

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	I
<i>Summary</i>	III
<i>Listado de Siglas de la Tesis</i>	V
CAPÍTULO I:	1
<i>Introducción General</i>	1
El rol las algas mixotróficas en las tramas tróficas microbianas	2
La MOD y su influencia sobre la red trófica.....	6
Clasificación de los organismos mixotróficos	11
Selectividad de presas.....	14
Justificación, Objetivo General del trabajo y estructura de la Tesis.....	15
CAPÍTULO II:	18
<i>Dinámica de las algas mixotróficas en dos lagos someros con diferentes concentración y calidad de materia orgánica disuelta</i>	18
<i>II- 1. Introducción</i>	19
<i>II- 2. Sitio de estudio</i>	25
Ubicación geográfica y características de los lagos.....	25
Antecedentes limnológicos de estos dos ambientes.....	28
<i>II- 3. Materiales y métodos</i>	30
<i>II-3-1. Obtención de las muestras</i>	30
<i>II-3-2. Determinaciones de laboratorio</i>	31
<i>II-3-3. Caracterización óptica de los lagos</i>	33
<i>II-3-4. Determinación de la abundancia de los distintos organismos</i>	34
<i>II-3-5. Cálculos de la biomasa de los organismos</i>	36
<i>II-3-6. Análisis estadísticos</i>	38
<i>II-4. Resultados</i>	39
<i>II-4-1. Variables físico-químicas y Cl a</i>	39

II-4-2. Relaciones entre variables físico-químicas y Cl a	50
II-4-3. Dinámica de los organismos.....	54
II-4-3-1. Composición, abundancia y biomasa del picoplancton	54
II-4-3-2. Composición, abundancia y biomasa del nano y micropláncton	62
II-4-3-3. Composición, abundancia y biomasa del zooplancton.....	72
II-4-4. Relaciones entre organismos y variables físico-químicas	76
II-4-5. Relaciones entre organismos	84
II- 5. Discusión	87
CAPÍTULO III.....	96
<i>Actividad fagotrófica de algas mixotróficas en dos lagos someros oligotróficos</i>	96
III- 1. Introducción	97
III- 2. Materiales y métodos.....	101
III-2-1. Obtención de las muestras	101
III-2-2. Preparación de las presas marcadas fluorescentemente (PMF).....	101
III-2-3. Diseño experimental y procesamiento de las muestras.....	102
III-2-4. Experiencias de corto tiempo (Ingestión)	103
III-2-5. Cálculos de Ingestión	105
III-2-6. Experiencias de largo tiempo (Desaparición).....	106
III-2-7. Análisis de la selectividad de presas.....	108
III-2-8. Estimación del impacto de la depredación en el ciclo anual.....	109
III-2-9. Análisis de los datos	109
III- 3. Resultados.....	110
III-3-1. Comparación de las tasas de depredación específica sobre BACT y PCY	111
III-3-2. Comparación de las TDE de los FMIX y los FHET en relación a las variables ambientales.....	118
III-3-3. Impacto relativo de los FMIX y FHET sobre el picoplancton	120

III-3-4. Comparación del impacto de depredación de los organismos flagelados y del resto de la comunidad bacterívora <200 µm sobre las BACT y las PCY.....	122
III-3-5. Estimación de la depredación en las fechas no experimentales.....	126
III-3-6. Transferencia de carbono a través de la bacterivoría y de la herbivoría.....	128
III- 4. Discusión	136
CAPÍTULO IV:	144
<i>Selección de presas in situ en flagelados mixotróficos y heterotróficos en lagos someros oligotróficos antárticos: un análisis del contenido de vacuolas digestivas</i>	<i>144</i>
IV- 1. Introducción.....	145
IV- 2. Sitio de estudio.....	147
Ubicación geográfica y características generales de los lagos.....	147
IV- 3. Materiales y métodos	150
IV-3-1. Obtención de las muestras.....	150
IV-3-2. Determinación de la abundancia de los distintos organismos... ..	150
IV-3-3. Procesamiento de las muestras mediante la técnica de CARD-FISH	150
IV-3-4. Análisis de la selectividad de presas por afiliación filogenética.	152
IV-3-5. Análisis de los datos.....	153
IV-4. Resultados	154
IV-4-1. Composición de la comunidad de procariontes heterotróficos	154
IV-4-2. Composición de la comunidad del nano- y microplancton	157
IV-4-3. Selectividad de presas por afiliación filogenética	158
IV- 5. Discusión.....	165
CAPÍTULO V:	172
V- 1. Principales Resultados.....	173
V- 2. Conclusiones Generales	175

BIBLIOGRAFÍA	177
AGRADECIMIENTOS.....	200
<i>Agradecimientos:.....</i>	<i>201</i>
ANEXO I.....	205
<i>Biovolumen y contenido de carbono de las algas mixotróficas y flagelados heterotróficos</i>	<i>205</i>
<i>Anexo I:.....</i>	<i>206</i>
ANEXO II:	207
<i>Protocolo técnica de CARD-FISH</i>	<i>207</i>
<i>Anexo II:.....</i>	<i>208</i>
<i>Detalle del protocolo de Deposición Catalizada e Hibridación in situ con Sondas Fluorescentes (CARD-FISH)</i>	<i>208</i>
<i>Fijación de muestras</i>	<i>208</i>
<i>Filtración de muestras.....</i>	<i>208</i>
<i>Adhesión de las células a los filtros</i>	<i>208</i>
<i>Permeabilización con lisozima y acromopeptidasa</i>	<i>209</i>
<i>Preparar el buffer de hibridación (BH)</i>	<i>210</i>
<i>Tabla BH.....</i>	<i>210</i>
<i>Hibridación.....</i>	<i>210</i>
<i>Preparar el buffer de lavado (BL).....</i>	<i>211</i>
<i>Tabla BL</i>	<i>211</i>
<i>Lavado.....</i>	<i>211</i>
<i>Deposición catalizada (amplificación).....</i>	<i>212</i>
<i>Tabla B: Lista de sondas.....</i>	<i>214</i>
TRABAJO DE RESPALDO	215



Resumen

La mixotrofia es una estrategia nutricional que combina dos capacidades tróficas en un único organismo: autotrofia y heterotrofia. Ampliamente presente en algas fitoplanctónicas flageladas, esta doble estrategia cobra particular relevancia en ambientes acuáticos con baja disponibilidad de nutrientes y/o de luz. Por este motivo, las condiciones ambientales determinan su importancia en la comunidad fitoplanctónica. En particular, la concentración y la calidad de la materia orgánica disuelta (MOD) influyen directamente en las tramas tróficas determinando las propiedades físicas o químicas de un ambiente (e.g. la disponibilidad de luz), y actuando como fuente de carbono y energía en los ecosistemas. La MOD es sustrato fundamentalmente de las bacterias, que compiten por los nutrientes con los organismos autotróficos, y que al mismo tiempo representan junto con las algas picoplanctónicas (picocianobacterias y picoeucariotas) una fuente de alimento disponible para mixótrofos y heterótrofos.

Hace algunos años se ha planteado que las algas mixotróficas se distribuyen dentro de un espectro de estrategias de nutrición (i.e. las especies explotan diferencialmente ambas capacidades nutricionales), existiendo desde especies predominantemente autotróficas, hasta especies predominantemente heterotróficas. En función de esto, en el **Capítulo II** planteamos evaluar la composición, la dinámica y las distintas estrategias de las algas mixotróficas, en dos lagos oligotróficos someros (Escondido y Morenito) con similar composición fitoplanctónica dominada por especies mixotróficas, pero con diferente concentración de MOD. A pesar de la marcada diferencia en la concentración de MOD entre los lagos, la biomasa de bacterias fue similar entre ellos. Esto probablemente se debe a que el Escondido presenta mayor concentración de MOD autóctona, es decir, de menor calidad para el consumo bacteriano, en relación al Morenito. El 75 % de la comunidad nano- y microplanctónica (fitoplancton, flagelados heterotróficos y ciliados) estuvo representada por algas mixotróficas en ambos lagos, aunque su dinámica fue diferente en cada uno, ya que su biomasa estuvo dominada por distintos taxa. La Clase Chrysophyceae dominó el fitoplancton del lago Escondido caracterizado por mayor aloctonía y, por lo tanto, con menor disponibilidad de luz. En contraste en el Morenito dominaron las Cryptophyceae. La dominancia de esta Clase estaría asociada a una diferente calidad espectral de la luz. Este lago presentó mayor disponibilidad de luz verde, la cual es aprovechada por las Cryptophyceae debido a que poseen ficobilinas, pigmentos accesorios a la clorofila *a* que absorben principalmente en las longitudes de onda correspondientes al verde. Esto indica que la calidad de la luz, además de su cantidad (ambas influenciadas por la calidad y la cantidad de MOD), determinan la composición de las especies de un ambiente. Además, dentro de las algas mixotróficas que habitan estos lagos, las Cryptophyceae son las menos heterótrofas. Esto apoya la hipótesis de que en ambientes con menor concentración de MOD la autotrofia sería relativamente más importante que en lagos donde la concentración de MOD es mayor.

Considerando la importancia de las algas mixotróficas en estos ambientes y sus diferentes estrategias nutricionales, en el **Capítulo III** se analizó experimentalmente su actividad fagotrófica sobre presas de distinto tamaño y se la comparó con la actividad fagotrófica de los flagelados heterotróficos. Para ello, se realizaron experiencias de fagotrofia utilizando tres tipos de presas de distinto



tamaño, usualmente presentes dentro del espectro natural de presas (bacterias, picocianobacterias y picoeucariotas). Los flagelados mixotróficos fueron responsables, en promedio, del 80 % de la ingestión debida a los flagelados, del 50 % de la bacterivoría total y del 70 % de la herbivoría total en ambos lagos. *Pseudopedinella* sp. (Dictyochophyceae) presentó las tasas específicas de bacterivoría y herbivoría más altas en estos ambientes, incluso mayores que los flagelados heterotróficos. Fue claramente el taxón más importante desde el punto de vista global, que junto con los taxa de la Clase Chrysophyceae (*Ochromonas* sp. y Chrysophyceae >5 μm), más importantes en el Escondido, fueron ubicados en el extremo más fagotrófico del espectro de estrategias de nutrición. Mientras que *Plagioselmis lacustris* y *Cryptomonas erosa* (Cryptophyceae), más importantes en el Morenito, presentaron las menores tasas específicas de depredación, por lo que fueron ubicadas en el extremo más autotrófico del espectro de estrategias nutricionales. El resto de las especies fagotróficas (*Dinobryon divergens*, *Chrysochromulina parva* y *Gymnodinium varians*) tomaron posiciones intermedias dentro del espectro nutricional. Los organismos fagotróficos llegaron a consumir en conjunto hasta el 39 % de la biomasa de las bacterias y hasta el 78 % de las picocianobacterias por día. En general las picocianobacterias fueron la presa preferida por la mayoría de los taxa analizados, probablemente debido a su tamaño y a su calidad nutricional.

Por último, en el **Capítulo IV** se analizó la selectividad de presas de los flagelados mixotróficos y heterotróficos sobre diferentes filotipos de procariontes heterotróficos (FPH), *Bacteria* y *Archaea*, pertenecientes a ensamblajes naturales de lagos antárticos oligotróficos. En este estudio se evaluó por primera vez la preferencia de presas *in situ* sobre diferentes taxa mixotróficos (*Pseudopedinella* sp., Chrysophyceae >5 μm y células tipo-*Ochromonas*). Los FPH fueron identificados mediante la técnica de CARD-FISH. Los flagelados bacterívoros presentaron algunas tendencias de selectividad sobre ciertos FPH. Las *Alphaproteobacteria* y las *Betaproteobacteria*, a pesar de su gran abundancia, fueron seleccionados negativamente por todos los protistas bacterívoros, probablemente debido a su tamaño. Contrariamente, las *Actinobacteria* fueron seleccionadas positivamente por todos los bacterívoros. Se plantean tres posibilidades para explicar este patrón: (a) que el tamaño celular de este filotipo sea el más “adecuado” para ser depredado entre todos los filotipos, (b) que posean un mayor tiempo de digestión por la posible presencia de una capa de protección denominada capa-S, (c) por el contrario, que sean vulnerables a la depredación por no contar con la presencia de esta capa-S. Por su parte, los *Bacteroidetes* fueron depredados de forma aleatoria. Llamativamente, todos los flagelados evaluados presentaron un patrón de preferencia similar. Los resultados sugieren que la afiliación filogenética determina parcialmente la selección de presas por parte de los protistas. Sin embargo, probablemente otras características transversales a los diferentes FPH como el tamaño celular, la morfología y la presencia de la capa-S explicarían la similitud en la preferencia de presas observada entre los flagelados.



Summary

Mixotrophy is a nutritional strategy that combines two trophic capabilities in a single organism: autotrophy and heterotrophy. Widely present within phytoplanktonic flagellates, this dual strategy is particularly relevant in aquatic environments with low nutrient and/or light availability. For this reason, the environmental conditions determine their importance in the community. In particular, the quantity and quality of dissolved organic matter (DOM) influence directly on the planktonic food web dynamics determining the chemical or physical properties of the environment (e.g. light availability), and acting as a source of carbon and energy in ecosystems. DOM is a carbon source mainly for bacteria, which compete for nutrients with autotrophic organisms, and at the same time, together with picoplanktonic algae (picocyanobacteria and picoeukaryotes) represent a food source for mixotrophs and heterotrophs.

Several years ago, it has been suggested that mixotrophic algae present a wide spectrum of nutritional strategies (i.e. species exploit both capabilities differentially), existing species predominantly autotrophic towards species predominantly heterotrophic. Based on this, in **Chapter II** we assessed the composition, the dynamics and the different strategies of mixotrophic algae in two oligotrophic shallow lakes (Escondido and Morenito), which have similar phytoplankton composition but different DOM concentration. Bacterial biomass was similar among both lakes, despite the marked difference in DOM concentration. This could be due to the higher concentration of allochthonous DOM in Escondido (i.e. lower quality for bacterial consumption) in relation to Morenito. The 75 % of the nano- and microplanktonic community (phytoplankton, heterotrophic flagellates and ciliates) was represented by mixotrophic algae in both lakes, although their dynamics were different in each lake, as their biomass was dominated by different taxa. Class Chrysophyceae dominated the phytoplankton of Lake Escondido, characterized by a higher allochthony and, therefore, less light availability. In contrast, Class Cryptophyceae dominated in lake Morenito. The dominance of this group would be associated with a different light spectral quality. This lake had greater availability of green light, which favors the growth of cryptophyceans because they have phycobilins, accessory pigments that absorb in the green range. This indicates that the light quality and its intensity (both influenced by DOM quality and quantity), determine the species composition of an environment. Moreover, within mixotrophic algae inhabiting these lakes, cryptophyceans are the least heterotrophic, supporting the hypothesis that in lakes with lower DOM concentration, autotrophy could be relatively more important than in lakes where DOM concentration is higher.

Considering the importance of mixotrophic algae in these environments and their different nutritional strategies, their phagotrophic activity on prey of different sizes was analyzed experimentally, and compared with the phagotrophic activity of heterotrophic flagellates (**Chapter III**). For this, experiments of phagotrophy were performed using three types of prey of different sizes, which are usually present in the natural spectrum of lakes (bacteria, picocyanobacteria and picoeukaryotes). The mixotrophic flagellates were responsible, on average, of 80 % of the ingestion due to the flagellates, 50 % of the total bacterivory, and 70 % of the total herbivory in both lakes. *Pseudopedinella* sp. (Dictyochophyceae) presented the highest specific rates of bacterivory and herbivory in these environments, even higher than



those of heterotrophic flagellates. This taxon was clearly the most important from the global point of view, which together with the taxa of the class Chrysophyceae (*Ochromonas ovalis* and Chrysophyceae >5 µm), more significant in Escondido, were located in the phagotrophic extreme of the spectrum of nutritional strategies. On the other hand, *Plagioselmis lacustris* and *Cryptomonas erosa* (Cryptophyceae), more important in Morenito, had the lowest specific grazing rates, so they were placed in the autotrophic end of the spectrum of nutritional strategies. The remaining phagotrophic species (*Dinobryon divergens*, *Chrysochromulina parva* and *Gymnodinium varians*) were placed in intermediate positions within the nutritional spectrum. Phagotrophic organisms together consumed up to 39 % of the bacterial biomass and up to 78 % of the picocyanobacterial biomass per day. In general, picocyanobacteria were preferred as prey by most of the analyzed taxa, probably due to their size and nutritional quality.

Finally, in **Chapter IV**, we investigated the selective predation of mixotrophic and heterotrophic flagellates on different heterotrophic prokaryote phylotypes (HPP; *Bacteria* and *Archaea*) living in natural assemblages from oligotrophic Antarctic lakes. *In situ* prey preference was analyzed for the first time on different mixotrophic taxa (*Pseudopedinella* sp., *Ochromonas*-like cells, Chrysophyceae >5 µm). Different HPP were identified using the CARD-FISH technique. Bacterivorous flagellates showed some general trends of selectivity over some HPP. *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* were the most abundant groups; however, a negative selection was detected in most samples by all bacterivorous protists, probably due to the bacterial size. In contrast, for *Actinobacteria* a positive selection trend was observed by all the bacterivores. We suggest three ways to explain this pattern: (a) that the cell size of this phylotype is the most “accurate” to be preyed upon, (b) they possess a longer digestion time due to the possible presence of a protective layer called S-layer, (c) on the other hand, they are vulnerable to predation for not having the presence of this S-layer. Finally, *Bacteroidetes* seemed to be randomly preyed upon. Interestingly, similar prey preferences were observed in all bacterivorous flagellates. Our results suggest that phylogenetic affiliation determines part of the process of prey selection by protists in these lakes. Nevertheless, other features, such as cell size, morphology and the presence of the S-layer, would explain the observed prey selectivity on the HPP.



Listado de Siglas de la Tesis

AAUT: algas autotróficas

AMF: algas picoeucariotas marcadas fluorescentemente

BACT: bacterias

BMF: bacterias marcadas fluorescentemente

CARD-FISH: “*Catalyzed Reporter Deposition- Fluorescence in situ Hybridization*”, deposición catalizada e hibridización *in situ* con sondas fluorescentes

Cl *a*: clorofila *a*

CMF: picocianobacterias marcadas fluorescentemente

C:N:P: relación estequiométrica entre carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P).

COD: carbono orgánico disuelto

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole (colorante para la tinción del ADN)

DTAF: 5-([4,6 diclorotriazin-2-yl]-amino)-fluoresceína

EUB338-II-III: sonda específica para hibridación de bacterias pertenecientes al clado “*Bacteria*”.

FHET: flagelados heterotróficos

FMIX: flagelados mixotróficos

FPH: filotipos de procariotas heterotróficos

Im: Intensidad media de la radiación en la capa de mezcla de la columna de agua

ID: impacto de la depredación

Kd: coeficiente de atenuación de la radiación vertical difusa

Kd_{AZUL}: coeficiente de atenuación de la radiación azul

Kd_{ROJO}: coeficiente de atenuación de la radiación rojo

Kd_{VERDE}: coeficiente de atenuación de la radiación verde



MOD: materia orgánica disuelta

MODC: materia orgánica disuelta coloreada

N: nitrógeno

NDT: nitrógeno disuelto total

NT: nitrógeno total

P: fósforo

PB: producción bacteriana

PcY: picocianobacterias

PDT: fósforo disuelto total

PEUK: picoeucariotas

PMF: presas marcadas fluorescentemente

PP: Producción primaria

PRS: fósforo reactivo soluble

PT: fósforo total

PUFA: "*poly-unsaturated fatty acids*", ácidos grasos poli-insaturados

RFA: radiación fotosintéticamente activa

S₂₇₅₋₂₉₅: pendiente espectral del intervalo de 275-295 nm, inversamente proporcional al tamaño molecular de la MOD

STS: sólidos totales en suspensión

TC: tasa de clareado

TDE: tasa de depredación específica

TPI: totalidad de procariotas identificados

UV: ultravioleta



CAPÍTULO I:

Introducción General





I. Introducción General

Entre los microorganismos acuáticos se pueden distinguir diferentes estrategias de nutrición. Por un lado existen organismos fototróficos, es decir, aquellos que poseen pigmentos fotosintéticos que captan la energía solar para generar su propio carbono orgánico, reconocidos tradicionalmente como algas fitoplanctónicas. Por otro lado, se encuentran los organismos heterotróficos que requieren de la ingestión de carbono orgánico desde el medio, como las bacterias, los flagelados heterotróficos, y los ciliados. Por último, hay organismos que combinan las dos estrategias antes descritas, la fototrofia y la heterotrofia, y que se denominan mixotróficos. Existen algas mixotróficas (Bird y Kalff, 1986, 1987; Nygaard y Tobiesen, 1993; entre otros), así como también ciliados mixotróficos que poseen algas endosimbióticas (Sanders, 1991; Stabell et al., 2002). Entre las algas mixotróficas se pueden distinguir dos subgrupos en relación a su comportamiento heterotrófico. Aquellas que consumen compuestos orgánicos disueltos en el medio son denominados osmotróficas, mientras que las que consumen materia orgánica particulada (e.g. bacterias) se denominan fagotróficas (Croft et al., 2006; Flynn et al., 2012). Esta Tesis se enfoca en el estudio de las algas mixotróficas fagotróficas.

El rol las algas mixotróficas en las tramas tróficas microbianas

Hasta la década del '70 se consideraba que el carbono en los océanos y lagos fluía principalmente a lo largo del eje fitoplancton - zooplancton - peces (Figura I-1.a), mientras que se consideraba que las pocas bacterias presentes cumplían el rol de simples descomponedoras de los organismos muertos (Gasol, 2005). El desarrollo de nuevas técnicas (e.g. epifluorescencia) para evaluar distintos aspectos microbianos mejoró la comprensión del funcionamiento de los sistemas acuáticos. Esto permitió no solo cuantificar de manera más aproximada el picoplancton (células $<2 \mu\text{m}$), sino que permitió distinguir diferentes componentes del mismo, de acuerdo a su modo de nutrición, en picoplancton heterotrófico (bacterias heterotróficas) y autotrófico (picocianobacterias y



picoeucariotas). La idea de que las bacterias y los flagelados heterotróficos cumplían un rol más importante del reconocido hasta ese momento surgió en la década de los '70 (Pomeroy, 1974). Sin embargo, fueron Azam et al. (1983) quienes incorporaron el concepto del “bucle microbiano” a la concepción clásica de la red trófica lineal. Esta idea surgió como resultado de las observaciones acerca de que parte de la materia orgánica generada a través de la producción primaria de las algas era liberada al ambiente, y era reutilizada por las bacterias heterotróficas. En este contexto, las bacterias juegan un rol clave en la reincorporación de la materia orgánica disuelta (MOD) “perdida” a lo largo de la cadena trófica, convirtiéndola en materia orgánica particulada (Tranvik, 1992). A su vez, estas bacterias son ingeridas por flagelados heterotróficos que luego son depredados por zoopláncteres superiores (Figura I-1.b). La conceptualización del bucle microbiano posicionó a los nanoflagelados heterotróficos (2-20 μm) y a los ciliados (generalmente $>20 \mu\text{m}$) como organismos clave, siendo la conexión heterotrófica con la red trófica clásica e incrementando la eficiencia del sistema, ya que aumenta las vías de transferencia de energía hacia los niveles tróficos superiores (Pomeroy, 1974; Azam et al., 1983).

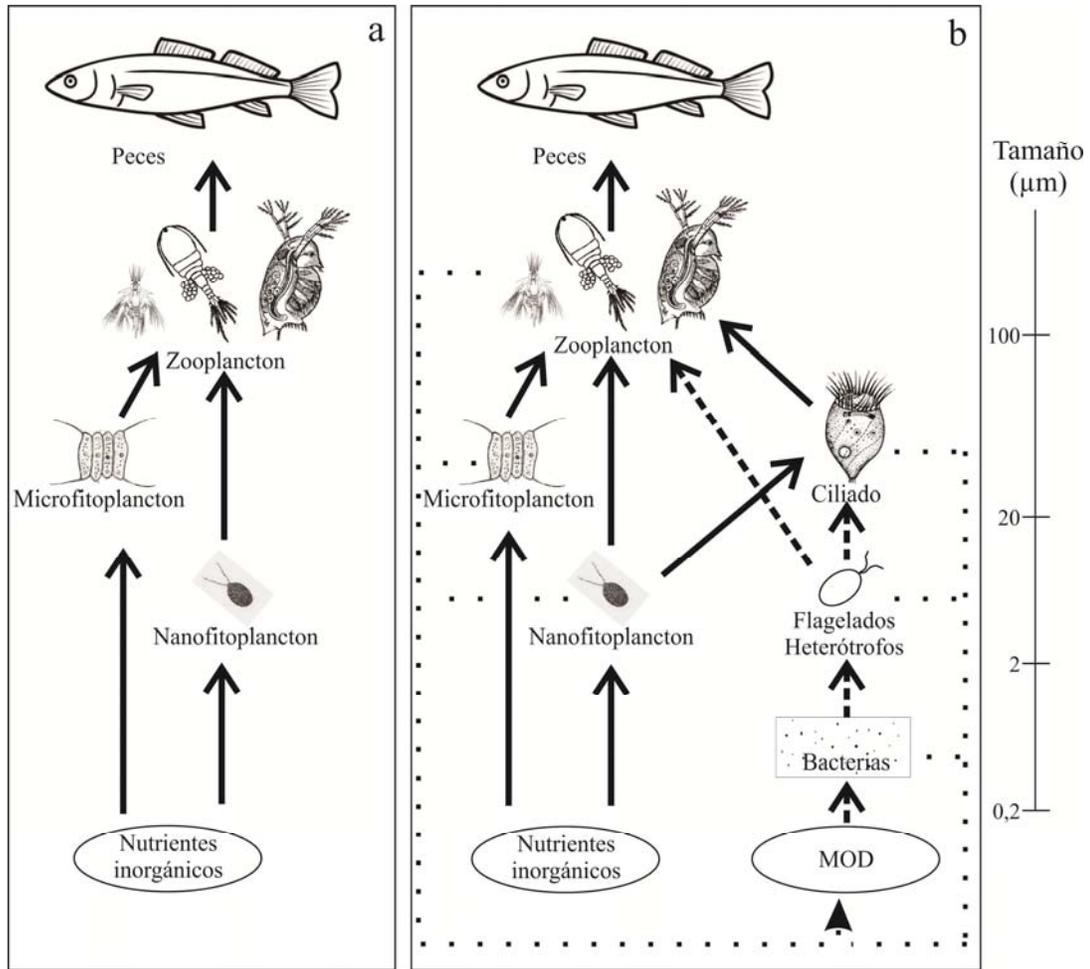


Figura I-1: a. Visión de la red trófica clásica, el fitoplancton se separa en dos clases de tamaño el nano-fitoplancton que presenta tamaños celulares entre 2-20 μm y el micro-fitoplancton con tamaños entre 20-200 μm; b. Visión de la red trófica clásica (líneas enteras) incluyendo el bucle microbiano (“microbial loop”; líneas rayadas). En líneas punteadas se observa la MOD “perdida” a través de la red trófica que es re-incorporada por las bacterias.

Paralelamente al desarrollo del concepto del bucle microbiano, otras investigaciones demostraban que los flagelados heterotróficos y los ciliados no eran los únicos protistas que depredaban sobre las bacterias. Bird y Kalff (1986) demostraron que *Dinobryon* sp. era capaz de ingerir tantas o más bacterias que todos los componentes heterotróficos del lago juntos (e.g. flagelados heterotróficos, ciliados, rotíferos y cladóceros). Si bien, la existencia de la mixotrofia como estrategia nutricional entre las algas se conoce desde hace más



de 75 años (Biecheler, 1936). La importancia de las algas mixotróficas como potenciales depredadores dentro de la trama trófica (Sanders, 1991) cobró mayor relevancia a partir del trabajo de Bird y Kalff (1986). Como consecuencia, actualmente la visión de la red trófica es mucho más compleja que hace tres décadas atrás.

Los estudios sobre algas mixotróficas realizados hasta el momento han demostrado que esta estrategia de nutrición se encuentra ampliamente distribuida entre los protistas (Christaki et al., 1999; Bergström et al., 2003; Bell y Laybourn-Parry, 2003; Laybourn-Parry y Marshall, 2003; Pålsson y Granéli, 2004; Unrein et al., 2007; Burkholder et al., 2008; Moorthi et al., 2009; Flynn et al., 2012, entre otros). Actualmente se sabe que casi todas las Clases algales que presentan organismos flagelados (a excepción de las Chlorophyceae) albergan especies mixotróficas con capacidad fagocítica: Cryptophyceae, Chrysophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Euglenophyceae, Raphidophyceae, Prasinophyceae y Dictyochophyceae (Porter, 1988; Havskum y Riemann, 1996; Burkholder et al., 2008; Flynn et al., 2012; Maruyama y Kim, 2013). Asimismo, se ha demostrado que las algas mixotróficas son importantes bacterívoros en los ambientes marinos representando aproximadamente el 50 % de la bacterivoría total (Unrein et al., 2007; Zubkov y Tarran, 2008; Hartmann et al., 2012). Mientras que en ambientes de agua dulce, el aporte a la bacterivoría total es mucho más variables (ver revisión en Unrein et al., 2007) llegando a representar en ocasiones el 100 % de la bacterivoría del sistema (Medina-Sánchez et al., 2004). Inclusive, la mixotrofia algal también puede llegar a ser relevante en ambientes eutróficos, representando en ocasiones entre el 2 y el 80% de la bacterivoría total (Sanders et al., 1989; Bennet et al., 1990; Berninger et al., 1992; Izaguirre et al., 2012).

Numerosos estudios han abordado el análisis de esta estrategia en relación a variables ambientales, como disponibilidad de luz y nutrientes (Tranvik et al., 1989; Sanders et al., 1990; Nygaard y Tobiesen, 1993; R. Jones y Rees, 1994a,b; entre otros). Esta estrategia nutricional implica un mayor costo energético para los organismos que la presentan, ya que requieren energía para sostener dos aparatos alimenticios paralelamente (Rothhaupt, 1996a; Raven, 1997). Sin embargo, presenta ventajas sobre los fotótrofos y los heterótrofos estrictos ante



situaciones de limitación por recursos, como luz o nutrientes, entre otros (Nygaard y Tobiesen, 1993; Marshall y Laybourn-Parry, 2002). En tales circunstancias se ha demostrado experimentalmente que los mixótrofos (i.e. generalistas) son más eficientes que los organismos especialistas, y por lo tanto terminan desplazándolos competitivamente (Tittel et al., 2003; Katechakis y Stibor, 2006). Asimismo, a través del empleo de modelos, se ha postulado que la mixotrofia es ventajosa en ambientes oligotróficos, donde los recursos son limitantes, mientras que los organismos especialistas autótrofos o heterótrofos serían más eficientes en condiciones eutróficas, es decir, con elevada disponibilidad de recursos (Troost et al., 2005).

La MOD y su influencia sobre la red trófica

En los ecosistemas acuáticos, la MOD constituye la principal fuente de carbono para las bacterias heterotróficas. La MOD consiste en una mezcla de compuestos carbonados, que pueden provenir de dos orígenes: autóctono o alóctono (R. Jones, 1992 y referencias dentro de este trabajo). La MOD autóctona deriva mayormente de la producción primaria dentro del lago, y consiste en derivados o exudados de algas y macrófitas (Kritzberg et al., 2004; Bade et al., 2007). Por su parte, la MOD alóctona es aquella que ingresa desde el medio terrestre circundante, y deriva de la degradación de compuestos en el suelo provenientes de las plantas superiores (Tranvik, 1992). Las precipitaciones y la escorrentía tienen una gran influencia sobre la variación temporal de la MOD alóctona en un cuerpo de agua (Jansson et al., 2000). Se ha demostrado que episodios de ingreso de alto caudal de agua al lago, debido al derretimiento de nieve o lluvias, se ven acompañados por el ingreso de gran cantidad de MOD a los lagos (Hope et al., 1994; Pace y Cole, 2002; Eimers et al., 2008). Este efecto tiene mayor relevancia en los lagos pequeños y someros que en los lagos grandes y profundos, ya que la relación entre la superficie del lago y la cuenca de drenaje es mayor en los primeros. En consecuencia, los ingresos externos resultan ser proporcionalmente más conspicuos (Wetzel, 2001).



Además, la calidad de la MOD suele estar asociada al origen de la misma, debido al tipo y al tamaño de las moléculas. En general se considera que la MOD autóctona es usualmente rica en proteínas y polisacáridos lábiles, mientras que la MOD alóctona contiene mayor cantidad de sustancias húmicas y fúlvicas con estructuras complejas (Pérez y Sommaruga, 2006). Por lo tanto, la MOD alóctona presenta una estructura molecular más compleja y, en general, de mayor tamaño que la autóctona, por lo cual su calidad como sustrato para las bacterias es menor (R. Jones, 1992; del Giorgio y Davis, 2003). En este sentido, se ha demostrado experimentalmente que la eficiencia de las bacterias para degradar MOD autóctona es mayor que para degradar MOD alóctona (Pérez y Sommaruga, 2006). Sin embargo, actualmente se sabe que la MOD alóctona también puede ser de tamaño molecular pequeño, pero de estructura molecular compleja (Berggren et al., 2010). Además, también se sabe que no todas las bacterias tienen la misma capacidad para consumir el mismo tipo de compuestos. De hecho, hay grupos de bacterias que están más especializados en la degradación de MOD de alto peso molecular (Cottrell y Kirchman, 2000).

Por otro lado, resulta importante destacar que también existe un proceso natural conocido como degradación fotoquímica (en inglés “*photobleaching*”) que pueden modificar la calidad de la MOD en el medio acuático. Este proceso consiste en la ruptura de las moléculas carbonadas en moléculas de menor tamaño, por exposición a la radiación ultravioleta (UV) natural (Kieber et al., 1990). Por lo tanto, las moléculas fotodegradadas, cambian su calidad y pueden ser asimiladas más fácilmente por las bacterias (Lindell et al., 1995; De Lange et al., 2003). Algunos estudios indican que la MOD algal es utilizada preferencialmente ante la MOD alóctona, aunque la MOD alóctona también es utilizada para completar sus requerimientos de carbono (Jansson et al., 1999; Kritzberg et al., 2004).

Es destacable que la MOD presenta una gran variedad de estructuras moleculares. Una parte importante de sus compuestos tienen la capacidad de absorber radiación en el espectro visible (400-700 nm) y en UV (250-400 nm), debido a la estructura que presentan. Es por ello que a estas moléculas se las denomina materia orgánica disuelta coloreada (MODC; Reche et al., 1999). Sin



embargo, existe una correlación significativa entre la variación de la MODC y la MOD (Pace y Cole, 2002; Spencer et al., 2009). Por este motivo, está aceptado mundialmente que la MODC es un buen estimador de la MOD en todos los ambientes acuáticos.

