

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BACTERIANA EN EL PUERTO DE MAHON

por TOMEU PAYERAS CIFRE biólogo*

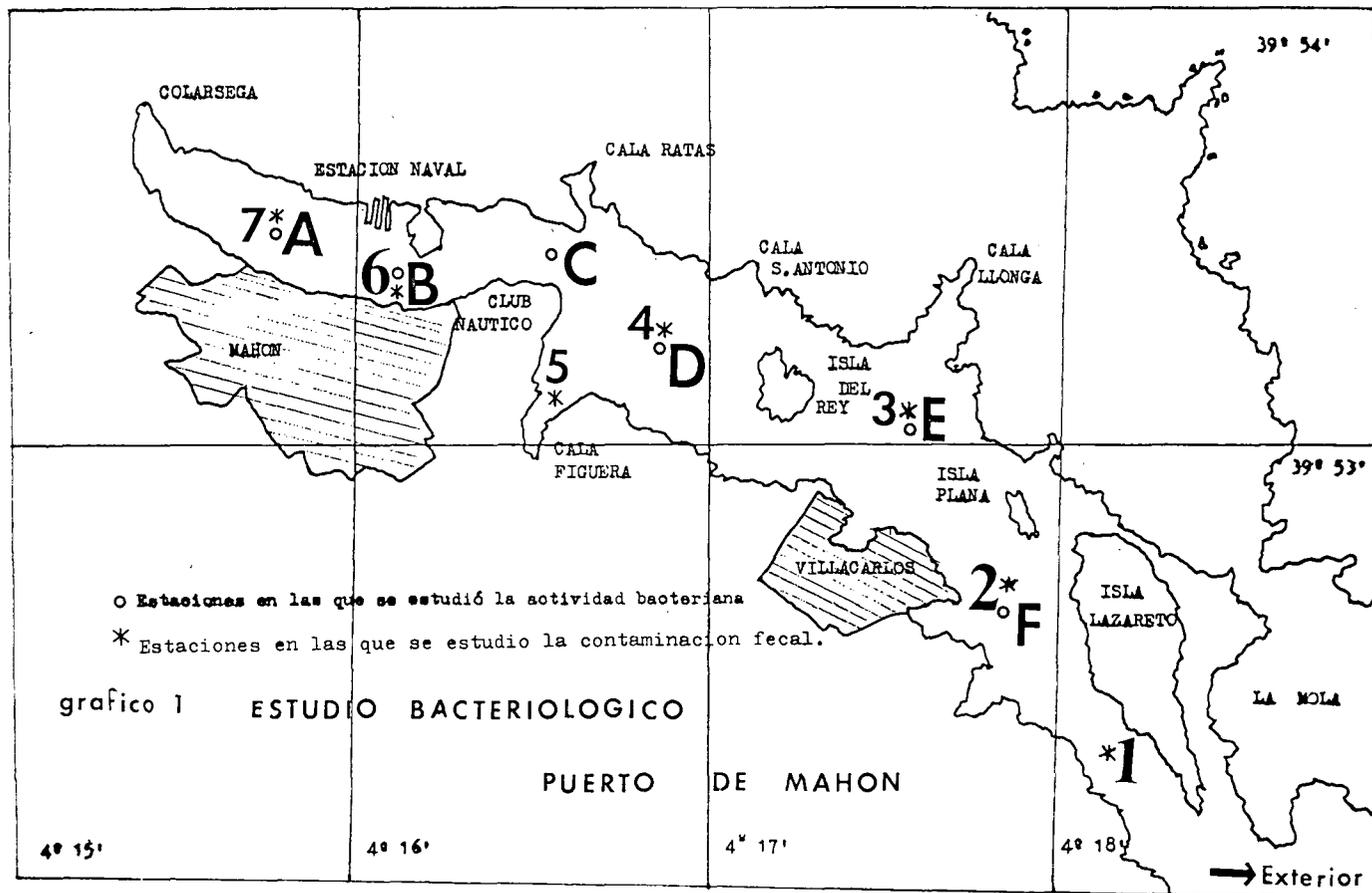
INTRODUCCION.

