

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



**Dinámica de las bacterias de interés sanitario adheridas a
partículas en un embalse de abastecimiento**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Rosa María Fernández Álvarez

Directora

María del Carmen de la Rosa Jorge

Madrid

ISBN: 978-84-8466-844-2

© Rosa María Fernández Álvarez, 1995

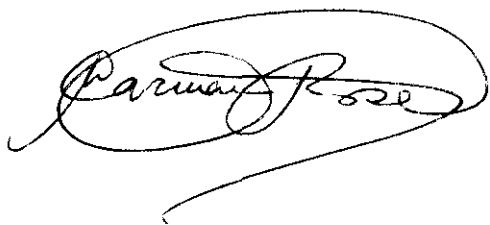
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DINAMICA DE LAS BACTERIAS DE INTERES
SANITARIO ADHERIDAS A PARTICULAS EN UN
EMBALSE DE ABASTECIMIENTO

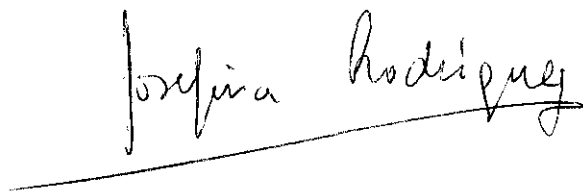
MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
ROSA MARIA FERNANDEZ ALVAREZ

Directoras:

Dra. Carmen de la Rosa Jorge

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carmen de la Rosa Jorge', enclosed within a large, loopy oval flourish.

Dra Josefina Rodríguez de Lecea

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Josefina Rodríguez de Lecea', written in a cursive style with a long horizontal line underneath.

Madrid, 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DINAMICA DE LAS BACTERIAS DE INTERES
SANITARIO ADHERIDAS A PARTICULAS EN UN
EMBALSE DE ABASTECIMIENTO

Rosa María Fernández Alvarez
Madrid, 1994

PREFACIO

Quisiera expresar mi agradecimiento a muchas personas que me ayudaron de muy distintas maneras durante la realización de este trabajo. Seguramente mi memoria me traicionará y me olvidaré de alguna de ellas. Espero que me sabrá perdonar.

A los directores de los Departamentos de Microbiología II y III, Dr. César Nombela Cano y Dr. José Martínez Peinado, quiero agradecerles haberme dado la oportunidad de trabajar en sus departamentos.

A mis directoras de Tesis, Dra. Carmen de la Rosa Jorge y Dra. Josefina Rodríguez de Lecea, Profesoras Titulares de Universidad en los Departamentos de Microbiología II y III, de las Facultades de Farmacia y Biología respectivamente, no sólo tengo que agradecerles el haber dirigido esta Tesis, también han sido importantísimos su apoyo en todo momento y sus ánimos para que este trabajo llegara a su fin.

A la Dra. Trinidad Soto Esteras, Profesora Titular de Escuela Universitaria del Departamento de Microbiología III, de la Facultad de Biología, compañera constante de muestreos y de jornadas de siembra, por su ayuda tanto en el trabajo de campo como en el laboratorio, por su apoyo constante, por su compañerismo y por todos los ánimos y buenos consejos que me ha dado en todo este tiempo, incluso en los momentos más desalentadores.

También debo recordar a Carmen Chena, compañera de muestreos y de laboratorio, por todos los ratos que hemos pasado codo con codo.

A la Dra. Covadonga Vázquez Estévez, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Microbiología III de la Facultad de Biología, por haberme ayudado con todo interés cada vez que la necesitaba y por haberme animado continuamente.

A la Dra. Angeles Mosso Romeo, por el apoyo incondicional durante todo mi trabajo

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología III, de la Facultad de Biología, por hacer más fácil el trabajo diario con su alegría y su compañerismo. Quiero recordar especialmente a Alberto Espinel, por toda la lata que le di con el ordenador.

A M^ª Jesús Gómez y a Eva Rodríguez, que durante el tiempo que estuvieron en el Departamento de Microbiología III de la Facultad de Biología, además de granjearse las simpatías de todos los que allí estábamos, tenían tantas ganas de aprender y tantas ganas de ayudar, que se prestaban a todo lo que les pidieses. Las dos me ayudaron mucho y con todo entusiasmo.

Desde luego el trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración del Canal de Isabel II, propietario del embalse estudiado, no sólo nos concedió los permisos para la recogida de muestras, sino que además puso a nuestra disposición la barca y al personal del embalse. Quiero recordar aquí a las personas que trabajaban en el embalse, manifestándoles mi más sincero agradecimiento por su gran ayuda y por el entusiasmo que ponían en facilitarnos cualquier tarea, participando en la recogida de muestras como uno de nosotros, ya hiciera un frío intenso o un calor sofocante.

Quiero agradecer a la Universidad Complutense de Madrid la concesión de la Ayuda a Grupos Precompetitivos al proyecto titulado "Caracterización de las poblaciones microbianas de un embalse de abastecimiento. Producción, actividad y biomasa"; gracias a ella se ha podido llevar a cabo todo este trabajo.

Sin duda mi mayor gratitud es hacia unas personas que me animaron constantemente para que finalizara la Tesis: mi marido y mis padres. A pesar de todo el tiempo que les he hecho esperar, espero que el verla ahora terminada les pueda resarcir de todos los malos ratos que habrán pasado por mi culpa.

Además, con Serafín, mi marido, tengo una deuda de gratitud enorme y este trabajo es tan mío como suyo. El ha participado en él desde sus inicios, remontándonos a cuando realizamos nuestras tesinas juntos, y ha sufrido y se ha alegrado con el tanto como yo. Parecía que nunca iba a llegar, pero aquí está.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Los microorganismos en el medio acuático continental	2
1.1.1. Distribución en aguas subterráneas, manantiales y ríos	2
1.1.2. Distribución en lagos y embalses	4
1.2. Influencia de los factores físico-químicos	6
1.3. Influencia de los factores biológicos	16
1.4. Adhesión microbiana a superficies	22
1.4.1. Razones que justifican la adhesión	22
1.4.2. Mecanismos de adhesión	24
1.4.3. Actividad de las bacterias adheridas	27
1.4.4. Factores que influyen sobre la adhesión	29
1.4.5. Importancia de la adhesión	36
1.4.5.1. Ecológica	36
1.4.5.2. Sanitaria	37
1.4.5.3. Industrial	39
1.5. Embalse de "El Atazar"	41
1.6. Objeto del trabajo	43
2. MATERIAL Y METODOS	46
2.1. Toma de muestras y su conservación	47
2.2. Realización de los perfiles de temperatura, oxígeno disuelto y tanto por ciento de saturación de oxígeno	47
2.3. Métodos microbiológicos	48
2.3.1. Determinación de la población bacteriana total	48
2.3.2. Recuento de bacterias respiratoriamente activas	49

2.3.3. Recuento de bacterias heterótrofas viables a 22°C y 37°C, totales y adheridas a partículas	49
2.3.4. Recuento de bacterias del grupo coliforme, totales y adheridas a partículas	50
2.3.5. Recuento de estreptococos fecales, totales y adheridos a partículas	51
2.3.6. Identificación de bacterias	51
2.3.6.1. Identificación de coliformes	51
2.3.6.2. Identificación de estreptococos	52
2.3.7. Adhesión <i>in vitro</i>	52
2.4. Métodos físico-químicos	54
2.4.1. pH	54
2.4.2. Concentración de ion amonio	54
2.4.3. Concentración de nitritos	54
2.4.4. Concentración de nitratos	54
2.4.5. Concentración de ortofosfatos	55
2.4.6. Concentración de fósforo total	55
2.4.7. Demanda química de oxígeno (D.Q.O.)	55
3. RESULTADOS Y DISCUSION	57
3.1. Perfiles de temperatura, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno	58
3.2. Parámetros microbiológicos	63
3.2.1. Población bacteriana total y células respiratoriamente activas	63
3.2.2. Bacterias heterótrofas totales y adheridas a partículas	68
3.2.2.1. Bacterias heterótrofas con crecimiento a 22°C	68
3.2.2.2. Bacterias heterótrofas con crecimiento a 37°C	75
3.2.2.3. Porcentaje de bacterias heterótrofas adheridas a partículas	82
3.2.3. Bacterias del grupo coliforme, totales y adheridas a partículas	85

3.2.3.1. Justificación del método empleado	85
3.2.3.2. Recuentos	86
3.2.3.3. Porcentaje de coliformes adheridos a partículas	102
3.2.4. Estreptococos fecales	103
3.2.5. Identificación de bacterias	105
3.2.5.1. Identificación de coliformes	105
3.2.5.2. Identificación de estreptococos	106
3.2.6. Adhesión <i>in vitro</i>	107
3.3. Parámetros físico-químicos	108
3.3.1. pH	108
3.3.2. Concentración de ion amonio	109
3.3.3. Concentración de nitritos	113
3.3.4. Concentración de nitratos	116
3.3.5. Concentración de ortofosfatos	120
3.3.6. Concentración de fósforo total	123
3.3.7. Demanda química de oxígeno	126
4. CONCLUSIONES	129
5. BIBLIOGRAFIA	131

1. INTRODUCCION

1.1. LOS MICROORGANISMOS EN EL MEDIO ACUATICO CONTINENTAL

Prácticamente todas las áreas ambientales conocidas se encuentran colonizadas por microorganismos que se han adaptado también a los diferentes sistemas acuáticos existentes en la Tierra. En casi todos ellos se encuentran microorganismos formando parte de las distintas biocenosis (comunidades biológicas) con interrelaciones entre todos los grupos que las forman y cuya distribución, tanto cuantitativa como específica, es muy diversa y es el resultado de la cooperación e interacción de todos los factores bióticos y abióticos y, como éstos, está sujeta a unos cambios más o menos profundos de una manera constante (Rhodes y Kator, 1990). Diversas investigaciones en ecología microbiana acuática han resaltado el papel que juegan las bacterias heterótrofas en la transformación de la materia orgánica, reciclado de nutrientes y flujo de energía en los sistemas acuáticos (Azam *et al.*, 1983; Scavia y Laird, 1987; van Es y Meyer-Reil, 1982; Zinabu y Taylor, 1989 a) y en las cadenas alimentarias, ya que la actividad heterotrófica de las bacterias sirve como vía primaria por la que la materia orgánica se hace disponible a niveles tróficos superiores (Azam *et al.*, 1983; Hubbard y Chrzanowski, 1986; Murray y Hodson, 1985; Zinabu y Taylor, 1989 b). Las bacterias concentran un carbono inútil por disperso (carbono orgánico disuelto, C.O.D.), en un carbono de alta calidad (carbono orgánico particulado, C.O.P.), útil para otros niveles tróficos (Murray y Hodson, 1985).

Existe una estrecha relación entre la flora bacteriana de las aguas continentales y la del suelo. Esto es particularmente importante en el caso de aguas corrientes, por estar expuestas constantemente a la contaminación procedente del suelo; de ahí la gran dificultad de separar netamente una y otra flora. Por tanto, muchas de las bacterias que podemos encontrar en las aguas están presentes también en el suelo.

1.1.1. DISTRIBUCION EN AGUAS SUBTERRANEAS, MANANTIALES Y RIOS

En las aguas subterráneas y de manantial la cantidad de bacterias es, por regla general, escasa, debido a su pobreza en principios nutritivos y a la filtración que sufren a través de las distintas capas de suelo. Dada la escasa concentración de materias nutritivas, las células suelen ser pequeñas, predominando los cocos más diminutos y los bacilos cortos (Rheinheimer, 1987), aunque algunos autores aseguran que los tamaños de la mayoría de las bacterias observadas no son significativamente más pequeños que los obtenidos de aguas superficiales ricas en nutrientes (Hirsch y Rades-Rohkohl, 1983). El espectro de especies varía mucho según la clase de agua, teniendo una influencia muy importante la temperatura y la composición de sustancias minerales

(Buchanam-Mappin *et al.*, 1986; Filip *et al.*, 1988; Hirsch y Rades-Rohkohl, 1983). En las aguas superficiales la flora bacteriana es generalmente mucho más rica en especies que en las subterráneas.

Las determinaciones del número total de bacterias en los ríos no permiten dar una idea de conjunto debido a la gran diversidad hidrográfica, encontrándose diferencias enormes en la cantidad de bacterias dependiendo en gran manera de si son ríos o arroyos limpios, de regiones montañosas o selváticas, o si se trata de ríos que atraviesan zonas pobladas, todos ellos contaminados.

También se pueden encontrar grandes oscilaciones en el perfil longitudinal de los ríos, atribuibles principalmente a la influencia que ejercen los afluentes, la evacuación de aguas residuales, las instalaciones portuarias y otros factores entre los que debemos incluir la autodepuración natural del río. Contrariamente a lo dicho respecto al perfil longitudinal, tanto el transversal como el vertical ofrecen diferencias relativamente escasas en lo concerniente al número de bacterias puesto que la corriente y el viento remueven constantemente el agua, lo que hace que, tanto las bacterias como la materia que usan para alimentarse, se distribuyan más uniformemente. Sólo se pueden advertir diferencias de cierta consideración en las riberas y en el fondo.

En los ríos y arroyos un factor importante es la velocidad de las aguas, que influye tanto en el número de microorganismos presentes como en la composición de las comunidades microbianas. Las aguas que corren a gran velocidad son poco productivas y tienen una micropoblación pobre en especies, que han de adaptarse a las condiciones extremas determinadas por la corriente.

En cuanto a las oscilaciones estacionales en la bibliografía se suelen citar dos modelos dependiendo del grado de contaminación. En los ríos contaminados no es raro encontrar un máximo invernal, con un número total de bacterias considerablemente mayor en la estación fría, que se atribuye a unas condiciones de vida y nutrición más favorables para las bacterias que llegan conducidas por las aguas residuales, ya que, si bien un aumento de la temperatura aumenta la actividad y disminuye el tiempo de generación de estas bacterias, también aumenta la acción tóxica y se acelera la autólisis (Granai y Sjogren, 1981). Esto, unido a que los efectos deletéreos combinados de la luz y la presencia de microbiota natural son generalmente mayores a temperaturas más altas (Anderson *et al.*, 1983; McCambridge y McMeekin, 1979; Rhodes y

Kator, 1988), hace que en verano se obtenga un número menor (Awong *et al.*, 1990). Se pueden obtener aumentos transitorios en el número total de bacterias durante las crecidas de los ríos, ya que los terrenos inundados originan una intensa contaminación adicional a la vez que aportan nuevos nutrientes.

En cambio, en los ríos que no sufren ninguna contaminación apreciable a causa de las aguas residuales, no se observa el ritmo estacional indicado anteriormente. Tanto el número total de bacterias como el de las saprofitas depende en este caso mucho más de las sustancias nutritivas producidas en el mismo río, sobre todo por el fitoplancton. Por consiguiente, el máximo no corresponde al invierno sino a las épocas de máxima producción por parte del fitoplancton (primavera y otoño o las postrimerías del verano).

1.1.2. DISTRIBUCION EN LAGOS Y EMBALSES

En los lagos formados por aguas subterráneas hay muchas bacterias de las existentes en esas aguas, a las que se pueden sumar otras especies, en mayor o menor número, dependiendo de las condiciones físico-químicas. En cambio a los lagos fluviales y a los embalses afluyen ríos que van a influir en su micropoblación, siendo esta influencia tanto mayor cuanto menor sea el lago o embalse, aunque la flora bacteriana lacustre siempre será diferente a la fluvial debido a las diferencias existentes entre ambos medios.

El número total de bacterias en lagos y embalses, así como su distribución estacional, va a depender del grado de contaminación y del estado trófico de los mismos. En los no contaminados y oligotróficos el número máximo de bacterias suele coincidir con la época de mayor producción por parte del fitoplancton, es decir la primavera, principio del otoño o final del verano. En lagos y embalses contaminados por aguas residuales se puede obtener un máximo en invierno como ya hemos comentado en el caso de los ríos.

La distribución vertical de las bacterias en zonas de clima templado ofrece grandes diferencias estacionales (Chrzanowski y Hubbard, 1988). En la época cálida la capa superior se calienta, lo que origina una estratificación estable formada por una capa superior caliente o epilimnion y otra inferior fría o hipolimnion. La temperatura desciende con brusquedad entre una y otra, lo que da lugar a una capa de transición térmica denominada termoclina o metalimnion. Estas tres capas, mientras dura esta situación, son totalmente inmiscibles. La estratificación térmica de la época estival tiene naturalmente una importancia extraordinaria para

la biología; en las tres capas no sólo es muy diverso el número total de bacterias, sino también su composición específica, su crecimiento y su actividad (Lovell y Konopka, 1985 b, c; Nagata, 1984).

Estas diferencias pueden ser particularmente importantes en los lagos y embalses eutróficos, en cuyo hipolimnion, durante la estratificación, llega a desaparecer por completo el oxígeno disuelto, lo que impide el desarrollo de algunas poblaciones bacterianas, conduce a un fuerte descenso en los recuentos de bacterias aerobias totales (Lewis *et al.*, 1986; Schmaljohann *et al.*, 1987), y favorece el de otras, como sulfobacterias, clostridios o *Desulfovibrio*.

El epilimnion bien iluminado y templado constituye la zona productiva por la capacidad asimilativa del fitoplancton que se desarrolla abundantemente. El desarrollo fitoplanctónico está ligado al estado trófico del lago o embalse, siendo más escaso en los oligotróficos, mientras que en los eutróficos se pueden producir "florecimientos" durante toda la época cálida. En el hipolimnion, de escasa o nula iluminación, tiene lugar la desintegración de la materia orgánica, llevada a cabo por distintos grupos de microorganismos, dependiendo de la existencia o no de oxígeno. A nivel de la termoclina o metalimnion es frecuente obtener los mayores recuentos de bacterias heterótrofas (Lovell y Konopka, 1985 b, c, d), población formada en su mayor parte por bacterias proteolíticas.

Cuando llega la época fría, se produce un enfriamiento de la capa superior que cae sobre las otras, produciéndose la mezcla de la columna de agua. Esto está ocurriendo continuamente durante todo el invierno, por lo que a esta etapa se la denomina de circulación. Durante esta época la distribución de bacterias es mucho más uniforme puesto que la columna de agua se encuentra en mezcla continua.

Los perfiles longitudinal y transversal de los lagos y embalses grandes, con frecuencia ofrecen también diferencias importantes en el contenido de bacterias del agua. Los ríos y arroyos que afluyen al lago o embalse pueden tener influencia en el número de microorganismos, que disminuye, por regla general, a medida que aumenta la distancia a las orillas.

También influye la climatología; después de precipitaciones intensas puede aumentar, aunque de manera transitoria, el número de bacterias en el agua, así como la cantidad de esporas de hongos. Otras veces el aumento se observa en la actividad heterotrófica, sin detectarse grandes aumentos en el número de bacterias (Hubbard y Chrzanowski, 1986). Esta influencia

es tanto mayor cuanto menor sea el lago o embalse.

1.2. INFLUENCIA DE LOS FACTORES FISICO-QUIMICOS

Hay una gran cantidad de factores físico-químicos que influyen sobre el desarrollo y supervivencia de los microorganismos en las aguas. Esta influencia no sólo se produce sobre el número de bacterias presente y sobre la composición en especies de las poblaciones microbianas, sino que algunos factores repercuten sobre la morfología y fisiología de los microorganismos, pudiendo alterar considerablemente el metabolismo, la forma celular o la reproducción de muchas especies o incluso pueden inducir a una incapacidad para formar colonias en medios bacteriológicos estandar (Barcina *et al.*, 1989, 1990; Buchanam-Mappin *et al.*, 1986; Byrd *et al.*, 1991; García-Lara *et al.*, 1991; López-Torres *et al.*, 1988; Munro *et al.*, 1987; Roszack y Colwell, 1987; Roszack *et al.*, 1984; Singleton *et al.*, 1982; Tamplin y Colwell, 1986; Xu *et al.*, 1982).

Aunque los diversos factores de los medios naturales que pueden influir sobre los seres vivos son numerosos, algunos destacan sobre los demás por su importancia particular.

Luz

La luz es un importante factor ecológico en las aguas. La intensidad luminosa biológicamente activa se conserva sólo en las capas superiores, variando la profundidad en función de la intensidad de la radiación solar y de la turbidez. Si se trata de aguas muy turbias, la influencia de la luz es posible únicamente en la capa superior de pocos centímetros de espesor; pero en aguas muy claras los efectos pueden extenderse a algunos metros de profundidad.

Como fuente de energía la luz es importante para el fitoplancton, estando la producción primaria fuertemente influenciada por la intensidad de luz (Lovell y Konopka, 1985 b); pero la irradiación intensa daña considerablemente a muchas especies cuyas condiciones óptimas en verano no se encuentran en la superficie sino a unos pocos metros de profundidad.

La penetración de la radiación ultravioleta más perjudicial biológicamente (UV-B, 280-320 nm) se ve reducida en aguas de embalses y estuarios en comparación con aguas de océano abierto, debido a la absorción selectiva de las longitudes de onda más cortas por parte del

material orgánico disuelto, la clorofila y la materia particulada. Por consiguiente las bacterias de la zona fótica están expuestas principalmente a la luz visible (400-775 nm) y en menor medida al ultravioleta cercano (UV-A, 320-400 nm). Aunque los fotones de estas longitudes de onda más largas se consideran generalmente menos dañinos biológicamente, retrasan o impiden el crecimiento de poblaciones bacterianas tanto alóctonas como autóctonas (Rhodes y Kator, 1990; Sieracki y Sieburth, 1986).

Numerosos autores han estudiado el efecto de la luz sobre poblaciones bacterianas. Bailey *et al.* (1983) estudiaron su efecto inhibitor sobre las bacterias en la bahía de Chesapeake (EEUU) y observaron que, con el aumento de la radiación, se producía una disminución de la tasa de supervivencia de las bacterias y que la proporción de población activa se reducía de un 93% a un 20%. Barcina *et al.* (1989, 1990), estudiando la supervivencia de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* bajo iluminación por luz visible en agua dulce, observaron que después de 72 h la mayoría de las células de ambas cepas perdían su capacidad para formar colonias en medios de cultivo adecuados, manifestando además una actividad metabólica reducida. Otros autores obtuvieron también una rápida reducción en los recuentos de viables de bacterias entéricas después de la exposición durante pocas horas a la luz del sol (Cornax *et al.*, 1990; Fujioka *et al.*, 1981; Fujioka y Narikowa, 1982; Kapuscinski y Mitchel, 1981; Rhodes y Kator, 1990). Algunos autores han observado que la acción conjunta de la luz y la presencia de microbiota natural pueden tener un efecto exacerbado sobre las bacterias entéricas (McCambridge y McMeekin, 1981; Rhodes y Kator, 1990).

La influencia perjudicial de la luz afecta mucho más a las bacterias incoloras debido, no sólo al componente ultravioleta, sino también a la participación de la radiación visible (Fujioka *et al.*, 1981; Kapuscinski y Mitchel, 1981; McCambridge y McMeekin, 1981). En el caso de las bacterias pigmentadas que contienen carotenoides la tolerancia es mayor, no produciéndose ninguna inhibición si la intensidad luminosa es normal, teniendo incluso una mayor resistencia a los rayos ultra-violeta; por eso muchas bacterias que se encuentran en el aire son intensamente pigmentadas ya que, al aumentar la pigmentación, se reduce la tasa de mortalidad a causa de la luz.

Temperatura

Las manifestaciones vitales de todos los microorganismos están supeditadas a la temperatura, que influye tanto sobre la tasa de crecimiento y supervivencia (Barcina *et al.*, 1986;

Lovell y Konopka, 1985 a) como sobre las necesidades nutritivas y, en menor medida, sobre la composición química y enzimática de las células (Anderson *et al.*, 1983; Davenport *et al.*, 1976; McFeters y Stuart, 1972). En líneas generales, al aumentar la temperatura, dentro del margen eugenésico, aumenta la actividad vital y se reduce el tiempo de generación. Cuando se reduce la temperatura por debajo de la mínima se produce a menudo la detención de las actividades metabólicas, pudiendo muchos microorganismos persistir mucho tiempo en este estado de vida latente. Temperaturas cercanas a la máxima y a la mínima pueden provocar alteraciones morfológicas, como por ejemplo *E. coli* que a 7°C forma células filamentosas.

Pero los efectos inequívocos de la temperatura *in vitro*, en cultivo puro y condiciones óptimas, no se observan a veces más que difícilmente o nunca en la naturaleza, ya que, en primer lugar, aquí concurren gran número de seres vivos muy diversos, con procesos paralelos o antagónicos, de ahí que la influencia de la temperatura no pueda determinarse siempre para cada una de las especies por separado; además, otros muchos factores se suman a la temperatura, ejerciendo su influencia sobre las distintas poblaciones microbianas.

Rheinheimer (1987) afirma que, aunque un incremento de la temperatura aumenta la actividad y disminuye el tiempo de generación, también aumenta la acción tóxica y acelera la autólisis; por eso no es raro que los recuentos de bacterias heterótrofas en aguas contaminadas, con predominio de microorganismos autóctonos, sean más altos en invierno que en verano, ya que las bajas temperaturas invernales hacen más lentos todos los procesos prolongando la supervivencia de estas bacterias; en cambio, en aguas limpias el número total de bacterias suele ser mayor en verano porque muchos microorganismos pueden multiplicarse intensamente en las aguas con temperaturas estivales. Nagata (1984) comprobó que los recuentos bacterianos en el lago Biwa estaban correlacionados con la temperatura. Otros autores han observado también que la supervivencia de *E. coli* y otras bacterias entéricas es mayor a temperaturas bajas (Granai y Sjogren, 1981; McCambridge y McMeekin, 1980 b; Sjogren y Gibson, 1981; Vasconcelos y Swartz, 1976).

Generalmente el efecto de algunos factores sobre las bacterias entéricas es mayor a temperaturas más altas. Por ejemplo, la presencia de microbiota natural: mientras que en muestras de aguas naturales la supervivencia de bacterias entéricas es mayor a temperaturas más bajas, cuando el agua es filtrada se obtiene mayor supervivencia de estas bacterias a temperaturas cálidas (Anderson *et al.*, 1983; Rhodes *et al.*, 1983; Rhodes y Kator, 1988). También los efectos deletéreos combinados de la luz y la presencia de microbiota natural son

mayores a temperaturas altas (Anderson *et al.*, 1983; Faust *et al.*, 1975; McCambridge y McMeekin, 1979, 1980 a, 1981; Rhodes y Kator, 1988, 1990; Vasconcelos y Swartz, 1976).

Por tanto el efecto de la temperatura dependerá de las condiciones del medio. Lo que es indudable es que las oscilaciones estacionales de la temperatura provocan en todo caso una alteración de las poblaciones microbianas. Las diferencias en la supervivencia de bacterias alóctonas, principalmente enterobacterias, en función de la estación, también están relacionadas con la microbiota autóctona, cuyas densidades son mayores en la estación cálida, por lo que muchos autores encuentran, durante la época estival, una menor supervivencia de las poblaciones de enterobacterias, obteniendo grandes diferencias entre los resultados en muestras filtradas y no filtradas (Anderson *et al.*, 1983; Rhodes y Kator, 1988).

Turbidez

La turbidez del agua ejerce también influencia sobre la vida de los microorganismos. Está originada por el seston que es el conjunto de materias que se encuentran en suspensión en el agua y que podemos dividir en tres grupos:

- Sustancias de origen mineral, generalmente transportadas desde el suelo
- Materiales detríticos, orgánicos e inorgánicos, finamente triturados
- Plancton, es decir, organismos en suspensión

El conjunto de los dos primeros se denomina tripton.

Una buena referencia de la turbidez la podemos obtener a partir de la profundidad del disco de Secchi y también se puede determinar ópticamente con un espectrofotómetro. El enturbiamiento es muy variable en los distintos medios acuáticos. Es muy escaso en los ríos y arroyos limpios y en los lagos y embalses oligotróficos, y mucho mayor en aguas contaminadas y lagos y embalses eutróficos. Carballo (1987) en un estudio comparativo de dos embalses, uno oligotrófico y otro eutrófico, observa grandes diferencias en las profundidades de disco de Secchi; mientras que en el primero obtenía valores entre 5 y 8 metros, en el segundo raramente llegaban a alcanzar el metro de profundidad.

El seston desempeña un papel muy importante como sustrato de muchos microorganismos. Los materiales detríticos, en particular, son portadores a menudo de una flora compuesta de numerosos hongos y bacterias. Estos microorganismos pueblan no solamente los compuestos orgánicos, que pueden utilizar como alimento, sino también los inorgánicos. Las materias en

suspensión, tanto de procedencia orgánica como de origen mineral, adsorben sobre su superficie sustancias nutritivas que están disueltas en el agua a una concentración baja, de tal manera que los microorganismos encuentran allí unas condiciones de alimentación más favorables que si están libres en el medio líquido. Esto es tanto más patente cuanto menos abundantes sean las sustancias nutritivas en el agua. Además, la adsorción a partículas detríticas también ofrece una protección frente a sustancias tóxicas e inhibitorias y frente a la luz solar. Por esto es frecuente encontrar un paralelismo entre la turbidez y la concentración bacteriana, lo que no quiere decir que un aumento o disminución de los residuos detríticos siempre tenga como consecuencia el incremento o reducción de la población bacteriana. En general, los aumentos de la turbidez que van acompañados de una elevación considerable del número de bacterias, son atribuibles, al menos en parte, a un aumento de la materia orgánica en suspensión; pero si la concentración bacteriana varía muy poco, habrá que buscar las causas en un aumento de las sustancias inorgánicas. Puede decirse que la turbidez tiene una influencia indirecta; su efecto depende sobre todo del papel que desempeñen otros factores como la luz y la concentración de nutrientes.

La proporción de microorganismos que crece sobre los detritos respecto al total de la microflora puede ser muy variable. Mientras que en aguas claras el porcentaje medio suele ser bastante bajo, en las aguas turbias éste puede llegar a ser muy elevado, incluso superior al 90%.

pH

El valor del pH influye poderosamente sobre el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de las bacterias se desarrollan únicamente dentro del margen de pH comprendido entre 4 y 9, fluctuando el óptimo entre 6,5 y 8,5, valores que predominan en casi todos los medios acuáticos estudiados, estando en muchos lagos y embalses en torno a 7. Durante la época de floración del plancton el pH puede aumentar notablemente, pudiendo llegar en lagos eutróficos a 9,5 ó 10. Esto repercute lógicamente sobre la composición de las poblaciones bacterianas (Klein y Alexander, 1986). Al producirse la descomposición de algunas algas, tiene lugar un descenso del pH por los ácidos presentes en sus jugos celulares. En diversos medios naturales se ha observado que durante esta descomposición se producía un incremento en el número de levaduras relacionado con un descenso del pH (Rheinheimer, 1987).

Aunque el pH óptimo de crecimiento para muchas bacterias esté alrededor de 7, algunos autores (Granai y Sjogren, 1981; Sjogren y Gibson, 1981) han observado en estudios realizados con *Enterobacter*, *E. coli* y otras enterobacterias, que la supervivencia es mucho mayor cuando

el valor del pH del agua desciende a valores en torno a 5,5. Esto lo atribuyen a que estos valores de pH, unidos a temperaturas bajas y a la presencia de iones tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} , favorecen la utilización de componentes celulares internos.

Grandes variaciones en la concentración de hidrogeniones provocan alteraciones fisiológicas y, no raramente, también morfológicas. Algunos microorganismos pueden producir formas de involución, las células normalmente aumentan de tamaño y pueden formar ramificaciones.

Concentración salina

El nivel de concentración salina determina muy especialmente las comunidades biológicas que pueblan las aguas. La proporción relativamente alta de NaCl del agua de mar hace que los organismos de agua dulce y salada sean fisiológicamente distintos. La mayoría de los microorganismos que viven en lagos y ríos limpios son más o menos halófilos y no pueden desarrollarse en las aguas que contengan una concentración salina superior al 10‰. Sólo un número relativamente limitado de ellos son halotolerantes. Estos se encuentran en mayor o menor número en casi todas las aguas continentales, pero abundan particularmente en las aguas residuales urbanas y en los ríos y lagos muy contaminados. En cambio, la inmensa mayoría de las bacterias y hongos que viven en el mar son halófilos.

Existen numerosos estudios sobre el efecto tóxico del agua de mar sobre bacterias entéricas que indican que, incluso en ausencia de microbiota natural, hay un marcado descenso en el número de bacterias entéricas después de su introducción en agua de mar y durante los periodos de incubación (Munro *et al.*, 1987; Rhodes *et al.*, 1983). Otros autores proponen que este efecto se debe a su menor capacidad para competir por los nutrientes con microorganismos marinos autóctonos (Enzinger y Cooper, 1976). Sin embargo, no todas las bacterias entéricas muestran una respuesta igual al ser introducidas en agua de mar; Morifigo *et al.* (1990) encontraron que la supervivencia de *E. coli* era mayor que la de *E. faecalis* cuando ambos eran introducidos en agua de mar, y que los daños subletales eran mayores en el segundo. También observaron que la viabilidad de *Salmonella* spp. era similar a la de *E. coli*.

Concentraciones salinas que se aparten mucho de la óptima, producen un aumento del tiempo de generación y muchas veces llevan consigo la aparición de alteraciones morfológicas y fisiológicas. Las bacterias pueden llegar a ser no cultivables (o no recuperables) en medios de

laboratorio (García-Lara *et al.*, 1991; Roszak *et al.*, 1984; Xu *et al.*, 1982), aunque permanezcan viables (Singleton *et al.*, 1982) y en algunos casos se ha observado que mantienen su virulencia (Grimes y Colwell, 1986). El aumento de la concentración de sal perturba el mecanismo normal de reproducción; las células se alargan pero dejan de dividirse, pudiendo llegar a formarse filamentos. Muchas bacterias marinas, aunque no todas, se destruyen por lisis al pasarlas a agua dulce.

Sustancias inorgánicas

Dentro de las sustancias inorgánicas que influyen sobre la vida de los microorganismos en las aguas corresponde un papel importante a los compuestos inorgánicos de nitrógeno y fósforo, elementos limitantes en la mayoría de los sistemas acuáticos (Currie y Kalff, 1984; Wetzel, 1983).

En los lagos y embalses oligotróficos a veces apenas son detectables el ión amonio, los nitritos, los nitratos y los fosfatos porque el fitoplancton los fija inmediatamente después de su liberación. En estas condiciones se puede producir una competencia entre las bacterias y las algas planctónicas. En la zona fótica, en las regiones de clima templado, se producen grandes oscilaciones estacionales en las concentraciones de compuestos nitrogenados y fosforados; suele haber mayores cantidades al final del otoño y en invierno, para descender bruscamente al inicio de la primavera a consecuencia del desarrollo del fitoplancton.

Las demás sustancias inorgánicas necesarias para la vida de los microorganismos existen en cantidad suficiente en la mayoría de las aguas. Los oligoelementos, como el hierro y el cobalto, son imprescindibles, aunque a concentraciones muy bajas, como componentes de importantes enzimas.

También existen numerosos compuestos inorgánicos que producen inhibición bacteriana, muchas de cuyas identidades no se conocen aún (Klein y Alexander, 1986). Los metales pesados pueden ser perjudiciales para la vida en las aguas, porque algunos de ellos son tóxicos para muchos microorganismos, aún a concentraciones relativamente bajas (Klein y Alexander, 1986). No es raro que el cobre y el mercurio, vehiculizados por las aguas residuales y los desechos industriales, lleguen a los ríos, lagos, embalses y zonas costeras, destruyendo totalmente las comunidades biológicas naturales. Su poder tóxico reside en su capacidad para fijar los grupos sulfhidrilos (SH-) de las enzimas.

Los cianuros, presentes ocasionalmente en nuestras aguas, aniquilan también a animales y plantas. El grupo CN- bloquea la citocromo-oxidasa al fijar el hierro; por eso es un veneno respiratorio muy activo (Rheinheimer, 1987).

Sustancias orgánicas

Las sustancias orgánicas en suspensión y disueltas en el agua tienen importancia principalmente en la nutrición de los microorganismos heterótrofos y como fuente de energía (LeChevallier *et al.*, 1991). De la concentración de materia orgánica depende en gran parte el volumen de las poblaciones de bacterias y hongos en las aguas (Fry y Zia, 1982), pudiendo ésta diferir mucho de unos lagos y embalses a otros, encontrándose en mayor concentración en los lagos eutróficos y en los ríos contaminados. Suele existir una correlación positiva entre la cantidad de microorganismos y la concentración de compuestos orgánicos, pero como se puede observar en el siguiente cuadro, no es tan decisiva la cantidad total de estas sustancias como la proporción de las que son fácilmente asimilables por los microorganismos, que constituyen sólo una parte que puede oscilar entre el 0.1% y el 9% del carbono orgánico disuelto total (LeChevallier *et al.*, 1991; Rheinheimer, 1987).

Tipo de lago	Sustancia orgánica mg de O ₂ por litro		Número total de bacterias por ml
	Cantidad total	Cantidad asimilable	
Oligotrófico A	15,0	0,3	1,70 10 ⁵
Oligotrófico B	15,3	0,5	1,30 10 ⁵
Mesotrófico A	-	1,43	3,42 10 ⁵
Mesotrófico B	-	3,03	1,64 10 ⁶
Eutrófico A	32,1	3,06	2,23 10 ⁶
Eutrófico B	33,7	5,16	3,42 10 ⁶
Distrófico	226,6	3,96	2,32 10 ⁶

(Rheinheimer, 1987).

La composición de la materia orgánica disuelta va a influir también, de una manera decisiva, sobre la distribución específica de las poblaciones de bacterias y hongos en las aguas. De la materia orgánica disuelta la mayor proporción suele corresponder a los hidratos de carbono, que pueden constituir alrededor de un 85%, predominando entre ellos los combinados respecto a los libres. Se supone que la escasa concentración de carbohidratos libres es atribuible a la intensa actividad microbiológica (Rheinheimer, 1987)

Si existe deficiencia de principios nutritivos orgánicos, las bacterias siguen multiplicándose pero apenas pueden crecer, por lo que se encontrará una gran proporción de células cocoides diminutas (Kjelleberg *et al.*, 1983; Mårdén *et al.*, 1985). Fry y Zia (1982) citan esta disminución de volumen como una estrategia de resistencia, disminuyendo el "turn-over" celular y el intercambio con el medio. Si la concentración es aún menor, se puede producir la muerte de algunas especies. Sinclair y Alexander (1984) observan una rápida desaparición de *Streptococcus* en ambientes pobres en nutrientes. En general, algunos autores afirman que las bacterias entéricas parece que son incapaces de competir adecuadamente con la microflora natural a las bajas concentraciones de nutrientes existentes en muchos medios acuáticos naturales (Burton *et al.*, 1987; Gerba y McLeod, 1976; Goyal y Adams, 1984). Algunos estudios realizados con *E. coli* y otras bacterias entéricas han demostrado que, bajo condiciones de inanición, se produce una evolución hacia un estado no cultivable, aunque las bacterias permanecen viables y en algunos casos capaces de producir procesos patológicos en animales de laboratorio (Munro *et al.*, 1987; Roszak *et al.*, 1984; Tamplin y Colwell, 1986; Xu *et al.*, 1982). Bajo estas condiciones de falta de alimento se pueden producir modificaciones fisiológicas más o menos intensas. Entre éstas se incluyen la pérdida de algunas características metabólicas y el aumento de otras actividades celulares (Munro *et al.*, 1987), la variación de la sensibilidad a metales pesados, bacteriófagos, antibióticos y colicinas (Chai, 1983; Munro *et al.*, 1987) y algunas alteraciones de las envueltas celulares (Munro *et al.*, 1987; Zaské *et al.*, 1980).

Otras especies, como *Pseudomonas*, son más resistentes a la inanición y pueden sobrevivir, manteniéndose en gran número durante días, en ambientes pobres en nutrientes, incluso en tampón fosfato (Sinclair y Alexander, 1984). No obstante, la resistencia a la inanición es una condición necesaria pero no suficiente para la supervivencia de especies en ambientes pobres en nutrientes o de especies que no compiten bien por los aportes limitados de nutrientes, porque entran en juego todos los demás factores (Sinclair y Alexander, 1984). La viabilidad prolongada depende de la regulación del metabolismo endógeno. En ausencia de sustratos exógenos, son metabolizados constituyentes intracelulares (aminoácidos, proteínas, RNA), lo que aumenta la capacidad de supervivencia de la célula (Granai y Sjogren, 1981; Jones y Rhodes-Roberts, 1981; Sjogren y Gibson, 1981).

De acuerdo con los parámetros de crecimiento hay dos grupos de microorganismos: uno, constituido por los que poseen capacidad para desarrollarse en los medios con una concentración muy baja de principios nutritivos, por lo que están adaptados a las condiciones que imperan en las aguas oligotróficas continentales, y otro, formado por los microorganismos adaptados a las

altas concentraciones de nutrientes, que se dan, por ejemplo, en las aguas eutróficas y en los sedimentos ricos en las mencionadas sustancias. Las bacterias pertenecientes al último grupo permanecen inactivas, en gran parte, en las aguas oligotróficas, pero pueden sobrevivir en ellas.

Los microorganismos que pueblan las aguas, están supeditados también, en mayor o menor medida, a los productos metabólicos de los animales y plantas presentes en ellas en una cuantía diversa (Sinclair y Alexander, 1984). Los productos extracelulares de las algas son utilizados por numerosos microorganismos (Bell, 1983; Brock y Clyne, 1984; Daft y Fallowfield, 1977; Fallon y Brock, 1979; Lovell y Konopka, 1985 b, c, d; Murray *et al.*, 1986, 1987; Stock y Ward, 1989) y las propias algas también se pueden convertir en fuente de nutrientes al morir (Daft y Fallowfield, 1977; Stock y Ward, 1989). Las bacterias heterótrofas han sido reconocidas como importantes componentes en el funcionamiento de ecosistemas acuáticos, utilizando una parte significativa de la materia orgánica formada por los productores primarios (Azam *et al.*, 1983; Ducklow *et al.*, 1982; Fuhrman y Azam, 1980; Griffith y Fletcher, 1990; Servais *et al.*, 1985; Zinabu y Taylor, 1989 a), aunque en proporciones muy diversas dependiendo de su composición y de la influencia de otros factores (Albright y McCrae, 1987). Así Bell y Kuparinen (1984) observaron en el lago Erken (Suecia), que había una utilización bacteriana relativamente baja de productos carbonatados algales, debido a las bajas temperaturas y al elevado peso molecular de los mismos. Lovell y Konopka (1985 b) advirtieron que el aumento de la producción primaria iba seguido de un aumento de la producción bacteriana. McFeters *et al.* (1978 a,b) observaron que existía una relación simbiótica entre bacterias indicadoras y patógenas y comunidades de algas en agua dulce oligotrófica. Nagata (1984) cita que la biomasa bacteriana está controlada por el fitoplancton, mediante la incorporación por parte de las bacterias de productos algales extracelulares. Zinabu y Taylor (1989 a) observaron una correlación positiva entre la producción primaria, la concentración de clorofila a y la abundancia y la biomasa bacterianas, sobre todo en las muestras de la zona fótica.

Parece ser que la supervivencia de bacterias entéricas es mayor en sedimentos, hecho que algunos autores atribuyen a una mayor concentración de materia orgánica en ellos (Burton *et al.*, 1987; Gerba y McLeod, 1976; Goyal y Adams, 1984).

Pero, como veremos más adelante, hay que tener en cuenta que estos productos no sólo tienen gran interés como principios nutritivos, que por tanto favorecen el crecimiento microbiano, sino que también pueden ser sustancias inhibidoras, pudiendo actuar sobre algunas especies o sobre grupos enteros de microorganismos. En ambientes acuáticos naturales existe

gran cantidad de compuestos orgánicos que producen inhibición bacteriana y de muchos de ellos no se conoce aún la identidad (Klein y Alexander, 1986; Sinclair y Alexander, 1984).

Gases disueltos

En las aguas hay también pequeñas cantidades de gases disueltos que pueden ejercer una influencia muy considerable sobre la vida de los microorganismos. Son principalmente oxígeno, CO₂ y nitrógeno, pero, en determinadas ocasiones, hay que señalar también la presencia de SH₂ y CO. La solubilidad de todos ellos disminuye al aumentar la temperatura y es mayor en el agua dulce que en la del mar.

El oxígeno, el dióxido de carbono y el nitrógeno están pasando constantemente del aire al agua, hasta que se satura la capa superficial de ésta, la única que puede realizar este intercambio con el aire. Además todos estos gases disueltos pueden formarse en el agua en virtud de distintos procesos bioquímicos.

En las aguas vamos a encontrar principalmente microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Pero en el hipolimnion y sedimento anóxicos de algunos lagos y embalses eutróficos van a desempeñar un papel importante los anaerobios estrictos.

El SH₂ es estable únicamente en medio anaerobio, donde puede aumentar su concentración gracias a la actividad microbiana. Es un veneno respiratorio por fijar el hierro de la citocromo-oxidasa. Su efecto es mortal para todos los organismos que poseen esta enzima al final de la cadena respiratoria. Por lo tanto la presencia de SH₂ tiene siempre como consecuencia la alteración total de la biocenosis, ya que van a desaparecer todos los seres vivos superiores y la mayoría de los microorganismos, desarrollándose en su lugar algunos microorganismos que lo toleran y otros que lo utilizan como fuente de energía (sulfobacterias quimioautótrofas) o como donador de H₂ (sulfobacterias púrpura y clorobacterias).

1.3. INFLUENCIA DE LOS FACTORES BIOLÓGICOS

Además de los factores físicos y químicos, hay otros de naturaleza biológica que producen también efectos sobre los microorganismos de las aguas. Pero los factores bióticos son mucho

menos conocidos que los abióticos porque su determinación resulta, casi siempre, mucho más difícil (Flint, 1987)

Competencia alimentaria

La competencia alimentaria desempeña un papel importante en todos los biotopos e influye decisivamente sobre la composición de la microflora (Awong *et al.*, 1990; Jannasch, 1968). Acaban por imponerse los microorganismos que alcanzan con mayor rapidez los nutrientes disponibles. En general, los alóctonos pueden competir difícilmente con los autóctonos, a los bajos niveles de nutrientes existentes en los medios acuáticos naturales poco contaminados (Cornax *et al.*, 1990; Rhodes y Kator, 1988; Sinclair y Alexander, 1984), y esto se ha demostrado como un factor que contribuye a la muerte de estas bacterias alóctonas entre las que se encuentran las entéricas (McCambridge y McMeekin, 1980 a, 1981; Rhodes y Kator, 1988; Sinclair y Alexander; 1984). Sinclair y Alexander (1984) observaron una rápida disminución de *Streptococcus* en aguas residuales en las que, aunque existe una concentración alta de nutrientes orgánicos, hay una intensa competición por los mismos.

Pero no todos los seres que consumen los mismos alimentos compiten entre sí; algunas sustancias sólo pueden ser utilizadas cuando existe una cooperación entre varias especies. La competencia alimentaria carece de importancia cuando concurren condiciones extremas; por ejemplo, en aguas con valores extremos de temperatura, concentración salina o pH, sólo algunas especies son capaces de utilizar los alimentos disponibles.

Cooperación entre microorganismos

Es frecuente observar cooperación entre diversos microorganismos en relación con la alimentación y el crecimiento. Por ejemplo, en cultivos puros y libres de bacterias, se obtiene una tasa de crecimiento baja de *Oscillatoria redekei*, debido a que, en condiciones normales de crecimiento, se liberan algunas sustancias, principalmente compuestos nitrogenados, que a concentraciones elevadas inhiben su crecimiento. Sin embargo, si en el medio existen bacterias que utilicen estos compuestos, la tasa de crecimiento es claramente más alta.

También es frecuente observar una cooperación entre microorganismos en la degradación de sustancias difícilmente atacables. Al desarrollo de microorganismos que disponen de sistemas enzimáticos capaces de desdoblar estas sustancias, le sigue el de otros que utilizan los productos

de esta escisión, lo que sirve para evitar que se acumulen productos tóxicos del metabolismo.

Predación

Hay gran número de seres vivos que se alimentan de microorganismos y por tanto pueden hacer que varíe notablemente la microflora de las aguas. Para que éstos constituyan una base importante como factores de nutrición es preciso que su número sea suficientemente elevado, como ocurre en aguas contaminadas (Klein y Alexander, 1986).

La predación por protozoos es importante en la dinámica de los sistemas acuáticos, por la regeneración de grandes cantidades de nutrientes y por la transferencia de energía a niveles tróficos superiores (Azam *et al.*, 1983; Jürgens y Güde, 1991); por tanto, los protozoos constituyen un eslabón en la cadena alimentaria, de la que son importantes miembros (Fenchel, 1982 b; Porter *et al.*, 1985; Rivier *et al.*, 1985; Watson *et al.*, 1981). Es, además, un importante factor de eliminación de bacterias, tanto autóctonas como alóctonas, en algunos sistemas acuáticos y terrestres (Cornax *et al.*, 1990; Enzinger y Cooper, 1976; Klein y Alexander, 1986; Mallory *et al.*, 1983; McCambridge y McMeekin, 1979, 1980 a, 1981; McManus y Furman, 1988; Nagata, 1984; Pace, 1988). Algunos estudios muestran la predación por protozoos como el factor más importante en la desaparición de *E. coli* en agua de mar (McCambridge y McMeekin, 1979, 1980 a), aunque otros autores sugieren que esto es debido a que las propiedades físicas y químicas de las aguas marinas afectan la capacidad de las bacterias entéricas para competir con los microorganismos autóctonos (Enzinger y Cooper, 1976).

La mayoría de los protozoos se alimentan de bacterias, al menos parcialmente. Algunos autores citan que los protozoos en el mar parecen utilizar bacterias como principal fuente de alimento, principalmente los flagelados (Bjørnsen *et al.*, 1986; Fenchel, 1982 a; García-Lara *et al.*, 1991; González *et al.*, 1990 b; Rassoulzadegan y Sheldon, 1986; Sherr *et al.*, 1987; Sibbald y Albright, 1988; Wikner *et al.*, 1986; Wright y Coffin, 1984), por lo que pueden ejercer un importante control sobre el desarrollo de las poblaciones bacterianas (Andersen y Fenchel, 1985; Andersen y Sørensen, 1986; Fenchel, 1982 b; Rassoulzadegan y Sheldon, 1986; Rivier *et al.*, 1985). Sin embargo, su importancia en agua dulce no está todavía bien comprendida (Bjørnsen *et al.*, 1986), pero no se consideran el único factor determinante (Seale *et al.*, 1990). Respecto a los ciliados, varios autores aseguran que suelen estar restringidos a ambientes ricos en bacterias, por lo que es improbable que en aguas abiertas sean responsables del control de las poblaciones bacterianas (Andersen y Sørensen, 1986; Fenchel, 1980 a, c). Algunos autores citan

la predación como uno de los factores que influyen en la desaparición de "blooms" producidos por cianobacterias (Daft *et al.*, 1985 a; Daft y Fallowfield, 1977; Fallon y Brock, 1980).