La degradación fotoquímica puede ser diferente aún entre lagos vecinos (geográficamente cercanos), esto posiblemente esté asociado a la composición y al origen de la MOD que presenten (Morris y Hargreaves, 1997). La concentración de MODC en un ambiente afecta las tasas de fotodegradación (Reche et al., 2000). En un ambiente más coloreado, la penetración de la radiación UV es menor debido a la mayor absorción de éste por las sustancias orgánicas disueltas en las capas superficiales. Consecuentemente, la fotodegradación se observa superficialmente y presenta menor efecto en la columna de agua que en un lago con menor concentración de MODC (Reche et al., 2000; Hanson et al., 2011). Así, la fotodegradación parece ser menos efectiva en ambientes más coloreados, por lo cual la MODC sigue siendo mayormente inaccesible para el uso bacteriano. Sin embargo, también puede ocurrir el enmascaramiento del proceso de fotodegradación debido al ingreso de nuevo material alóctono del medio circundante (Morris y Hargreaves, 1997), el cual depende entre otros factores de la hidrogeomorfología de los ambientes, y particularmente, del tiempo de residencia del agua en la cubeta del lago. Se ha demostrado, que tanto la fotodegradación como la ruptura de la MOD por microorganismos, es favorecida por mayores tiempos de residencia, siendo responsables de la pérdida interna de sustancias coloreadas (Rasmussen et al., 1989; Kratz et al., 1997; Håkanson, 2005; Webster et al., 2008). Cuanto mayor es el tiempo de residencia, mayor es el procesamiento de las sustancias disueltas (Xenopoulos et al., 2003; Queimaliños et al., 2012).

La interacción de la MOD con la red trófica abarca varios aspectos. Por un lado, el clima óptico de un cuerpo de agua se ve influenciado por la concentración y por la calidad de la MODC, debido a su alta capacidad de absorber la radiación solar (Reche et al., 2000; Scully et al., 2003; Fujii et al., 2012). Por esta razón, es un importante competidor del fitoplancton por la luz disponible en el ambiente, principalmente en aquellos lagos donde su concentración es alta (R. Jones,



1992). Por otro lado, la MOD autóctona subsidia la producción bacteriana, sin embargo en ocasiones, la MOD alóctona completa los requerimientos de carbono de las bacterias, cuando éstos superan la producción autóctona (Jansson et al., 1999; Kritzberg et al., 2004). Mientras que al mismo tiempo, las bacterias y las algas compiten por los nutrientes disponibles en el ambiente. Ante este escenario de reducción de la calidad lumínica, competencia por los escasos nutrientes y, relativamente, elevada abundancia de bacterias, es esperable que las algas mixotróficas cobren relevancia.

En la Figura I-2 se presenta en forma esquemática una visión completa y actual de las principales interacciones tróficas que se pueden encontrar en una trama trófica planctónica. Sin embargo, tanto la intensidad de estas interacciones (e.g. el grosor de las flechas que conectan los distintos componentes de la trama trófica), como la composición y abundancia de los organismos que componen la trama trófica, depende entre otras cosas, de la concentración de nutrientes, la disponibilidad de luz, y la calidad y cantidad de MOD.

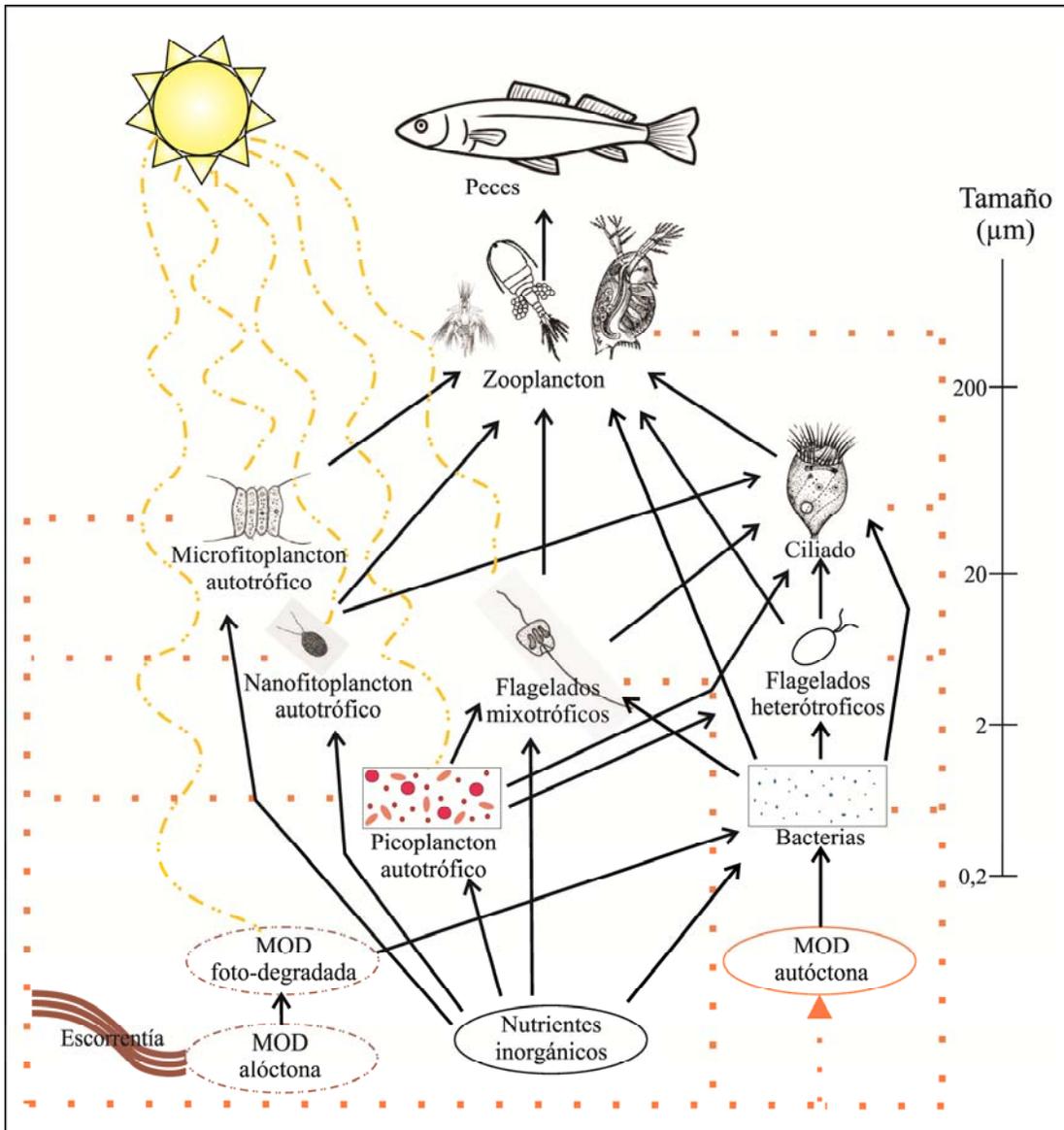


Figura I-2: Visión de la red trófica actual. *Referencias:* en líneas punteadas se indica el flujo de MOD autóctona debido a “desecho”, “pérdida” o por sobre-producción primaria en el caso de los autótrofos; las líneas enteras marrones (abajo a la izquierda) indican el ingreso de MOD alóctona al lago por escorrentía.



Clasificación de los organismos mixotróficos

La mixotrofia es una estrategia nutricional exitosa ante situaciones de escasos recursos, sin embargo la respuesta de las algas mixotróficas a las condiciones ambientales no es uniforme entre los distintos taxa. Nygaard y Tobiesen (1993), postularon que la mixotrofia es empleada por diferentes especies algales (e.g. *Ochromonas minima*, *Chrysochromulina ericina*, *Cryptomonas* sp., entre otras), para la adquisición de nutrientes limitantes. Más recientemente, un resultado similar fue presentado por Kamjunke et al. (2007), quienes describieron la ventaja competitiva que la bacterivoría le proporcionó a *Dinobryon* durante un proceso de re-oligotrofización. Además, algunos otros estudios demostraron cómo la variación de la disponibilidad de luz afecta positiva o negativamente la capacidad bacterívora en algunas especies, como es el caso de *Dinobryon divergens*, *D. sertularia* y *Poterioochromonas malhamensis* (R. Jones y Rees, 1994a,b; Holen, 1999). Otros autores observaron que algunas especies se ven afectadas positivamente por la concentración de presas disponibles en el ambiente, más que por la disponibilidad de nutrientes o de luz, como es el caso de *Ochromonas* sp. y *Poterioochromonas malhamensis* (Andersson et al., 1989; Caron et al., 1990; Sanders et al., 1990). La mixotrofia también ha sido asociada a la adquisición de sustancias esenciales (e.g. vitaminas), en especies que presentan muy bajas tasas de depredación (Tranvik et al., 1989). Todos estos resultados estarían indicando que la utilización de la fagotrofia por parte de las algas varía significativamente entre los taxa. R. Jones (1994) planteó que los distintos organismos mixótrofos podrían ordenarse a lo largo de un espectro de nutrición (Figura I-3), de acuerdo al grado de autotrofia y de heterotrofia de cada uno. Posteriormente, H. Jones (1997) propuso una clasificación de los organismos mixotróficos de acuerdo con los requisitos que presentan para utilizar su capacidad fagotrófica en relación a la fototrófica. Los organismos mixotróficos varían desde aquellos principalmente fototróficos y que muy esporádicamente utilizan su capacidad fagotrófica, hasta aquellos que son principalmente fagótrofos y que utilizan la fototrofia solo de manera ocasional. El empleo de una u otra estrategia trófica está determinado por el organismo en sí mismo, las condiciones fisiológicas que presenta, así como también las condiciones ambientales en las que vive (Porter, 1988; H. Jones, 1997; R. Jones,



2000; Stoecker, 1998). En la Tabla I-1 se presentan las características de los cuatro grupos planteados por H. Jones (1997) y resumidos en el trabajo de revisión de R. Jones (2000).

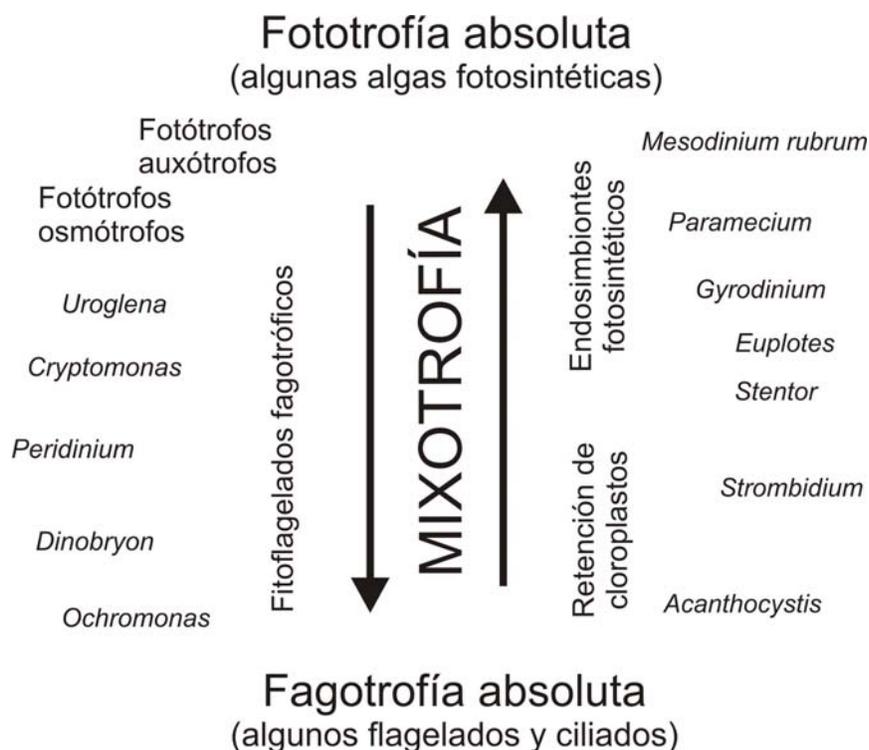


Figura I-3: Representación esquemática de la continuidad de estrategias nutricionales entre los protistas planctónicos. Se muestran ejemplos de géneros que incluyen especies mixotróficas (adaptado de R. Jones, 1994).



Tabla I-1. Clasificación de los protistas mixotróficos basada en su comportamiento (adaptado de R. Jones, 2000).

Grupo A	Protistas cuyo principal modo de nutrición es la heterotrofia, los cuales emplean la fototrofia sólo cuando la concentración de presas limita su crecimiento heterotrófico.	Ej. <i>Ochromonas</i> sp. (Andersson et al., 1989); <i>Poterioochromonas malhamensis</i> (Caron et al., 1990)
Grupo B	Protistas cuyo principal modo de nutrición es la fototrofia, pero suplementan su crecimiento por fagotrofia cuando la luz es limitante.	Ej. <i>Dinobryon divergens</i> (Jones y Rees, 1994b); <i>Chrysochromulina brevifilum</i> (R. Jones et al., 1993)
Grupo C	Protistas cuyo principal modo de nutrición es la fototrofia, pero a los cuales la fagotrofia les provee de sustancias esenciales para el crecimiento.	Ej. <i>Uroglena americana</i> (Kimura y Ishida, 1985); <i>D. sertularia</i> (R. Jones y Rees, 1994a,b)
Grupo D	Protistas cuyo principal modo de nutrición es la fototrofia e ingieren presas sólo a muy bajas tasas, por ejemplo, para cumplir con los requisitos de mantenimiento celular durante largos períodos de oscuridad.	Ej. <i>Cryptomonas erosa</i> y <i>C. ovata</i> (Tranvik et al., 1989)

El Grupo A está caracterizado por especies cuyo crecimiento no depende de la intensidad de luz, sino de la concentración de presas disponibles en el ambiente donde se desarrollan, como *Ochromonas* sp. y *Poterioochromonas malhamensis* (Andersson et al., 1989; Caron et al., 1990; Sanders et al., 1990). Dentro del Grupo B se agrupa a las especies como *Chrysochromulina brevifilum*, *Dinobryon divergens* y *Ochromonas* sp., cuyas tasas de ingestión son inversamente proporcionales a la intensidad de luz, y que por lo tanto utilizan la bacterivoría cuando la luz limita su crecimiento autotrófico (R. Jones et al., 1993; R. Jones y Rees, 1994b; Keller et al., 1994). Dentro del Grupo C, se encuentra



Uroglena americana, *D. sertularia* y *D. cylindricum*, las cuales utilizan la bacterivoría como medio de adquisición de nutrientes. Además, éstas a veces presentan una relación directa entre la bacterivoría y el incremento de la intensidad de luz (Kimura y Ishida, 1985; R. Jones y Rees, 1994a,b; Caron et al., 1993). Por último, en el Grupo D, se incluye a especies con tasas de ingestión muy bajas, como *Cryptomonas erosa* y *C. ovata* (Tranvik et al., 1989). Sin embargo, también se ha sugerido que estas especies podrían utilizar la ingestión de presas para suplir sus requerimientos de nutrientes orgánicos o inorgánicos, lo cual las ubicaría en el Grupo C (Urabe et al., 2000; Unrein et al., 2013).

Tal como se discutió más arriba, si bien es sabido que las diferentes algas mixotróficas presentan distintas estrategias nutricionales, la mayor parte de los trabajos que estudian su impacto *in situ* en los ecosistemas acuáticos consideran a estos organismos como una “caja negra” (Christaki et al., 1999; Unrein et al., 2007; Tsai et al., 2011). Efectivamente son muy pocos los trabajos que discriminan taxonómicamente (Nygaard y Tobiesen, 1993; Sanders et al., 1990; Pålsson y Granéli, 2003), y menos aún los que estudian comparativamente el impacto de cada taxón y sus preferencias alimenticias (Havskum y Riemann, 1996; Domaizon et al., 2003).

Selectividad de presas

La selectividad de presas de algunos flagelados mixotróficos y heterotróficos, ha sido evaluada en experiencias de laboratorio utilizando como presas esferas de látex y bacterias naturales de distintos tamaños y tipos (González, 1990a; Monger y Landry, 1991; Pfandl et al., 2004). Estos estudios permitieron concluir que las presas de 1 a 3 μm corresponden al tamaño óptimo de presas accesibles para el consumo entre los flagelados heterotróficos (Pernthaler, 2005). Además, los escasos trabajos en donde se evaluó la selectividad de los protistas (flagelados heterotróficos, ciliados y *Cryptomonas* mixotróficas) por presas naturales de distinto tamaño (e.g. bacterias y picocianobacterias) observaron que todos los organismos evaluados mostraron



una preferencia por las picocianobacterias (Pernthaler et al., 1996; Tarbe et al., 2011; Izaguirre et al., 2012).

Las principales características que determinan la selectividad por las presas son el tamaño y la forma de las mismas (González et al., 1990a). Además, existen otras características que también pueden mediar sobre la depredación selectiva, tales como la movilidad, la digestibilidad, la superficie celular, el estado fisiológico, la afiliación filogenética y la calidad de alimento (determinado como la proporción entre el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo de las presas, conocido como relación C:N:P) (Boenigk et al., 2001a,b; Matz et al., 2002; Matz y Jürgens, 2005; Jezbera et al., 2005, 2006; Shannon, 2006; Shannon et al., 2007; Massana et al., 2009; Jousset, 2012). Se ha estudiado la selectividad de los flagelados mixotróficos en relación a algunas de estas características, aunque la mayoría de los estudios se han realizado en laboratorio con cultivos de *Ochromonas*. Algunos estudios muestran para flagelados mixotróficos selectividad en relación a diferentes características. Algunos hallaron selectividad positiva respecto a presas con un tamaño entre 0,5 y 3 μm (Andersson et al., 1986; Izaguirre et al., 2012); otros estudios hallaron que la selectividad de presas puede estar afectada por la digestibilidad de las presas que un flagelado ingiere (Boenigk et al., 2001a,b); por otra parte algunos trabajos analizaron como la selectividad de una presa se reduce en función del aumento de su movilidad (Matz y Jürgens, 2005); por último, también se ha analizado cómo la calidad de alimento de una presa (i.e. la relación estequiométrica de C:N:P) influye en la selectividad que los flagelados tengan sobre esta (Shannon et al., 2007). Sin embargo, aún no se ha analizado la selectividad de presas por tamaño y por afiliación filogenética en un ensamble natural dominado por varios taxa de flagelados mixotróficos.

Justificación, Objetivo General del trabajo y estructura de la Tesis

A partir de los antecedentes previamente descriptos se desprende que: (1) no todas las algas mixotróficas presentan el mismo grado de heterotrofia, lo que implica que los distintos taxa impactarían de manera diferente sobre las posibles presas. A pesar de esto, los pocos estudios que consideran a las algas



mixotróficas dentro de la trama trófica microbiana suelen considerarlo como un grupo homogéneo. (2) Son muy escasos los estudios en donde se haya intentado estimar las tasas de depredación y el impacto de los distintos taxa sobre el bacterioplancton. (3) Son inexistentes los trabajos enfocados en evaluar la selectividad de presas en algas mixotróficas bajo condiciones naturales.

En este contexto, el **Objetivo General** de esta **Tesis** es analizar el rol de los organismos mixotróficos dentro de la red trófica microbiana de diferentes ambientes someros lacustres, evaluando la selectividad de presas. De este modo se pretende abrir la “caja negra” de los mixótrofos analizando el comportamiento de cada taxón en particular, y demostrar la importancia de realizar un análisis más detallado de este grupo de protistas.

Para cumplir con este Objetivo General se seleccionaron seis lagos someros oligotróficos, dos de ellos ubicados en el norte de Patagonia (Lagos Escondido y Morenito) y cuatro de ellos en la Península Antártica (Bahía Esperanza: Lagos Esperanza, Flora, Encantado y Chico). Los lagos seleccionados se asemejan entre sí por ser oligotróficos y porque su comunidad fitoplanctónica está dominada por especies mixotróficas (Izaguirre et al., 1998; Queimaliños, 2002). Todos estos lagos presentan una baja abundancia de especies estrictamente autotróficas.

En el **Capítulo II** de esta Tesis se analiza, en primer lugar, la dinámica estacional de los taxa mixotróficos (determinados al mayor detalle taxonómico posible) dentro de la red trófica microbiana pelágica en los lagos Escondido y Morenito, que presentan diferente cantidad y calidad de MOD y como consecuencia diferencias en el clima óptico. En los **Capítulos III y IV** se analizan las preferencias tróficas por tamaño y por afiliación filogenética de cada uno de los taxa mixotróficos en las comunidades planctónicas bajo condiciones naturales. En el **Capítulo III** se estudia la actividad fagotrófica de todos los taxa mixotróficos presentes en los lagos Escondido y Morenito, y la selectividad de presas de estos taxa sobre tres tamaños diferentes de presas que se encuentran disponibles naturalmente en los ambientes (bacterias, picocianobacterias y picoeucariotas). Por otra parte, en el **Capítulo IV** se analiza la selectividad de presas *in situ* por parte de los flagelados mixotróficos sobre bacterias pertenecientes a distintas



afiliaciones filogenéticas. Este análisis se llevó a cabo sobre la comunidad planctónica natural de cuatro lagos oligotróficos antárticos, que presentan una composición fitoplanctónica similar a los lagos patagónicos. Este cambio de sitio de estudio se debió a dificultades metodológicas que se explican detalladamente en el Capítulo, y considerando que las preferencias tróficas de los flagelados son independientes del medio en el que habitan. Finalmente, en el **Capítulo V** se exponen los Principales Resultados y las Conclusiones Generales de este trabajo de Tesis Doctoral.



CAPÍTULO II:

Dinámica de las algas mixotróficas en dos lagos someros con diferentes concentración y calidad de materia orgánica disuelta





II- 1. Introducción

La relación entre el carbono autóctono y el carbono alóctono en un cuerpo de agua determina el grado de aloctonía de un ambiente. Se ha comprobado que el ingreso de material alóctono a un cuerpo de agua está afectado por las precipitaciones (Pace y Cole, 2002; Adrian et al., 2009). De acuerdo a las características de la MOD alóctona, se considera que el color del agua (determinado como la absorbancia a 440 nm) es proporcional al carbono orgánico alóctono originado en los ambientes terrestres circundantes, potencialmente disponible para los consumidores dentro del lago (Carpenter et al., 2005). Homólogamente, el mejor estimador de la biomasa fitoplanctónica en un cuerpo de agua es la concentración de Clorofila *a* (Cl *a*), la cual puede ser utilizada como un indicador del carbono autóctono producido por estos organismos, y disponible para los consumidores. Así, el cociente Color:Cl *a* es un indicador de la relación entre la cantidad de carbono alóctono y autóctono, resultando ser un predictor útil de la aloctonía de un ambiente (Carpenter et al., 2005; Webster et al., 2008; Queimaliños et al., 2012).

Como se describió detalladamente en la Introducción General, además de cumplir un rol central en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos como principal fuente de carbono de las bacterias heterotróficas (R. Jones, 1992), la MOD afecta el ingreso de la luz en un cuerpo de agua. Analizando el efecto de la MOD sobre las redes tróficas, R. Jones (1992) planteó que la calidad espectral de la luz puede tener alguna influencia en la composición de la comunidad fitoplanctónica. Sin embargo, enfatizó que la cantidad de luz disponible en el ambiente podría tener mayor efecto que su calidad sobre la composición del fitoplancton en un sistema. La mayoría de los trabajos realizados hasta la actualidad han acentuado el análisis del comportamiento de distintas especies fitoplanctónicas ante distintas intensidades de luz (Holen, 1999; Sciandra et al., 2000; Pålsson y Daniel, 2004; de Tezanos Pinto y Litchman, 2010). Por todo esto, es esperable que la composición del fitoplancton esté influenciada por la cantidad y la calidad de MOD disponible en un cuerpo de agua.



En los sistemas acuáticos, la absorción de la luz en el espectro visible (equivalente al espectro de Radiación Fotosintéticamente Activa -RFA- que oscila entre los 400-700 nm) se debe fundamentalmente a cinco componentes presentes en el ecosistema (Kirk, 1980; Roesler et al., 1989): (a) las moléculas de agua en sí mismas; (b) las sustancias disueltas coloreadas, también denominadas *Gilvin* (Kirk, 1980); (c) partículas orgánicas vivas; (d) partículas orgánicas en suspensión no vivas y (e) partículas inorgánicas en suspensión. El espectro de absorción de las moléculas de agua presenta, comparativamente, una mayor absorción hacia las longitudes de onda larga del espectro de la RFA (entre los 600 a 700 nm), correspondientes a los colores anaranjado y rojo (Figura II-1). Por otro lado, las sustancias coloreadas disueltas presentan un espectro de absorción caracterizado por una disminución exponencial con el aumento de las longitudes de onda (Davies-Colley y Vant, 1987) (Figura II-1). Dadas estas características de absorción, las sustancias disueltas son importantes en el proceso de absorción de las radiaciones UV y de los colores violeta y azul (Davies-Colley y Vant, 1987; Shooter et al., 1998; Zagarese et al., 1998; Bukaveckas y Robbins-Forbes, 2000; Pérez et al., 2002). Las sustancias disueltas de color son fundamentalmente ácidos húmicos y ácidos fúlvicos originados por el proceso de descomposición de tejidos vegetales y contribuyen entre el 40 y el 60 % de la MOD lacustre (Davies-Colley y Vant, 1987).

Por su parte, los organismos fototróficos conforman otro de los componentes que absorben la radiación en un cuerpo de agua. Este componente presenta espectros de absorción característicos de acuerdo con la composición de pigmentos que presentan los organismos. En general, las longitudes de onda pertenecientes al azul y al rojo (440 y 675 nm, Kirk, 2011) son las más absorbidas debido a la absorción de la *Cl a*, que es el principal pigmento en todos los grupos de algas (Figura II-1). Además existen otros pigmentos, denominados pigmentos accesorios que amplían el espectro de absorción de la *Cl a*, y que absorben en otras longitudes de onda (Striebel, 2008). Por último, tanto las partículas en suspensión inorgánicas (sedimento resuspendido o arcillas glaciarias) como las orgánicas no vivas (detritos), presentan una absorción mayor en las longitudes de



onda correspondientes al violeta y al azul, mientras que es muy baja en el naranja y en el rojo (Figura II-1).

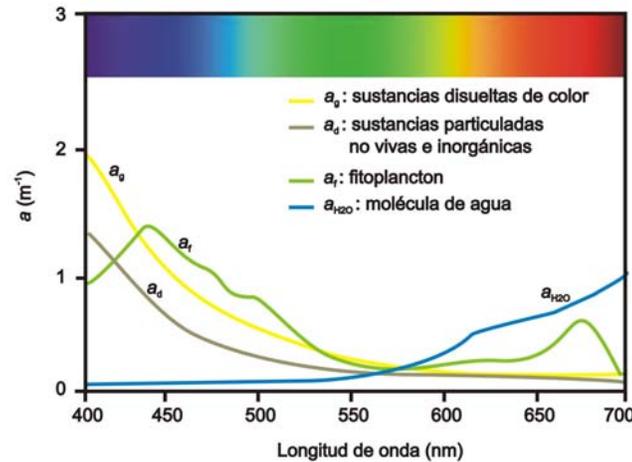


Figura II-1: Espectros de absorción característicos de las principales fracciones involucradas en la absorción de la luz en un cuerpo de agua (figura adaptada de Kirk, 2011).

Así, la calidad de la luz en un cuerpo de agua está determinada por la composición y la abundancia de los componentes (agua, fitoplancton, MOD, partículas orgánicas e inorgánicas en suspensión) que afectan diferencialmente a la absorción de la luz en el agua. Por lo tanto, la calidad de la luz puede ser caracterizada a partir de los coeficientes de atenuación de la luz (K_d) de tres colores: azul, verde y rojo ($K_{d_{AZUL}}$, $K_{d_{VERDE}}$ y $K_{d_{ROJO}}$, respectivamente). La disponibilidad de la luz verde en un ambiente, por ejemplo, puede estimarse a partir del cociente $K_{d_{ROJO}}/K_{d_{VERDE}}$ (Vörös et al., 1998).

A partir de lo descrito previamente, sería esperable que ambientes más alóctonos presenten diferente calidad de luz, y menor cantidad de luz que ambientes comparativamente más autóctonos. R. Jones (2000) planteó dos escenarios hipotéticos en los que analizó cuál sería el rol del fitoplancton autotrófico y mixotrófico en función de las condiciones del ambiente. Este autor planteó que un lago de aguas claras (“*clear water*”) con baja concentración de MOD y alta disponibilidad de luz, ofrecerá bajas posibilidades de supervivencia para los organismos mixotróficos, mientras que la mayor parte del flujo del



carbono y del fósforo (P) ocurrirá a través del fitoplancton autotrófico obligado hacia el zooplancton, con un pequeño flujo a través de las bacterias por flagelados heterotróficos. En contraste, en un lago más húmico (“*humic lake*”) las condiciones de luz desfavorables y la, relativamente, alta concentración de MOD podrían generar desventajas a los fotótrofos obligados, debido tanto a la limitación por luz, como a la competencia con las bacterias por el P inorgánico. En este escenario los mixótrofos suplementarían su fijación fotosintética de carbono con la ingesta de bacterias. Además, la bacterivoría les permitiría utilizar a las bacterias como fuente alternativa de nutrientes esenciales.

Los lagos Escondido y Morenito están ubicados en cercanías de la ciudad de Bariloche (Noroeste de Patagonia, Argentina). Son dos lagos vecinos oligotróficos y someros, con similares características físico-químicas, pero que difieren en sus parámetros hidrogeomórficos, y en el contenido y la calidad de la MOD que presentan. La concentración media de MOD del Escondido es de aproximadamente 4 mg L^{-1} , el doble que la del Morenito (Diaz y Pedrozo, 1993; Morris et al., 1995; Modenutti et al., 2000; Bastidas Navarro et al., 2009; Pérez et al., 2010). Esta diferencia en relación a la MOD, probablemente está asociada a diferencias en la hidrogeomorfología de estos lagos.

Los trabajos previos realizados en estos dos ambientes muestran que ambos lagos presentan una composición fitoplanctónica bastante similar (Diaz y Pedrozo, 1993; Queimaliños, 2002; Bastidas Navarro et al., 2009), con una abundancia importante de algas reconocidas como mixotróficas, tales como: *Chrysochromulina parva*, *Plagioselmis lacustris* (syn. *Rhodomonas lacustris*), *Cryptomonas erosa*, *Dinobryon divergens*, *Gymnodinium varians*. A partir de la clasificación de estrategias nutricionales propuesta por H. Jones (1997), se podrían ordenar a las especies mixotróficas presentes en ambos lagos como se observa en la Figura II-2.

El Objetivo de este Capítulo es comparar la variación de la estructura y la dinámica de las algas mixotróficas a lo largo de un ciclo anual, en dos lagos vecinos someros y oligotróficos con características físico-químicas muy similares, a excepción del contenido y la calidad de la MOD. En el presente Capítulo se describe por primera vez y en detalle la dinámica anual de todas las fracciones



planctónicas de tamaño $<200 \mu\text{m}$, comparando ambos lagos en forma concurrente.

Debido a las diferencias anteriormente mencionadas respecto a la concentración y calidad de MOD que presenta cada lago, se plantea la siguiente hipótesis.

Hipótesis y predicción

Hipótesis: La diferente concentración de MOD y disponibilidad de luz en cada lago condiciona la importancia relativa de las algas mixotróficas pertenecientes a los distintos extremos del espectro de estrategias nutricionales.

Predicción: las especies mixotróficas más heterotróficas (e.g. *Ochromonas* sp., *sensu* H. Jones, 1997) dominarán en el lago con mayor concentración de MOD y menor disponibilidad de luz (Escondido), mientras que en el lago más claro (Morenito) es esperable que dominen especies mixotróficas más autotróficas (e.g. *Cryptomonas* sp. *sensu* H. Jones, 1997).

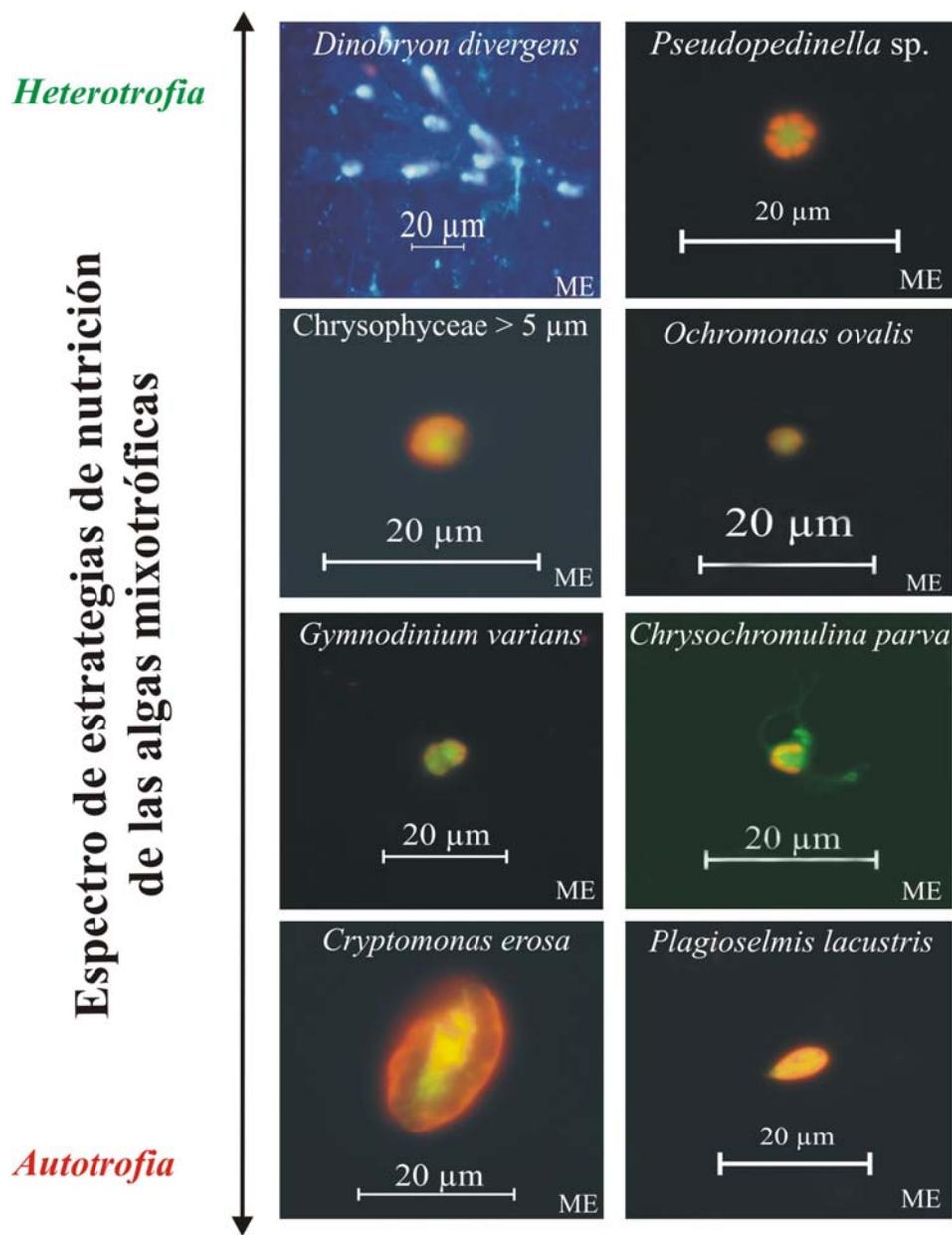


Figura II-2: Esquema mostrando el espectro de estrategias nutricionales teórico de las principales especies mixotróficas que habitan en los lagos Escondido y Morenito, comenzando desde la parte inferior con las especies mixotróficas más autotróficas e incrementando hacia arriba el grado de heterotrofia (fagotrofia).