Se ha efectuado este trabajo en colaboración con el Laboratorio Oceanográfico de Baleares. Dicho estudio está encaminado a investigar las causas que producen la eutrofización de aquellas aguas. También se estudió la contaminación de desagües urbanos y los efectos producidos en aquel ecosistema. Los datos fueron obtenidos en la campaña oceanográfica Mahón II, con el barco oceanográfico Jafuda Cresques en Abril de 1975. Centramos el estudio bacteriológico en la actividad bacteriana. Comparamos los resultados obtenidos con alguno de los parámetros físicos y biológicos con los que pueda estar relacionada dicha actividad.

LA ACTIVIDAD BACTERIANA.

Todavía no se ha cuantificado muy bien la función que desempeña la fisiología bacteriana en relación a la ecología del mar. Ello es debido a varias causas, en primer lugar es sabido la gran versatilidad fisiológica de los microorganismos, ante nuevas condiciones ecológicas. Poseen una variedad de procesos metabólicos de los que pueden obtener materia y energía, ello hace imposible establecer una correlación entre sustrato y actividad bacteriana. Las fluctuaciones de población son más acentuadas que en el fitoplancton, debido a su corto período de reproducción. La sucesión ecológica de las poblaciones bacterianas en el mar es un aspecto muy poco conocido. Está regida a veces por oligoelementos o por sustratos no muy bien conocidos. Lo más correcto

* Passeig La Gola, 14. Port de Pollença.



parece ser, el optar por analizar la actividad total de la población respecto a los parámetros que más nos interesan. En el caso del estudio de la productividad marina, será interesante determinar la cantidad de materia orgánica degradada (heterotrofismo) y la síntesis de materia orgánica bacteriana a partir de elementos y sustancias minerales (autotrofismo).

Si repasamos el ciclo biológico de los océanos, vemos que en la base de la pirámide alimenticia se encuentran los vegetales que realizan la síntesis de moléculas orgánicas a partir de compuestos minerales simples, obteniendo la energía de la fotosíntesis. Los siguientes eslabones sólo aprovechan un 10% en incrementar su materia orgánica disipándose el resto en forma de energía. Todos los seres vivientes tanto animales como vegetales eliminan al medio ambiente diversos productos de su metabolismo: secreciones, excrementos, que raramente se encuentran bajo una forma mineral sencilla, frecuentemente en forma de moléculas orgánicas más o menos complejas. Finalmente al término de su existencia, sus propios cadáveres se añaden a las sustancias que han expulsado durante su vida. Una parte de esta materia orgánica se sedimenta en las grandes profundidades, una pequeña porción queda inalterable (sustancias de naturaleza húmica). Una tercera parte es mineralizada antes de llegar al fondo, pudiéndose así formar nitratos, fosfatos, etc., que pueden ser puestos de nuevo a disposición de las algas marinas. La mayoría de las bacterias actúan a expensas de este material degradable (bacterias heterótrofas). Esta degradación que tiene por resultado la síntesis de materia orgánica bacteriana, tiene un rendimiento muy superior al anteriormente aludido. Se considera, en general, que la parte de materia orgánica muerta que se transforma en protoplasma bacteriano oscila entre el 30% y 40% mientras que el resto se utiliza en la producción de energía y sustancias catabólicas. Esto produce un enriquecimiento de sustancias minerales a partir de materia orgánica, quedando a disposición de las algas o de las bacterias quimiosintéticas (autotrofismo).

PARAMETROS ESTUDIADOS.

Los parámetros estudiados son los siguientes: actividad heterotrófica, actividad autotrófica (oxidación de hierro, oxidación de azufre, reducción de sulfatos y nitrificación). Contaminación fecal (*Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, coliformes, número total de gérmenes). Dichos datos se compararon con otros que se obtuvieron en la misma campaña: clorofila, oxígeno disuelto, tripton, en los que colaboraron M. Durán, J. Jansá y M. Deyá.

