son mucho más activas en cuanto a su respiración, producción y capacidad de incorporación y de hidrólisis de sustratos en el agua litoral.

El sedimento litoral, cuyo primer centímetro presentó una densidad de bacterias superior a la que se encuentra en la columna de agua, se caracterizó por una elevada concentración de materia orgánica, y por tanto disponibilidad de sustrato. Sin embargo, las comunidades microbianas de este hábitat presentaron bajas actividades de hidrólisis de sustratos.

Los procesos que acontecen en el agua litoral, parecen seguir una dinámica diferente a los del sedimento, sino que siguen una dinámica parecida a la del agua pelágica, a pesar de la distancia que separa ambas estaciones.

7.3.4. Importancia de la zona litoral para el resto del lago.

En un estudio acerca de la importancia de la zona litoral, es muy tentador el realizar un balance sobre la contribución de los procesos de degradación de la materia orgánica de esta región del lago a la totalidad del lago.

Para ello deben ser hechas una serie de asunciones, que pueden no ser del todo ciertas pero que contribuyen a simplificar los cálculos. En primer lugar, se considera el epilímnion de la zona pelágica como la zona metabólicamente activa, y su profundidad media es de 10 m; La profundidad media de la zona litoral es de 3 m (Kiefer 1978); y la última es que la parte metabólicamente activa del sedimento litoral son los 10 cm superiores, en los que no existe un gradiente vertical. A partir de estas asunciones, se hizo un cálculo de la actividad por unidad de superficie de algunos ectoenzimas a partir de las medias anuales que se encuentran en las tablas 7.1, 7.2 y 7.3. El cálculo de la actividad

por superficie en la zona litoral ha sido realizado a partir de la suma de las actividades calculadas para el agua y el sedimento.

Los resultados mostraron que la actividad de todos los ectoenzimas estudiados en el trabajo fue comparable en ambas zonas, siendo la contribución del sedimento mucho menor al del agua litoral. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Teiber (1995) para la producción primaria a partir de datos obtenidos en la misma estación.

Teniendo en cuenta que la zona litoral representa un 12 % de la superficie total del lago de Constanza (Geller & Güde 1989), la contribución de esta región para el total del lago no parece tener una especial importancia. En lagos menos profundos, y en los que la zona litoral represente una mayor proporción del total del lago, sin embargo, la contribución de la zona será sin duda más importante, y deberá ser tenida en la cuantificación de los procesos de degradación de la materia orgánica a nivel del global del lago.

Allwissend bin ich nicht; doch viel ist mir bewußt.

Goethe

- CONCLUSIONES -

Conclusiones

1. La degradación de carbohidratos en el epilímnion de la zona pelágica del lago Constanza aumenta en importancia durante el verano y otoño tras la proliferación de fitoplancton que ocurre durante el verano. La proliferación algal más importante que ocurre en la primavera, fundamentalmente diatomeas, no tiene su repercusión sobre las actividades bacterianas posiblemente debido a la excreción preferencial de substratos de bajo peso molecular y/o a una más rápida sedimentación de las células.
2. Las poblaciones bacterianas del agua litoral del lago Constanza presentan por lo general una actividad hidrolítica superior a las del agua pelágica. Una de las posibles causas debe buscarse en la existencia de fuentes de carbono adicionales al fitoplancton, como son los macrófitos, los aportes terrestres de materia orgánica, y también la posible influencia del fitobentos. Otras de las razones pueden encontrarse en las diferentes condiciones ambientales, como la mayor turbulencia, la cercanía del sedimento y la menor deficiencia de nutrientes inorgánicos.
3. Las características de las poblaciones microbianas de los sedimentos litorales siguen una dinámica diferente a las del agua pelágica y litoral, ya que los aportes de materia orgánica ocurrieron de manera distinta.
4. El sedimento litoral presenta una elevada heterogeneidad, detectable ya a nivel de centímetros y que se ve alterada normalmente debido a la acción de fuertes vientos asociados a tormentas.
5. Los parámetros de actividad microbiana en el sedimento litoral son entre uno y tres órdenes de magnitud superiores por unidad de volumen a los del agua tanto litoral como pelágica. La actividad ectoenzimática específica de las

bacterias fue, sin embargo, muy inferior a la del agua.

6. Durante la degradación de detritus vegetal se observa una sucesión de poblaciones bacterianas y de actividades hidrolíticas que indica el orden de utilización de las moléculas. En primer lugar se desarrolla una población fundamentalmente libre que consume presumiblemente carbohidratos monoméricos, para cuya utilización las bacterias no precisan producir ectoenzimas. Posteriormente aparecen actividades de degradación de disacáridos y oligosacáridos, así como de almidón, polisacárido soluble de reserva. Una vez concluye esta fase, aumenta el porcentaje de bacterias adheridas y aparecen la hidrólisis de polisacáridos estructurales, celulosa y hemicelulosa.

7. Tanto la temperatura como los depredadores bacterianos hacen que la sucesión de poblaciones bacterianas y ectoenzimas observada en la degradación de detritus vegetal transcurra con mayor rapidez. Los depredadores favorecen el paso de hidrólisis de polisacáridos no estructurales a la de estructurales al depredar selectivamente sobre las bacterias que se encuentran libres y que degradan substratos particulados.