II- 2. Sitio de estudio

Ubicación geográfica y características de los lagos

Se seleccionaron dos lagos vecinos someros oligotróficos situados en cercanías de la ciudad de Bariloche en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina: Escondido y Morenito (Figura II-3).

El lago Escondido se encuentra ubicado en un ambiente erosivo-deposicional glaciario entre rocas aborregadas y morenas de fondo (Pereyra y Helms, 2005). Este lago está localizado a 764 m s.n.m. (41°03'S, 71°34'O), presenta una profundidad máxima de 8 m y un área de 8 Ha, siendo el más pequeño de los dos lagos seleccionados para este estudio. Este lago pertenece a una cuenca cerrada y, como tal, carece de arroyos o ríos superficiales que confluyan en él, y se desconoce la existencia de algún drenaje subsuperficial (Pereyra y Helms, 2005; Figura II-4). Este ambiente presenta materiales muy finos en el sustrato. Es un lago pedemontano con muy baja influencia antrópica. Térmicamente es clasificado como un lago polimíctico frío, que se encuentra continuamente mezclado, aunque ocasionalmente se congela (Balseiro y Modenutti, 1990). Este cuerpo de agua oligotrófico presenta una concentración promedio de Cl a de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Modenutti et al., 2000; Bastidas Navarro et al., 2009), y una concentración de carbono orgánico disuelto (COD) que oscila entre 2,7 y 5,4 mg L^{-1} (Morris et al., 1995; Bastidas Navarro et al., 2009; Pérez et al., 2010).

El lago Morenito está localizado a 3,7 km en línea recta del lago Escondido. Está establecido sobre una estructura de origen principalmente volcánico con intercalaciones sedimentarias de origen marino (Rapacioli, 2011). Está ubicado a una altitud de 758 m s.n.m. (41°03'S, 71°31'O), presenta una profundidad máxima de 12 m y un área de 38 Ha. El lago Morenito era originalmente una pequeña bahía del Lago Moreno Oeste, que quedó separada artificialmente a partir de la creación de un camino en 1960. Esta bahía se convirtió así en un cuerpo de agua más independiente, conectado con el lago Moreno Oeste a través de un canal (Figura II-4). Cuando el nivel superficial de la cuenca se eleva, se genera una conexión superficial más importante entre estos dos cuerpos de agua.



El lago Morenito pertenece a una cuenca abierta, se encuentra conectado aguas arriba con la laguna Ezquerria (laguna somera de 3-4 m de profundidad; Queimaliños, 1993; Diaz et al., 2007) y aguas abajo con el lago Moreno Oeste (lago profundo de 90 m profundidad; Figura II-3). Este lago pertenece a la denominada Reserva Natural Urbana Lago Morenito – Laguna Ezquerria (Rapacioli, 2011). Según su caracterización térmica, este lago también es polimíctico frío, se encuentra continuamente mezclado, aunque ocasionalmente se congela (Queimaliños, 2002). Es un lago oligotrófico con una concentración de Cl a que oscila entre 0,2 - 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Alonso et al., 2004; Bastidas Navarro et al., 2009), y una concentración de COD que oscila entre 1,8 y 3,3 mg L^{-1} (Alonso et al., 2004; Bastidas Navarro et al., 2009).

La vegetación circundante de ambos lagos está constituida por un bosque mixto de *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Blume, *N. antarctica* (Forster f.) Oersted y *Austrocedrus chilensis* (D.Don) Florin et Boutleje, siendo más denso en el caso del lago Escondido. A su vez, los dos lagos presentan zonas litorales extendidas tapizadas por la macrófita sumergida *Potamogeton linguatus* y la macrófita emergente *Schoenoplectus californicus* (Modenutti et al., 1998).

El clima en esta región es templado-frío con el máximo de precipitación en la estación fría (Paruelo et al., 1998). Presenta un pronunciado gradiente de precipitaciones en sentido Oeste-Este, con marcada estacionalidad, concentrándose en los meses de otoño e invierno (Paruelo et al., 1998) (Figura II-4). Las temperaturas son típicas de una región templado-fría, con inviernos húmedos y fríos, con heladas y precipitaciones níveas, y veranos cálidos y secos. Las primaveras son ventosas siendo los vientos dominantes del sector Oeste-Noroeste provenientes del anticiclón del Pacífico (Paruelo et al., 1998). La incidencia máxima de la radiación solar coincide con la estación seca.

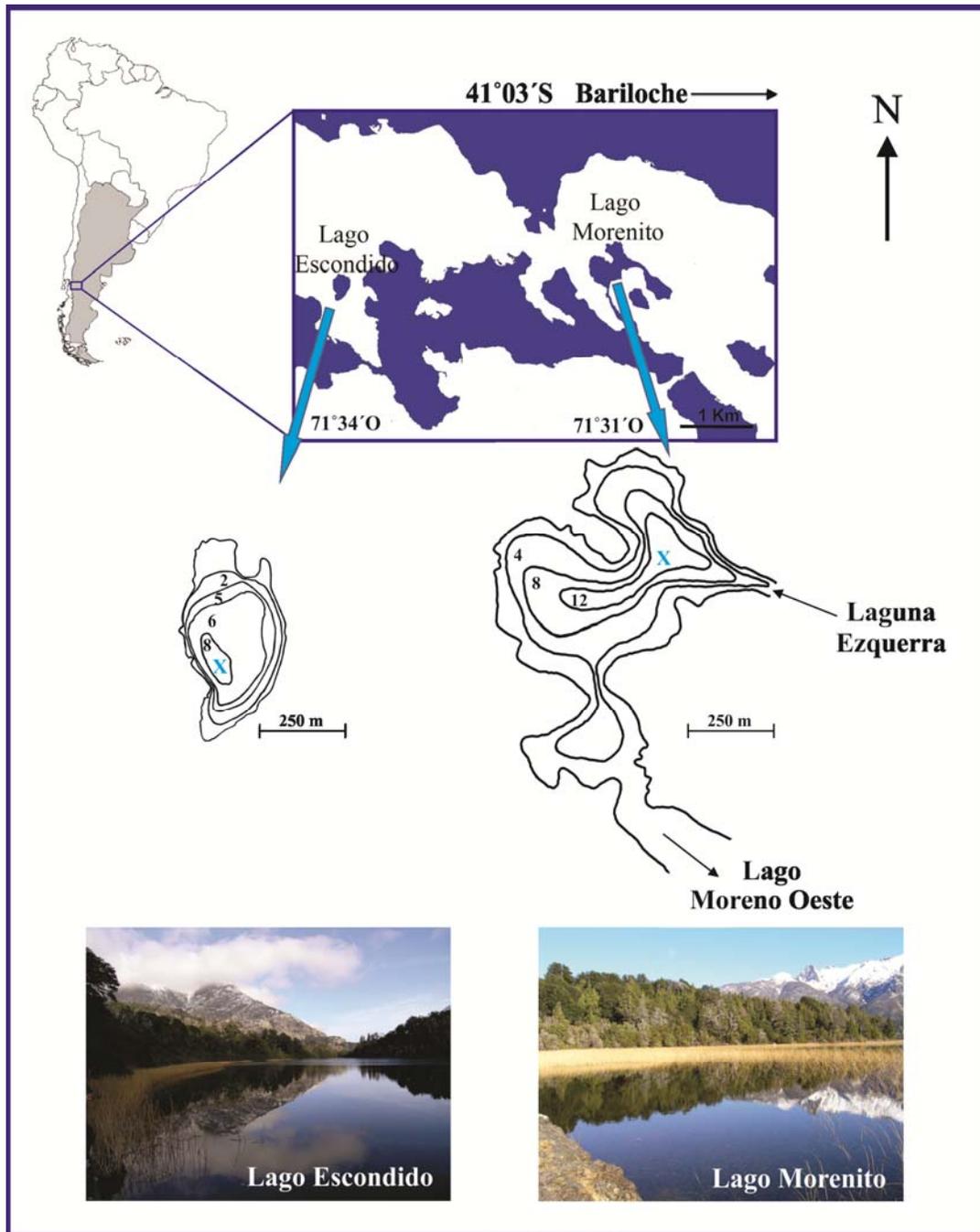


Figura II-3: Localización geográfica del lago Escondido (izquierda) y del lago Morenito (derecha) dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia Argentina; en color azul se distinguen los lagos. Debajo, los mapas batimétricos de cada lago; con una cruz azul se indican los puntos de máxima profundidad donde se realizaron los muestreos. Las flechas en el mapa batimétrico del lago Morenito indican el sentido del flujo natural de agua desde la laguna Ezquerra (aguas arriba) hasta el Lago Moreno Oeste (aguas abajo). Debajo una foto de cada uno de los ambientes.



Figura II-4: Imágenes satelitales de los lagos Escondido (a) y Morenito (b). El primero pertenece a una cuenca cerrada. El segundo pertenece a una cuenca abierta, se encuentra conectado aguas arriba con la laguna Ezquerra y aguas abajo con el lago Moreno Oeste. Con * se indica el camino que separó artificialmente al lago Morenito del Moreno Oeste (para más detalles ver el texto).

Antecedentes limnológicos de estos dos ambientes

La composición fitoplanctónica de ambos lagos está dominada por géneros como: *Chrysochromulina*, *Ochromonas*, *Dinobryon*, *Gymnodinium*, *Peridinium*, *Cryptomonas* y *Plagioselmis* (Díaz y Pedrozo, 1993; Queimaliños, 2002; Bastidas Navarro et al., 2009), que han sido definidos como mixotróficos (Sanders y Porter, 1988; Tranvik et al., 1989; Boraas et al., 1992; R. Jones 1994, 2000; H. Jones, 1997; entre otros). Algunos trabajos experimentales analizaron las tasas de bacterivoría de la comunidad mixotrófica de estos ambientes en general (Queimaliños, 2002; Bastidas Navarro et al., 2011); sin embargo, queda por conocer detalladamente el impacto de la bacterivoría de cada una de las especies mixotróficas presentes.

La comparación de la producción primaria (PP) en relación a la producción bacteriana (PB) en estos dos ambientes ha demostrado diferencias funcionales entre ellos (Bastidas Navarro et al., 2009). Estos autores hallaron valores del cociente PP:PB levemente inferiores a 1 en el Escondido, y valores que oscilaron entre 3 y 6 en el Morenito. Aplicando los conceptos de Jansson et al. (2000) el Escondido se comportaría como un lago netamente heterotrófico, mientras que,



por el contrario, el Morenito se comportaría como un lago oligotrófico claro donde la PB depende ampliamente de la MOD generada por la producción fitoplanctónica (Jansson et al., 2000). Esto estaría diferenciando el tipo de funcionamiento de estos lagos, evidenciando que el Escondido presenta una movilización energética principalmente por la vía heterotrófica (Bastidas Navarro et al., 2009).

En el caso del lago Escondido, se ha descrito que el ingreso de material alóctono al lago está fuertemente determinado por las lluvias (Bastidas Navarro et al., 2012). En el caso del Morenito esto no ha sido demostrado aún, sin embargo es esperable que presente el mismo patrón que el Escondido, debido a la similitud de sus cuencas. Además recientemente, este mismo patrón fue observado en el lago Moreno Oeste vecino del Morenito (Queimaliños et al., 2012).

Pérez et al. (2002) han demostrado que la cantidad de luz en la columna de agua es levemente diferente entre estos dos ambientes. El coeficiente de atenuación de la radiación vertical difusa ($K_{d_{RFA}}$) es mayor en el Escondido que en el Morenito, lo cual implica que el primero tiene menor ingreso de luz que el segundo. Además, analizando la calidad de la luz, también encontraron diferencias entre los valores de los coeficientes de atenuación de la luz (K_d) de los distintos colores. Aunque el orden en el cual se extinguen cada una de estas longitudes de onda es el mismo entre los lagos: $K_{d_{AZUL}} > K_{d_{ROJO}} > K_{d_{VERDE}}$ (Pérez et al., 2002), se ha observado que los tres coeficientes son mayores en el Escondido que en Morenito. Además, debido a que la mayor absorción de la luz está dada por la MODC (80 % en el Escondido y 48 % en el Morenito), ambos lagos han sido categorizados como “*Gilvin*” o tipo G (Pérez et al., 2002).



II- 3. Materiales y métodos

II-3-1. Obtención de las muestras

Estos cuerpos de agua fueron estudiados mensualmente desde enero de 2010 hasta enero de 2011. Se estableció un punto de muestreo en el área de mayor profundidad de cada lago (Figura II-3). Las muestras de agua fueron obtenidas con un muestreador limnológico Schindler-Patalas de 12 litros de capacidad, cada tres metros de profundidad comenzando desde la superficie y hasta medio metro por encima del fondo. En este sentido, las profundidades siempre muestreadas en ambos lagos fueron 0, 3 y 6 m, mientras que la 4^{ta} profundidad dependió del nivel del agua. En el lago Escondido, en los casos en que fue muestreada, osciló entre los 6,5 y 7,5 m, mientras que en el lago Morenito fue siempre obtenida y osciló entre los 7,5 y 9 m. Cabe destacar que en el lago Morenito la máxima profundidad encontrada fue de 9,5 m y no los 12 m de referencia (Modenutti et al., 2000).

Por cada profundidad de muestreo se obtuvieron 24 litros de agua. De este volumen, 5 litros fueron transferidos a un bidón de polipropileno, el cual fue previamente lavado en el laboratorio con ácido clorhídrico al 10 % y agua destilada, y enjuagado con agua del mismo lago antes de comenzar con la recolección. Una submuestra de 200 mL fue fijada con glutaraldehído 10 % frío (4°C) previamente filtrado por 0,2 μm (concentración final 1 %) para la cuantificación de picoplancton y nanoplancton. Otra submuestra de 500 mL fue fijada con Lugol acético para el recuento del microfitoplancton y ciliados. El volumen restante dentro de cada bidón fue transportado al laboratorio en condiciones de oscuridad a fin de caracterizar la MOD, y determinar la concentración de nutrientes, de Cl a y de sólidos totales en suspensión (STS). Los 19 litros restantes fueron filtrados en el lago a través de una malla de 50 μm de poro, a fin de obtener una muestra de zooplancton concentrada (rotíferos, cladóceros y copépodos), la cual fue fijada con formol al 4 %.

En el sitio de muestreo se determinaron, para cada profundidad, los siguientes parámetros: temperatura, pH y conductividad a través de las sondas



portátiles Hanna HI98150 y Hanna HI9142 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA), respectivamente. La concentración de oxígeno disuelto fue medida *in situ* con una sonda portátil Orion (Model 115).

II-3-2. Determinaciones de laboratorio

De cada muestra de agua se separaron 500 mL para medir nutrientes totales y otros 500 mL se filtraron a través de filtros GF/F (Whatman), previamente muflados, a fin de estimar la concentración de la MODC (color del agua) y la concentración de nutrientes disueltos. Un volumen entre 1 y 2 litros se utilizó para la determinación de Cl a y un volumen equivalente para el cálculo de STS.

La MOD fue caracterizada espectrofotométricamente por absorbancias en el espectro UV-visible (290-800 nm). A partir de los espectros de absorción se calcularon tres parámetros ópticos: la concentración del COD (Morris et al., 1995), a_{440} y la pendiente espectral entre 275 y 295 nm ($S_{275:295}$) (Helms et al., 2008).

La absorbancia fue determinada sobre el agua del lago filtrada por GF/F, con un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453E, utilizando una cubeta de cuarzo de 10 cm de longitud de paso de luz y midiendo un espectro completo desde 200 hasta 800 nm con intervalos de 1 nm. Se utilizó agua destilada como blanco. La absorbancia promedio entre 700 y 800 nm fue sustraída en cada espectro para corregir el efecto de línea de base del instrumento (Green y Blough, 1994; Helms et al., 2008). Luego, las unidades de absorbancia fueron convertidas a coeficientes de absorción como sigue:

$$a = 2,303 A/l$$

donde a = coeficiente de absorción Neperiana (m^{-1}), A = absorbancia, y l = largo de la cubeta (m). La concentración del COD se estimó aplicando el modelo de regresión propuesto por Morris et al. (1995), a partir del espectro completo de absorbancia (290-800 nm) de la muestra disuelta. La absorbancia a 440 nm (a_{440}) fue utilizada como estimadora de la concentración de MODC (Reche et al., 1999). La pendiente espectral del intervalo de 275-295 nm ($S_{275:295}$) fue aplicada como un



estimador del tamaño molecular de la MOD y fue calculado mediante el ajuste de los espectros transformados por logaritmo a una regresión lineal, y es proporcionada como un número positivo de acuerdo con una convención matemática (Helms et al., 2008). En este contexto, las pendientes están inversamente relacionadas con el tamaño molecular de la MOD (Helms et al., 2008).

La concentración de nutrientes de la fracción total, como fósforo total (PT) y nitrógeno total (NT), fueron determinados directamente sobre la muestra del lago no filtrada. Las fracciones de nutrientes disueltas como fósforo disuelto total (PDT), fósforo reactivo soluble (PRS) y nitrógeno disuelto total (NDT) fueron medidas sobre las muestras filtradas. Para las determinaciones de PT y PDT, las muestras fueron digeridas con persulfato de potasio a 125°C y 1,25 atm de presión durante 1 hora (APHA, 1989). Las concentraciones fueron estimadas a través del método de reducción con ácido ascórbico y molibdato de amonio (complejo amarillo) y lectura espectrofotométrica (APHA, 1989). En el caso del PRS la concentración fue obtenida a través de la reducción con ácido ascórbico y molibdato de amonio sin previa digestión (APHA, 1989). Para las determinaciones de NT y NDT, las muestras fueron digeridas con una solución de persulfato de potasio en hidróxido de sodio 1,5 N a 125°C y 1,5 atm durante 1 hora. Posteriormente, las muestras fueron acidificadas con ácido sulfúrico concentrado. Las concentraciones de NT y NDT fueron estimadas a partir de la lectura espectrofotométrica de las muestras acidificadas (Bachmann y Canfield, 1996).

Para determinar la concentración de Cl *a*, se realizó una extracción de los pigmentos retenidos en los filtros utilizando como solvente etanol 90 % (Nusch, 1980). La concentración de Cl *a* corregida por feopigmentos fue determinada por espectrofotometría antes y después de acidificar el extracto con ácido clorhídrico 0,1 N.

La concentración de STS fue medida por diferencia entre el peso final y el inicial de los filtros, los cuales fueron secados a 110°C hasta peso constante (APHA, 1989).



II-3-3. Caracterización óptica de los lagos

El coeficiente de atenuación de la radiación vertical difusa (Kd_{λ}) fue calculado a partir del modelo desarrollado por Kirk (1981, 1984, 1994) en base a las simulaciones de Monte Carlo. Este modelo calcula propiedades ópticas aparentes en función de propiedades ópticas inherentes. Para el cálculo de los Kd_{λ} se utilizaron los valores de a_t , b_t y μ_0 : a_t es el coeficiente de absorción total determinado como la suma de los espectros de absorción del agua pura, de la MODC y de la CI a; b_t es el coeficiente de la dispersión total determinado como la suma de los espectros de dispersión del agua pura y de los STS; μ_0 es calculado a partir del ángulo zenital utilizando la Ley de Snell (Belzile et al., 2002); el ángulo zenital fue calculado a partir de la fecha, la hora y la latitud según Kirk (1994); los parámetros g_1 y g_2 son dos valores constantes (Belzile et al., 2002). Se determinó el Kd para cada nm (λ) del espectro utilizando la siguiente fórmula:

$$Kd_{\lambda} = \frac{1}{\mu_0} (a_{t\lambda}^2 + (g_1 \cdot \mu_0 - g_2) \cdot a_{t\lambda} \cdot b_{t\lambda})^{0,5}$$

Los coeficientes correspondientes a los colores azul (Kd_{AZUL}), verde (Kd_{VERDE}) y rojo (Kd_{ROJO}) fueron calculados a 440 nm, a 550 nm y a 675 nm, respectivamente (Kirk, 2011). Para el cálculo del Kd_{RFA} se integraron los Kd_{λ} de acuerdo con Belzile et al. (2002).

El cálculo de la irradiancia media instantánea en la columna de agua (I_m) fue estimado siguiendo la fórmula propuesta por Helbling et al. (1994):

$$I_m = I_0 \frac{1 - e^{-Kd_{RFA} \cdot Z}}{Kd_{RFA} \cdot Z}$$

donde I_0 es la irradiancia luminica (RFA) en la superficie del lago; Kd_{RFA} es el coeficiente de la atenuación espectral de la Radiación Fotosintéticamente Activa; Z : profundidad de la capa de mezcla. Los valores de I_0 fueron obtenidos a partir de un radiómetro GUV 511 (Biospherical Instruments, Inc., San Diego, Estados Unidos), ubicado en el Laboratorio de Fotobiología (INIBIOMA, Bariloche). En los momentos cuando el lago se encontró estratificado los valores de la I_m fueron



calculados utilizando los valores de profundidad (Z) correspondientes al epilimnion.

II-3-4. Determinación de la abundancia de los distintos organismos

Para estimar la abundancia del picoplancton, bacterias heterotróficas, picocianobacterias y picoeucariotas (a partir de ahora: BACT, PCY y PEUK, respectivamente) antes de transcurridas las 24 hs de fijación, un volumen de entre 5 y 10 mL de muestra fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, concentración final $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), como colorante para la tinción del ADN de los organismos, según la metodología de Porter y Feig (1980), y luego filtrados a través de membranas de policarbonato negras de $0,22 \mu\text{m}$ de poro (MSI). Para la enumeración de los organismos $<20 \mu\text{m}$ (nanoplancton), algas autotróficas, flagelados mixotróficos y heterotróficos (a partir de ahora: AAUT, FMIX y FHET, respectivamente) se filtraron entre 10 y 20 mL de muestra teñidas con DAPI a través de membranas de policarbonato negras de $0,8 \mu\text{m}$ de poro (MSI). Todos los filtros fueron montados sobre portaobjetos con una gota de aceite de inmersión específico para epifluorescencia (Immersol 518 F) y almacenados a -20°C hasta su posterior recuento.

Para la cuantificación de las células, las muestras fueron inspeccionadas a $1000\times$ de magnificación utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX50, Japón) equipado con una lámpara HBO 50W, y un set de filtros para excitación en luz azul (BP 420–480 nm, BA 515 nm), excitación en luz verde (BP 480-550 nm, BA 590 nm) y excitación en UV (BP 330-385 nm, BA 420 nm). Utilizando el filtro de luz azul se identificaron y cuantificaron los organismos pigmentados, debido a que la Cl a autofluoresce en color rojo con esta luz (PCY, PEUK, AAUT y FMIX). Mediante el filtro de luz verde se identificaron y cuantificaron los organismos pigmentados que presentan ficobilinas, debido a su autofluorescencia en color anaranjado fluorescente (PCY y Cryptophyceae). A través del filtro de UV, se identificaron los núcleos de los organismos eucariotas y se cuantificaron los organismos procariontes heterotróficos (BACT). Particularmente,



los dinoflagelados pigmentados fueron distinguidos por la presencia de un núcleo característico con cromosomas condensados y por la morfología general.

La abundancia fue calculada como cél mL^{-1} para cada profundidad en el perfil vertical y como abundancia promedio en la columna de agua por fecha. En todos los casos el error de recuento fue menor al 20 % y siempre se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$e = [(s/\sqrt{n} \times t(\alpha, 1 - n))/X] \times 100\%$$

Donde s es el desvío estándar, n es el número de campos, X es la media y t es el valor de t-Student con $\alpha = 0,05$.

El número de células contadas osciló entre 400-600 para BACT, 100-200 para PCY, 50-150 para PEUK y 50-100 para los organismos nanoplantónicos.

El recuento de los organismos microfitoplanctónicos ($>20 \mu\text{m}$) fue realizado siguiendo la técnica de Utermöhl (Utermöhl, 1958). Las muestras fueron contadas bajo microscopio invertido (Olympus CKX41, Japón), utilizando cámaras de decantación de 50 mL. El microfitoplancton fue enumerado por escaneo de la superficie entera de la cámara de decantación a $400\times$. El error de los recuentos fue inferior al 20 % y se estimó de acuerdo a Venrick (1978). La abundancia fue calculada como cél mL^{-1} para cada profundidad en el perfil vertical y también como el valor promedio de la columna de agua por fecha.

Las algas fueron identificadas taxonómicamente utilizando la siguiente bibliografía: Huber-Pestalozzi (1941, 1968, 1983), Komárek y Komarkova (2003), Shubert (2003), Gerroth (2003), Stoermer y Julius (2003), Kingstom (2003), Kociolek y Spaulding (2003 a y b), Krugrens (2003). Posteriormente su clasificación taxonómica más actualizada fue confirmada utilizando la base de datos provista por AlgaeBase (Guiry y Guiry, 2013).

Para la cuantificación de los ciliados se siguió la misma técnica que para el recuento del microfitoplancton bajo microscopio invertido, por escaneo de la superficie completa de la cámara a $100\times$. La identificación de los ciliados fue realizada siguiendo a Modenutti y Pérez (2001).



Para determinar la abundancia de los rotíferos, se cuantificaron alícuotas de 1 mL de una muestra concentrada. El recuento se llevó a cabo en cámaras Sedgwick–Rafter bajo microscopio (Olympus BX50, Japón). En el caso de los crustáceos (cladóceros y copépodos), para cada muestra se cuantificaron alícuotas de 5 mL bajo microscopio estereoscópico (Olympus SZ61) en cámaras de Bogorov. El número de alícuotas examinado en cada caso fue determinado de acuerdo a las recomendaciones de Cassie (en Edmondson y Winberg, 1971) con el objeto de mantener el error de las estimaciones por debajo del 10 %.

II-3-5. Cálculos de la biomasa de los organismos

Se determinó el tamaño promedio de las BACT para cada lago, sobre la medición de 400 células en total, mediante el análisis de imágenes (Image Pro Plus 4.5) obtenidas a partir de los preparados teñidos con DAPI en cada fecha de muestreo. El biovolumen de las bacterias fue obtenido aplicando la metodología propuesta por Massana et al. (1997a). La biomasa bacteriana fue calculada utilizando la relación carbono-volumen propuesta por Norland (1993) derivada de los datos de Simon y Azam (1989):

$$\text{pg C cell}^{-1} = 0,12 \text{ pg } (\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1})^{0,7}$$

Las PCY y los PEUK fueron medidos con la misma metodología que las BACT, a partir de imágenes obtenidas de las muestras. Para cada uno de estos grupos, se midieron 150 células y se calculó un valor promedio de las longitudes máxima y mínima. Para las PCY se utilizó un factor de conversión de 237 fg C μm^{-3} siguiendo a Worden et al. (2004). En el caso de los PEUK se utilizó un factor de conversión propuesto por Menden-Deuer y Lessard (2000):

$$\text{pg C cell}^{-1} = 0,216 \text{ pg } (\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1})^{0,939}$$

Por lo menos 30 células de cada taxón de organismos nanofitoplanctónicos fueron medidas a partir del análisis de imágenes obtenidas de preparados teñidos con DAPI. Al menos 30 organismos de cada taxa del microfitoplancton fueron medidos bajo microscopio invertido con ocular micrométrico. El biovolumen (μm^3)



de cada taxón nanofitoplanctónico y microfitoplanctónico fue estimado aplicando los modelos geométricos de Sun y Liu (2003). Para las dos fracciones del fitoplancton se utilizaron los factores de conversión de volumen a carbono propuestos por Menden-Deuer y Lessard (2000):

$$\begin{aligned} \text{Dinoflagelados:} & \quad \text{pg C cell}^{-1} = 0,760 \text{ pg } (\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1})^{0,819} \\ \text{Diatomeas:} & \quad \text{pg C cell}^{-1} = 0,288 \text{ pg } (\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1})^{0,811} \\ \text{Otras algas:} & \quad \text{pg C cell}^{-1} = 0,216 \text{ pg } (\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1})^{0,939} \end{aligned}$$

Los FHET fueron medidos utilizando la misma metodología que para el nanofitoplancton, 50 células fueron medidas para cada categoría de tamaño (< y >5 μm) de este grupo. El biovolumen fue calculado aproximando la forma de la célula a un esferoide (Sun y Liu, 2003). El volumen celular promedio de cada grupo de tamaño de los FHET fue convertido a carbono asumiendo un factor de conversión de 0,22 pg C μm^{-3} siguiendo a Børsheim y Bratbak (1987).

Al menos 30 células fueron medidas para cada especie de ciliado bajo microscopio invertido con ocular micrométrico. El biovolumen fue estimado aplicando los modelos geométricos de Sun y Liu (2003). Para la conversión a carbono se utilizó el factor 110 fg C μm^{-3} propuesto por Woelfl y Geller (2002).

En el caso de los rotíferos, copépodos y cladóceros (zooplancton), se midió la longitud total 30 individuos de cada especie utilizando un microscopio con ocular micrométrico. Para la transformación de las tallas medidas a peso seco, se emplearon las fórmulas volumétricas de Ruttner-Kolisko (1977) para los rotíferos, y las fórmulas de Dumont et al. (1975) y de Botrell et al. (1976) para los crustáceos. Los valores de biomasa para toda la comunidad fueron expresados como μg peso seco L^{-1} . Se asumió que el contenido de carbono equivale al 48 % del peso seco, tanto para los rotíferos (Rossa et al., 2007) como para los microcrustáceos (Andersen y Hessen, 1991).



II-3-6. Análisis estadísticos

Se analizó la variación en profundidades para cada variable mediante un ANOVA de dos vías. Luego, para cada variable se hicieron ANOVAs de medidas repetidas, analizando la variación entre fechas y lagos. Cuando la interacción entre variables (fechas y lagos) fue significativa, se utilizó el test Tukey como *test a posteriori*. Se utilizaron análisis de regresión para analizar la relación entre las variables físicas y químicas entre sí y con las variables biológicas, así como para analizar la sincronía de las variables entre los lagos. Se define como “*sincronía*” a la variación simultánea de las variables entre los lagos, hecho que se relaciona con el accionar de factores externos a los ambientes que producen la fluctuación de estas variables.



II-4. Resultados

II-4-1. Variables físico-químicas y Cl a

La temperatura del agua presentó un patrón similar entre los lagos, no habiendo diferencias significativas entre ellos ($F = 1,11$, $p = 0,294$). En ambos lagos las temperaturas mínimas fueron obtenidas entre el final de otoño y el final del invierno. El valor promedio de la temperatura en la columna de agua encontrado en el lago Escondido en esas fechas fue $5,0^{\circ}\text{C}$ y en el lago Morenito fue $5,1^{\circ}\text{C}$ (Figura II-5). Como es esperable, las temperaturas máximas fueron obtenidas durante el verano. Promediando las temperaturas correspondientes a enero de 2010 y enero de 2011 para el lago Escondido se obtuvo un valor de $19,7^{\circ}\text{C}$, mientras que para Morenito se obtuvo una temperatura promedio de $17,7^{\circ}\text{C}$ (Figura II-5). Es destacable que durante el verano de 2010 ambos lagos mostraron una leve estratificación a 6 m de profundidad, mientras que durante la primavera de 2010, el lago Escondido mostró una leve estratificación primero a 6 m y luego a 3 m (Figura II-5). El comportamiento de esta variable fue fuertemente sincrónico entre los dos lagos (Figura II-6).

La conductividad presentó valores similares entre ambos lagos, aunque fue significativamente mayor en el lago Morenito que en el Escondido durante todo el año ($F = 480,06$, $p < 0,001$). El valor promedio anual en el lago Escondido fue de $63 \mu\text{S cm}^{-1}$, mientras que el valor promedio para el Morenito fue de $70 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Figura II-5). Las fechas ($F = 24,42$, $p < 0,001$) y la interacción entre los dos factores (lagos y fechas) también fue significativa ($F = 5,86$, $p < 0,001$; Figura II-5). El comportamiento sincrónico entre los dos lagos se observó claramente en el caso de la conductividad (Figura II-6).

Los valores de STS fueron similares entre los lagos, presentando los máximos valores hacia finales del verano (Figura II-5).