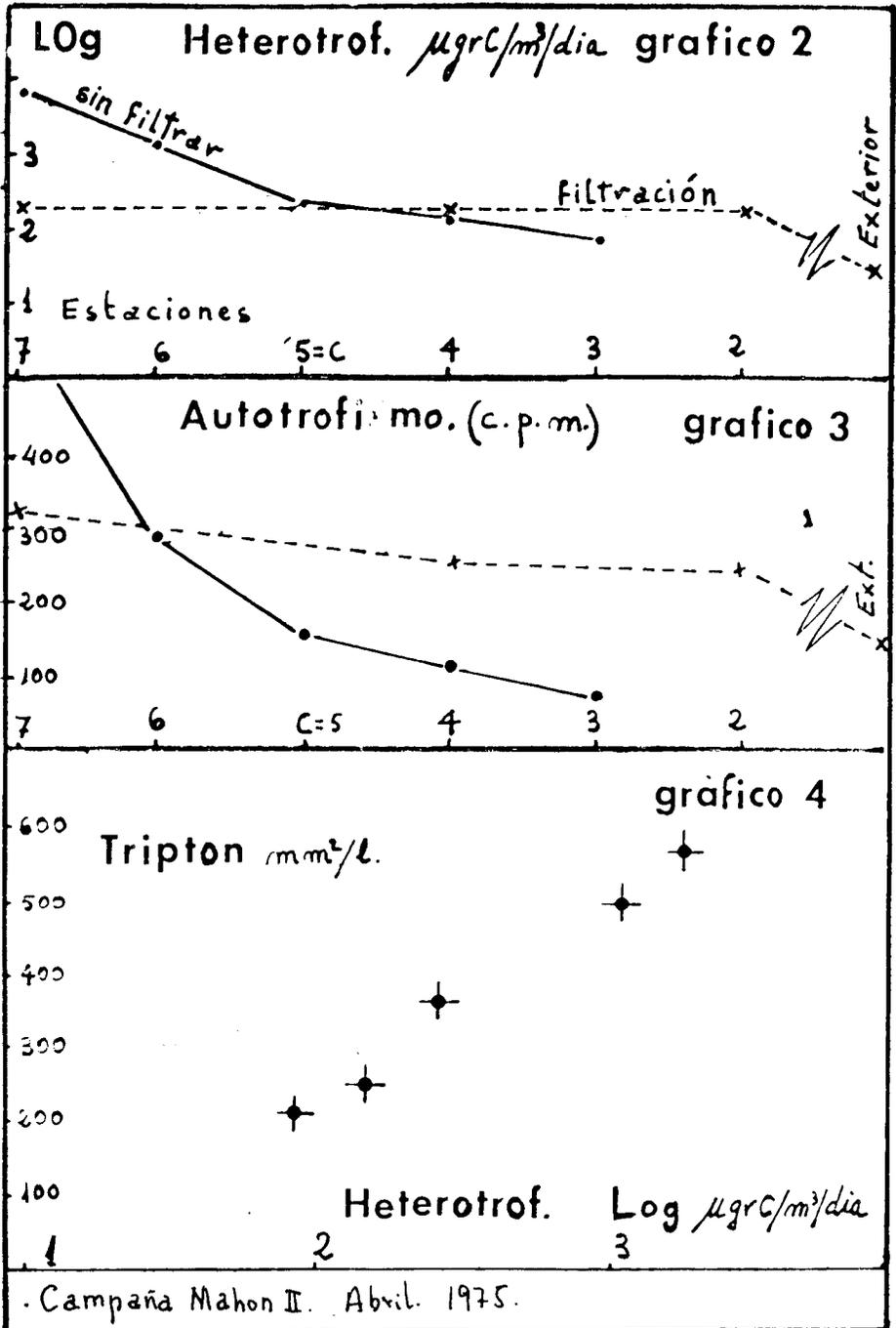
Estación	Profund. metros	Clorofila mgr/m ³	Oxígeno ml/l.	Tripton mm ³ /l.	Seschi m.	I. C. F.	Filtros	I. A. H.	Quim.	Oxid. Fe ++	Oxid. SH ²	Red. SO ⁴ =	Nitrif. NH ⁴ +
1				130	6	9,7		M g r c C / m ³ / dia					
2=F	7	0'7	5'87	285	5	14	+	190	0'54	0'65	0'61	0'48	0,72
2=F	14		5'67		+		258	0'77	1'14	1'00	0'82	0,94	
2=F	21		5'17		+		433	1'63	1'03	0'89	0'90	1,10	
3=E	9'5	1	5'75	201	4	4'6	—	84	0'21	0'25	0'22	0'13	0,52
4=D	8	1'7	5'8	241	3'5	1'3	—	141	0'37	0'45	0'36	0'38	0,49
4=D	8	1'7	5'8	241	3'5	1'3	+	214	0'80	1'12	0'88	0,84	1,05
5	5'5	4'4	6'25	362	3	11							
C	7'5		6'0				—	240	0'54	0'65	0'47	0,53	0,64
6=B	5'5	4'6	6'95	500	2	191	—	1.111	0'98	1'07	1'11	0,91	1,32
7=A	5'5	4'9		564	2	405	—	1.814	1'67	3'59	1'92	1,92	1,77
7=A	5'5	4'9		564	2	405	+	275	1'19	1'26	1'21	1,24	1,20
Ext.	25					0	+	53	0'53	1'07	0'77	0,56	0,49
Ext.	35					0	+	38	0'90	0'35	0'38	0,26	0,37