La tasa de consumo depende de varios factores, entre los que se pueden destacar los siguientes:

- Tipo de protozoo y estado de crecimiento (Fenchel, 1980 b, c, 1982 b; Sherr *et al.*, 1988).
- La concentración de bacterias (Fenchel, 1980 a, b, c, 1982 b; Pedrós-Alió y Brock, 1983 b; Rivier *et al.*, 1985; Sherr *et al.*, 1983). Algunos autores sugieren que la persistencia de determinadas especies bacterianas puede ser el resultado de una densidad de supervivencia demasiado baja para soportar la predación (Klein y Alexander, 1986; Sinclair y Alexander, 1984; Watson *et al.*, 1981).
- El tamaño de las bacterias. Algunos autores han observado que los protozoos bacterívoros, tanto flagelados como ciliados, ingieren preferiblemente las células bacterianas más grandes en una población mixta (González *et al.*, 1990 b). En algunos casos se ha observado que la predación está favorecida si las bacterias forman microagregados o si se concentran en interfases (Rivier *et al.*, 1985).
- La especie bacteriana. Algunos autores han observado que los protozoos bacterívoros no consumen necesariamente bacterias de diferentes especies con igual eficiencia (Mitchell *et al.*, 1988). Gurijala y Alexander (1990) sugieren que las bacterias con superficies celulares más hidrofóbicas son más resistentes a la predación, quizás por su adsorción sobre material particulado
- Otros factores como la temperatura del agua (Caron *et al.*, 1986; McCambridge y McMeekin, 1980 b; Sherr *et al.*, 1983, 1988) o la luz que puede estimular la actividad predatoria de algunos protozoos, como por ejemplo *Vexillifera*, una ameba predatoria de *E. coli* que aumenta su locomoción y su actividad alimentaria en presencia de radiación solar (Rhodes y Kator, 1990).

La predación puede ser también importante desde otro punto de vista. King *et al.* (1988) mostraron que las bacterias ingeridas por protozoos podían resistir la digestión y demostraron la supervivencia diferencial de bacterias dentro de protozoos durante la cloración; estas bacterias no digeridas pueden ser expelidas después de un tiempo. González *et al.* (1990 a) también observaron tasas de digestión distintas según la especie bacteriana de que se trate.

Muchos metazoos se alimentan también de bacterias, hongos y fitoplancton en mayor o menor medida. Tanto rotíferos como pequeños crustáceos son consumidores importantes de fitoplancton y bacterioplancton (Lair, 1991 a, b; Nagata, 1985), siendo su presión predatoria sobre el fitoplancton normalmente mayor en lagos oligotróficos que en eutróficos (Lair, 1991 b). La intensa actividad predatoria de los rotíferos puede ser un factor importante que influya sobre la sucesión estacional de las comunidades planctónicas (Lair y Ali, 1990). Los microorganismos pueden ser también importantes para la alimentación de anélidos y de larvas de insectos que viven en los ríos y lagos. Las bacterias pueden desempeñar un papel importante en la alimentación de copépodos y de las larvas de langostas.

Infección

La presencia de bacteriófagos se ha comprobado tanto en las aguas continentales como en el mar y se ha sugerido que juegan un papel significativo en la mortalidad bacteriana (García-Lara *et al.*, 1991), aunque para otros autores no son un factor principal en la regulación de las densidades bacterianas (Sanders y Porter, 1986). Son particularmente abundantes en las aguas residuales (Hicks y Rowbury, 1987), debido a que en ellas las densidades bacterianas son mayores (Klein y Alexander, 1986; Wiggins y Alexander, 1985). De allí se aíslan con frecuencia colifagos, así como bacteriófagos que infectan a bacterias patógenas para el hombre como *Salmonella* y *Shigella*. Se han encontrado también algunos especializados en bacterias autóctonas de las aguas. También existen actinofagos que atacan a los actinomicetos y parecen tener una especificidad muy acusada. Los cianofagos, cuyos organismos hospedadores son las cianobacterias, desempeñan a menudo un papel en la desaparición repentina de sus florecimientos en lagos y embalses eutróficos (Daft *et al.*, 1985 b; Fallon y Brock, 1980).

En las aguas, tanto dulces como saladas, se encuentra también un parásito estricto de bacterias: *Bdellovibrio*. Es una bacteria pequeña, en forma de coma, Gram negativa, que infecta a otras bacterias Gram negativas. Se han descrito tres especies: *B. bacteriovorus*, *B. starrii* y *B. stalpii*. Lo mismo que los bacteriófagos, se encuentra especialmente en aguas contaminadas, en las que la concentración bacteriana es alta. No existe acuerdo sobre su papel en el control de la dinámica de las poblaciones bacterianas. Aunque es más probable que su acción sea más importante en agrupaciones de bacterias en interfases o sobre partículas, Sanders y Porter (1986) observaron que no era un factor principal en la regulación de las densidades bacterianas.

Sustancias inhibidoras

Se ha comprobado la existencia de sustancias con acción bactericida en aguas continentales y de mar producidas principalmente por algas. Si existen florecimientos de fitoplancton pueden alcanzar concentraciones efectivas, por lo que éstos pueden ir acompañados de un acusado descenso del número de bacterias saprofitas (Klein y Alexander, 1986). Albright *et al.* (1986) y Cooper *et al.* (1985) observaron en cultivos de distintas algas, entre las que se encontraba *Skeletonema costatum*, que las sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano se producían en concentraciones particularmente altas cuando las algas se encontraban hacia el final del crecimiento exponencial.

Los antibióticos, producidos por actinomicetos y hongos, también pueden ejercer ocasionalmente influencia sobre la microflora en áreas muy limitadas, principalmente en los sedimentos, en plantas y animales muertos y en partículas en suspensión; pero, por regla general, no tienen influencia sobre los microorganismos que están libres en las aguas.

Muchas cianobacterias pueden liberar también sustancias que inhiben a otras especies, y no sólo pueden actuar sobre bacterias, sino que en ocasiones hay florecimientos de cianobacterias que producen la muerte de peces y también procesos patológicos en bañistas.

Son importantes también las bacteriocinas, proteínas antibacterianas producidas por bacterias; dentro de éstas se encuentran las colicinas, activas frente a coliformes (Hardy, 1982). Se ha implicado a sustancias tipo bacteriocinas en la disminución de coliformes en sistemas de distribución de agua potable (Means y Olson, 1981).

1.4. ADHESION MICROBIANA A SUPERFICIES

Los ambientes naturales contienen un gran número de superficies potencialmente disponibles para la adhesión y colonización por microorganismos (Breznak, 1984; van Loosdrecht *et al.*, 1990). Así, en estudios de ecología microbiana en habitats acuáticos se observa frecuentemente adhesión de bacterias a partículas o, en general, a interfases (Characklis, 1984; Hoppe, 1984). La naturaleza de estas partículas es muy variada; pueden ser orgánicas, inorgánicas, artificiales, de animales y plantas vivos o muertos (Beech y Gaylarde, 1989; Breznak, 1984; Costerton y Cheng, 1982; Gordon, 1987; Vanhaecke *et al.*, 1990). Aunque las superficies proporcionan comúnmente un lugar para la adhesión de bacterias acuáticas, exámenes microscópicos revelan que no todas las partículas en algunos biotopos acuáticos están colonizadas. En estos ambientes naturales sólo una parte de las partículas presentes está normalmente colonizada por bacterias en un grado considerable. Por otra parte las determinaciones de los porcentajes de células que se encuentran adheridas, muestran grandes discrepancias; mientras que para algunos autores las bacterias adheridas exceden en número a las libres (Costerton y Geesey, 1979 a; Geesey *et al.*, 1978), para otros es al contrario (Clarke y Joint, 1986; Harvey y George, 1987; Iriberry *et al.*, 1987, 1990 a, b; Yoon y Rosson, 1990), aunque sí parece existir un acuerdo sobre que en agua de mar predominan las bacterias libres, mientras que en agua dulce y de estuario la proporción de adheridas es variable, pudiendo llegar a ser más significativa (Bell y Albright, 1982; Goulder, 1977; Iriberry, 1990 b). Parece que el número y la naturaleza de las partículas y sus capacidades de adsorción son decisivas sobre la adhesión (Hoppe, 1984; Iriberry *et al.*, 1987). Muchas partículas e interfases no proporcionan las condiciones necesarias para la competición con éxito de las bacterias adheridas con las libres. También es importante la composición de la población microbiana dominante, porque bacterias bien adaptadas a bajas concentraciones de nutrientes en el agua no se beneficiarán significativamente de la vida en adhesión (Hoppe, 1984).

1.4.1. RAZONES QUE JUSTIFICAN LA ADHESION

La tendencia microbiana a la adhesión se ha explicado por distintas razones que suponen una serie de ventajas, importantes desde el punto de vista ecológico, para las bacterias que se encuentran adheridas a partículas (Costerton y Cheng, 1982)

- Altas concentraciones de nutrientes en las superficies

El material orgánico adsorbido a las partículas crea una acumulación local de posibles nutrientes de los que las células podrían beneficiarse. Esta adsorción de nutrientes puede hacer de las partículas un ambiente más rico nutricionalmente para los microorganismos, lo que hace que esta localización parezca ideal para el crecimiento bacteriano (Costerton y Cheng, 1982; DeFlann *et al.*, 1990; Fletcher, 1980 b, 1984; Gouldey, 1977; Hendricks, 1974; Kjelleberg *et al.*, 1982; Pedrós-Alió y Brock, 1983 a; Pringle y Fletcher, 1983). Además parece ser que las bacterias adheridas pueden ver aumentada su capacidad para usar también como nutrientes compuestos no cargados, de bajo peso molecular, que pueden no acumularse en las superficies (Breznak, 1984).

- Mantenimiento de unas condiciones nutricionales favorables

La superficie colonizada puede proporcionar, no solamente altas concentraciones de nutrientes, sino el mantenimiento de estas ventajas nutricionales. En algunos casos la propia superficie es "comestible"; las partículas colonizadas por las bacterias son frecuentemente orgánicas, en muchos casos pueden ser identificadas como restos de algas o bolas fecales de zooplancton (Pedrós-Alió y Brock, 1983 a). Otro caso es el de la adhesión a superficies vegetales, que no sólo servirán como una superficie de adhesión y de concentración de nutrientes disueltos, sino que además podrán actuar como sustrato o fuente de nutrientes por su biodegradación (Bobbie *et al.*, 1978) o por el aprovechamiento de sus exudados orgánicos (Costerton y Cheng, 1982)

Muchas veces se forman agregados de diferentes especies, bacterianas y no bacterianas, originándose un consorcio estratificado en ocasiones extraordinariamente complejo (Breznak, 1984; Costerton *et al.*, 1987; Gilbert *et al.*, 1989; Hirsch, 1984). En él las bacterias se podrán beneficiar de la materia orgánica disuelta liberada por las actividades de otras bacterias (Pedrós-Alió y Brock, 1983 a) y otros organismos adheridos (Stock y Ward, 1989). Se pueden formar, incluso, micronichos que permitirían a bacterias anaerobias como, por ejemplo, las sulfato-reductoras, obtener anaerobiosis incluso en un agua rica en oxígeno (Characklis, 1984; Costerton y Cheng, 1982; McFeters, 1984; White, 1984).

- Protección frente a factores adversos

La envoltura exopolisacárida externa protege a las bacterias, como veremos más adelante, frente a agentes externos físicos, químicos y biológicos y frente a las condiciones fluctuantes y a menudo estresantes del medio circundante (Cheng *et al.*, 1981; Fletcher, 1980 b, 1984; White, 1984). Se ha observado que la supervivencia de las bacterias mejora si éstas están adheridas a partículas (Breznak, 1984; Jeffrey y Paul, 1986 a, b; Silverman *et al.*, 1984).

1.4.2. MECANISMOS DE ADHESION

Una bacteria puede adherirse a una superficie sólida, básicamente de dos maneras:

Adhesión pasiva

La adhesión pasiva tiene lugar por un proceso espontáneo determinado por adsorción físico-química que no requiere actividad fisiológica por parte de la bacteria. Esta adhesión tiene lugar, por ejemplo, cuando las bacterias que se adhieren han muerto por radiación ultravioleta, calor o formaldehído (Fletcher, 1980 a, 1983, 1987; Paul, 1984).

Bajo este punto de vista la adhesión de una bacteria a una superficie sólida depende de las fuerzas de atracción entre las dos superficies (Rutter y Vincent, 1980, 1984). Al mismo tiempo pueden tener lugar fuerzas de repulsión que pueden contrarrestar la interacción de atracción o incluso inhibir la adhesión. Estas fuerzas físico-químicas de atracción y repulsión incluyen (McEldowney y Fletcher, 1986 b):

- fuerzas de largo alcance: interacciones electrostáticas
fuerzas de van der Waals
- fuerzas de corto alcance: interacción dipolo-dipolo
enlace químico (electrostático, covalente, puente de hidrógeno)
interacciones hidrofóbicas

La mayoría de las bacterias tienen una carga neta negativa como la mayoría de las superficies sólidas (McEldowney y Fletcher, 1986 b; Wardell, 1988), por tanto la repulsión electrostática entre superficies de igual carga tenderá a evitar una estrecha aproximación entre superficies (Rutter y Vincent, 1984). Si la repulsión es lo suficientemente fuerte, no tendrá lugar la

adhesión. Que la repulsión evite así la adhesión depende del balance entre fuerzas opuestas de atracción y repulsión (Marshall *et al.*, 1971; Rutter y Vincent, 1984).

Algunos autores sugieren que la adhesión se produce por este mecanismo por diversos motivos. La influencia de los cationes sobre la adhesión se puede explicar en términos de efectos electrostáticos y por una disminución del grosor de la doble capa eléctrica (Marshall *et al.*, 1971). La presencia de sustancias orgánicas disueltas en el medio también puede inhibir la adhesión bacteriana (Fletcher, 1976; Fletcher y Loeb, 1979; Marshall *et al.*, 1971) por la adsorción de la sustancia sobre la superficie, haciéndola menos favorable para la adhesión microbiana a través de efectos estéricos o por afectar la hidratación de la superficie, convirtiendo una superficie favorable en una desfavorable (Fletcher y Loeb, 1979).

Adhesión activa

La adhesión activa es la que tiene lugar por contribución fisiológica de las bacterias. En ocasiones la adhesión es un proceso dependiente del tiempo (Busscher *et al.*, 1986; Fletcher y Marshall, 1982 b; Marshall, 1980; Marshall *et al.*, 1971; McEldowney y Fletcher, 1988 b), en el que durante la fase inicial las bacterias pueden ser fácilmente lavadas de la superficie, pero después se vuelven firmemente adheridas y resisten el lavado (Fletcher, 1983; Marshall, 1980; Marshall *et al.*, 1971; Rutter, 1984). Estas dos etapas se han descrito como adhesión reversible e irreversible (Marshall *et al.*, 1971) y se cree que la adhesión firme depende de un adhesivo extracelular polimérico que une la bacteria a la superficie (Fletcher, 1983; Iman *et al.*, 1984; Marshall, 1980; McEldowney y Fletcher, 1988 b; Pedrós-Alió y Brock, 1983 a; Rutter, 1984). Algunos estudios han encontrado que ciertos inhibidores metabólicos, incluidos antibióticos e inhibidores de la síntesis de proteínas, son efectivos en inhibir la adhesión (Fletcher, 1980 a; Paul, 1984). Además se han descrito casos en los que las células bacterianas son capaces de responder ante la presencia de superficies, por ejemplo *Vibrio parahaemolyticus* induce la síntesis de flagelos laterales cuando entra en contacto con una superficie (Silverman *et al.*, 1984).

Pero en la mayoría de los estudios de adhesión bacteriana no ha sido posible dilucidar si la adhesión estaba determinada sólo por adsorción físico-química o dependía del metabolismo bacteriano. En muchos casos el proceso parece estar conforme con las predicciones físico-químicas; sin embargo cuando los resultados experimentales no están de acuerdo con las

predicciones teóricas, es probable que la fisiología de las bacterias o la complejidad química y estructural de sus superficies estén jugando un papel principal (Fletcher, 1987). Wardell (1988) afirma que la interacción inicial entre la célula bacteriana y la superficie es el resultado de fuerzas físico-químicas, principalmente fuerzas de atracción de van der Waals y fuerzas electrostáticas de repulsión, y que posteriormente están implicados adhesivos poliméricos.

Lo mismo sucede cuando se estudia el efecto de los distintos factores sobre la adhesión; es raramente posible confirmar si el factor analizado influye sobre la adhesión afectando a la físico-química del proceso, a la fisiología de la bacteria o a ambas (Fletcher, 1988). Además, la mayoría de los datos sobre los efectos de distintas variables, como los componentes del medio, son consistentes tanto con los mecanismos de adhesión pasiva como activa (Fletcher, 1980 a). Por ejemplo, Fletcher (1983) observó que el butanol inhibía la adhesión de *Pseudomonas* a placas Petri, pudiendo deberse esta acción a la adsorción del alcohol sobre la superficie de la placa, o a que las bacterias se volvían inmóviles, ya que en experimentos previos se había observado que la eliminación de flagelos disminuía la adhesión de esta bacteria (Fletcher, 1977, 1983). Otros alcoholes, sin embargo, aumentaban la adhesión probablemente debido a una modificación de la fisiología de la célula y/o de las características de la superficie bacteriana (Fletcher, 1983).

Estudios realizados con microscopía electrónica han demostrado que en la adhesión están implicados polímeros estructurales y que la mayoría de las comunidades adheridas están inmersas en una matriz estructural que mantiene unida al sustrato a la comunidad entera (Cheng *et al.*, 1981; Read y Costerton, 1987). La histoquímica ultraestructural ha mostrado que estos polímeros son en su mayor parte polisacáridos (Cheng *et al.*, 1981; Fletcher, 1987; Read y Costerton, 1987) que toman la forma de fibrillas o de material amorfo, que se extiende entre la célula y la superficie, o de matrices hidratadas tipo gel en las que están embebidas multicapas de células. Pero la microscopía no revela qué grupos específicos están implicados ni proporciona una información detallada acerca de la composición o conformación de estos polímeros. Aunque los polisacáridos parecen ser abundantes, otros polímeros, particularmente proteínas, parecen estar implicados en la interacción adhesiva (Fletcher, 1980 b, 1987; Robb, 1984).

Se ha intentado identificar y caracterizar los polímeros que actúan realmente como adhesivos mediante investigaciones bioquímicas, pero es difícil obtener suficiente polímero (Christensen *et al.*, 1985; Sutherland, 1980); en la mayoría de los casos éste se ha aislado del medio de cultivo lo que indica que estaría disociado de las células y sería soluble en agua, por

lo que Fletcher (1987) piensa que quizás no fueran auténticos polímeros adhesivos que, intuitivamente, cabría esperar que permanecieran asociados a las bacterias.

También se han realizado estudios mediante digestiones enzimáticas y tratamientos químicos disruptores, que han proporcionado datos numerosos y en ocasiones conflictivos. Es interesante que, a pesar de las fuertes indicaciones de que los polisacáridos son los implicados en la adhesión, las digestiones enzimáticas han tendido a demostrar que las proteasas son más efectivas, que las enzimas que degradan carbohidratos, en retirar a las bacterias de las superficies (Fletcher y Marshall, 1982 b; McEldowney y Fletcher, 1986 a; Paul y Jeffrey, 1985 a). Esto sugiere que las proteínas de la superficie bacteriana pueden ser importantes al menos en estabilizar las interacciones adhesivas, si no actúan como adhesivos reales (Fletcher, 1987; Robb, 1984). También se ha conseguido romper la adhesión por tratamientos con algunos compuestos químicos, por ejemplo, el peryodato, que degrada carbohidratos (Fletcher, 1980 b; McEldowney y Fletcher, 1986 a), por secuestradores de cationes y por surfactantes (McEldowney y Fletcher, 1986 a, b).

Puede ser que el tipo de polímero activo en la adhesión dependa de las propiedades del sustrato y por tanto de los tipos de interacciones posibles; así, sobre un sustrato hidrofóbico pueden ser activos los constituyentes lipídicos o los grupos no polares de los polisacáridos de la superficie bacteriana, mientras que sobre una superficie hidrofílica los adhesivos pueden ser los polisacáridos hidratados (Fletcher, 1987; Fletcher y Marshall, 1982 b; Paul y Jeffrey, 1985 a, b).

1.4.3. ACTIVIDAD DE LAS BACTERIAS ADHERIDAS

El efecto de la adhesión sobre la fisiología bacteriana se ha investigado comparando las actividades de las células adheridas con las de sus homólogas libres en la fase líquida (Breznak, 1984). Se ha sugerido en muchas investigaciones que la actividad fisiológica puede ser distinta en las bacterias adheridas y en las libres, y se cree que las bacterias asociadas a partículas son responsables a menudo de una fracción sustancial del metabolismo bacteriano en aguas en las que las partículas son abundantes (Edwards y Meyer, 1986; Griffith y Fletcher, 1990; Hollibaugh y Azam, 1983; Kirchman y Mitchell, 1982). Para detectar estas diferencias se han desarrollado numerosas técnicas: medida del crecimiento (Kjelleberg *et al.*, 1982, 1983), respiración (Bright y Fletcher, 1983 a, b; Gordon *et al.*, 1983), absorción de sustrato (Bright y Fletcher, 1983 a, b; Gordon *et al.*, 1983; Kirchman y Mitchell, 1982), producción de calor (Gordon *et al.*, 1983),

cambio de tamaño celular (Humphrey *et al.*, 1983; Kjelleberg *et al.*, 1982, 1983).

En cuanto a los resultados obtenidos no existe unanimidad. En muchos casos las poblaciones adheridas son más activas (Bright y Fletcher, 1983 a, b; Fletcher, 1986; Humphrey *et al.*, 1983; Jeffrey y Paul, 1986 a, b; Kjelleberg *et al.*, 1982, 1983; Ladd *et al.*, 1979; Murray *et al.*, 1987), mientras que en otros parecen ser más activas las no adheridas (Gordon *et al.*, 1983; Iriberry *et al.*, 1987). Cuando la actividad se expresa por célula, las bacterias asociadas a partículas son generalmente más activas metabólicamente que las bacterias no adheridas (Harvey y Young, 1980; Iriberry *et al.*, 1987; Kirchman y Mitchell, 1982; Paerl y Merkel, 1982). Harvey y Young (1980) utilizando sales de tetrazolio; concretamente el cloruro de 2-(paraiodofenil)-3-(paranitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT), estimaron que el 95% de las bacterias respiratoriamente activas estaban adheridas a partículas.

Es posible que estas diferencias estén relacionadas con variaciones en las interacciones entre el sustrato y la superficie y con el grado en el que el sustrato tienda a estar concentrado en la superficie por adsorción (Fletcher y Marshall, 1982 b; Griffith y Fletcher, 1991). Sustratos que se adsorben muy poco sobre la superficie de las partículas son hidrolizados en mayor grado por parte de las células no adheridas, mientras que las bacterias adheridas pueden tener un acceso reducido al sustrato debido a que éste está principalmente en solución. Niveles de adsorción relativamente bajos pueden presentarse con solutos de bajo peso molecular que tienden a mantenerse en un equilibrio de adsorción. Con sustratos que se adsorben sobre las superficies la situación es la contraria, debido, como sugieren algunos autores, a que la actividad enzimática está favorecida en la superficie, bien por facilitar el contacto entre la enzima y el sustrato o bien por permitir cambios conformacionales en el sustrato o en las enzimas que favorezcan la hidrólisis (Griffith y Fletcher, 1991). En ambientes naturales las superficies son rápidamente acondicionadas por compuestos orgánicos disueltos, la mayoría de alto peso molecular (Griffith y Fletcher, 1991), incluso en aguas relativamente pobres en materia orgánica (Hunter y Liss, 1982; Rutter, 1984). Sin embargo, en estos ambientes naturales existe una mezcla compleja de moléculas orgánicas, algunas de las cuales se adsorben más fácilmente que otras, con lo que el resultado neto de la adhesión bacteriana a partículas es extremadamente difícil de predecir (Griffith y Fletcher, 1991).

Si los experimentos se llevan a cabo a concentraciones de sustrato muy bajas, la mayor actividad resultante de las bacterias adheridas se debe a que son capaces de asimilar nutrientes escasos más fácilmente que las bacterias en suspensión, debido a que éstos se adsorben en la

interfase sólido-líquido y pueden ser accesibles sólo para las bacterias adheridas (Fletcher, 1984, 1986; Griffith y Fletcher, 1991; Kjelleberg *et al.*, 1982; Pedrós-Alió y Brock, 1983 a).

1.4.4. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA ADHESION

Se han realizado numerosos estudios para intentar probar los efectos de diferentes condiciones ambientales o fisiológicas sobre la adhesión, pero ha habido mucha variación en los resultados de estos estudios con respecto tanto a la capacidad de adhesión de diferentes especies, cepas o fenotipos bacterianos, como a la susceptibilidad de los mismos a factores modificantes (Fletcher, 1988). Sobre la adhesión bacteriana a superficies en un ambiente acuático pueden influir numerosos factores, que incluyen las propiedades de las superficies sólidas, de las propias bacterias y de la fase líquida.

- Tensión superficial o energía libre de superficie de la superficie sólida

La energía libre de superficie de una superficie sólida es un indicador de la idoneidad de esa superficie para la adhesión bacteriana, ya que indica la tendencia de un sustrato a tomar parte en distintos tipos de interacción espontáneamente (Fletcher y Marshall, 1982 a). Algunos autores encuentran que la colonización es mayor y más rápida en las superficies con una tensión superficial baja, es decir hidrofóbicas, como el poliestireno, que en las que tienen una tensión superficial relativamente alta, hidrofílicas, como el vidrio (Fletcher y Loeb, 1979; Paul y Loeb, 1983; Paul y Jeffrey, 1985 b; Pringle y Fletcher, 1983; 1986 a; Samuelsson y Kirchman, 1990). Sin embargo, otros autores afirman lo contrario, obteniendo una adhesión mayor y más firme, por tanto más difícil de interrumpir, a superficies hidrofílicas (Absolom *et al.*, 1983; Dexter *et al.*, 1975; McEldowney y Fletcher, 1986 a; Pedersen *et al.*, 1986). Otros no han encontrado diferencias significativas entre ambos tipos de sustratos, es decir, no encuentran una preferencia absoluta por parte de las bacterias por superficies hidrofílicas o hidrofóbicas (Baker, 1984; Fletcher, 1980 a; McEldowney y Fletcher, 1986 b; van Pelt *et al.*, 1985).

Existen algunas razones que pueden justificar estas discrepancias. En primer lugar las diferencias en las comunidades bacterianas utilizadas; Fletcher y Loeb (1979) utilizan un solo microorganismo, una especie marina de *Pseudomonas*, en agua estéril, mientras que Dexter y colaboradores (1975) realizan los experimentos con agua de mar natural. En ambientes naturales existe un gran número de distintos tipos de bacterias que colonizan superficies y,

cuando está presente esta variedad de colonizadores bacterianos, la importancia de la tensión superficial de la superficie se reduce, puesto que diferentes bacterias colonizan los diversos tipos de superficies (Baker, 1984). También pueden influir las distintas características de las superficies bacterianas, que varían enormemente de una especie o una cepa bacteriana a otra (Pedersen *et al.*, 1986; Pringle *et al.*, 1983) y los cambios en las características del sustrato debido a la adsorción de sustancias orgánicas que acondicionan su superficie cuando éste se encuentra sumergido (Pringle y Fletcher, 1983).

- **Rugosidad de la superficie**

Geesey y Costerton (1979) observan que las bacterias adheridas se concentran principalmente en grietas de detritus, mientras que las zonas planas se encuentran casi desprovistas de micropoblación adherida. Fletcher y Marshall (1982 b) afirman que las fuerzas de repulsión entre una superficie sólida y una bacteria, son menores al disminuir el radio de curvatura de las superficies que se aproximan; por lo tanto, puede ser más fácil para una bacteria entrar en contacto con ondulaciones de la superficie que con un plano completamente llano. Characklis (1984) afirma que la tasa de acumulación neta de bacterias es mayor en superficies rugosas por dos razones: primera, la desadhesión debida a fuerzas de arrastre estará reducida, puesto que las células están protegidas o resguardadas del flujo de la fase líquida, y segunda, estará disponible más superficie de sustrato para contacto con la célula.

Baker (1984) estudiando la adhesión a sustratos rugosos y lisos (portaobjetos de vidrio y trozos de placa Petri de poliestireno, rayados y sin rayar) encuentra que los rugosos son colonizados más y más rápidamente que los lisos. Pero esto no se debe ni a un aumento del área disponible para ser colonizada, ya que la cantidad en que aumenta el área no está directamente relacionada con el aumento del número de bacterias adheridas, ni a que las depresiones de las superficies rugosas puedan proporcionar un lugar más protegido y, por tanto, más favorable, puesto que las bacterias no se encuentran particularmente concentradas en las depresiones, sino uniformemente distribuidas en toda la superficie. El autor sugiere que las irregularidades de la superficie pueden servir como punto de anclaje de la matriz polisacarida extracelular o glicocálix.

- **Carga de la superficie**

Cuando un sólido se sumerge en un ambiente acuático, normalmente, adquiere una carga

superficial, bien por adsorción de iones o por la ionización de los grupos superficiales (Fletcher *et al.*, 1980). La carga de la superficie puede afectar a la concentración de iones y moléculas cargadas sobre la superficie sólida (Bright y Fletcher, 1983 a; Haack y McFeters, 1982).

- Características de las moléculas adsorbidas

Cuando una superficie sólida se sumerge en un medio acuático, se adsorben rápidamente sobre ella sustancias presentes en solución (Tosteson *et al.*, 1985). Las macromoléculas generalmente se adsorben de manera irreversible y así, tienden a enmascarar las propiedades superficiales originales (Fletcher *et al.*, 1980; McEldowney y Fletcher, 1987; Pringle y Fletcher, 1983, 1986 b). La adsorción de grandes moléculas puede conducir a cambios conformacionales que las haga más accesibles o más resistentes a la degradación microbiana (Bright y Fletcher, 1983 a). Sin embargo el punto hasta el que las macromoléculas adsorbidas puedan oscurecer la química de la superficie del sustrato, no está claro (Pringle y Fletcher, 1986 b). Se ha observado que algunas macromoléculas biológicas alteran, a través de la adsorción, la idoneidad de una superficie para la adhesión bacteriana. Generalmente las proteínas adsorbidas disminuyen la posterior adhesión bacteriana (Fletcher, 1976; Fletcher y Marshall, 1982 b) por convertirla en una superficie menos favorable para la adhesión a través de efectos estéricos o por efectos de hidratación de la superficie que pasa de hidrofóbica (favorable) a hidrofílica (desfavorable) (Fletcher, 1980 a; Fletcher y Loeb, 1979; McEldowney y Fletcher, 1987).

- Concentración de nutrientes en la fase líquida

Diversos autores afirman que la adhesión a partículas es beneficiosa para las bacterias en condiciones de baja concentración de nutrientes en el agua; en estos casos las bacterias pueden crecer más fácilmente después de haberse adherido a superficies, debido a que en ellas se concentran los nutrientes por adsorción, siendo así más accesibles (Fletcher, 1976; Pedrós-Alió y Brock, 1983 a), mientras que si la concentración de nutrientes es alta pueden crecer predominantemente las libres (Pedrós-Alió y Brock, 1983 a). Marshall *et al.* (1971) comprueban en una cepa marina de *Pseudomonas* que la adhesión depende de la concentración de la fuente de carbono; a concentraciones bajas la adhesión está favorecida y al ir aumentando, la adhesión se ve reducida hasta resultar completamente inhibida. McEldowney y Fletcher (1986 a) observan que la presencia de nutrientes modifica los niveles

de adhesión bacteriana a superficies, pero que el efecto varía dependiendo del sustrato y de la especie bacteriana, y afirman que los cambios en las concentraciones de nutrientes en hábitats acuáticos naturales afectan a la adhesión de las especies bacterianas individuales de manera distinta, por lo que estas diferencias influyen en la composición de especies del biofilm. Pedersen *et al.* (1986) también observan que al aumentar la concentración de nutrientes en el agua, disminuye marcadamente la adhesión bacteriana.

- Concentración iónica del medio

Frecuentemente se ha encontrado que los iones inorgánicos promueven la adhesión de las bacterias (Cowan y Fletcher, 1987; Goldberg *et al.*, 1990). Un ejemplo es el aumento de la adhesión de *Streptococcus faecium* inducido por un aumento en la concentración de cloruro sódico y cloruro potásico (Fletcher, 1980 a). También se ha observado un aumento de la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* al acero inoxidable (Stanley, 1983) y de *Vibrio alginolyticus* al hidroxapatito (Gordon y Millero, 1984) al incrementarse la concentración de electrolitos. Los cationes divalentes, particularmente Ca^{2+} y Mg^{2+} , promueven o favorecen la adhesión de algunas bacterias marinas y se ha observado que la adhesión firme de una cepa marina de *Pseudomonas* en ausencia de estos cationes no se produce (Marshall *et al.*, 1971). Los cationes trivalentes, como Al^{3+} , favorecen la adhesión de estreptococos (Fletcher, 1980 a); por el contrario, La^{3+} y Al^{3+} inhiben la adhesión de *Pseudomonas* (Fletcher, 1977, 1980 b).

Los cationes pueden influir sobre la adhesión bacteriana de varias maneras:

- a) Sobre la fisiología celular o la permeabilidad de membrana (Fletcher, 1980 b). Electrolitos como Ca^{2+} y Mg^{2+} intervienen en la fisiología de las bacterias como importantes cationes celulares y cofactores en reacciones enzimáticas (Fletcher, 1988)
- b) Por su acumulación en la superficie y la formación de una doble capa eléctrica, influyendo por tanto sobre las fuerzas de repulsión entre la superficie bacteriana y del sustrato (Fletcher, 1980 b, 1988; McEldowney y Fletcher, 1986 b; Rutter y Vincent, 1980) y entre grupos negativos del polímero adhesivo, teniendo como resultado su condensación y la atracción de la célula hacia la superficie (Fletcher, 1988)
- c) Ayudando a mantener la integridad estructural de los polímeros adhesivos a través de enlaces cruzados. Se ha demostrado, por examen al microscopio electrónico, que Ca^{2+} y Mg^{2+} pueden ser importantes en mantener la integridad estructural de la matriz polimérica

intercelular, observándose que al transferir microcolonias adheridas a medios deficientes en estos cationes, hay una desnaturalización casi inmediata del polímero (Fletcher y Floodgate, 1976)

- pH

Se ha observado que una disminución del pH causa un aumento de la adhesión (Stanley, 1983). Fletcher (1988) sugiere que la disminución del pH reduce la disociación de grupos aniónicos, lo que tendría como resultado una disminución de la repulsión electrostática y permitiría a las células moverse más cerca de las superficies. También se ha sugerido que el pH puede tener influencia sobre la viscosidad del polímero adhesivo bacteriano, siendo ésta mayor al disminuir el pH, con lo que aumenta la adhesión (Boyle y Reade, 1983; McEldowney y Fletcher, 1988 b). Otros autores obtienen resultados diferentes según la cepa bacteriana y el sustrato de que se trate (McEldowney y Fletcher, 1988 b).

- Especie o cepa bacteriana

Pedersen *et al.* (1986) indican que el principal factor que influye sobre la adhesión es la especie bacteriana de que se trate. Las especies bacterianas difieren considerablemente en la calidad y cantidad de polímeros de la superficie celular, por tanto no es sorprendente que también varíe su capacidad de adhesión al sustrato, así como la fuerza de la adhesión (Fletcher y McEldowney, 1984, Pringle y Fletcher, 1983). También se pueden encontrar diferencias entre distintas cepas de la misma especie (Fletcher, 1980 a).

En un sistema acuático natural, en el que existe una amplia variedad de especies bacterianas, la adhesión está influida por la composición de la población y puede diferir de la adhesión que presenta cada una de las especies en cultivo puro. Los resultados dependen de la combinación de especies y de la secuencia de adhesión. En experimentos de laboratorio, tanto en pruebas de adhesión simultánea como secuencial, se ha observado que la presencia de una especie puede influir sobre la adhesión de otra aumentándola, disminuyéndola o no teniendo efecto sobre ella, dependiendo de las bacterias y del sustrato de que se trate (McEldowney y Fletcher, 1987).

- **Hidrofobicidad de la superficie bacteriana**

Diversos autores han comprobado en diferentes hábitats que las cepas con hidrofobicidad alta se adhieren mejor a las superficies (Fatton y Shilo, 1984; Hoog y Old, 1987). Las bacterias en ambientes acuáticos son predominantemente Gram negativas y tales células pueden aumentar su hidrofobicidad en condiciones oligotróficas (Kjelleberg, 1984), lo que podría incrementar su capacidad para unirse a superficies hidrófobas (Breznak, 1984).

- **Estado fisiológico del fitoplancton**

Algunas algas durante el crecimiento exponencial producen sustancias antimicrobianas; por eso, es frecuente observar que la proporción de bacterias adheridas es mayor cuando comienza el crecimiento del fitoplancton o cuando está senescente, momento en el que se liberan compuestos orgánicos que son rápidamente utilizados por las bacterias heterótrofas (Bell y Albright, 1982). Estos autores observan que la clorofila a y la producción primaria están inversamente correlacionadas con el porcentaje de bacterias adheridas (Albright *et al.*, 1986).

- **Salinidad y concentración de partículas**

La abundancia de partículas puede ser el determinante más común de la abundancia de bacterias adheridas en sistemas acuáticos naturales (Pedrós-Alió y Brock, 1983 a). Bell y Albright (1982) encuentran que existe una correlación positiva entre el número de partículas y el número de bacterias adheridas y negativa entre la salinidad y el número de bacterias adheridas. Otros autores también encuentran una correlación positiva entre el número de partículas y el de bacterias adheridas (Iriberry *et al.*, 1987; Palumbo *et al.*, 1984; Pedrós-Alió y Brock, 1983 a; Yoon y Rosson, 1990), mientras que para otros (Albright *et al.*, 1986) no existe correlación.

- **Flujo hidráulico del sistema**

El flujo hidráulico y la velocidad de la corriente pueden influir sobre la abundancia de bacterias adheridas. Si el flujo es demasiado rápido, la mayoría de la biomasa bacteriana se encuentra adherida a superficies (Fletcher y Marshall, 1982 a; Pedrós-Alió y Brock, 1983 a), tendiendo a acumularse en depresiones o fisuras de las mismas (Fletcher, 1980 b; Fletcher y Marshall, 1982 a). Pedersen (1982 b) observa que al aumentar la velocidad de flujo, aumenta

la producción de biofilm.

- Otros factores *in vitro*

En la adhesión bacteriana *in vitro* también influyen otros factores, además de los anteriores:

- Concentración del cultivo: al aumentar la densidad de células del cultivo, aumenta el número de colisiones bacterianas con la superficie de adhesión, con lo que aumenta la oportunidad de adhesión (Fletcher, 1977; Pedersen *et al.*, 1986).
- Tiempo de adhesión: del mismo modo que en el punto anterior, al aumentar el tiempo, aumenta el número de colisiones y por tanto la posibilidad de que se produzca la adhesión (Fletcher, 1977).
- Condiciones del cultivo: dentro de una cepa bacteriana dada, la adhesión puede variar al cambiar alguna característica del cultivo, por ejemplo limitación de carbono o de nitrógeno o variación en la fuente de carbono. Parece posible que estas variaciones en la capacidad de adhesión, inducidas por las distintas condiciones de crecimiento, sean debidas, al menos en parte, a diferencias asociadas con la composición de la superficie celular (Fletcher y McEldowney, 1984). ya que los componentes macromoleculares de la superficie bacteriana varían en cantidad y composición con las condiciones de crecimiento (McEldowney y Fletcher, 1986 a).
- Edad del cultivo: la adhesión es mayor en la fase de crecimiento exponencial que en la estacionaria o en la de muerte, debido a que la etapa de crecimiento influye en la movilidad celular y en la calidad o cantidad de polímeros de la superficie celular (Fletcher, 1977; Harber *et al.*, 1983; Pedersen *et al.*, 1986). El movimiento de las células es importante porque aumenta mucho la posibilidad de que una bacteria se encuentre con una superficie potencialmente colonizable y además la energía cinética de las células móviles puede ser importante para vencer las fuerzas electrostáticas de repulsión que pueden existir entre la superficie bacteriana y la de adhesión (Fletcher, 1980 a; Harber *et al.*, 1983; Marshall *et al.*, 1971). Stratford y Wilson (1990) afirman que, para que se produzca la adhesión, la energía de colisión debe ser alta, por lo que el movimiento browniano sería insuficiente para producir contacto. Fletcher (1977) observa que los cultivos en fase

logarítmica tienen la mayor proporción de células móviles. Fletcher (1980 a, b) comprueba que la adhesión de *Pseudomonas* al poliestireno resulta inhibida al eliminar los flagelos. Harber y colaboradores (1983) estudiando la adhesión de *E. coli* al poliestireno, observan que las cepas que poseen fimbrias tipo I y flagelos se adhieren más y mejor durante la fase exponencial; además comprueban que las cepas adherentes pueden volverse no adherentes, simplemente inhibiendo la síntesis de los flagelos, por lo que deducen que la influencia de los flagelos puede deberse no sólo a la movilidad de las células, sino a que los propios flagelos pueden estar directamente implicados en la adhesión. Jones *et al.* (1981) comprueban asimismo que la movilidad promueve la adhesión de *Salmonella typhimurium* a células HeLa.

En cuanto a la producción o secreción de polímeros adhesivos por las bacterias, existe una evidencia apreciable de que está influida por la edad del cultivo y, puesto que estos polímeros juegan un papel importante en la adhesión, ésta se encontrará afectada por las variaciones que se produzcan en los mismos (Fletcher, 1977). Van Loosdrecht *et al.* (1990) sugieren que el aumento de la adhesión en la fase logarítmica puede ser debido a un aumento de la hidrofobicidad de la pared celular durante esta fase.

1.4.5. IMPORTANCIA DE LA ADHESION

La adhesión bacteriana a superficies juega un importante papel en una amplia variedad de situaciones, de las que aquí resumiremos algunas.

1.4.5.1. Ecológica

- La adhesión de bacterias a sustratos sólidos les puede conferir una ventaja en términos de disponibilidad de nutrientes (Breznak, 1984).
- Las bacterias que crecen sobre superficies en el medio ambiente desempeñan una labor beneficiosa debido a su papel en el continuo "turn-over" de residuos orgánicos y minerales (Fletcher *et al.*, 1980).
- La adhesión permite a las bacterias subsistir en un nicho nutricional adecuado. Además la envoltura exopolisacáridica las protege de agentes ambientales perjudiciales y de condiciones desfavorables (Costerton y Cheng, 1982; McEldowney y Fletcher, 1987).

- Las bacterias adheridas son más resistentes a bacteriófagos debido a que los polímeros extracelulares actúan como barrera de protección (Hicks y Rowbury, 1987; Wrangstadh *et al.*, 1986).
- La existencia de agregados bacterianos puede determinar la dominancia de determinadas especies de microflagelados en un sistema, debido a que algunos se alimentan predominantemente de bacterias adheridas (*Bodo* sp.), mientras que otros consumen preferiblemente bacterias libres (*Paraphysomonas* sp.) (Sibbald y Albright, 1988). Asimismo, aunque algunas especies de zooplancton se alimentan de bacterias libres (Pedrós-Alió y Brock, 1983 b; Sibbald y Albright, 1988), parece que las bacterias adheridas a partículas experimentan una presión de predación mayor (Fenchel y Jørgensen, 1977; Rassoulzadegan y Etienne, 1981).
- La división microbiana en las interfases hidrocarburos líquidos-agua tiene una aplicación en la degradación del petróleo (Goldberg *et al.*, 1990; Rosenberg y Rosenberg, 1981).

1.4.5.2. Sanitaria

Desde el punto de vista sanitario citaremos varios ejemplos entre los muchos que se pueden encontrar en la bibliografía:

- Las bacterias adheridas tienen una mayor resistencia al cloro y a otros desinfectantes utilizados para potabilizar el agua de abastecimiento (Berman *et al.*, 1988; Herson *et al.*, 1987; LeChevallier *et al.*, 1981, 1984 a; Ridgway y Olson, 1982; Ridgway *et al.*, 1984); esto puede provocar aumentos repentinos e inesperados en los recuentos de coliformes en sistemas de distribución de agua potable (Goshko *et al.*, 1983; Hudson *et al.*, 1983) debido al crecimiento de bacterias adheridas a las paredes de las tuberías y a la presencia de coliformes en estos biofilms (LeChevallier *et al.*, 1987). Asimismo la adhesión, sobre todo a partículas orgánicas, proporciona protección frente a la desinfección por radiación ultravioleta, debido a que las bacterias adheridas están menos expuestas y a que las partículas orgánicas absorben la radiación (Qualls *et al.*, 1983).
- Se ha observado que algunas bacterias patógenas que se pueden transmitir por aguas contaminadas, como por ejemplo el agente causante del cólera *Vibrio cholerae* serogrupo O1, se encuentran en ellas adheridas a partículas, lo que aumenta su supervivencia (Tamplin *et al.*,

1990).

- En numerosas infecciones la adhesión es un prerrequisito para la patogénesis, ya que constituye una etapa inicial en la colonización de tejidos (Wyatt *et al.*, 1990). Algunos ejemplos son:

- * Los patógenos entéricos colonizan el intestino delgado por medio de adhesinas de superficie que permiten a la bacteria fijarse a los tejidos humanos y animales, por ejemplo en la gastroenteritis por *E. coli* enterotoxigénica (Lindahl y Carlstedt, 1990); se ha comprobado, en voluntarios humanos, que si esta bacteria carece de adhesinas, no es capaz de colonizar el intestino delgado y, por tanto, no produce la enfermedad (Walsh y Bissonnette, 1983).

- * En la pielonefritis por *E. coli*, las *fimbrias P* parecen ser un marcador de virulencia (Harber *et al.*, 1983; Rhen, 1985).

- * La capacidad de *Staphylococcus aureus* para adherirse a la mucosa nasal se considera como un factor que conduce a su colonización (Wyatt *et al.*, 1990).

- * Las caries dentales se producen cuando bacterias anaerobias adheridas, comprendidas en la placa dental, producen ácido que destruye el esmalte dental (Gibbons y van Houte, 1975).

- Los microorganismos adheridos, por ejemplo, a partículas de alimento, son mucho más resistentes al ácido gástrico que los no adheridos, por lo que la adhesión puede ser un factor importante en la supervivencia de estos microorganismos y por tanto su capacidad para producir la infección (Poynter *et al.*, 1986)

- La resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los mecanismos de defensa del huésped se debe a la producción de microcolonias envueltas en exopolisacáridos sobre la superficie de los tejidos de los órganos infectados (Baltimore y Mitchell, 1980; Lam *et al.*, 1980; Marrie *et al.*, 1979; Schwartzmann y Boring, 1971); esto en muchos casos aumenta además su resistencia a la terapia convencional con antibióticos y otros agentes antimicrobianos (Costerton y Cheng, 1982; Costerton *et al.*, 1987; Gilbert *et al.*, 1987, 1989; Wrangstadh *et al.*, 1986).

- Se han descrito también numerosos problemas producidos por bacterias capaces de adherirse a distintos materiales utilizados en implantes biomédicos y dispositivos trascutáneos, como por ejemplo catéteres intravasculares y peritoneales y válvulas cardíacas. *S. epidermidis* infecta frecuentemente estos implantes (Hogt *et al.*, 1983). En una primera fase la bacteria se adhiere a la superficie del dispositivo; después tiene lugar, por parte de ciertas cepas, la producción de un polisacárido extracelular que, *in vivo*, forma un complejo con factores del huésped

dando lugar a una matriz extracelular que ancla a las bacterias firmemente a las superficies de los implantes y las protege de las defensas del huésped (Dunne y Burd, 1991).

1.4.5.3. Industrial

Desde el punto de vista industrial la adhesión microbiana es importante tanto por los efectos perjudiciales que pueda ocasionar, como por los beneficiosos. Algunos de los efectos perjudiciales más comúnmente observados son:

- El desarrollo de microcolonias de algunas especies bacterianas sobre los metales puede constituir un foco de corrosión (Beech y Gaylarde, 1989; Costerton y Geesey, 1979b; Characklis, 1984; Gordon, 1987; Pedersen, 1982 a).
- Las bacterias que forman parte de microcolonias adheridas en sistemas acuáticos industriales son, en muchas ocasiones, resistentes a biocidas (Costerton y Geesey, 1979b; Herson *et al.*, 1987; LeChevallier *et al.*, 1984 a; McEldowney y Fletcher, 1987; Ridgway *et al.*, 1984; Ridgway y Olson, 1982).
- La adhesión de bacterias sobre superficies de procesamiento en fábricas de alimentos son una fuente potencial de contaminación (McEldowney y Fletcher, 1987). En la industria de la alimentación este riesgo se considera que disminuye cuando tales superficies están secas, en parte porque el crecimiento y la supervivencia estarían reducidos (McEldowney y Fletcher, 1988 a). Sin embargo, se ha observado la capacidad de bacterias no formadoras de endoesporas para resistir condiciones de desecación por extensos periodos de tiempo en superficies de procesado de alimentos. McEldowney y Fletcher (1988 a) sugieren que el exopolímero hidratado que rodea las células mantiene un ambiente adecuado, protegiéndolas de la desecación. Además, las endoesporas de algunas especies bacterianas, con gran resistencia a la desinfección y esterilización por calor, se pueden adherir a superficies de equipos de fabricación, lo que puede ser un importantísimo problema en las industrias de alimentación y farmacéutica (Husmark y Rönner, 1990; Rönner *et al.*, 1990).
- La adhesión bacteriana en los intercambiadores de calor ocasiona una disminución en su conductividad, disminuyendo, por lo tanto, el rendimiento (Bar-Or, 1990; Characklis, 1984; Pedersen, 1982 a; Ridgway *et al.*, 1984).

- La colonización de superficies y el desarrollo de biofilms pueden afectar adversamente a la eficiencia de muchos procesos de membrana industriales, por ejemplo la ósmosis inversa. Al colonizarse la superficie de las membranas de diacetato de celulosa, disminuyen progresivamente tanto el flujo de agua como las propiedades de retención de minerales de las membranas (Ridgway *et al.*, 1983, 1984).

Respecto a los efectos beneficiosos, citamos también algunos ejemplos:

- Gracias a la adhesión puede favorecerse la fermentación en procesos industriales, por ejemplo, en la producción rápida del vinagre (Characklis, 1984).
- Las películas microbianas y las células inmovilizadas, junto con reactores de lecho fluido y fijo, son un importante componente de procesos de fabricación en la industria biotecnológica (Wardell, 1988).
- El tratamiento de aguas residuales depende de la acción de microorganismos adheridos que absorben y degradan compuestos orgánicos y nitrogenados (Bar-Or, 1990; van Loosdrecht *et al.*, 1990; Wardell, 1988).

1.5. EMBALSE DE «EL ATAZAR»

El embalse de «El Atazar» está situado a unos 70 km de Madrid, en el Norte de la Comunidad Autónoma, pertenece a la jurisdicción de los términos municipales de El Atazar y Patones, pero sus aguas llegan hasta las estribaciones del casco urbano de El Berrueco.