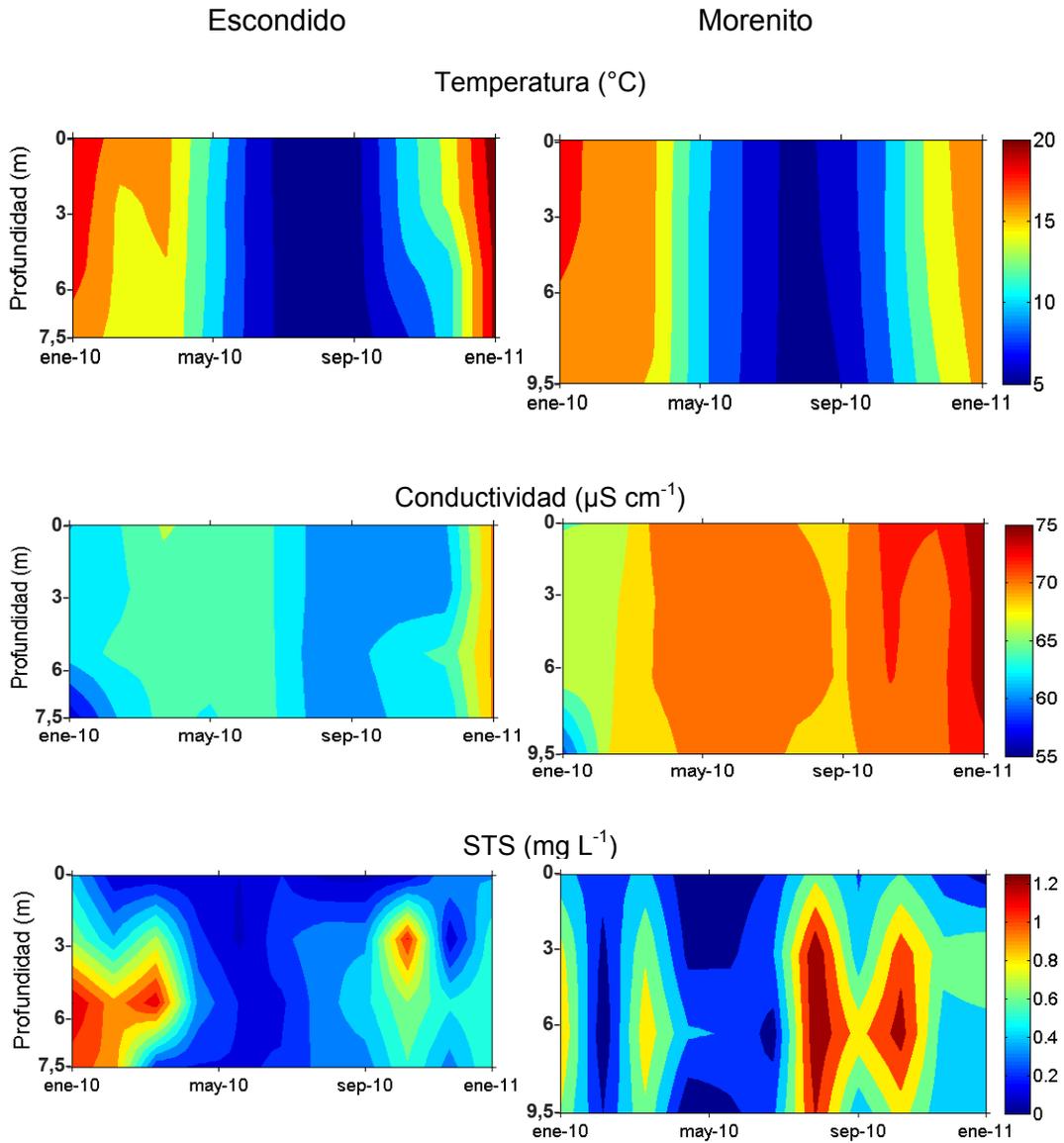


Figura II-5: Variación temporal y en profundidad de la temperatura, la conductividad y los STS en ambos lagos. La escala de la variable indicada en cada título se encuentra a la derecha de los gráficos para cada fila.

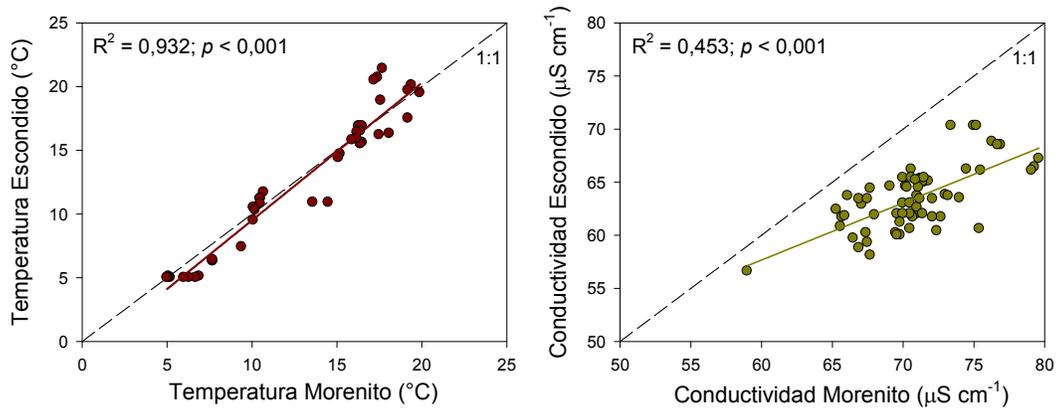


Figura II-6: Sincronía entre los lagos en la variación de la temperatura y de la conductividad.

Las concentraciones de oxígeno disuelto fueron similares en ambos lagos y estuvieron siempre próximas a los niveles de saturación. Los valores promedio anuales fueron de 10,8 y 10,9 mg L^{-1} para Escondido y Morenito, respectivamente. Los valores promedio de pH fueron de 7,3 para ambos lagos.



Tabla II-1. Valores promedio, desvío estándar (DE) y rango (mínimos y máximos) de las variables físico-químicas y de la concentración de clorofila *a* (Cl *a*) de los dos lagos durante todo el período de muestreo. *Referencias:* STS: sólidos totales en suspensión; Kd: coeficiente de atenuación de la radiación vertical difusa; RFA: radiación fotosintéticamente activa; Im: irradiancia media de la columna de agua; COD estimado: carbono orgánico disuelto; S₂₇₅₋₂₉₅: pendiente espectral del intervalo de 275-295 nm, inversamente proporcional al tamaño molecular de la MOD; PT: fósforo total; PDT: fósforo disuelto total; PRS: fósforo reactivo soluble; NT: nitrógeno total; NDT: nitrógeno disuelto total. Las variables que presentan diferencias significativas entre los lagos están indicadas con *.

	Lago Escondido		Lago Morenito	
	Promedio ± DE	Rango	Promedio ± DE	Rango
Temperatura (°C)	12,6 ± 5,4	5,0 - 21,4	12,8 ± 4,9	5,0 - 19,9
Conductividad (µS cm ⁻¹) *	64 ± 3	57 - 70	70 ± 3	59 - 75
pH	7,3 ± 0,4	6,4 - 7,8	7,3 ± 0,5	6,5 - 8,0
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	10,9 ± 1,4	8,7 - 12,5	10,9 ± 1,5	9,0 - 13,0
STS (mg L ⁻¹)	0,4 ± 0,4	0,1 - 1,6	0,5 ± 0,4	0,1 - 1,4
COD estimado (mg L ⁻¹) *	4,1 ± 0,4	3,4 - 5,2	2,3 ± 0,4	1,9 - 3,3
Color del agua (a ₄₄₀ , m ⁻¹) *	1,29 ± 0,23	0,87 - 1,76	0,50 ± 0,13	0,28 - 0,89
S ₂₇₅₋₂₉₅ (10 ⁻³ nm ⁻¹) *	17,05 ± 0,98	15,50 - 19,20	20,69 ± 1,23	17,90 - 23,00
Kd _{RFA} (m ⁻¹) *	0,871 ± 0,278	0,496 - 1,365	0,592 ± 0,219	0,308 - 0,924
Kd _{AZUL} (m ⁻¹)	2,546 ± 1,038	1,026 - 4,459	1,220 ± 0,477	0,566 - 1,997
Kd _{VERDE} (m ⁻¹)	0,746 ± 0,348	0,265 - 1,348	0,468 ± 0,263	0,200 - 1,040
Kd _{ROJO} (m ⁻¹)	1,030 ± 0,426	0,495 - 1,919	1,085 ± 0,422	0,594 - 2,026
Im (µmol m ⁻² s ⁻¹)	151,2 ± 81,7	34,9 - 252,8	192,2 ± 98,8	47,1 - 393,8
PT (µg L ⁻¹) *	8,5 ± 3,5	3,5 - 17,7	9,1 ± 2,7	4,3 - 17,1
PDT (µg L ⁻¹) *	5,6 ± 2,2	2,7 - 12,5	5,1 ± 1,6	2,4 - 9,4
PRS (µg L ⁻¹) *	3,4 ± 1,4	1,1 - 6,7	2,5 ± 1,1	0,1 - 5,1
NT (µg L ⁻¹) *	401,6 ± 91,1	270,1 - 623,9	447,9 ± 117,4	246,6 - 765,4
NDT (µg L ⁻¹)	345,0 ± 79,4	246,0 - 578,0	338,2 ± 87,5	207,2 - 564,3
Cl <i>a</i> (µg L ⁻¹)	1,2 ± 0,6	0,5 - 3,3	1,2 ± 0,4	0,6 - 2,4



La concentración estimada de COD reveló que el valor promedio en la columna de agua y a lo largo del año fue aproximadamente el doble en el lago Escondido que en el Morenito, con valores de 4,1 y 2,3 mg L⁻¹, respectivamente (Tabla II-1; Figura II-7). Se encontraron diferencias significativas entre los lagos, las fechas y la interacción entre estas variables ($F = 6814,9$, $p < 0,001$; $F = 137,3$, $p < 0,001$; $F = 14,7$, $p < 0,001$).

El color del agua presentó intensidades casi tres veces mayores en el lago Escondido (promedio = 1,29 m⁻¹) que en el lago Morenito (promedio = 0,50 m⁻¹) (Tabla II-1; Figura II-7), presentando la mayor intensidad de color hacia fines de invierno y principios de primavera (Figura II-7). Notablemente, en ambos lagos se observó un incremento del color del agua hacia fines del verano (marzo de 2010) (Figura II-7). Es importante destacar que a pesar de presentar valores absolutos distintos [(lagos) $F = 3131,4$, $p < 0,001$; (fechas): $F = 55,1$, $p < 0,001$; (interacción) $F = 12,4$, $p < 0,001$], ambos lagos mostraron fluctuaciones estacionales sincrónicas (Figura II-8).

La pendiente $S_{275-295}$ fue diferente entre los lagos, siendo siempre menor en el Escondido (promedio = 17,05 10⁻³ nm⁻¹) que en el Morenito (promedio = 20,69 10⁻³ nm⁻¹) ($F = 701,7$, $p < 0,001$) (Tabla II-1; Figura II-7). Sin embargo, es destacable que la variación de este parámetro a lo largo del año ($F = 18,6$, $p < 0,001$) fue sincrónica entre los lagos (Figura II-8). En general, se observó que la variación fue inversa a la del color, lo cual indica una relación directa entre el color y el tamaño molecular.

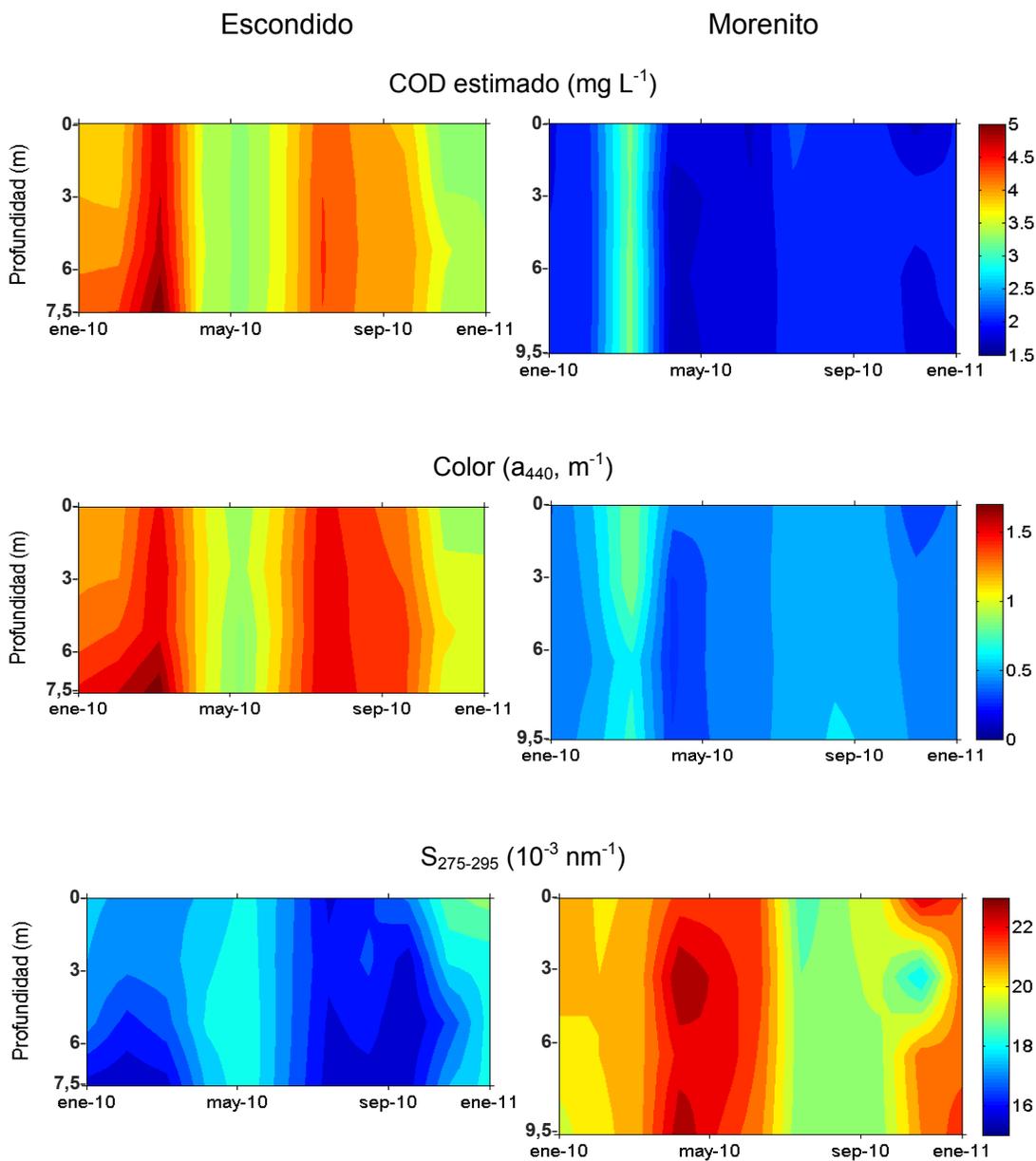


Figura II-7: Variación de la concentración del carbono orgánico disuelto (COD) estimado, del color del agua y de la pendiente $S_{275-295}$ de la MOD, en la columna de agua a lo largo del año de muestreo en ambos lagos. Los valores de la pendiente representan una relación inversa con el tamaño molecular (i.e. a mayor valor de la pendiente menor tamaño molecular de la MOD). La escala de la variable indicada en cada título se encuentra a la derecha de los gráficos para cada fila.

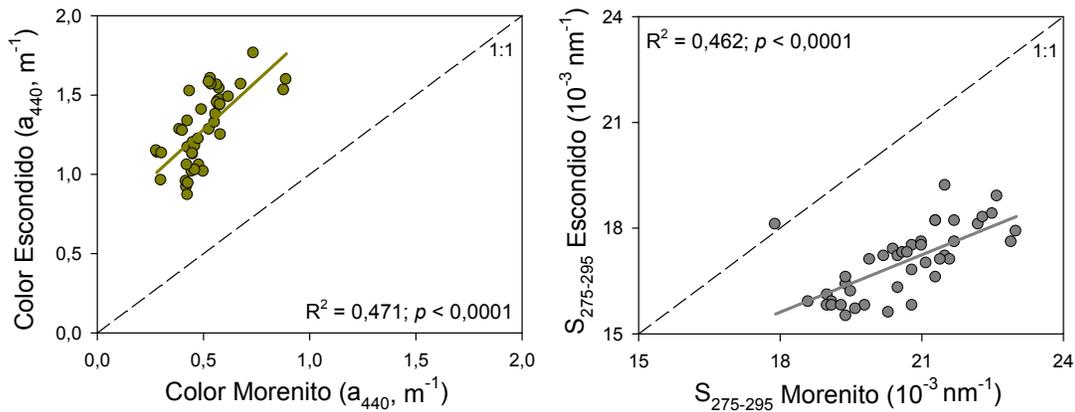


Figura II-8: Sincronía entre los lagos en la variación del color del agua y de la pendiente $S_{275-295}$, indicando el tamaño molecular de la MOD.

El coeficiente de atenuación de la radiación vertical difusa RFA (Kd_{RFA}) fue mayor en el lago Escondido (promedio = $0,871 m^{-1}$) que en el Morenito (promedio = $0,592 m^{-1}$) durante todo el año (Tabla II-1; Figura II-9, paneles de la izquierda). En ambos lagos se observó un aumento del Kd_{RFA} a final del verano y durante el invierno. El incremento del Kd_{RFA} durante final del verano presentó la misma magnitud que durante el invierno en el lago Morenito, no así en el Escondido. Sin embargo, la intensidad media (Im) de la radiación en la capa de mezcla de la columna de agua, fue similar entre los lagos durante la mayor parte del año (Tabla II-1; Figura II-9, paneles de la izquierda). Durante el verano, ambos lagos estuvieron iluminados hasta el fondo. Sin embargo, durante el invierno ambos lagos presentaron menos del 1 % de la luz en el fondo.

Tal como se observó en otras variables, el Kd_{RFA} y la Im registraron una variación sincrónica entre ambos lagos (Figura II-9, paneles de la derecha). Cabe destacar que en el primer caso los valores estuvieron alejados de la relación 1:1, reafirmando que siempre fueron mayores en el Escondido. Por su parte, los valores de Im fueron levemente mayores en el Morenito en algunos momentos del año (Figura II-9, paneles de la derecha).

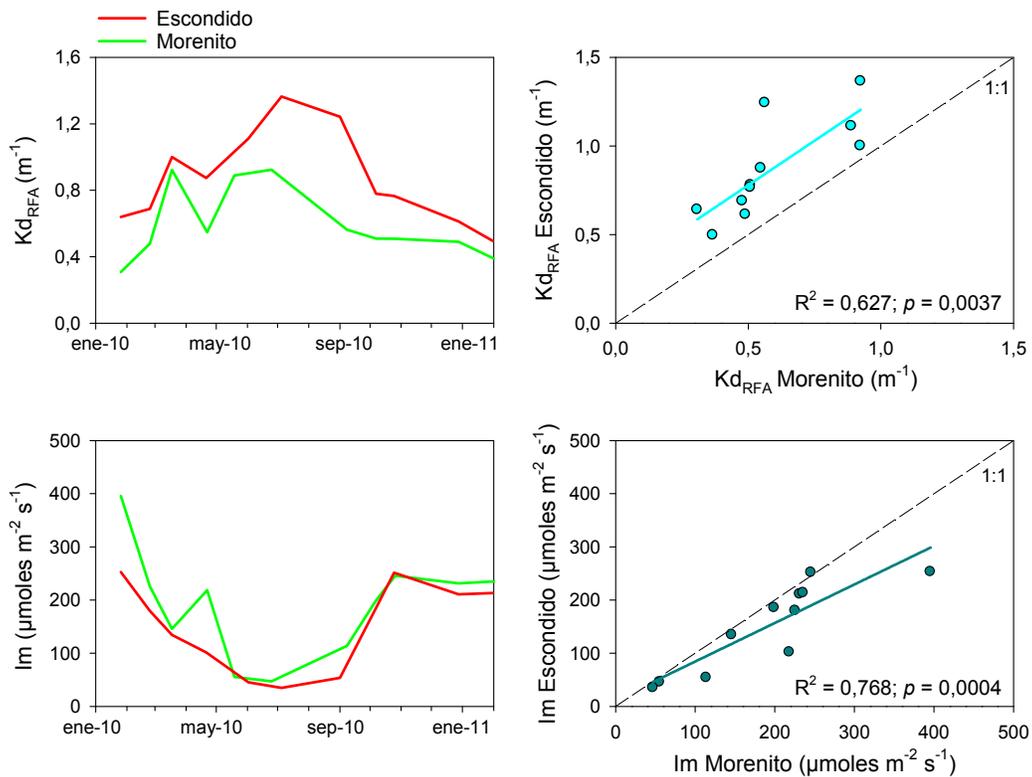


Figura II-9: Los paneles de la izquierda muestran comparativamente la variación del Kd_{RFA} y la Im a lo largo del año para cada lago. Los paneles de la derecha muestran la sincronía de la variación en el Kd_{RFA} y la Im entre los lagos.

La caracterización de la calidad espectral de la luz mostró diferencias entre los ambientes. El Kd_{AZUL} fue siempre mayor en el Escondido que en el Morenito, los mayores valores se presentaron durante el invierno en ambos lagos, aunque esto se observó más pronunciadamente en el primero de éstos (Tabla II-1; Figura II-10, paneles de la izquierda). En el Morenito se observó también un aumento del Kd_{AZUL} a finales del verano. Ambos lagos fueron sincrónicos en la variación de este parámetro, aunque se observó que el aumento de éste fue siempre más importante en Escondido (Figura II-10, paneles de la derecha). El Kd_{VERDE} fue en general mayor en el Escondido que en el Morenito, a excepción de una fecha a finales del verano, donde los valores de ambos lagos fueron similares entre los lagos (Tabla II-1; Figura II-10). La regresión entre los valores de Kd_{VERDE} de ambos lagos presentó una pendiente igual a 1, indicando una variación sincrónica exacta entre ellos (i.e. que impacta con igual magnitud en ambos lagos). Es destacable



que la curva se aleja por encima de la relación 1:1 entre los lagos indicando que comparativamente la atenuación de esta luz es mayor en el Escondido que en el Morenito. El Kd_{ROJO} fue muy semejante entre los lagos durante todo el año (Tabla II-1; Figura II-10, paneles de la izquierda), y este parámetro también varió sincrónicamente entre los ambientes (Figura II-10, paneles de la derecha).

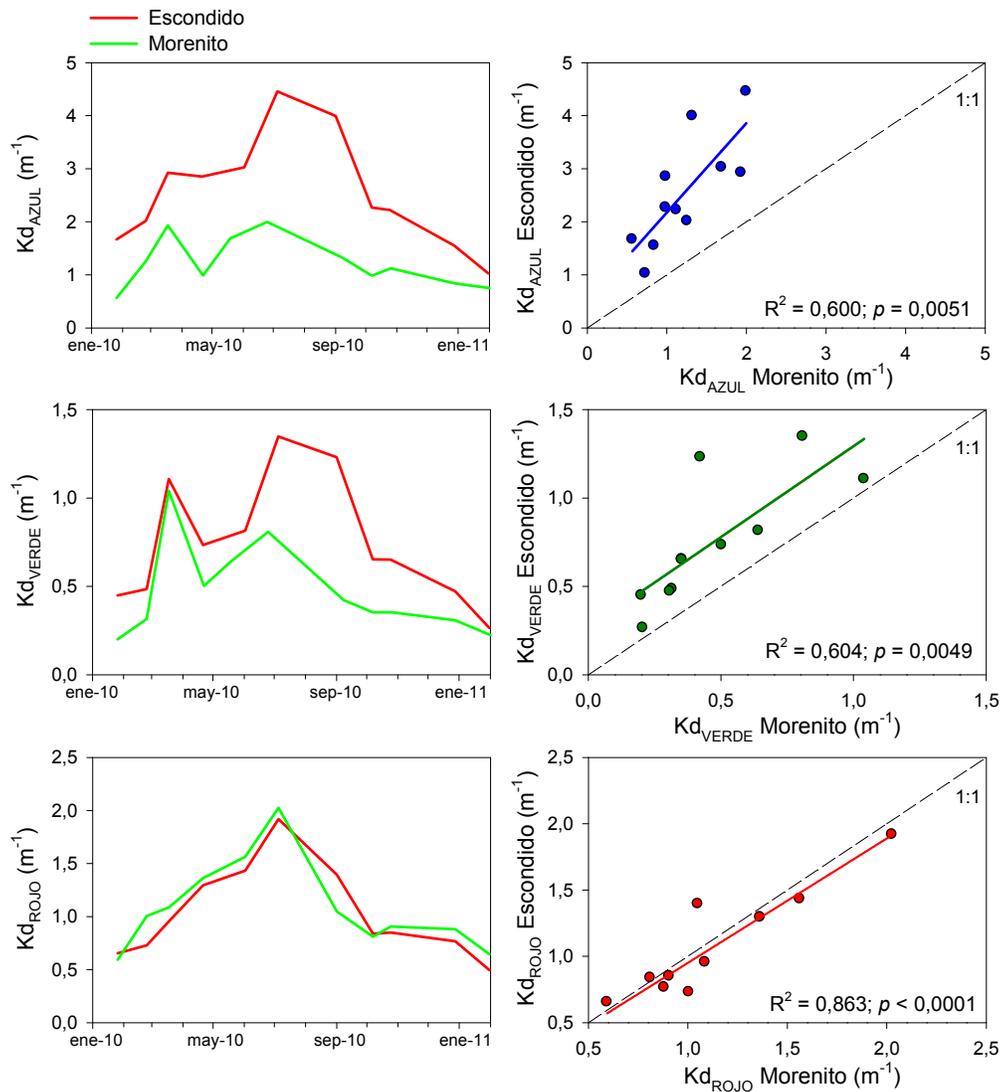


Figura II-10: Variación temporal de los coeficientes de atenuación de los colores: azul (Kd_{AZUL}), verde (Kd_{VERDE}) y rojo (Kd_{ROJO}) comparada entre ambos lagos (paneles de la izquierda). Sincronía en la variación de los Kd_{AZUL} , Kd_{VERDE} y Kd_{ROJO} entre los lagos Escondido y Morenito (paneles de la derecha).



La concentración de PT, aunque con valores equivalentes, fue significativamente diferente entre lagos, fechas y en la interacción de los dos factores ($F = 7,25$, $p = 0,009$; $F = 18,56$, $p < 0,001$; $F = 3,45$, $p = 0,002$, respectivamente) (Figura II-11). El lago Morenito (promedio = $9,1 \mu\text{g L}^{-1}$) presentó concentraciones levemente mayores de PT que el Escondido (promedio = $8,5 \mu\text{g L}^{-1}$) durante la mayor parte del año. Las fracciones disueltas del fósforo, PDT y PRS mostraron ser estadísticamente diferentes entre los lagos y las fechas, así como la interacción de estos dos factores (*PDT* (lagos): $F = 5,66$, $p = 0,021$; (fechas) $F = 28,59$, $p < 0,001$; (interacción) $F = 3,04$, $p = 0,005$; *PRS* (lagos): $F = 45,47$, $p < 0,001$; (fechas) $F = 16,66$, $p < 0,001$; (interacción) $F = 16,19$, $p = 0,005$) (Tabla II-1; Figura II-11). A pesar de estas diferencias significativas, el valor promedio anual de PDT fue sólo levemente más elevado en el Escondido ($5,6 \mu\text{g L}^{-1}$) que en el Morenito ($5,1 \mu\text{g L}^{-1}$). En el caso del PRS, la concentración promedio anual fue siempre relativamente baja: $3,37$ y $2,53 \mu\text{g L}^{-1}$ para los lagos Escondido y Morenito, respectivamente. En esta fracción la relación se invirtió, ya que el lago Escondido presentó las mayores concentraciones de PRS durante la mayoría de las fechas estudiadas. Es de destacar el incremento observado en la concentración de las distintas fracciones de fósforo a finales del verano (Figura II-11).

La concentración del NT, como en el caso del fósforo presentó valores equivalentes, pero fue significativamente diferente entre los lagos ($F = 6,32$, $p = 0,015$). El lago Escondido presentó un valor promedio de $401,6 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que el Morenito presentó una concentración promedio de $447,9 \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las fechas, ni en la interacción entre estos dos factores ($F = 0,85$, $p = 0,566$; $F = 1,08$, $p = 0,389$) (Tabla II-1; Figura II-11). Por su parte, en el caso de la concentración de NDT, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los factores (Lago: $F = 0,21$, $p = 0,643$; Fechas: $F = 0,59$, $p = 0,796$; Interacción: $F = 0,86$, $p = 0,560$). El valor promedio anual de esta fracción correspondiente a Escondido y Morenito fue de $341,6$ y de $334,4 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Los mayores valores de concentración de nitrógeno en el lago Morenito fueron observados durante el invierno, mientras que en el lago Escondido fueron observados durante el verano tardío y principio del otoño (Figura II-11).

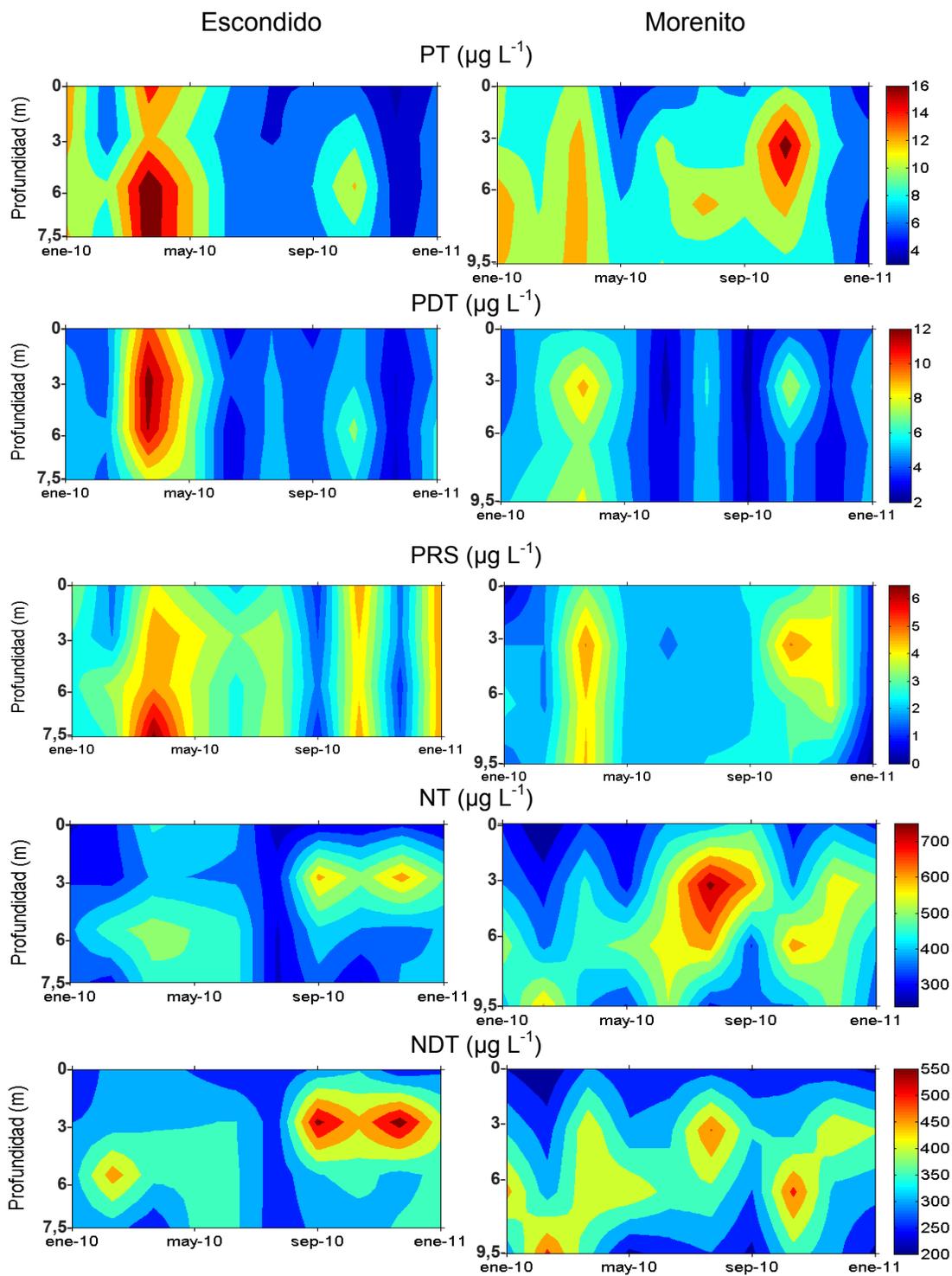


Figura II-11: Variación temporal y vertical de cada fracción del fósforo y nitrógeno determinada en cada fecha de muestreo. *Referencias:* PT: fósforo total; PDT: fósforo disuelto total; PRS: fósforo reactivo soluble; NT: nitrógeno total; NDT: nitrógeno disuelto total. La escala de la variable indicada con color se encuentra a la derecha de los gráficos para cada fila.



La concentración promedio de *Cl a* fue similar entre los lagos, siendo 1,24 para Escondido y 1,27 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Morenito. No se hallaron diferencias significativas entre estos valores ($F = 0,02$, $p = 0,899$; Tabla II-1). A pesar de la similitud entre las concentraciones de *Cl a*, estos lagos presentan fluctuaciones en la concentración a lo largo del tiempo, y esta variación fue diferente en cada uno de los lagos, tal como lo indica la interacción entre el factor lago y el factor fechas ($F = 2,52$, $p = 0,012$; $F = 6,07$, $p < 0,001$, respectivamente; Figura II-12). Durante el verano y principio del otoño, el lago Escondido mostró la máxima concentración de *Cl a*, superando la concentración alcanzada por el lago Morenito. Esta relación se invirtió durante el invierno y la primavera, cuando el lago Morenito mostró las mayores concentraciones.

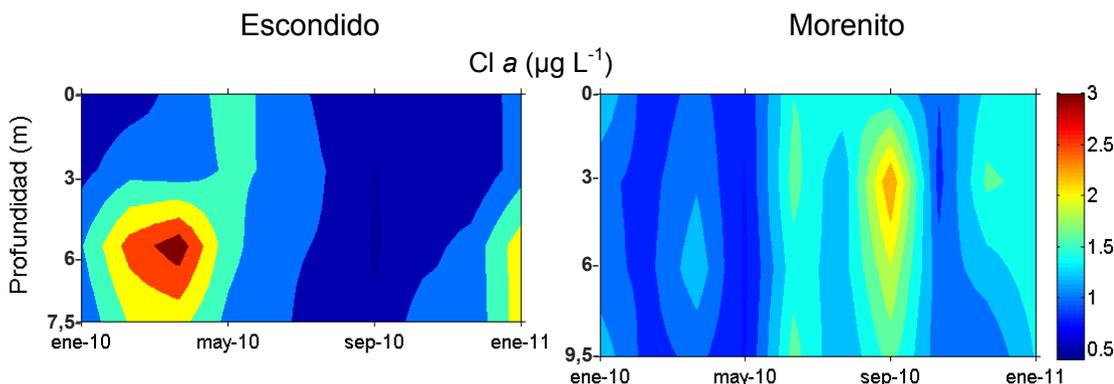


Figura II-12: Variación temporal y vertical de la concentración de clorofila *a* (*Cl a*) determinada en cada fecha de muestreo. La escala de la variable indicada con color se encuentra a la derecha de los gráficos.