TOMA DE MUESTRAS.

Las estaciones en que se tomaron muestras se sitúan en el gráfico número 1. En general sólo se tomaron a un solo nivel, aproximadamente en la zona de compensación, debido a la poca profundidad de la zona y a las limitaciones técnicas en algunos puntos se tomaron muestras a distintos niveles para observar la variación de actividad con la profundidad. La toma de muestras no se realizó en condiciones estériles (botella Niskin de 5 litros) ya que no era necesario debido a que la pequeña cantidad de líquido arrastrado de una estación a otra no influía en los resultados. En cada estación se tomaron siete muestras de 125 ml. cada una para la determinación de la actividad bacteriana. Las botellas eran estériles, pintadas de negro y recubiertas de cinta opaca actividad de filoplancton y enmascarar el proceso de actividad bacteriana. Unas muestras se incubaron, previo filtraje por malla de 20 micras y otras sin filtrarlas, de esta manera se comprobó la importancia de esta operación sobre la actividad de la muestra. Para la determinación de la contaminación fecal se utilizó agua de las mismas botellas Niskin. No fue necesario extremar las precauciones en la realización de la técnica debido a que se emplearon medios de cultivo selectivo y además era muy improbable que algún germen fecal procedente del exterior fuera a parar al medio de cultivo.

ACTIVIDAD HETEROTROFICA.

La botella destinada a medir la actividad *heterotrófica* se incubó con una cantidad de glucosa ^{14}C que equivale a 1 mgr C/m³. La actividad heterotrófica será proporcional a la cantidad de glucosa degradada. La actividad propia de esta glucosa era de 0,4 micro Ci/ml = 889.159 c.p.m. La técnica empleada se basa en la descrita por Parson y Strickland 1961 algo modificada. Esta cantidad de sustrato es tal que no influye en la tasa energética del sistema, ya que la glucosa existente en el agua de mar está siempre comprendida entre 1 y 10 mgr/m³ (Andrews y Williams 1971). A concentraciones inferiores a 60 mgr/m³ la utilización del sustrato es debida casi exclusivamente a las bacterias; mientras que a concentraciones de sustrato comprendidas entre 0,5 y 2 gr/m³ la variación de la concentración es debida a difusión en las algas (Hobbie J. E. 1968). Los resultados obtenidos en cada estación están señalados en la tabla número 1 y representados en el gráfico n.º 2



CALCULO DE LA ACTIVIDAD AUTOTRÓFICA.

Las botellas destinadas a medir dicha actividad fueron seis por cada muestra de agua, y cada una contenía 125 ml. La correspondiente a la quimiosíntesis natural se añadía tan sólo 1 micro Ci de ^{14}C en forma de $^{14}\text{CO}_3\text{HNa}$. A las restantes se las añadía además 0,4 mgr. de $\text{SO}_4\text{Fe}/100$ ml., destinada a medir la oxidación del hierro. La destinada a medir la reducción de sulfatos 0,4 mgr. $\text{SO}_4\text{Mg}/100\text{ml}$. La destinada a medir la oxidación de azufre 20 mgr. de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/100\text{ml}$. Para medir la nitrificación se añadieron 62 mgr. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2/100$ ml. Otra botella sirvió de "blanco" añadiendo cloroformo 0,2 ml/100ml. con el fin de inhibir toda actividad bacteriana. Según describen otros autores es conveniente filtrar las muestras por malla de 20 micras antes de ser incubadas. En este trabajo hemos incubado muestras con y sin filtración previa, observando el efecto que produce la eliminación de algas y flóculos de materia orgánica.