8. La sucesión descrita en la degradación de detritus vegetal fue similar en el caso de detritus de origen autóctono, como las algas verdes o los macrófitos, y para el de detritus terrestre como las hojas de árbol. Esta última, sin embargo, fue menos intensa y más lenta que la de detritus vegetal acuático.

9. La mayor parte de las bacterias con capacidad para hidrolizar carbohidratos son capaces de producir varias actividades hidrolíticas, en dependencia del substrato ofrecido. Sin embargo, aproximadamente un 90 % de las bacterias que crecieron con detritus vegetal como fuente de carbono no eran capaces de degradar los polisacáridos presentes.

10. Las algas unicelulares contribuyen a enriquecer el medio con productos de excreción, que en el caso estudiado de *Scenedesmus* parecieron consistir fundamentalmente de substancias de bajo peso molecular, para cuya utilización

las bacterias no precisan o precisan solo la producción de un único ectoenzima, como indicó el patrón de actividades ectoenzimáticas observado.

11. El patrón de actividades ectoenzimáticas observado en presencia de zooplancton herbívoro, *Daphnia* en este caso, sugiere que su actividad contribuye a aumentar no solo la cantidad de materia orgánica disuelta (DOM) sino también particular (POM), ya que los polisacáridos de la pared vegetal pueden ser liberados al medio con los excrementos. Estos organismos además pueden enriquecer el medio con quitina durante su muda, o quizás con enzimas quitinolíticos.

12. La zona litoral es una zona de intensa actividad metabólica. La evaluación cuantitativa de su contribución para la totalidad del lago es por el momento muy difícil, principalmente debido a la heterogeneidad existente y al problema derivado de la elección de la profundidad elegida para realizar el balance. Sin embargo, el porcentaje que esta zona representa del total del lago de Constanza, un 12 % de la superficie, sugiere que su contribución en el flujo de nutrientes para la totalidad del lago parece ser muy baja.

*Die guten Leute wissen gar nicht, was es für Zeit und Mühe
kostet, das Lesen zu lernen und von dem Gelesenen Nutzen
zu haben; ich habe achtzig Jahre dazu gebraucht.*

Goethe

- BIBLIOGRAFÍA -

Bibliografia

Alber, M. & I. Valiella. 1994. Production of microbial organic aggregates from macrophyte-derived dissolved organic material. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 37-50.

Arndt, H., H. Güde, M. Macek & K.-O. Rothhaupt. 1992. Chemostats used to mode the microbial food web: evidence for the feedback effect of herbivorous metazoans. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **37**: 187-194.

Azam, F., T. Fenchel, J.G. Field, J.S. Gray. L.A. Meyer-Reil & F. Thingstad. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 257-263.

Baines, S.P. & M.L. Pace. 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: Patterns across marine and freshwater systems. *Limnol. Oceanogr.* **36(6)**: 1078-1090.

Belova, M. 1993. Microbial decomposition of freshwater macrophytes in the littoral zone of lakes. *Hydrobiologia.* **251**: 59-64.

Bell, R.T. & I. Ahlgren. 1987. Thymidine incorporation and microbial respiration in the surface sediment of a hypereutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* **32**: 476-482.

Biddanda, B.A. 1988. Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. II. Microbial metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **42**: 89-9

Biddanda, B.A., L.R. Pomeroy. 1988. Microbial aggregation and degradation of phytoplankton-derived detritus in seawater. I. Microbial succession. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **42**: 79-88.

- Bird, D.F. & C.M. Duarte. 1989. Bacteria-organic matter relationships in sediment: a case of spurious correlation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**: 904-908.
- Blum, L.K. & A.L. Mills. 1991. Microbial growth and activity during the initial stages of seagrass decomposition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **70**: 73-82
- Boon, P.I. 1993. Organic matter degradation and nutrient regeneration in Australian fresh waters: III. Size fractionation of phosphatase activity. *Arch. Hydrobiol.* **126**: 339-360.
- Boström, B. 1991. Microbial activity in sediments of a shallow, highly eutrophic lake following the sedimentation of a spring diatom bloom. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **24**: 2577-2577.
- Cole, J.J. 1982. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1982. **13**: 291-314.
- Cole, J.J. & G.E. Likens. 1979. Measurements of mineralization of phytoplankton detritus in an oligotrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* **24**: 541-547.
- Cole, J.J., G.E. Likens & D.L. Strayer. 1982. Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 1080-1090.
- Cole, J.J., W.H. McDowell & G.E. Likens. 1984. Sources and molecular weight of "dissolved" organic carbon in an oligotrophic lake. *Oikos.* **42**: 1-9.
- Chappel, K.R. & R. Goulder. 1994. Seasonal variation of epiphytic extracellular enzyme activity on two freshwater plants, *Phragmites australis* and *Elodea canadensis*. *Arch. Hydrobiol.* **132**: 237-253.
- Chergui, H. & E. Pattee. 1990. Processing of leaves of trees and aquatic macrophytes in the network of the river Rhone. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* **75**:

281-302.