II-4-2. Relaciones entre variables físico-químicas y *Cl a*

Se encontró una relación inversa y significativa entre el color del agua y la pendiente $S_{275-295}$ (inversamente relacionada con el tamaño molecular de la MOD) (Figura II-13). Esto confirma una relación directa entre el color y el tamaño molecular de la MOD, indicando que cuanto mayor es el color del agua, mayor es el tamaño molecular que presenta la MOD. En el gráfico se observa que la MOD del Morenito es menos coloreada y presenta menor tamaño molecular que la del Escondido.

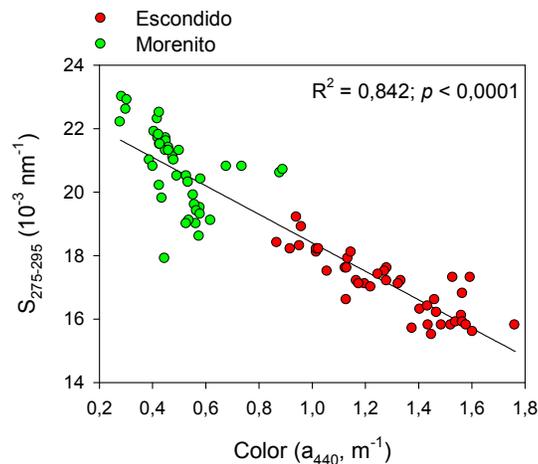


Figura II-13: Relación entre el color del agua y la pendiente $S_{275-295}$ (inversamente proporcional al tamaño molecular de la MOD).

La variación del Kd_{RFA} estuvo significativamente relacionada con las precipitaciones en el lago Escondido. Sin embargo, en el lago Morenito se observó que esta relación fue significativa sólo cuando el análisis se realizó sustrayendo los valores de lluvias y de color correspondientes al mes de marzo de 2010. En tal caso, la variación del Kd_{RFA} fue significativa con las precipitaciones (Figura II-14). Esto indica que este factor externo es uno de los principales influyentes sobre el clima óptico en ambos lagos, debido al ingreso de material alóctono desde la cuenca al lago por escorrentía. El aumento del Kd_{RFA} durante marzo 2010 se observó en ambos lagos, aunque la magnitud del aumento fue más conspicua en el Morenito, igualando la magnitud del aumento debido a las lluvias (Figura II-14). Este muestreo se realizó 20 días después del fuerte terremoto ocurrido en Concepción (Chile) el 27 de febrero de 2010, que alcanzó una intensidad de V a VI (escala Mercalli Modificada) en la ciudad de Bariloche (Franke, 2010).

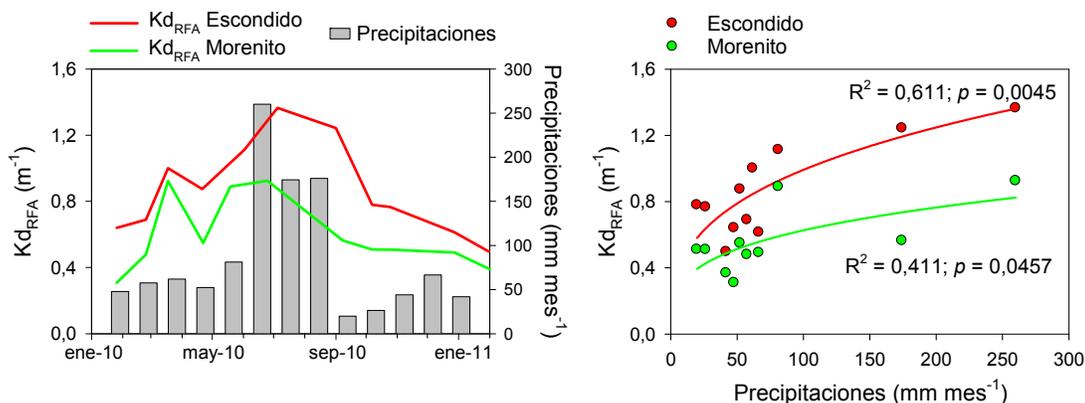


Figura II-14: El panel de la izquierda muestra la variación temporal del Kd_{RFA} y de las precipitaciones en ambos lagos. El panel de la derecha muestra la relación entre estas dos variables. Los valores de precipitaciones fueron extraídos de las publicaciones de la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas en su sitio de Internet (www.aic.gov.ar).

Los valores del cociente Color:Cl *a* fueron mayores en el lago Escondido (promedio anual = $1,33 [m^{-1} (\mu g L^{-1})^{-1}]$) que en el Morenito (promedio anual = $0,43 [m^{-1} (\mu g L^{-1})^{-1}]$) durante todo el año, indicando un mayor grado de aloctonía en el primero de los ambientes (Figura II-15). Por su parte, la relación entre el Color y la Cl *a*, ubica todos los valores del lago Escondido (entre el 0 y 10 %), por encima de los del Morenito (mayoritariamente entre el 10 y el 20 %) (Figura II-16). De acuerdo con la clasificación propuesta por Bade et al. (2007), estos porcentajes indican qué proporción de la MOD del lago es de origen algal. Esta proporción de MOD algal fue siempre mayor en el Morenito.

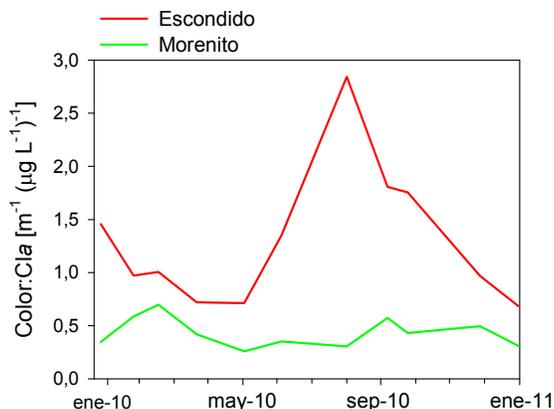


Figura II-15: Variación temporal del cociente Color:Cl *a*, indicando el grado de aloctonía de cada ambiente.

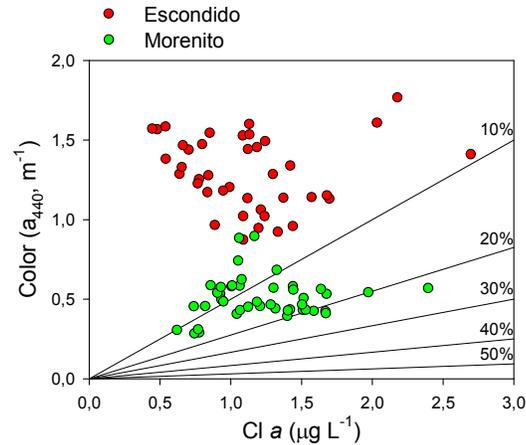


Figura II-16: Porcentaje de MOD de origen algal en función del color y la concentración de Cl a. Esta figura fue adaptada de Bade et al. (2007).

El cociente $K_{d_{ROJO}}/K_{d_{VERDE}}$ fue siempre mayor en el Morenito que en el Escondido, indicando mayor disponibilidad de luz verde en el primero de estos lagos (Figura II-17). La variación de este cociente fue bastante homogénea a lo largo del año, aunque en ambos lagos se observó una reducción brusca de la disponibilidad de luz verde durante el muestreo de marzo 2010.

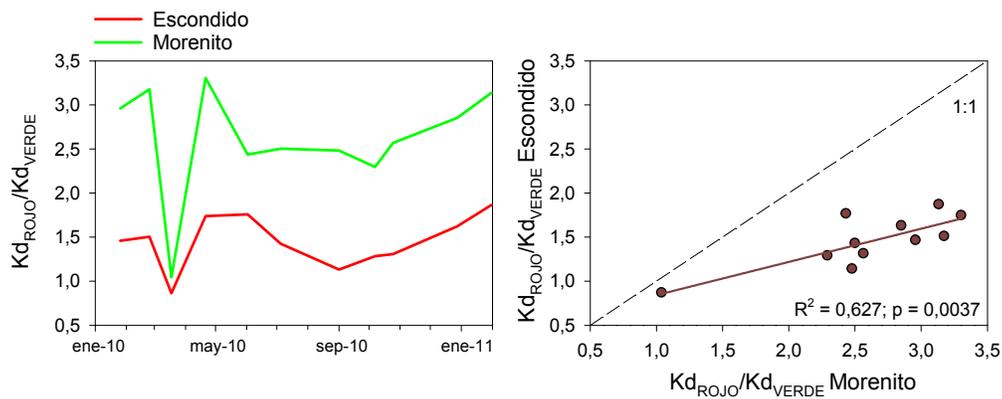


Figura II-17: El panel de la izquierda muestra la variación temporal del cociente $K_{d_{ROJO}}/K_{d_{VERDE}}$ entre los lagos. El cociente indica la disponibilidad de luz verde en el ambiente. El panel de la derecha muestra la sincronización de esta variable entre los lagos.



II-4-3. Dinámica de los organismos

II-4-3-1. Composición, abundancia y biomasa del picoplancton

La comunidad picoplanctónica en estos dos ambientes está compuesta por BACT, PCY y PEUK. Comparando los lagos, el biovolumen de las BACT del lago Escondido no fue significativamente diferente de las del lago Morenito ($0,041 \pm 0,035$ y $0,031 \pm 0,29 \mu\text{m}^3$, respectivamente; $F = 2,97$, $p = 0,08$). Por su parte, la morfología general fue similar entre los lagos y estuvo dominada por células cocoides (Figura II-18.a, b). Las bacterias filamentosas fueron observadas con muy baja abundancia, $<1\%$ durante la mayor parte del año, aunque llamativamente alcanzaron un 3% de la abundancia total durante la primavera en ambos lagos (Figura II-18.c; Tabla II-1).

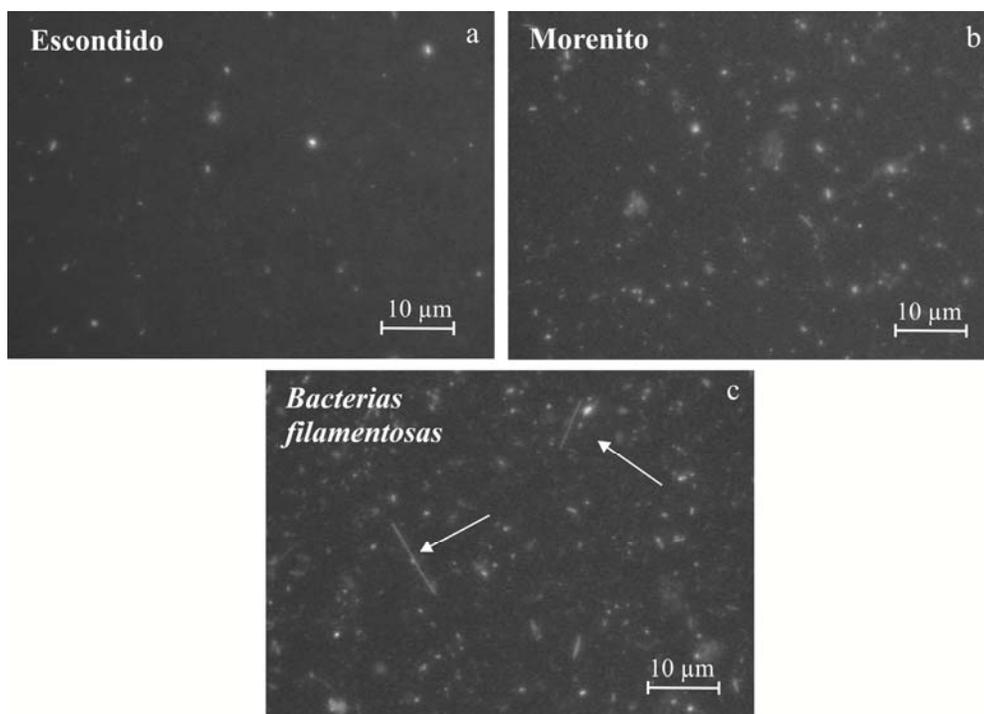


Figura II-18: Fotografías en microscopio de epifluorescencia bajo radiación UV; **a.** BACT del lago Escondido; **b.** BACT del lago Morenito; **c.** BACT filamentosas poco abundantes.

Las PCY fueron un grupo homogéneo constituido por células ricas en ficoeritrina en ambos ambientes, mientras que no se encontraron células ricas en ficocianinas (Figura II-19). Por su parte, el biovolumen que presentaron en el lago



Escondido fue mayor que el de las del Morenito ($0,370 \pm 0,228$ y $0,270 \pm 0,204 \mu\text{m}^3$, respectivamente; $F = 25,05$, $p < 0,001$). En algunas oportunidades se observaron algunos agregados, pero este comportamiento no fue observado comúnmente (Figura II-19.c).

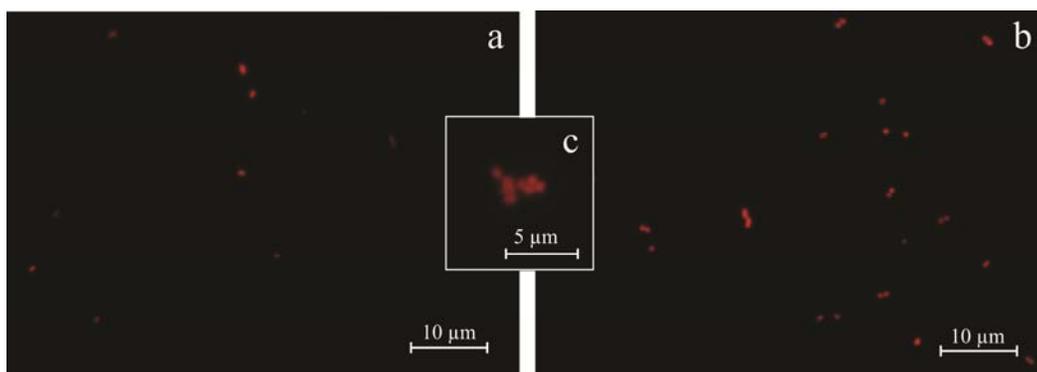


Figura II-19: Fotografías en microscopio de epifluorescencia bajo luz azul; **a.** PCY del lago Escondido; **b.** PCY del lago Morenito; **c.** Agregado de PCY.

Las PEUK fueron las presas de mayor tamaño y en ambos ambientes se pudieron distinguir dos morfotipos. El morfotipo denominado “PEUK 1” presentó una morfología esférica y un biovolumen de $3,05 \pm 1,97 \mu\text{m}^3$ para el Escondido y de $2,96 \pm 1,71 \mu\text{m}^3$ para Morenito (Figura II-20.a). El morfotipo denominado “PEUK 2” presentó una morfología oval a alargada y un biovolumen de $1,09 \pm 0,62 \mu\text{m}^3$ para el Escondido y de $1,03 \pm 0,78 \mu\text{m}^3$ para Morenito (Figura II-20.b).

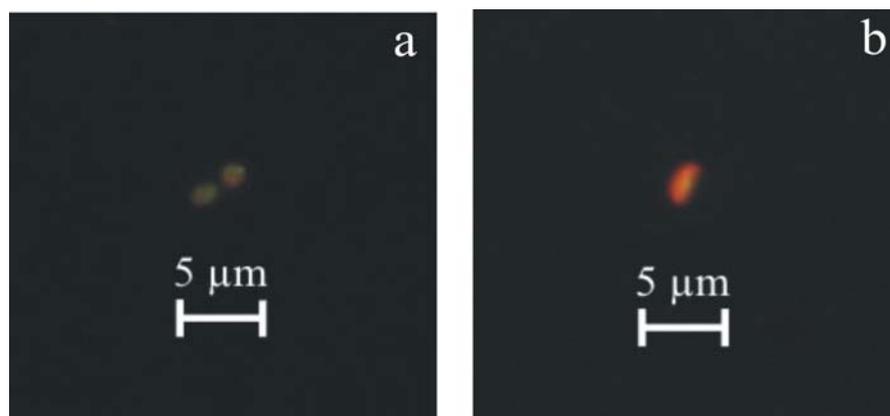


Figura II-20: Fotografías en microscopio de epifluorescencia bajo luz azul, en color rojo fluoresce la clorofila a. **a.** PEUK 1 (esférico, tipo *Chlorella* sp.); **b.** PEUK 2 (oval-alargado).



La abundancia promedio de las BACT fue aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que el picoplancton autotrófico (PCY + PEUK) (Tabla II-2). Las abundancias de BACT, PCY y PEUK estuvieron en el orden de 10^6 cél mL⁻¹, 10^4 cél mL⁻¹ y 10^3 cél mL⁻¹, respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas en la biomasa de BACT entre los lagos ($F = 0,06$, $p = 0,939$), siendo los valores promedios anuales 15,7 ng C mL⁻¹ para Escondido, y 15,4 ng C mL⁻¹ para Morenito (Figura II-21). Sin embargo, la biomasa de BACT varió significativamente a lo largo del año ($F = 6,36$, $p < 0,001$), y dicha variación no fue homogénea entre los lagos, dado que la interacción entre el factor principal (lago) y los factores de medidas repetidas fue significativa (meses; $F = 8,87$, $p < 0,001$).

La biomasa de PCY promedio anual no fue significativamente distinta entre los lagos ($F = 0,37$, $p = 0,561$), siendo 5,5 ng C mL⁻¹ y 5,2 ng C mL⁻¹ para Escondido y Morenito, respectivamente. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas a lo largo del año ($F = 19,78$, $p < 0,001$), y en la interacción del factor principal (lago) y el factor de medidas repetidas (meses; $F = 14,82$, $p < 0,001$; Figura II-21). Durante el verano y otoño se registró mayor biomasa de PCY en el Escondido que en el Morenito, mientras que durante la segunda mitad del año esta relación se invirtió.

La biomasa de PEUK 1 y 2 a lo largo del año fue significativamente distinta entre los lagos ($F = 65,50$, $p < 0,001$; $F = 6,19$, $p = 0,047$, respectivamente; Figura II-21), entre las fechas ($F = 36,64$, $p < 0,001$; $F = 22,14$, $p < 0,001$, respectivamente) y la interacción entre ambos factores ($F = 36,18$, $p < 0,001$; $F = 25,74$, $p < 0,001$, respectivamente). La biomasa de PEUK 1 fue siempre mayor en el lago Morenito que en el Escondido, con un promedio anual de 3,2 y 1,0 ng C mL⁻¹, respectivamente. Las PEUK 2 presentaron el mismo patrón temporal que las PEUK 1. La biomasa promedio anual de este grupo fue de 1,2 y 1,5 ng C mL⁻¹ para Escondido y Morenito, respectivamente.



Tabla II-2: Abundancia promedio (cél mL⁻¹), desvío estándar (DE), valores máximos y mínimos de los diferentes taxa de la comunidad planctónica de los lagos estudiados. *Referencias:* * Abundancia del zooplancton mostrado como ind L⁻¹. *Continúa en la página siguiente.*

Clase		Lago Escondido				Lago Morenito				
		Promedio	DE	Mín	Máx	Promedio	DE	Mín	Máx	
Picoplancton	Bacterias	1,25 10 ⁶	4,47 10 ⁵	5,88 10 ⁵	1,92 10 ⁶	1,49 10 ⁶	3,26 10 ⁵	9,49 10 ⁵	2,10 10 ⁶	
	Bacterias filamentosas	5,44 10 ³	7,19 10 ³	0	2,42 10 ⁴	4,46 10 ³	8,42 10 ³	0	2,68 10 ⁴	
	Picocianobacterias	5,77 10 ⁴	2,86 10 ⁴	1,87 10 ⁴	1,07 10 ⁵	7,88 10 ⁴	8,41 10 ⁴	7,64 10 ²	2,89 10 ⁵	
	Picoeucariotas (tipo 1)	1,67 10 ³	8,89 10 ²	4,98 10 ²	3,65 10 ³	5,36 10 ³	6,26 10 ³	0	1,89 10 ⁴	
	Picoeucariotas (tipo 2)	5,37 10 ³	5,00 10 ³	1,86 10 ³	1,88 10 ⁴	5,90 10 ³	4,86 10 ³	9,66 10 ²	1,43 10 ⁴	
Especies Mixotróficas	Haptophyceae	<i>Chrysochromulina parva</i>	344,4	284,5	8,5	1002,8	362,3	361,5	8,5	1014,7
	Cryptophyceae	<i>Cryptomonas erosa</i>	10,3	6,3	1,0	18,2	47,9	59,9	5,0	210,3
		<i>Plagioselmis lacustris</i>	109,4	79,0	25,5	290,8	404,8	359,2	105,6	1251,3
		<i>Ochromonas ovalis</i>	500,0	276,6	152,7	1008,9	210,2	130,6	23,9	425,6
	Chrysophyceae	Chrysophyceae >5 µm	126,1	76,6	0	233,0	10,3	10,9	0	31,9
		<i>Dinobryon divergens</i>	20,7	29,0	0,3	80,7	40,4	53,4	3,6	184,3
		<i>Dinobryon sertularia</i>	7,3	8,1	0,3	21,1	12,0	9,4	1,6	29,8
		<i>Pseudopedinella</i> sp.	189,1	64,7	99,2	294,0	128,8	125,7	10,3	350,4
	Dictyochophyceae	<i>Gymnodinium fuscum</i>	0,3	0,2	0,1	0,9	0,58	0,6	0,1	1,8
	Dinophyceae	<i>Gymnodinium varians</i> 1	2,8	3,0	0,2	9,5	1,0	0,6	0,1	1,7
<i>Gymnodinium varians</i> 2		0	0	0	0	1,5	0,9	0	2,5	
Especies Autotróficas	Chlorophyceae	<i>Oocytis lacustris</i>	0	0	0	0	1,8	0,8	1,3	2,7
	Chrysophyceae	<i>Mallomonas</i> sp.	16,8	13,4	7,3	26,2	18,2	8,78	8,8	26,2
	Euglenophyceae	<i>Trachelomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dinophyceae	<i>Gymnodinium paradoxum</i>	18,3	20,8	5,1	73,0	6,6	5,9	1,0	13,8
		<i>Peridinium</i> sp.	18,7	17,3	1,4	47,0	1,5	0,4	1,2	1,8
	Bacillariophyceae	<i>Diatoma hiemale</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>Synedra ulna</i>	2,2	0,7	1,4	2,8	10,8	11,1	2,8	23,5
<i>Fragilaria</i> spp.		5,0	14,6	0	48,4	8,0	14,1	0	48,4	



Tabla II-2-Continuación: Abundancia promedio (cél mL⁻¹), desvío estándar (DE), valores máximos y mínimos de los diferentes taxa de la comunidad plantónica de los lagos estudiados. *Referencias:* * Abundancia del zooplancton mostrado como ind L⁻¹.

Clase		Lago Escondido				Lago Morenito			
		Promedio	DE	Mín	Máx	Promedio	DE	Mín	Máx
FH	Flagelados Heter. <5µm	179,1	80,4	94,0	312,5	206,5	90,9	95,7	354,9
	Flagelados Heter. >5µm	135,6	93,8	56,4	336,7	138,7	104,7	38,7	336,7
Ciliados	<i>Balanium planctonicum</i>	0,9	1,3	0,1	4,0	1,4	3,1	0,1	10,7
	<i>Urotricha furcata</i>	0,7	0,9	0,2	3,1	0,7	1,0	0,2	3,6
	<i>Strobilidium lacustris</i>	1,4	1,3	0,5	4,6	0,7	0,5	0,1	2,0
	<i>Strobilidium humile</i>	0,5	0,7	0,1	2,2	0,8	0,7	0,2	2,4
	<i>Strombidium viride</i>	0,4	0,1	0,3	0,7	0,3	0,3	0,1	1,0
	<i>Paradileptus elephantinus</i>	0,3	0,2	0,1	0,6	0,1	0	0	0,1
	Otras especies de ciliados	0,4	0,3	0,1	1,1	0,4	0,4	0,1	1,4
Zooplancton	Rotifera *	171,8	136,4	19,8	415,5	248,3	244,7	53,5	831,8
	Copepoda *	3,9	2,9	1,1	10,6	51,1	28,7	12,7	97,7
	Cladocera *	9,9	13,4	1,6	44,8	11,1	11,6	0,9	33,4

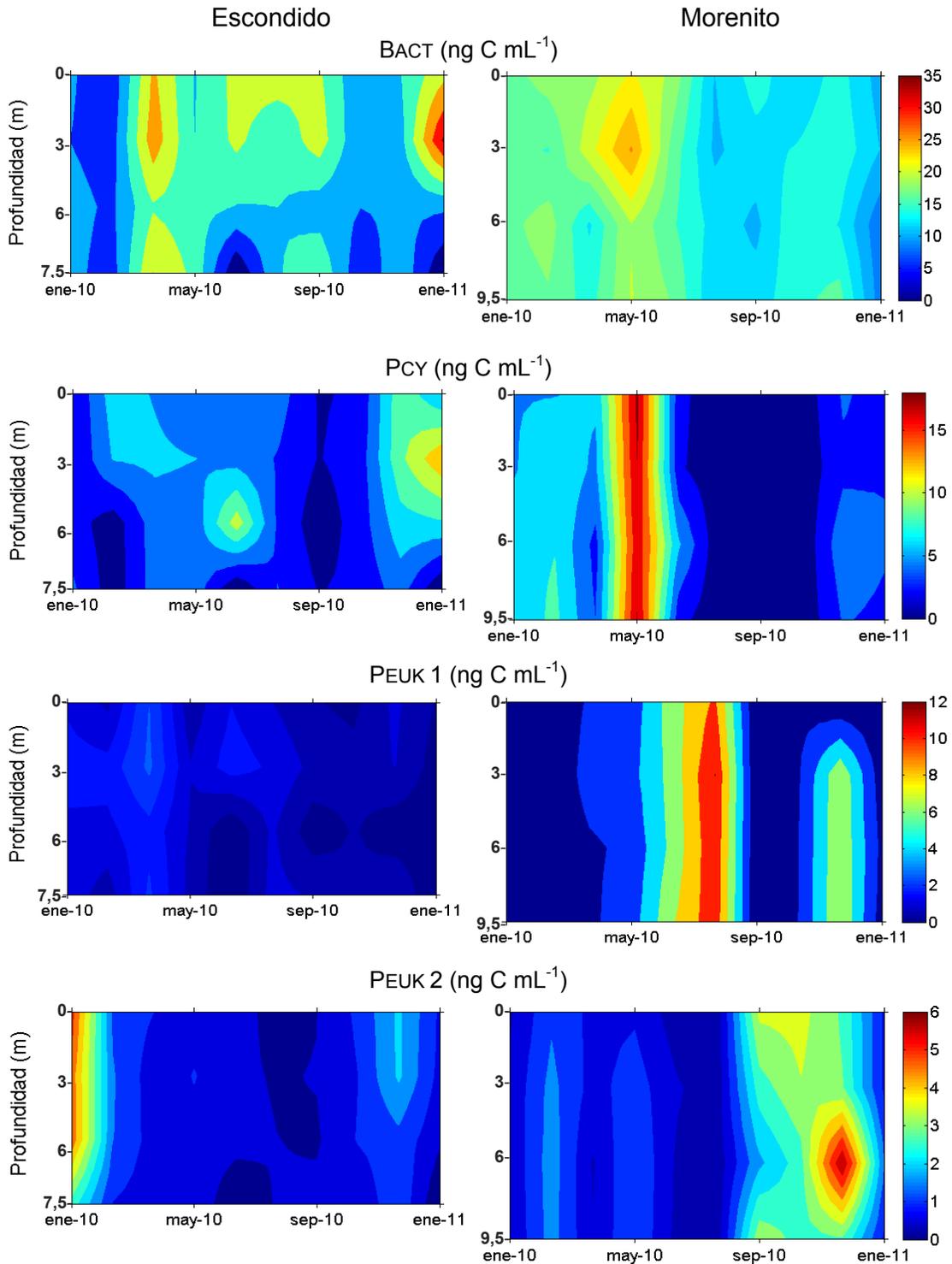


Figura II-21: Variación temporal y vertical de la biomasa de cada grupo picoplanctónico. *Referencias:* BACT: bacterias; PCY: picocianobacterias; PEUK 1: picoeucariotas 1; PEUK 2: picoeucariotas 2. La escala de la variable indicada en cada título se encuentra a la derecha de los gráficos para cada fila.



La biomasa total del picoplancton (promedio de la columna de agua) fue similar entre los lagos, con valores que oscilaron entre 13 y 44 ng C mL⁻¹ durante el año. Los patrones mostraron un incremento en el mes de marzo y hacia final del año (Figura II-22.a, b). Analizando la composición relativa de los distintos componentes del picoplancton se observa que, en ambos lagos las BACT dominaron la biomasa picoplantónica durante todo el año representando en promedio el 67 % en el Escondido y 62 % en el Morenito (Figura II-22.c, d). Por su parte, las Pcy representaron en promedio el 20 % de la biomasa picoplanctónica total, registrándose los valores más bajos durante el invierno en ambos lagos, aunque más notoriamente en el Morenito. En ambos lagos se observó un aumento en la biomasa relativa hacia final del verano. En el caso del lago Morenito es importante destacar un fuerte incremento en la biomasa de las Pcy durante finales del verano. En lo que respecta a los PEUK 1, se observa que en el lago Escondido la biomasa relativa fue similar durante todo el año, representando un 5 % en promedio. Mientras que en el Morenito la importancia relativa fue variable alcanzando hacia finales de otoño el 40 % de la biomasa del picoplancton. Los PEUK 2 representaron en promedio el 6 y 8 % de la biomasa del picoplancton en el lago Escondido y en el Morenito, respectivamente.

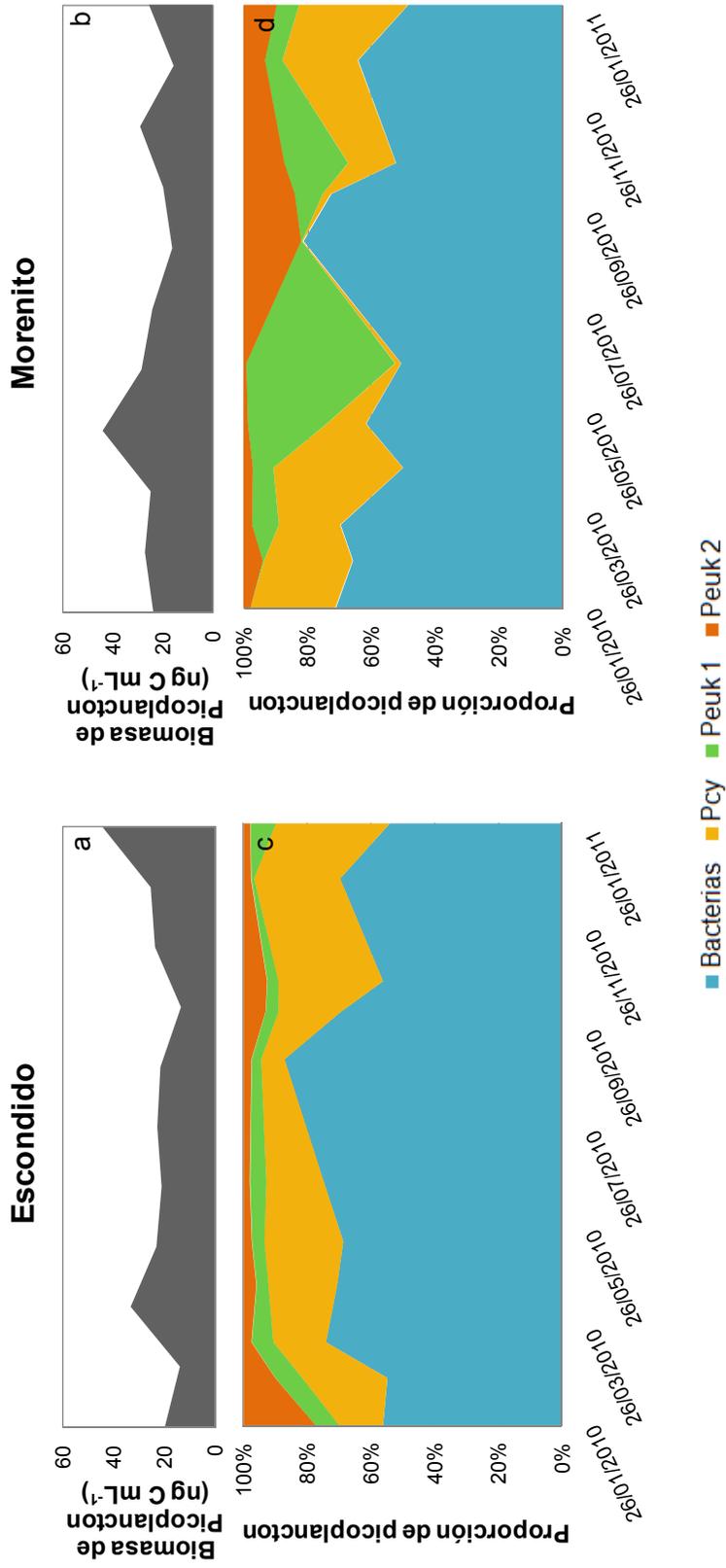


Figura II-22: a y b. Variación temporal de la biomasa (ng C mL⁻¹) total del picoplancton para cada lago a lo largo del año; **c y d.** Proporción de cada uno de los grupos picoplanctónicos a lo largo del año para cada lago. Referencias: PCY: picocianobacterias; PEUK 1: piceocariota 1 (estérico); PEUK 2: piceocariota 2 (oval-alargado).



II-4-3-2. Composición, abundancia y biomasa del nano y micropláncton

La abundancia promedio de los taxones nanoplanctónicos y microplanctónicos en conjunto fue de 1690 y 1616 cél mL⁻¹, para Escondido y Morenito, respectivamente. Los taxones estrictamente autotróficos representaron menos del 5 % de la abundancia total de estos grupos de protistas en estos ambientes (en promedio entre 45 y 62 cél mL⁻¹). Algunos de los géneros encontrados pertenecen a la Clase Bacillariophyceae: *Fragilaria* sp., *Diatoma* sp.; y algunos géneros de la Clase Dinophyceae: *Gymnodinium* sp., *Peridinium* sp. (Tabla II-2). Los FMix fueron las más abundantes entre los protistas identificados, y en promedio estuvieron alrededor de 1300 cél mL⁻¹ en ambos lagos (correspondiendo aproximadamente al 76 % de la abundancia). Los FHET representaron, aproximadamente, el 20 % de la abundancia del ensamble de protistas, con valores que oscilaron entre 310 y 345 cél mL⁻¹. Los ciliados siempre presentaron abundancias menores al 1 % de la abundancia total.