Tiempo de incubación. El tiempo de incubación debe ser lo más amplio posible de forma que obtengamos la máxima actividad del producto acumulado en las células. Pero debe ser inferior al período de reciclaje del producto o de un aumento de población ya que en ambos casos podíamos obtener conclusiones erróneas. Castelvi (1975) calcula aproximadamente tres horas para la incubación heterotrófica y 15 horas para la autotrófica.

Temperatura de incubación. Tiene que ser la misma que había a la profundidad en que fueron sacadas las muestras. Esto puede presentar algunos inconvenientes prácticos, en nuestro caso, lo solucionamos depositando las muestras en un recipiente que estaba recibiendo continuamente durante la incubación, agua bombeada desde la profundidad a que fueron extraídas

Cálculo de la actividad. Una vez terminado el período de incubación se pasaron las muestras por filtros de membrana de 0,45 micras y se lavaron estos con agua de mar filtrada y acidulada con 1 ‰ de CIH. Se depositaron los filtros en viales conteniendo silicagel, para su posterior lectura. La determinación de radioactividad incorporada se hizo con un contador de centelleo líquido Intertecneque, cuya eficiencia era del 95 %. El líquido de centelleo empleado fue el formado por tolueno, dimetil POPOP y PPO. Los resultados se expresan en micro $\text{gC}/\text{m}^3/\text{día}$, no siendo este el valor real del heterotrofismo, sino el relativo a la cantidad de glucosa degradada respecto a la cantidad añadida. Tiene un valor de índice que nos sirve para comparar la actividad en distintas zonas. Los datos obtenidos se señalan en la tabla n.º 1 y se representan en el gráfico n.º 3.

INDICE DE CONTAMINACIÓN FECAL.

Se abandonó la técnica del número más probable (NMP) por falta de precisión, laboriosidad y poca capacidad de volumen de muestra para analizar. Se adoptó la técnica del cultivo sobre filtros de membrana en medios y temperatura selectiva. Se emplearon técnicas descritas en el Standard methods for the examination of water and wastewater 13^o ed. 1971 y los datos de E. Geldrich 1966 introduciendo temperaturas selectivas para el aislamiento de coliformes. Se determinó la concentración de *E. coli* empleando el caldo m-FC (difco) incubando 24h a 45° C. La enumeración de Streptococos fecales se realizó empleando el medio m-enterococcus-agar a 24 h a 37° C. Se calculó también el número de coliformes totales y el número de bacterias aerobias.