Chróst, R.J. 1978. The estimation of extracellular release by phytoplankton and heterotrophic activity of aquatic bacteria. *Acta Microbiol. Polon.* **27**: 139-146.

Chróst, R.J. 1981. The composition and bacterial utilization of DOC released by phytoplankton. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* **5**: 325-332.

Chróst, R.J. 1983. Plankton photosynthesis, extralular release and bacterial utilization of released dissolved organic carbon (RDOC) in lakes of different trophy. *Acta Microbiol. Polon.* **32**: 278- 287.

Chróst, R.J. 1990. Microbial ectoenzymes in aquatic environments. pp. 47-74 in J. Overbeck & R.J. Chróst (eds), *Aquatic Microbial Ecology. Biochemical and molecular approaches.* Springer Verlag, New York.

Chróst, R.J. 1991. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. pp. 29-54 in R.J. Chróst (ed), *Microbial enzymes in aquatic environments,* Springer Verlag, New York.

Chróst, R.J. 1992. Significance of bacterial ectoenzymes in aquatic environments. *Hydrobiologia.* **243/244**: 61-70.

Chróst, R.J. & M.A. Faust. 1983. Organic carbon release by phytoplankton: its composition and utilization by bacterioplankton. *J. Plankton. Res.* **5**: 477-494.

Chróst, R.J. & H.J. Krambeck. 1986. Fluorescence correction for measurements of enzyme activity in natural waters using methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol.* **106**: 79-90.

Chróst, R.J., U. Münster, H. Rai, D. Albrecht, P.K. Witzel & J. Overbeck. 1989. Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the euphotic zone of a eutrophic lake. *J. Plankton. Res.* **11**: 223-242.

- Chróst, R.J. & J. Overbeck. 1987. Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorous availability for phytoplankton and bakterioplankton in lake Plußsee (north German eutrophic lake). *Microb. Ecol.* **13**: 229-248.
- Chróst, R.J. & J. Overbeck. 1990. Substrate. ectoenzyme interaction: significance of β -glucosidase activity for glucose metabolism by aquatic bacteria. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **34**: 93-98.
- Chróst, R.J. & B. Riemann. 1994. Storm-stimulated enzymatic decomposition of organic matter in benthic/pelagic coastal mesocosms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **108**: 185-192.
- Chróst, R.J., R. Wcislo & G.Z. Halemejko. 1986. Enzymatic decomposition of organic matter by bacteria in an eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **107**: 145-165.
- De Haan, H., H.T.S. Boschker, K. Buis & T.E. Cappenberg. 1993. Functioning of land-water ecotones in relation to nutrient cycling. *Hydrobiologia.* **251**: 27-32.
- DeFlaun, M.F. & L.M. Mayer. 1983. Relationships between bacteria and grain surfaces in intertidal sediments. *Limnol. Oceanogr.* **28**: 873-881.
- Deufel, J. 1971. Veränderung im mikrobiellen Zelluloseabbau im Bodensee infolge der fortschreitenden Eutrophierung sowie als Vergleich im eutrophen Schleinsee und zwei verschieden stark belasteten Bodenseezuflüssen. *Schweiz. Z. Hydrol.* **33**: 96-113.
- Duarte, C.M., D.F. Bird, J. Kalff. 1988. Submerged macrophytes and sediment bacteria in the littoral zone of Lake Memphremagog (Canada). *Vehr. Internat. Verein. Limnol.* **23**: 271-281.
- Duarte, C.M. & D. Vaqué. 1992. Scale dependence of bacterioplankton patchiness. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **84**: 95-100.

- Duyf, F.C. & A.J. Kop. 1990. Seasonal patterns of bacterial production and biomass in intertidal sediments of the western Dutch Wadden Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **59**: 249-261.
- Enríquez, S., C.M. Duarte & K. Sand-Jensen. 1993. Patterns in decomposition rates among photosynthetic organisms: the importance of detritus C:N:P content. *Oecologia*.
- Fenchel, T. 1970. Studies on the decomposition of organic detritus derived from the turtle grass, *Thalassia testudinum*. *Limnol. Oceanogr.* **15**: 14-20.
- Findlay, S. & K. Tenore. 1982. Nitrogen source for a detritivore: detritus substrate versus associated microbes. *Science*. **218**: 371-372.
- Fogg, G.E. 1966. The extracellular products of algae in freshwater. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **5**: 1-25.
- Francko, D.A. 1983. Size-fractionation of alkaline phosphatase activity in lake water by membrane filtration. *Journal of Freshwater Ecology*. **2**: 305-309.
- Francko, D.A. 1991. Filtration and buoyant density characterization of algal alkaline phosphatase. In: Chróst, R.J. (ed): *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York, pp: 227-238.
- Freeman, C., M.A. Lock, J. Marxsen & S.E. Jones. Inhibitory effects of high molecular weight dissolved organic matter upon metabolic processes in biofilms from contrasting rivers and streams. *Freshwater Biology*. **24**: 159-166.
- Fukami, K., U. Simidu & N. Taga. 1981. Fluctuation of the communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplankton. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* **55**: 171-184.
- Fukami, K., U. Simidu & N. Taga. 1985a. Microbial decomposition of phyto-

and zooplankton in seawater. I. Changes in organic matter. Mar. Ecol. Prog. Ser. **21**: 1- 6.