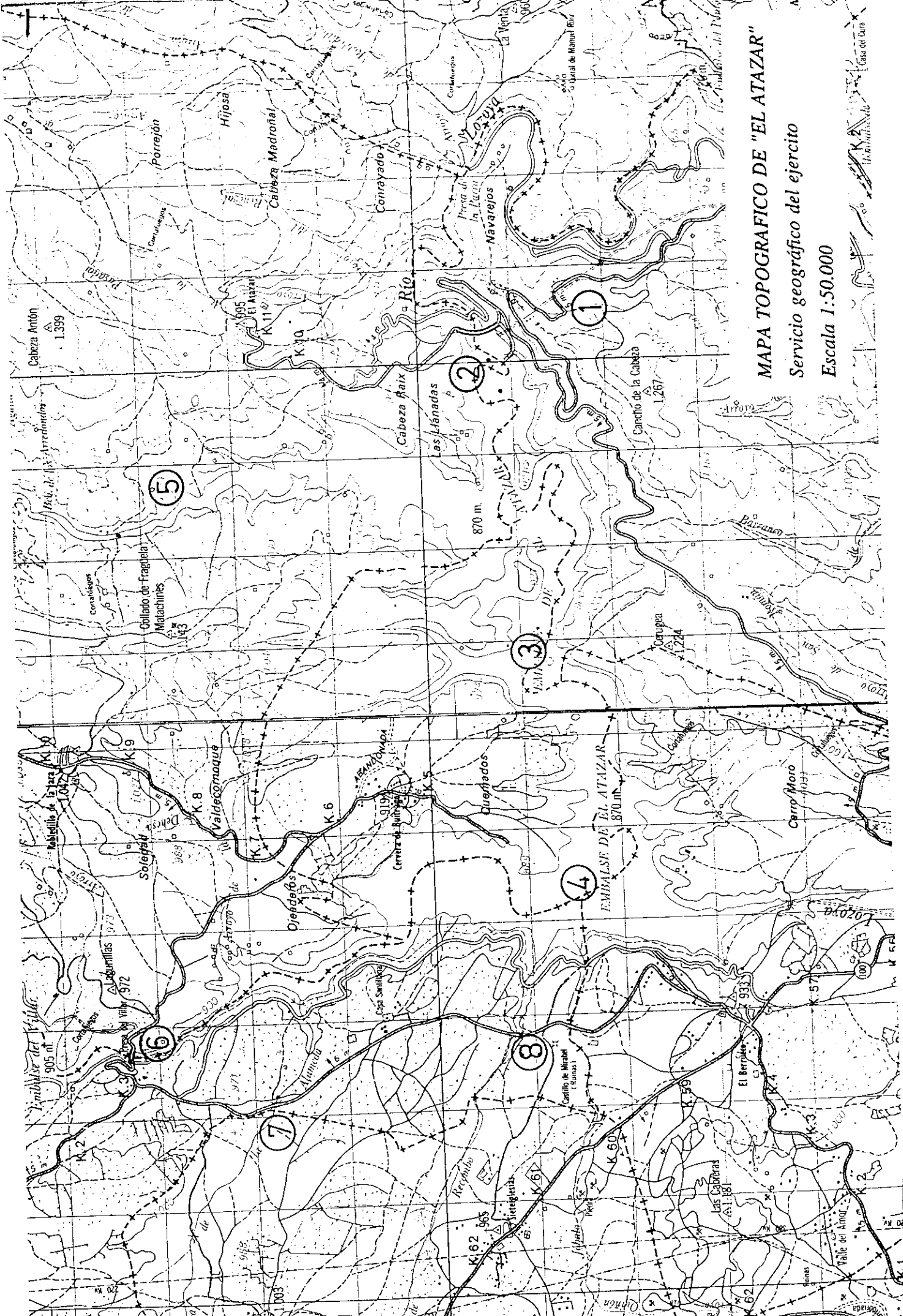
El Atazar es el último de la cadena de embalses del río Lozoya, formada por otros cuatro embalses más, que superan cada uno el hectómetro cúbico de capacidad. Estos embalses son: La Pinilla, Riosequillo, Puentes Viejas y El Villar. Según el Canal de Isabel II, El Atazar multiplica por 2,7 la capacidad de los otros cuatro juntos (Canal de Isabel II, 1972).

El Atazar es una presa de tipo bóveda-cúpula, con un muro de 141 m de altura y una longitud de coronación de 370 m, esto, unido a una cola máxima de 17 km, permite al embalse contener una cantidad de agua de 426 hm³, que inunda una superficie de 1.200 hectáreas.

Se terminó su construcción en 1972 y entró en funcionamiento real en 1974, abasteciendo de agua potable a Madrid. La razón fundamental de su construcción fue regular los excesos de precipitación en la cuenca del río Lozoya respecto a la capacidad de los otros cuatro embalses. Su principal papel es pues realizar una regulación anual de caudales vitales en el abastecimiento a Madrid (Cubillo *et al.*, 1990).

La entrada de agua al embalse se produce por varios caminos: escorrentía superficial, regulación hidráulica de la cadena del río Lozoya y ríos y arroyos que desembocan en el embalse. La escorrentía superficial es muy importante en la consecución de caudales y se ve potenciada por dos factores: su amplia cuenca de recepción (con 982 km²) y la impermeabilidad del terreno, constituido en su mayoría por materiales como pizarras, granitos, neises, etc. (Fuster *et al.*, 1971).

La geología de la zona de El Atazar presenta una clara diferenciación entre sus mitades este y oeste. Mientras que su mitad este es homogénea y compuesta por pizarras del Ordovícico, la mitad oeste es más fragmentada y de una geología distinta. Así, a la altura de Cervera de Buitrago, encontramos una franja estrecha de rañas y arenas del Plioceno; ésta es la zona donde la escorrentía superficial es menor, debido a una mayor infiltración. Junto a ésta, y terminando de rodear casi por completo el embalse, existe una zona granítica que se prolonga hasta Bustarviejo. Contigua a estos granitos, en la mitad oeste orilla sur, aparece una zona de neises



MAPA TOPOGRAFICO DE "EL ATAZAR"

Servicio geográfico del ejército

Escala 1:50.000



PI Mu Casa del Luro

unidos al gran macizo central metamórfico de la cordillera de Guadarrama (Fuster *et al.*, 1971).

En las cercanías del embalse no se observa ninguna falla aparente. En la construcción se encontraron varias diaclasas en la cubeta cuyo material de relleno no ofrecía garantías; fueron vaciadas y rellenadas con hormigón (Canal de Isabel II, 1972).

1.6. OBJETO DEL TRABAJO

El abastecimiento de agua potable a la población es un problema que debe preocupar a las autoridades, principalmente las sanitarias, tanto nacionales como locales. Cada día son mayores las cantidades de agua que se requieren por habitante, y debido a la irregularidad pluviométrica de nuestro país, es necesario realizar una regulación de los caudales por medio de embalses.

Es innegable la necesidad de suministrar este agua en condiciones óptimas, ya que puede ser un medio de transmisión de enfermedades. La legislación española estipula los análisis que son necesarios para controlar su calidad, que incluyen tanto la valoración de parámetros físico-químicos como microbiológicos (B.O.E., 1983; B.O.E., 1990). Para realizar el control de la calidad microbiológica es sobradamente conocido que no se intenta realizar el aislamiento de posibles microorganismos patógenos, sino de aquellos que se encuentran siempre en heces, denominados indicadores fecales, que incluyen coliformes, estreptococos y esporas de clostridios sulfito-reductores. La razón para su utilización se ha basado en el concepto de que estos microorganismos son más fáciles de detectar que los patógenos, por encontrarse en mayor número y tener una supervivencia más larga.

Por lo tanto estos grupos microbianos tienen mucho interés, debido a su enorme importancia, por lo que han sido objeto de los más diversos trabajos, que incluyen desde estudios para mejorar su recuento y aislamiento, hasta la evaluación de los efectos de los distintos factores, bióticos y abióticos, sobre su supervivencia.

La asociación de bacterias con material particulado es de considerable importancia en ambientes acuáticos. Existen numerosos trabajos sobre la adhesión microbiana en aguas dulces. Los distintos autores que trabajan en este tema están de acuerdo en que el grado de adhesión en ambientes dulceacuícolas varía considerablemente. También existe común acuerdo en que la adhesión bacteriana a partículas puede tener una gran influencia sobre la supervivencia de los

microorganismos.

Sin embargo, por regla general, todos estos estudios sólo se han realizado sobre la micropoblación total, determinando el número de bacterias libres y adheridas a partículas, pero no conocemos ninguno que haya realizado una discriminación entre libres y adheridas en diferentes grupos bacterianos.

Por ello hemos creído de interés determinar si existe una tendencia a la adhesión en grupos microbianos de gran importancia para determinar la calidad microbiológica de las aguas como son los indicadores de contaminación fecal, aspecto que contribuiría a un mayor conocimiento del comportamiento de estos microorganismos en el ambiente acuático.

Para esto se ha elegido una estación de muestreo en la cabecera del embalse de El Atazar, realizándose la recogida de muestras a distintas profundidades, para determinar si existían diferencias, tanto espaciales como temporales en el número total de bacterias de los grupos escogidos y en el porcentaje de ellas que se presentan adheridas a partículas.

Los parámetros microbiológicos estudiados han sido:

* Recuento directo, para conocer el número total de bacterias en el embalse, determinando el porcentaje de células que se encuentran respiratoriamente activas.

* Recuento de bacterias heterótrofas viables a 22°C y 37°C, determinando el número total y el número de ellas que se encuentran adheridas a partículas.

* Recuento de coliformes totales y fecales, realizando, asimismo, la discriminación entre el número total y el de adheridos a partículas.

* Recuento de estreptococos fecales, totales y adheridos a partículas.

Complementariamente se ha realizado la identificación de las cepas de coliformes y de estreptococos fecales seleccionadas. Con algunas de estas cepas se han realizado ensayos de adhesión *in vitro* para intentar determinar si existen diferencias en su tendencia a la adhesión, según estén libres o adheridas en la muestra de agua.

También se han estudiado algunos parámetros físico-químicos, que nos ayudan a conocer un poco más el entorno en el que se encuentran los microorganismos estudiados y nos permiten buscar posibles influencias de los mismos sobre la micropoblación. Los parámetros evaluados han sido:

* Perfil de temperatura, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno de la columna de agua del embalse, imprescindibles en el estudio de un embalse debido, como ya hemos citado en la introducción, a la importancia de la estratificación térmica.

* Concentraciones de los compuestos de nitrógeno más importantes en el estudio de la dinámica de un embalse, como son el ión amonio, los nitritos y los nitratos.

* Concentraciones de ortofosfatos y fósforo total, parámetros de gran importancia debido a que el fósforo es el principal elemento limitante en numerosos sistemas acuáticos.

* Demanda química de oxígeno, importante como medida de la cantidad de materia orgánica del agua.

* pH

Creemos que esta investigación puede tener interés, ya que al determinar la proporción de bacterias adheridas en los distintos grupos bacterianos estudiados, aborda un punto de vista poco investigado, lo que puede servir de complemento a los estudios que continuamente se están realizando sobre la adhesión bacteriana. Hemos elegido los indicadores sanitarios para la realización de este trabajo debido a la importancia que la adhesión a partículas puede tener en su supervivencia y en su resistencia a algunos agentes utilizados para potabilizar el agua de abastecimiento.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. TOMA DE MUESTRAS Y SU CONSERVACION

La recogida de muestras se realiza en la cabecera del embalse, en un punto situado a una distancia aproximada de unos 100 m de la pared de la presa y equidistante de ambas orillas.

Las muestras se recogen con una botella de muestreo, para toma de muestras en profundidad, que se hace descender hasta la profundidad deseada por medio de un cable de acero marcado metro a metro, al final del cual va unido un lastre que facilita el descenso y evita desviaciones de la vertical.

El equipo toma-muestras se baja con ambas tapas abiertas. Al llegar a la profundidad deseada, se envía por el mismo cable un mensajero, que al golpear contra el dispositivo de enganche de las tapas las libera, con lo que la botella se cierra (Herbert, 1988). Una vez en la superficie, las muestras se pasan a recipientes de plástico estériles de 1,5 l de capacidad.

Durante toda la campaña de muestreo se toman las muestras a las siguientes profundidades: 25 cm, 2, 4, 6, 8, 10, 20 y 40 m.

Las muestras se transportan en frío, en neveras portátiles, hasta el laboratorio y se analizan en el mismo día.

2.2. REALIZACION DE LOS PERFILES DE TEMPERATURA, OXIGENO DISUELTO Y TANTO POR CIENTO DE SATURACION DE OXIGENO

Los perfiles de temperatura, concentración de oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno de la columna de agua, se realizan *in situ* con un aparato electrónico marca pHOX 62, provisto de una sonda de 30 m, marcada metro a metro.

Una vez ajustado el aparato, se hace descender la sonda, lentamente para que se vaya estabilizando, hasta la profundidad de 30 m, realizándose la lectura de los tres parámetros. Posteriormente, se va subiendo la sonda metro a metro efectuándose las mismas lecturas.

2.3 METODOS MICROBIOLÓGICOS

2.3.1. DETERMINACION DE LA POBLACION BACTERIANA TOTAL

El número de bacterias totales se determina por recuento directo con naranja de acridina (Acridine Orange Direct Count, AODC) según la técnica de Hobbie *et al.* (1977), modificación de la de Francisco *et al.* (1973).

Para ello se utilizan filtros Nucleopore de policarbonato (Bowden, 1977) de 0,2 μm de diámetro de poro y 25 mm de diámetro, teñidos con *Negro Irgalan* (Ciba-Geigy) en solución al 0,2% en ácido acético al 2%, esterilizada por filtración. Antes de usar los filtros, éstos se lavan por pases sucesivos por agua destilada esterilizada por filtración (Hobbie *et al.*, 1977)

Un mililitro de la dilución deseada de la muestra se trata durante 3 minutos con 0,2 ml de solución de naranja de acridina al 1‰, esterilizada por filtración (Hobbie *et al.*, 1977). Una vez transcurrido este tiempo, se pasa la mezcla a través de los filtros de policarbonato teñidos, utilizando un soporte Millipore de vidrio esmerilado. Una vez terminada la filtración, se hace pasar a través del filtro agua destilada, esterilizada por filtración, para lavar y quitar los excesos de colorante.

El filtro se coloca sobre un porta-objetos, se añade una gota de vaselina líquida, se coloca encima un cubre-objetos y sobre él una gota de aceite de inmersión. La preparación así obtenida se observa con objetivo de inmersión en microscopio de epifluorescencia, equipado con un ocular cuadrulado para facilitar el recuento. Se cuentan todas las bacterias que presentan fluorescencia verde.

Los recuentos se efectúan en al menos 20 campos por preparación. Conociendo el diámetro del campo del microscopio, el del filtro y la cantidad de muestra filtrada, se realizan los cálculos necesarios para expresar los resultados como bacterias totales por mililitro.

Todas las soluciones que se utilizan en esta técnica (*negro irgalan*, naranja de acridina y agua destilada) deben estar esterilizadas por filtración para eliminar cualquier partícula que tengan en suspensión y evitar falsos resultados. Además, nosotros, para asegurar la esterilidad, añadimos a todas las soluciones formol a una concentración final del 1%.

2.3.2. RECUENTO DE LAS BACTERIAS RESPIRATORIAMENTE ACTIVAS

Para estimar el número de bacterias respiratoriamente activas, en el momento de tomar las muestras en el embalse, se realiza la incubación *in situ* y en la oscuridad con INT (cloruro de p-iodo fenil, 3-p-nitro fenil, 5-fenil tetrazolio; Sigma) según la técnica de Zimmermann *et al.* (1978) modificada por Maki y Remsem (1981).

El INT se prepara a una concentración del 0,1% en agua destilada y se esteriliza por filtración con filtros Millex (Millipore) distribuyéndolo en recipientes estériles de 100 ml, a razón de 10 ml en cada uno.

En el embalse, con cada una de las muestras recogidas, se completan los recipientes hasta 100 ml, manteniéndose la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se detiene la incubación añadiendo 1 ml de formaldehído al 10%.

Las bacterias que tienen su cadena de transporte electrónico en actividad, utilizan el INT como último aceptor de electrones, reduciéndolo a Formazán que queda como cristales de color rojo-ladrillo en el interior de la bacteria (Betts *et al.*, 1989; Zimmerman *et al.*, 1978).

La observación se realiza tiñendo las bacterias con naranja de acridina, según la técnica descrita en el apartado anterior y observando con objetivo de inmersión en microscopio de epifluorescencia. Se efectúa el recuento de las bacterias que presentan los cristales rojo-ladrillo en su interior. Los resultados se presentan como porcentaje respecto a las bacterias totales.

2.3.3. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 22°C Y A 37°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

El recuento de bacterias heterótrofas se realiza por el método de dilución en placa, sembrando 1 ml de las diluciones decimales, realizadas en solución salina al 9‰. Se utiliza como medio de cultivo el agar de recuento en placa (Adsa-Micro), incubando a 22°C y a 37°C, durante 5 días y 48 horas respectivamente (APHA, 1989)

Para realizar la segregación entre bacterias libres y adheridas a partículas, se filtra la muestra por un filtro de 3 µm de diámetro de poro, en el que quedan retenidas las bacterias que se encuentran adheridas a partículas (Fry, 1988; Goulder, 1977; Pedrós-Alió y Brock, 1983 a;

Yoon y Rosson, 1990), recogiendo el filtrado en un kitasato estéril. Posteriormente se realiza el recuento de bacterias totales en la muestra sin filtrar y el de las libres en el filtrado. Por diferencia entre las bacterias totales y las libres obtenemos el número de aquellas que se encuentran adheridas a partículas.

Todos los recuentos se efectúan por duplicado. Los resultados se expresan como ufc/ml.

2.3.4. RECUESTO DE BACTERIAS DEL GRUPO COLIFORME, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

Al efectuar el recuento de este grupo de bacterias se realiza igualmente una segregación entre el número total de bacterias coliformes y el número de aquellas que se encuentran adheridas a partículas. Para ello, como en el caso anterior, se realizan los recuentos en la muestra sin filtrar y en el filtrado obtenido después de pasar por un filtro de 3 μm de diámetro de poro. Todos los recuentos se efectúan por duplicado. En algunas muestras se incubó también el filtro de 3 μm de diámetro de poro, en las mismas condiciones, con el fin de obtener cepas que se encuentran adheridas a partículas, para realizar posteriormente los ensayos de adhesión *in vitro*, como se detalla en el apartado 2.3.7.

El método utilizado para realizar los recuentos es el de filtración por membrana, usando filtros de 47 mm de diámetro y de 0,45 μm de diámetro de poro. Se filtran 10 ml de las diluciones decimales.

El medio elegido, después de ensayar con algunos de los más utilizados en la bibliografía, es el caldo *m-Endo* (Burlingame, *et al.*, 1984; Rivera *et al.*, 1988; Mates y Shaffer, 1989), impregnado en almohadillas absorbentes en placas Petri de 49 mm de diámetro. Las colonias típicas desarrolladas en este medio son de color rosa fusia con o sin brillo metálico.

La incubación se realiza siempre en anaerobiosis para impedir que parte de la flora bacteriana acompañante, que podría crecer en el caldo Endo, se desarrolle.

Se efectúan los recuentos de coliformes totales y fecales, incubando las placas para los primeros a 37°C durante 48 horas y para los segundos a 44,5°C durante 24 horas. Los resultados se expresan como ufc/100 ml.

2.3.5. RECuento DE ESTREPTOCOCOS FECALES, TOTALES Y ADHERIDOS A PARTICULAS

El recuento de estreptococos fecales se realiza por el método de filtración por membrana utilizando filtros Millipore de 47 mm de diámetro y 0,45 μm de diámetro de poro. Se filtran 100 ml de muestra. El medio utilizado es el agar de Slanetz y Bartley (Collin *et al.*, 1988; Devriese *et al.*, 1992). La incubación se realiza a 37°C durante 48 horas. Las colonias típicas son de color rojo ladrillo.

Como en los casos anteriores, también efectuamos aquí una segregación entre el número total de estreptococos fecales y el número de adheridos a partículas; pero en este caso, en lugar de realizar los recuentos solamente en la muestra sin filtrar y en el filtrado obtenido después de pasar por un filtro de 3 μm , también se coloca el filtro de 3 μm sobre la superficie del medio utilizado, obteniendo en este caso el número de estreptococos fecales adheridos a partículas. La razón de hacerlo así, es porque estos microorganismos se encuentran en un número muy inferior al de los grupos anteriores y el error cometido al calcular el número de bacterias adheridas podría ser mayor. Además estas cepas se utilizan, junto con las obtenidas en el recuento efectuado en el filtrado, para realizar los ensayos de adhesión *in vitro*, como se detalla en el apartado 2.3.7.

Los resultados de los recuentos se expresan como ufc/100 ml

2.3.6. IDENTIFICACION DE BACTERIAS

2.3.6.1. Identificación de las cepas de coliformes

Las colonias típicas aisladas en el medio de recuento se siembran en agar triptona-soja (TSA), incubándose a 37°C, 24 h. A partir del cultivo obtenido, en primer lugar se procede a su confirmación, realizando algunas pruebas preliminares: tinción Gram, producción de gas en caldo lactosado, citocromo-oxidasa, siembra en medio de Hugh-Leifson para oxidación/fermentación de la glucosa, y ONPG (orto-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido). Posteriormente con las cepas confirmadas se realizan las siguientes pruebas para su identificación: movilidad, por el método de la gota pendiente; catalasa; crecimiento en medio Kligler, donde se realiza la lectura de tres pruebas, glucosa, lactosa y producción de SH_2 ; indol; rojo de metilo y Voges-Proskauer; citrato (Daguet, 1977); lisina descarboxilasa; ornitina

descarboxilasa; arginina dehidrolasa; fenilalanina desaminasa; triptófano desaminasa (Oberhofer, 1985); ureasa; hidrólisis de la gelatina; producción de ácido a partir de glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa; reducción de nitratos (Daguet, 1977).

Para la identificación de algunas de las cepas se han utilizado las galerías API 20E (Biomérieux), aunque en algunos casos han sido necesarias pruebas complementarias.

Para la clasificación en especies se han seguido los criterios del Manual Bergey's (Krieg y Holt, 1984).

2.3.6.2. Identificación de las cepas de estreptococos fecales

Las colonias típicas aisladas en el medio de recuento se siembran en TSA, incubando a 37°C, 24 h. A partir del cultivo obtenido se realizan las siguientes pruebas para su identificación: hidrólisis del almidón (Ruoff, 1992), producción de ácido a partir de lactosa, manitol, sorbitol, rafinosa y sacarosa (Devriese *et al.*, 1992; Ruoff, 1992).

Para la clasificación en especies se han seguido los criterios del Manual Bergey's (Sneath *et al.*, 1986).

2.3.7. ADHESION IN VITRO

Con una selección de las cepas aisladas en los recuentos de coliformes y estreptococos, se realizan ensayos de adhesión *in vitro*. Se utilizan cepas, pertenecientes a estos dos grupos, aisladas de los recuentos de bacterias libres y cepas crecidas sobre los filtros de 3 µm, sobre los que sólo se quedan retenidas las bacterias que se encuentran adheridas a partículas (ver apartados 2.3.4. y 2.3.5.)

Para llevar a cabo los ensayos se cultivan las cepas que van a ser utilizadas en caldo triptono soja (TSB) hasta alcanzar la fase exponencial. El comienzo de la fase exponencial se determina realizando la curva de crecimiento. Por lo general los tiempos de incubación oscilan entre 18 y 22 horas. Posteriormente se recogen las células por centrifugación, lavando dos veces con tampón fosfato y resuspendiendo en tampón fosfato hasta una densidad óptica de 0,1 a 540 nm (McEldowney y Fletcher, 1986 a).

Para estudiar la adhesión al poliestireno, se añaden 5 ml de la suspensión obtenida a placas Petri de este material, de 49 mm de diámetro, que sirven como sustrato de adhesión, dejándose durante 60 minutos a 22°C. Transcurrido este tiempo, se lavan con tampón fosfato para retirar las bacterias que no se encuentran adheridas, fijando las adheridas con fijador de Bouin (71% v/v de solución acuosa saturada de ácido pícrico; 24% v/v de formol; 5% v/v de ácido acético), tificando a continuación con cristal violeta (5 g/l) (McEldowney y Fletcher, 1986 a), y contando al microscopio. Conociendo el diámetro del campo del microscopio y el diámetro de la placa Petri, es posible calcular el número total de bacterias que se han adherido a la placa. Por otra parte se estima el número de bacterias que permanecen en la solución, por el método de recuento en placa, expresándose los resultados como porcentaje de células adheridas.

2.4. METODOS FISICO-QUIMICOS

2.4.1. pH

El pH se determina en el laboratorio, procurando que el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y la medición sea el mínimo posible. En nuestro caso fue siempre inferior a 6 horas. Se emplea un pHmetro DIGIT 501 marca CRISON, con compensador de temperatura y calibrador.

2.4.2. CONCENTRACION DE ION AMONIO

Para la valoración del ión amonio se utiliza el método colorimétrico de Nessler, cuyo fundamento es la formación de un complejo amarillo-pardo-rojizo de $I(NH_2)Hg$ que se obtiene cuando se mezcla el reactivo de Nessler (I_2Hg 2IK) con la muestra que contiene ión amonio. La intensidad de color, función del amonio presente, se determina por colorimetría a 415 nm (de la Rubia, 1980). A la muestra se le añade tartrato-sódico-potásico (o sal de La Rochelle) para evitar la precipitación de los iones calcio y magnesio presentes en la muestra (APHA, 1989). El resultado se expresa en mg/l.

2.4.3. CONCENTRACION DE NITRITOS

El método colorimétrico empleado para la valoración de nitritos es el de la sulfanilamida. En este método el compuesto diazoico, formado por la diazotación, en medio ácido, de la sulfanilamida por los nitritos presentes en el agua, se combina con la N-(1-naftil) etilendiamina, produciendo un complejo de color rojo púrpura que se determina colorimétricamente a 435 nm (Rodier, 1981). Se expresan los resultados en mg/l.

2.4.4. CONCENTRACION DE NITRATOS

El método colorimétrico empleado para la valoración de la concentración de nitratos es el de la reducción con cadmio. En este método se emplea cadmio-cobre granulado para reducir los nitratos a nitritos, que se determinan mediante la diazotación de la sulfanilamida y su copulación con el clorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina para formar un complejo rojo púrpura, susceptible de valoración colorimétrica a 535 nm (Rodier, 1981). Los resultados se expresan en mg/l.

2.4.5. CONCENTRACION DE ORTOFOSFATOS

El método colorimétrico empleado se fundamenta en la reacción de los ortofosfatos en medio ácido con molibdato amónico y tartrato de antimonio y potasio, formando un complejo de antimonio-fosfo-molibdato, el cual es reducido por la acción del ácido ascórbico, dando un complejo de color azul, cuya intensidad es función de la concentración de ortofosfatos presentes en la muestra. La lectura se efectúa a 640 nm (Rodier, 1981). Los resultados se expresan en mg/l.

2.4.6. CONCENTRACION DE FOSFORO TOTAL

La concentración de fósforo total se determina según el método indicado por el Centro de Estudios Hidrográficos (de la Rubia 1980), que consiste en hervir suavemente 50 ml de la muestra durante 30 minutos, con 1 ml de H_2SO_4 11 N y 0,4 g de $(NH_4)_2SO_5$. Después de enfriar, se ajusta el pH a 7 con NaOH 1 N, se diluye hasta 50 ml con agua destilada y se valoran en esta mezcla los ortofosfatos existentes según el método explicado en el apartado anterior. Los resultados se expresan en mg/l.

2.4.7. DETERMINACION DE LA DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (D.Q.O.)

Para la estimación de la materia orgánica presente en las muestras, se utiliza el método de la oxidabilidad al permanganato, según la técnica recomendada por el Centro de Estudios Hidrográficos (de la Rubia, 1980).

Para ello se ponen a hervir 100 ml de agua de la muestra con 15 ml de H_2SO_4 1/3. Cuando comienza la ebullición se añaden 10 ml de $KMnO_4$ N/100 y se mantiene la mezcla en ebullición durante 10 minutos exactos. Transcurrido este tiempo, se añaden 10 ml de ácido oxálico N/100. Posteriormente se valora con $KMnO_4$ N/100 hasta obtener una coloración rosa pálida. Se anotan los mililitros de $KMnO_4$ gastados en la valoración.

Para calcular la D.Q.O. se aplica la siguiente fórmula:

$$A = [(V + 10) \times F - 10] \times 0,8$$

siendo:

A = D.Q.O. expresada como miligramos de oxígeno por litro de agua

V = volumen de KMnO_4 N/100, en mililitros, gastado en la valoración

F = factor de la solución de KMnO_4 N/100

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. PERFILES DE TEMPERATURA, OXIGENO DISUELTO Y PORCENTAJE DE SATURACION DE OXIGENO

Los perfiles de temperatura y de concentración de oxígeno disuelto en la columna de agua del embalse se encuentran representados en las figuras 1 a 3, en ellas podemos observar que la estratificación se produjo en el mes de Mayo, permaneciendo en esta situación hasta el mes de Noviembre. El máximo espesor del epilimnion apareció en Octubre con 16 metros y el mínimo en Junio y Julio con 4 y 5 metros respectivamente. El metalimnion más grueso se encontró en Mayo y Julio con 7 y 9 metros respectivamente y el menor en Junio y Octubre con 2 y 3 metros respectivamente.

La concentración de oxígeno disuelto fue siempre bastante elevada, con porcentajes de saturación entre el 50 % y el 114 %. Durante los meses en los que el embalse se encontraba en circulación la concentración de oxígeno disuelto variaba poco a lo largo de la columna de agua del embalse, oscilando entre aproximadamente 8 y 10 mg/l, lo que representaba un porcentaje de saturación entre el 66 % y el 80 % respectivamente. Naturalmente las mayores diferencias se encontraron durante el período de estratificación.

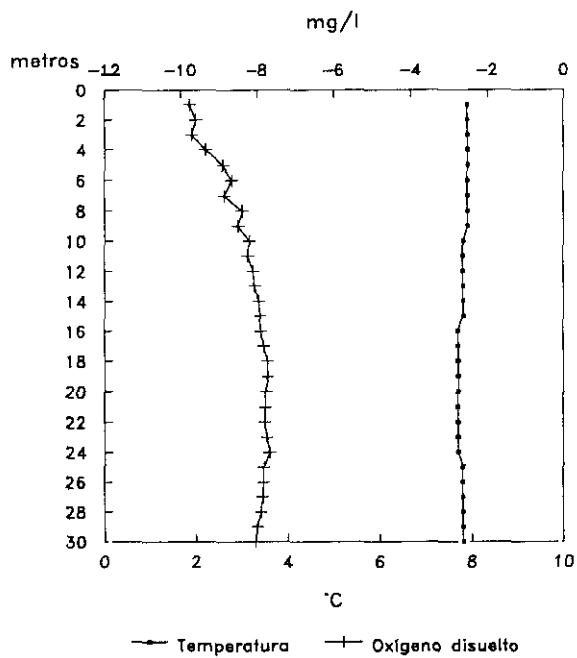
Se observa una sobresaturación epilimnética en los meses de Junio, con un tanto por ciento de saturación de 102%, y Julio, con un porcentaje entre 101% y 106%, y una situación de saturación o cercana a ella en los meses de Mayo, con un 94%, y Octubre, con un 100%. Sin embargo no se detectaron "blooms" de fitoplancton ninguno de los días de recogida de muestras, ni visualmente en el momento de la recogida, ni por la valoración de la concentración de clorofila. La sobresaturación puede haber sido debida a tormentas primaverales y veraniegas que descargaron con frecuencia sobre la zona, o también al fuerte aire, habitual durante gran parte del año, que provoca oleaje, en ocasiones fuerte, y que favorecería una oxigenación de la capa superficial.

En el mes de Mayo encontramos un incremento brusco de la cantidad de oxígeno disuelto en el metalimnion, mientras que al mes siguiente nos encontramos con la situación opuesta, con un mínimo en el comienzo de la termoclina, que podría ser consecuencia del consumo de oxígeno en la degradación de la materia orgánica (Wetzel, 1983). En Julio vuelve a haber un aumento de la concentración metalimnética de oxígeno, llegándose a obtener porcentajes de saturación de 114%. Respecto al hipolimnion la situación no varía mucho con respecto al período de circulación, siendo las concentraciones de oxígeno disuelto altas durante todo el

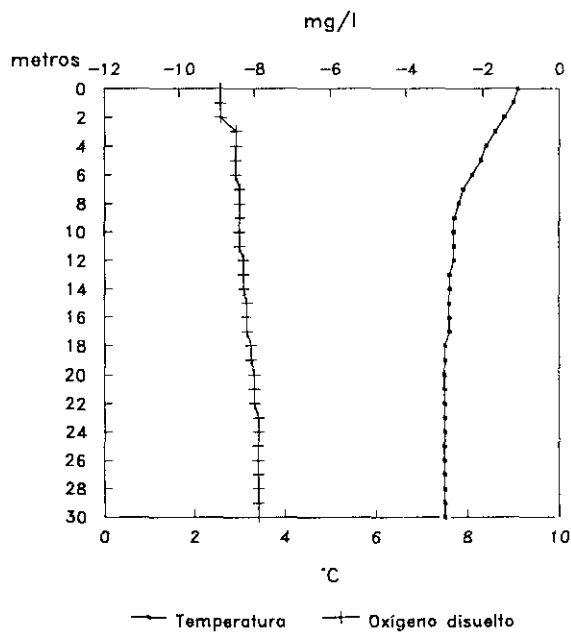
estudio. El embalse de "El Atazar", como ya hemos citado en la introducción, tiene una profundidad en cabecera de 141 m, además, debido a lo escarpado del terreno, la profundidad se mantiene en gran parte del embalse, lo que le permite contener una cantidad de oxígeno disuelto elevada, que disminuye poco a lo largo del estudio, incluso durante la estratificación térmica.

Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Carballo (1987) en un estudio realizado en este mismo embalse, aunque en aquella ocasión las concentraciones de oxígeno disuelto fueron, en su mayoría, un poco más bajas. Creemos que esto pudo deberse a una agresión que sufrió el embalse en aquellos años, debida al trasvase masivo de agua de los embalses que se encuentran por encima de "El Atazar" en la cadena del Lozoya, todos ellos eutróficos. Esto provocó un aumento en las concentraciones de algunos parámetros estudiados, tanto físico-químicos como microbiológicos, lo que pudo conducir a un mayor consumo de oxígeno (Carballo, 1987; Fernández, 1985).

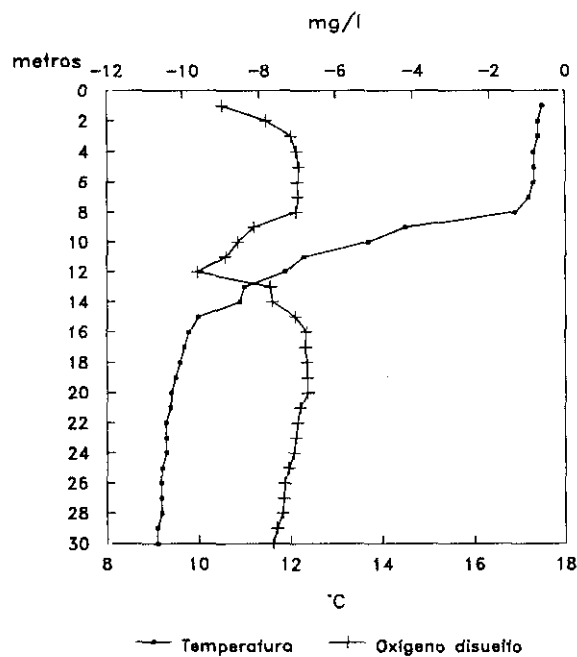
Fig. 1. PERFILES DE TEMPERATURA/OXIGENO DISUELTO
(meses Febrero, Marzo, Mayo y Junio)



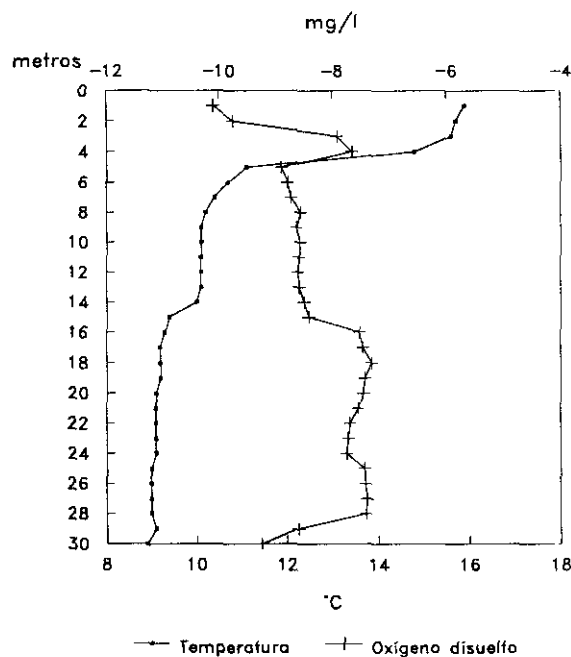
Febrero



Marzo

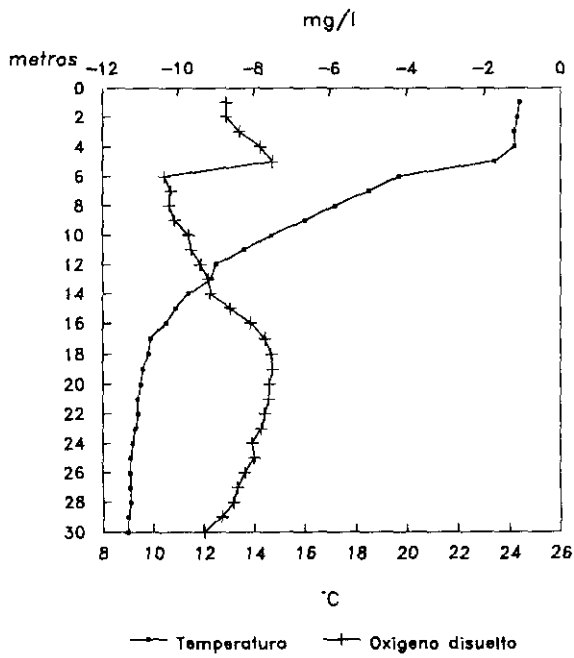


Mayo

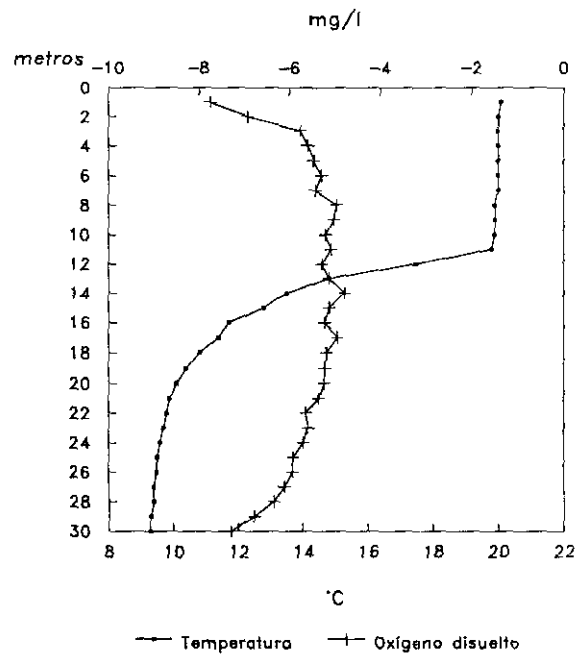


Junio

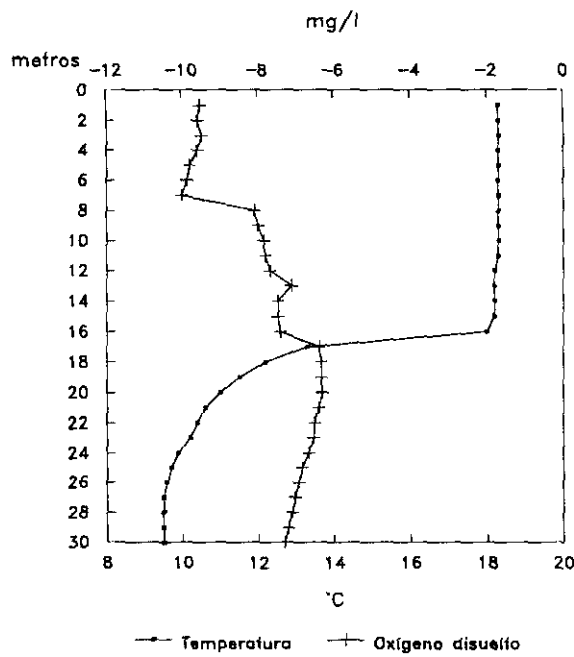
Fig. 2. PERFILES DE TEMPERATURA/OXIGENO DISUELTO
 (meses Julio, Septiembre, Octubre y Noviembre)



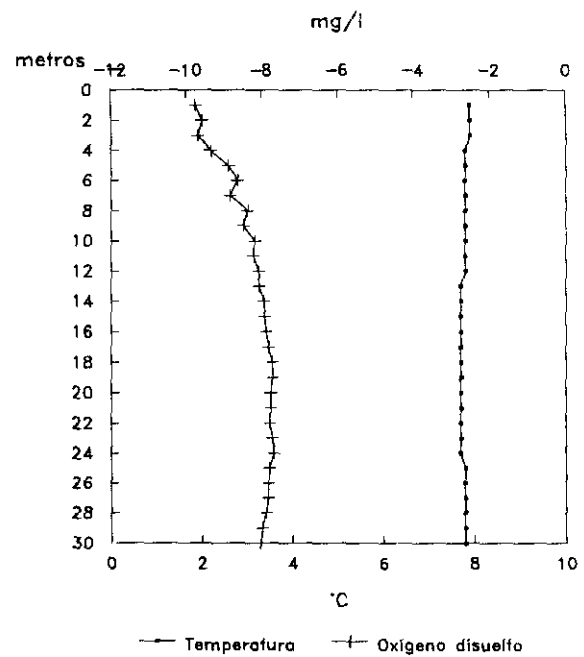
Julio



Septiembre

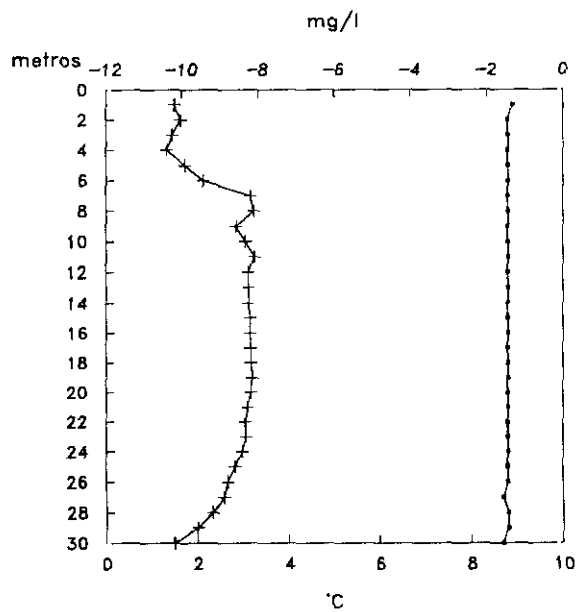


Octubre



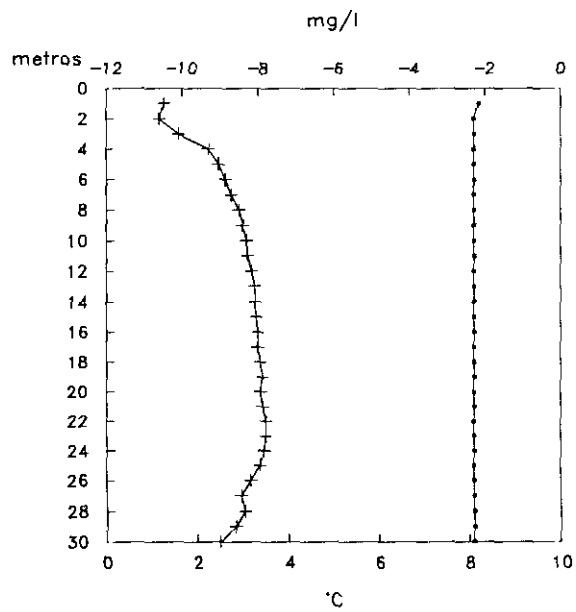
Noviembre

Fig. 3. PERFILES DE TEMPERATURA/OXIGENO DISUELTO
(meses Diciembre, Enero, Abril y Julio)



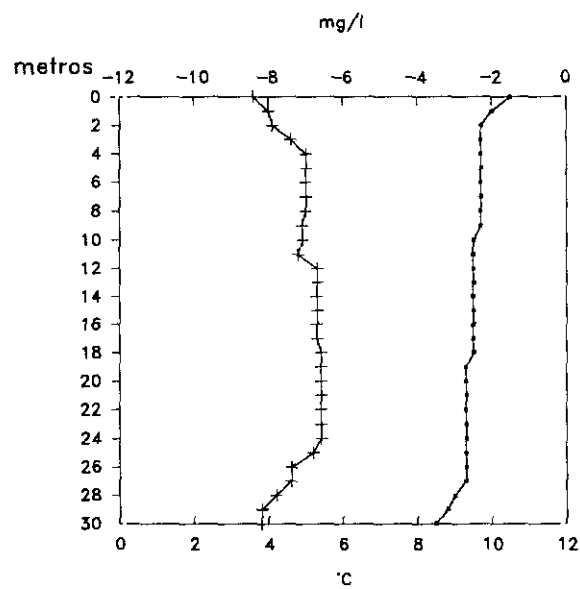
— Temperatura + Oxígeno disuelto

Diciembre



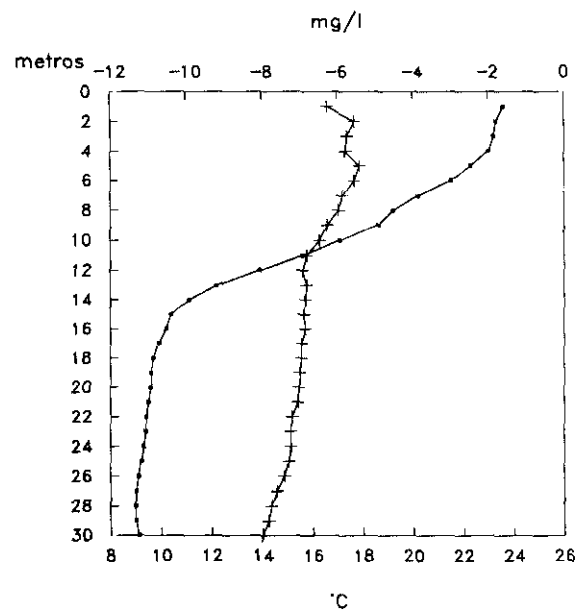
— Temperatura + Oxígeno disuelto

Enero



— Temperatura + Oxígeno disuelto

Abril



— Temperatura + Oxígeno disuelto

Julio

3.2. PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS

3.2.1. POBLACION BACTERIANA TOTAL Y CELULAS RESPIRATORIAMENTE ACTIVAS

- Distribución temporal

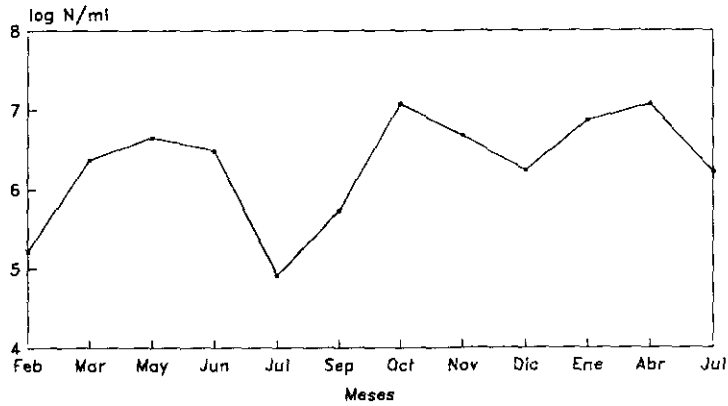
Los resultados de los recuentos directos por naranja de acridina (AODC) se encuentran representados en las figuras 4 y 5. El número total de bacterias osciló entre $7,7 \times 10^4$, en el metro 2 en el mes de Julio, y $1,4 \times 10^7$, en el metro 2 en el mes de Abril, encontrándose durante la mayor parte del estudio en el orden de 10^6 , lo que está de acuerdo con otros estudios realizados en lagos y embalses (Chrzanowski, 1985; Chrzanowski y Hubbard, 1988; Zinabu y Taylor, 1989 a, b). De las células bacterianas eran respiratoriamente activas una media de 0,31% en los meses de invierno, 0,93% en los de primavera, 8,46% en los de verano y 0,81% en los de otoño. Estos valores se pueden comparar con los de Maki y Remsem (1981) en lagos de EEUU. Otros autores (Zimmerman *et al.*, 1978) han obtenido valores mayores pero en aguas de mar costeras.

Como podemos observar en la representación de la distribución temporal del número de bacterias totales, existe un marcado descenso en el mes de Julio, que puede tener como causa el aumento de la intensidad de la radiación solar y factores relacionados, para aumentar posteriormente en Septiembre y Octubre. Estos aumentos coincidentes con el comienzo de la etapa de circulación han sido observados también por Zinabu y Taylor (1989 a), que sugieren que pueden deberse a una mayor disponibilidad de nutrientes debido a la mezcla de la columna de agua.