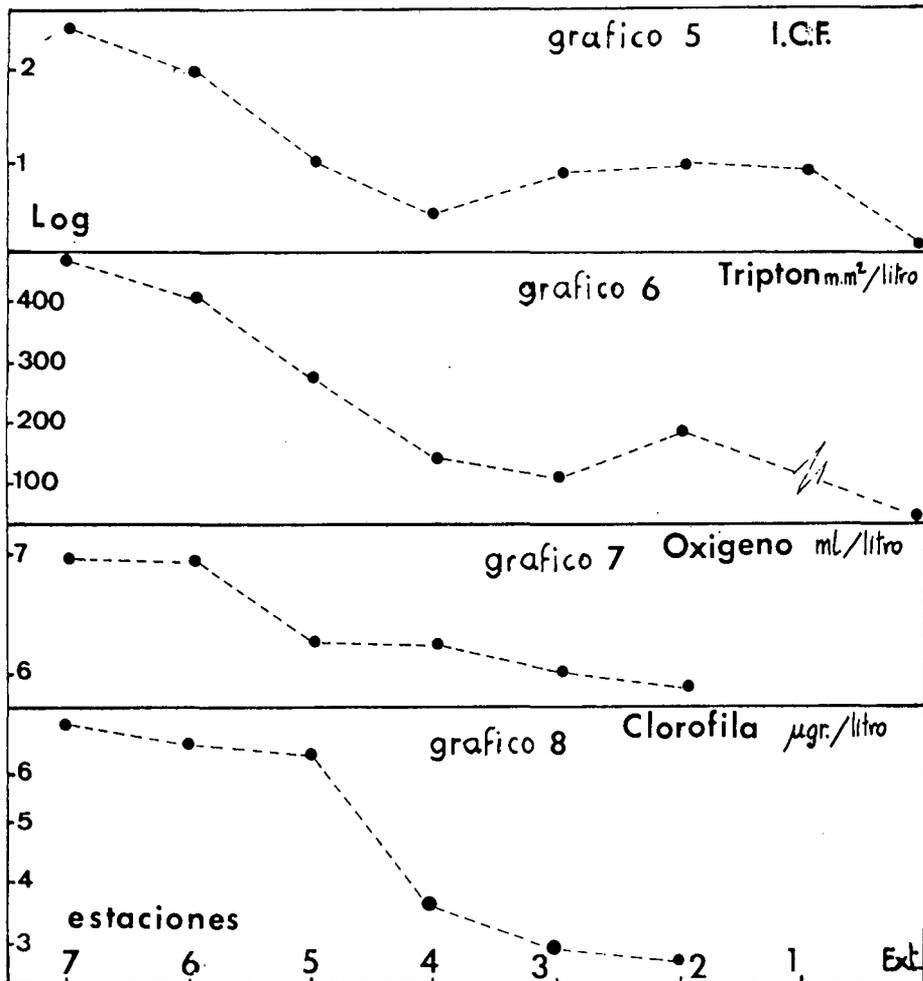
Los datos obtenidos se agruparon en forma de índice (Payeras B. Bol. Inst. Esp. Oceanografía, N.º 203 y Bol. Soc. Hist. Nat. Palma de Mallorca n.º 19) de esta forma fue posible obtener un parámetro de contaminación comparable con las demás variables físicas y biológicas. Los resultados constan en la tabla n.º 1 y se representan en el gráfico n.º 5.

RESULTADOS.

Se expresan en la tabla n.º 1 en la que se señalan los datos obtenidos en cada estación y a la profundidad a que fueron tomadas las muestras. Se tomaron datos en el exterior del puerto para compararlos con los de la zona interior contaminada. La actividad bacteriana se expresa en mgr/c/m³/día. La contaminación fecal en forma de índice. La cantidad de tripton se obtuvo por el sistema de recuento óptico π MC de Millipore. Se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer para la determinación de clorofila aplicando cálculos de la SCOR-UNESCO (1966) (por J. JANSÁ). Gráfico 8. El oxígeno disuelto se midió por el método Winkler (M. DEYÁ).

INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Hay que resaltar en primer lugar la enorme eficacia y sencillez que representa el empleo de técnicas radioisotópicas para investigar la actividad bacteriana en el mar. Consideramos que es el sistema más adecuado para investigar el flujo de energía que circula a nivel bacteriano antes de ser recicla-



do por las algas. Para ello hemos de prescindir de la taxonomía y recuentos clásicos trabajando con los rendimientos fisiológicos de los distintos grupos bacterianos.

El empleo de filtros de membrana con medios y temperaturas selectivos es varios cientos de veces más preciso y rápido que el antiguo sistema de recuentos del N.M.P. Esta nueva técnica permite al mismo tiempo el recuento y la identificación.

La actividad heterotrófica bacteriana es mucho mayor dentro del sistema contaminado que en el exterior, ofreciendo una buena correlación directa con el I.C.F. y con la cantidad de tripton (ver gráfico N.º 4).

Si hay una polución o explotación del sistema natural, aumenta la actividad bacteriana y la relación biomasa bacteriana a biomasa no bacteriana. El sistema se simplifica y hay poca diversidad, con unos mecanismos de rápida renovación y un ciclo de nutrientes con una participación importante de su forma inorgánica. Esto es lo que se observa en el interior del puerto de Mahón. Hay una gran actividad bacteriana comparada con la del exterior, el ecosistema está muy simplificado. El ciclo de la materia orgánica transcurre en su mayor parte por tres niveles solamente bacterias —algas— zooplanton, ya que existen pocos seres capaces de resistir la contaminación y aprovecharse del zooplanton.