Fukami, K., U. Simidu & N. Taga. 1985b. Microbial decomposition of phyto- and zooplankton in seawater. II. Changes in the bacterial communitie. Mar. Ecol. Prog. Ser. **21**: 7-13.

Gajewski, A.J. & R.J. Chróst. 1995. Production and enzymatic decomposition of organic matter by microplancton in a eutrophic lake. J. Plankton Res. **17**: 709-728.

Geesey, G.G. & D.C. White. 1990. Determination of bacterial growth and activity at solid-liquid interfaces. Annu. Rev. Microbiol. **44**: 579-563.

Geller, W. & H. Güde. 1989. Lake Constance, the largest German lake. Limnology in the Federal Republic of Fermany. W. Lampert & K.O. Rotthaupt, eds. 9-17.

Godschalk, G.L. & R.G. Wetzel. 1978a. Decomposition of aquatic angiosperms. I. Dissolved components. Aquat. Bot. **5**: 281-300.

Godshalk, G.L. & R.G. Wetzel. 1978b. Decomposition of aquatic angiosperms. II. Particulate components. Aquat. Bot. **5**: 301-327.

Goulder, R. 1990. Extracellular enzyme activities associated with epiphytic microbiota on submerged stems of the reed *Phragmites australis*. FEMS Microb. Ecol. **73**: 323-330.

Gries, T. 1995. Phosphorhaushalt der oberen 20 m des Überlinger Sees (Bodensee) unter besonderer Berücksichtigung der Sedimentation. Doktorarbeit Universität Konstanz, Deutschland.

Güde, H. 1978a. Polysaccharide degradation by aquatic *Cytophaga* populations

- in a eutrophic lake and in mixed cultures. *Vehr. int. Ver. Limnol.* **20**: 2233-2237.
- Güde, H. 1978b. Model experiments on regulation of bacterial polysaccharide degradation in lakes. *Arch. Hydrobiol./Suppl.* **55**: 157-185.
- Güde, H. 1985. Influence of phagotrophic processes in the regeneration of nutrients in two-stage continuous culture systems. *Microb. Ecol.* **11**: 193-204.
- Güde, H. 1986. Loss processes influencing growth of planktonic bacterial populations in Lake Constanza. *J. Plankton. Res.* **8**: 795-810.
- Güde, H. 1988. Direct and indirect influences of crustacean zooplankton on bacterioplankton of Lake Constance. *Hydrobiologia.* **159**: 63-73.
- Güde, H. 1988. Incorporation of ^{14}C -glucose, ^{14}C -aminoacids and ^3H -thymidine by different size fractions of aquatic microorganisms. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **31**: 61-69.
- Güde, H. 1989. The role of grazing on bacteria in plankton succession. *Plankton ecology. Succession in plankton communities.* Ulrich Sommer (ed).
- Güde, H. 1990. Bacterial production and flow of organic matter in Lake Constance. In: *Ecological structure and function in large lakes.* Eds: M.M. Tilzer & C. Serruya. Sciences Tech. Publishers, Madison . pp: 489-502.
- Güde, H., B. Haibel & H. Müller. 1985. Development of bacterial planktonic populations in a water column of Lake Constance (Bodensee-Obersee). *Arch. Hydrobiol.* **105**: 59-77.
- Gunatilaka, A., M.C. Mendez & G. Herndl. 1990. Microbial interactions during decomposition of phragmites litter. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **34**: 127-127.

- Hall, K.J., P.M. Kleiber & I. Yesaki. 1972. Heterotrophic uptake of organic solutes by microorganisms in the sediment. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., **29** Suppl: 441-471.
- Hansen, L., G.F. Krog & M. Sondergaard. 1986. Decomposition of lake phytoplankton. 1. Dynamics of short-term decomposition. Oikos. **46**: 37-44.
- Harrison, P.G., K.H. Mann. 1975. Detritus formation from eelgrass (*Zostera marina* L.): The relative effects of fragmentation, leaching and decay. Limnol. Oceanogr. **20**: 924- 934.
- Hill, B.H., T.J. Gardner, O.F. Ekisola & G.M. Henebry. 1992. Microbial use of leaf litter in prairie streams. J. N. Am. Benthol. Soc. **11**: 11-19.
- Hood, M.A. 1991. Comparison of four methods for measuring chitinase activity and the application of the 4-MUF assay in aquatic environments. J. Microbiol. Meth. **13**: 153-162.
- Hoppe, H.-G. 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. Mar. Ecol. Prog. Ser. **11**: 299-308.
- Hoppe, H.-G. 1991. Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. pp. 61-83 in R.J. Chróst (ed), Microbial enzymes in aquatic environments, Springer Verlag, New York.
- IGKB (Internationale Gewässerschutzkommission für den Bodensee). 1993. Limnologischer Zustand des Bodensees. Freiwasser, Schadstoffe in Sedimenten. Jahresbericht 20.
- Hoppe, H.-G., K. Gocke, D. Zamorano, R. Zimmermann. 1983. Degradation of macromolecular organic compounds in a tropical lagoon (Ciénaga Grande, Colombia) and its Ecological significance. Int. Revue ges, Hydrobiol. **68**: 811-

824

Jones, S.E. & M.A. Lock. 1989. Hydrolytic extracellular enzyme activity in heterotrophic biofilms from two contrasting streams. *Freshwater Biology* **22**: 289-296.