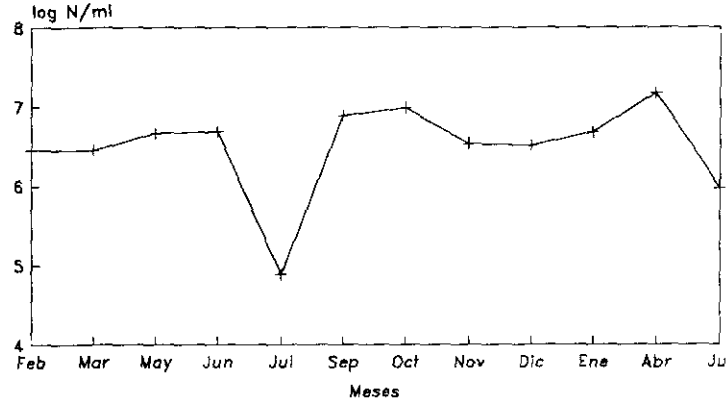
- Distribución espacial

En relación a la distribución espacial, es decir, respecto a la profundidad, ésta se encuentra representada en las figuras 6 y 7. Podemos advertir que no existe una heterogeneidad vertical, ya que la densidad bacteriana no muestra variaciones importantes con la profundidad, sólo se aprecia en algunos meses (Febrero, Julio y Septiembre) que la concentración es algo menor en la muestra de superficie. En la época estival esto puede estar ocasionado por la acción de la radiación solar y su influencia sobre otros factores. Como podemos observar no se encuentran diferencias que distingan la época de estratificación de la de circulación. Aunque, como veremos

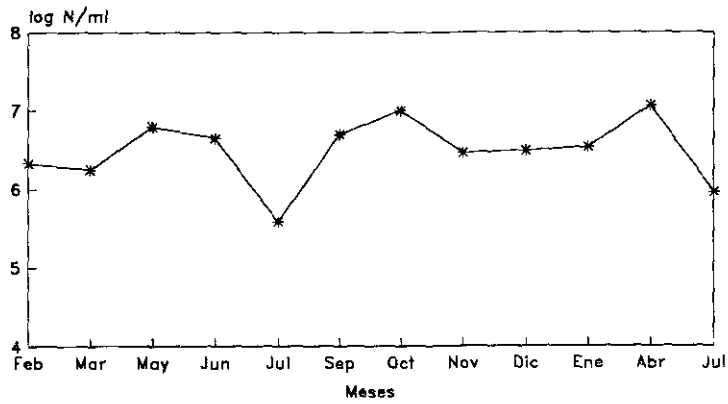
Fig.4. RECUENTO DE BACTERIAS TOTALES (AODC)



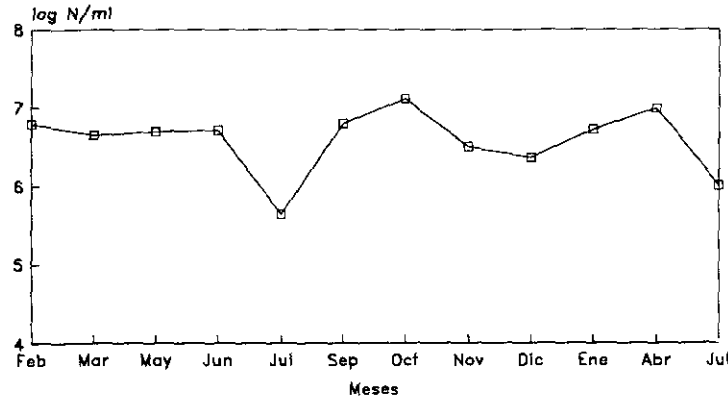
0 metros



2 metros



4 metros



6 metros

Fig.5. RECUEMTO DE BACTERIAS TOTALES (AODC)

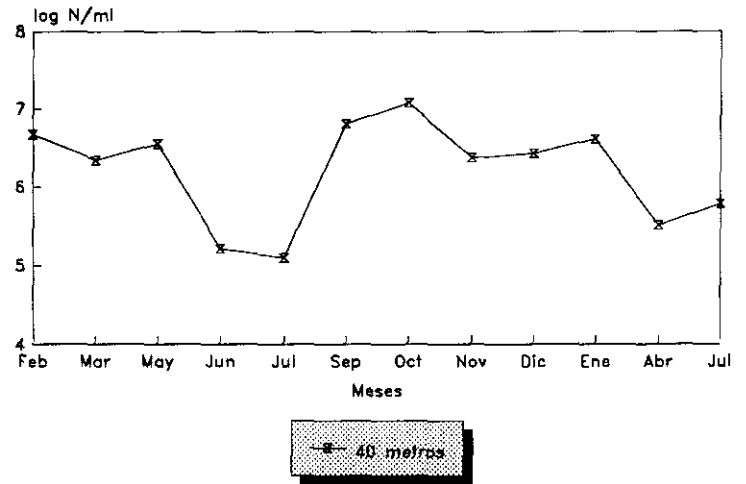
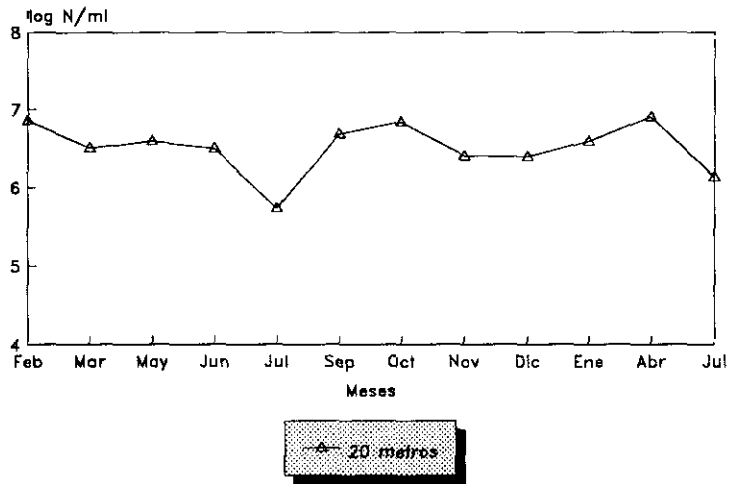
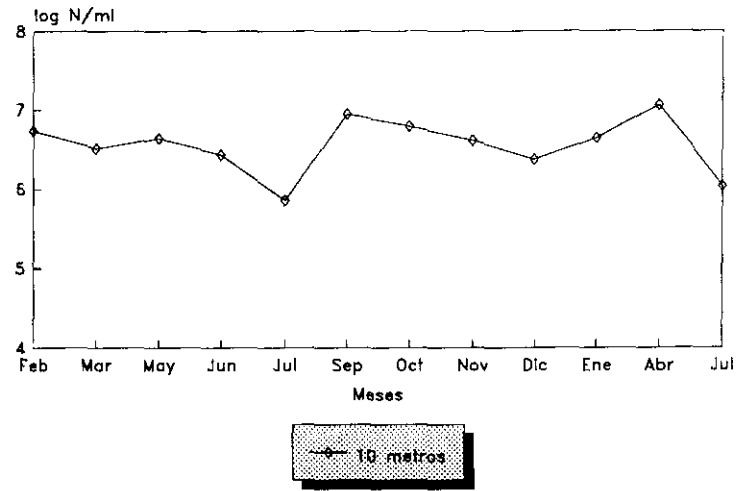
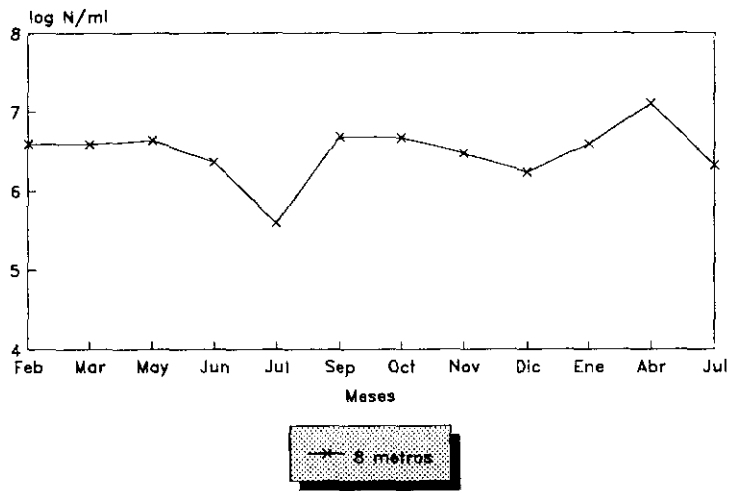


Fig. 6. PERFILES DEL RECUENTO TOTAL (AODC)

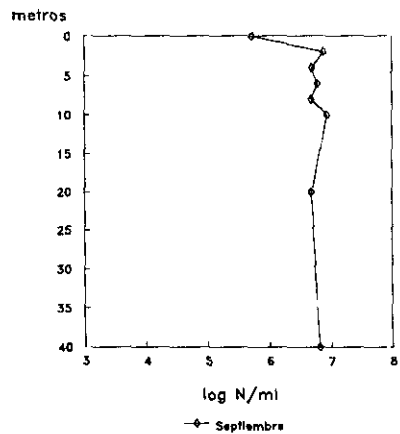
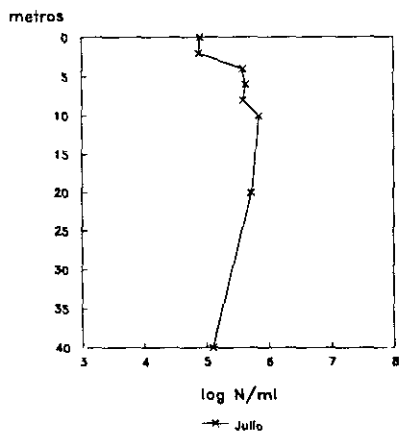
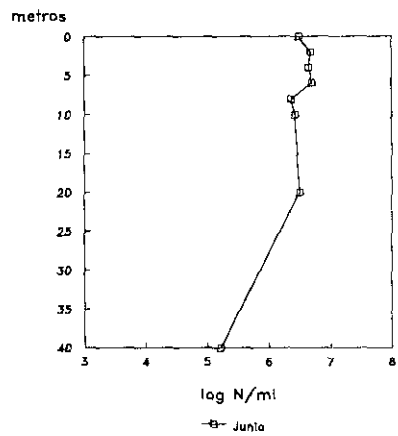
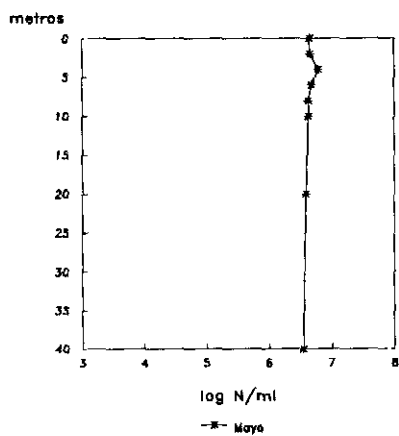
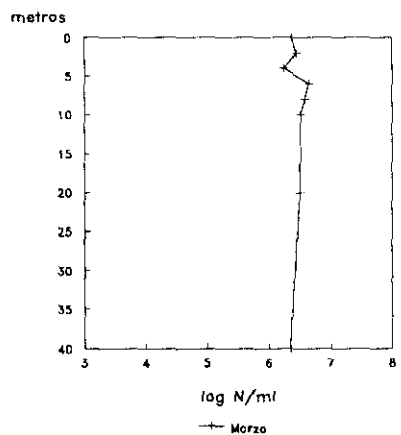
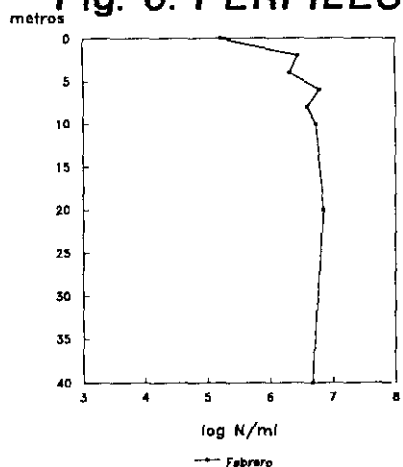
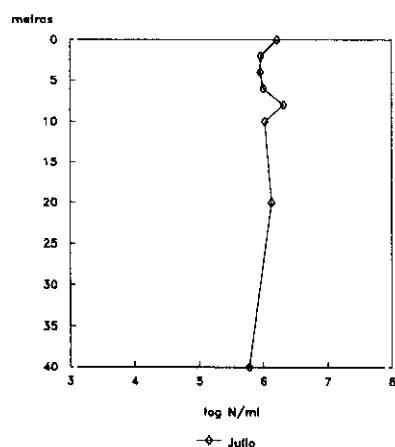
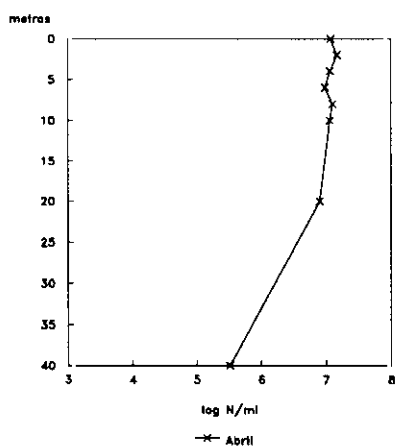
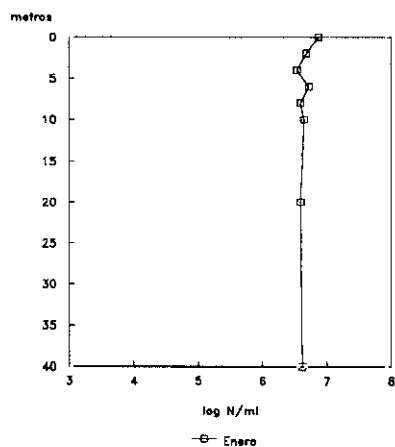
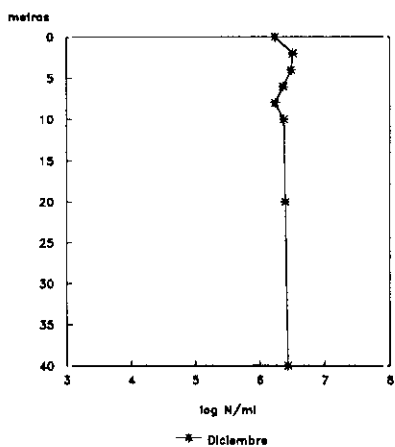
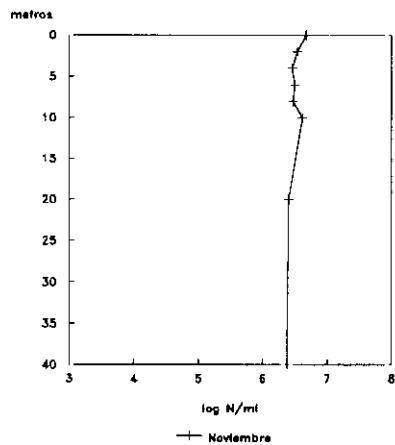
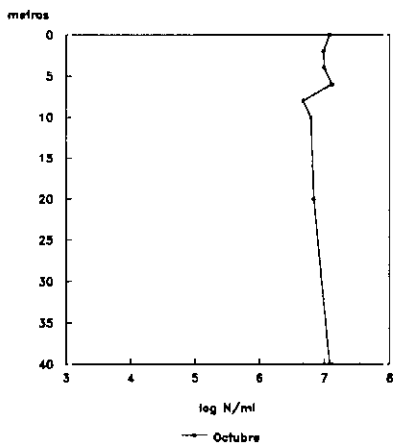


Fig. 7. PERFILES DEL RECUENTO TOTAL (AODC)



más adelante, en la distribución de otras variables sí existe heterogeneidad vertical, la densidad bacteriana total no muestra una variación vertical significativa. Esto mismo es observado por Zinabu y Taylor en su estudio en el lago Awassa (1989 a).

3.2.2. BACTERIAS HETEROTROFAS

3.2.2.1. Bacterias heterótrofas con crecimiento a 22°C

Los recuentos de bacterias heterótrofas con crecimiento a 22°C se presentan en las figuras 8 a 11. En cada una de ellas se representa la distribución temporal, en cada una de las profundidades estudiadas, de las bacterias viables a 22°C totales y aquellas que se encontraban adheridas a partículas. Se realiza la representación gráfica del logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias por mililitro frente al tiempo.

- Distribución temporal

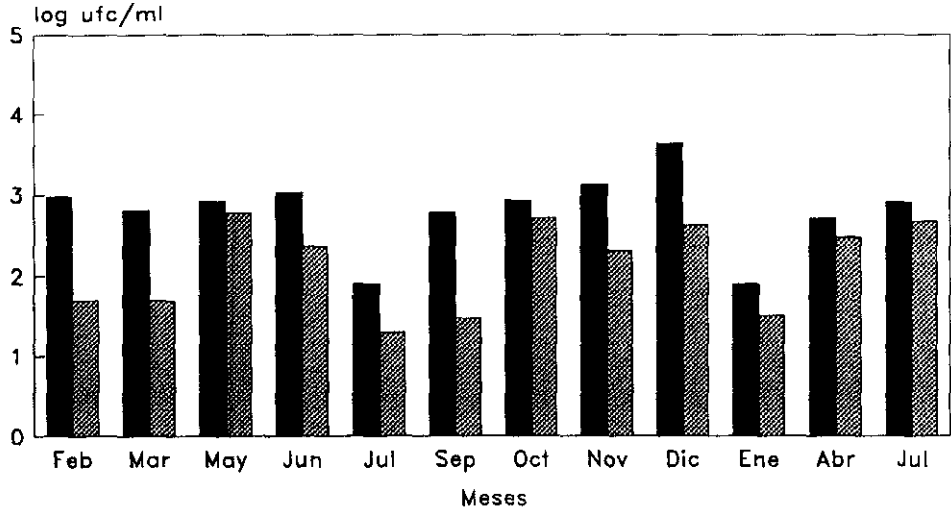
Los niveles de bacterias heterótrofas con crecimiento a 22°C oscilaron entre $5 \times 10^1/\text{ml}$ en el metro seis, en Julio del primer año y $8,59 \times 10^3/\text{ml}$, en el metro ocho en el mes de Diciembre. Los niveles fueron inferiores a los encontrados por Carballo (1987) y por nosotros, en un estudio anterior (Fernández *et al.*, 1991) en este mismo embalse, y similares a los publicados por Zinabu y Taylor (1989 a) en el lago Awassa. Los recuentos de estas mismas bacterias, adheridas a partículas, se encontraron entre $3,6 \times 10^0/\text{ml}$ en el metro cuarenta en el mes de Noviembre y $2,35 \times 10^3/\text{ml}$ en el metro cuarenta, en el mes de Julio del segundo año.

La distribución temporal muestra pocas diferencias a lo largo del estudio, sólo pequeños aumentos y disminuciones, sin seguir un modelo claro. Sólo destacar el descenso en el mes de Julio del primer año, que se produce en todas las capas y que coincide en el mismo mes en el que se producía un descenso en el recuento total (AODC). Los recuentos de las bacterias adheridas no siguen líneas paralelas a los de totales, siendo numerosas las ocasiones en las que se producen aumentos o disminuciones en las densidades de las primeras que no se corresponden con variaciones en los recuentos de las segundas.

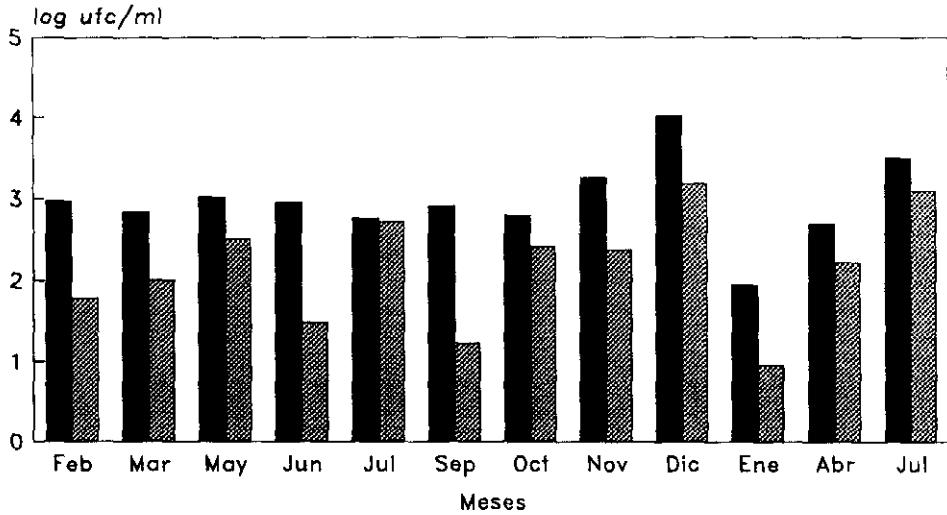
- Distribución espacial

En las figuras 12 y 13 se encuentran representados los perfiles de profundidad de estas

Fig. 8. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 22°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

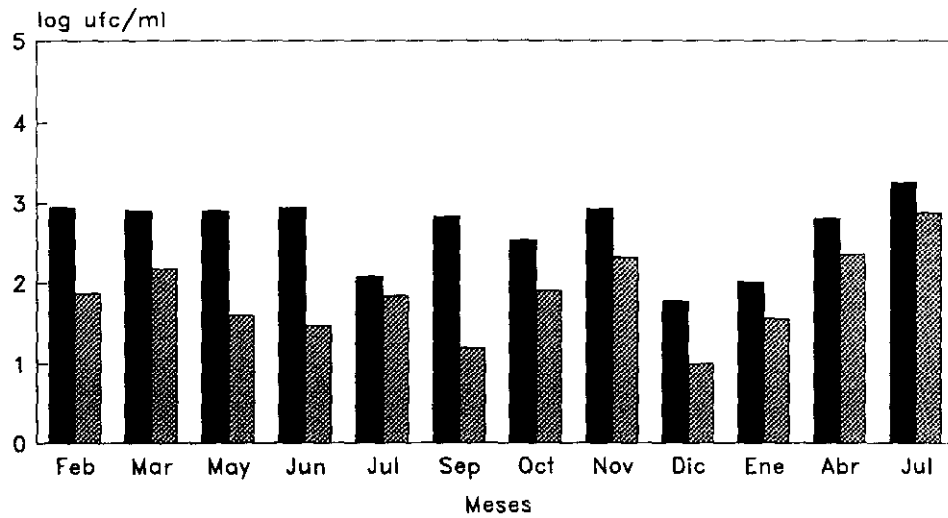


0 Metros

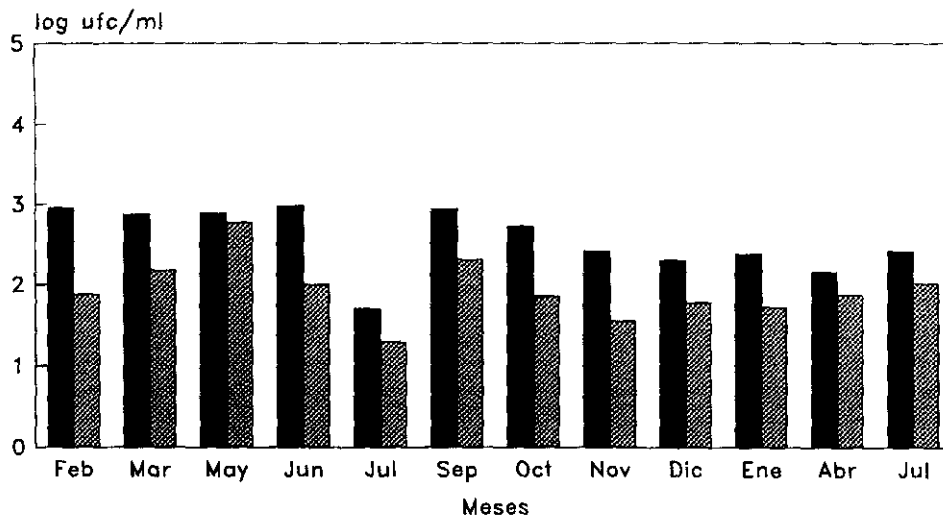


2 Metros

Fig. 9. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 22°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

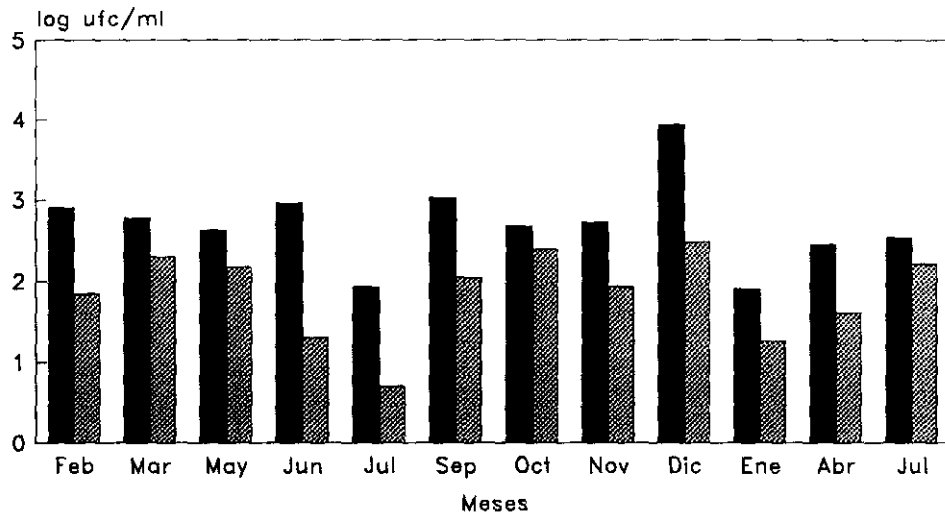


4 Metros

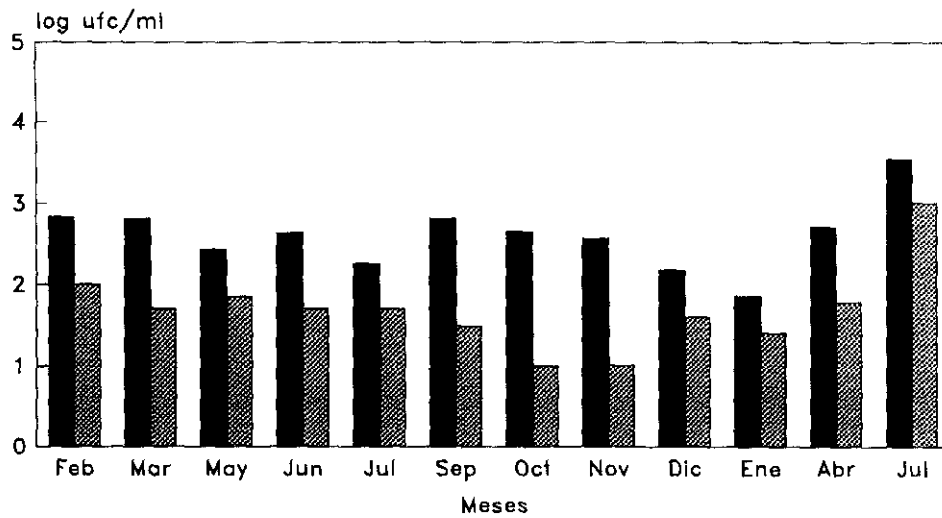


6 Metros

Fig. 10. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 22°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

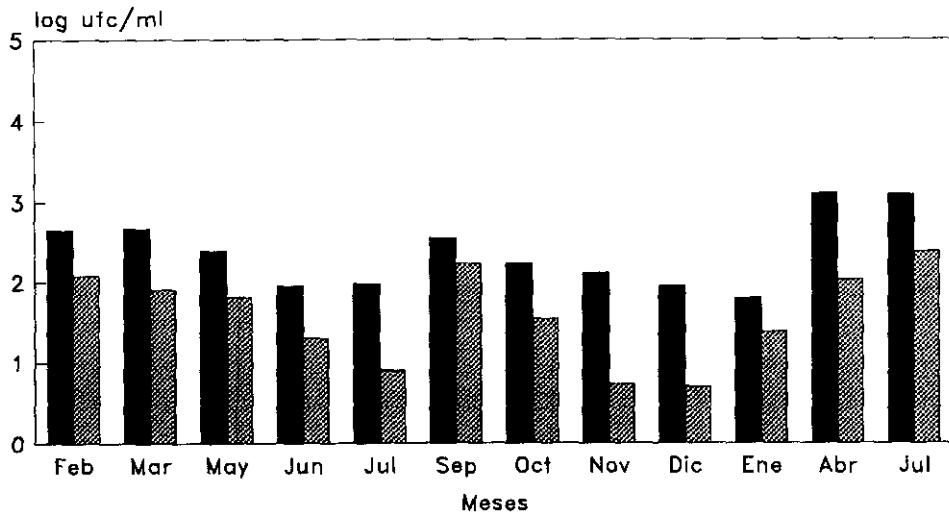


8 Metros

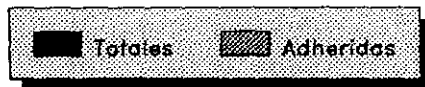
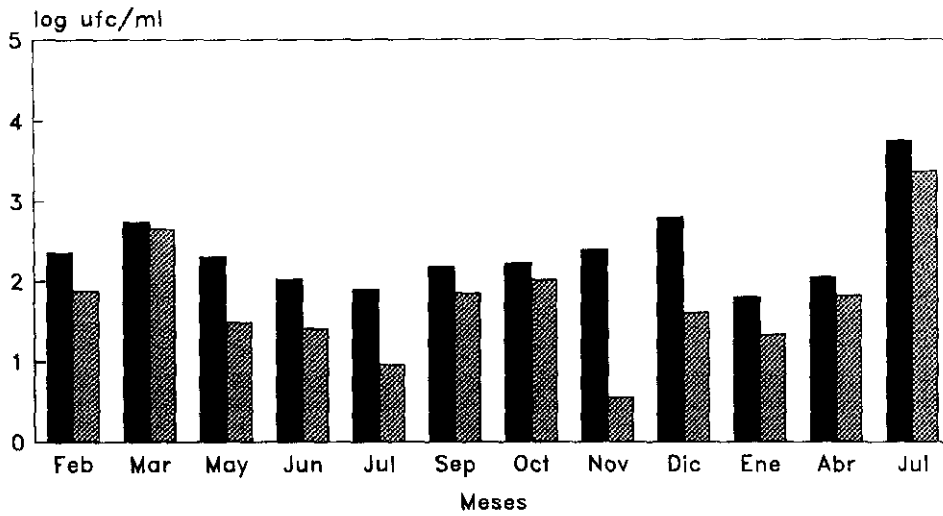


10 Metros

Fig. 11. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 22°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS



20 Metros



40 Metros

Fig. 12. PERFILES DE PROFUNDIDAD DE BACTERIAS HETEROTROFAS (22°C)

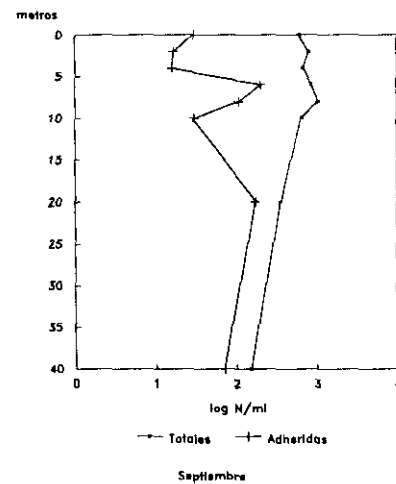
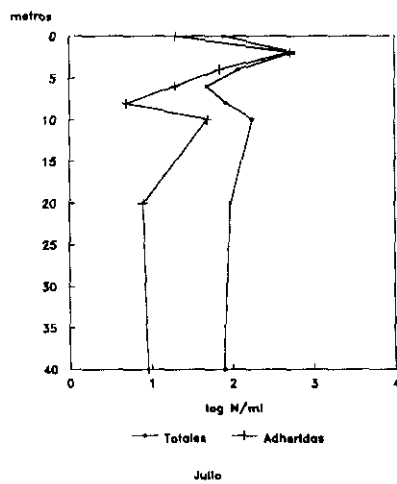
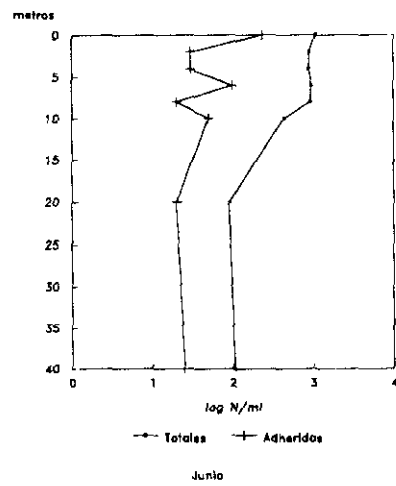
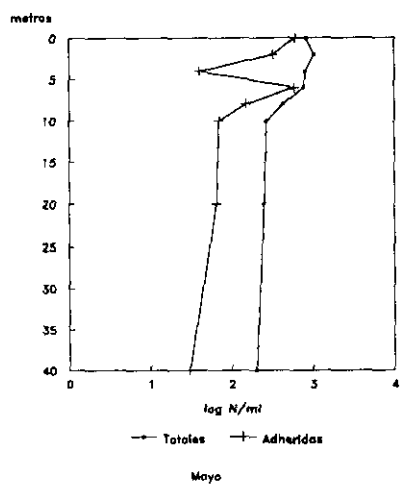
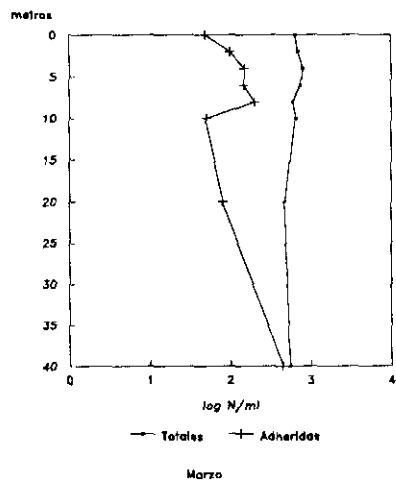
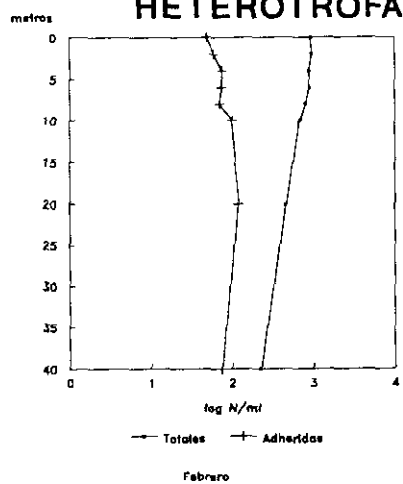
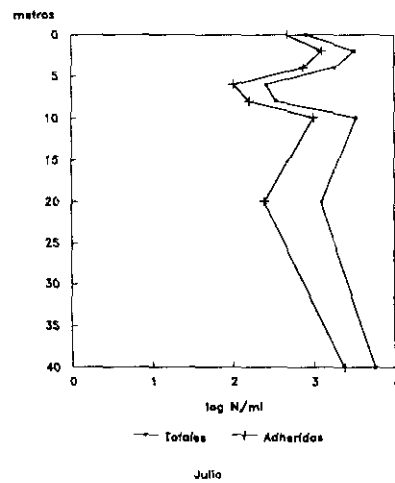
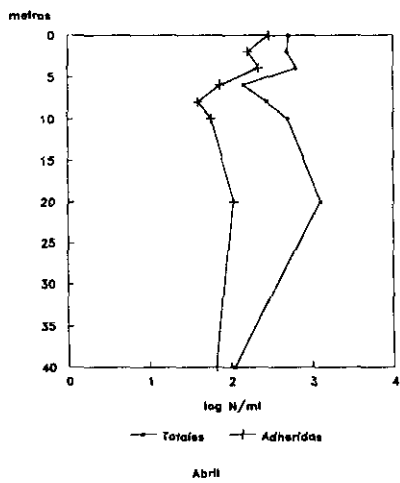
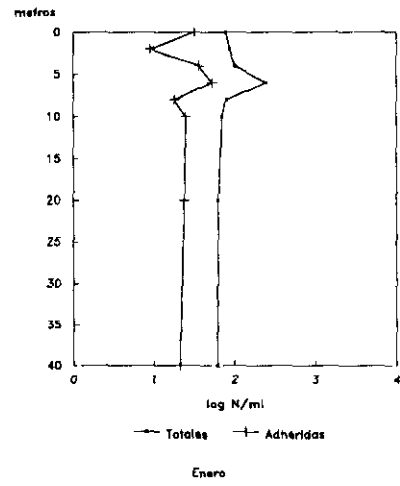
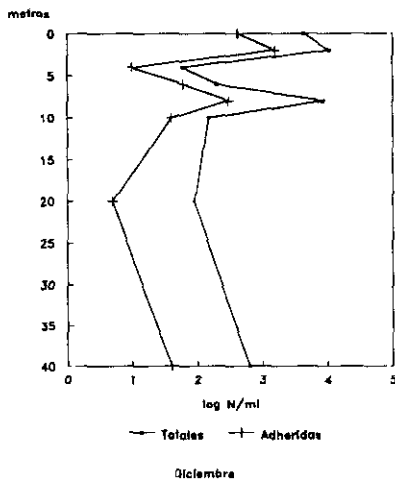
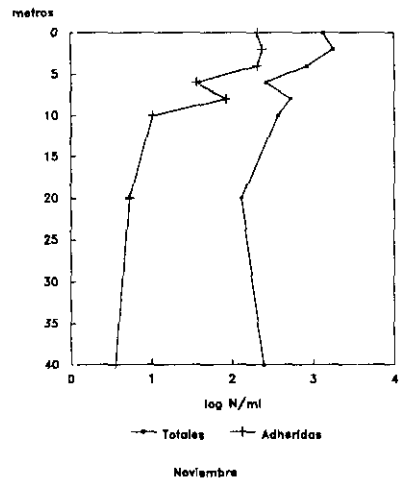
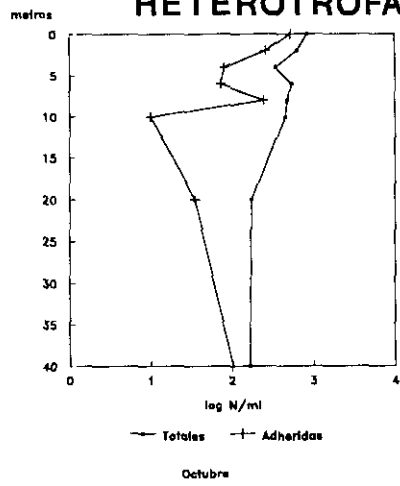


Fig. 13. PERFILES DE PROFUNDIDAD DE BACTERIAS HETEROTROFAS (22°C)



bacterias, tanto del número total, como de las que se encuentran adheridas a partículas. Observamos que no existe un modelo de distribución vertical ya que parece que la estratificación térmica no conduce a una concentración marcada en alguna de las capas. También podemos observar que la distribución del número total y del número de adheridas no están relacionadas, obteniéndose en los perfiles de prácticamente todos los meses, dos líneas totalmente independientes. Sólo resaltar el gran aumento de la adhesión en el metro dos en el mes de Julio del primer año, quizás debido a que las bacterias adheridas están más protegidas frente a la radiación solar. En Julio del segundo año se obtuvo la mayor similitud entre los recuentos de totales y adheridas, alcanzándose el valor más alto en el porcentaje de adhesión, como veremos más adelante.

3.2.2.2. Bacterias heterótrofas con crecimiento a 37°C

Los recuentos de bacterias heterótrofas con crecimiento a 37°C se presentan en las figuras 14 a 17. En cada una de ellas, igual que en el caso anterior, se representa la distribución temporal, en cada una de las profundidades estudiadas, de las bacterias viables a 37°C totales y aquellas que se encontraban adheridas a partículas. Se realiza la representación gráfica del logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias por mililitro frente al tiempo.

- Distribución temporal

El número de estas bacterias osciló entre un mínimo de $1,0 \times 10^1/\text{ml}$ en Julio del segundo año en la muestra correspondiente al metro 20, y un máximo de $1,71 \times 10^3/\text{ml}$ en el mes de Septiembre en la muestra correspondiente a la misma profundidad. Los niveles en este caso también fueron inferiores a los encontrados por Carballo (1987) y por nosotros en un estudio anterior (Fernández *et al.*, 1991) en este mismo embalse, y similares a los hallados por Zinabu y Taylor (1989 a) en el lago Awassa. Los niveles de estas bacterias que se encontraban adheridas a partículas estuvieron situados entre $4,9 \times 10^0/\text{ml}$ en la muestra correspondiente al metro 20 del mes de Julio del segundo año y $7,9 \times 10^2/\text{ml}$ en el mes de Septiembre en la misma profundidad.

La distribución temporal en este caso sí sigue una pauta similar en todas las profundidades, ya que es apreciable un descenso que comienza a producirse en el mes de Mayo, para permanecer en esta situación hasta el final del verano e iniciar una recuperación en Septiembre, que se producirá a lo largo del otoño para volver a descender en invierno. Esto podría ser debido

Fig. 14. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 37°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

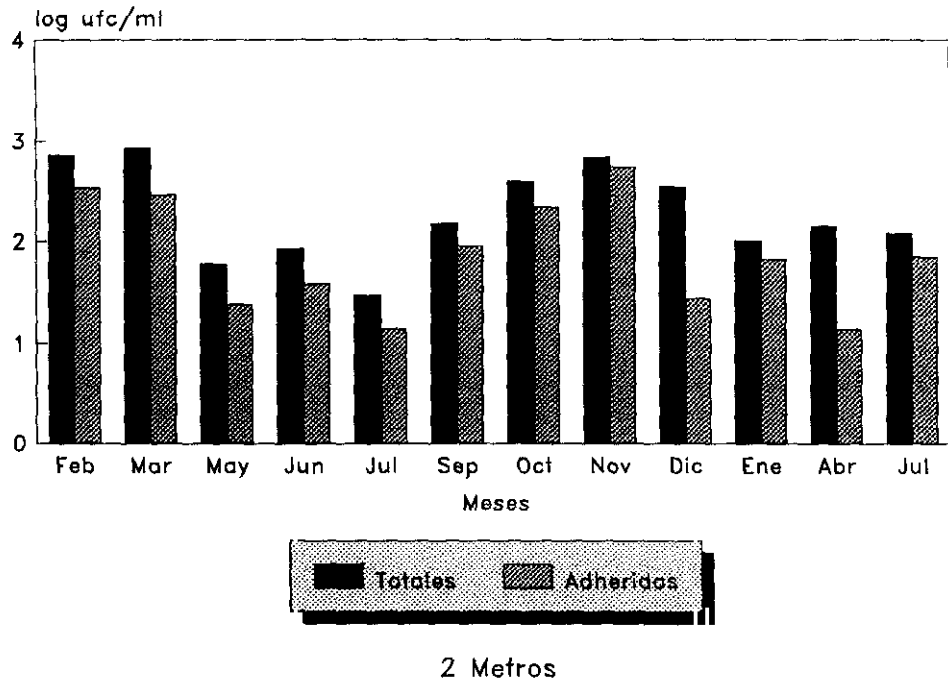
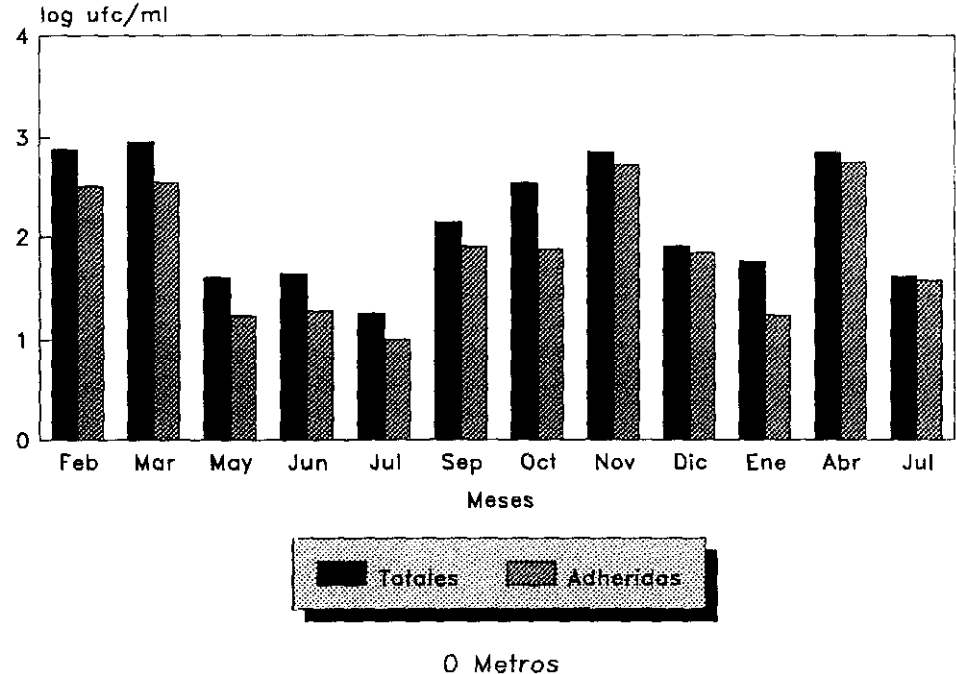
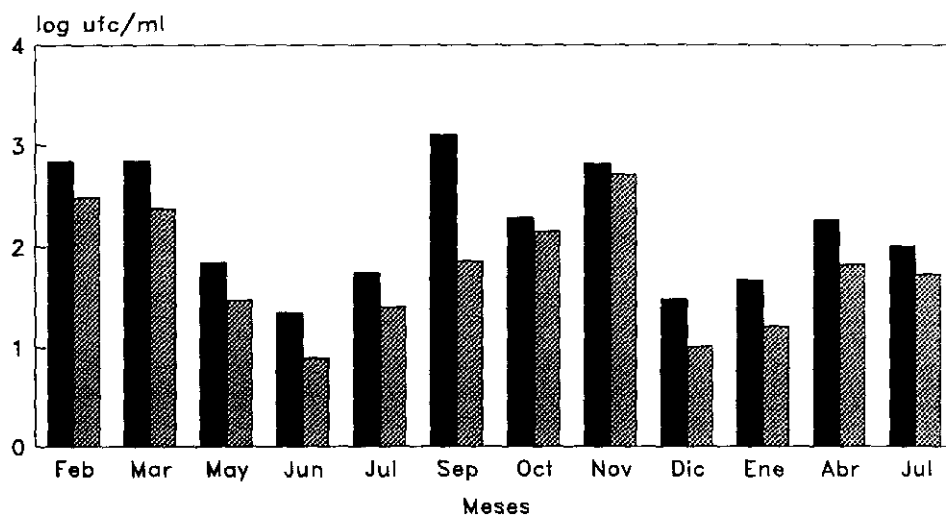
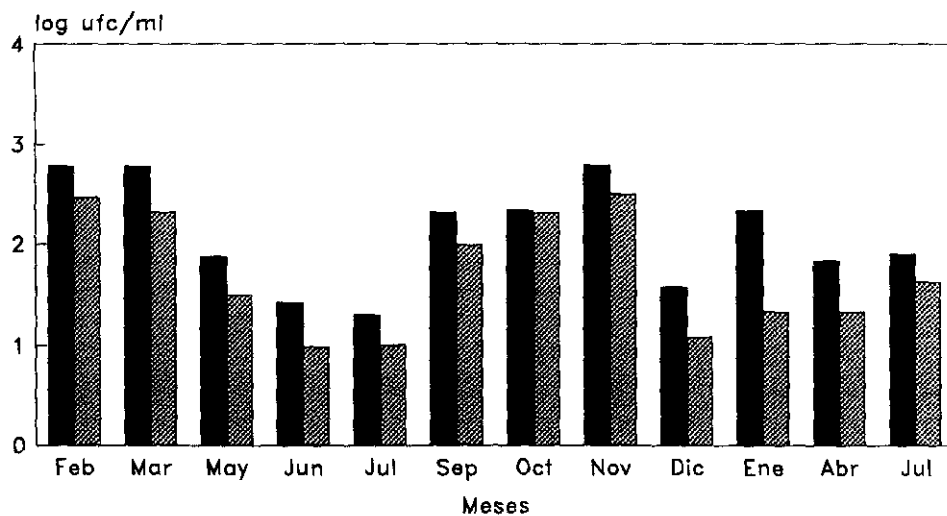


Fig. 15. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 37°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

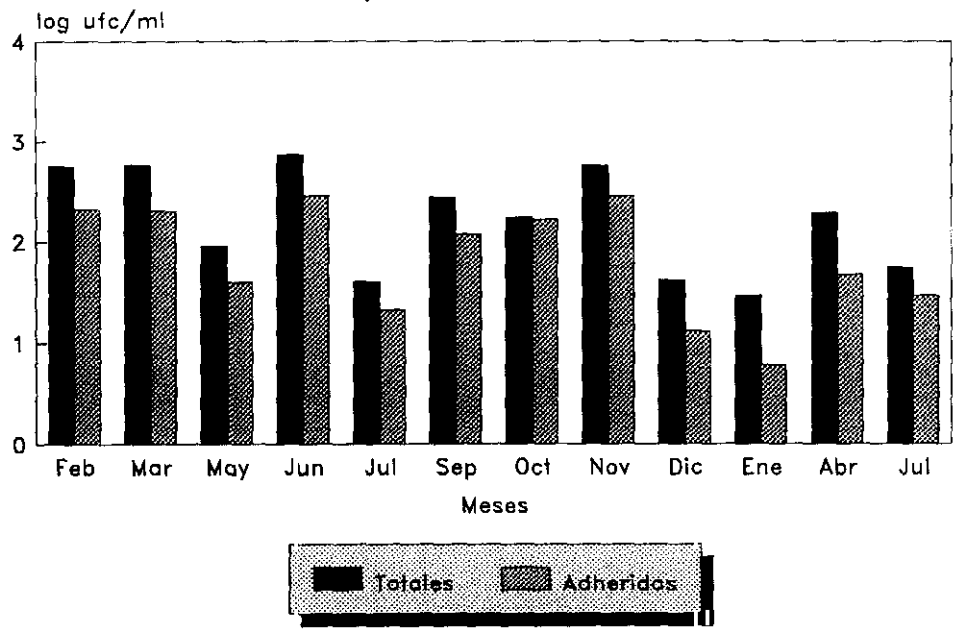


4 Metros

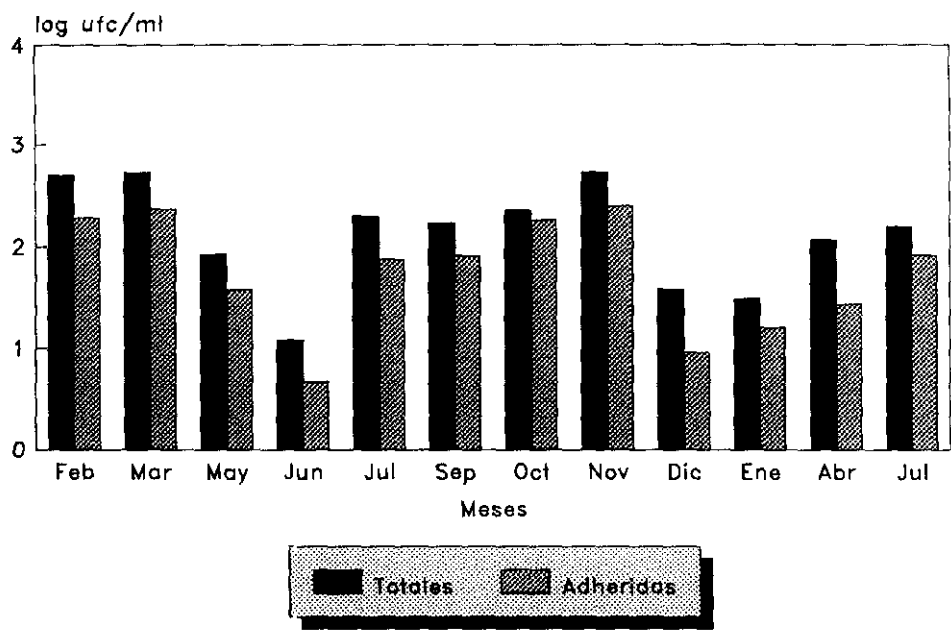


6 Metros

Fig. 16. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 37°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

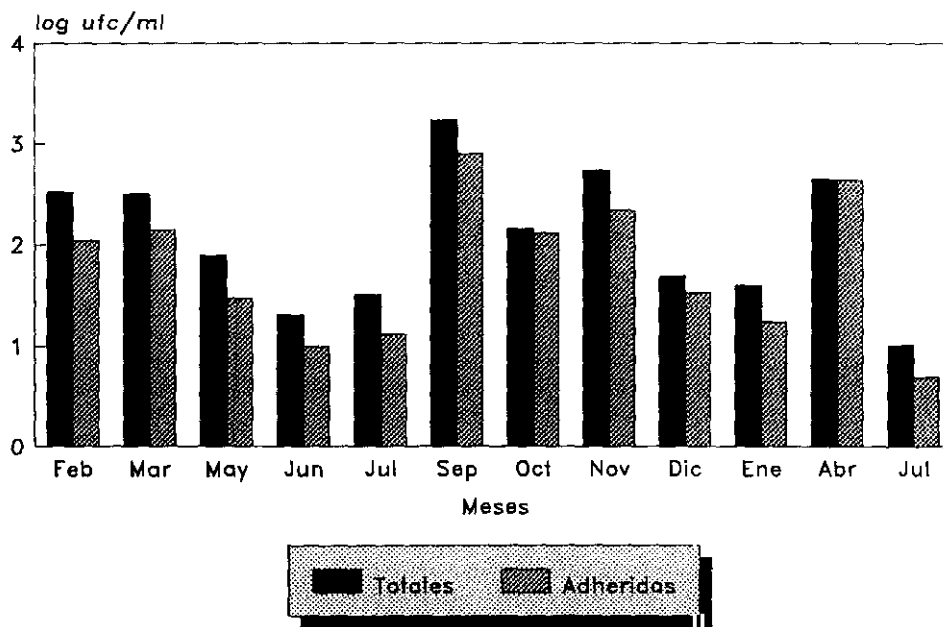


8 Metros

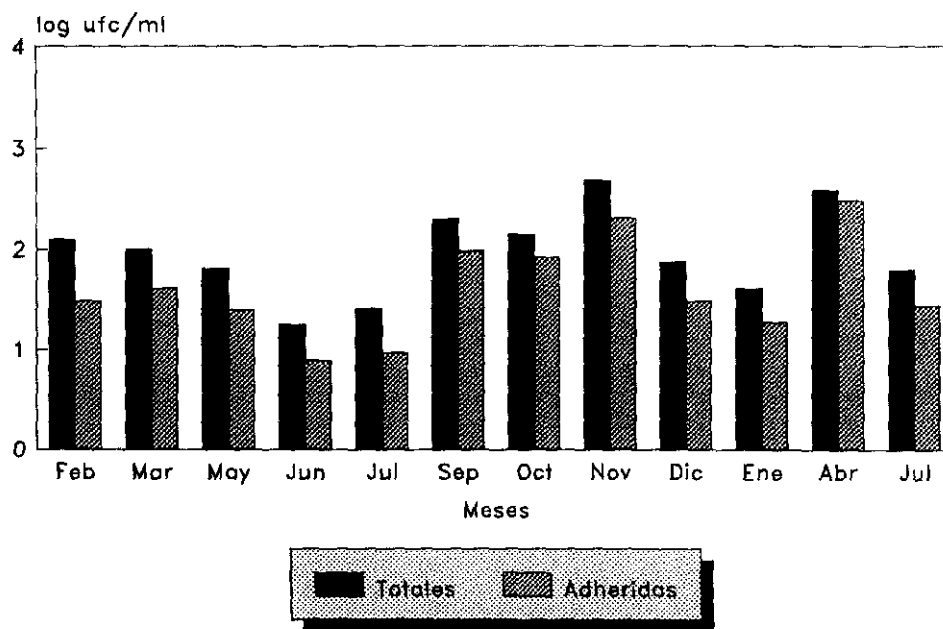


10 Metros

Fig. 17. RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFAS CON CRECIMIENTO A 37°C, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS



20 Metros



40 Metros

Fig. 18. PERFILES DE PROFUNDIDAD DE BACTERIAS HETEROTROFAS (37°C)

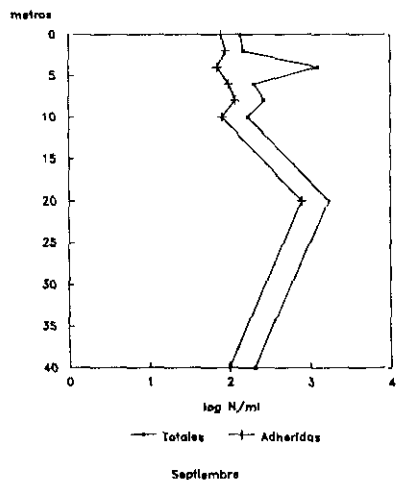
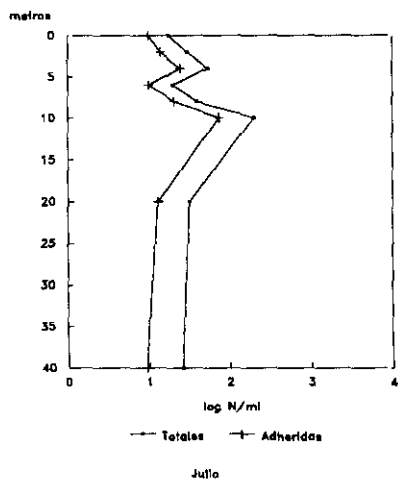
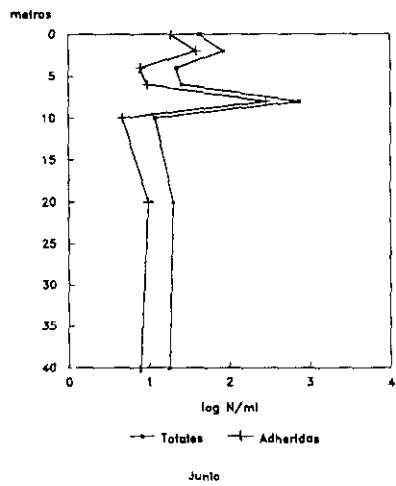
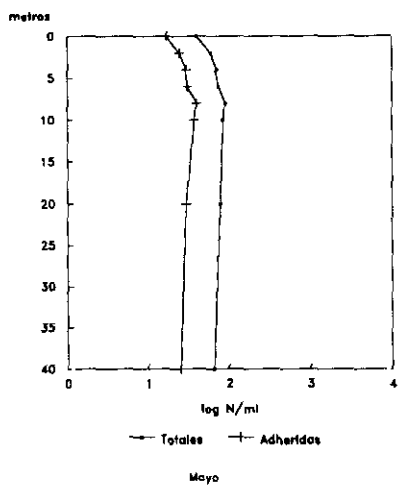
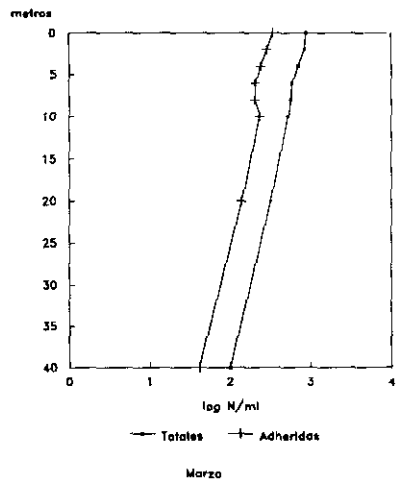
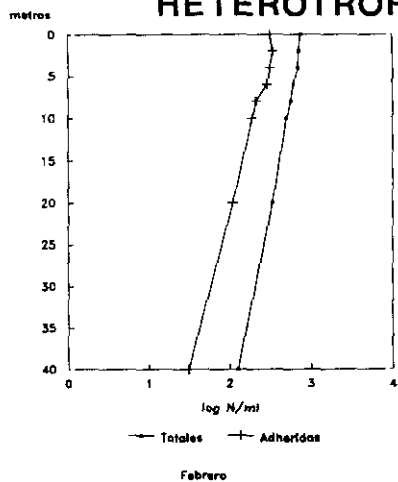
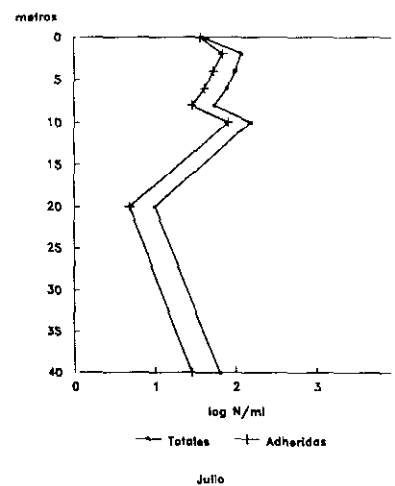
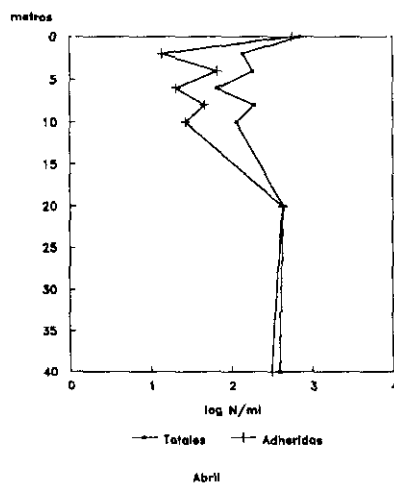
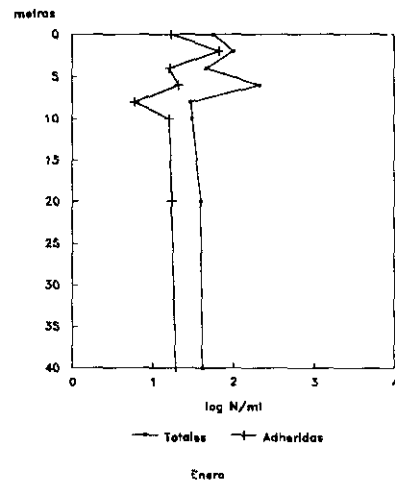
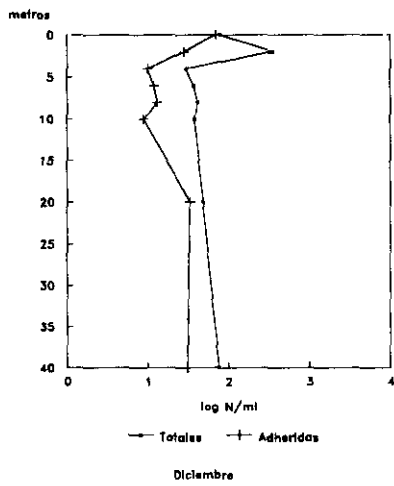
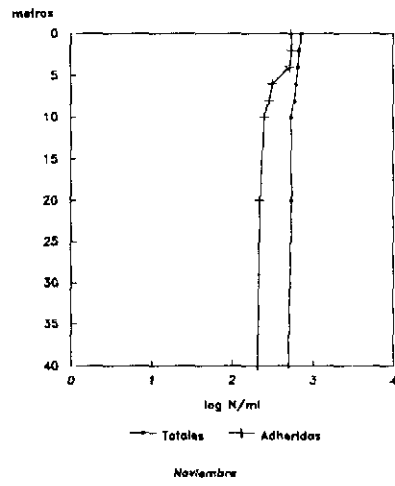
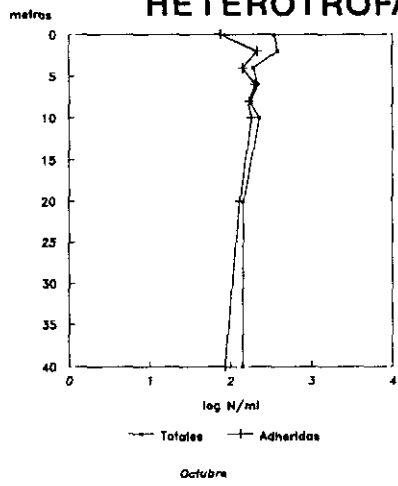


Fig. 19. PERFILES DE PROFUNDIDAD DE BACTERIAS HETEROTROFAS (37°C)



a la menor supervivencia de las bacterias autóctonas cuando se eleva la temperatura (Awong *et al.*, 1990) debido a que, al mismo tiempo, aumenta la acción tóxica de numerosos compuestos presentes en el agua y se acelera la autólisis (Granai y Sjogren, 1981). El aumento que se produce en otoño puede explicarse por las razones anteriormente citadas, al haber un descenso de la temperatura se produce un aumento de la supervivencia de las poblaciones bacterianas autóctonas.

A diferencia de las bacterias heterótrofas con crecimiento a 22°C, aquí los recuentos de las bacterias totales y adheridas a lo largo del tiempo, sí siguen un comportamiento muy similar, encontrándose las densidades bacterianas de ambas muy próximas a lo largo de todo el estudio y produciéndose los aumentos y disminuciones al mismo tiempo. Esto se debe a la gran tendencia a la adhesión encontrada entre las bacterias pertenecientes a este grupo.

- Distribución espacial

En las figuras 18 y 19 están representados los perfiles verticales de estas bacterias durante todo el periodo de estudio. En el perfil correspondiente a cada mes se reproducen las gráficas tanto del número total de estas bacterias como del número de las mismas que se encontraban adheridas a partículas. No podemos afirmar que sigan un modelo de distribución, porque, como podemos ver en la figura 18, si bien durante la época de circulación su distribución es más o menos homogénea en toda la columna de agua y al producirse la estratificación existe una mayor concentración entre el metro 8 y el 10, en la figura 19 existen diferencias significativas en las gráficas correspondientes a los meses de Diciembre y Enero, en los que, a pesar de encontrarse el embalse en circulación, no existe una distribución homogénea a lo largo de toda la columna de agua; sin embargo sí es posible observar que en Julio vuelve a producirse una situación similar a la de la estratificación del año anterior, con un aumento de la concentración entre los metros 8 y 10.

3.2.2.3. Porcentaje de bacterias heterótrofas adheridas a partículas

En la tabla 1 se pueden observar los porcentajes de bacterias heterótrofas viables con crecimiento a 22°C que se encontraban adheridas a partículas durante todo el estudio. Como podemos ver éstos fueron muy variables, estando comprendidos entre un mínimo de 1,5%, en el mes de Noviembre en la muestra del metro 40, y un máximo de 88% en el mes de Julio del primer año a la profundidad de 2 metros; dentro de este amplísimo margen, sin embargo,

predominan los valores bajos en la mayoría de las muestras. El mes en el que obtuvimos un porcentaje de adhesión mayor fue Julio del segundo año, con una media de 39,6%, y en el que lo obtuvimos menor fue Noviembre, con una media de 11,4%. Esto lo podríamos deducir

m	Feb	Mar	May	Jun	Jul	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Abr	Jul
0	5,3	7,7	72,9	21,5	25,0	4,9	61,9	15,4	9,7	40,7	57,3	58,2
2	6,3	14,3	31,3	3,3	88,0	2,1	41,1	13,2	14,7	10,3	33,3	39,6
4	8,6	18,7	5,0	3,4	58,3	2,3	23,6	24,4	16,6	35,9	34,8	41,2
6	8,3	20,0	76,7	11,4	41,2	23,5	13,6	14,0	30,0	21,8	51,3	39,5
8	8,7	33,3	35,3	2,2	5,9	10,5	52,0	16,1	3,5	22,8	14,3	47,1
10	14,7	7,7	25,9	11,5	27,7	4,7	2,4	2,8	26,6	35,2	11,5	29,8
20	26,1	17,0	26,0	22,2	8,4	48,6	20,2	4,1	5,5	38,1	8,6	19,7
40	33,3	81,8	15,0	23,8	11,5	46,6	61,8	1,5	6,3	33,8	59,1	41,9

Tabla 1. Porcentaje de bacterias heterótrofas con crecimiento a 22°C, que se presentaban adheridas a partículas, durante todo el período de estudio, a las diferentes profundidades estudiadas.

igualmente si observamos las figuras 12 y 13, en las que se encuentran representados los perfiles de profundidad de los recuentos de bacterias totales y adheridas; se puede ver que en la gráfica correspondiente al mes de Noviembre ambas líneas están muy separadas y que en la del mes de Julio del segundo año están muy próximas una de otra.

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de bacterias heterótrofas viables a 37°C, que se encontraban adheridas a partículas. Podemos ver que en este caso los valores en la mayoría de las muestras estuvieron comprendidos entre un 40% y un 50%. El máximo valor lo obtuvimos en Abril en la muestra correspondiente a los 20 metros de profundidad, con un 97,73%, y el valor mínimo en Enero a los 6 metros con un valor excepcionalmente bajo, comparado con todos los demás, un 9,81%. El mes en el que se alcanzaron los porcentajes más altos de adhesión fue Octubre con una media de 71,4%. Si contemplamos la figura 19, podemos ver que en este mes las líneas que representan las bacterias totales y las adheridas están muy próximas, lo que indica que sus recuentos fueron muy similares. Los porcentajes más bajos de adhesión en este grupo de bacterias se obtuvieron en el mes de Enero con una media de 37,8%, aunque valores muy semejantes se alcanzaron en los meses de Febrero y Marzo con medias de 39,6%

y 38,4% respectivamente.

m	Feb	Mar	May	Jun	Jul	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Abr	Jul
0	42,6	38,9	42,5	44,2	55,6	57,2	21,7	74,9	87,5	29,8	79,2	92,5
2	47,9	34,1	40,8	45,9	46,7	60,0	55,9	80,9	80,0	66,0	10,0	58,3
4	45,3	34,3	42,2	35,5	45,5	57,2	74,1	79,1	33,3	34,8	36,1	53,0
6	47,5	35,0	41,3	36,9	50,0	47,8	93,1	51,2	32,4	9,8	30,9	52,5
8	37,5	35,7	43,9	38,5	52,5	43,7	96,0	49,0	31,7	20,7	24,4	52,7
10	38,0	44,4	44,2	39,2	37,5	47,7	80,3	47,0	23,7	51,6	23,3	52,9
20	32,8	43,8	37,8	49,0	40,6	46,2	89,7	40,9	68,8	43,6	97,7	49,0
40	24,8	41,0	38,5	43,3	35,8	48,5	60,7	42,1	40,8	46,4	79,5	44,5

Tabla 2. Porcentaje de bacterias heterótrofas con crecimiento a 37°C, que se presentaban adheridas a partículas, durante todo el período de estudio, a las diferentes profundidades.

El porcentaje de bacterias que se encontraban adheridas a partículas es notablemente superior entre las heterótrofas con crecimiento a 37°C, siendo además su comportamiento respecto a la adhesión más constante, es decir, no existen grandes saltos en estos porcentajes, mientras que el porcentaje de bacterias adheridas entre las heterótrofas con crecimiento a 22°C sufre grandes variaciones, no presentando un comportamiento homogéneo. Algunos autores sugieren que las bacterias heterótrofas con crecimiento a 22°C son en su mayor parte autóctonas, mientras que las de crecimiento a 37°C son predominantemente alóctonas. Esto podría explicar las diferencias observadas respecto a la adhesión, puesto que las bacterias autóctonas están adaptadas a las condiciones que imperan en el medio y a las bajas concentraciones de nutrientes existentes en el agua, con lo que no se beneficiarían significativamente de la vida en adhesión (Hoppe, 1984), no necesitando, por tanto, adherirse a partículas, pudiendo sobrevivir a concentraciones muy bajas de principios nutritivos, mientras que las alóctonas tenderían a la adhesión buscando un ambiente más rico (Costerton y Cheng, 1982; DeFlann *et al.*, 1990; Pringle y Fletcher, 1983).

3.2.3. BACTERIAS DEL GRUPO COLIFORME, TOTALES Y ADHERIDAS A PARTICULAS

3.2.3.1. Justificación del método empleado

Antes de presentar y discutir los resultados obtenidos, creemos de importancia resaltar algunos aspectos sobre el método y los medios de cultivo utilizados para llevar a cabo estos recuentos.

Después de realizar pruebas preliminares con varios medios, utilizando tanto la técnica de filtración por membrana (FM) como la de número más probable (NMP), se eligió la primera por ser sencilla, precisa, más cuantitativa (Franzblau *et al.*, 1984; Hsu y Williams, 1982) ya que proporciona recuentos directos en lugar de un índice de probabilidad (McDaniels *et al.*, 1987), y por obtener con ella resultados definitivos más rápidamente que por NMP (Doyle *et al.*, 1984, LeChevallier *et al.*, 1983 a, b; LeChevallier y McFeters, 1984).

El medio de elección fue el caldo m-Endo (Burlingame *et al.*, 1984; Rivera *et al.*, 1988; Shaffer, 1989), seleccionado después de haber utilizado algunos de los más comúnmente usados (caldo lactosado, agar Endo, agar McConkey, agar Chapman-TTC, etc.). La elección se realizó por obtenerse con él mayor recuperación y una mayor reproductibilidad de los resultados.

Se ha publicado en numerosas ocasiones que bacterias no coliformes pueden interferir con la detección de coliformes, tanto por NMP como por filtración por membrana (Burlingame *et al.*, 1984; Clark, 1980; Doyle *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1981 b). Por NMP se puede producir enmascaramiento de la producción de gas, por competición con los nutrientes (Evans *et al.*, 1981 b); sobrecrecimiento de bacterias no coliformes mejor adaptadas a crecer en los medios de NMP que los coliformes dañados (Bissonnette *et al.*, 1975); formación por parte de bacterias no coliformes de productos antagonistas para el crecimiento o la actividad bioquímica de coliformes (Means y Olson, 1981). Por filtración se puede producir supresión del crecimiento por liberación de sustancias antagonistas o por competir por los nutrientes (Doyle *et al.*, 1984; Finch *et al.*, 1987; Hsu y Williams, 1982; LeChevallier y McFeters, 1985 a, b; McFeters *et al.*, 1982)

Nosotros mismos pudimos comprobar esta inhibición tanto en este trabajo como en otros anteriores (Fernández, 1985; Fernández *et al.*, 1991), en los que observamos, además, que esta interferencia en la detección de coliformes se producía principalmente por bacterias del género

Pseudomonas, especialmente por *P. aeruginosa*. Diversos autores han citado también a esta bacteria como una de las principales responsables de la inhibición de coliformes tanto en NMP como en filtración por membrana (Burlingame *et al.*, 1984; LeChevallier y McFeters, 1985 a).

Debido a esta inhibición de las bacterias coliformes por parte de no coliformes que estén creciendo activamente, es necesario un procedimiento que reduzca o inhiba el crecimiento de los no coliformes. La incubación anaerobia cumple estos requerimientos y ha sido sugerida como técnica para mejorar la detección de coliformes en aguas superficiales, por filtración por membrana (LeChevallier *et al.*, 1983 a, b). Su simplicidad y bajo coste puede permitir su uso en monitorizaciones.

También hemos encontrado en la bibliografía la aparición de coliformes atípicos, que no producían brillo metálico o que eran lactosa negativos:

- sin brillo metálico: Burlingame *et al.* (1984) observan que sólo una fracción de *Enterobacter cloacae* aislado de aguas naturales producía brillo metálico. Franzblau *et al.* (1984) citan que de los aislados de agua natural, aproximadamente el 50% de los que no producían brillo eran coliformes, predominantemente *Citrobacter* y *Enterobacter*.
- lactosa negativos: gran parte de las colonias lac (-), crecidas en medios de recuento como m-FC, se identifican como *E. coli* (Cenci *et al.*, 1990; Rychert y Stephenson, 1981). Algunos autores atribuyen esto a que algunos factores ambientales (como la temperatura) y/o de presión (residuos tóxicos, biocidas, cloro, etc.) pueden interferir con la expresión del operón lactosa, especialmente en el primer aislamiento sobre medios selectivos (Feng y Hartman, 1982; McFeters *et al.*, 1982).

Por estas razones algunos autores aconsejan que para realizar la confirmación de las colonias crecidas en los medios de recuento, es más conveniente realizar las pruebas de la B-galactosidasa, o la del ONPG, y la oxidasa (Cenci *et al.*, 1990; Rychert y Stephenson, 1981). Nosotros también pudimos observar esto mismo, por lo que además de realizar la confirmación en caldo lactosado, siempre se efectuaban las pruebas citadas en el apartado 2.3.7.1.

3.2.3.2. Recuentos

Los resultados obtenidos en los recuentos del número total de coliformes totales y fecales, y del número de los que se encontraban adheridos a partículas, se encuentran recogidos en las

figuras 20 a 23, para los coliformes totales, y 24 a 27 para los fecales. La representación se realiza como logaritmo del número de unidades formadoras de colonias (ufc) por 100 ml, frente al tiempo.

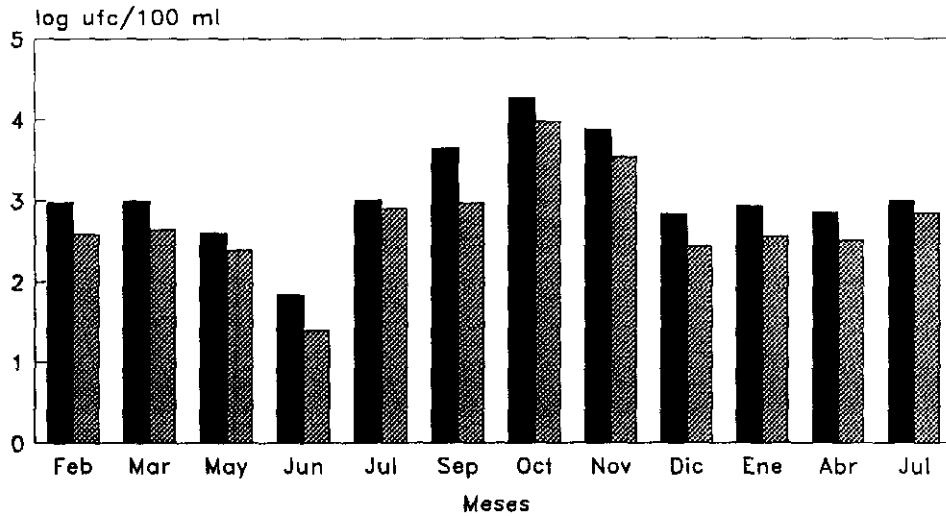
- Distribución temporal

El número de **coliformes totales** (figuras 20-23) se encontraba durante la mayoría del período de estudio en el orden de 10^3 por 100 ml, valores inferiores a los encontrados por nosotros (Fernández, 1985) en este mismo embalse, y a los encontrados por Bergstein-Ben y Stone (1991) durante la mayor parte de su estudio en el lago Kinneret, a los publicados por Maul y Block (1983) y a los encontrados por Chen y Hickey (1983), y mucho menores que los detectados por Cenci *et al.* (1990) y por McDaniels *et al.* (1987) en distintas aguas superficiales. El mínimo se obtuvo en el mes de Junio en la muestra de superficie con un recuento de 70 ufc/100 ml, y un número de bacterias adheridas de 25 ufc/100 ml, y el máximo se alcanzó en el mes de Octubre en la muestra de 10 m de profundidad, con un recuento de $1,38 \times 10^4$ ufc/100 ml para totales y $8,20 \times 10^3$ /100 ml para adheridas a partículas.

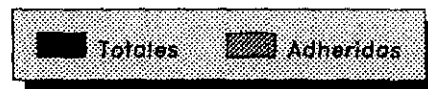
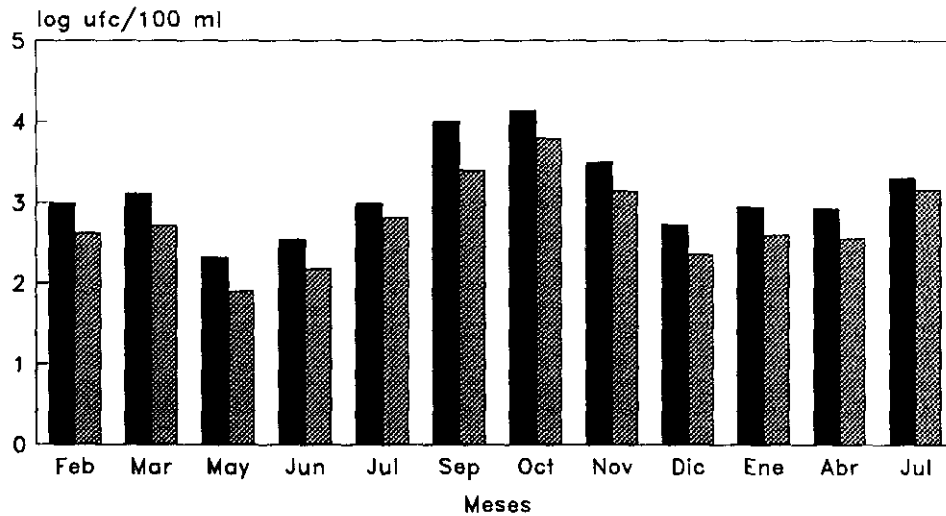
La distribución temporal es muy similar a la observada en las figuras 14 a 17 correspondientes a los recuentos de bacterias heterótrofas viables a 37°C. En este caso la línea que representa los recuentos de bacterias adheridas también sigue la misma distribución que la de las totales, estando ambas, en todo momento, muy próximas.

Como podemos observar, se produce una disminución en todas las profundidades en el mes de Mayo. Esto podría ser debido, como se ha citado con anterioridad, a la menor supervivencia de las bacterias autóctonas cuando aumenta la temperatura (Awong *et al.*, 1990) debido a que también aumenta la acción tóxica de numerosos compuestos presentes en el agua y se acelera la autólisis (Granai y Sjogren, 1981), además de que los efectos deletéreos combinados de la luz y la presencia de microbiota natural son generalmente mayores a temperaturas más altas (Anderson *et al.*, 1983; McCambridge y McMeekin, 1979; Rhodes y Kator, 1988). En algunas profundidades el descenso continúa en el mes de Junio, especialmente en la muestra correspondiente a superficie. En los meses posteriores se observa un ligero aumento, puesto que, a pesar de que la subida de las temperaturas continúa, también aumentan las descargas urbanas debido al aumento de población en los pueblos de los alrededores por el período vacacional; por lo tanto, aunque la temperatura tenga un efecto negativo sobre la supervivencia de estas poblaciones bacterianas, al ser el número que llega al embalse mucho

Fig. 20. RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES. NUMERO TOTAL Y NUMERO DE ADHERIDAS A PARTICULAS

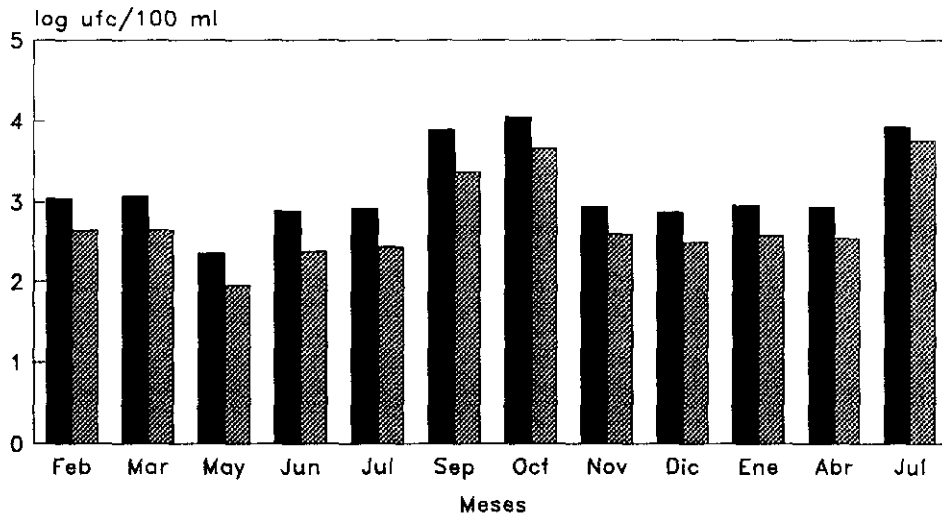


0 Metros

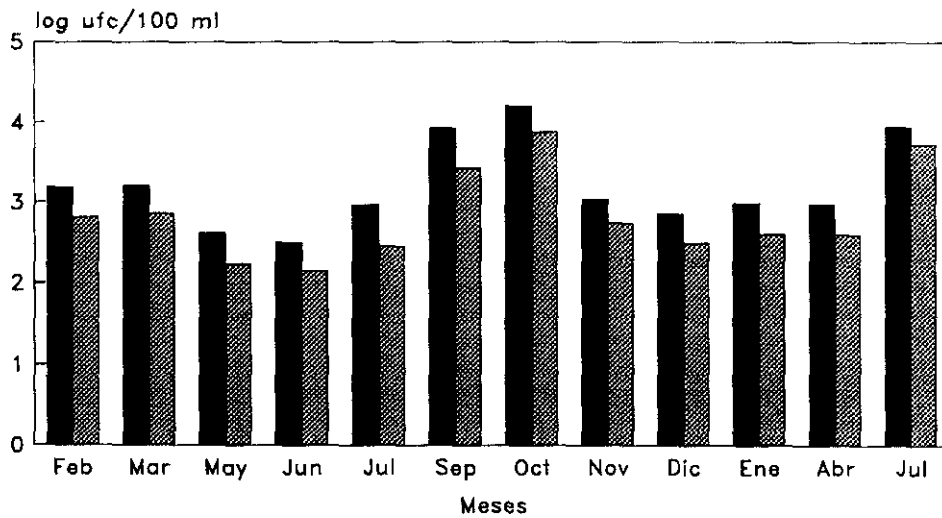


2 Metros

Fig. 21. RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES. NUMERO TOTAL Y NUMERO DE ADHERIDAS A PARTICULAS

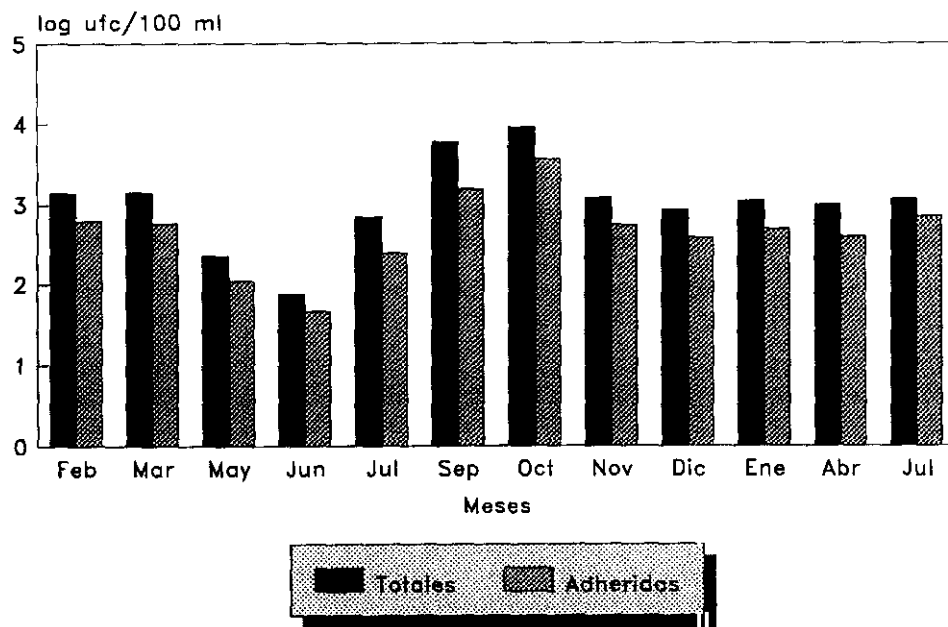


4 Metros

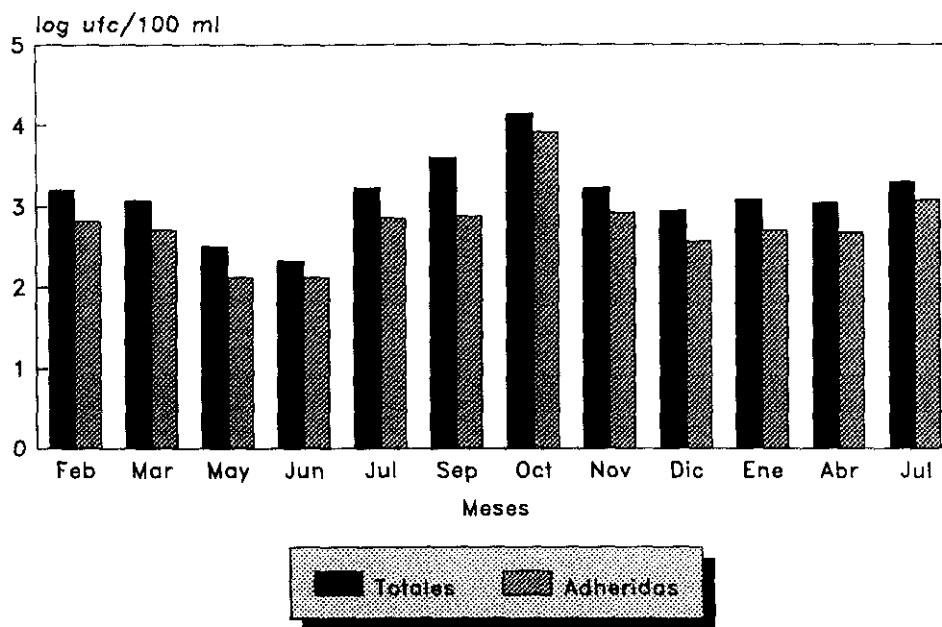


6 Metros

Fig. 22. RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES. NUMERO TOTAL Y NUMERO DE ADHERIDAS A PARTICULAS

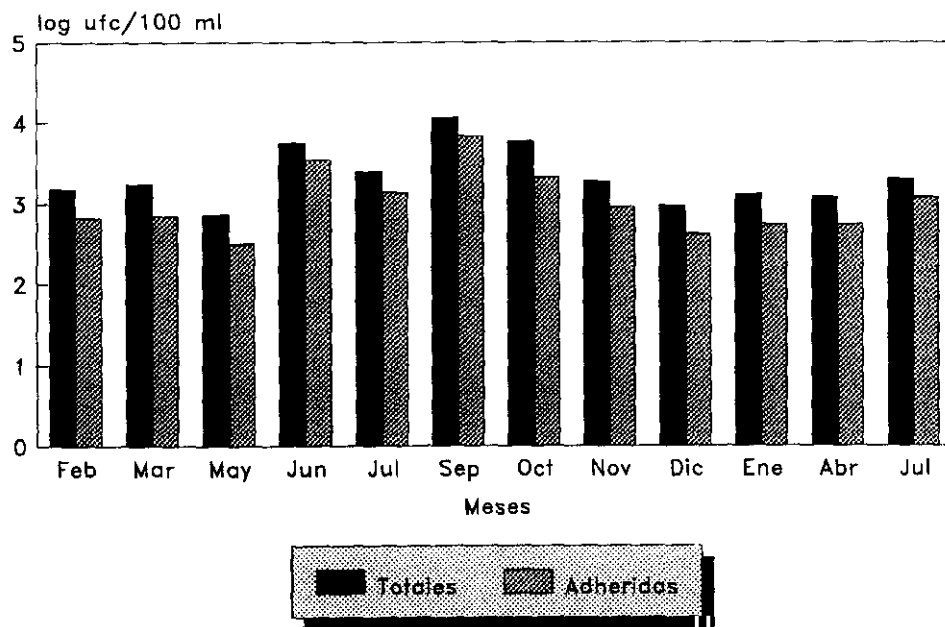


8 Metros

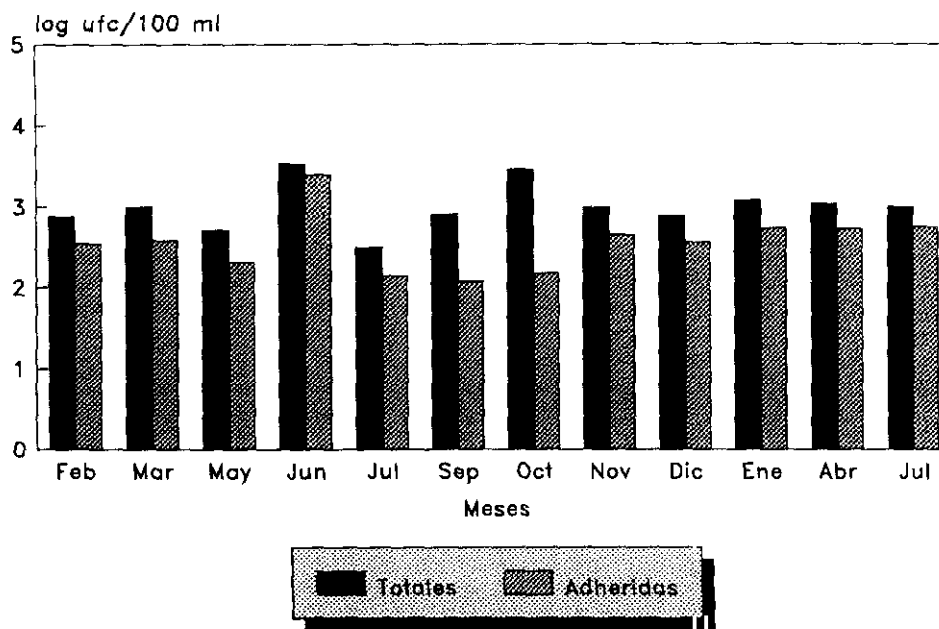


10 Metros

**Fig. 23. RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES
 NUMERO TOTAL Y NUMERO DE ADHERIDAS A PARTICULAS**



20 Metros



40 Metros

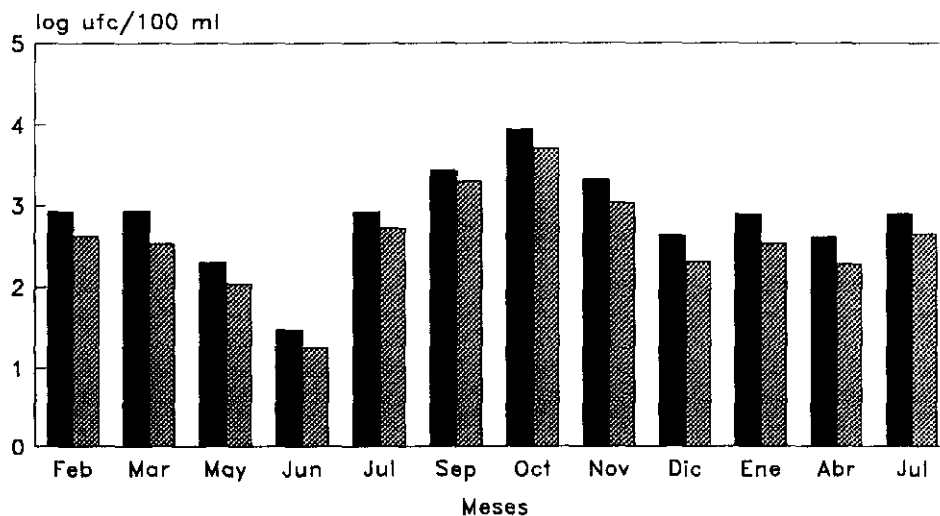
mayor, el resultado es un ligero aumento. En el mes de Octubre se observa un importante incremento en todas las capas del embalse, que puede explicarse por las razones anteriormente citadas, se produce un aumento de la supervivencia de las poblaciones bacterianas alóctonas. En los meses siguientes se vuelve a producir una disminución en los recuentos, que se mantienen estables hasta que al final del estudio, en el último mes, se produce un ligero aumento que se podría explicar de igual manera que el correspondiente al mismo mes del año anterior.

El número de **coliformes fecales** (figuras 24-27) se encontró durante gran parte del periodo de estudio en el orden de $10^2/100$ ml. Estos valores son inferiores a los encontrados por nosotros (Fernández, 1985) en este mismo embalse, y a los hallados por otros autores (Bergstein-Ben y Stone, 1991; Maul y Block, 1983; Chen y Hickey, 1983; Cenci *et al.* 1990; McDaniels *et al.*, 1987). El mínimo se obtuvo, como en el caso de los coliformes totales, en el mes de Junio, aunque en este caso en la muestra de 8 metros, con un recuento de 25 ufc/100 ml, y un número de bacterias adheridas de 17 ufc/100 ml, y el máximo se alcanzó en el mes de Octubre en la muestra de 10 m de profundidad, coincidiendo en este caso, tanto el mes como la profundidad, con los coliformes totales, con un recuento total de $2,00 \times 10^4$ ufc/100 ml y un número de adheridos a partículas de $1,20 \times 10^4$ ufc/100 ml.

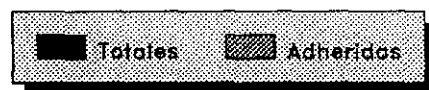
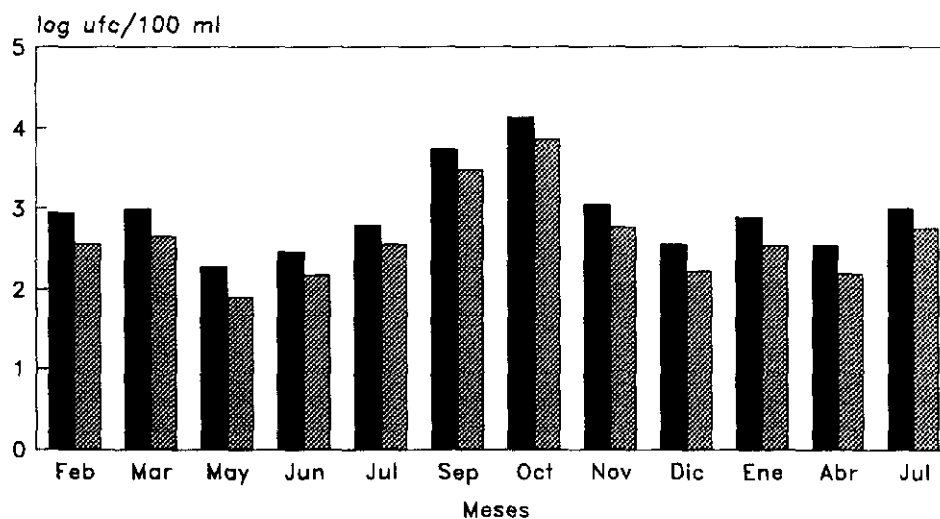
Como podemos observar en las gráficas de las figuras 24 a 27, la distribución temporal de las bacterias coliformes fecales es muy similar a la de las totales y se podría explicar por los motivos citados anteriormente; en todas las profundidades se produce una disminución en el mes de Mayo, que, como dijimos anteriormente, podría ser debida a la menor supervivencia de las bacterias alóctonas cuando aumenta la temperatura. En el mes de Junio observamos que en la superficie continúa esta disminución. Como en los coliformes totales, en los meses posteriores se observa un ligero aumento que puede ser debido al incremento de las descargas urbanas durante el período vacacional. En este caso también se observa un importante incremento en el mes de Octubre en todas las capas del embalse, que puede explicarse por las razones anteriormente citadas. En los meses siguientes se vuelve a producir una disminución en los recuentos, que se mantienen estables hasta el final del estudio, cuando, en el último mes, en algunas profundidades, se produce un ligero aumento que se podría explicar de igual manera que el correspondiente al mismo mes del año anterior.

Los recuentos de **coliformes fecales adheridos a partículas**, como decíamos en las bacterias heterótrofas viables a 37°C y en los coliformes totales (figuras 14 a 17 y 20 a 23 respectivamente), siguen exactamente la misma distribución temporal que los de coliformes

Fig. 24. RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES. NUMERO TOTAL Y NUMERO DE ADHERIDAS A PARTICULAS

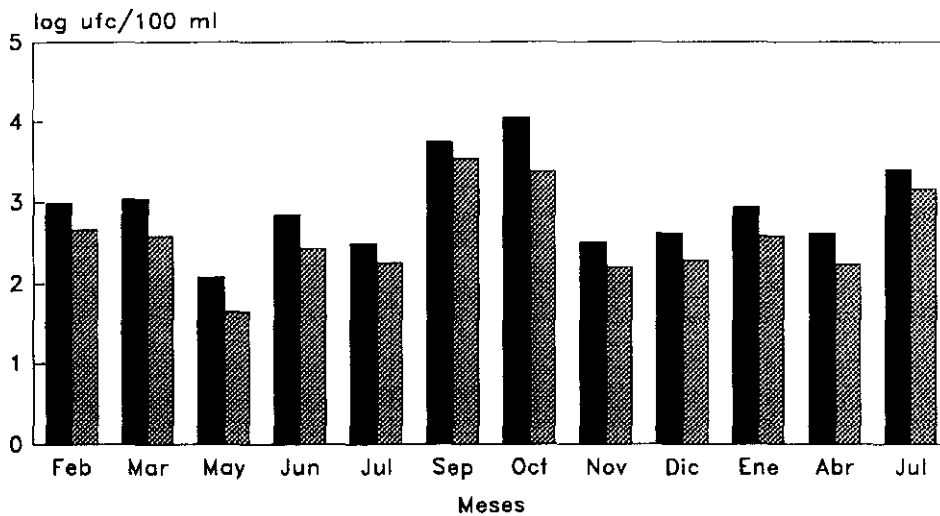


0 Metros

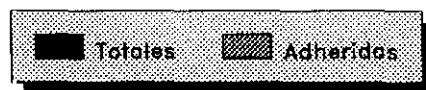
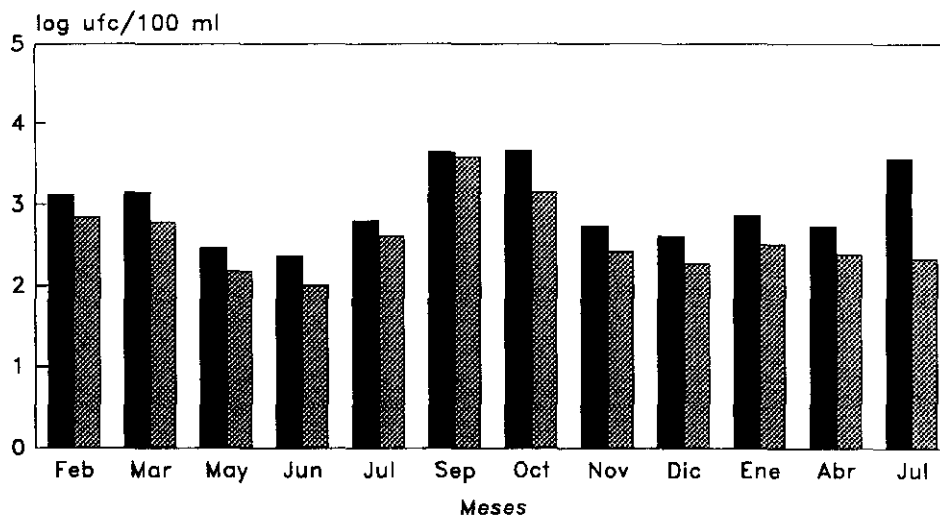


2 Metros

Fig. 25. RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES. NUMERO TOTAL Y NUMERO DE ADHERIDAS A PARTICULAS

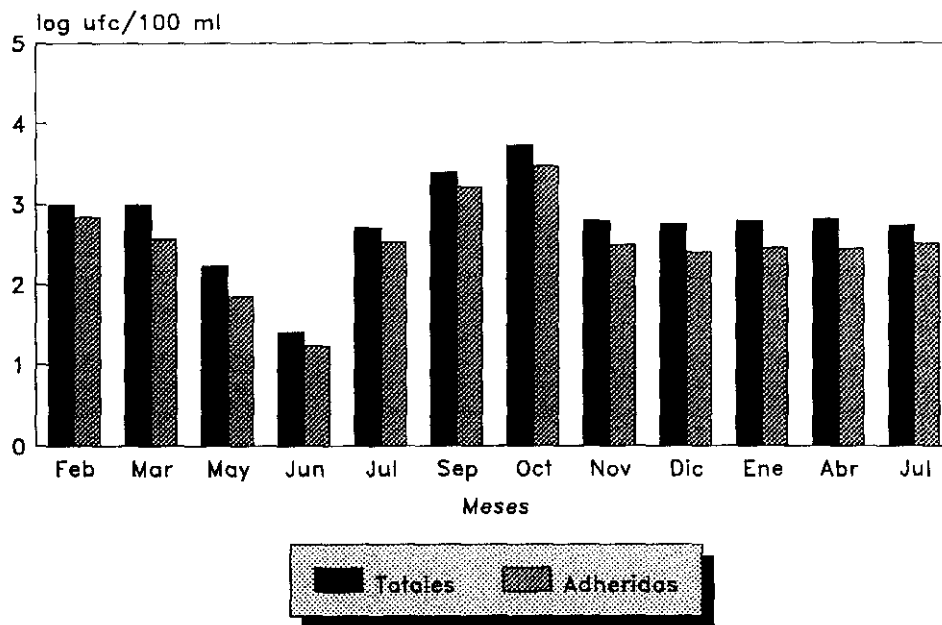


4 Metros

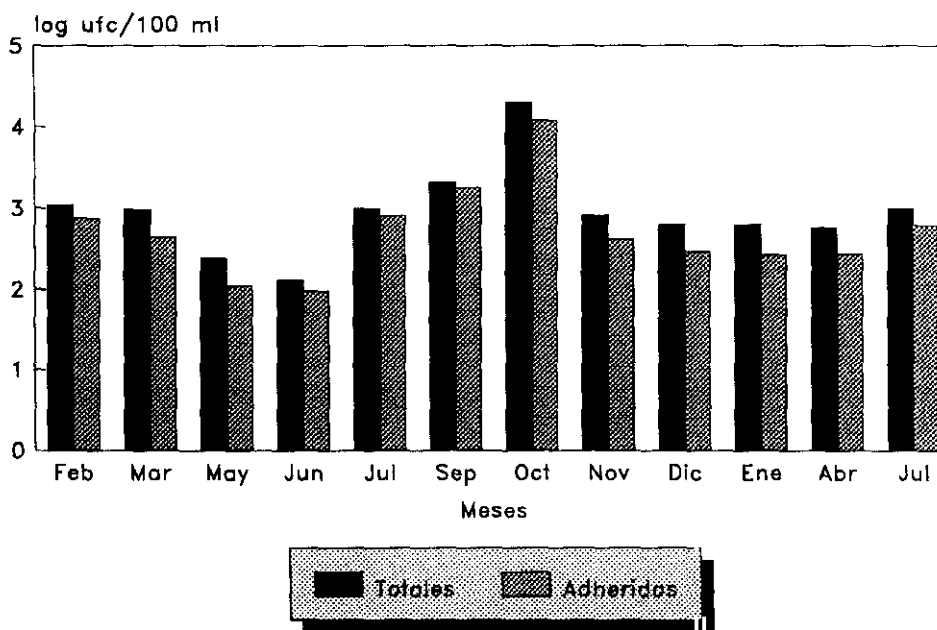


6 Metros

**Fig. 26. RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES
 NUMERO TOTAL Y NUMERO DE ADHERIDAS A PARTICULAS**

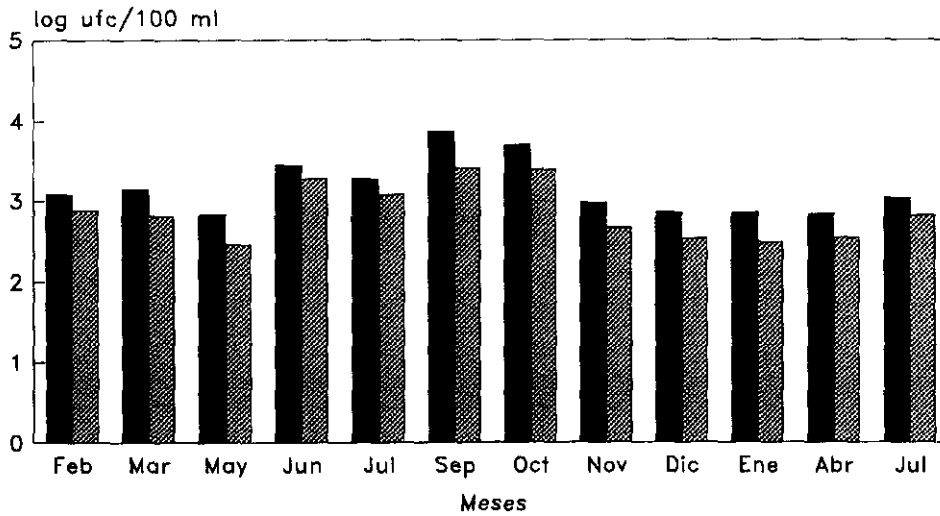


8 Metros

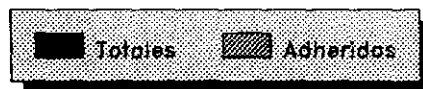
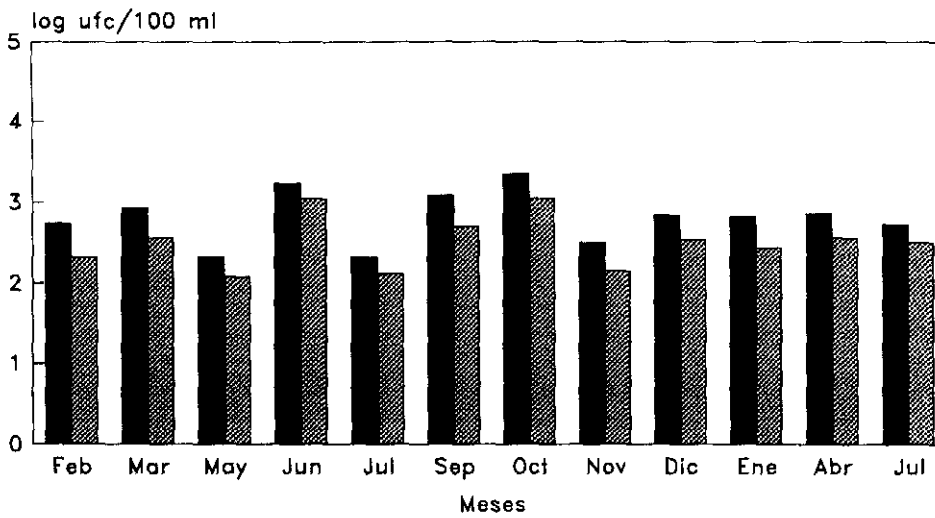


10 Metros

Fig. 27. RECUENTO DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES. NUMERO TOTAL Y NUMERO DE ADHERIDAS A PARTICULAS



20 Metros



40 Metros

fecales totales, encontrándose ambas líneas muy próximas durante todo el estudio.