Las zonas de máxima actividad heterotrófica coinciden con las zonas más polucionadas, concretamente a la altura de la ciudad de Mahón y de Villarclos se encuentran los máximos. En estas zonas se encuentran los vertederos

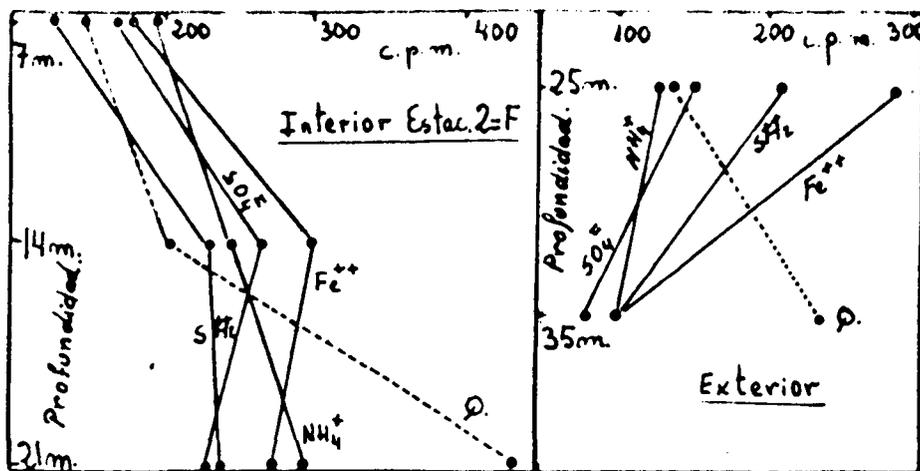


Gráfico n.º 9 : Distintas actividades autotróficas en profundidad en el interior y exterior del puerto. D = quimiosíntesis
 NH_4^+ : nitrificación. SO_4 : reducción de sulfatos. Fe^{++} : oxidación hierro.
 SH_2 : oxidación

de aguas residuales. Cabe pensar que este aumento sea debido en parte a las bacterias de origen fecal y en parte a la materia orgánica añadida al sistema facilitando así la proliferación de las bacterias heterotróficas marinas.

Las técnicas descritas para la determinación de la actividad bacteriana recomiendan un filtrado de la muestra por una malla de 20 micras para evitar la asimilación del carbono por las algas. Comprobamos el efecto de este filtrado sobre la actividad de la muestra. Las muestras sin filtrar presentaban una mayor actividad hacia el interior del puerto (gráfico n.º 2). Este fenómeno es muy raro teniendo en cuenta que la luz no penetraba en la botella durante la incubación. De qué manera asimilaban estas muestras más carbono que las filtradas deberá aclararse en posteriores trabajos. Es posible que las bacterias estén asociadas en parte a cadáveres de algas o flóculos de materia orgánica superiores a 20 micras de diámetro.

En profundidad aumenta la quimiosíntesis y el heterotrofismo (excepto en exterior), mientras que disminuyen o se mantienen constantes las demás actividades.

En profundidad la actividad bacteriana difiere sensiblemente de la del exterior del puerto. Gráfico 9 y 10. Las actividades son superiores en el interior del puerto. El heterotrofismo aumenta hasta llegar al fondo, mientras que en el exterior desciende al acercarse al fondo. Seguramente en el interior la cantidad de tripton en sedimentación es tal que no puede ser degradada antes de llegar al fondo. Parece ser que la sedimentación es acusada. La quimiosíntesis aumenta en profundidad tanto en el puerto como fuera de él. Las demás actividades autotróficas del interior sufren un aumento en profundidad para después mantenerse constantes. En el exterior decrece sensiblemente antes de llegar al fondo.