Jürgens, K. & H. Güde. 1990. Incorporation and release of phosphorus by planktonic bacteria and phagotrophic flagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **59**: 271-284.

Jürgens, K. & H. Güde. 1994. The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **112**: 169-188.

Karner, M., C. Ferrier-Pagès, F. Rassoulzadegan. 1994. Phagotrophic nanoflagellates contribute to occurrence of α -glucosidase and aminopeptidase in marine environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **114**: 237-244.

Kato, K. 1994. Planktonic bacterial DNA and RNA synthesis from algal extracellular products in a eutrophic lake. *FEMS Micob. Ecol.* **15**: 291-298.

Kaushik, N.K. & H.B.N. Hynes. 1971. The fate of dead leaves that fall into streams. *Arch. Hydrobiol.* **68**: 465-51

Kok, C.J. & G. Van der Velde. 1991. The influence of selected water quality parameters on the decay rate and exoenzymatic activity of detritus of *Nymphaea alba* L. floating leaf blades in laboratory experiments. *Oecologia* **88**: 311-316.

Lampert, W. 1978. Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* **23**: 831-834.

Lehman, J.T. & D. Scavia. 1982. Microscale patchiness of nutrients in plankton communities. *Science.* **216**: 729-730.

- López, N.I. 1993. Actividades bacterianas del sedimento superficial marino y su importancia ecológica en la producción de los sistemas litorales. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña. 209 pp.
- Mackas, D.L., K.L. Denman, M.R. Abbot. 1985. Plankton patchiness: biology in the physical vernacular. *Bull. mar. Sci.* **37**: 652-674.
- Mallo, S., F. Vallespinós, S. Ferrer & D. Vaqué. 1993. Microbial activities in estuarine sediments (Ebro Delta, Spain) influenced by organic matter influx. *Sci. Mar.* **57**: 31-40.
- Mann, K.H. 1972. Macrophyte production and detritus food chains in coastal waters. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, **29 Suppl.**: 353-383.
- Mann, K.H. 1988. Production and use of detritus in various freshwater ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* **33**: 910-930.
- Mantoura, R.F.C. and C.A. Llewellyn. (1983). The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **151**: 297-314.
- Marvalin, O., L. Aleya & C. Amblard. 1989. Importance relative des fractions bactériennes libres et fixées en milieu lacustre eutrophe. *Arch. Hydrobiol.* **115**: 371-390.
- Marxsen, J. 1988. Investigations into the number of respiring bacteria in groundwater from sandy and gravelly deposits. *Microb. Ecol.* **16**: 65-72.
- Marxsen, J. & D. Fiebig. 1991. Measurement of bacterial production in stream-bed sediments. *Vehr. Internat. Verein. Limnol.* **24**: 3044-3044.
- Marxsen, J. & K.-P. Witzel. 1991. Significance of extracellular enzymes for

organic matter degradation and nutrient regeneration in small streams. pp. 270-283 in R.J. Chróst (ed), *Microbial enzymes in aquatic environments*, Springer Verlag, New York.

Mason, C.F. 1976. Relative importance of fungi and bacteria in the decomposition of *Phragmites* leaves. *Hydrobiologia*. **51**: 65-69.

Mattern, H. 1971. Beobachtungen über die Algenflora im Uferbereich des Bodensees. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **37**: 1-163.

Meyer-Reil, L.-A. 1981. Enzymatic decomposition of proteins and carbohydrates in marine sediments: methodology and field observations during spring. *Kieler Meeresforsch., Sonderh.* **5**: 311-317.

Meyer-Reil, L.-A. 1986. Measurement of hydrolytic activity and incorporation of dissolved organic substrates by microorganisms in marine sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **31**: 143-149.

Meyer-Reil, L.-A. 1987. Seasonal and spatial distribution of extracellular enzymatic activities and microbial incorporation of dissolved organic substrates in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1748-1755.

Meyer-Reil, L.-A., R. Dawson, G. Liebezeit & H. Tiedge. 1978. Fluctuations and interactions of bacterial activity in sandy beach sediments and overlying waters. *Mar. Biol.* **48**: 161-171.

Meyer-Reil, L.-A. & M. Köster. 1992. Microbial life in pelagic sediments: the impact of environmental parameters on enzymatic degradation of organic material. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **81**: 65-72.

Mitchell, J.G. & J.A. Fuhrman. 1989. Centimetre scale vertical heterogeneity in bacteria and chlorophyll a. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **54**: 141-148.