La biomasa de los protistas nano y microplanctónicos varió en el Escondido entre 17,5 y 43,9 ng C mL⁻¹, mientras que en el Morenito varió entre 29,5 y 85,8 ng C mL⁻¹. La biomasa de los FMix y FHET representó el 86 y el 92 % de la biomasa total en cada lago, respectivamente. Es destacable que los ciliados a pesar de ser poco abundantes, en ocasiones fueron responsables de hasta el 30 % de la biomasa de protistas. La variación temporal en el perfil vertical de las algas mixotróficas en el Morenito se observó un claro evento de sucesión (Figura II-23). *Chrysochromulina parva*, *Cryptomonas erosa* y *Pseudopedinella* sp. fueron las especies con mayor biomasa durante el verano. Hacia el final del verano *C. parva* junto con *Ochromonas ovalis* y las Chrysophyceae >5 µm dominaron la biomasa de la comunidad fitoplanctónica. Estas especies fueron reemplazadas por *Plagioselmis lacustris* y *C. erosa* en otoño e invierno. Al comienzo de la primavera *Pseudopedinella* sp. surgió como la especie dominante seguida por *Dinobryon divergens* y *D. sertularia* avanzada esta estación. En el lago Escondido el reemplazo de especies fue menos claro que en el Morenito, aunque presentaron algunas similitudes. Durante el verano la biomasa de la comunidad fitoplanctónica estuvo dominada por *O. ovalis* y Chrysophyceae >5 µm, *Gymnodinium varians* y *Pseudopedinella* sp. Entre otoño e invierno tomaron



mayor importancia *C. parva*, *O. ovalis*, Chrysophyceae $>5 \mu\text{m}$ y *C. erosa*. Durante el invierno, *G. varians* tuvo un pulso de biomasa y hacia finales de invierno y principios de primavera *Pseudopedinella* sp., *D. divergens* y *D. sertularia* dominaron la biomasa fitoplanctónica.

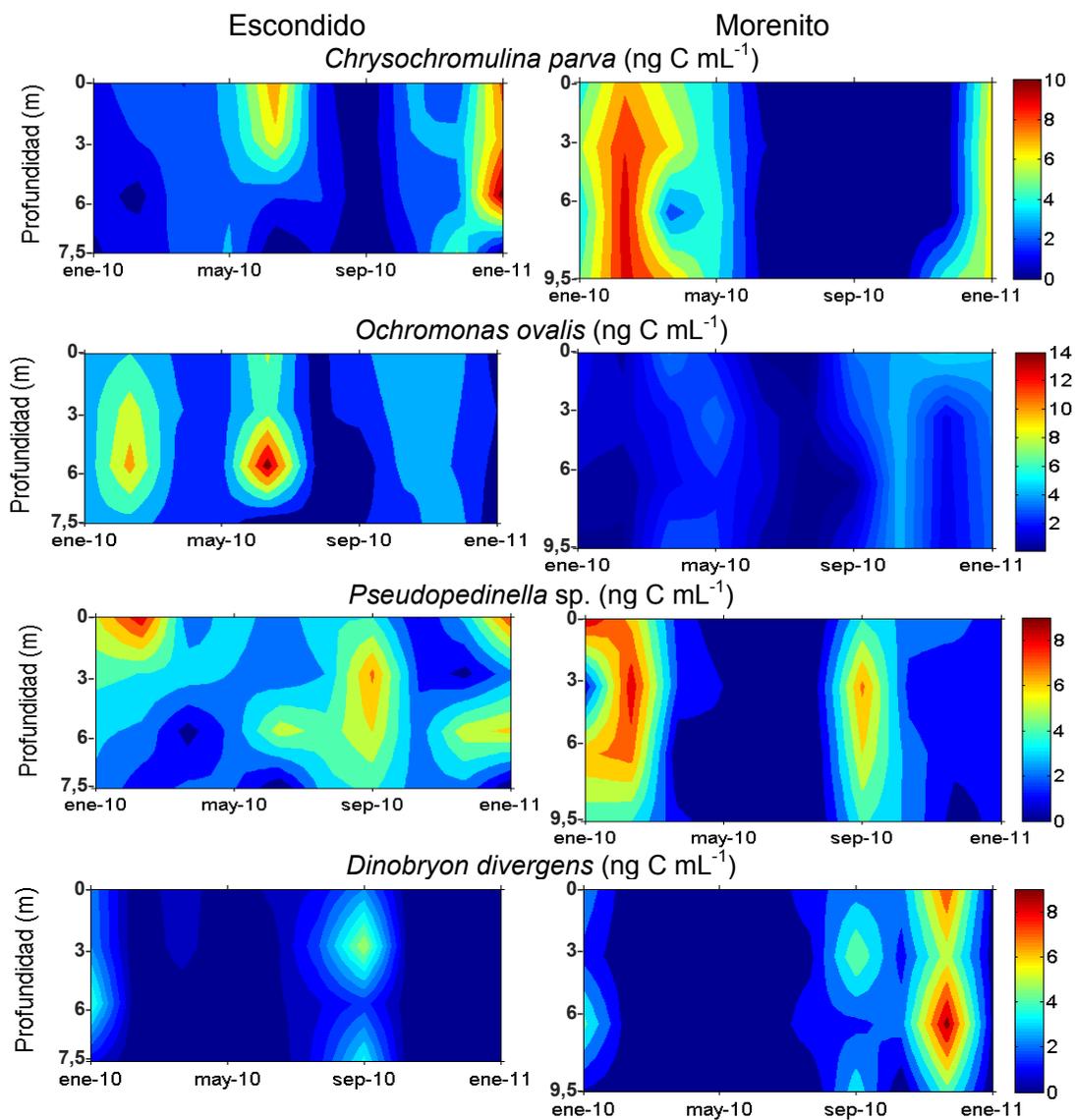


Figura II-23: Variación temporal y vertical de la biomasa de las algas mixotróficas en los dos lagos estudiados. La escala de la variable indicada en cada título se encuentra a la derecha de los gráficos para cada fila. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula. *Continúa en la página siguiente.*

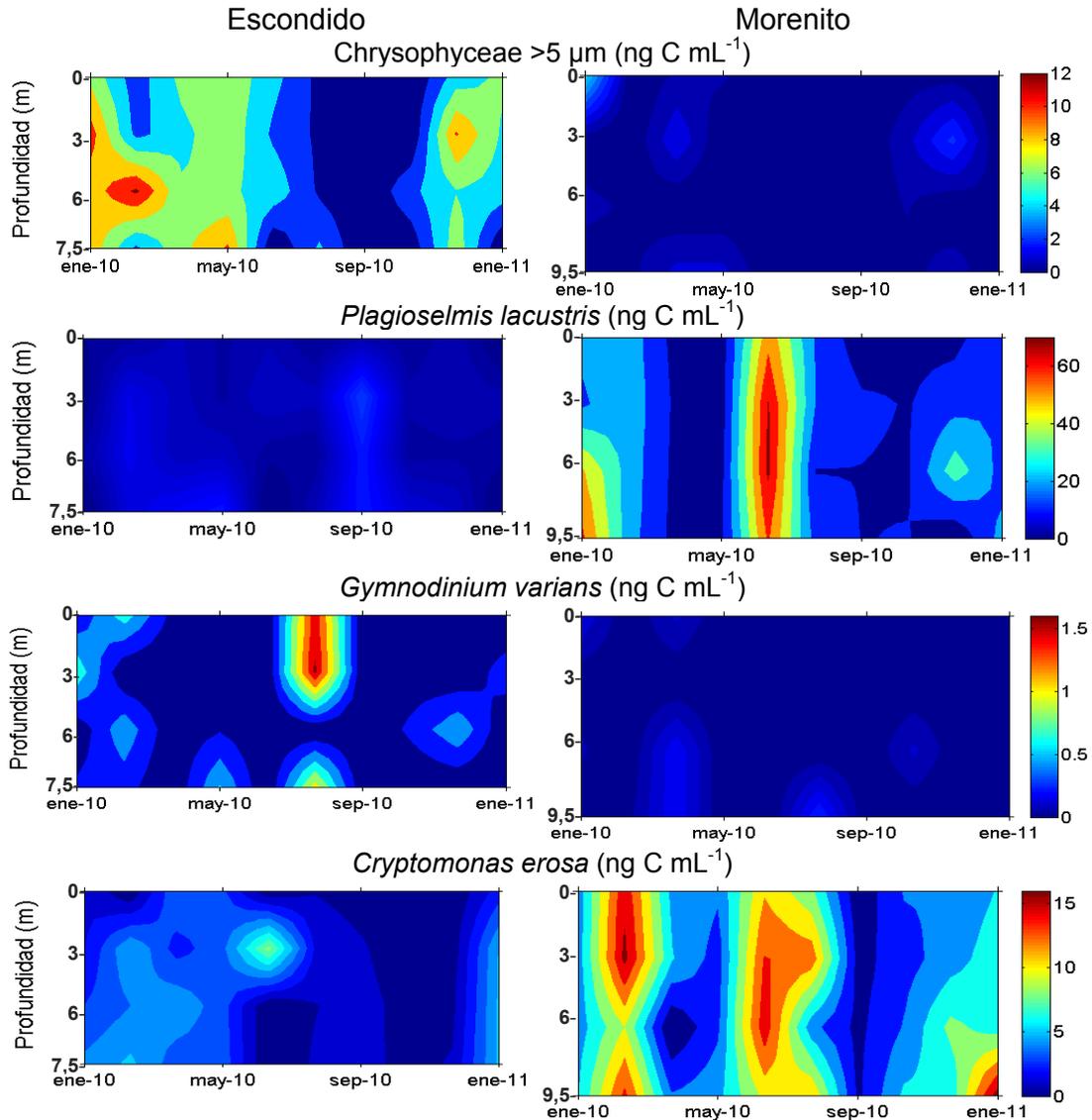


Figura II-23-Continuación: Variación temporal y vertical de la biomasa de las algas mixotróficas en los dos lagos estudiados. La escala de la variable indicada en cada título se encuentra a la derecha de los gráficos para cada fila. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula.

En el caso de los FHET $<5 \mu\text{m}$, los valores más elevados de la biomasa se registraron durante los meses de verano. Los FHET $>5 \mu\text{m}$ presentaron las máximas biomasa en la primavera y a 6 m de profundidad en ambos casos, mientras que en el resto del año esta biomasa se distribuyó de manera relativamente uniforme en la columna de agua (Figura II-24). En el caso de los ciliados la biomasa fue relevante, principalmente, en el Escondido durante el



comienzo del verano, y durante fines de verano e inicio de otoño en el Morenito (Figura II-24). El comportamiento de los ciliados mostró ser relativamente homogéneo en la columna de agua.

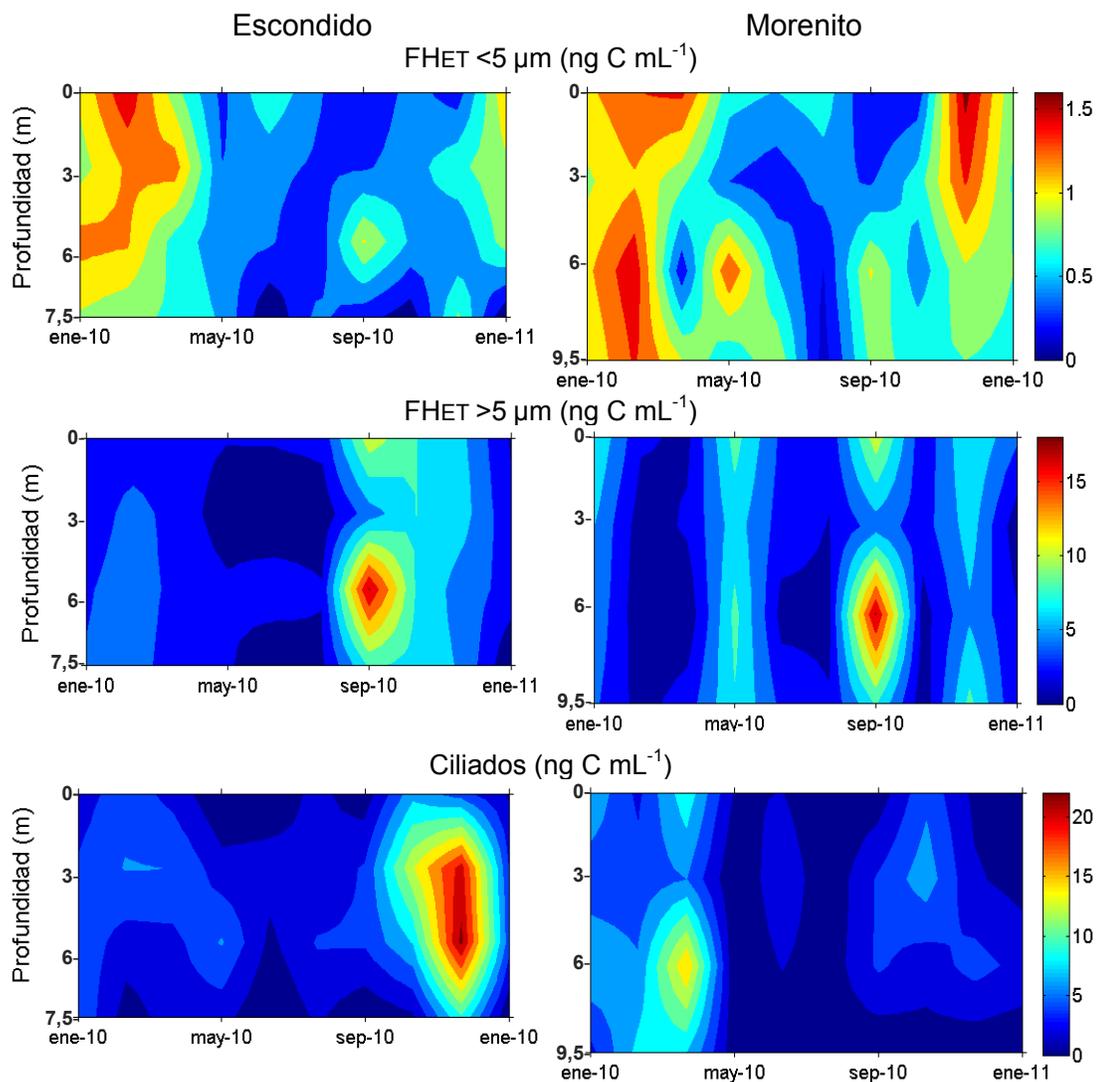


Figura II-24: Distribución temporal y vertical de la biomasa de los flagelados heterotróficos (FHET < y >5 μm) y ciliados en los dos lagos estudiados. La escala de la variable indicada en cada título se encuentra a la derecha de los gráficos para cada fila.



La biomasa de los protistas bacterívoros (FMix, FHET y ciliados) estuvo dominada por los FMix durante todo el año (Figura II-25). Éstos representaron el 75 % de la biomasa en promedio. Los FHET representaron entre el 10 y el 30 % de la biomasa total de los protistas bacterívoros. Por su parte, los ciliados representaron aproximadamente el 10 % de la biomasa total de los protistas bacterívoros, aunque en algunas ocasiones alcanzaron el 30 % de esta (Figura II-25). Es destacable que aunque la biomasa de FMix, dominó durante la mayor parte del año, hacia finales del invierno los FHET y los ciliados, representaron entre el 40 y 50 % de la biomasa de los bacterívoros (Figura II-25).

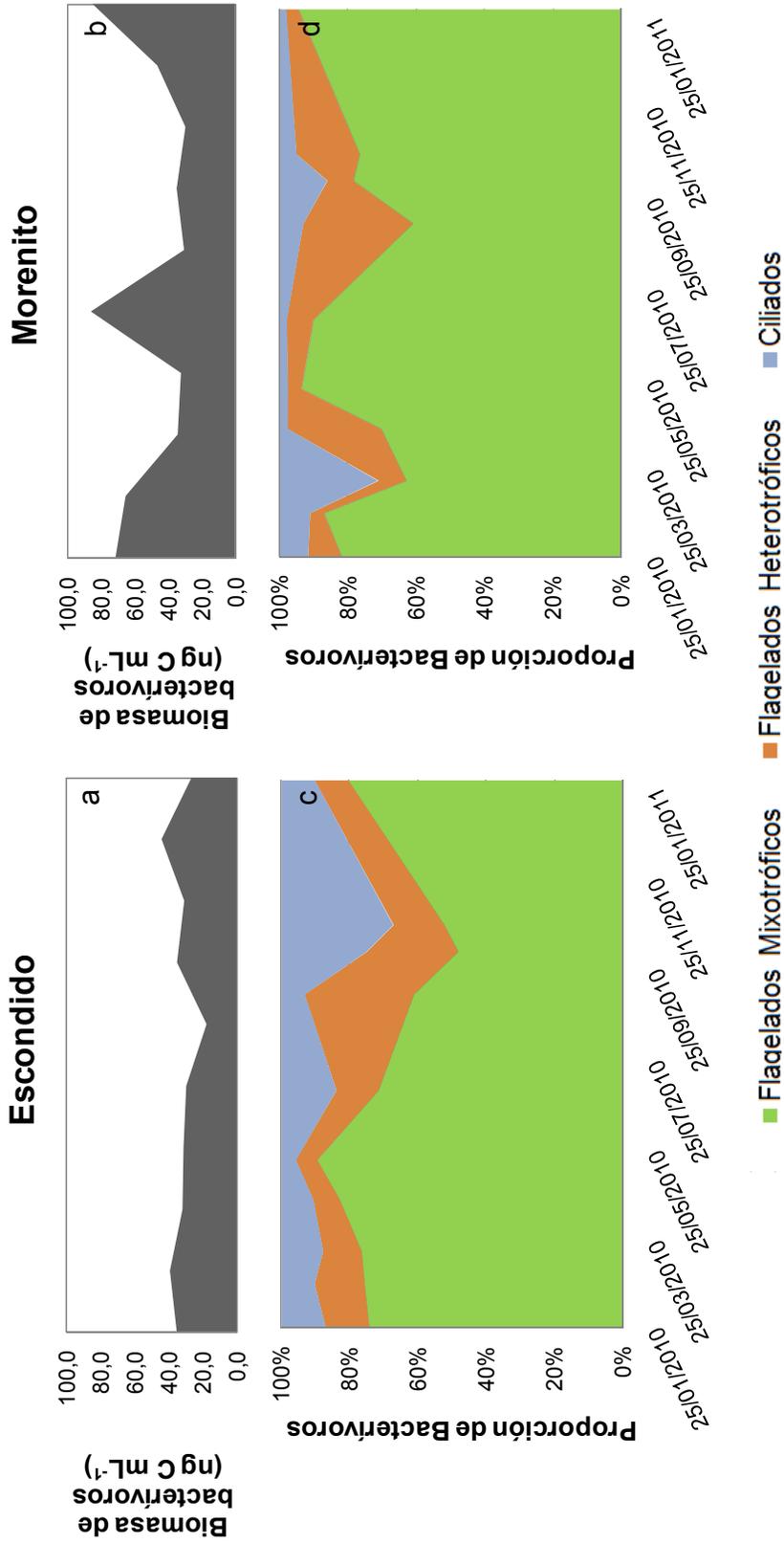


Figura II-25: a y b. Variación temporal de la biomasa (ng C mL⁻¹) total de protistas bacterívoros (flagelados mixotróficos, flagelados heterotróficos y ciliados) para cada lago; **c y d.** Proporción de cada uno de los grupos de protistas bacterívoros a lo largo del año para cada lago.



Analizando detalladamente la biomasa de los mixótrofos, se observó que la composición de la comunidad según las Clases algales fue diferente entre los lagos a lo largo del año (Figura II-26). El lago Escondido estuvo dominado por la Clase Chrysophyceae (representada por *O. ovalis*, Chrysophyceae >5 μm ; *D. divergens* y *D. sertularia*) durante todas las estaciones, mientras que el Morenito estuvo siempre dominado por Cryptophyceae (representada por *P. lacustris* y *C. erosa*). En el caso de la Clase Haptophyceae (representada únicamente por *C. parva*), en ambos lagos se observó un aumento de su importancia relativa durante el verano. La Clase Dictyochophyceae (representada únicamente por *Pseudopedinella* sp.) mostró mayor regularidad en su importancia relativa en el lago Escondido que en el Morenito. En este último lago mostró algunos pulsos de biomasa con mayor importancia. Respecto a los dinoflagelados (*G. varians*) se observó poca relevancia de esta especie en ambos lagos y durante todo el año, aunque es destacable que en el Morenito mostró un aumento en su biomasa durante final del verano.

Notablemente, las únicas Clases que estuvieron representadas con más de un género fueron las Clases Cryptophyceae y Chrysophyceae. En tales casos, se determinó la importancia relativa de cada uno de los taxa dentro de cada Clase en cada lago. *P. lacustris* representó aproximadamente el 70 % de la biomasa de las Cryptophyceae en el lago Morenito y el 60 % en el Escondido (Figura II-27).

O. ovalis representó el 40 y 50 % de la Clase Chrysophyceae a lo largo del año en el Escondido y Morenito, respectivamente (Figura II-28). En el lago Escondido, *D. divergens* y *D. sertularia* representaron en promedio alrededor del 10 % de la biomasa, aunque durante final del invierno representó el 60 % de la biomasa de la Clase. En el Morenito, *D. divergens* y *D. sertularia* presentaron en promedio el 40 % de la biomasa total de la Clase. Es destacable que en el final del invierno y en la primavera, estas especies representaron hasta el 80 % de la biomasa (Figura II-28). Por último, en el Escondido las Chrysophyceae >5 μm representaron el 40 % de la biomasa de la Clase, mientras que en el Morenito, representaron en promedio menos del 10 % (Figura II-28).

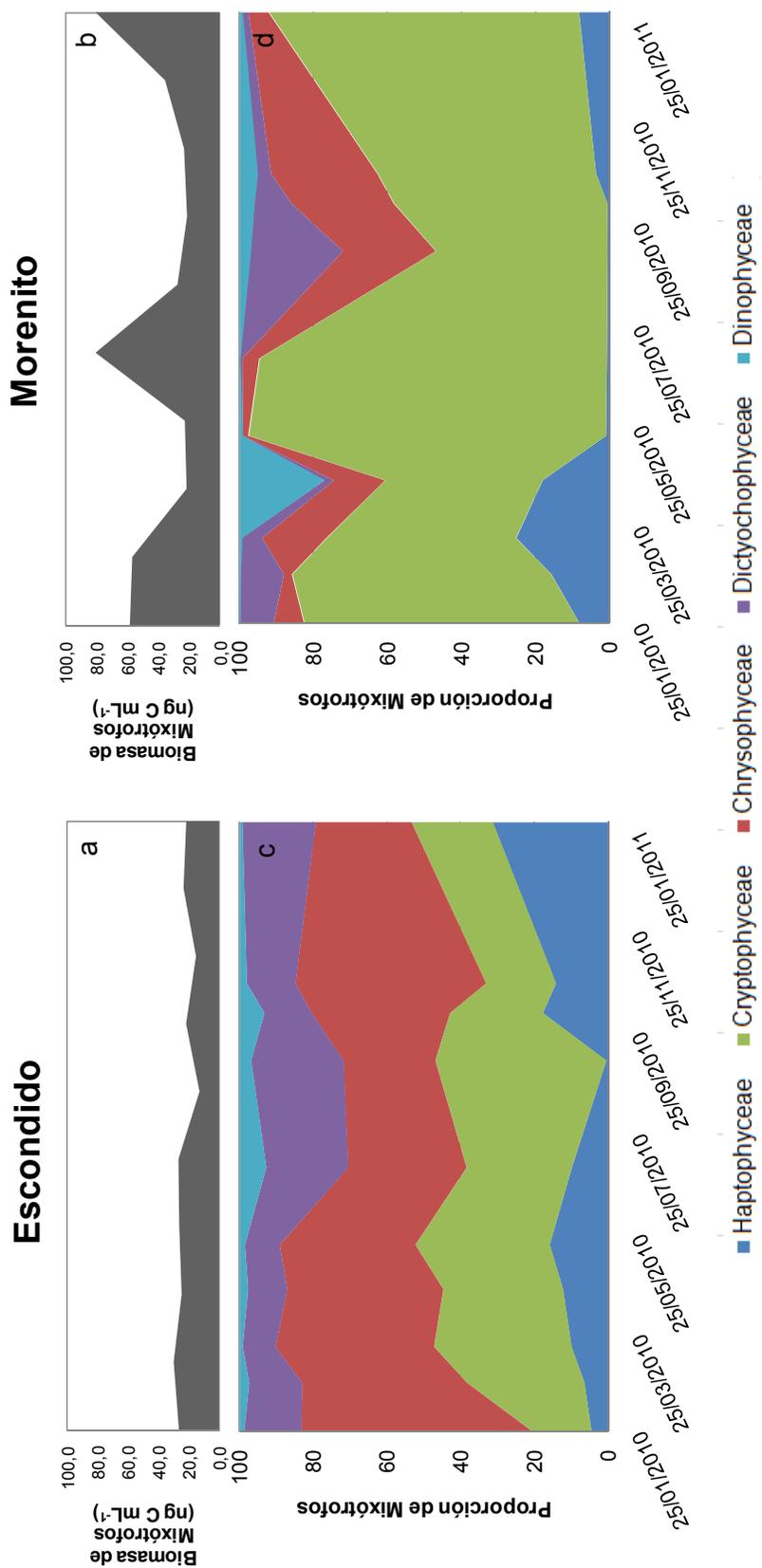


Figura II-26: a y b. Variación temporal de la biomasa (ng C mL⁻¹) total de mixótrofos para cada lago; **c y d.** Proporción de cada una de las clases algales mixotróficas a lo largo del año para cada lago.

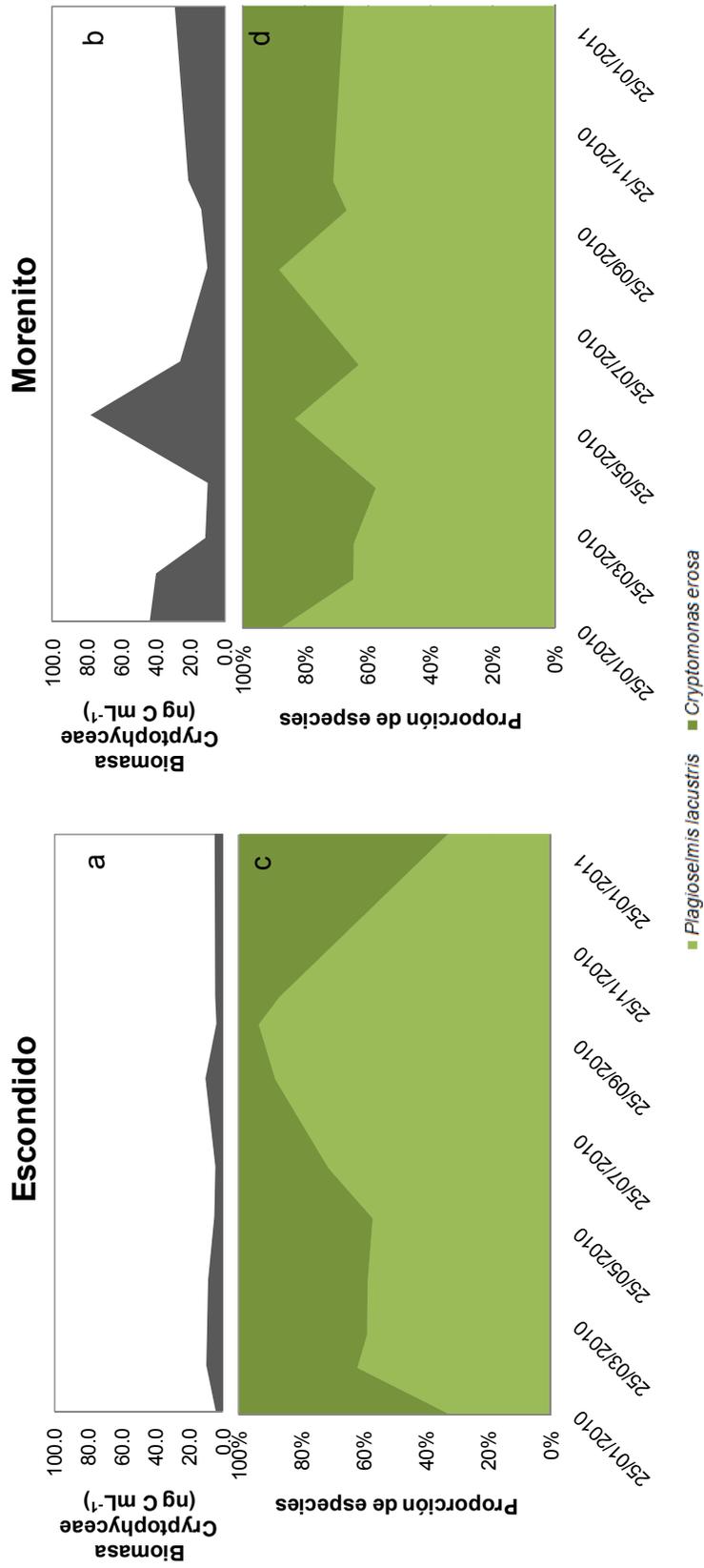


Figura II-27: a y b. Variación temporal de la biomasa (ng C mL⁻¹) total de Cryptophyceae para cada lago; **c y d.** Proporción de cada una de las especies componentes de la clase a lo largo del año para cada lago.

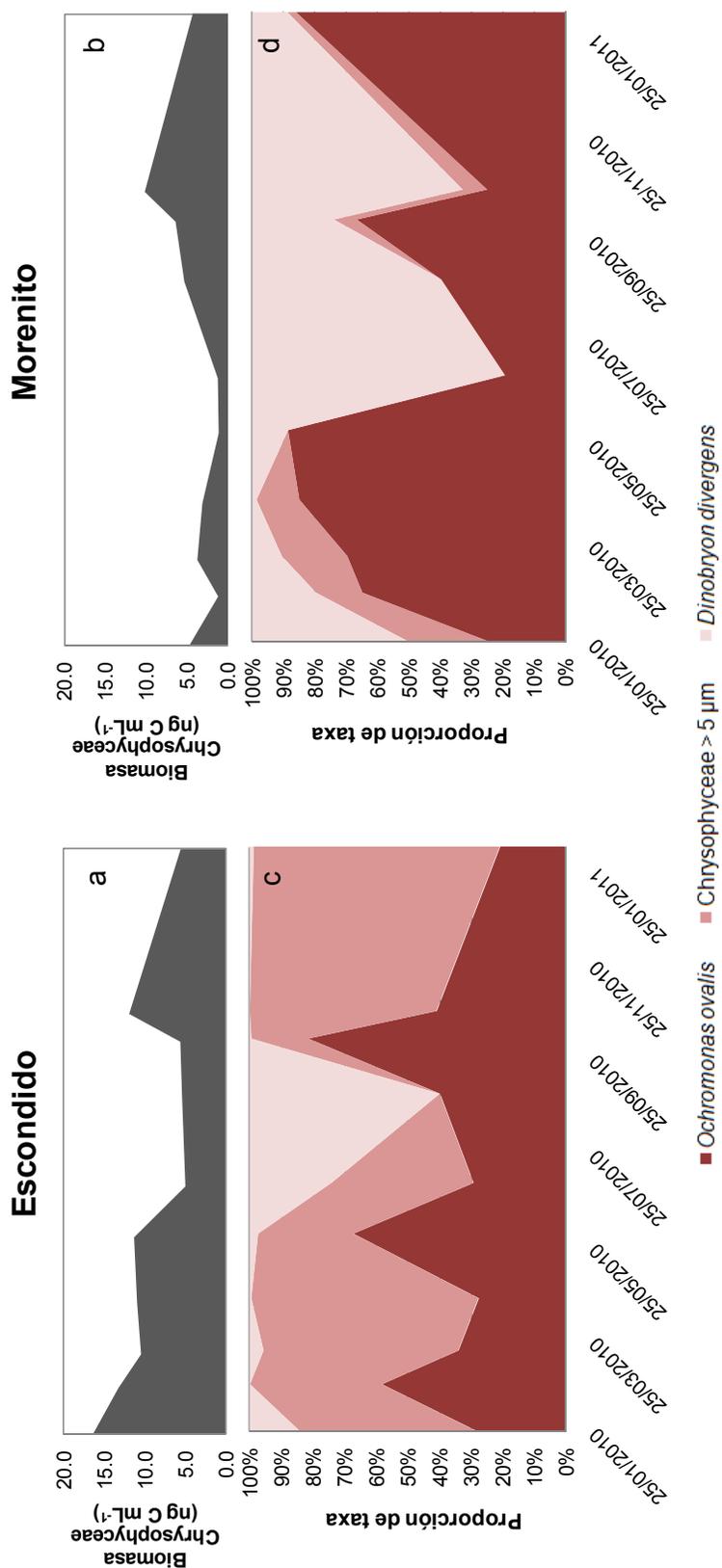


Figura II-28: a y b. Variación temporal de la biomasa (ng C mL⁻¹) total de Chrysophyceae para cada lago; **c y d.** Proportión de cada uno de los taxa componentes de la clase a lo largo del año para cada lago.



II-4-3-3. Composición, abundancia y biomasa del zooplancton

La composición de especies zooplanctónicas (rotíferos, copépodos y cladóceros) fue similar en ambos ambientes. Los rotíferos más abundantes fueron *Keratella cochlearis*, *Polyarthra vulgaris* y *Synchaeta kitina*. Dentro de los copépodos se encontraron *Boeckella gracilipes* y representantes de *Cyclopoida*, mientras que los cladóceros estuvieron representados por *Bosmina longirostris* y *Ceriodaphnia* c.f. *dubia*. En la Figura II-29 se muestran fotografías de algunas de estas especies.

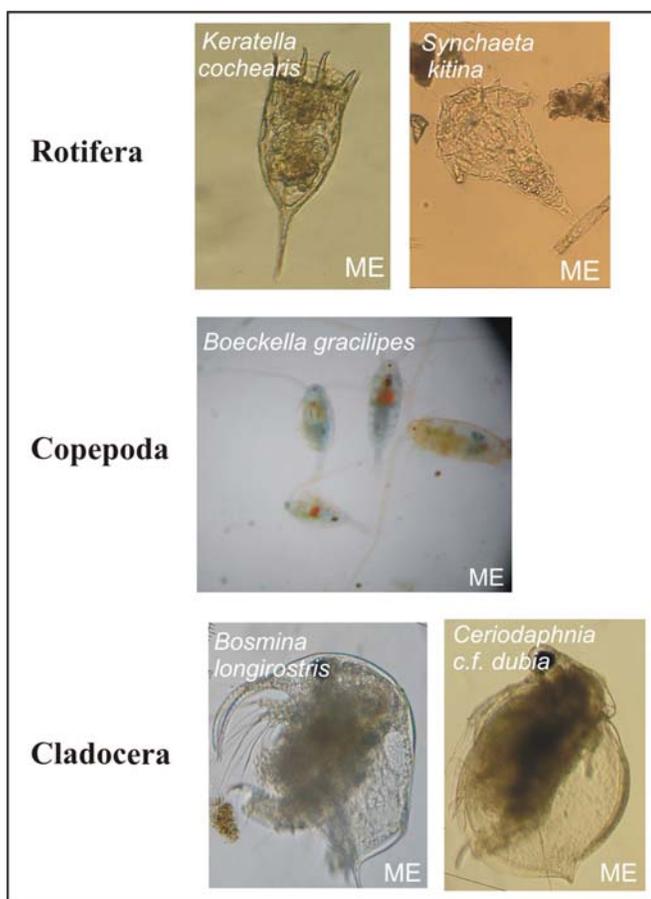


Figura II-29: Fotografías bajo microscopio de algunas de las especies zooplanctónicas presentes en los ambientes estudiados.