La fotosíntesis aumenta hacia el interior lo que provoca una mayor cantidad de oxígeno a disposición de la respiración bacteriana (gráfico n.º 7) que junto con la mayor cantidad de tripton provocan una mayor actividad mineralizadora. Si pensamos que esto ocurre a finales de abril cabe interpretar que estos nutrientes son los que permiten el enorme crecimiento de algas que se registra en verano. Las aguas se tiñen de verde debido a la enorme proliferación de fitoplancton. Seguramente son otras las causas que influyan en desencadenar este fenómeno como pueden ser oligoelementos (quizás los relacionados con la industria de bisutería). Observando el gráfico n.º 7 el contenido de oxígeno disuelto crece también hacia el interior lo que hace pensar que a pesar del consumo por las bacterias y la respiración celular, el balance es fa-

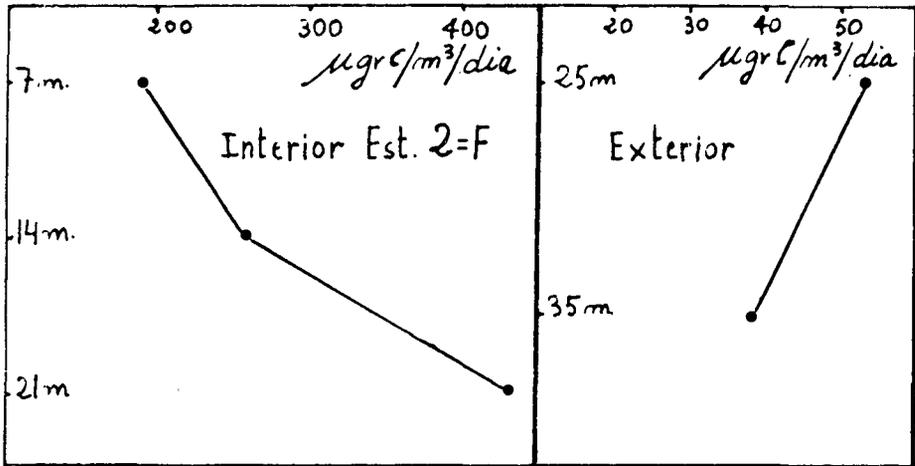


Gráfico n.º 10. Variación en profundidad de la actividad heterotrófica en el interior y exterior del puerto de Mahón.

vorable a la producción de oxígeno. Teniendo en cuenta que las muestras fueron tomadas a la profundidad de compensación hace pensar en una gran producción primaria unida quizás a una fuerte sedimentación.

CONCLUSIÓN:

En el puerto de Mahón el aporte de materia fecal condiciona la estructura del ecosistema acelerando y acortando el ciclo de la materia orgánica. El escaso intercambio de agua con el exterior hace más acusado este fenómeno. El empleo de técnicas radioisotópicas para la investigación de la actividad bacteriana demuestran ser de una gran sencillez y eficacia. Lo mismo ocurre con el empleo de filtros de membrana sobre medios selectivos para la determinación de la contaminación fecal.

Los desagües urbanos aportan gran cantidad de materia orgánica y gérmenes. El I.C.F, tripton y heterotrofismo son muy elevados en estas zonas y descienden al alejarnos. Es el ICF el que presenta un mayor gradiente lo que

puede ser debido a las leyes de difusión y al poder depurador del agua de mar. El heterotrofismo es muy elevado, lo que provoca a finales de primavera una gran cantidad de nutrientes a disposición de las algas, propiciando así una explosión de fitoplancton durante el verano.

Fue una feliz idea el que se realizaran estos trabajos antes de que se procediera a la colocación de un emisario submarino que enviara las aguas residuales fuera del puerto. Esto plantea una excelente ocasión para estudiar de nuevo la zona, observar la evolución del ecosistema hacia una mayor complejidad y poder demostrar más claramente los efectos que producen las aguas contaminadas al incidir en el ecosistema marino.

BIBLIOGRAFÍA

- CASTELLVI, J., BALLESTER, A., 1973. — *Expl. Sci. Mer. Med.* 22: 33-34.
HOBBIE, J. C., 1973. — *Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm)* 17: 207-214.
IBP-UNESCO, *Simposium. Pallanza, Italy, may 23-27, 1972.*
PARSONS, T. R. & STRICKLAND, *Deep. Sea. Res.* 8, 211-222.
PAYERAS, B., 1975. — *Bol. Ins. Esp. Ocean.* n.º 203.
BOROKIN, 1969. — *IBP Handbook, London* 12: 128-150.
CASTELLVI, J., *Invest. Pesq.* 1975. Vol. 39: 119-144.