- Moriarty, D.J.W. 1990. Bacterial productivity in sediments. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. **34**: 183-189.
- Moriarty, D.J.W. & Pollard. 1981. DNA synthesis as a measure of bacterial productivity in seagrass sediments. Mar. Ecol. Prog. Ser. **5**: 151-156.
- Müller, H. 1972. Wachstum und Phosphatbedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemm.) v. Goor in statischer un kontinuierlicher Kultur unter Phosphat-Limitierung. Arch. Hydrobiol. Suppl. **38**: 399-484.
- Münster, U. 1992. Microbial extracellular enzyme activities and biopolymer processing in two acid polyhumic lakes. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. **37**: 21-32.
- Münster, U. & R.J. Chróst. 1990. Origin, composition and microbial utilization of dissolved organic matter. In: Overbeck, J. & R.J. Chróst (eds). Aquatic microbial ecology: biochemical and molecular approaches. Springer-Verlag, New York, pp 96-122.
- Münster, U. P. Einiö & J. Nurminen. 1989. Evaluation of the measurements of extracellular enzyme activities in a polyhumic lake by means of studies with ethylumbelliferyl-substrates. Arch. Hydrobiol. **115**: 321-337.
- Münster, U., P. Einiö, & J. Nurminen. 1991. Exoenzyme activities and their relation to substrate composition. Verh. Internat. Verein. Limnol. **24**: 2578.
- Münster, U., J. Nurminen, P.Einiö & J. Overbeck. 1992. Extracellular enzymes in a small polyhumic lake: origin, distribution and activities. Hydrobiologia **243/244**: 47-59.
- Newell, R.C., M.I. Lucas & E.A.S. Linley. 1981. Rate of degradation and efficiency of conversion of phytoplankton debris by marine microorganisms. Mar. Ecol. Prog. Ser. **6**: 123-136.

- Oberdorfer, E. 1928. Lichtverhältnisse und Algenbesiedlung im Bodensee. Z. Bot **20**: 465-568.
- Obernosterer, I. & G.J. Herndl. 1995. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: dependence on the inorganic N:P ratio. Mar. Ecol. Prog. Ser. **116**: 247-257.
- Oláh, J. 1972. Leaching, colonization and stabilization during detritus formation. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., **29 Suppl.**: 105-127.
- Opsahl, S. & R. Benner. 1993. Decomposition of senescent blades of the seagrass *Halodule wrightii* in a subtropical lagoon. Mar. Ecol. Prog. Ser. **94**: 191-20
- Owen, R.W. 1989. Microscale and finescale variations of small plankton in coastal and pelagic environments. J. mar. Res. **47**: 197-240.
- Pedrós-Alió, C. & M.M. Sala. 1990. Microdistribution and diel vertical migration of flagellated vs gas-vacuolated purple sulfur bacteria in a stratified water body. Limnol. Oceanogr. **35**: 1637-1644.
- Pick, F.R. 1987. Interpretations of alkaline phosphatase in Lake Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **44**: 2087-2094.
- Pieczynska, E. 1993. Detritus and nutrient dynamics in the shore zone of lakes: a review. Hydrobiologia. **251**: 49-58.
- Polisini, J.M. & C.E. Boyd. 1972. Relationships between cell-wall fractions, nitrogen, and standing crop in aquatic macrophytes. Ecology. **53**: 484-488.
- Pollard, P.C. & D.J.W. Moriarty. 1984. Validity of the tritiated thymidine method for estimating bacterial growth rates: measurement of isotope dilution during DNA synthesis. Appl. Environ. Microbiol. **48**: 1076-1083.

- Polunin, N.V.C. 1982. Processes contributing to the decay of reed (*Phragmites australis*) litter in fresh water. Arch. Hydrobiol. **94**: 182-209.
- Pomeroy, L.R. & W.J. Wiebe. 1993. Seasonal uncoupling of the microbial loop and its potential significance for the global cycle of carbon. In: Trends in microbial ecology. R. Guerrero & C. Pedrós-Alió (eds.). 407-409.
- Poremba, K. 1995. Hydrolitic enzymatic activity in deep-sea sediments. FEMS Microb. Ecol. **16**: 213-221.
- Poremba, K. & H.G. Hoppe. 1995. Spatial variation of benthic microbial production and hydrolitic enzymatic activity down the continental slope of the Celtic Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. **118**: 237-245.
- Porter K.G. & Y.S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. **25**: 943-948.
- Rath, J., C. Schiller & G.J. Herndl. 1993. Ectoenzymatic activity and bacterial dynamics along a trophic gradient in the Caribbean Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. **102**: 89-96.
- Reichardt, W. 1988. Measurement of enzymatic solubilization of POM in marine sediments by using dye releas-techniques. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. **31**: 353-363.
- Reiss, F. 1968. Ökologische und systematische Untersuchungen an Chironomiden des Bodensees. Ein Beitrag zur lakustrischen Chironomidenfauna des nördlichen Alpenvorlandes. Arch. Hydrobiol. **64**: 176-323.
- Rosenstock, B. & M. Simon. 1993. Utilization of dissolved combined and free aminoacids by planctonic bacteria in Lake Constance. Limnol. Oceanogr. **38**: 1521-1531.