La abundancia de los tres grupos de zoopláncteres analizados fue mayor en el lago Morenito que en el Escondido, variando entre 22 y 470 ind L⁻¹ y entre 67 y



963 ind L⁻¹, respectivamente (Tabla II-2). Los rotíferos fueron los más abundantes en ambos lagos, mientras que el segundo grupo de importancia fue opuesto entre los lagos, los copépodos en el caso del Escondido y los cladóceros en el caso del Morenito (Tabla II-2).

En cambio, la biomasa zooplanctónica total fue diez veces mayor en el lago Morenito (promedio de 59,3 $\mu\text{g C L}^{-1}$) que en el Escondido (promedio de 4,9 $\mu\text{g C L}^{-1}$; Figura II-30.a, b) durante todo el año y en todos los grupos, aunque las mayores diferencias se observaron entre los copépodos y los cladóceros.

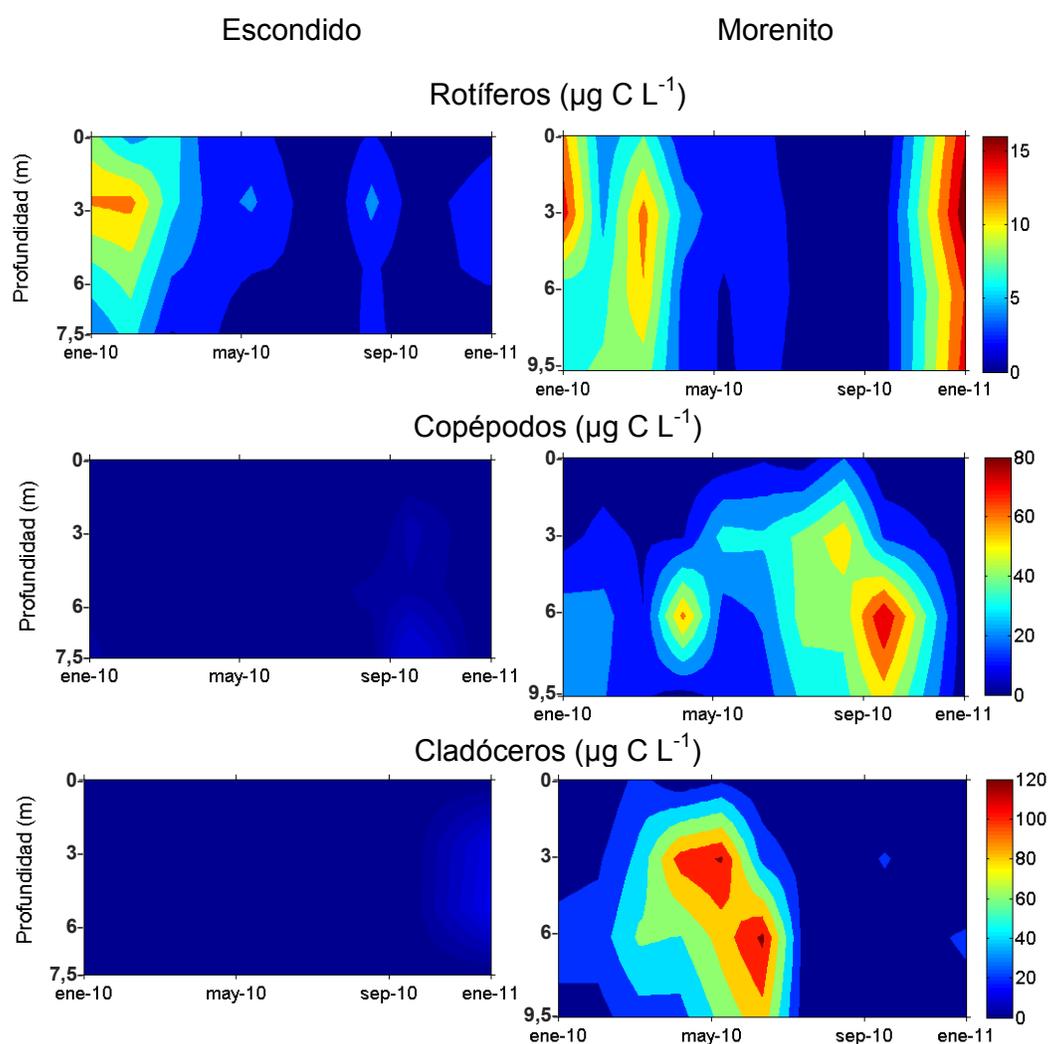


Figura II-30: Distribución temporal y vertical de la biomasa de los rotíferos, copépodos y cladóceros en los dos lagos estudiados. Los paneles de la izquierda corresponden al lago Escondido y los de la derecha corresponden al Morenito. La escala de la variable indicada en el título se encuentra a la derecha de los gráficos para cada fila.



En el lago Escondido, los rotíferos fueron los zoopláncteres dominantes representando en promedio el 67 % de la biomasa promedio de la columna de agua del zooplancton (Figura II-31). Por su parte, los copépodos representaron el 22 % de la biomasa, mientras que los cladóceros, dominados por *Bosmina longirostris*, representaron aproximadamente el 10 % restante. En el Morenito, sin embargo, la composición promedio fue más fluctuante. La dominancia estuvo repartida a lo largo del año entre Copepoda y Cladocera, representando estas en promedio el 40 y 44 % de la biomasa total del zooplancton. Es destacable que la composición de los cladóceros en abundancia en este lago, estuvo repartida entre *Bosmina longirostris* y *Ceriodaphnia* c.f. *dubia*, en similares proporciones. Por último, los rotíferos representaron el 15 % de la biomasa total de zoopláncteres en el Morenito, presentando mayor relevancia durante el verano que el resto del año.

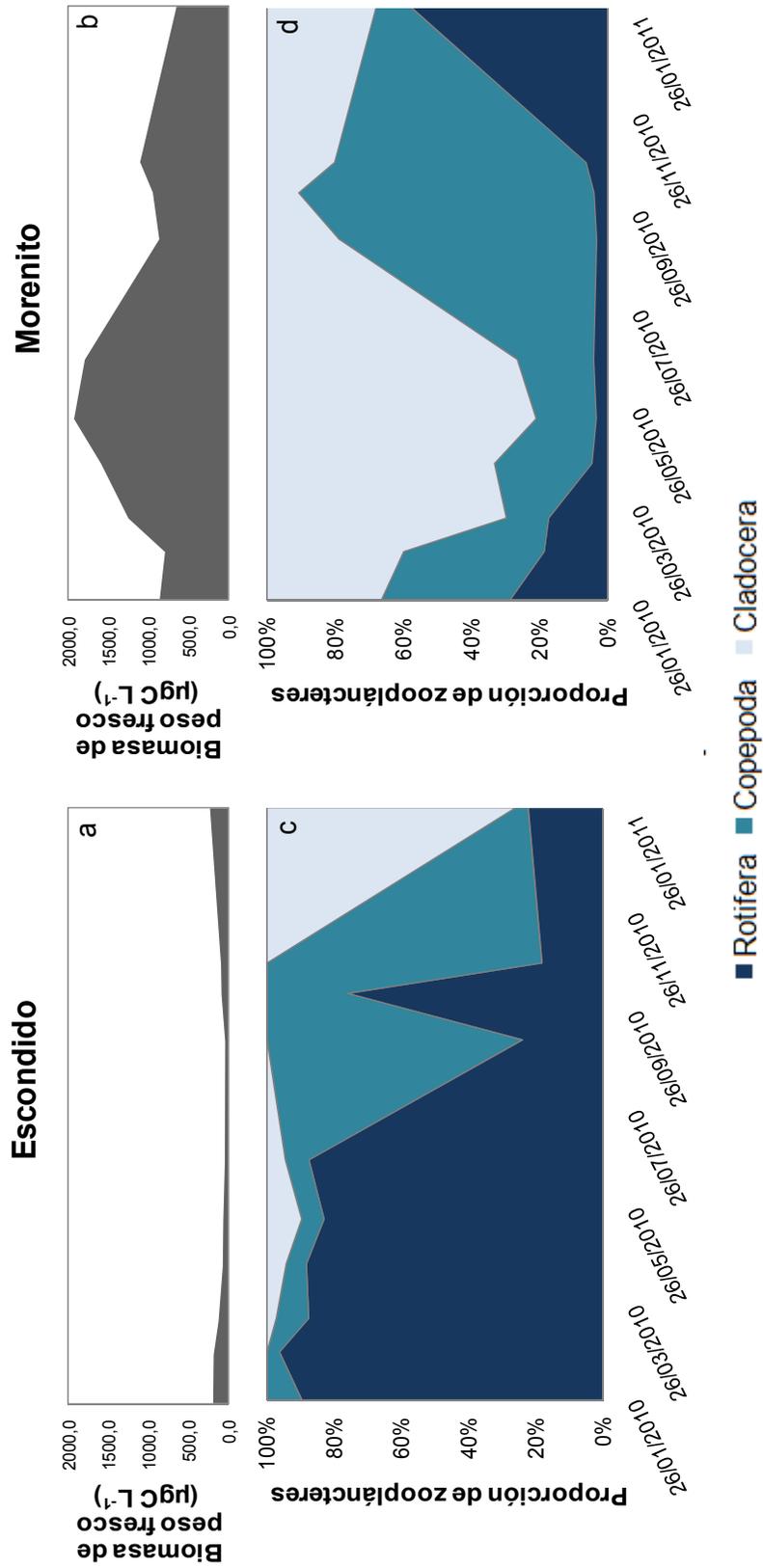


Figura II-31: a y b. Variación de la biomasa ($\mu\text{gC L}^{-1}$) total del zoopláncton para cada lago a lo largo del año; **c y d.** Proporción de cada uno de los grupos de zoopláncton a lo largo del año para cada lago.



II-4-4. Relaciones entre organismos y variables físico-químicas

Se observó una tendencia positiva entre la biomasa de BACT y la pendiente $S_{275-295}$, al analizar ambos lagos en conjunto. Sin embargo, esta relación fue significativa cuando los lagos fueron analizados de forma separada. Como la pendiente $S_{275-295}$ representa una relación inversa, se observa que, a menor tamaño molecular de la MOD mayor biomasa de BACT (Figura II-32).

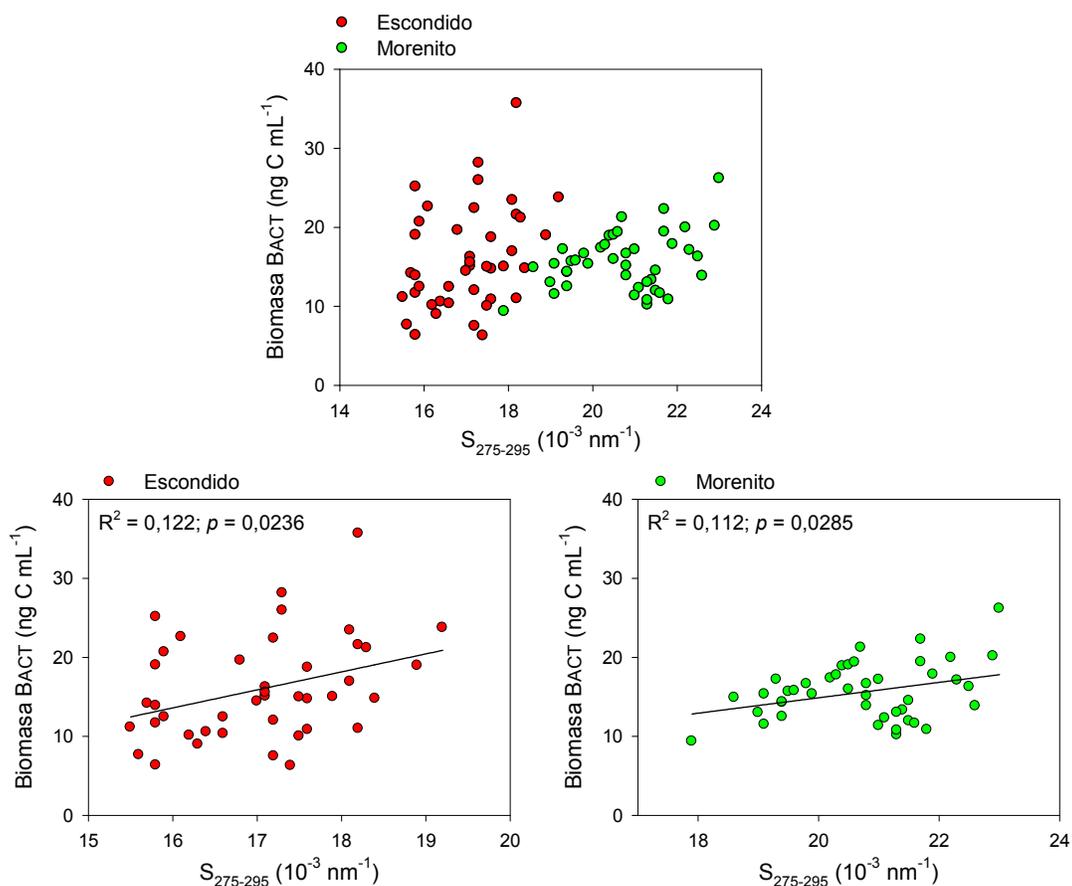


Figura II-32: Biomasa de bacterias (BACT) en relación al tamaño molecular de la MOD (la pendiente $S_{275-295}$ es inversamente proporcional al tamaño molecular de la MOD). El panel superior muestra los datos de los lagos juntos, los paneles inferiores muestran los datos de los lagos Escondido (izquierda) y Morenito (derecha).



Del mismo modo, la biomasa de BACT se relacionó inversamente con el color del agua, aunque la significancia de esta relación fue mayor considerando los lagos de forma separada (Figura II-33). Por lo tanto, a mayor color del agua, menor biomasa de BACT.

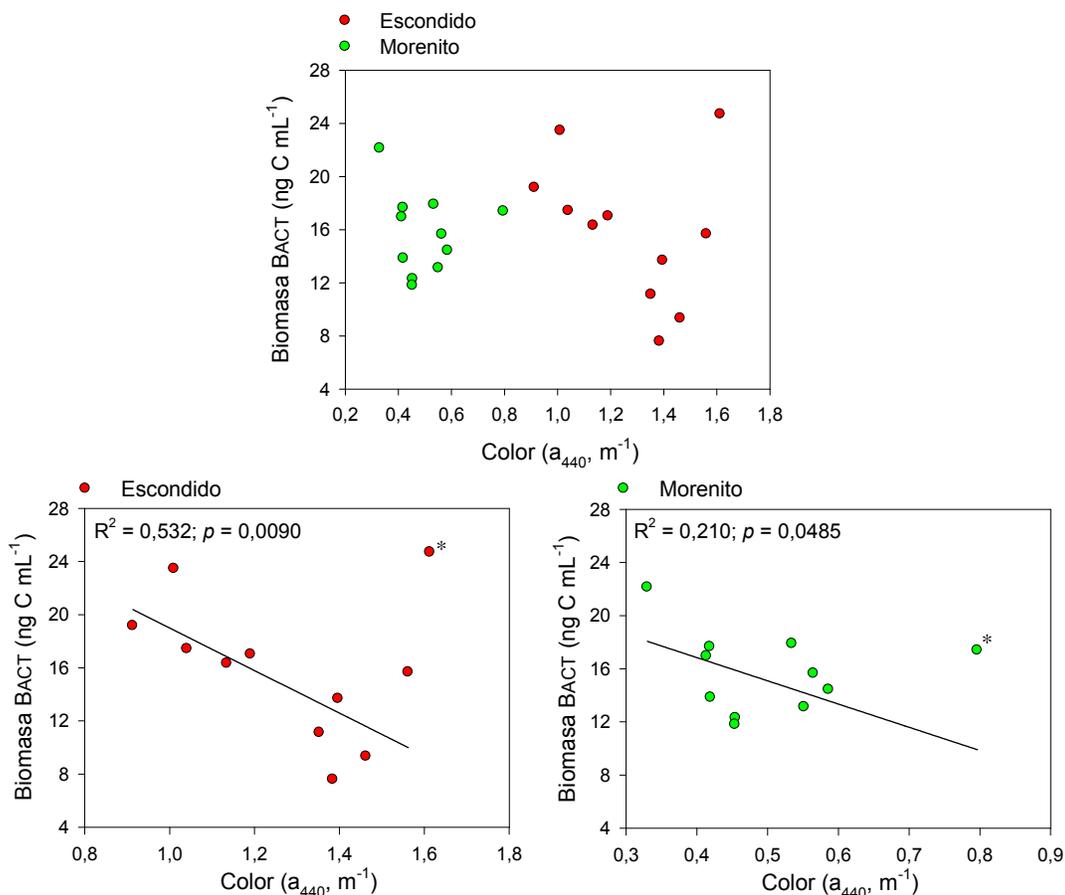


Figura II-33: Biomasa de BACT en relación al color del agua (a_{440} , m^{-1}). El panel superior muestra los datos de los lagos juntos, los paneles inferiores muestran los datos de los lagos Escondido (izquierda) y Morenito (derecha). Los valores marcados con * corresponden al muestreo de marzo de 2010 (posterior al terremoto de Concepción, Chile) en ambos lagos no están incluidos en el análisis de regresión.



La biomasa de PCY no mostró una clara relación con la disponibilidad de luz verde (Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE}) analizando ambos lagos en conjunto (Figura II-34). Sin embargo, el análisis separado de los lagos mostró significancia positiva en el comportamiento de este grupo respecto a la disponibilidad de luz verde. Esto indica que a mayor disponibilidad de luz verde, mayor biomasa de PCY. En el Morenito se observó una relación más fuerte que en el Escondido.

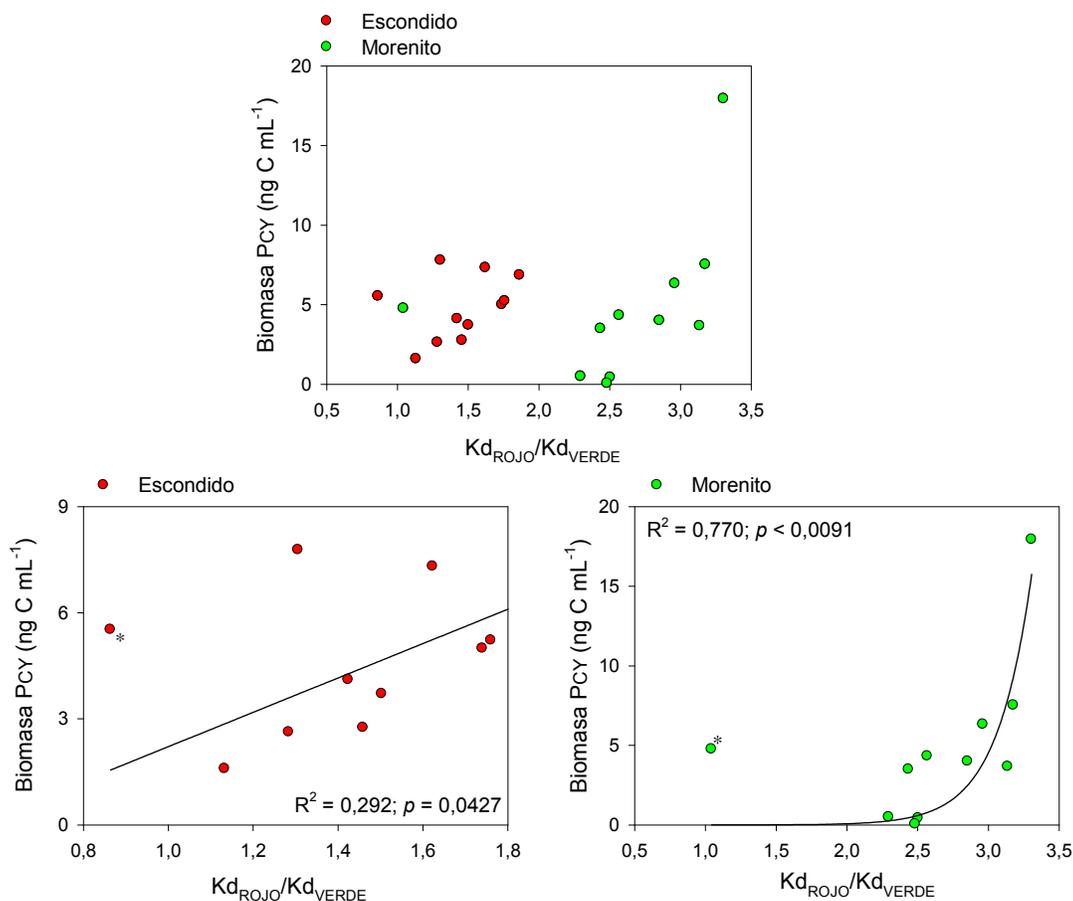


Figura II-34: Biomasa de PCY en relación a la disponibilidad de luz verde (Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE}). El panel superior muestra los datos de los lagos juntos, los paneles inferiores muestran los datos de los lagos Escondido (izquierda) y Morenito (derecha). Los valores marcados con * corresponden al muestreo de marzo de 2010 en ambos lagos (no están incluidos en la regresión).



La biomasa de PEUK presentó una relación significativamente inversa con el Kd_{RFA} , considerando los lagos juntos y separados. Esto indica que la biomasa aumenta con la reducción de la disponibilidad de la luz en la columna de agua (Figura II-35).

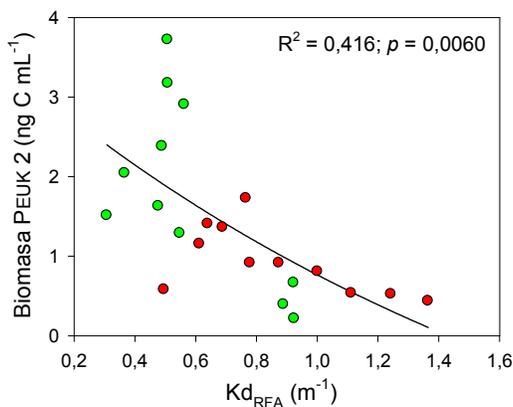


Figura II-35: Biomasa de PEUK en relación a la disponibilidad de radiación fotosintéticamente activa (Kd_{RFA}).

Se observó una relación inversa y significativa entre la biomasa de las Cryptophyceae y el Kd_{RFA} en ambos lagos. Es decir, que la biomasa de Cryptophyceae disminuyó con la reducción de la disponibilidad de la luz en la columna de agua. Como es esperable, esta relación fue significativamente positiva en relación a la I_m ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Por su parte, la biomasa de Chrysophyceae no varió significativamente en relación a la cantidad de luz disponible, ni con la I_m ($\mu\text{moles m}^{-1} \text{seg}^{-1}$; Figura II-36).

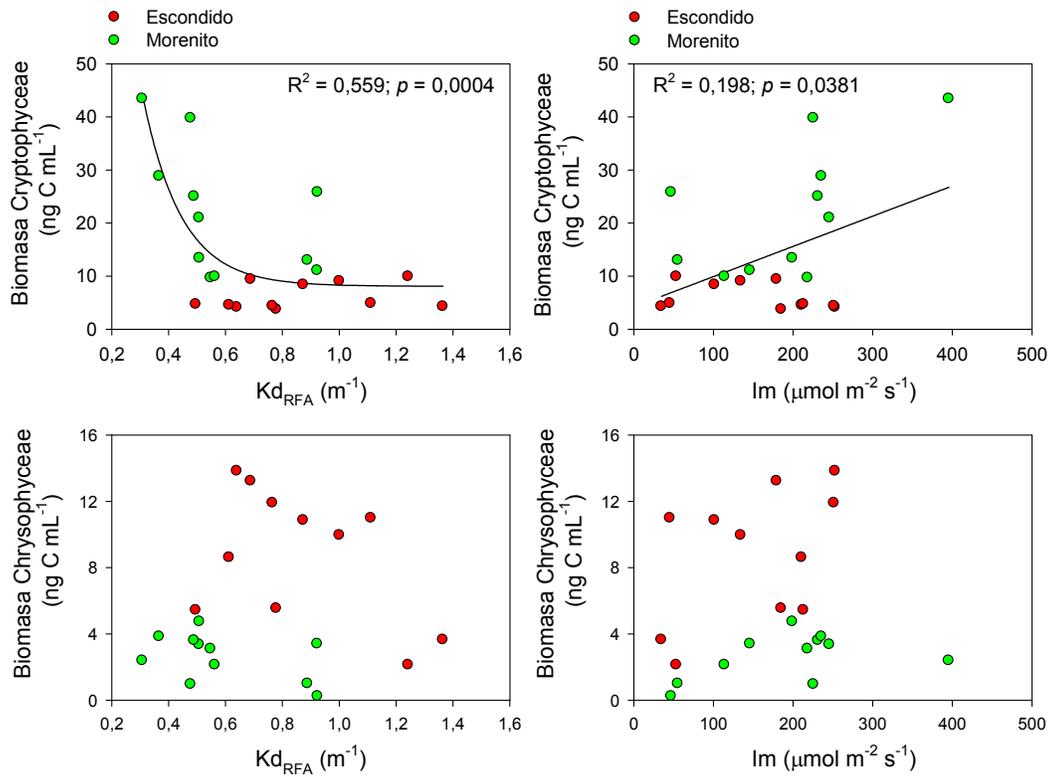


Figura II-36: Los paneles de la izquierda muestran la relación entre la biomasa de las Clases y el Kd_{RFA} , los paneles de la derecha muestran la relación entre la biomasa de las Clases y la I_m . Los paneles superiores muestran los datos de las biomazas de Cryptophyceae, los paneles inferiores muestran los datos de las biomazas de Chrysophyceae.

La biomasa de Cryptophyceae se relacionó positivamente con la disponibilidad de luz verde (Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE}), mientras que la biomasa de Chrysophyceae mostró una relación inversa y significativa (Figura II-37).

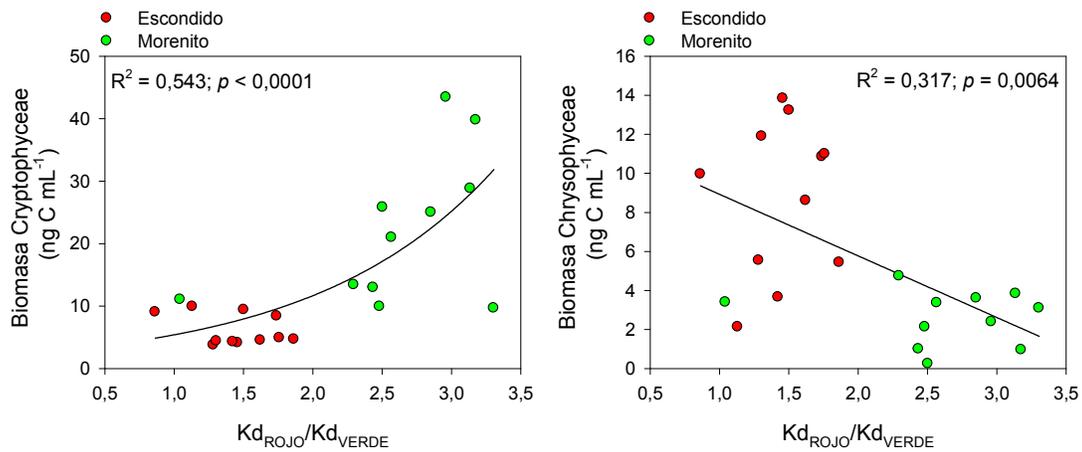


Figura II-37: El panel izquierdo muestra la relación entre la biomasa de las Cryptophyceae y la disponibilidad de luz verde (Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE}). El panel derecho muestra la relación entre la biomasa de las Chrysophyceae y la disponibilidad de luz verde (Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE}) en ambos lagos.

Para abrir la “caja negra” de los mixótrofos se analizó el comportamiento de las dos especies pertenecientes a la Clase Cryptophyceae (*P. lacustris* y *C. erosa*), en relación a dos variables de luz, el Kd_{RFA} y el Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE} . Se observó que *P. lacustris* respondió inversamente a la disponibilidad de luz (Kd_{RFA}), y positivamente en relación a la disponibilidad de luz verde (Figura II-38). Por su parte, *C. erosa* presenta un patrón similar con relaciones significativas tanto con el Kd_{RFA} , como con el Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE} (Figura II-38).

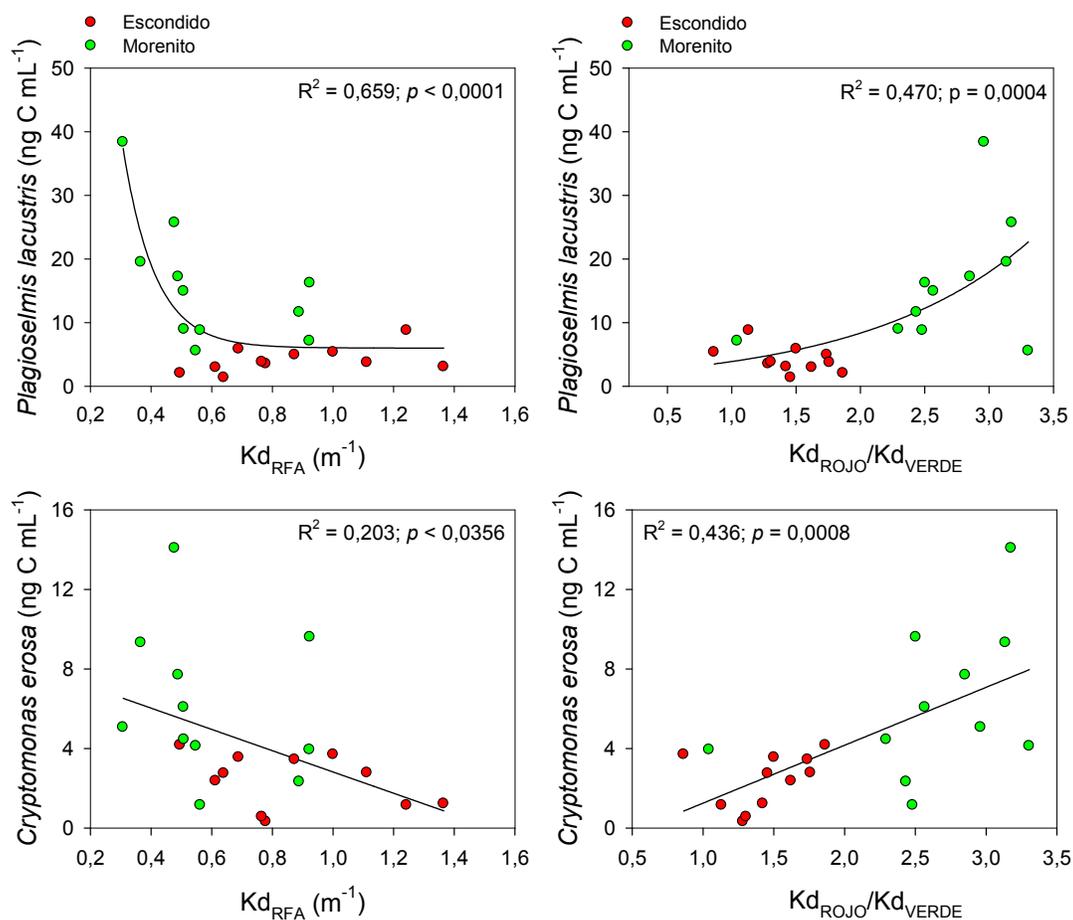


Figura II-38: Los paneles de la izquierda muestran la relación entre la biomasa de las especies y el Kd_{RFA} , los paneles de la derecha muestran la relación entre la biomasa de las especies y el Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE} . Los gráficos de arriba muestran los datos de las biomazas de *P. lacustris*, los gráficos de abajo muestran los datos de las biomazas de *C. erosa*.

La biomasa de Haptophyceae, representada únicamente por *C. parva*, estuvo positivamente relacionada con la temperatura del agua (Figura II-39). Además, esta especie también presentó una relación positiva y significativa con la concentración de PDT (Figura II-39).

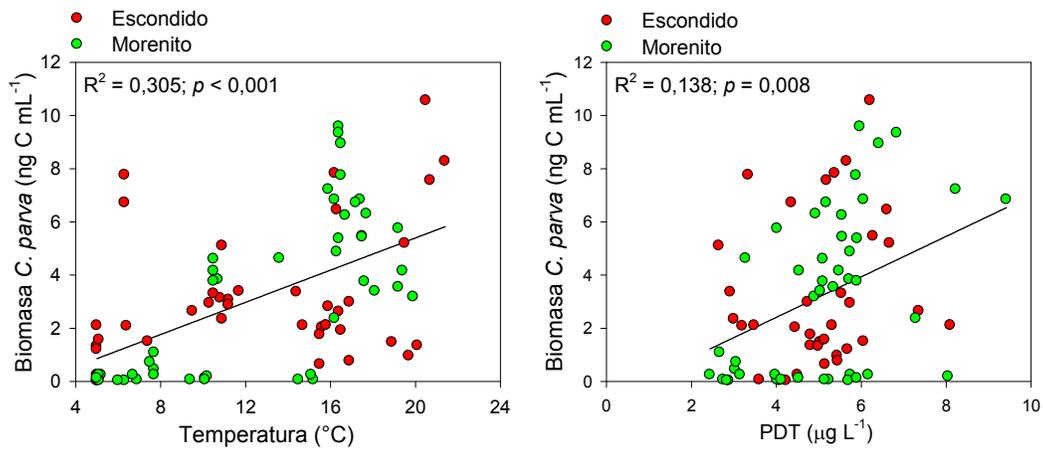


Figura II-39: Relación entre la biomasa de *C. parva* y la temperatura (a) y con la concentración de PDT (b).