- Distribución espacial

En las figuras 28 a 31 se presentan los perfiles de profundidad de **coliformes totales** (en las dos primeras) y **fecales** (en las últimas), haciendo también la distinción entre el número total y el de adheridos a partículas. En ambos casos podemos observar que durante los primeros meses del estudio, en los que el embalse se encontraba en circulación, la distribución de estas bacterias con respecto a la profundidad es prácticamente homogénea, no encontrándose diferencias en las diferentes profundidades estudiadas. Sin embargo, cuando se produce la estratificación de la columna de agua del embalse, se comienzan a observar algunas diferencias entre profundidades. Estas se inician en el mes de Mayo, con un aumento de la concentración tanto de coliformes totales como fecales según descendemos hacia el metro 6. Este perfil, casi idéntico para coliformes totales y fecales, se mantiene en los meses posteriores, aunque con un marcado aumento también en el metro 20, que se mantiene o disminuye ligeramente hacia el 40. La mayor concentración en el metro seis puede ser debida a que a esta profundidad no llega la acción de la luz del sol y también a que exista una mayor concentración de nutrientes, debido a que muchas especies de fitoplancton en verano tienen sus condiciones óptimas a unos pocos metros de profundidad, porque la irradiación intensa las daña considerablemente (Lovell y Konopka, 1985 b). En el mes de Noviembre, de nuevo el embalse en circulación, la mayor concentración se localizó en la muestra de superficie, ya que en esta época del año la acción de la luz solar es mucho menor y normalmente en superficie estas bacterias pueden encontrar mayor número de partículas que les pueden servir como protección o como alimento. En los meses siguientes, se repite la situación de los primeros meses del estudio, sin diferencias entre las distintas profundidades. Con la llegada del verano, en Julio del segundo año, se vuelve a la situación comentada para los meses del verano anterior.

En las representaciones de los perfiles de profundidad no se observan diferencias entre bacterias totales y adheridas, siendo las dos líneas generalmente paralelas en todo su recorrido. En los meses en los que el embalse está en circulación la distancia entre las líneas es un poco mayor, aproximándose, hasta hacerse casi coincidentes en algunos puntos, cuando el embalse está estratificado.

Fig. 28. PERFILES DE PROFUNDIDAD DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES

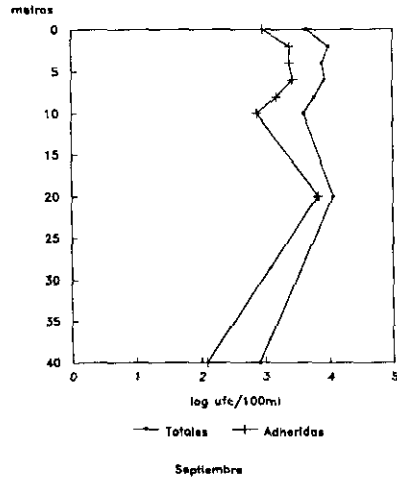
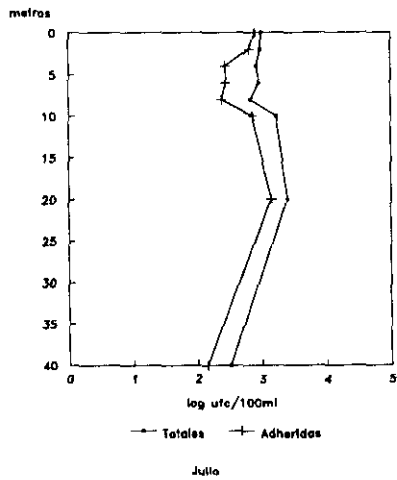
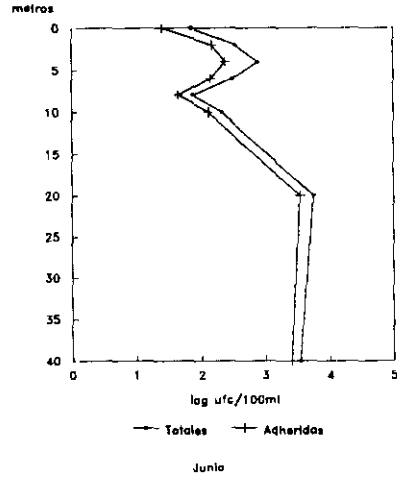
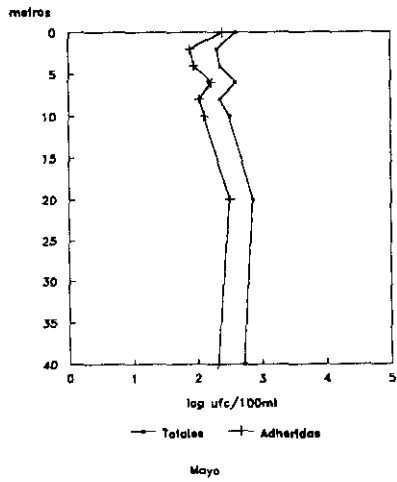
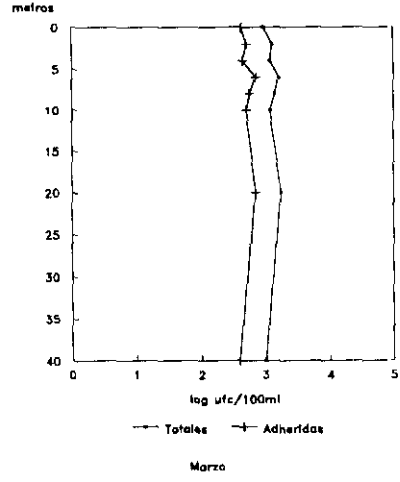
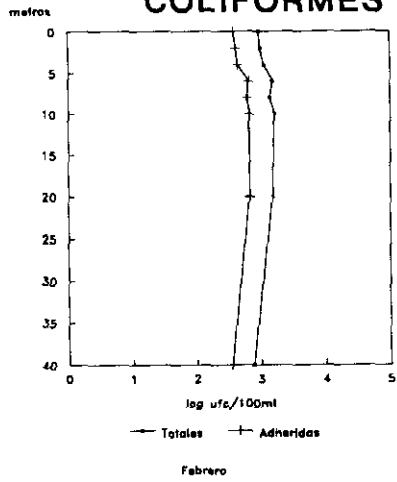


Fig. 29. PERFILES DE PROFUNDIDAD DE BACTERIAS COLIFORMES TOTALES

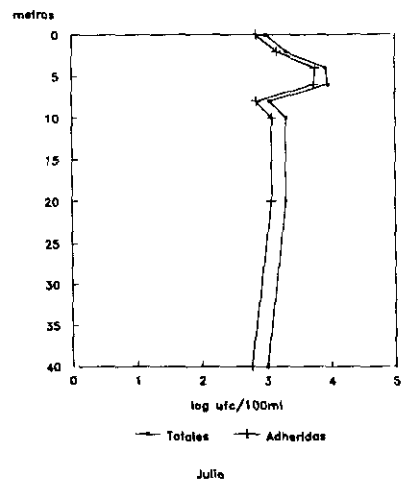
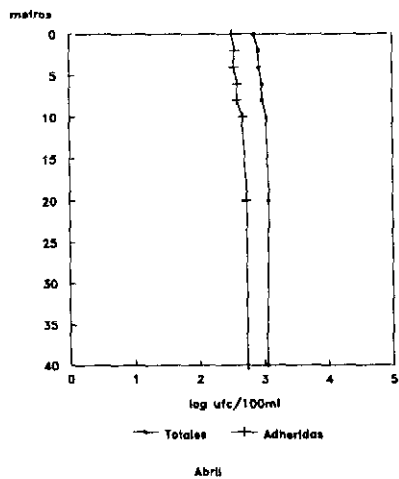
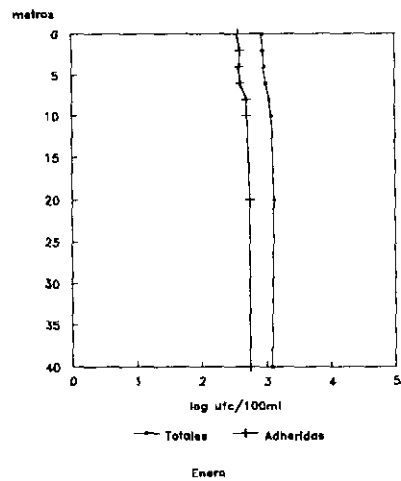
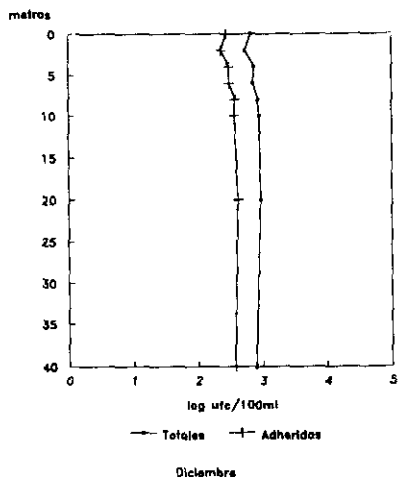
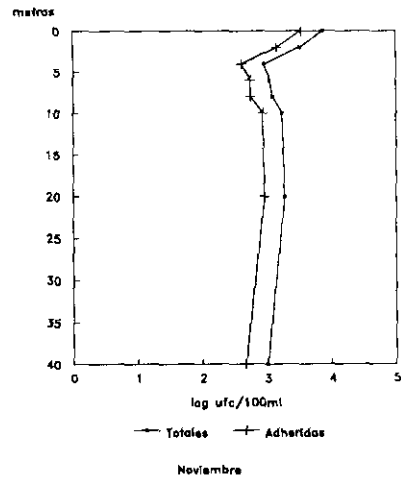
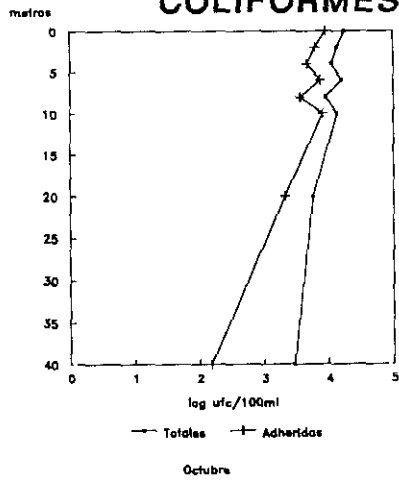


Fig. 30. PERFILES DE PROFUNDIDAD DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES

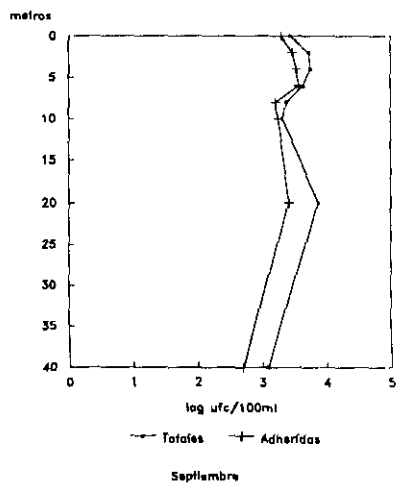
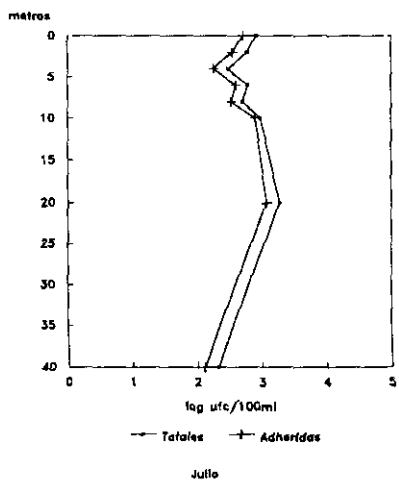
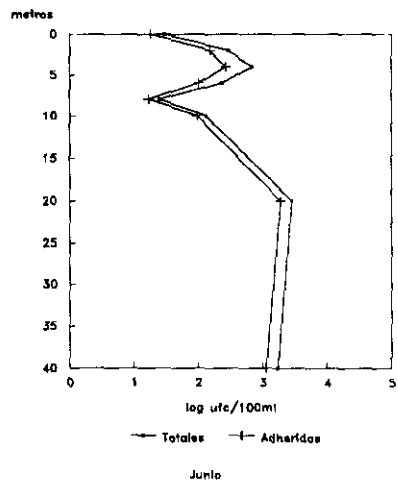
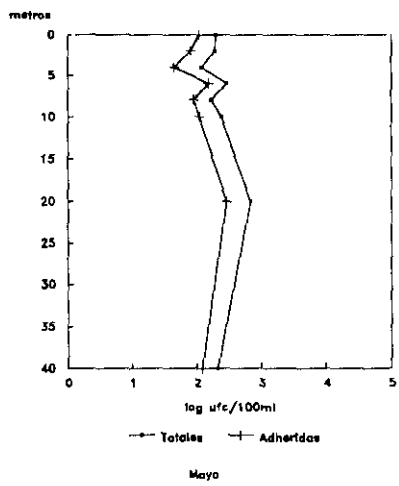
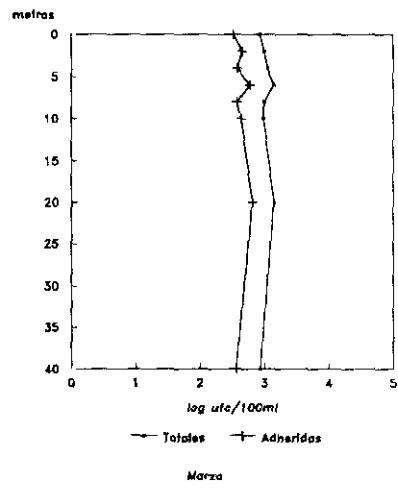
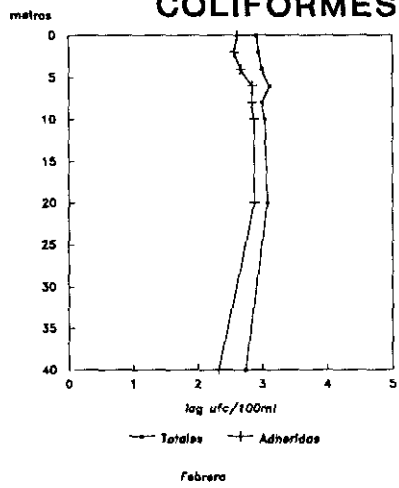
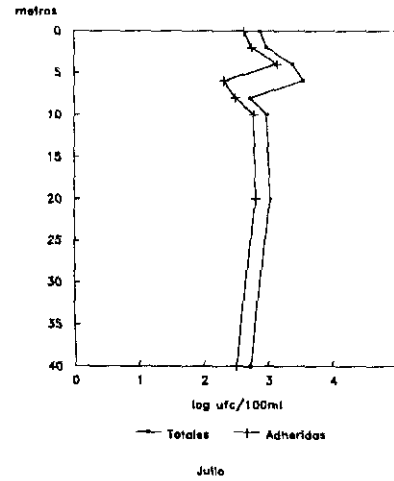
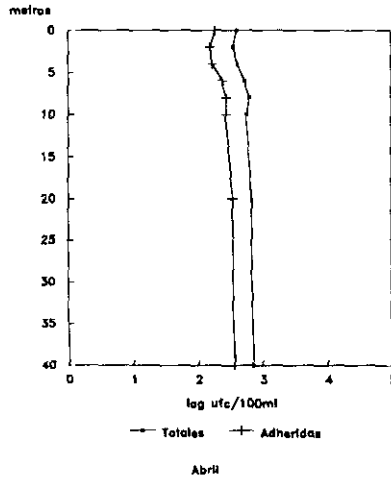
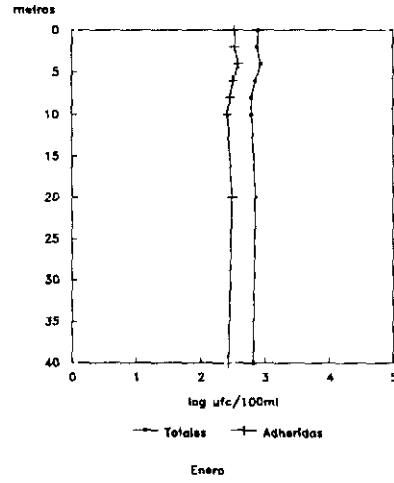
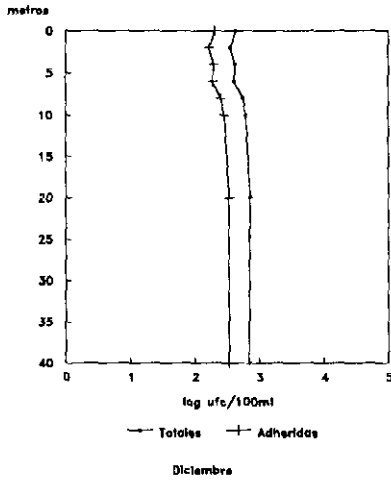
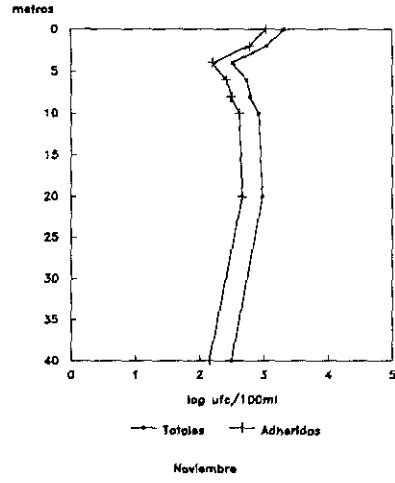
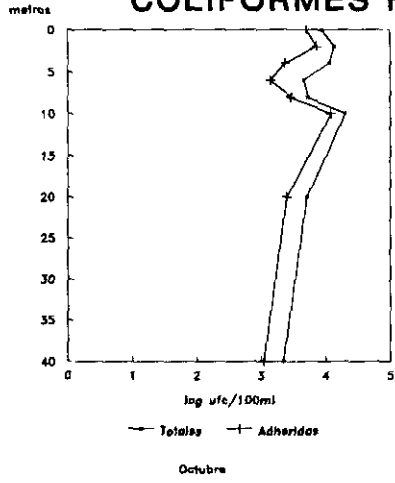


Fig. 31. PERFILES DE PROFUNDIDAD DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES



3.2.3.3. Porcentaje de coliformes adheridos a partículas

En la tabla 3 se pueden observar los porcentajes de bacterias **coliformes totales** que se encontraban adheridas a partículas durante todo el estudio, en todas las profundidades estudiadas. Como podemos ver éstos estuvieron comprendidos entre un 40 y un 50% en la mayoría de las muestras, llegando incluso a un 80% en la muestra de superficie de Julio del primer año. El mes en que se encontró un porcentaje de adhesión mayor fue en Julio del segundo año, con una media de 63,74%; si observamos la figura 29 podremos apreciar en la última gráfica correspondiente a este mes que las líneas que representan las bacterias totales y las adheridas están muy próximas, lo que indica que sus recuentos fueron muy similares. El mes en el que se obtuvo el porcentaje menor fue Septiembre, con una media de 28,4%. Respecto a la profundidad, los máximos porcentajes de adhesión correspondieron a las muestras de superficie y de 20 metros

m	Feb	Mar	May	Jun	Jul	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Abr	Jul	\bar{x}
0	40,6	44,9	62,5	35,7	80,0	21,0	51,4	45,7	41,5	42,1	45,4	70,3	48,4
2	42,0	40,0	38,1	42,8	67,3	25,0	45,6	43,8	42,3	44,3	42,7	72,2	45,5
4	39,1	37,5	39,1	30,8	32,7	31,0	41,9	44,9	40,7	41,6	40,6	68,5	40,7
6	42,5	44,2	41,5	45,0	30,6	32,0	46,9	49,7	43,1	40,5	41,9	60,3	43,2
8	44,6	40,8	47,8	60,0	35,5	26,1	40,5	45,8	45,2	44,6	40,2	61,4	44,4
10	40,8	42,8	40,6	61,9	42,9	19,0	59,4	49,6	41,7	41,8	42,9	60,7	45,3
20	43,9	40,6	43,8	62,2	56,0	58,3	36,5	48,5	44,4	42,3	45,9	59,3	48,5
40	46,5	39,0	39,4	73,5	43,8	15,0	5,2	45,8	47,3	45,9	49,2	57,2	42,3
\bar{x}	42,5	41,2	44,1	51,5	48,6	28,4	40,9	46,7	43,3	42,9	43,6	63,7	

Tabla 3. Porcentaje de bacterias coliformes totales que se presentaban adheridas a partículas, durante todo el período de estudio a las diferentes profundidades estudiadas.

con un 48,42% y un 48,47% respectivamente, y los mínimos a las muestras de 4 metros con un 40,7%. El haber obtenido uno de los máximos porcentajes de adhesión en superficie es algo natural debido a que en esta capa puede haber un mayor número de partículas disponibles para la adhesión y a que las bacterias que se encuentran adheridas obtienen una mayor protección frente a factores adversos (Cheng *et al*, 1981, Fletcher, 1980 b; White, 1984) entre los que se encuentra la luz del sol (Barcina *et al*, 1989, 1990; Cornax *et al*, 1990; Rhodes y Kator, 1990), lo que explicaría también el haber obtenido el mayor porcentaje de adhesión en Julio del

segundo año (media=63,74%).

En la tabla 4 se recoge el tanto por ciento de bacterias **coliformes fecales** que se encontraban adheridas a partículas durante todo el período de estudio. Como en los coliformes totales, el porcentaje estuvo comprendido entre un 40% y un 50% durante la mayor parte del estudio, llegando a alcanzar un 86,4% en Septiembre en la muestra de 6 metros. El mes en que se obtuvo el porcentaje mayor fue Julio del primer año, con una media de 64,94%, y en el que se encontraron los valores menores fue Marzo, con una media de 41,73%. Respecto a la profundidad, los valores máximos de adhesión se alcanzaron en las muestras correspondientes a los 10 metros con una media de 59,09%, y los mínimos en los 4 metros, con una media de 44,78%.

	Feb	Mar	May	Jun	Jul	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Abr	Jul	x
0	50,6	39,1	55,0	60,0	62,5	72,7	57,7	53,2	47,3	43,2	46,3	56,4	53,7
2	41,6	45,5	42,1	51,7	59,0	55,0	52,9	54,1	46,7	45,1	44,2	58,2	49,7
4	47,4	34,5	37,5	39,1	58,1	60,7	21,2	49,6	46,2	44,7	40,8	57,6	44,8
6	53,8	42,9	51,7	43,5	65,6	86,4	30,4	48,5	45,9	45,3	45,2	59,3	51,5
8	69,7	37,7	52,9	68,0	66,6	66,6	54,7	50,4	44,8	46,8	43,6	60,1	55,2
10	68,2	45,4	45,8	73,1	82,6	85,7	60,0	49,7	46,4	42,1	47,8	62,3	59,1
20	63,3	46,4	42,6	66,8	63,2	34,9	49,0	48,5	47,3	43,4	51,1	59,8	51,4
40	38,2	42,3	57,1	65,9	61,9	41,7	50,0	45,3	49,1	41,6	50,4	60,2	50,3
x	54,1	41,7	48,1	58,5	64,9	63,0	47,0	49,9	46,7	44,0	46,2	59,3	

Tabla 4. Porcentaje de bacterias coliformes fecales que se presentaron adheridas a partículas, durante todo el período de estudio, a las diferentes profundidades estudiadas.

3.2.4. RECUENTO DE ESTREPTOCOCOS FECALES

Como podemos observar en la tabla 5, los recuentos de estreptococos fecales fueron muy irregulares, no siendo posible detectarlos en algunas muestras y estando en las restantes en número muy bajo. Ya anteriormente nosotros (Fernández *et al.*, 1991) observamos en este mismo embalse que los recuentos de estreptococos fecales eran muy irregulares y bajos. Pourcher *et al.* (1991) encuentran que en un porcentaje muy elevado de muestras de aguas contaminadas con residuales los coliformes eran también muchísimo más numerosos que los estreptococos fecales.

m	Feb	Mar	May	Jun	Jul	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Abr	Jul
0	0	2	0	0	0	2	0	0	3	1	0	0
2	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
4	2	2	3	2	2	1	1	1	1	2	3	1
6	2	3	2	1	0	0	3	1	3	0	3	5
8	1	1	3	0	2	1	1	0	1	0	1	1
10	4	4	1	0	1	2	0	4	2	3	4	4
20	1	2	0	2	1	0	1	1	0	1	1	3
40	0	1	0	3	2	0	0	2	0	1	0	2

Tabla 5. Recuento de estreptococos fecales (ufc/100 ml).

Se han publicado numerosos trabajos comparando los estreptococos fecales con los coliformes, en cuanto a las diferencias en su resistencia y su supervivencia, y a su idoneidad como indicadores de la calidad microbiológica del agua; existe una gran discrepancia al respecto. Mientras que algunos autores encuentran que la supervivencia de los estreptococos fecales es menor (Lessard y Sieburth, 1983) otros autores opinan lo contrario (Barcina *et al.*, 1990; Bergstein-Ben y Stone, 1991; Bissonnette *et al.*, 1975; McFeters *et al.*, 1974). Pourcher *et al.* (1991) opinan que la resistencia y la supervivencia dependen de las especies, y así, mientras que los enterococos resultaban ser más resistentes y con una mayor supervivencia que los coliformes, *Streptococcus bovis* era mucho menos resistente y su supervivencia era mucho menor. Como se expone en el apartado 3.2.5., la especie predominante en el presente estudio ha sido *S.bovis*, por lo que creemos que los bajos e irregulares recuentos se deben a la menor supervivencia de esta especie.

Aunque, dado el escaso número de estreptococos encontrados, no resulta adecuado hablar de porcentaje de adheridos a partículas, no queremos pasar por alto que una mayoría de las cepas obtenidas fueron aisladas del filtro de 3 µm de diámetro de poro en el que, queremos recordar, quedaban retenidas las bacterias que se encontraban adheridas a partículas.

3.2.5. IDENTIFICACION DE BACTERIAS

3.2.5.1. Identificacion de coliformes

Con las cepas confirmadas como coliformes se realizaba la identificación, habiéndose identificado un total de 1024 cepas con los siguientes resultados:

Espece	%
<i>Cedecea davisae</i>	2,9
<i>Citrobacter freundii</i>	6,0
<i>Citrobacter sp.</i>	1,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5,0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3,5
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	19,4
<i>Enterobacter intermedium</i>	6,4
<i>Enterobacter sakazakii</i>	3,4
<i>Enterobacter sp.</i>	1,8
<i>Escherichia coli</i>	22,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4,4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,6
<i>Kluyvera sp.</i>	3,1
<i>Serratia ficaria</i>	2,3
<i>Serratia fonticola</i>	6,7
<i>Serratia plymuthica</i>	5,9
No identificadas	1,1

Tabla 6. Identificación de las cepas de coliformes aisladas
Porcentaje de cepas de cada especie.

El espectro de especies obtenido es similar al encontrado por otros autores (Cenci *et al.*, 1990; Rivera *et al.*, 1988). Las cepas aisladas de los recuentos de coliformes fecales pertenecían en su totalidad a las siguientes especies: *C. freundii*, *Citrobacter sp.*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*,

E. coli, *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. Esta distribución de especies está de acuerdo con lo publicado por Leclerc y Mossel (1989).

3.2.5.2. Identificación de estreptococos

Como ya hemos anticipado en el apartado 3.2.4., una inmensa mayoría de las cepas fueron identificadas como *Streptococcus bovis*.

Especie	%
<i>Streptococcus bovis</i>	86
<i>Enterococcus faecalis</i>	8
<i>Enterococcus durans</i>	3
<i>Enterococcus faecium</i>	2
No identificadas	1

Tabla 7. Identificación de las cepas de estreptococos aisladas
Porcentaje de cepas de cada especie

Ya en un trabajo anterior, nosotros (Fernández *et al.*, 1991) encontramos en este mismo embalse que la especie predominante era *S. bovis*.

El predominio de esta especie en El Atazar pensamos que puede ser debido a que en la zona existe un método de ganadería tradicional, denominado "sesteo", que consiste en dejar al ganado suelto durante la mayor parte del año. Como hemos dicho en la introducción, en esta zona predominan los materiales impermeables, con lo que las aguas de lluvia llegarían por escorrentía superficial hasta el embalse sin sufrir infiltraciones, y estas aguas de lluvia arrastrarían material fecal de todo el ganado de la zona, en el que la especie predominante es *S. bovis*. Estos resultados sugieren que la identificación de los estreptococos fecales y enterococos, de un habitat acuático, puede proporcionar una información muy útil sobre el posible origen de la contaminación, ya que mientras que *Enterococcus faecalis* predomina en las heces humanas y de pollos, *S. bovis* es típica de heces bovinas y en menor medida también de cerdo (Pourcher *et al.*, 1991).

3.2.6. ENSAYOS DE ADHESION *IN VITRO*

Debido a la naturaleza variable de las superficies biológicas algunos investigadores han usado superficies sólidas de vidrio o poliestireno para estudiar la adhesión bacteriana ya que estos materiales proporcionan superficies más estables y mejor definidas. Las fimbrias tipo I purificadas se adhieren por sus extremos a partículas de látex de poliestireno y por eso el poliestireno parece ser un material altamente adecuado para cuantificar la adhesión bacteriana mediada por este tipo de apéndices (Harber *et al.*, 1983).

Con la realización de estos ensayos se ha pretendido comprobar si existían diferencias en la capacidad de adhesión de las distintas cepas estudiadas, según hubieran sido aisladas del filtro de 3 µm de diámetro de poro (donde quedan retenidas las bacterias adheridas a partículas) o del filtrado obtenido con este mismo filtro (donde se encuentran las bacterias libres de la muestra de agua). Para abreviar, y con el fin de agilizar la explicación, a las primeras las denominaremos cepas adheridas y a las segundas cepas libres.

Como se citaba en el apartado 2.3.7., los ensayos se realizaron con diversas cepas tanto de coliformes como de estreptococos, que comprendían todas las especies identificadas.

En ningún caso se encontraron diferencias importantes entre la adhesión de cepas adheridas y la de cepas libres. Esto quiere decir que no significa que las cepas que se encuentran libres en el momento de llevar a cabo el análisis de la muestra, tengan una menor capacidad de adhesión, sino que las bacterias adheridas pueden presentarse en algún momento libres, como estrategia de supervivencia, debido a que tienen la capacidad de desadherirse cuando la situación es desfavorable (cuando disminuyen los nutrientes, cuando aumenta la concentración bacteriana sobre la superficie de adhesión, etc.)(Marshall, 1980; Marshall *et al.*, 1971).

Pedrós-Alió y Brock (1983) indican que muchas bacterias que se encuentran libres en el plancton tienen glicocálix, formado por fibrillas de polisacáridos estrechamente empaquetadas, lo que sugiere que una parte sustancial de la población libre podría potencialmente volverse adherida (Costerton y Geesey, 1979 a; Fletcher y Floodgate, 1976; Paerl y Merkel, 1982). Tampoco se observaron diferencias entre las distintas cepas utilizadas.

Todas las cepas, tanto de coliformes como de estreptococos estudiadas, presentaron una tendencia a la adhesión elevada, obteniéndose en todos los casos unos recuentos mucho mayores

sobre la superficie que en solución, una vez transcurrido el tiempo dejado para la adhesión.

Grupo bacteriano	%
Coliformes libres	67
Coliformes adheridos	69
Estreptococos libres	58
Estreptococos adheridos	57

Tabla 8. Porcentaje de adhesión *in vitro* de los grupos bacterianos estudiados

3.3. RESULTADOS FISICO-QUIMICOS

3.3.1. pH

En la tabla 6 se presentan los resultados de pH durante todo el período de estudio, en todas las profundidades estudiadas

	Feb	Mar	May	Jun	Jul	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Abr	Jul
0	7,6	7,6	7,3	6,9	6,8	6,1	6,0	6,5	6,4	6,6	7,5	7,2
2	7,5	7,4	7,2	6,9	6,9	6,2	5,9	6,5	6,4	6,5	7,4	7,1
4	7,5	7,5	7,2	6,8	6,7	6,3	6,3	6,5	6,5	5,7	7,4	7,1
6	7,5	7,6	7,2	6,8	6,9	6,4	6,5	6,6	6,9	5,8	7,4	7,0
8	7,4	7,4	7,1	6,8	6,9	6,3	6,5	6,6	7,0	5,9	7,3	7,1
10	7,4	7,5	7,1	6,7	7,1	6,5	6,5	6,7	7,0	5,9	7,4	7,1
20	7,2	7,4	7,1	6,7	7,2	6,5	6,6	6,6	6,3	6,0	7,4	7,2
40	7,2	7,3	6,9	6,8	6,9	6,6	6,3	6,6	6,2	6,1	7,4	7,1

Tabla 9. Valores de pH, durante todo el período de estudio, a las diferentes profundidades estudiadas.

Los valores de pH se encontraron entre un mínimo de 5,7 en febrero del segundo año en la muestra correspondiente al metro cuatro, y un máximo de 7,6 en superficie en los meses de Febrero y Marzo y en la muestra del metro seis, también del mes de Marzo. Todas las

profundidades estudiadas tuvieron valores de pH semejantes durante todo el estudio, sin mostrar grandes variaciones, ni temporales ni espaciales.

Los valores son inferiores a los obtenidos en este mismo embalse en trabajos anteriores. (Fernández, 1985; Carballo, 1987) en los que el pH osciló generalmente entre 8 y 8,8.

3.3.2. CONCENTRACION DE ION AMONIO

- Distribución temporal

Las concentraciones de ion amonio se encuentran representadas en las figuras 32 y 33. Como podemos observar en las mismas, no fue posible detectarlo en el primer y último mes del estudio en ninguna de las profundidades ni en el mes de Mayo en las muestras de superficie, dos y cuatro metros. El aumento detectado en Octubre puede observarse en todas las muestras aunque es menor en la de cuatro metros de profundidad. El valor máximo obtenido es de 0,95 mg/l en el mes de Octubre en superficie.

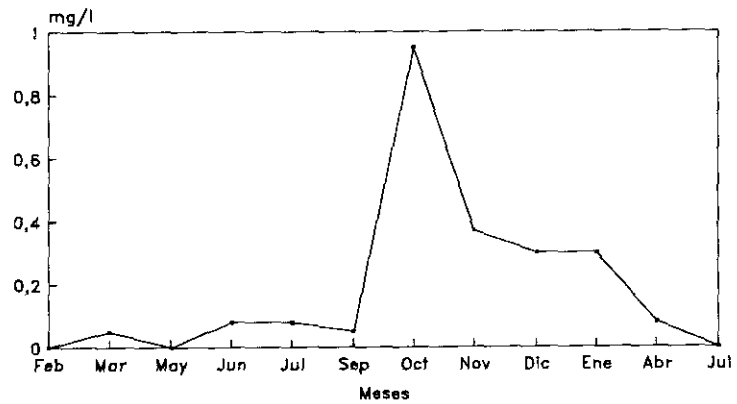
Los valores obtenidos son similares a los encontrados por Zinabu y Taylor (1989 a) en el lago Awassa, algo superiores a los encontrados por nosotros, con anterioridad, en este mismo embalse (Fernández, 1985), e inferiores a los encontrados por Carballo (1987), también en este embalse, con concentraciones de 2,5 mg/l en algunas de las muestras y valores entre 1,5 y 2 mg/l durante varios meses. Como hemos citado anteriormente, el haber obtenido porcentajes de saturación de oxígeno superiores a los detectados en aquel estudio, puede haber influido en que haya una menor concentración de compuestos de nitrógeno más reducidos en favor de los más oxidados.

La distribución del ion amonio es altamente variable en los lagos y embalses y depende de muchos factores (Wetzel, 1983). En ocasiones se pueden producir aumentos bruscos y transitorios, producto del inmediato ataque microbiano a poblaciones fitoplanctónicas que proliferen en ese momento. Pensamos que éste pudo ser el motivo del aumento repentino que se observó en la mayoría de las muestras en el mes de Octubre, ya que en el mismo mes, como veremos más adelante, se produce una disminución de la concentración de ortofosfatos que podría haber sido debida a su absorción por parte del fitoplancton. Es de destacar que en este mes se producen ligeros aumentos en el recuento total (AODC) en algunas profundidades e incrementos algo más importantes en los recuentos de coliformes totales y fecales.

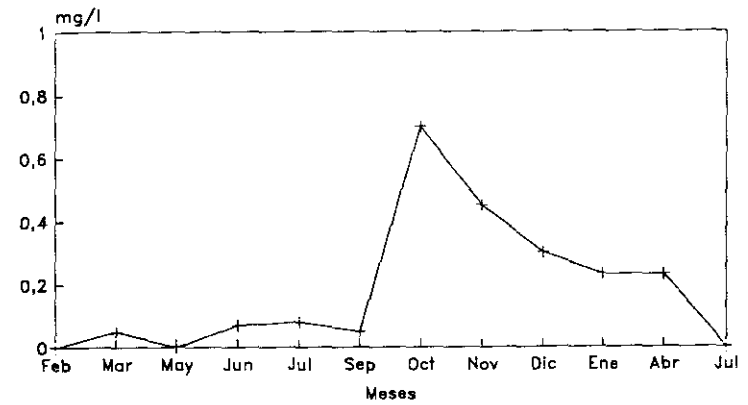
- Distribución espacial

No se observa una variación con la profundidad, obteniéndose unos valores bastante homogéneos en toda la columna de agua. Otros autores (Zinabu y Taylor, 1989 a) obtenían, sin embargo, durante todo su estudio diferencias marcadas entre epilimnion e hipolimnion, correspondiendo las mayores concentraciones a la capa más profunda. Estas diferencias con nuestros datos son debidas a que, en su estudio, las concentraciones de oxígeno disuelto en profundidad eran bajas, disminuyendo marcadamente durante la estratificación, momento en que obtenían los valores máximos de ion amonio. Y como ya hemos citado con anterioridad, las concentraciones de oxígeno disuelto en el embalse de El Atazar fueron elevadas durante todo el estudio y a todas las profundidades.

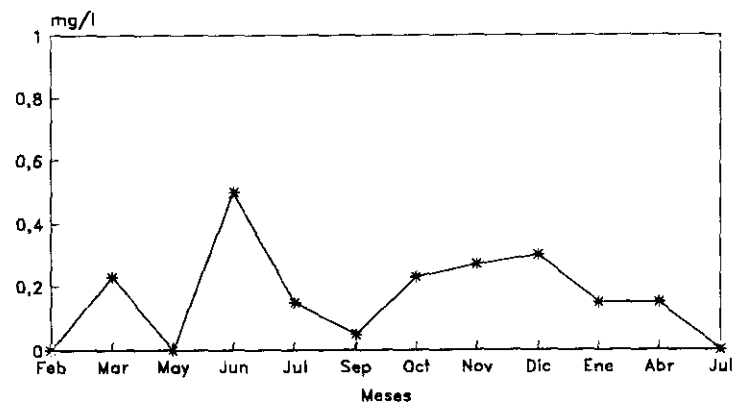
Fig. 32. CONCENTRACION DE ION AMONIO



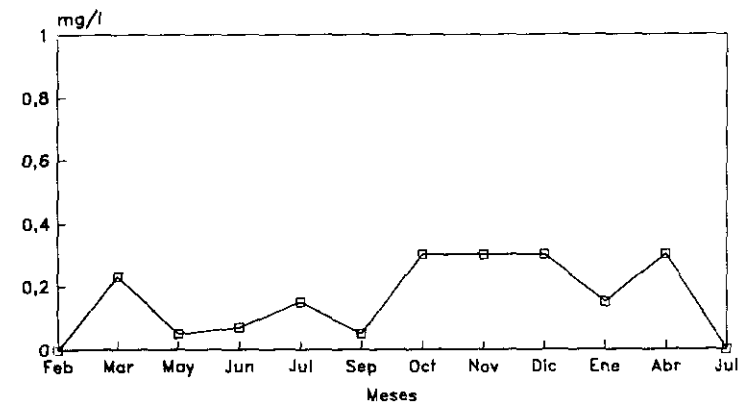
0 metros



2 metros

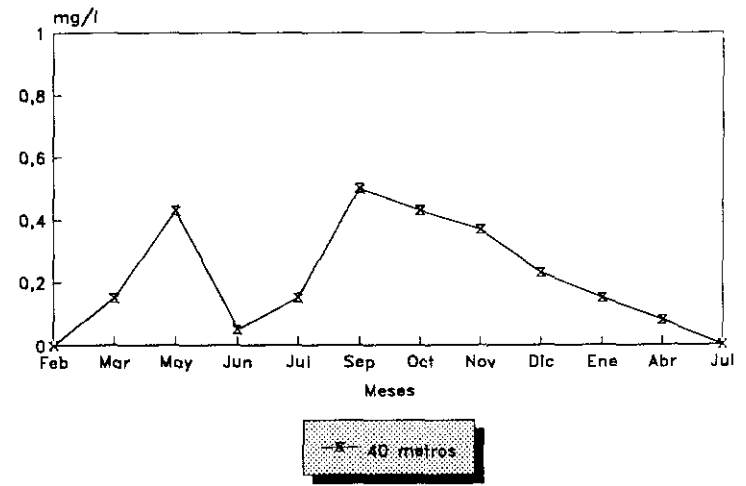
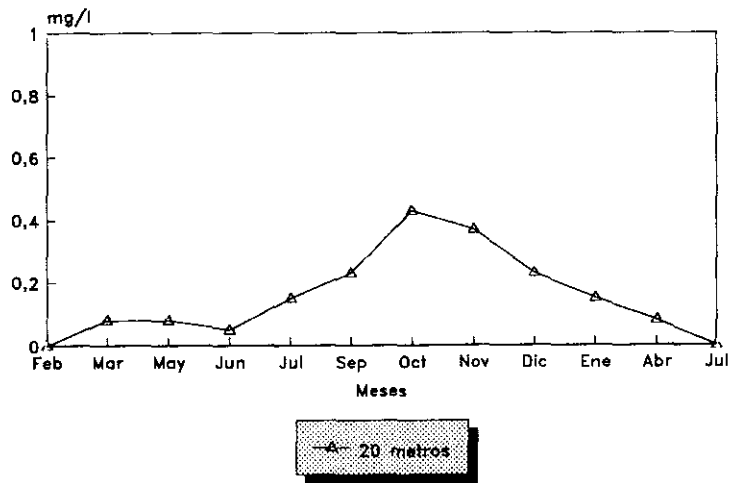
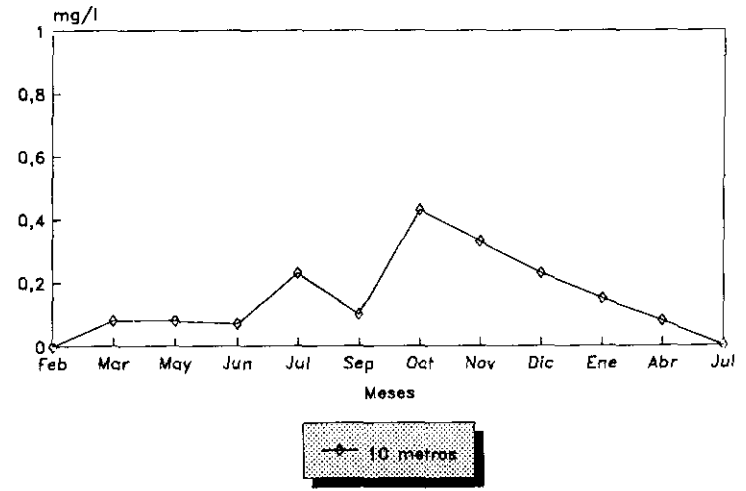
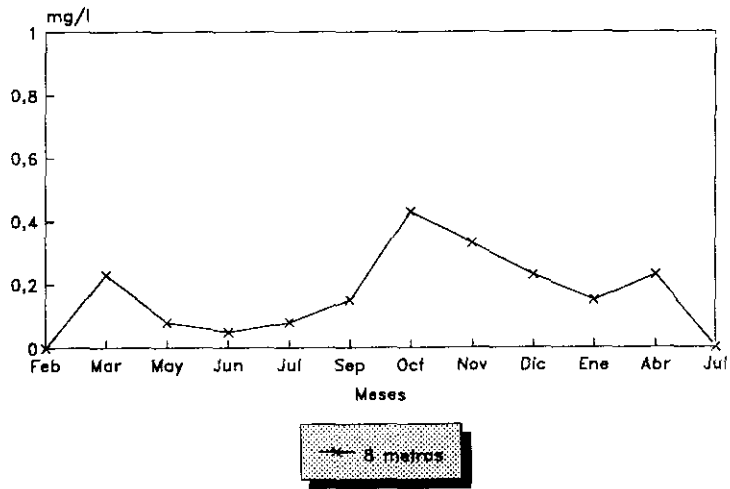


4 metros



6 metros

Fig. 33. CONCENTRACION DE ION AMONIO



3.3.3. CONCENTRACION DE NITRITOS

- Distribución temporal

Las concentraciones de nitritos obtenidas se encuentran recogidas en las figuras 34 y 35. Como podemos observar los valores obtenidos son bajos, aunque similares, y en algunas muestras algo más altos que los obtenidos por Carballo (1987) en este mismo embalse. Estuvieron comprendidos entre 0 y 0,47 mg/l.

La distribución temporal es irregular, con constantes aumentos y disminuciones. No fue posible su detección en las muestras de superficie, 2 y 6 metros del mes de Marzo. En Enero hubo un marcado aumento, reflejado en las gráficas correspondientes a superficie, 2, 4, 6 y 8 metros; sin embargo el máximo valor obtenido corresponde a las muestras de más profundidad (10 y 20 metros) con 0,47 mg/l en el mes de Diciembre.

En el apartado anterior veíamos que se producía un aumento de la concentración de ion amonio en el mes de Octubre en todas las profundidades estudiadas. En este mes, en la concentración de nitritos se produce una ligera disminución en todas las profundidades. Estos sucesos podrían estar relacionados con actividades de la población bacteriana, bien por producirse un desplazamiento hacia la reducción a ión amonio o porque en Octubre, como ya hemos citado, se producen aumentos en algunas poblaciones bacterianas (AODC, en algunas profundidades, y coliformes totales y fecales) que pueden suponer un aumento del consumo de nitratos y nitritos. También podemos observar que en los últimos meses del estudio la concentración de ion amonio va disminuyendo progresivamente, sobre todo en las tres últimas profundidades, y en estos mismos meses se produce un ligero aumento de nitritos.

Los nitritos, al ser compuestos intermedios en el ciclo del nitrógeno, es lógico que presenten una mayor variación en las concentraciones detectadas. Otros autores citan estas irregularidades que pueden llegar, en ocasiones, a hacer imposible su detección a lo largo de todo un año (Zinabu y Taylor, 1989 a).

- Distribución espacial

Con respecto a la profundidad no se obtuvo un modelo de distribución espacial, ya que en todos los niveles se alcanzaron valores similares.