Robertson, M.L., A.L. Mills & J.C. Zieman. 1982. Microbial synthesis of detritus-like particulates from dissolved organic carbon released by tropical seagrasses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **7**: 279-28

Sala, M.M. & H. Gude. 1993a. Mikrobielle Aktivitäten in Litoralsedimenten des Bodensees. Deutsche Gesellschaft für Limnologie. *Erweiterte Zusammenfassungen der Jahrestagung 1992 (Konstanz)*. Band I: 79-83.

Sala, M.M. & H. Gude. 1993b. Development of microbial ectoenzyme activities in littoral sediments of Lake Constance. *Vehr. int. Ver. Limnol.* **25(1)**: 633-633.

Sala, M.M., R. Walser and H. Güde. 1994. Experimentelle Untersuchungen zum Makrophytenabbau. Mikrobielle Lebensgemeinschaften und Ekto-Enzymaktivitäten. Deutsche Gesellschaft für Limnologie. *Erweiterte Zusammenfassungen der Jahrestagung 1993 (Coburg)*: 301-305.

Schaber, P. 1986. Flachwasserzone des Bodensees. Literaturerfassung im Auftrag der Internationalen Gewässerschutzkommission für den Bodensee. pp: 64.

Schallenberg, M., J. Kalff & J.B. Rasmussen. 1989. Solutions to problems enumerating sediment bacteria by direct counts. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1214-1219.

Schmitt-Biegel, B. & U. Obst. 1989. Rationelle fluorimetrische Bestimmung von Enzymaktivitäten in vivo und der Biomasse (DNA) auf Mikrotiterplatten. *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* **22**: 165-167.

Scholz, O. & P.I. Boon. 1993. Biofilm development and extracellular enzyme activities on wood in billabongs of south-eastern Australia. *Freshwater Biology.* **30**: 359-368.

Schweitzer, B. 1993. Untersuchung über wachstumbegrenzende Nährstoffe des Bakterioplanktons im Bodensee. Diplomarbeit Universität Konstanz.

Deutschland.

Shailaja, M.S. & A. Pant. 1986. Relationship between particulate and extracellular carbon compounds of phytoplankton photosynthesis in a trophic estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **32**: 161-167.

Sich, H. 1991. Sediment bacteria attached to sand grains- indications to a protection from feeding by ciliates. *Kieler Meeresforsch. Sonderh.* **8**: 269-273.

SieBegger, B. 1968. Veränderung des Phosphat und Ammonium Gehaltes im Litoral des Bodensees nach Stürmen durch Eintrag aus den aufgewühlten Sedimenten. *gwf-Wasser/Abwasser.* **109**: 1237-1238.

Simon, M. 1984. Bacterioplankton production and its relation to heterotrophic activity parameters in Lake Constance. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **19**: 131-139.

Simon, M. & M.M. Tilzer. 1982. Bacterial decay of the autumnal phytoplankton in Lake Constance (Bodensee). *Schweiz. Z. Hydrol.* **44**: 263-275.

Simon, M. & M.M. Tilzer. 1987. Bacterial response to seasonal changes in primary production and phytoplankton biomass in Lake Constanza. *J. Plankton. Res.* **9**: 553-564.

Simon, M. & Rosenstock, B. 1992. Carbon and nitrogen sources of planctonic bacteria in Lake Constance studied by the composition and isotope dilution of intracellular aminoacids. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 1496-1511.

Sinsabaugh, R.L., E.F. Benfield & A.E. Linkins. 1981. Cellulase activity associated with the decomposition of leaf litter in a woodland stream. *Oikos.* **36**: 184-190.

Siuda, W. & R.J. Chróst. 1987. The relationship between alkaline phosphatase

(APA) activity and phosphate availability for phytoplankton and bacteria in eutrophic lakes. *Pol. Arch. Hydrobiol.* **31**: 207-233.

Siuda, W., R. Wcislo & R.J. Chróst. 1991. Composition and bacterial utilization of photosynthetically produced organic matter in an eutrophic lake. *Arch. Hydrobiol.* **121**: 473-484.

Soecknick, K., W. Nümann, R. Sartory, J. Malgras, Ch. Romond & B. Horb. 1970. Répartition des bactéries dans les sédiment du lac de Constance. *Ann. Limnol.* **6**: 281-292.

Sommer, U., Z.M. Gliwicz, W. Lampert & A. Duncan. 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. Hydrobiol.* **106**: 433-471.

Somville, M. 1984. Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1181-1185.

Sondergaard, M. & Schierup, H.H. 1982a. Dissolved organic carbon during a spring diatom bloom in Lake Mosso, Denmark. *Water Res.* **16**: 795-821.

Sondergaard, M. & Schierup, H.H. 1982b. Release of extracellular organic carbon during a diatom bloom in Lake Mosso: molecular weight fractionation. *Freshwat. Biol.* **12**: 313-320.

Sridhar, K.R. & F. Bärlocher. 1993. Seasonal changes in microbial colonization of fresh and dried leaves. *Arch. Hydrobiol.* **128**: 1-12

Starink, M. 1995. Seasonal variation in bacterial production, protozoan grazing, and abundances in Sediments of a freshwater littoral zone. Doctoral thesis. Universiteit van Amsterdam, Holland.