Fig. 34. CONCENTRACION DE NITRITOS

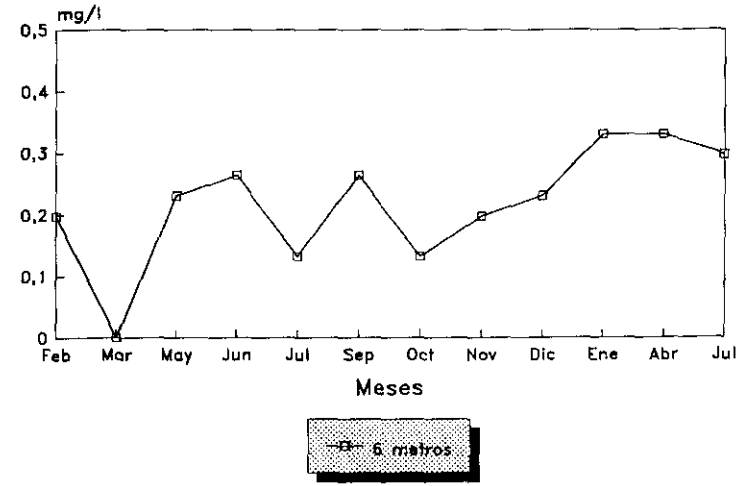
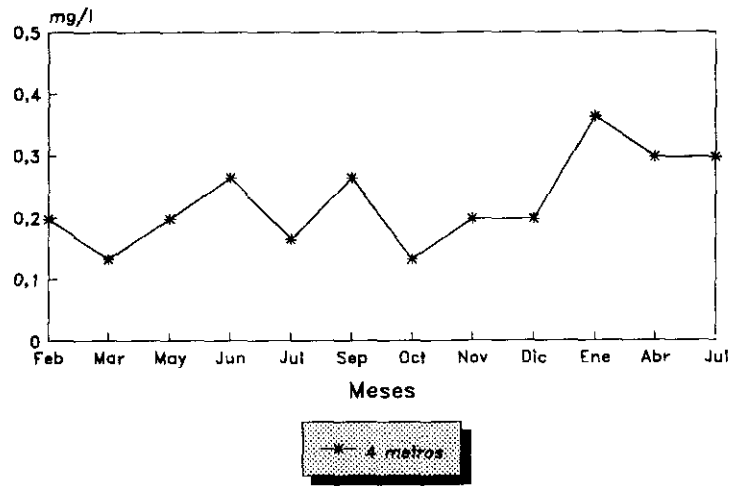
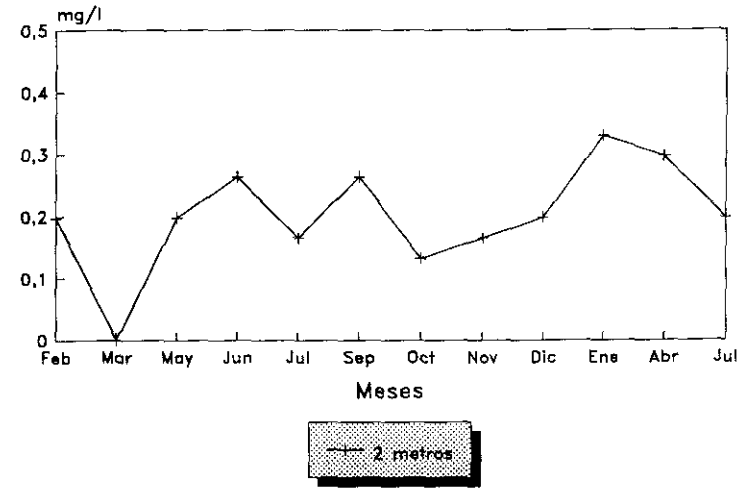
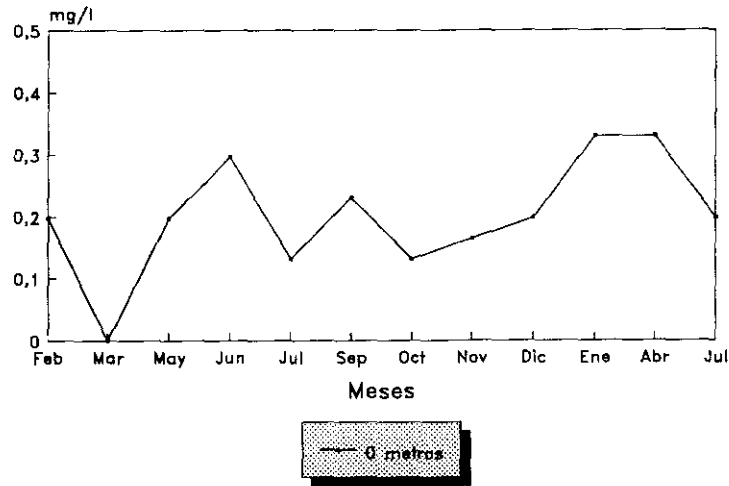
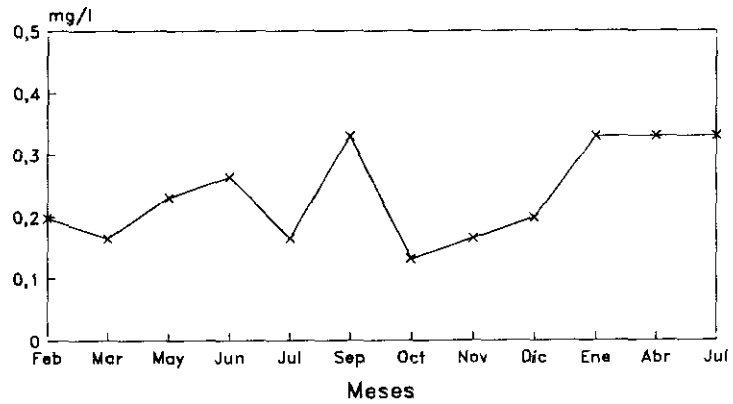
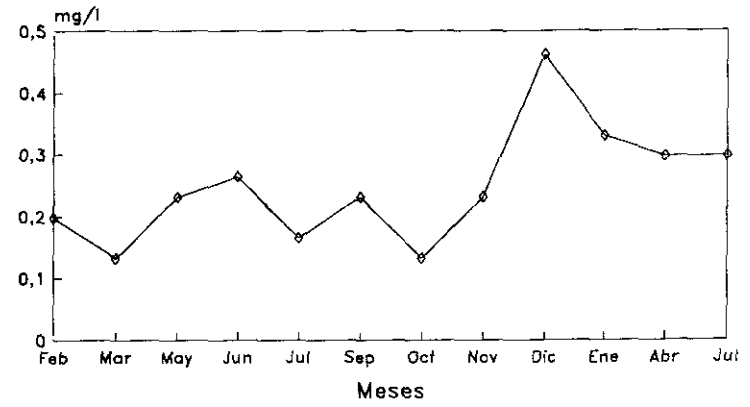


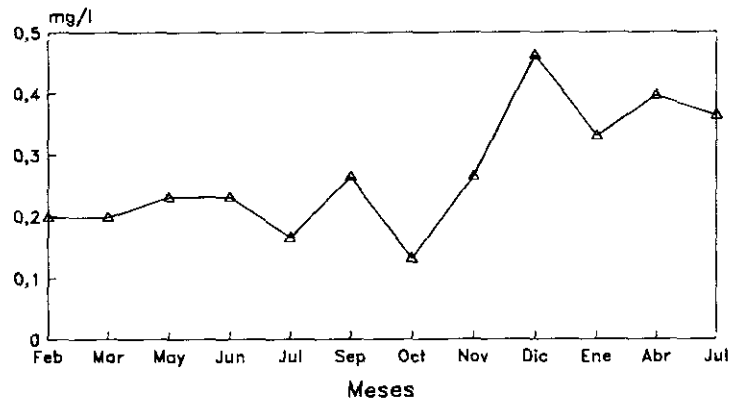
Fig 35. CONCENTRACION DE NITRITOS



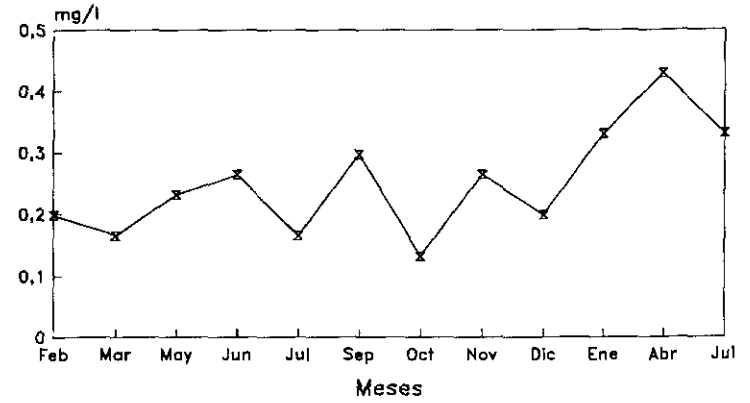
8 metros



10 metros



20 metros



40 metros

3.3.4. CONCENTRACION DE NITRATOS

- Distribución temporal

Las concentraciones de nitratos están representadas en las figuras 36 y 37. Los valores estuvieron comprendidos entre 0,13 mg/l, en Marzo en la muestra de 4 m y en Octubre en superficie, y 6,8 mg/l en Julio del segundo año en superficie. Durante una gran parte del periodo de estudio, concretamente desde el mes de Marzo hasta el de Diciembre, los valores obtenidos fueron bajos y similares a los encontrados en un trabajo anterior (Carballo, 1987) en este mismo embalse; el resto de los meses la concentración fue muy superior. También son mayores que los valores encontrados por Zinabu y Taylor (1989 a).

En el primer mes del estudio la concentración de nitratos en todas las profundidades estudiadas era alta, oscilando entre 2 y 6 mg/l. Sin embargo en Marzo se produjo una disminución, permaneciendo en esta situación hasta Diciembre. Durante todos estos meses las concentraciones fueron menores de 1 mg/l en la mayoría de las muestras, sobrepasando esta cantidad únicamente en los metros 20 y 40 en los meses de Junio y Septiembre. No es de extrañar que durante estos meses obtuviéramos los valores más altos en el hipolimnion puesto que, como ya hemos mencionado en el apartado 3.1., éste permanecía muy oxigenado incluso durante la estratificación térmica. En Enero se produjo un gran aumento llegando de nuevo a concentraciones de 4 mg/l, manteniéndose aproximadamente en esta situación en todas las profundidades a excepción de la superficie, en la que en los meses siguientes aumenta hasta llegar al máximo valor obtenido durante todo el estudio que fue de 6,8 mg/l en el mes de Julio del segundo año.

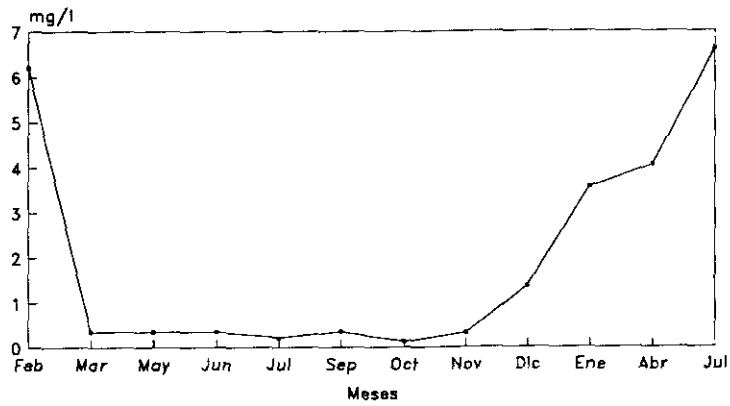
En los apartados anteriores resaltábamos que en el mes de Octubre se producía un aumento de la concentración de ion amonio y una ligera disminución de la de nitritos. La concentración de nitratos en Octubre también es baja, produciéndose una ligera disminución en todas las profundidades, que podríamos explicar por las razones anteriormente citadas. También señalábamos que se producía una disminución de la concentración de ion amonio y un aumento de la de nitritos en los últimos meses del estudio. Como hemos visto, durante estos meses también se produce el aumento de la concentración de nitratos. Este incremento de la concentración de nitratos puede haber influido en los aumentos que se producen en los recuentos de algunos grupos bacterianos (bacterias heterótrofas a 22°C y coliformes), debido a la mayor disponibilidad de nitrógeno. Sin embargo, si comparamos las gráficas de la figuras 32 a 37,

correspondientes a las concentraciones de estas tres formas nitrogenadas, observamos que sus dinámicas no son en absoluto similares.

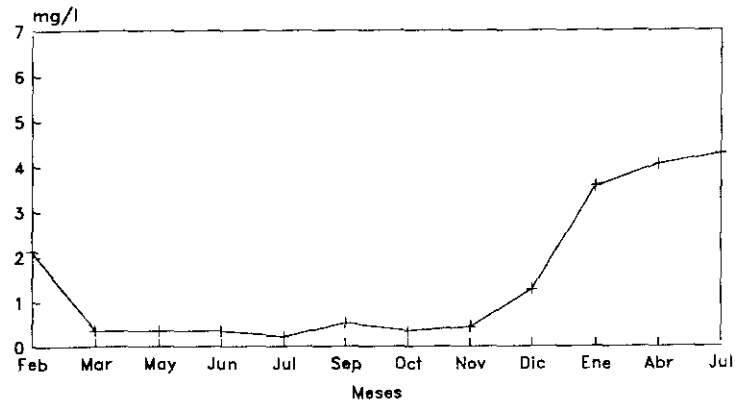
- Distribución espacial

En cuanto a la distribución espacial, las concentraciones de nitratos son muy similares en todas las profundidades durante todo el período de estudio, pudiéndose apreciar que el perfil de la gráfica es prácticamente el mismo en las ocho profundidades, únicamente de Marzo a Diciembre, meses en los que se mantuvieron las concentraciones en sus niveles más bajos, éstas son superiores en las capas más profundas.

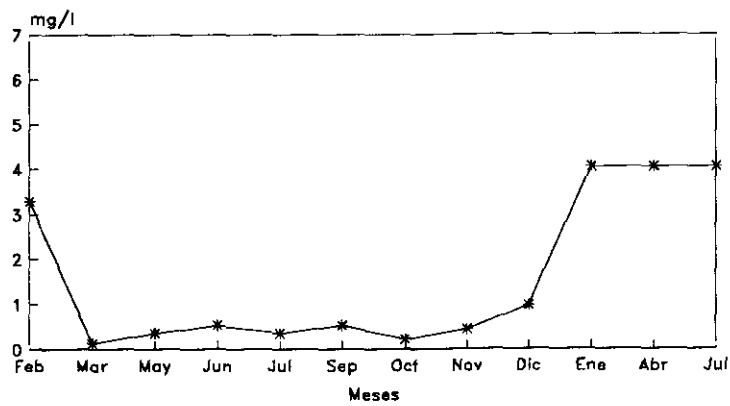
Fig. 36. CONCENTRACION DE NITRATOS



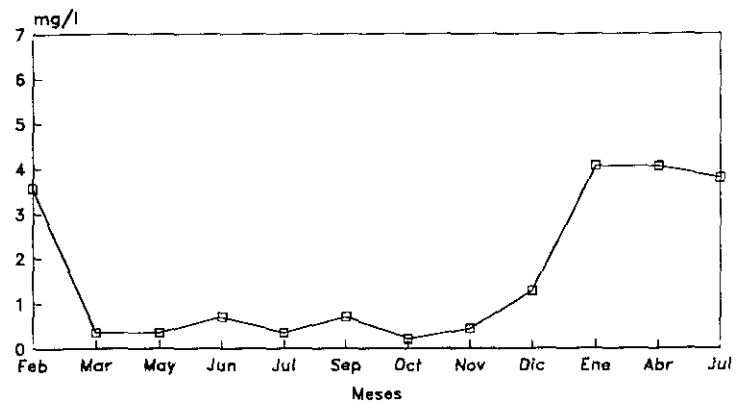
0 metros



2 metros

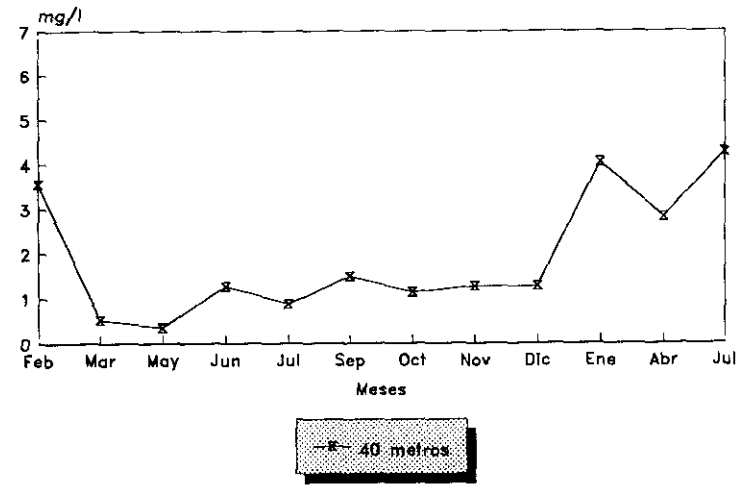
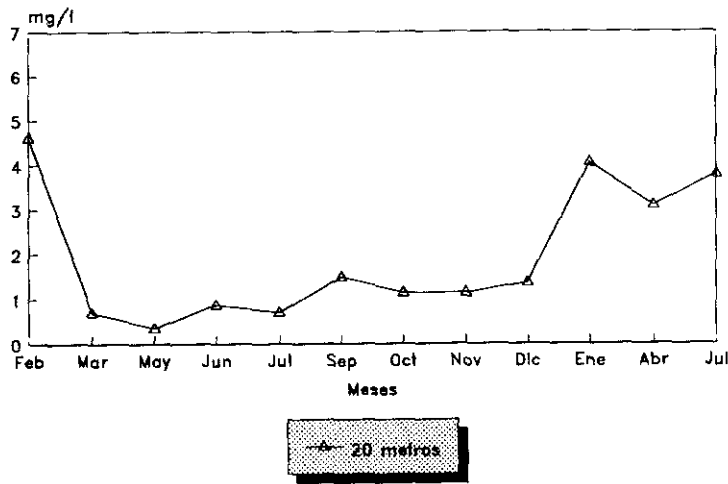
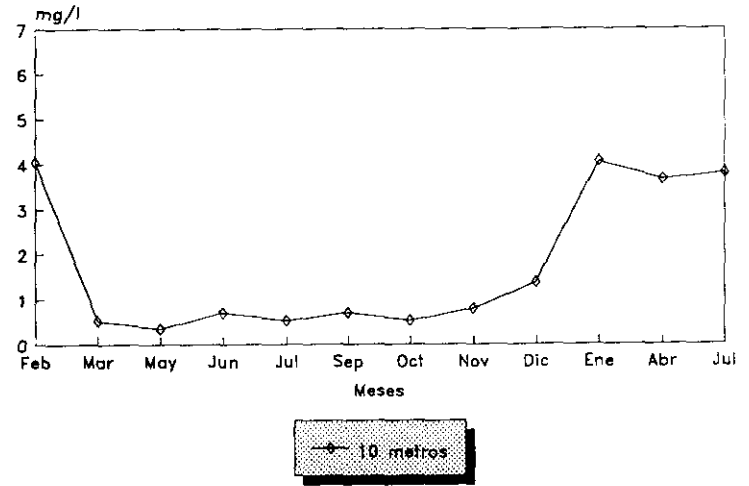
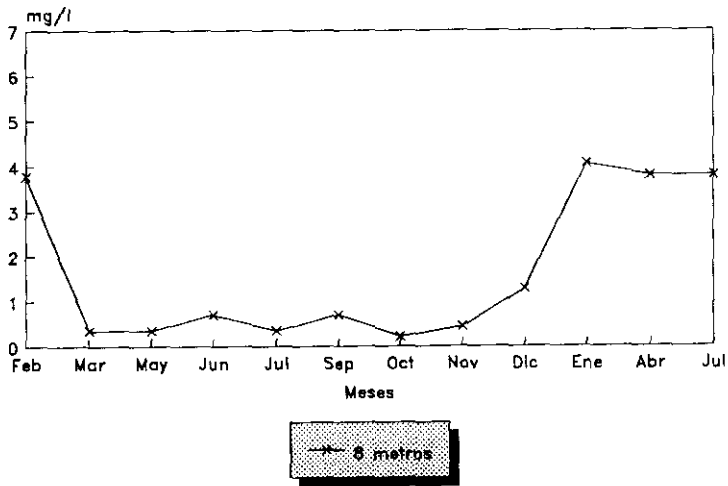


4 metros



6 metros

Fig. 37. CONCENTRACION DE NITRATOS



3.3.5. CONCENTRACION DE ORTOFOSFATOS

Las concentraciones de ortofosfatos se encuentran representadas en las figuras 38 y 39. Las concentraciones estuvieron comprendidas entre 0 y 0,68, valor que se obtuvo en la muestra de superficie en el mes de Septiembre. Los valores obtenidos fueron bajos, siendo muy inferiores a los encontrados por Carballo (1987) en este mismo embalse, y similares a los encontrados por Zinabu y Taylor (1989 a).

- Distribución temporal

Como se puede apreciar en las figuras citadas, la distribución temporal es muy irregular, mostrando continuas oscilaciones. Los ortofosfatos no pudieron ser detectados en el mes de Mayo en ninguna de las muestras analizadas, en el mes de Junio en las correspondientes a los metros 2 y 4, en Diciembre en las muestras de los metros 8, 10, 20 y 40 y en Julio del segundo año en ninguna de las muestras. Otros autores también han obtenido valores muy bajos e irregulares (Zinabu y Taylor, 1989 a).

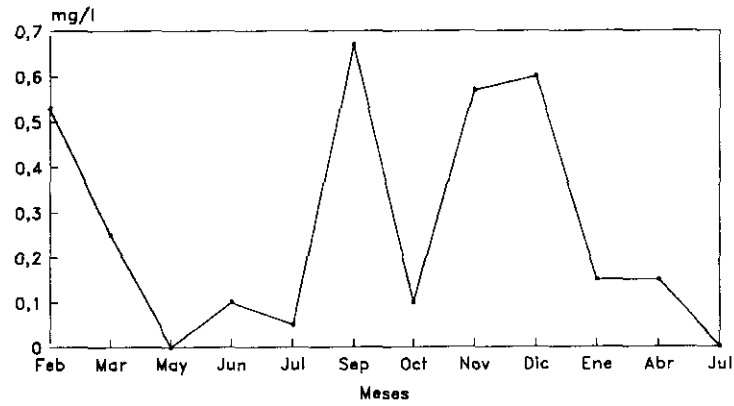
El no poder detectar estos compuestos en algunas de las muestras correspondientes a la primavera y el verano (Mayo, Junio y Julio) se puede atribuir a que el fósforo es el principal elemento limitante en este embalse (Carballo, 1987) y cuando está disponible es inmediatamente utilizado (Wetzel, 1983) compitiendo por él fitoplancton y bacterioplancton. En los meses más cálidos y con más horas de luz es cuando se produce un mayor desarrollo del fitoplancton, con lo cual asimilaría todo el fosfato disponible.

Como citábamos en los apartados anteriores es de destacar la disminución de la concentración en el mes de Octubre que coincide con un aumento de la del ion amonio y que ya hemos explicado en el apartado 3.3.2.

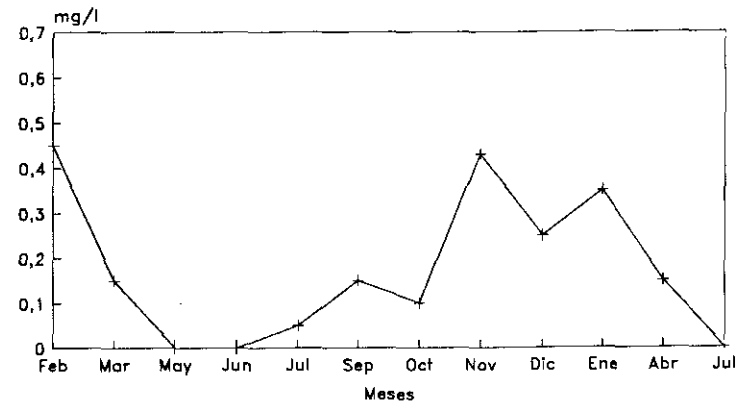
- Distribución espacial

En cuanto a la profundidad no podemos reconocer ningún modelo de distribución espacial, puesto que todas las profundidades se comportan de una manera similar con continuos aumentos y disminuciones.

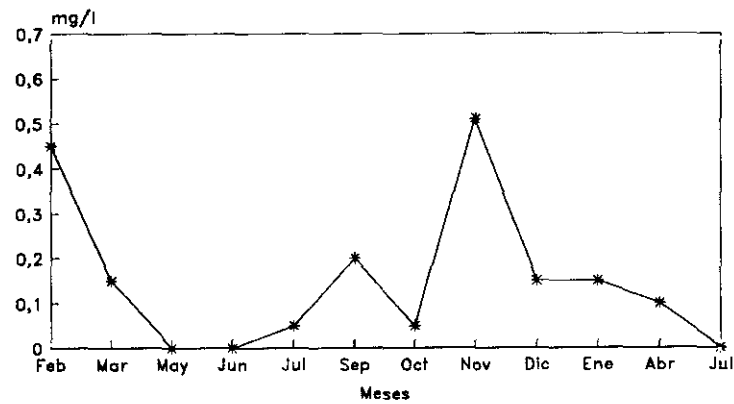
Fig. 38. CONCENTRACION DE ORTOFOSFATOS



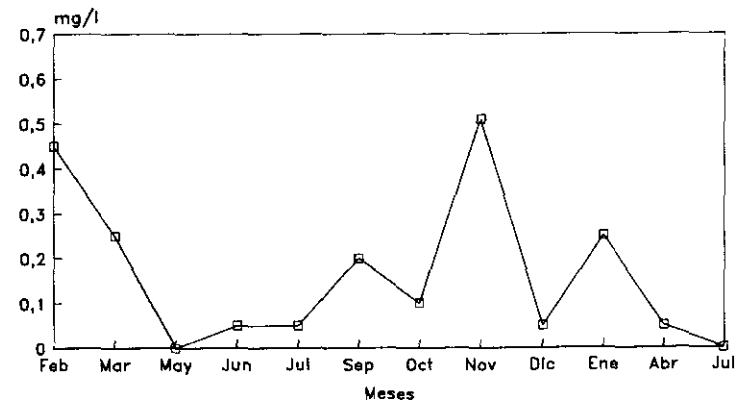
0 metros



2 metros

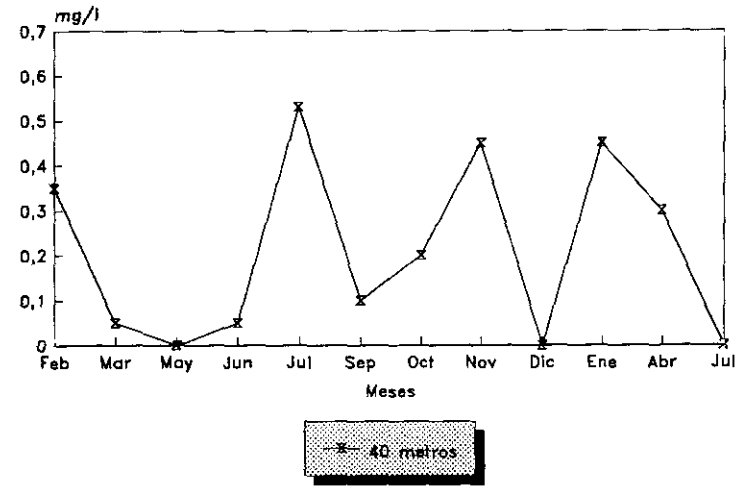
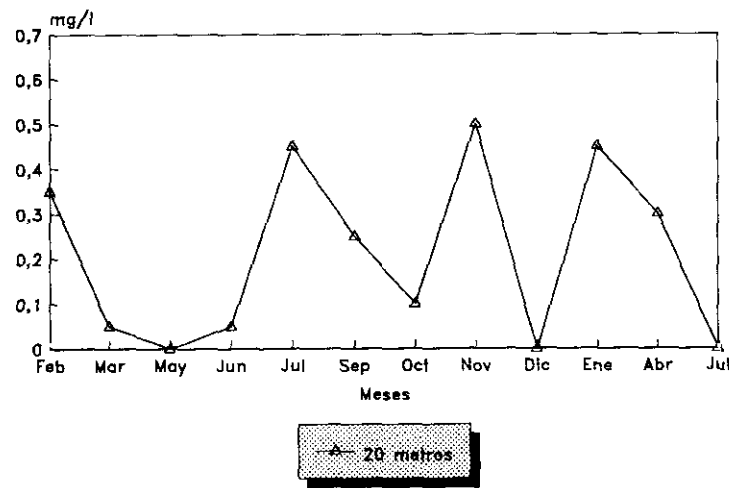
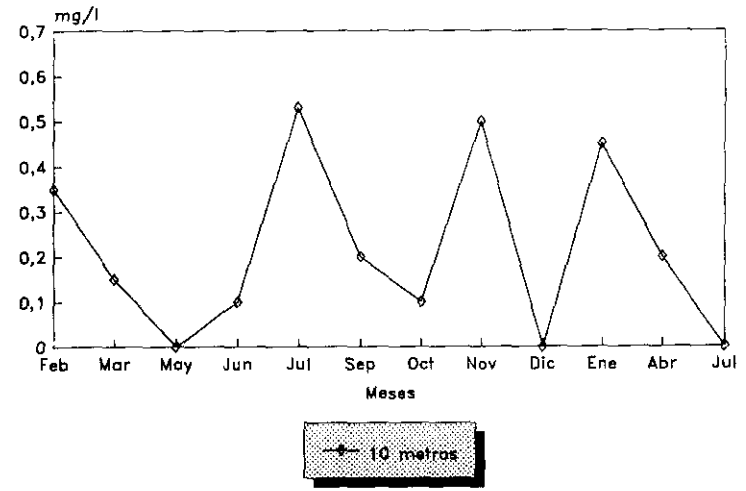
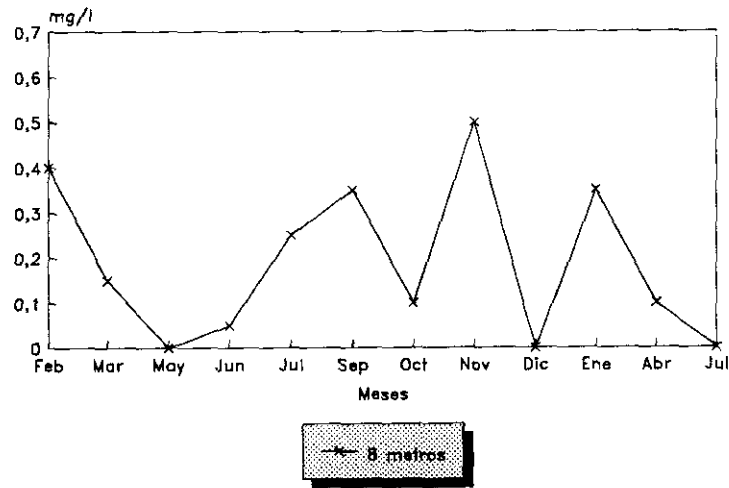


4 metros



6 metros

Fig. 39. CONCENTRACION DE ORTOFOSFATOS

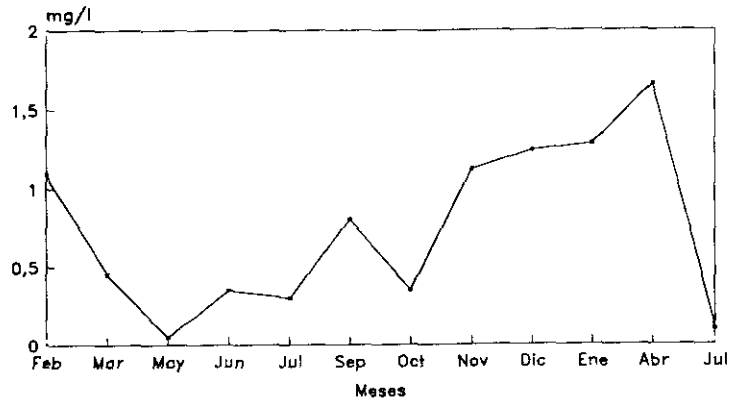


3.3.6. CONCENTRACION DE FOSFORO TOTAL

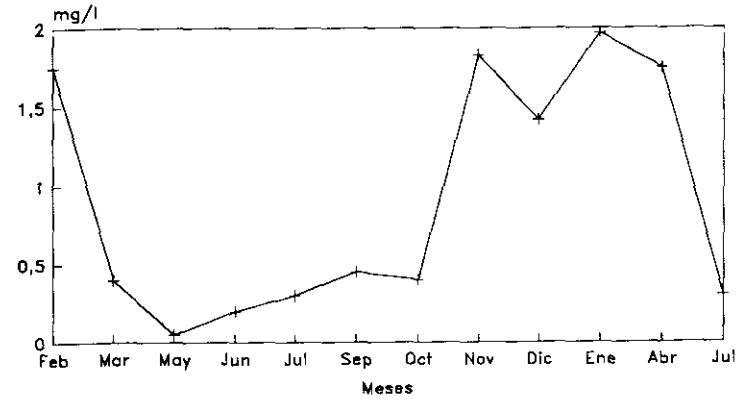
Las concentraciones de fósforo total están representadas en las figuras 40 y 41. Como podemos observar, los valores son también en su mayoría bajos.

En ocasiones podemos detectar similitudes entre las gráficas de estas figuras y las de las figuras 38 y 39, correspondientes a las concentraciones de ortofosfatos. Al igual que en éstas, observamos que en Mayo se obtuvieron las menores concentraciones de fósforo total, con valores muy próximos a 0 mg/l en todas las profundidades estudiadas. Asimismo, también se produce un descenso acusado en el mes de Julio del segundo año, volviendo a estar próxima a 0 mg/l la concentración de fósforo total en la muestra correspondiente a la superficie. El valor máximo se obtuvo en Enero, en la muestra del metro dos, alcanzando una concentración de 2 mg/l. El aumento en este mes también se puede observar en las muestras de los metros 8, 10, 20 y 40.

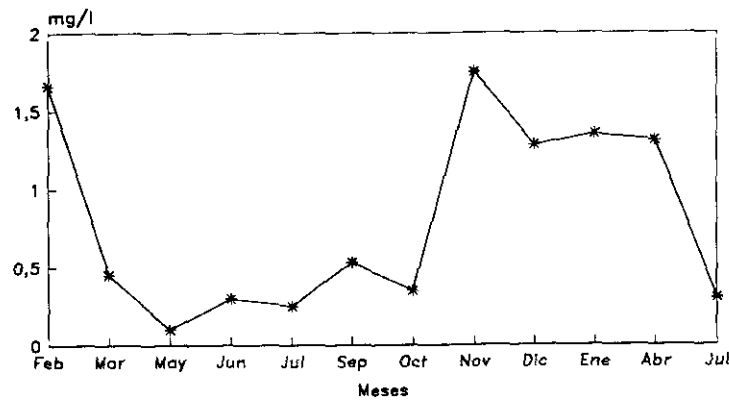
Fig. 40. CONCENTRACION DE FOSFORO TOTAL



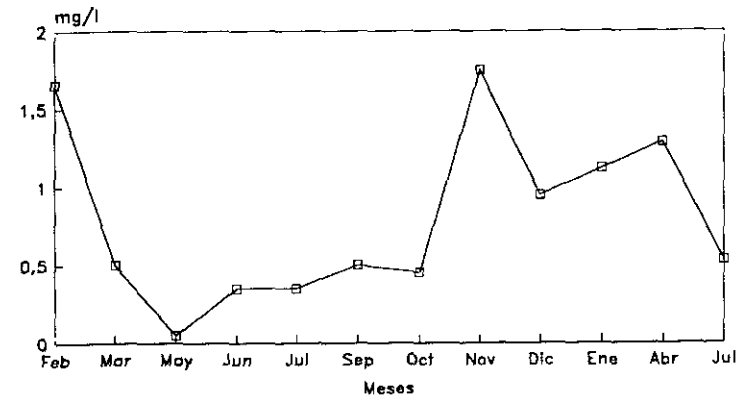
0 metros



2 metros

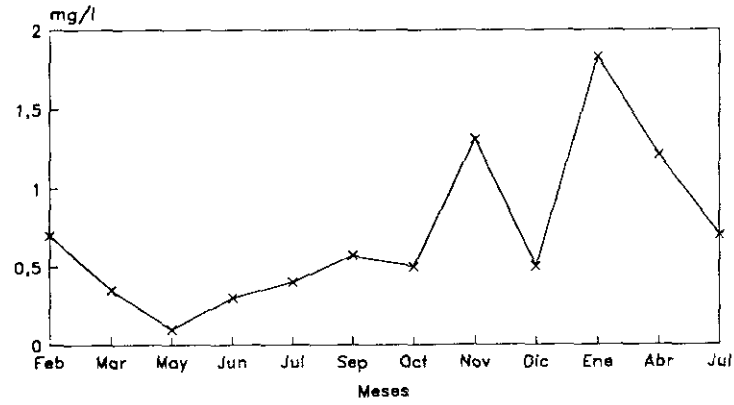


4 metros

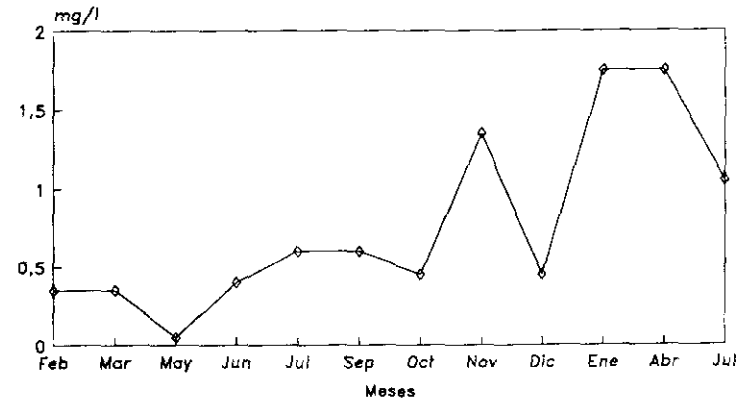


6 metros

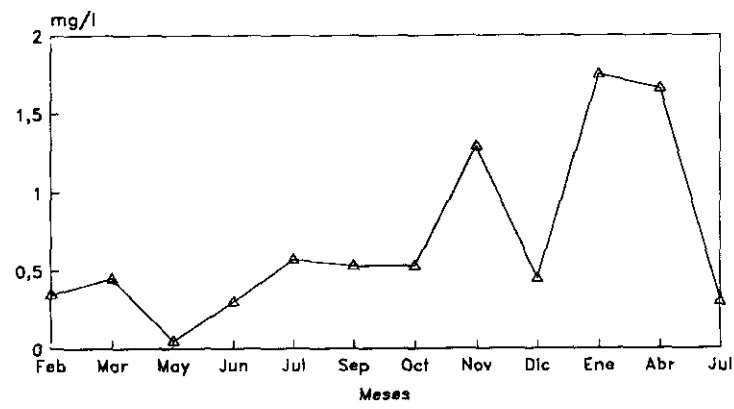
Fig.41. CONCENTRACION DE FOSFORO TOTAL



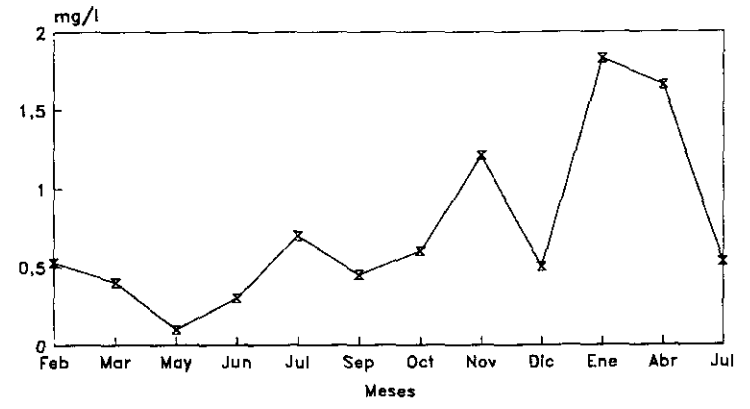
8 metros



10 metros



20 metros



40 metros

3.3.7. DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (D.Q.O.)

Los valores de D.Q.O. se encuentran representados en las figuras 42 y 43. Como se puede observar en ellas, éstos estuvieron comprendidos entre 4 y 7 mg O₂/l. Estos valores son superiores a los encontrados por Carballo (1987) en este mismo embalse, quien obtuvo valores durante la mayor parte de su estudio alrededor de 2 mg O₂/l.

- Distribución

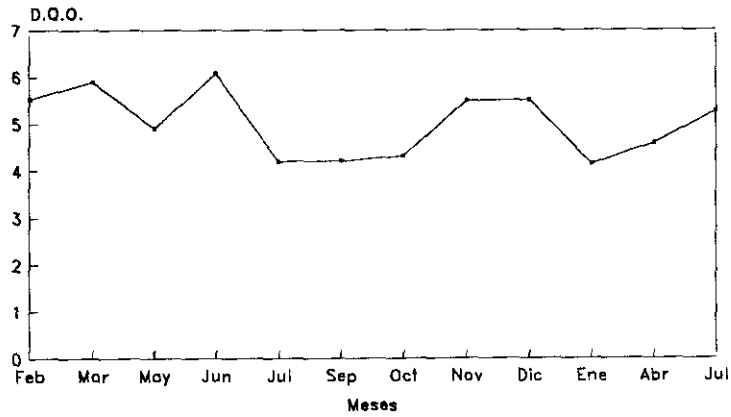
El máximo se obtuvo en el mes de Marzo, en la muestra correspondiente al metro 10, con un valor de 6,9 mg O₂/l. El mínimo se encontró en las muestras de los metros 4, 10, 20 y 40 del mes de Abril, con valores próximos a los 4 mg O₂/l.

La distribución temporal es bastante homogénea a la largo de todo el período de estudio, no observándose aumentos ni disminuciones acusados en la mayoría de las muestras.

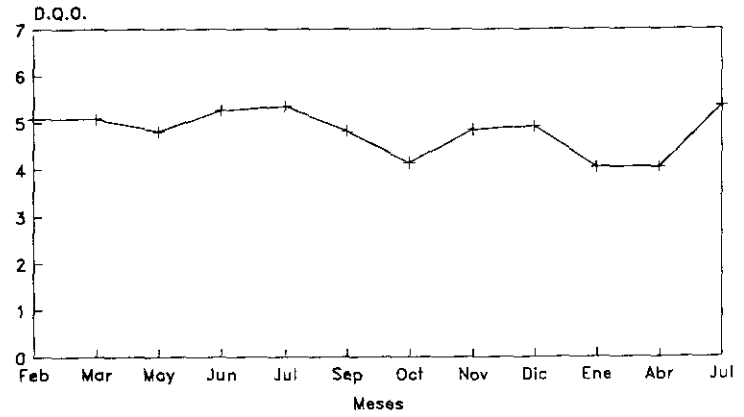
En cuanto a la distribución espacial tampoco podemos observar una mayor localización de la materia orgánica en alguna de las capas.

A pesar de que la concentración de materia orgánica puede influir notablemente en la concentración de las poblaciones microbianas (Fry y Zia, 1982) en este caso no encontramos relaciones entre las variaciones en los valores de DQO y los recuentos bacterianos. Quizás esto sea debido a que los valores obtenidos son bajos y las variaciones pequeñas.

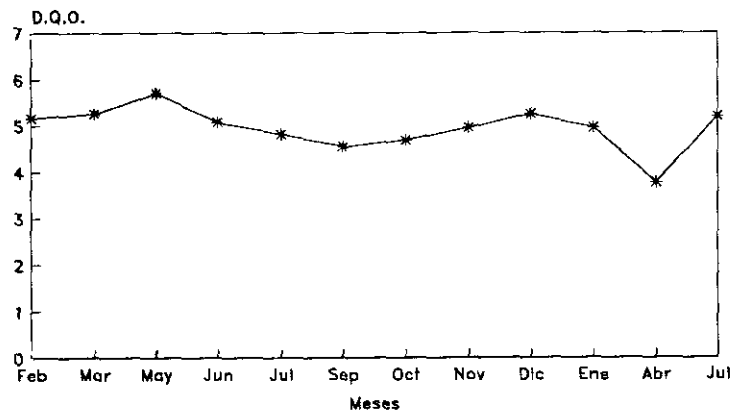
Fig.42. DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (D.Q.O.) (mg O /l)



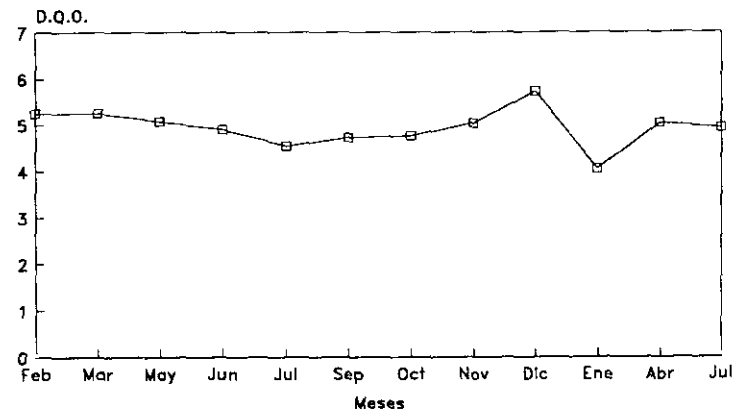
0 metros



2 metros

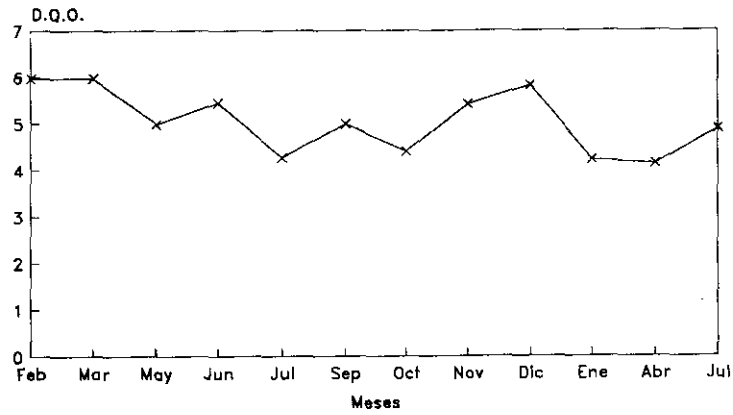


4 metros

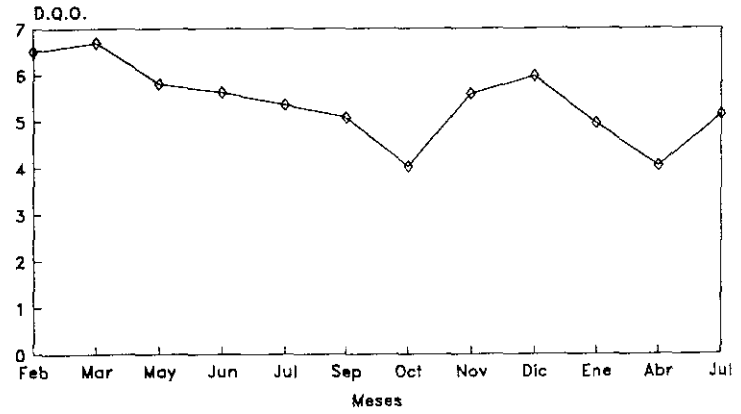


6 metros

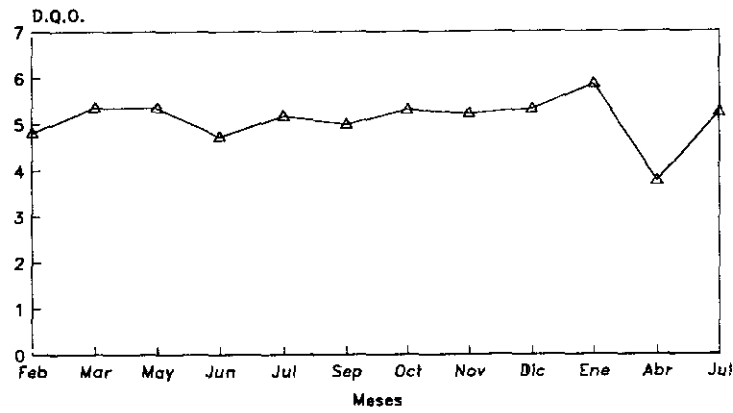
Fig. 43. DEMANDA QUÍMICA DE OXIGENO (D.Q.O.) (mg O /l)



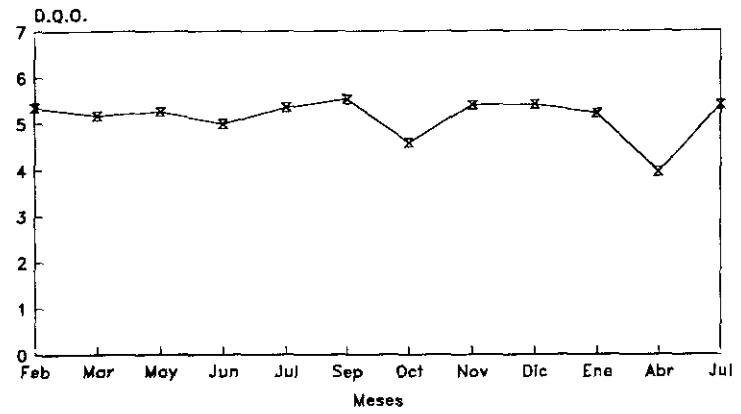
5 metros



10 metros



20 metros



40 metros

4. CONCLUSIONES

- Los recuentos de bacterias totales en el embalse de El Atazar se encontraron durante el periodo de estudio en el orden 10^6 /ml, con porcentajes de células respiratoriamente activas muy bajos durante gran parte del estudio, excepto en los meses de verano.
- La distribución temporal es más homogénea en las bacterias autóctonas que en las alóctonas. Por otra parte la de las bacterias coliformes es semejante a la de las bacterias heterótrofas a 37°C.
- Los recuentos de coliformes han sido mucho mayores que los de estreptococos, que no pudieron ser detectados en numerosas muestras. Se recomienda el método de filtración por membrana con incubación anaerobia para el recuento de bacterias coliformes en ambientes acuáticos naturales, ante la interferencia de bacterias de otros grupos que dificultan su detección.
- Las especies predominantes entre las bacterias coliformes han sido *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*, mientras que la especie dominante en los estreptococos es *Streptococcus bovis*, lo que conduce a la obtención de recuentos muy bajos debido a su menor supervivencia en agua.
- Los porcentajes de adhesión han sido mayores entre las bacterias que se consideran alóctonas que entre las consideradas autóctonas. Las bacterias del grupo coliforme presentan una alta tendencia a la adhesión, obteniéndose porcentajes alrededor del 50% en la mayoría de las muestras estudiadas. Esta alta tendencia a la adhesión también se observó en los estreptococos a pesar de la irregularidad de sus recuentos.
- La adhesión *in vitro*, tanto de las cepas de coliformes como de estreptococos aisladas de las muestras del embalse, ha sido elevada en todos los casos, sin diferencias entre las distintas cepas de bacterias que se encontraban libres y adheridas en el embalse.
- La gran tendencia a la adhesión de los coliformes podría suponer una estrategia de supervivencia en medios acuáticos de estas bacterias que han sido consideradas tradicionalmente indicadoras de contaminación fecal.

5. BIBLIOGRAFIA

- ABSOLOM, D.R., LAMBERTI, F.V., POLICOVA, Z., ZINGG, W., van OSS, C.J. and NEUMANN, A.W. 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 90-97.
- ALBRIGHT, L.J. and McCRAE, S.K. 1987. Annual bacterioplankton biomasses and productivities in a temperate west coast canadian fjord. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1277-1285.
- ALBRIGHT, L.J., McCRAE, S.K. and MAY, B.E. 1986. Attached and free-floating bacterioplankton in Howe Sound, British Columbia, a coastal marine fjord-embayment. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 614-621.
- ANDERSEN, P. and FENCHEL, T. 1985. Bacterivory by microheterotrophic flagellates in seawater samples. *Limnol. Oceanogr.* **30**, 198-202.
- ANDERSEN, P. and SØRENSEN, H.M. 1986. Population dynamics and trophic coupling in pelagic microorganisms in eutrophic coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **33**, 99-109.
- ANDERSON, I.C., RHODES, M.W. and KATOR, H.I. 1983. Seasonal variation in survival of *Escherichia coli* exposed in situ in membrane diffusion chambers containing filtered and non filtered estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1877-1883.
- A.P.H.A. 1989. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 17th ed. Port City Press. Baltimore.
- AWONG, J., BITTON, G. and RASUL CHAUDHRY, G. 1990. Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 977-983.
- AZAM, F., FENCHEL, T., FIELDS, J.G., FENCHEL, J.F., GRAY, J.S., MEYER-REIL, L.A. and THINGSTAD, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**, 257-263.
- BAILEY, C.A., NEIHOF, R.A. and TABOR, D.S. 1983. Inhibitory effect of solar radiation on amino acid uptake in Chesapeake Bay bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 44-49.