- Suberkroop, K. & M.J. Klug. 1976. Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. *Ecology*. **57**: 707-719.
- Tanaka, Y. 1991. Microbial decomposition of reed (*Phragmites communis*) leaves in a saline lake. *Hydrobiologia*. **220**: 119-129.
- Tanaka, Y. 1993. Aerobic cellulolytic flora associated with decomposing *Phragmites* leaf litter in a seawater lake. *Hydrobiologia*. **263**: 145-154.
- No! Tanaka, Y. 1993a. Aerobic cellulolytic flora associated with decomposing *Phragmites* leaf litter in a seawater lake. *Hydrobiologia*. **262**: 65-75.
- Teiber, P. 1995. Vorkommen und Produktivität des Phytobenthos im Bodensee-Litoral. Deutsche Gesellschaft für Limnologie. Erweiterte Zusammenfassungen der Jahrestagung 1994 (Hamburg): 369-374.
- Tibbles, B.J., C.L. Davis, J.M. Harris & M.I. Lucas. 1992. Estimates of bacterial productivity in marine sediments and water from a temperate saltmarsh lagoon. *Microb. Ecol.* 195-209.
- Tilzer, M.M. 1984. Estimation of phytoplankton loss rates from daily photosynthetic rates and observed biomass changes in Lake Constanza. *J. Plankton. Res.* **6**: 309-324.
- Velji, M.I. & L.J. Albright. 1986. The dispersion of adhered marine bacteria by pirophosphate and ultrasound prior to direct counting. IFREMER, Actes de Colloques. **3**: 249-259
- Vives-Rego, J., G. Billen, A. Fontigny & M. Somville. 1985. Free and attached proteolytic activity in water environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **21**: 245-249.
- Vrba, J. 1992. Seasonal extracellular enzyme activities in decomposition of polymeric organic matter in a reservoir. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*

37: 33-42.

Vrba, J. & J. Macháček. 1994. Release of dissolved extracellular β -N-acetylglucosaminidase during crustacean moulting. *Limnol. Oceanogr.* **39**: 712-716.

Vrba, J., J. Nedoma, K. Simek & J. Seda. 1992. Microbial decomposition of polymer organic matter related to plancton development in a reservoir: activity of α -, β -glucosidase, and β -N-acetylglucosaminidase and uptake of N-acetylglucosamine. *Arch. Hydrobiol.* **126**: 193-211.

Vrba, J., K. Simek, J. Nedoma & P. Hartman. 1993. 4-Methylumbelliferyl- β -N-acetylglucosaminidase hydrolysis by a high-affinity enzyme, a putative marker of protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3091-3101.

Wagner, G. 1968. Petrographische, mineralogische, und chemische Untersuchungen an Sedimenten in den Deltabereich von Schussen und Argen. *Schweiz. Z. Hydrol.* **53**: 715-721.

Walser, R., M.M. Sala and H. Güde. (1994). Experimentelle Untersuchungen zum Makrophytenabbau. Stoffbilanzierung zum Abbau von Makrophytenbiomasse. Deutsche Gesellschaft für Limnologie. Erweiterte Zusammenfassungen der Jahrestagung 1993 (Coburg): 297-300.

Walser, R. & H. Güde. 1995. Makrophyten, stabile Strukturelemente der Flachwasserzone? Deutsche Gesellschaft für Limnologie. Erweiterte Zusammenfassungen der Jahrestagung 1994 (Hamburg): 375-380.

Watanabe, Y. 1984. Transformation and decomposition of photosynthetic products of lake phytoplankton. *Jap. J. Limnol.* **45**: 116-125.

Weisse, T., H. Müller, R.M. Pinto-Coelho, A. Schweizer, D. Springmann & G. Baldringer. 1990. Response of the microbial loop to the phytoplankton spring

bloom in a large prealpine lake. *Limnol. Oceanogr.* **35**: 781-794.

Wetzel, R.G. 1990. Land-water interfaces: Metabolic and limnological regulators. *Vehr. Internat. Verein. Limnol.* **24**: 6-24.

Wetzel, R.G., P.H. Rich, M.C. Miller, H.L. Allen. 1972. Metabolism of detrital carbon in a temperate hard-water lake. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Suppl.* **29**: 185-243.

Weyhmüller, M. 1995. Stoffumsätze im Litoralsediment des Bodensees-Obersees. *Deutsche Gesellschaft für Limnologie. Erweiterte Zusammenfassungen der Jahrestagung 1994 (Hamburg)*: 375-380.

Wiebe, W.J. & D.F. Smith. 1977. Direct measurement of dissolved organic carbon release by phytoplankton and incorporation by microheterotrophs. *Mar. Biol.* **42**: 213-223.

Williams, P.J.leB. 1981. Incorporation of microheterotrophic processes into the classic paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch., Sonderh.* **5**: 1-28.

Wirth, S.J. & G.A. Wolf. 1990. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *J. Microbiol. Meth.* **12**: 197-20

Wirth, S.J. and G.A. Wolf. 1992. Micro-plate colourimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- β -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. *Soil. Biol. Biochem.* **24**: 511-519.