- BAKER, J.H. 1984. Factors affecting the bacterial colonization of various surfaces in a river. *Can. J. Microbiol.* **30**, 511-515.
- BALTIMORE, R.S. and MITCHELL, M. 1980. Immunological investigation of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of susceptibility by opsonic antibody in mucoid and nonmucoid strains. *J. Infect. Dis.* **141**, 238-247.
- BARCINA, I., ARANA, I., IRIBERRI, J. and EGEEA, L. 1986. Factors affecting the survival of *Escherichia coli* in a river. *Hidrologia.* **141**, 249-253.
- BARCINA, I., GONZALEZ, J.M., IRIBERRI, J. and EGEEA, L. 1989. Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 246-251.
- BARCINA, I., GONZALEZ, J.M., IRIBERRI, J. and EGEEA, L. 1990. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 189-198.
- BAR-OR, Y. 1990. The effect of adhesion on survival and growth of microorganisms. *Experientia.* **46**, 823-826.
- BEECH, I.B. and GAYLARDE, C.C. 1989. Adhesion of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* to mild steel surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 201-207.
- BELL, C.R. and ALBRIGHT, L.J. 1982. Attached and free-floating bacteria in a diverse selection of water bodies. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1227-1237.
- BELL, R.T. and KUPARINEN, J. 1984. Assessing phytoplankton and bacterioplankton production during early spring in lake Erken, Sweden. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 1221-1230.
- BELL, W.H. 1983. Bacterial utilization of algal extracellular products. The specificity of algal-bacterial interaction. *Limnol. Oceanogr.* **28**, 1131-1143.
- BERGSTEIN-BEN DAN, T. and STONE, L. 1991. The distribution of fecal pollution

- indicator bacteria in lake Kinneret. *Wat. Res.* **25**, 263-270.
- BERMAN, D., RICE, E.W. and HOFF, J.C. 1988. Inactivation of particle-associated coliforms by chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 507-512.
 - BETTS, R.P., BANKES, P. and BANKS, J.G. 1989. Rapid enumeration of viable microorganisms by staining and direct microscopy. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**, 199-202.
 - BISSONNETTE, G.K., JEZESKI, J.J., McFETERS, G.A. and STUART, D.G. 1975. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. *Appl. Microbiol.* **29**, 186-194.
 - BJØRNSSEN, P.K., LARSEN, J.B., GEERTZ-HANSEN, O. and OLESEN, M. 1986. A field technique for the determination of zooplankton grazing on natural bacterioplankton. *Freshwater Biol.* **16**, 245-253.
 - BOBBIE, R.J., MORRISON, S.J. and WHITE, D.C. 1978. Effects of substrate biodegradability on the mass and activity of the associated estuarine microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 179-184.
 - B.O.E. 1983. Nº 193. 13 de Agosto de 1983.
 - B.O.E. 1990. Nº 226. 20 de Septiembre de 1990.
 - BOWDEN, W.B. 1977. Comparison of two direct count techniques for enumerating aquatic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1229-1232.
 - BOYLE, C.D. and READE, A.E. 1983. Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 392-399.
 - BREZNAK, J.A. 1984. Activity on surfaces. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.) pp. 203-221. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlín.
 - BRIGHT, J.J. and FLETCHER, M. 1983 a. Amino acid assimilation and electron transport system activity in attached and free-living marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 818-

- BRIGHT, J.J. and FLETCHER, M. 1983 b. Amino acid assimilation and respiration by attached and free-living populations of a marine *Pseudomonas* sp. *Microb. Ecol.* **9**, 215-226.
- BROCK, T.D. and CLYNE, J. 1984. Significance of algal excretory products for growth of epilimnetic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 731-734.
- BUCHANAM-MAPPIN, J.M., WALLIS, P.M. and BUCHANAM, A.G. 1986. Enumeration and identification of heterotrophic bacteria in groundwater and in a mountain stream. *Can. J. Microbiol.* **32**, 93-98.
- BURLINGAME, G.A., McELHANEY, J., BENNET, M. and PIPES, W.O. 1984. Bacterial interference with coliform colony sheen production on membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 56-60.
- BURTON, G.A., GUNNISON, D. and LANZA, G.R. 1987. Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 633-638.
- BUSSCHER, H.J., UYEN, M.H.W.J.C., van PELT, A.W.J., WEERKAMP, A.H. and ARENDS, J. 1986. Kinetics of adhesion of the oral bacterium *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 910-914.
- BYRD, J.J., XU, H.S. and COLWELL, R.R. 1991. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 875-878.
- CANAL DE ISABEL II. 1972. El Atazar. Abastecimiento de agua a Madrid.
- CARBALLO, S. 1987. Dinámica del ciclo biogeoquímico del nitrógeno en dos embalses de distinto grado trófico. Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense. Madrid.
- CARON, D.A., GOLDMAN, J.C. and DENNETT, M.R. 1986. Effect of temperature on growth, respiration and nutrient regeneration by an omnivorous microflagellate. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1340-1347.

- CENCI, G., CALDINI, G., SFODERA, F. and MOROZZI, G. 1990. Fluorogenic detection of atypical coliforms from water samples. *Microbiologica*. **13**, 121-129.
- CLARK, J.A. 1980. The influence of increasing numbers of nonindicator organisms upon the detection of indicator organisms by the membrane filter and presence-absence test. *Can. J. Microbiol.* **26**, 827-832.
- CLARKE, K.R. and JOINT, I.R. 1986. Methodology for estimating numbers of free-living and attached bacteria in estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1110-1120.
- COLLIN, J.F., ZMIROU, D., FERLEY, J.P. and CHARREL, M. 1988. Comparison of bacterial indicators and sampling programs for drinking water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2073-2077.
- COOPER, S., BATTAT, A., MARSOT, P. and SYLVESTRE, M. 1983. Production of antibacterial activities by two *Bacillariophyceae* grown in dialysis culture. *Can. J. Microbiol.* **29**, 338-341.
- CORNAX, R., MORIÑIGO, M.A., ROMERO, P. AND BORREGO, J.J. 1990. Survival of pathogenic microorganisms in seawater. *Curr. Microbiol.* **20**, 293-298.
- COSTERTON, J.W. and CHENG, K.J. 1982. Microbe-microbe interactions at surfaces. In: *"Experimental microbial ecology"*. R.G. Burns & J.H. Slater (eds.). pp. 275-290. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M. and MARRIE, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 435-464.
- COSTERTON, J.W. and GEESEY, G.G. 1979 a. Which population of aquatic bacteria should we enumerate?. In: *"Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology"*. J.W. Costerton & R.R. Colwell (eds.). pp. 7-18. ASTM Press. Philadelphia.
- COSTERTON, J.W. and GEESEY, G.G. 1979 b. Microbial contamination of surfaces. In: *"Surface contamination"*. K.L. Mittal (ed.) pp. 211-221. Plenum Publishing. Nueva York.

- COWAN, M.M. and FLETCHER, M. 1987. Rapid screening method for detection of bacterial mutants with altered adhesion abilities. *J. Microbiol. Methods*. **7**, 241-249.
- CUBILLO, F., CASADO, C. y CASTILLO, V. 1990. Caudales ecológicos. Estudio de regímenes de caudales mínimos en los cauces de la Comunidad de Madrid. Cuadernos madrileños del medio ambiente. Agencia del Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid. Madrid.
- CURRIE, D.J. and KALFF, J. 1984. A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnol. Oceanogr.* **29**, 298-310.
- CHAI, T.J. 1983. Characteristics of *Escherichia coli* grown in bay water as compared with rich medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1316-1323.
- CHARACKLIS, W.G. 1984. Biofilm development: a process analysis. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 137-157. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin.
- CHEN, M. and HICKEY, P.J. 1983. Modification of delayed-incubation procedure for detection of fecal coliforms in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 889-893.
- CHENG, K.-J., IRVIN, R.T. and COSTERTON, J.W. 1981. Autochthonous and pathogenic colonization of animal tissues by bacteria. *Can. J. Microbiol.* **27**, 461-490.
- CHRISTENSEN, B.E., KJOSBAKKEN, J., SMIDSRØD, O. 1985. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 837-845.
- CHRZANOWSKI, T.H. 1985. Seasonality, abundance, and biomass of bacteria in a southwestern reservoir. *Hydrobiologia*. **127**, 117-123.
- CHRZANOWSKI, T.H. and HUBBARD, J.G. 1988. Primary and bacterial secondary production in a southwestern reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 661-669.
- DAFT, M.J., BURNHAM, J.C. AND YAMAMOTO, Y. 1985a. Lysis of *Phormidium luridum*

- by *Myxococcus fulvus* in continuous flow cultures. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 73-80.
- DAFT, M.J., BURNHAM, J.C. AND YAMAMOTO, Y. 1985b. Algal blooms: consequences and potential cures. *J. Appl. Bacteriol.* Symposium Supplement. 175S-186S.
 - DAFT, M.J. and FALLOWFIELD, H.J. 1977. Seasonal variations in algal and bacterial populations in scottish freshwater habitats. In: "*The oil industry and microbial ecosystems*". K.W.A. Chater and H.J. Sommerville (eds.). pp. 41-50. Heyden & sons, Ltd. London.
 - DAGUET, G.L. 1977. *Técnicas en bacteriología. I. Aerobios.* pp. 218-220. Ed. Jims. Barcelona.
 - DAVENPORT, C.V., SPARROW, E.B. and GORDON, R.C. 1976. Fecal indicator bacteria persistence under natural conditions in an ice-covered river. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 527-536.
 - DeFLANN, M.F., TANZER, A.S., McATEER, A.L., MARSHALL, B. and LEVY, S.B. 1990. developoment of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 112-119.
 - DEVRIESE, L.A., COLLINS, M.D. and WIRTH, R. 1992. The genus *Enterococcus*. In: "*The Prokaryotes*". 2nd. ed. Vol. II. pp. 1465-1481. A. Balows, H.G. Trüpper, M. Dworkin, W.Harder, K.H. Schleiffer. Springer-Verlag. Berlin.
 - DEXTER, S.C., SULLIVAN, J.D., WILLIAMS, J. and WATSON, S.W. 1975. Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **30**, 298-308.
 - DOYLE, J.D., TUNNICLIFF, B., BRICKLER, S.K., KRAMER, R.E. and SINCLAIR, N.A. 1984. Anaerobic incubation of membrane filter cultures for improved detection of fecal coliforms from recreational waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 324-326.
 - DUCKLOW, H.W., KIRCHMAN, D.L. and ROWE, G. 1982. Production and vertical flux of attached bacteria in the Hudson River Plume of the New York Bight as studied with floating sediment traps. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 769-776.

- DUNNE, W.M., Jr. and BURD, E.M. 1991. In vitro measurement of the adherence of *Staphylococcus epidermidis* to plastic using cellular urease as a marker. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 863-866.
- EDWARDS, R.T. and MEYER, J.L. 1986. Production and turnover of planktonic bacteria in two southeastern blackwater rivers. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1317-1323.
- ENZINGER, R.M. and COOPER, R.C. 1976. Role of bacteria and protozoa in the removal of *Escherichia coli* from estuarine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 758-763.
- EVANS, T.M., SEIDLER, R.J. and LeCHEVALLIER, M.W. 1981 a. Impact of verification media and resuscitation on accuracy of the membrane filter total coliform enumeration technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1141-1151.
- EVANS, T.M., WAARVICK, C.E., SEIDLER, R.J. and LeCHEVALLIER, M.W. 1981 b. Failure of the most-probable-number technique to detect coliforms in drinking water and raw water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 130-138.
- FALLON, R.D. and BROCK, T.D. 1979. Decomposition of blue-green algal (cyanobacterial) blooms in lake Mendota, Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 820-830.
- FALLON, R.D. and BROCK, T.D. 1980. Planktonic blue-green algae: production, sedimentation and decomposition in Lake Mendota, Wisconsin. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 72-88.
- FATTON, A. and SHILO, M. 1984. Hydrophobicity as an adhesion mechanism of bentic cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 135-143.
- FAUST, A., AOTAKY, A.E and HARGADON, M.L. 1975. Effect of physical parameters on the in situ survival of *Escherichia coli* MC-6 in an estuarine environment. *Appl. Microbiol.* **30**, 800-806.
- FENCHEL, T. 1980 a. Relation between particle size selection and clearance in suspension-feeding ciliates. *Limnol. Oceanogr.* **25**, 733-738.
- FENCHEL, T. 1980 b. Suspension feeding in ciliated protozoa: functional response and

- particle size selection. *Microb. Ecol.* **6**, 1-11.
- FENCHEL, T. 1980 c. Suspension feeding in ciliated protozoa: feeding rates and their ecological significance. *Microb. Ecol.* **6**, 13-25.
 - FENCHEL, T. 1982 a. Ecology of heterotrophic microflagellates. II. Bioenergetics and growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **8**, 225-231.
 - FENCHEL, T. 1982 b. Ecology of heterotrophic microflagellates. IV. Quantitative occurrence and importance as bacterial consumers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **9**, 35-42.
 - FENCHEL, T. and JØRGENSEN, B. 1977. Detritus food chains of aquatic environments: the role of bacteria. In: "*Advances in Microbial Ecology*", Vol. 1. M. Alexander (ed.). pp. 1-58. Plenum-Press. Nueva York.
 - FENG, P.C.S. and HARTMAN, P.A. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1320-1329.
 - FERNANDEZ, R.M. 1985. Influencia de la contaminación fecal de los aportes en la calidad sanitaria de dos embalses de distinto grado trófico. Tesina de Licenciatura. 302 pp. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
 - FERNANDEZ-ALVAREZ, R.M., CARBALLO-CUERVO, S., DE LA ROSA-JORGE, M.C. and RODRIGUEZ-DE LECEA, J. 1991. The influence of agricultural run-off on bacterial populations in a river. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 437-442.
 - FILIP, Z., KADDU-MULINDWA, D. and MILDE, G. 1988. Survival of some pathogenic and facultative pathogenic bacteria in groundwater. *Wat. Sci. Tech.* **20**, 227-231.
 - FINCH, G.R., STILES, M.E. and SMITH, D.W. 1987. Recovery of a marked strain of *Escherichia coli* from ozonated water by membrane filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2894-2896.
 - FLETCHER, M. 1976. The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. *J. Gen. Microbiol.* **94**, 400-404.

- FLETCHER, M. 1977. The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can. J. Microbiol.* **23**, 1-6.
- FLETCHER, M. 1980 a. The question of passive versus active attachment mechanisms in non-specific bacterial adhesion. In: "*Microbial adhesion to surfaces*". R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent (eds.). pp. 197-210. Ellis Horwood Ltd. Chichester.
- FLETCHER, M. 1980 b. Adherence of marine microorganisms to smooth surfaces. In: "*Bacterial adherence*" (Receptors and recognition, Series B, vol. 6). E.H. Beachey (ed.). pp. 345-374. Chapman and Hall. London.
- FLETCHER, M. 1983. The effects of methanol, ethanol, propanol and butanol on bacterial attachment to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 633-641.
- FLETCHER, M. 1984. Comparative physiology of attached and free-living bacteria. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 223-232. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin.
- FLETCHER, M. 1986. Measurement of glucose utilization by *Pseudomonas fluorescens* that are free-living and that are attached to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 672-676.
- FLETCHER, M. 1987. How do bacteria attach to solid surfaces?. *Microbiological Sciences.* **4**, 133-136.
- FLETCHER, M. 1988. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J. Bacteriol.* **170**, 2027-2030.
- FLETCHER, M. and FLOODGATE, G.D. 1976. The adhesion to bacteria of solid surfaces. In: "*Microbial ultrastructure: the use of electron microscope*". R. Fuller and D.W. Lovelock. pp. 101-107. Academic Press. London.
- FLETCHER, M., LATHAM, M.J., LYNCH, J.M. and RUTTER, P.R. 1980. The characteristics of interfaces and their role in microbial attachment. In: "*Microbial adhesion to surfaces*". R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent (eds.). pp. 67-78. Ellis

Horwood Ltd. Chichester.

- FLETCHER, M. and LOEB, G.I. 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 67-72.
- FLETCHER, M. and MARSHALL, K.C. 1982 a. Are solid surfaces of ecological significance to aquatic bacteria?. In: "*Advances in Microbial Ecology*". Vol. 6. K.C. Marshall (ed.). pp. 199-236. Plenum Press. Nueva York.
- FLETCHER, M. and MARSHALL, K.C. 1982 b. Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 184-192.
- FLETCHER, M. and McELDOWNEY, S. 1984. Microbial attachment to nonbiological surfaces. In: "*Current perspectives in microbial ecology*". M.J. Klug and C.A. Reddy (eds). pp. 124-129. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- FLINT, K.P. 1987. The long-term survival of *Escherichia coli* in river-water. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 261-270.
- FRANCISCO, D.E., MAH, R.A. and RABIN, A.C. 1973. Acridine orange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Trans. Amer. Micros. Soc.* **92**, 416-421.
- FRANZBLAU, S.G., HINNEBUSCH, B.J., KELLEY, L.M. and SINCLAIR, N.A. 1984. Effect of noncoliform on coliform detection in potable groundwater: improved recovery with an anaerobic membrane filter technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 142-148.
- FRY, J.C. 1988. Determination of biomass. In: "*Methods in aquatic bacteriology*". B. Austin (ed.) pp. 27-72. Jhon Wiley & sons. Chichester.
- FRY, J.C. and ZIA, T. 1982. Viability of heterotrophic bacteria in freshwater. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2841-2850.
- FUJIOKA, R.S., HASHIMOTO, H.H., SIWAK, E.B. and YORNG, R.H.T. 1981. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 690-696.

- FUJIOKA, R.S. and NARIKOWA, O.T. 1982. Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 395-401.
- FUHRMAN, J.A. and AZAM, F. 1980. Bacterioplankton secondary production estimates for coastal waters of British Columbia, Antarctica and California. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1085-1095.
- FUSTER, J.M., PORTERO, J., GARCIA CACHO, L. y CAPOTE, R. 1971. Mapa geológico de España. Hoja de Segovia. Instituto Geológico y Minero de España. Madrid.
- GARCIA-LARA, J., MENON, P., SERVAIS, P. and BILLEN, G. 1991. Mortality of fecal bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 885-888.
- GEESEY, G.G. and COSTERTON, J.W. 1979. Microbiology of a northern river: bacterial distribution and relationship to suspended sediment and organic carbon. *Can. J. Microbiol.* **25**, 1058-1062.
- GEESEY, G.G., MUTCH, R., COSTERTON, J.W. and GREEN, R.B. 1978. Sessile bacteria: an important component of the microbial population in small mountain streams. *Limnol. Oceanogr.* **23**, 1214-1223.
- GERBA, C.P. and McLEOD, J.S. 1976. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 114-120.
- GIBBONS, R.J. and van HOUTE, J. 1975. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* **29**, 19-44.
- GILBERT, P., ALLISON, D.G., EVANS, D.J., HANDLEY, P.S. and BROWN, M.R.W. 1989. Growth rate control of adherent bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1308-1311.
- GILBERT, P., BROWN, M.R.W. and COSTERTON, J.W. 1987. Inocula for antimicrobial sensitivity testing: a critical review. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**, 147-154.
- GOLDBERG, S., KONIS, Y. and ROSENBERG, M. 1990. Effect of cetylpyridinium chloride

- on microbial adhesion to hexadecane and polystyrene. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1678-1682.
- GONZALEZ, J.M., IRIBERRI, J., EGEA, L. and BARCINA, I. 1990 a. Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1851-1857.
 - GONZALEZ, J.M., SHERR, E.B. and SHERR, B.F. 1990 b. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 583-589.
 - GORDON, A.S. 1987. Influence of alginate on attachment of *Vibrio* spp to stainless steel surfaces in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1175-1177.
 - GORDON, A.S., GERCHAKOV, S.M. and MILLERO, F.J. 1983. Effects of inorganic particles on metabolism by a periphytic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 411-417.
 - GORDON, A.S. and MILLERO, F.J. 1984. Electrolyte effects on attachment of an estuarine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 495-499.
 - GOSHKO, M.A., PIPES, W.O. and CHRISTINA, R.R. 1983. Coliform occurrence and chlorine residual in small water distribution systems. *Am. Water Works Assoc. J.* **74**, 371-374.
 - GOULDER, R. 1977. Attached and free bacteria in an estuary with abundant suspended solids. *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 399-405.
 - GOYAL, S.M. and ADAMS, W.N. 1984. Drug-resistant bacteria in continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 861-862.
 - GRANAI, C. III and SJOGREN, R.E. 1981. In situ and laboratory studies of bacterial survival using a microporous membrane sandwich. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 190-195.
 - GRIFFITH, P.C. and FLETCHER, M. 1990. A model system derived from marine diatoms for investigating the activity of particle-associated bacteria. *J. Microbiol. Methods.* **12**, 65-74.

- GRIFFITH, P.C. and FLETCHER, M. 1991. Hydrolysis of protein and model dipeptide substrates by attached and nonattached marine *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 2021. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2186-2191.
- GRIMES, D.J. and COLWELL, R.R. 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *Microbiol. Lett.* **34**, 161-165.
- GURIJALA, K.R. and ALEXANDER, M. 1990. Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1631-1635.
- HAACK, T.K. and McFETERS, G.A. 1982. Microbial dynamics of an epilithic mat community in a high alpine stream. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 702-707.
- HARBER, M.J., MACKENZIE, R. and ASSCHER, A.W. 1983. A rapid bioluminescence method for quantifying bacterial adhesion to polystyrene. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 621-632.
- HARDY, K.G. 1982. Bacteriocins. In: "*Experimental Microbial Ecology*". Burns and Slater (ed.). pp. 368-378. Blackwell Scientific Publishing. London.
- HARVEY, R.W. and GEORGE, L.H. 1987. Growth determinations for unattached bacteria in a contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2992-2996.
- HARVEY, R.W. and YOUNG, L.Y. 1980. Enumeration of particle-bound and unattached respiring bacteria in the salt marsh environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 156-160.
- HENDRICKS, C.W. 1974. Sorption of heterotrophic and enteric bacteria to glass surfaces in the continuous culture of river water. *Appl. Microbiol.* **28**, 572-578.
- HERBERT, R.A. 1988. Sampling methods. In: "*Methods in aquatic bacteriology*". B. Austin (ed.). pp. 3-25. John Wiley & Sons. Chichester.
- HERSON, D.S., MCGONIGLE, B., PAYER, M.A. and BAKER, K.H. 1987. Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1178-1180.

- HICKS, S.J. and ROWBURY, R.J. 1987. Bacteriophage resistance of attached organisms as a factor in the survival of plasmid-bearing strains of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **4**, 129-132.
- HIRSCH, P. 1984. Microcolony formation and consortia. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 373-393. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlín.
- HIRSCH, P. and RADES-ROHKOHL, E. 1983. Microbial diversity in a groundwater aquifer in Northern Germany. *Developments in Industrial Microbiology.* **24**, 183-200.
- HOBBIIE, J.E., DALEY, R.J. and JASPER, S. 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1225-1228.
- HOGT, A.H., DANKERT, J., de VRIES, J.A. and FEIJEN, J. 1983. Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2959-2968.
- HOLLIBAUGH, J.T. and AZAM, F. 1983. Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnol. Oceanogr.* **28**, 1104-1116.
- HOOG, S.D. and OLD, L.A. 1987. The hydrophobicity of *Streptococcus salivarius* strain HB and mutants deficient in adhesion to saliva-coated hydroxyapatite. *Lett. Appl. Microbiol.* **4**, 99-101.
- HOPPE, H.-G. 1984. Attachment of bacteria: advantage or disadvantage for survival in the aquatic environment. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 283-301. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlín.
- HSU, S.C. and WILLIAMS, T.J. 1982. Evaluation of factors affecting the membrane filter technique for testing drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 453-460.
- HUBBARD, J.G. and CHRZANOWSKI, T.H. 1986. Impact of storms on heterotrophic activity of epilimnetic bacteria in a southwestern reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1259-1263.
- HUDSON, L.D., HANKLIN, J.W. and BATTAGLIA, M. 1983. Coliforms in a water distribution system: a remedial approach. *Am. Water Works Assoc. J.* **75**, 564-568.

- HUMPHREY, B., KJELLEBERG, S. and MARSHALL, K.C. 1983. Responses of marine bacteria under starvation conditions at a solid-water interface. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 43-47.
- HUNTER, K.A. and LISS, P.S. 1982. Organic matter and the surface charge of suspended particles in estuarine waters. *Limnol. Oceanogr.* **27**, 322-335.
- HUSMARK, U. and RÖNNER, U. 1990. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 557-562.
- IMAN, S.H., BARD, R.F. and TOSTESON, T.R. 1984. Specificity of marine microbial surface interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 833-839.
- IRIBERRI, J., UNANUE, M., BARCINA, I. and EGEEA, L. 1987. Seasonal variation in population density and heterotrophic activity of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2308-2314.
- IRIBERRI, J., UNANUE, M., AYO, B., BARCINA, I. and EGEEA, L. 1990 a. Attached and free-living dividing bacteria in two aquatic systems. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, 87-89.
- IRIBERRI, J., UNANUE, M., AYO, B., BARCINA, I. and EGEEA, L. 1990 b. Bacterial production and growth rate estimation from [³H]Thymidine incorporation for attached and free-living bacteria in aquatic systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 483-487.
- JANNASCH, H.W. 1968. Competitive elimination of *Enterobacteriaceae* from seawater. *Appl. Microbiol.* **16**, 1616-1618.
- JEFFREY, W.H. and PAUL, J.H. 1986 a. Activity of an attached and free-living *Vibrio* sp. as measured by thymidine incorporation, p-iodonitrotetrazolium reduction, and ATP/DNA ratios. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 150-156.
- JEFFREY, W.H. and PAUL, J.H. 1986 b. Activity measurements of planktonic microbial and microfouling communities in an eutrophic estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 157-162.

- JONES, G.W., RICHARDSON, L.A. and UHLMAN, D. 1981. The invasion of HeLa cells by *Salmonella thyphimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 351-360.
- JONES, K.L. and RHODES-ROBERTS, M.E. 1981. The survival of marine bacteria under starvation conditions. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 247-258.
- JÜRGENS, K. and GÜDE, H. 1991. Seasonal changes in the grazing impact of phagotrophic flagellates on bacteria in Lake Constance. *Mar. Microb. Food Webs.* **5**, 27-37.
- KAPUSCINSKI, R.B. and MITCHELL, R. 1981. Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 670-674.
- KING, C.H., SHOTTS, E.B. Jr., WOOLEY, R.E. and PORTER, K.G. 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3023-3033.
- KIRCHMAN, D. and MITCHELL, R. 1982. Contribution of particle bound bacteria to total microheterotrophic activity in five ponds and two marshes. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 200-209.
- KJELLEBERG, S. 1984. Adhesion to inanimate surfaces. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 51-70. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin.
- KJELLEBERG, S., HUMPHREY, B.A. and MARSHALL, K.C. 1982. Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1166-1172.
- KJELLEBERG, S., HUMPHREY, B.A. and MARSHALL, K.C. 1983. Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 978-984.
- KLEIN, T.M. and ALEXANDER, M. 1986. Bacterial inhibitors in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 114-118.
- KRIEG, N.R. and HOLT, J.G. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. I. pp. 408-515. Williams & Wilkins. Baltimore.

- LADD, T.I., COSTERTON, J.W. and GEESEY, G.G. 1979. Determination of the heterotrophic activity of epilithic microbial populations. In: *"Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology"*. J.W. Costerton and R.R. Colwell (eds.). pp. 180-195. ASTM Press. Philadelphia.
- LAIR, N. 1991 a. Grazing and assimilation rates of natural population of planktonic cladocerans in a eutrophic lake. *Hydrobiologia*. **215**, 51-61.
- LAIR, N. 1991 b. Comparative grazing activities of the rotifer and crustacean communities in a eutrophic lake. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **24**, 924-927.
- LAIR, N. and ALI, H.O. 1990. Grazing and assimilation rates of natural population of planktonic rotifers *Keratella cochlearis*, *Keratella quadrata* and *Kellicottia longispina* in a eutrophic lake (Aydat, France). *Hydrobiologia*. **194**, 119-131.
- LAM, J., CHAN, R., LAM, K. and COSTERTON, J.W. 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Imm.* **28**, 546-556.
- LECLERC, H and MOSSEL, D.A.A. 1989. *Microbiologie, le tube digestif, l'eau et les aliments*. pp. 359-366. Doin Editeurs. Paris.
- LeCHEVALLIER, M.W., BABCOCK, T.M. and LEE, R.G. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2714-2724.
- LeCHEVALLIER, M.W., CAMERON, S.C. and McFETERS, G.A. 1983 a. New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 484-492.
- LeCHEVALLIER, M.W., CAMERON, S.C. and McFETERS, G.A. 1983 b. Comparison of verification procedures for the membrane filter total coliform technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1126-1128.
- LeCHEVALLIER, M.W., EVANS, T.M. and SEIDLER, R.J. 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 159-167.

- LeCHEVALLIER, M.W., HASSENAUER, T.S., CAMPER, A. and McFETERS, G.A. 1984 a. Desinfection of bacteria attached to granular activated carbon. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 918-923.
- LeCHEVALLIER, M.W., JAZANOSKI, P.E., CAMPER, A.K. and McFETERS, G.A. 1984 b. Evaluation of m-T7 agar as a fecal coliform medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 371-375.
- LeCHEVALLIER, M.W. and McFETERS, G.A. 1984. Recent advances in coliform methodology for water analysis. *J. Environ. Health.* **47**, 5-9.
- LeCHEVALLIER, M.W. and McFETERS, G.A. 1985 a. Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliforms organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1338-1341.
- LeCHEVALLIER, M.W. and McFETERS, G.A. 1985 b. Enumerating injured coliforms in drinking water. *Res. Tech. J. AWWA.* **77**, 81-87.
- LeCHEVALLIER, M.W., SCHULZ, W. and LEE, R.G. 1991. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 857-862.
- LESSARD, E.J. and SIEBURTH, J.M. 1983. Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and bath chambers in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 950-959.
- LEWIS, W.M., FROST, T. and MORRIS, D. 1986. Studies of planktonic bacteria in lake Valencia, Venezuela. *Arch. Hydrobiol.* **106**, 289-305.
- LINDAHL, M. and CARLSTEDT, I. 1990. Binding of K99 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* to pig small intestinal mucin glycopeptides. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1609-1614.
- LOPEZ-TORRES, A.J., PRIETO, L. and HAZEN, T.C. 1988. Comparison of the in situ survival and activity of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in tropical marine environment. *Microb. Ecol.* **15**, 41-57.

- LOVELL, C.R. and KONOPKA, A. 1985 a. The effects of temperature on bacterial production in a dimictic eutrophic lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**, 135-140.
- LOVELL, C.R. and KONOPKA, A. 1985 b. Primary and bacterial production in two dimictic indiana lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 485-491.
- LOVELL, C.R. and KONOPKA, A. 1985 c. Seasonal bacterial production in a dimictic lake as measured by increases in cell numbers and thymidine incorporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 492-500.
- LOVELL, C.R. and KONOPKA, A. 1985 d. Thymidine incorporation by free-living and particle-bound bacteria in a eutrophic dimictic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 501-504.
- MAKI, J.S. and REMSEN, C.C. 1981. Comparison of two direct-count methods for determining metabolizing bacteria in freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1132-1138.
- MALLORY, L.H., YUK, C.S., LIANG, L.N. and ALEXANDER, M. 1983. Alternative prey: mechanism for elimination of bacterial species by protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1073-1079.
- MÅRDÉN, P., TUNLID, A., MALMCRONA-FRIBERG, K., ODHAM, G. and KJELLEBERG, S. 1985. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch. Microbiol.* **142**, 326-332.
- MARRIE, T.J., HARDING, G.K.M., RONALD, A.R., DIKKEMA, J., LAM, J., HOBAN, S. and COSTERTON, J.W. 1979. Influence of antibody coating of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **139**, 357-361.
- MARSHALL, K.C. 1980. Bacterial adhesion in natural environments. In: "*Microbial adhesion to surfaces*". R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent (eds.). pp. 187-196. Ellis Horwood Ltd. Chichester.
- MARSHALL, K.C., STOUT, R. and MITCHELL, R. 1971. Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **68**, 337-348.

- MATES, A. and SHAFFER, M. 1989. Membrane filtration differentiation of *E. coli* from coliforms in the examination of water. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 343-346.
- MAUL, A. and BLOCK, J.C. 1983. Microplate fecal coliform method to monitor stream water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 1032-1037.
- McCAMBRIDGE, J. and McMEEKIN, T.A. 1979. Protozoan predation of *Escherichia coli* in estuarine waters. *Water Res.* **13**, 659-663.
- McCAMBRIDGE, J. and McMEEKIN, T.A. 1980 a. Relative effects of bacterial and protozoan predators on survival of *Escherichia coli* in estuarine water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 907-911.
- McCAMBRIDGE, J. and McMEEKIN, T.A. 1980 b. Effect of temperature on activity of predators of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in estuarine water. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* **31**, 851-855.
- McCAMBRIDGE, J. and McMEEKIN, T.A. 1981. Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of fecal and other bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1083-1087.
- McDANIELS, A.E., BORDNER, R.H., MENKEDICK, J.R. and WEBER, C.I. 1987. Comparison of the hydrophobic-grid membrane filter procedure and standard methods for coliform analysis of water. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1003-1009.
- McELDOWNEY, S. and FLETCHER, M. 1986 a. Effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 513-523.
- McELDOWNEY, S. and FLETCHER, M. 1986 b. Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 460-465.
- McELDOWNEY, S. and FLETCHER, M. 1987. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Arch. Microbiol.* **148**, 57-62.

- McELDOWNNEY, S. and FLETCHER, M. 1988 a. The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* **7**, 83-86.
- McELDOWNNEY, S. and FLETCHER, M. 1988 b. Effect of pH, temperature and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene. *Microb. Ecol.* **16**, 183-195.
- McFETERS, G.A. 1984. Biofilm development and its consequences. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 109-124. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin.
- McFETERS, G.A., BISSONNETTE, G.K., JEZESKI, J.J., THOMPSON, C.A. and STUART, D.G. 1974. Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl. Environ. Microbiol.* **27**, 823-829.
- McFETERS, G.A., CAMERON, S.C. and LeCHEVALLIER, M.W. 1982. Influence of diluents, media, and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 97-103.
- McFETERS, G.A. and STUART, D.G. 1972. Survival of coliform bacteria in natural waters field and laboratory studies with membrane-filter chambers. *Appl. Microbiol.* **24**, 805-811.
- McFETERS, G.A., STUART, S.A. and OLSON, S.B. 1978 a. Growth of heterotrophic bacteria and algal extracellular products in oligotrophic waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 383-391.
- McFETERS, G.A., STUART, S.A. and OLSON, S.B. 1978 b. Interactions of algae and heterotrophic bacteria in an oligotrophic stream. In: "*Microbial Ecology*". M.W. Loutit and J.A.R. Miles (ed.) pp. 56-61. Springer-Verlag. New York.
- McMANUS, G.B. and FURMAN, J.A. 1988. Control of marine bacterioplankton populations: measurement and significance of grazing. *Hydrobiologia.* **159**, 51-61.
- MEANS, E.G. and OLSON, B.H. 1981. Coliform inhibition by bacteriocin-like substances in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 506-512.

- MITCHELL, G.C., BAKER, J.H. and SLEIGH, H.A. 1988. Feeding of a freshwater flagellate *Bodo saltans*, on diverse bacteria. *J. Protozool.* **35**, 219-222.
- MORIÑIGO, M.A., CORNAX, R., CASTRO, D., MARTINEZ-MANZANARES, E. and BORREGO, J.J. 1990. Viability of *Salmonella* spp. and indicator microorganisms in seawater using membrane diffusion chambers. *Antonie van Leeuwenhoek.* **57**, 109-117.
- MUNRO, P.M., GAUTHIER, M.J. and LAUMOND, F.M. 1987. Changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater or grown in seawater-wastewater mixtures. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1476-1481.
- MURRAY, R.E., COOKSEY, K.E. and PRISCU, J.C. 1986. Stimulation of bacterial DNA synthesis by algal exudates in attached algal-bacteria consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1177-1182.
- MURRAY, R.E., COOKSEY, K.E. and PRISCU, J.C. 1987. Influence of physical disruption on growth of attached bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2997-2999.
- MURRAY, R.E. and HODSON, R. 1985. Annual cycle of bacterial secondary production in five aquatic habitats of the Okefenokee swamp ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 650-655.
- NAGATA, T. 1984. Bacterioplankton in Lake Biwa: Annual fluctuations of bacterial numbers and their possible relationship with environmental variables. *Jap. J. Limnol.* **45**, 126-133.
- NAGATA, T. 1985. Filter mesh-sizes of *Daphnia longispira* and its filtering rates on natural bacteria. *Memoirs of the Faculty of Science, Kyoto University, Series of Biology.* Vol. X, 109-114.
- OBERHOFER, T.R. 1985. *Manual of nonfermenting gram-negative bacteria.* John Wiley & sons. New York.
- PACE, M.L. 1988. Bacterial mortality and the fate of bacterial production. *Hydrobiologia.* **159**, 41-49.

- PAERL, H.W. and MERKEL, S.M. 1982. Differential phosphorus assimilation in attached versus unattached microorganisms. *Arch. Hydrobiol.* **93**, 125-134.
- PALUMBO, A.V., FERGUSON, R.L. and RUBLEE, P.A. 1984. Size of suspended bacterial cells and association of heterotrophic activity with size fractions of particles in estuarine and coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 157-164.
- PAUL, J.H. 1984. Effects of antimetabolites on the adhesion of an estuarine *Vibrio* sp. to polystyrene. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 924-929.
- PAUL, J.H. and JEFFREY, W.H. 1985 a. Evidence for separate adhesion mechanisms for hydrophilic and hydrophobic surfaces in *Vibrio proteolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 431-437.
- PAUL, J.H. and JEFFREY, W.A. 1985 b. The effect of surfactants on the attachment of estuarine and marine bacteria to surfaces. *Can. J. Microbiol.* **31**, 224-228.
- PAUL, J.H. and LOEB, G.I. 1983. Improved microfouling assay employing a DNA-specific fluorochrome and polystyrene as substratum. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 338-343.
- PEDERSEN, K. 1982 a. Method for studying microbial biofilms in flowing-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 6-13.
- PEDERSEN, K. 1982 b. Factors regulating microbial biofilm development in a system with slowly flowing seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1196-1204.
- PEDRÓS-ALIÓ, C. and BROCK, T.D. 1983 a. The importance of attachment to particles for planktonic bacteria. *Arch. Hydrobiol.* **98**, 354-379.
- PEDRÓS-ALIÓ, C. and BROCK, T.D. 1983 b. The impact of zooplankton feeding on the epilimnetic bacteria of a eutrophic lake. *Freshwater Biol.* **13**, 227-239.
- PORTER, K.G., SHERR, E.B., SHERR, B.F., PACE, M. and SANDERS, R.W. 1985. Protozoa in planktonic food webs. *J. Protozool.* **32**, 409-415.

- POURCHER, A.M., DEVRIESE, L.A., HERNANDEZ, J.F. and DELATTRE, J.M. 1991. Enumeration by miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 525-530.
- POYNTER, D., HICKS, S.J. and ROWBURY, R.J. 1986. Acid resistance of attached organisms and its implications for the pathogenicity of plasmid-bearing *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **3**, 117-121.
- PRINGLE, J.H. and FLETCHER, M. 1983. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 811-817.
- PRINGLE, J.H. and FLETCHER, M. 1986 a. Adsorption of bacterial surface polymers to attachment substrate. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 743-749.
- PRINGLE, J.H. and FLETCHER, M. 1986 b. Influence of substratum hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1321-1325.
- PRINGLE, J.H., FLETCHER, M. and ELLWOOD, D.C. 1983. Selection of attachment mutants during the continuous culture of *Pseudomonas fluorescens* and relationship between attachment ability and surface composition. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2557-2569.
- QUALLS, R.G., FLYNN, M.P. and JOHNSON, J.D. 1983. The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. *J. W. P. C. F.* **55**, 1280-1285.
- RASSOULZADEGAN, F. and ETIENNE, M. 1981. Grazing rate of the tintinnid *stenosomella ventricosa* (CLAP. and LACHM.) JORG. on the spectrum of the naturally occurring particulate matter from a Mediterranean neritic area. *Limnol. Oceanogr.* **26**, 258-266.
- RASSOULZADEGAN, F. and SHELDON, R.W. 1986. Predator-prey interactions of nanozooplankton and bacteria in an oligotrophic marine environment. *Limnol. Oceanogr.* **31**, 1010-1021.
- READ, R.R. and COSTERTON, J.W. 1987. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 1080-1090.

- RHEINHEIMER, G. 1987. *Microbiología de las aguas*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- RHEN, M. 1985. Characterization of DNA fragments encoding fimbriae of the uropathogenic *Escherichia coli* strain KS71. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 571-580.
- RHODES, M.W., ANDERSON, I.C. and KATOR, H.I. 1983. In situ development of sublethal stress in *Escherichia coli*: effects on enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1870-1876.
- RHODES, M.W. and KATOR, H.I. 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2902-2907.
- RHODES, M.W. and KATOR, H.I. 1990. Effects of sunlight and autochthonous microbiota on *Escherichia coli* survival in an estuarine environment. *Curr. Microbiol.* **21**, 65-73.
- RIDGWAY, H.F., KELLY, A., JUSTICE, C. and OLSON, B.H. 1983. Microbial fouling of reverse osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological, and ultrastructural analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1066-1084.
- RIDGWAY, H.F. and OLSON, B.H. 1982. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 972-987.
- RIDGWAY, H.F., RIGBY, M.G. and ARGO, D.G. 1984. Adhesion of a *Mycobacterium* sp. to cellulose diacetate membranes used in reverse osmosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 61-67.
- RIVERA, S.C., HAZEN, T.C. and TORANZOS, G.A. 1988. Isolation of fecal coliforms from pristine sites in a tropical rain forest. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 513-517.
- RIVIER, A., BROWNLEE, D.C., SHELDON, R.W. and RASSOULZADEGAN, F. 1985. Growth of microzooplankton: a comparative study of bacterivorous zooflagellates and ciliates. *Mar. Microb. Food Webs.* **1**, 51-60.
- ROBB, I.D. 1984. Stereo-chemistry and function of polymers. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 39-49. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin.
- RODIER, J. 1981. *Análisis de las aguas*. Ed. Omega. Barcelona.

- RÖNNER, U., HUSMARK, U. and HENRIKSSON, A. 1990. Adhesion of bacillus spores in relation to hydrophobicity. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 550-556.
- ROSENBERG, M. and ROSENBERG, E. 1981. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* on hexadecane. *J. Bacteriol.* **148**, 51-57.
- ROSZAK, D.B. and COLWELL, R.R. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2889-2893.
- ROSZAK, D.B., GRIMES, D.J. and COLWELL, R.R. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* **30**, 334-338.
- RUBIA, J. DE LA. 1980. *Análisis de las aguas naturales continentales*. Ed. Centro de Estudios Hidrográficos. M.O.P.U. Madrid.
- RUOFF, K.L. 1992. The genus *Streptococcus*. In: "*The Prokaryotes*". 2nd. ed. Vol. II. pp. 1450-1464. A. Balows, H.G. Trüpper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleiffer. Springer-Verlag, Berlin.
- RUTTER, P.R. 1984. Mechanisms of adhesion. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 5-19. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlín.
- RUTTER, P.R. and VINCENT, B. 1980. The adhesion of microorganisms to surfaces: physicochemical aspects. In: "*Microbial adhesion to surfaces*". R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent (eds.) pp. 79-92. Ellis Horwood, Ltd. Chichester.
- RUTTER, P.R. and VINCENT, B. 1984. Physicochemical interactions of the substratum, microorganisms, and the fluid phase. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.) pp. 21-38. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin.
- RYCHERT, R.C. and STEPHENSON, G.R. 1981. Atypical *Escherichia coli* in streams. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1276-1278.
- SAMUELSSON, M-O and KIRCHMAN, D.L. 1990. Degradation of adsorbed protein by attached bacteria in relationship to surface hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3643-

3648.

- SANDERS, R.W. and PORTER, K.G. 1986. Use of metabolic inhibitors to estimate protozooplankton grazing and bacterial production in a monomictic eutrophic lake with an anaerobic hypolimnion. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 101-107.
- SCAVIA, D. and LAIRD, G. 1987. Bacterioplankton in Lake Michigan: dynamics, controls and carbon flux. *Limnol. Oceanogr.* **32**, 1017-1033.
- SCHMALJOHANN, R., POLLINGER, U. and BERMAN, T. 1987. Natural populations of bacteria in Lake Kinneret: observations with scanning and epifluorescence microscope. *Microb. Ecol.* **13**, 1-12.
- SCHWARTZMANN, S. and BORING, J.R. 1971. Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infec. Immun.* **3**, 762-767.
- SEALE, D.B., BORAAS, M.E., HOLEN, D. and NEALSON, K.H. 1990. Use of bioluminescent bacteria, *Xenorhabdus luminescens*, to measure predation on bacteria by freshwater microflagellates. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**, 31-40.
- SERVAIS, P., BILLEN, G. and VIVES-REGO, J. 1985. Rate of bacterial mortality in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1448-1454.
- SHERR, B.F., SHERR, E.B. and BERMAN, T. 1983. Grazing, growth, and ammonium excretion rates of a heterotrophic microflagellate fed with four species of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1196-1201.
- SHERR, B.F., SHERR, E.B. and FALLON, R.D. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 958-965.
- SHERR, B.F., SHERR, E.B. and RASSOULZADEGAN, F. 1988. Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: temperature dependence. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1091-1095.

- SIBBALD, M.J. and ALBRIGHT, L.J. 1988. Aggregated and free bacteria as food sources for heterotrophic microflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 613-616.
- SIERACKI, M.E. and SIEBURTH, J.M. 1986. Sunlight-induced growth delay of planktonic marine bacteria in filtered seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **33**, 19-27.
- SILVERMAN, M., BELAS, R. and SIMON, M. 1984. Genetic control of bacterial adhesion. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.). pp. 95-107. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin.
- SINCLAIR, J.L. and ALEXANDER, M. 1984. Role of resistance to starvation in bacterial survival in sewage and lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 410-415.
- SINGLETON, F.L., ATTWELL, R.W., JANGI, M.S. and COLWELL, R.R. 1982. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1080-1085.
- SJOGREN, R.E. and GIBSON, M.J. 1981. Bacterial survival in a dilute environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1331-1336.
- SNEATH, P.H., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 2. pp. 1043-1071. Williams & Wilkins. Baltimore.
- STANLEY, P.M. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.* **29**, 1493-1499.
- STOCK, M.S. and WARD, A.K. 1989. Establishment of a bedrock epilithic community in a small stream: microbial (algal and bacterial) metabolism and physical structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**, 1874-1883.
- SUTHERLAND, I.W. 1980. Polysaccharides in the adhesion of marine and freshwater bacteria. In: "*Microbial adhesion to surfaces*". R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent (eds.). pp. 329-338. Ellis Horwood Ltd. Chichester.
- TAMPLIN, M.L. and COLWELL, R.R. 1986. Effects of microcosm salinity and organic

- substrate concentration on production of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 297-301.
- TAMPLIN, M.L., GAUZENS, A.L., HUQ, A., SACK, D.A. and COLWELL, R.R. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1977-1980.
 - TOSTESON, T.R., REVUELTA, R., ZAIDI, B.R., IMAN, S.H. and BARD, R.F. 1985. Aggregation-adhesion enhancing macromolecules and the specificity of marine microbial surface interactions. *J. Coll. Interface Sci.* **104**, 60-71.
 - van ES, F.B. and MEYER-REIL, L.A. 1982. Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria. In: "*Advances in Microbial Ecology*". K.C. Marshall (ed.) pp. 11-170. Plenum Press. New York.
 - VANHAECKE, E., REMON, J.-P., MOOR, M., RAES, F., DE RUDDER, D. and van PETEGHEM, A. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 788-795.
 - van LOOSDRECHT, M.C.M., LYKLEMA, J., NORDE, W. and ZEHNDER, A.J.B. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Rev.* **54**, 75-87.
 - van PELT, A.W.J., WEERKAMP, A.H., UYEN, M.H.W.J.C., BUSSCHER, H.J., de JONG, H.P. and ARENDS, J. 1985. Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1270-1275.
 - VASCONCELOS, G.J. and SWARTZ, R.G. 1976. Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus in situ. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 913-920.
 - WALSH, S.M. and BISSONNETTE, G.K. 1983 Chlorine-induced damage to surface adhesins during sublethal injury of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1060-1065.
 - WARDELL, J.N. 1988. Methods for the study of bacterial attachment. In: "*Methods in aquatic bacteriology*". B. Austin (ed.). pp. 389-415. John Wiley & sons, Ltd. Chichester.

- WATSON, P.J., OHTAGUCHI, K. and FREDRICKSON, A.G. 1981. Kinetics of growth of the ciliate *Tetrahymena pyriformis* on *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **122**, 323-333.
- WETZEL, R.G. 1983. *Limnology*. 2nd ed. 860 pp. Saunders College Publishing. Philadelphia.
- WHITE, D.C. 1984. Chemical characterization of films. In: "*Microbial adhesion and aggregation*". K.C. Marshall (ed.), pp. 159-176. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag. Berlin.
- WIGGINS, B.A. and ALEXANDER, M. 1985. Minimum Bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 19-23.
- WIKNER, J., ANDERSSON, A., NORMARK, S. and HAGSTRÖM, Å. 1986. Use of genetically marked minicells as a probe in measurement of predation on bacteria in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 4-8.
- WRANGSTADH, M., CONWAY, P.L. and KJELLEBERG, S. 1986. The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion. *Arch. Microbiol.* **145**, 220-227.
- WRIGHT, R.T. and COFFIN, R.B. 1984. Measuring microzooplankton grazing on planktonic marine bacteria by its impact on bacterial production. *Microb. Ecol.* **10**, 137-149.
- WYATT, J.E., POSTON, S.M. and NOBLE, W.C. 1990. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cell monolayers. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 834-844.
- XU, H.S., ROBERTS, N., SINGLETON, F.L., ATTWELL, R.W., GRIMES, D.J. and COLWELL, R.R. 1982. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8**, 313-323.
- YOON, W.B. and ROSSON, R.A. 1990. Improved method of enumeration of attached bacteria for study of fluctuation in the abundance of attached and free-living bacteria in response to diel variation in seawater turbidity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 595-600.
- ZASKE, S.K., DOCKINS, W.S. and McFETERS, G.A. 1980. Cell envelope damage in

Escherichia coli caused by short-term stress in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 386-390.

- ZIMMERMANN, R., ITURRIAGA, R and BECKER-BIRCK, J. 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 926-935.

- ZINABU, G.-M. and TAYLOR, W.D. 1989 a. Seasonality and spatial variation in abundance, biomass and activity of heterotrophic bacterioplankton in relation to some biotic and abiotic variables in an Ethiopian rift-valley lake (Awassa). *Freshwater Biol.* **22**, 355-368.

- ZINABU, G.-M. and TAYLOR, W.D. 1989 b. Heterotrophic bacterioplankton production and grazing mortality rates in an Ethiopian rift-valley lake (Awassa). *Freshwater Biol.* **22**, 369-381.