La biomasa de las Dictyochophyceae, representada únicamente por *Pseudopedinella* sp. estuvo negativamente relacionada con la pendiente $S_{275-295}$ en ambos lagos (Figura II-40). Por su parte, la biomasa de *D. divergens* y *D. sertularia* se correlacionaron negativamente con la concentración del PDT (Figura II-41).

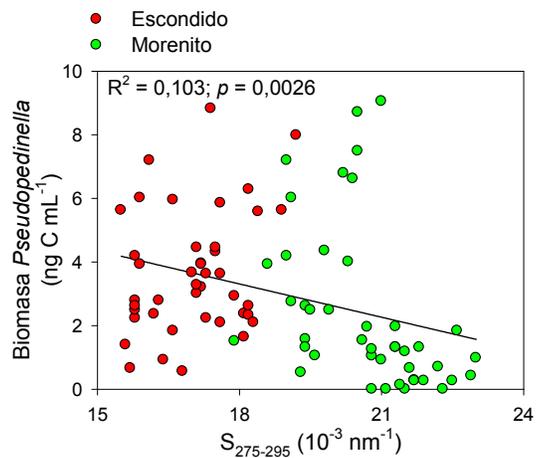


Figura II-40: Relación entre la Biomasa de las Dictyochophyceae y la pendiente $S_{275-295}$.

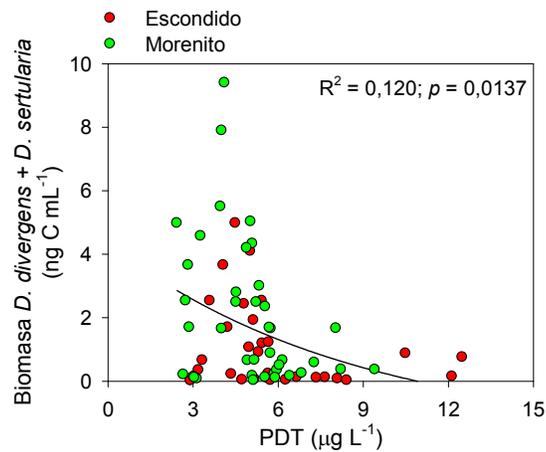


Figura II-41: Relación entre la biomasa de las *Dinobryon divergens* y *D. sertularia* y la concentración de PDT. *Referencias:* PDT: fósforo disuelto total.

II-4-5. Relaciones entre organismos

Las biomásas de *C. parva*, FHET <5 μm, y de *G. varians* se correlacionaron positivamente con la biomasa PCY ($\rho = 0,878$, $p < 0,001$; $\rho = 0,862$, $p < 0,001$, $\rho = 0,695$, $p = 0,017$, respectivamente; Figura II-42). Por su parte, *C. erosa*, Chrysophyceae >5 μm mostraron gráficamente una acople con las PCY como los dos grupos antes mencionados, pero sin significancia estadística detectable.

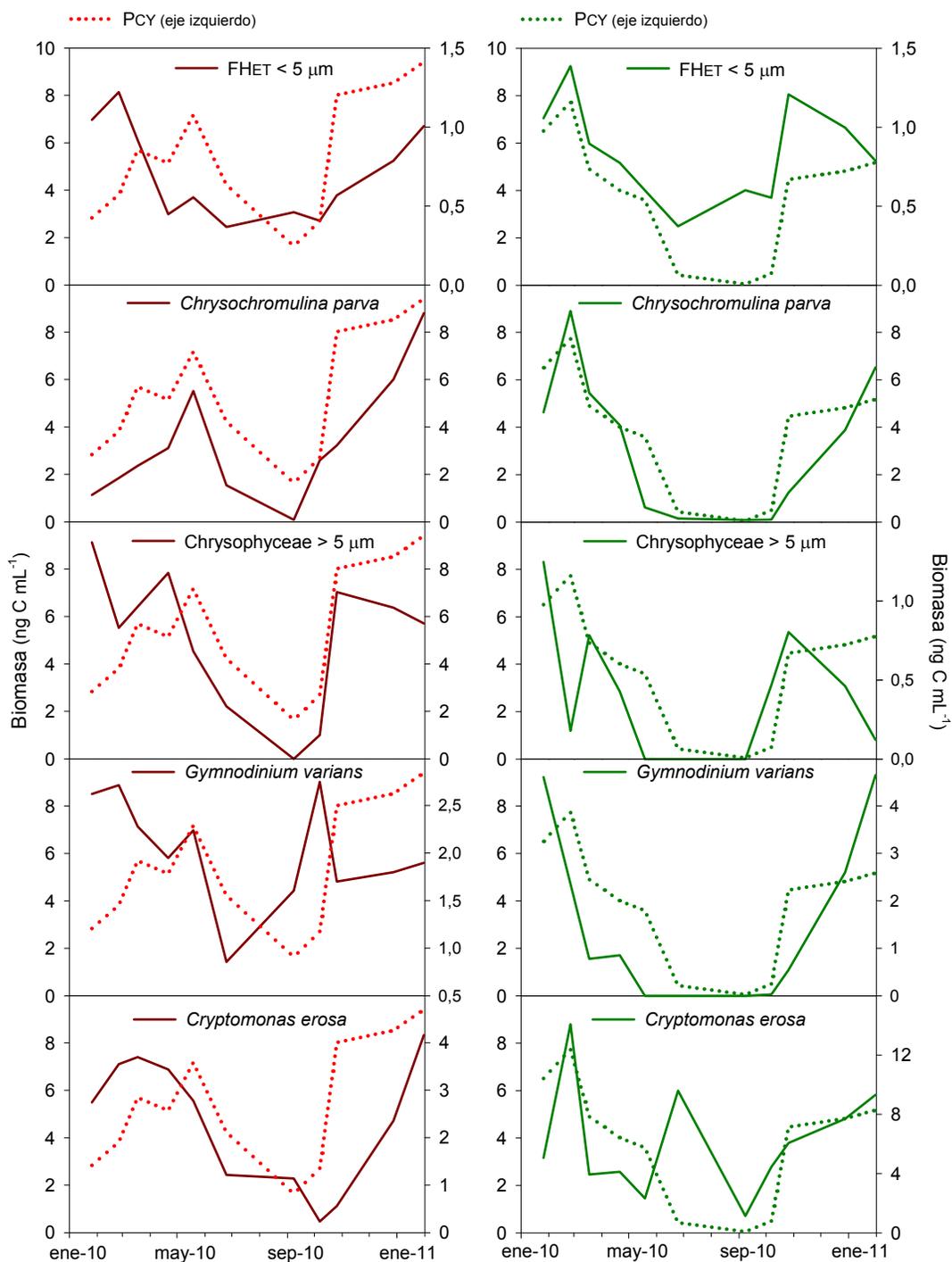


Figura II-42: Relación entre la biomasa de diferentes taxa mixotróficos y la biomasa de las PCY, a lo largo del tiempo en los dos lagos estudiados. *Referencias:* PCY: picocianobacterias.



Se encontró una relación significativa negativa entre las biomases de la Clase Cryptophyceae y Chrysophyceae (Figura II-43).

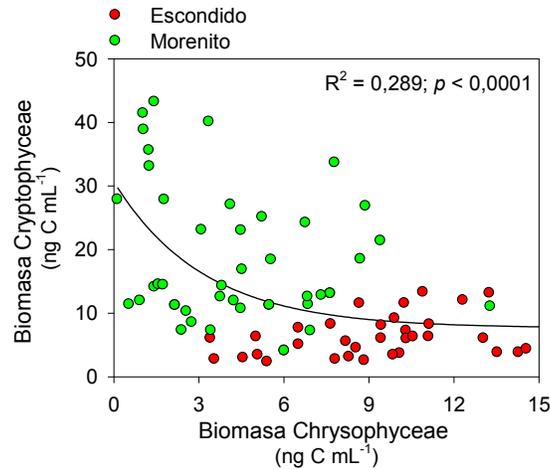


Figura II-43: Relación entre la biomasa de Cryptophyceae y Chrysophyceae en los dos lagos estudiados.

Se encontró un acoplamiento entre la variación de la biomasa de los Cladóceros y de las Cryptophyceae a lo largo del año, tal como se observó para algunas especies mixotróficas con las PCY (Figura II-44).

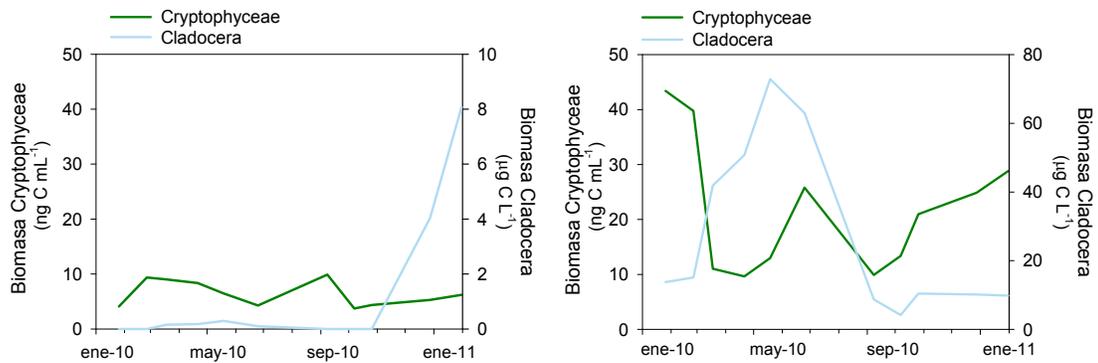


Figura II-44: Relación entre la biomasa de los cladóceros y la biomasa de las Cryptophyceae a lo largo del tiempo en los dos lagos estudiados.



II- 5. Discusión

La variación concurrente de una o más series de datos en el tiempo entre dos o más ecosistemas se denomina **sincronía** (Pace y Cole, 2002). Muchas de las variables abióticas determinadas en este estudio, presentaron fluctuaciones temporales sincrónicas o semejantes en ambos lagos (e.g. temperatura, color, $S_{275-295}$). Esto sería un indicio de que algún factor externo de alcance regional (i.e. climático), está afectando de manera similar a ambos cuerpos de agua, como se ha visto en otros estudios (Baines et al., 2000; Kling et al., 2000; Pace y Cole, 2002). En particular, los incrementos de las concentraciones de nutrientes (PT, PDT, PRS, NDT) registrados durante marzo 2010 en ambos lagos, podrían estar relacionados con los efectos del fuerte terremoto ocurrido en Concepción (Chile), 20 días previos al muestreo. En este sentido, otros trabajos mostraron que los terremotos o tormentas fuertes (i.e. huracanes) provocan resuspensión de sedimentos y material disuelto y, por lo tanto un efecto directo sobre la claridad del agua y liberación de nutrientes a la columna de agua (Conmy et al., 2009; Pawlowski et al., 2013). Este patrón de incremento de nutrientes, del color y del Kd_{RFA} fue observado en Escondido y Morenito durante esa fecha. Particularmente, la resuspensión de sedimentos atribuida al terremoto presentó mayor efecto relativo en el Kd_{RFA} del lago Morenito que en aquel del Escondido, y esto podría estar asociado a características propias del sedimento de cada lago.

Considerando que las características climáticas del área donde se ubican estos lagos presentan la estación seca durante el verano, la variación del color del agua, el Kd_{RFA} y el tamaño molecular de la MOD en estos ambientes, resultó ser también estacional. En invierno se registraron los valores más elevados de Kd_{RFA} en ambos lagos, los que estuvieron positivamente correlacionados con las intensas lluvias debido al efecto de la escorrentía que incorpora sedimentos al lago, MOD alóctona de alto peso molecular, y a su vez aumentó el color del agua. Esto coincide con la relación significativa encontrada entre el color del agua y el tamaño molecular de la MOD. Contrariamente, durante los meses de verano, además de no haber ingreso de material alóctono debido a que es la época seca, la alta irradiancia solar provoca la fotodegradación de la MOD existente en el cuerpo de agua y, debido al aumento de la temperatura, es esperable que



también aumente la actividad de degradación biológica sobre la MOD (Reche et al., 2000). Todo esto provocaría la reducción del tamaño de la MOD y consecuentemente del color del agua.

La principal diferencia en la composición química del agua entre los dos lagos estuvo asociada al contenido de MOD, ya que la concentración de COD del Escondido fue en promedio el doble que la del Morenito, consistentemente con los registros previos (Morris et al., 1995; Alonso et al., 2004; Bastidas Navarro et al., 2009; Pérez et al., 2010). Sin embargo, a pesar de que la MOD representa la principal fuente de carbono y energía para las BACT (Blomqvist et al., 2001; Jansson et al., 2006), estas diferencias en la MOD no se reflejaron en la biomasa de BACT, la cual fue similar en ambos lagos.

La relación Color:Cl_a sugiere un mayor grado de aloctonía en el lago Escondido respecto al Morenito, es decir que la contribución de la MOD de origen terrestre es mayor en el lago Escondido que en el Morenito. Esta diferente proporción entre la MOD de origen alóctono vs. autóctono implica además una diferencia en la calidad de la MOD entre ambos lagos. Pérez y Sommaruga (2006) comprobaron que la capacidad de las BACT para procesar la MOD de los diferentes orígenes (autóctona y alóctona) varía sustancialmente, siendo mucho más eficientes al procesar el carbono derivado de las algas que la MOD de origen terrestre. Una evidencia indirecta de este hecho, es la relación positiva que se encontró entre biomasa de BACT y la pendiente $S_{275-295}$ (inversamente relacionada con el tamaño molecular de la MOD) y la relación negativa entre biomasa de BACT y el color del agua. Por lo tanto, a pesar de que el lago Escondido posee una concentración de MOD mayor, la menor calidad de la MOD explicaría la falta de diferencia entre la biomasa bacteriana de ambos lagos. Una explicación alternativa podría estar relacionada con la fuerte limitación por nutrientes existentes en estos lagos (Diaz et al., 2007), la cual podría restringir el crecimiento bacteriano independientemente de la concentración de MOD que tenga el lago (Farjalla et al., 2002; Jansson et al., 2006).

Aplicando los conceptos analizados por De Lange et al. (2003), la MOD del Escondido sería más fotolábil (degradable fotoquímicamente) que biolábil (degradable biológicamente), debido a su gran tamaño molecular. Esta



característica la convertiría en un recurso de carbono poco disponible para la utilización bacteriana. Por su parte, el Morenito presenta mayor proporción de MOD biolábil, más accesible, comparativamente, para el consumo bacteriano que la del Escondido. Esta podría ser otra de las razones por las que no se observa diferencia entre la biomasa de BACT entre ambos lagos.

Tal como se planteó en la Introducción General, según R. Jones (1992) una elevada concentración de MOD posee un doble efecto negativo sobre el fitoplancton autotrófico, ya sea, (1) debido a la disminución de la penetración de la luz por el aumento del color del agua, o bien (2) favoreciendo el crecimiento de las BACT, que son sus principales competidores por los nutrientes. En este escenario, el modelo conceptual planteado por R. Jones (2000) predice que la biomasa de algas mixotróficas sería mayor en lagos con mayor concentración de MOD (e.g. Escondido), mientras que los lagos con baja concentración de MOD estarían dominados por fitoplancton autotrófico (e.g. Morenito).

Contrariamente a esta hipótesis, la biomasa de BACT fue similar entre los lagos. Sin embargo, ambos ambientes se encuentran fuertemente limitados por la baja concentración de nutrientes (Diaz et al., 2007). Bajo estas condiciones, las BACT suelen ser mejores competidores que el fitoplancton autotrófico, debido a las altas tasas de captación de nutrientes (Currie y Kalff, 1984). En consecuencia, el crecimiento del fitoplancton autotrófico se ve severamente limitado por la escasez de nutrientes, favoreciendo el desarrollo de aquellas algas fitoplanctónicas (e.g. mixotróficas) que puedan obtener nutrientes de una fuente alternativa (Bergström et al., 2003).

A diferencia de lo planteado por R. Jones (2000), más del 80 % de la biomasa fitoplanctónica de ambos lagos estuvo dominada por algas mixotróficas, principalmente Chrysophyceae, Cryptophyceae, Haptophyceae y Dictyochophyceae. Diversos trabajos demostraron que la mixotrofia, siendo una estrategia generalista, es más eficiente y desplaza competitivamente a los organismos especialistas, autótrofos y heterótrofos estrictos, en condiciones de baja disponibilidad de recursos, principalmente nutrientes (Bergström et al., 2003; Tittel et al., 2003; Katechakis y Stibor, 2006). En el caso estudiado, las algas mixotróficas en ambos lagos representaron siempre más del 50 % (promedio



70 %) de la biomasa total de bacterívoros (FHET + FMIX + ciliados), especialmente en los períodos de mayor radiación disponible. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la mixotrofia sería el modo de nutrición más exitoso dentro del nano-microplancton en los dos ambientes estudiados.

A pesar de la dominancia de algas mixotróficas y de que su composición fue similar en ambos lagos, la abundancia relativa de las especies dominantes difirió significativamente en cada uno de los ambientes a lo largo del año: las Cryptophyceae dominaron en el lago Morenito, mientras que las Chrysophyceae dominaron en el Escondido; en tanto que las abundancias promedio de Dictyochophyceae y Haptophyceae fueron similares en ambos lagos.

Estas diferencias en la composición algal implican además diferencias en el modo de nutrición dominante en cada uno de los ambientes. Según la revisión de H. Jones (1997) las Cryptophyceae serían primariamente autotróficas, mientras que las Chrysophyceae serían algas cuyo principal modo de nutrición sería la heterotrofia (Figura II-2). En el Capítulo III de esta Tesis se analizará experimentalmente el grado de bacterivoría de las principales especies mixotróficas aquí encontradas. Aunque podríamos anticipar que los resultados de dicho Capítulo avalan la clasificación propuesta por H. Jones (1997). Por lo tanto, en cierto modo la predicción de R. Jones (2000) de esperar mayor abundancia de algas autotróficas en lagos con poca MOD, se cumple parcialmente, si consideramos el distinto grado de heterotrofia o autotrofia de las algas mixotróficas dominantes en cada lago.

Otra posible explicación de estas diferencias en la composición, y sobre todo de la relación inversa encontrada entre las biomásas de Chrysophyceae y Cryptophyceae en función del color del agua, podrían deberse a diferencias en las preferencias por el ambiente lumínico.

Zohary et al. (2010) afirma que diferencias en la intensidad de luz, así como en la composición espectral de la misma, crea “nichos lumínicos” y cada variación de estos parámetros puede promover el reemplazo de especies fitoplanctónicas. Trasladando esta idea a nuestros resultados, podría decirse que si bien la Im fue muy similar entre los lagos estudiados, la calidad de la luz o clima óptico fue



diferente. Esta diferencia se debería al efecto que causa la cantidad y la composición de la MOD presente en cada ambiente, lo cual estaría determinando al menos parcialmente, la composición fitoplanctónica diferencial observada. Esto apoyaría la **Hipótesis** planteada en este Capítulo.

El fitoplancton presenta numerosos pigmentos capaces de capturar la radiación solar visible incidente en un cuerpo de agua. De acuerdo al tipo y a la combinación de pigmentos que presente un alga, es posible clasificarla taxonómicamente. Además de la Cl a, existen otros pigmentos accesorios como las ficobilinas (ficoeritrina y ficocianina), que suelen estar presentes en cianobacterias y Cryptophyceae. Dichos pigmentos permiten capturar los fotones de las longitudes de ondas del verde-amarillo (ficoeritrina) y anaranjado (ficocianina) (500-640nm), transmitiendo luego la energía a la Cl a (Striebel, 2008). Dentro de las picocianobacterias, se pueden distinguir dos grupos principales de acuerdo a la composición pigmentaria: células ricas en ficoeritrinas y células ricas en ficocianina. Cada uno de estos grupos es más eficiente en la absorción de un determinado tipo de luz. Callieri et al. (1996) demostraron que las longitudes de onda del verde y del rojo son mejor absorbidas por la ficoeritrina y la ficocianina de las picocianobacterias que por otros pigmentos. Las picocianobacterias ricas en ficoeritrina absorben muy eficientemente la luz verde (550 nm), mientras que aquellas ricas en ficocianina son muy eficientes absorbiendo la luz roja (660 nm) (Stomp et al., 2007). La presencia de este tipo de pigmento también ha sido descrita para cianobacterias fijadoras de nitrógeno en condiciones de limitación por luz (de Tezanos-Pinto y Litchman, 2010).

Vörös et al. (1998) propusieron el cociente Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE} como un indicador de la radiación dominante bajo el agua. Valores <1 indican una predominancia de radiación roja, mientras que por el contrario valores >1 indican que la radiación dominante bajo el agua sería la verde. Estos autores observaron que el porcentaje de picocianobacterias ricas en ficoeritrina respecto del total de picocianobacterias aumenta con el incremento de este cociente, es decir, con el incremento de la luz verde disponible. Nuestros resultados indican que el lago Morenito siempre presenta mayor cociente Kd_{ROJO}/Kd_{VERDE} , es decir mayor disponibilidad de luz verde que el Escondido.



Al igual que las picocianobacterias, las Cryptophyceae presentes en estos dos lagos, *P. lacustris* y *C. erosa*, también presentan ficoeritrina como pigmento accesorio (Guiry y Guiry, 2013). Por lo tanto, es esperable que estas dos especies se vean favorecidas diferencialmente ante mayor disponibilidad de luz verde, en comparación con las demás especies fitoplanctónicas que carecen de estos pigmentos accesorios. Esto podría explicar en parte su mayor abundancia en el lago Morenito respecto del Escondido.

Las PCY (fundamentalmente *Synechococcus* sp. de acuerdo con Callieri, 2007) también se vieron beneficiadas con el incremento de la disponibilidad de luz verde, mientras que las PEUK 2 se vieron beneficiadas con la disminución del Kd_{RFA} en ambos lagos. Además, se ha encontrado en otros ambientes que la baja luz y la baja concentración de PDT puede interactuar para crear condiciones más favorables para el desarrollo de organismos fotosintéticos pequeños (Callieri, 2007).

Asociaciones entre *Synechococcus* sp. y algunas especies mixotróficas han sido observadas previamente en lagos oligotróficos, sugiriendo una posible interacción depredador-presa (Callieri et al., 2006). Este tipo de asociaciones también se hallaron en los lagos Escondido y Morenito, entre algunas de las especies mixotróficas (*C. parva*, *C. erosa*, *P. lacustris*, y *G. varians*) y *Synechococcus* sp. Esta posible relación depredador-presa será analizada en mayor profundidad en el Capítulo III de esta Tesis.

Las mayores abundancias de *C. parva* (Haptophyceae) ocurrieron en época estival, mientras que en invierno esta especie estuvo prácticamente ausente en ambos lagos. Algunos estudios sobre especies del género *Chrysochromulina* en el mar, han indicado que estas especies aumentan su crecimiento con el incremento de la temperatura hasta 20°C (Rhodes y Burke, 1996; Dahl et al., 2005), mientras que estudios específicos sobre *C. parva* indican una relación positiva entre la tasa de crecimiento y la temperatura, aunque el óptimo se encontraría por debajo de los 20°C (Nicholls, 2003). Esto explicaría la relación positiva encontrada con la temperatura del agua en los ambientes aquí estudiados. Asimismo, se observó que el incremento de nutrientes en el lago favorecería el desarrollo de *C. parva* (Nicholls, 2003), lo cual explicaría la relación



positiva encontrada con el PDT. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que esta especie es capaz de sobrevivir e incluso de dominar la comunidad bajo situaciones de limitación por nutrientes (Andersson et al., 1996; Hajdu et al., 1996; Samuelsson et al., 2002), debido a su capacidad mixotrófica que le permite obtener nutrientes de la ingesta de bacterias.

Pseudopedinella sp. estuvo presente la mayor parte del tiempo aunque fue poco abundante en los dos lagos, tal como se observó en otros lagos oligotróficos en el mundo (Havskum y Riemann, 1996; Isaksson et al., 1999; Gereá et al., 2013). *Pseudopedinella* sp. mostró una relación positiva con la Im, lo que concuerda con estudios realizados por Ostroff et al. (1980), quienes observaron que la intensidad de la luz favorece su desarrollo. Si bien, este género crece autotróficamente en condiciones de saturación de nutrientes, es capaz de ingerir bacterias bajo condiciones de limitación por nutrientes (Nygaard y Tobiesen, 1993; Vähätalo et al., 2011).

La biomasa de *Dinobryon divergenes* y *D. sertularia* en este estudio estuvo correlacionada negativamente con la concentración de PDT. Estudios previos han asociado a este género con procesos de oligotrofización, donde la reducción de la carga de nutrientes (particularmente del fósforo biodisponible) y el incremento de la disponibilidad de luz en la columna de agua favorece el crecimiento de estas algas (Kamjunke et al., 2007). Estos dos factores están asociados a la utilización por un lado de la capacidad bacterívora, como captadora de nutrientes, y por el otro de la capacidad fototrófica de esta especie, para fijar carbono. La necesidad de fotosintetizar para compensar los requerimientos de carbono, que resultan insuficientes de la ingesta de presas, ha sido propuesta hace al menos dos décadas (Caron et al., 1993; R. Jones y Rees, 1994; H. Jones, 1997).

Debido al gran tamaño de las colonias de *Dinobryon*, estas algas suelen considerarse como inaccesibles (“inedible”) para el zooplancton (Domaizon et al., 2005). En consecuencia, representan una “trampa de nutrientes y de carbono”. Sin embargo, estas dos especies representaron en promedio menos del 4 % de la biomasa total de bacterívoros durante todo el año, aunque adquirieron mayor relevancia durante el invierno y la primavera, fundamentalmente en el Morenito. A



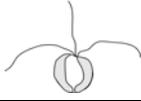
pesar de ello, debido a su baja biomasa promedio anual, resulta poco esperable que haya una gran pérdida de nutrientes por causa de estas especies.

En relación al zooplancton, su abundancia total fue similar entre los lagos, aunque debido a la diferente composición de los grupos dominantes, la biomasa total fue muy distinta entre ellos. El lago Morenito estuvo dominado por cladóceros y la biomasa de zoopláncteres fue 10 veces mayor que en el Escondido, donde dominaron rotíferos. Esta diferencia en la composición y principalmente en la biomasa podría estar relacionada con la disponibilidad y calidad de alimento para el zooplancton en cada ambiente. Sin embargo, habría que considerar a la depredación por peces como un factor que también puede determinar la composición específica de un grupo, y que excede el análisis de esta Tesis.

Se ha postulado que el mantenimiento de una alta tasa de crecimiento, supervivencia y reproducción, así como la alta eficiencia de conversión de alimentos para una amplia variedad de organismos marinos y lacustres (e.g. zooplancton), están fuertemente relacionados con la adquisición de ácidos grasos poli-insaturados (conocidos como “*PUFA*” -*poly-unsaturated fatty acids*-) (Brett y Müller Navarra, 1997). La selectividad de presas en función de la presencia de estos *PUFA*, ha sido estudiada en la alimentación de cladóceros y copépodos (Burns et al., 2011). Estos dos grupos de zoopláncteres requieren del aporte de estos *PUFA* mediante el alimento que ingieren, ya que no pueden sintetizarlos. Todas las algas presentan estos ácidos grasos, aunque en distintas proporciones. Dentro de las Clases algales, las Cryptophyceae son las que mayor cantidad de *PUFA* presentan, particularmente *Cryptomonas* sp. y *Plagioselmis* sp. (Brett y Müller Navarra, 1997; Brett et al., 2000; Burns et al., 2011). Además, la influencia de la calidad de la luz a la que están sometidos los organismos fotosintéticos altera su calidad como alimento (Pommier et al., 2012). En particular, se ha comprobado que la síntesis de ácidos grasos en los productores primarios se basa en la energía proporcionada por el NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) que es generada durante la fotosíntesis (Wainman et al., 1999), de modo que la producción de lípidos tiende a aumentar con el aumento de la intensidad del RFA (Pommier et al., 2012). La gran diferencia de biomasa de zooplancton encontrada entre Escondido y Morenito, podría estar relacionada con



la diferente calidad de alimento disponible para el zooplancton en cada lago. Así, la mayor biomasa de zoopláncteres en Morenito debida a la mayor presencia de cladóceros, podría estar asociada a la dominancia de las Cryptophyceae en este lago.



CAPÍTULO III

Actividad fagotrófica de algas mixotróficas en dos lagos someros oligotróficos





III- 1. Introducción

La bacterivoría en especies de algas mixotróficas ha sido estudiada más intensivamente durante las últimas tres décadas (Bird y Kalff, 1986). Mediante experimentos de campo, numerosos trabajos han analizado las tasas de ingestión de diferentes FHET y FMix sobre BACT marcadas fluorescentemente (BMF; su sigla en inglés “FLB”) (Nygaard y Tobiesen, 1993; Caron et al., 1993; Šimek et al., 1997; Queimaliños et al., 2002; Jezbera et al., 2003). La mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de las tasas de bacterivoría de los FHET y FMix estudiándolos a cada uno como un grupo, o en algunos casos discriminándolos en grupos de diferentes tamaños (Christaki et al., 1999; Unrein et al., 2007; Tsai et al., 2011).

En ocasiones, se han determinado tasas de depredación específicas de FMix utilizando especies de cultivo, comúnmente *Ochromonas* sp. y *Poterochromonas* sp. (Porter et al., 1988; Tranvik et al., 1989; Sanders et al., 1990), o analizando experimentalmente algún taxón de particular relevancia en un ambiente determinado (Unrein et al., 2010), o especies que provocan floraciones algales (Nygaard y Tobiesen, 1993; Jeong et al., 2005 a, b; Seong et al., 2006). A partir de estos estudios se ha observado que especies de algas mixotróficas pertenecientes a diferentes Clases algales (e.g. Chrysophyceae, Cryptophyceae) pueden presentar diferente grado de bacterivoría, implicando un efecto diferencial de depredación sobre una determinada comunidad de presas (e.g. bacterioplancton). Sin embargo, son muy pocos los trabajos en donde se discrimina la actividad fagocítica de distintos taxa *in situ*. Los escasos estudios llevados a cabo en el mar muestran que las Haptophyceae serían los bacterívoros más importantes entre las algas mixotróficas (Havskum y Riemann, 1996; Unrein et al., 2013). Mientras que los pocos estudios realizados en lagos hasta el momento, no muestran un patrón tan homogéneo, sino que el impacto es mucho más variable dependiendo del ambiente y del alga mixotrófica dominante en cada caso (Sanders et al., 1989; Domaizon et al., 2003; Pålsson y Granéli, 2003), aunque se evidencia un impacto significativo de las Chrysophyceae en lagos oligotróficos.



Existen varios métodos para determinar la bacterivoría de los flagelados en un ambiente acuático (Vaqué et al., 1994). Sin embargo, los más comúnmente utilizados son dos: (a) las experiencias de corto tiempo en las que se estiman tasas de ingestión con microesferas de látex (en inglés denominadas “beads”) o BACT marcadas fluorescentemente o radiactivamente (James et al., 1996; González et al., 1999; Safi y Hall, 1999; Ichinotsuka et al., 2006), y que permiten calcular tasas de depredación específicas de distintos taxa; (b) las experiencias de largo tiempo son aquellas en las que se determina la tasa de desaparición de presas marcadas (microesferas de látex o BACT marcadas fluorescentemente o radiactivamente) como resultado del impacto de la depredación de toda la comunidad bacterívora de un ambiente (FMix, FHET y ciliados; Unrein et al., 2007).

Además de las BACT, las algas picoplanctónicas (PCY y PEUK) también pueden ser potenciales presas para los bacterívoros. Los escasos estudios que han abordado el análisis de la selectividad de presas (BACT vs. PCY) demostraron una preferencia por las PCY, por parte de los FHET, ciliados y dos especies de Cryptophyceae (Šimek et al., 1995, 1996; Pernthaler et al., 1996; Tarbe et al., 2011; Izaguirre et al., 2012). A excepción del estudio de Izaguirre et al. (2012), no existen registros de la selectividad *in situ* de presas de distinto tamaño por parte de distintos taxa de protistas mixotróficos.

Un análisis de las tasas de bacterivoría de los FMix y FHET en los lagos Morenito y Moreno Oeste durante un período estival, indicó que la bacterivoría debida a mixótrofos era la prevalente en estos ecosistemas (Queimaliños, 2002). La autora resaltó la importancia de *C. parva* y *D. divergens* como bacterívoros en estos dos ambientes. Más recientemente, un análisis del efecto de la radiación UV sobre la capacidad bacterívora y fotosintética de los organismos mixotróficos en el lago Escondido demostró que el aumento de la radiación UV reduce las tasas de ingestión de BACT por parte de FMix y FHET (Bastidas Navarro et al., 2011). Estos antecedentes destacan la importancia de la mixotrofia en estos dos ambientes. Sin embargo, aún se desconoce la importancia relativa de la bacterivoría debida cada uno de los taxa de FMix.



Como se describió en el Capítulo II de esta Tesis, la estructura de la comunidad fitoplanctónica de los lagos Escondido y Morenito, está dominada por FMix (>70% del nanoplancton). Además, se observa una variación estacional de la composición del fitoplancton. Por este motivo, y dada la relevancia de las especies mixotróficas en estos ambientes se propone evaluar cuál es y cómo varía la contribución que cada uno de estos taxa a la bacterivoría total de los mismos. Además, se pretende conocer si los FMix y FHET presentan algún tipo de preferencia entre las presas de distinto tamaño disponibles en el ambiente natural (BACT, PCY y PEUK).

El Objetivo General del presente Capítulo es analizar la actividad fagotrófica de los principales taxa de algas mixotróficas en los lagos Escondido y Morenito, y evaluar la selectividad en relación al tamaño y tipo de presas.

Objetivos específicos

- 1- Determinar detalladamente la actividad fagotrófica sobre diferentes tamaños y tipos de presas (BACT, PCY y PEUK) por parte de los diferentes taxa de FMix y FHET en los distintos ambientes.
- 2- Comparar las tasas de bacterivoría entre los distintos taxa mixotróficos y heterotróficos.
- 3- Determinar la contribución de los distintos FMix y FHET a la bacterivoría total en los ambientes seleccionados.
- 4- Evaluar la selectividad de presas por parte de los distintos taxa de FMix y FHET.



Hipótesis y predicciones

Hipótesis 1: Los taxa mixotróficos dominarán la bacterivoría de los ambientes limitados por nutrientes debido a su doble estrategia de nutrición.

Predicción: Escondido y Morenito son dos lagos oligotróficos donde el fitoplancton está limitado por nutrientes, los taxa que dominarán la bacterivoría de estos ambientes serán mayormente mixotróficos en lugar de heterotróficos durante todo el año.

Hipótesis 2: Las tasas de bacterivoría variarán entre los distintos taxa mixotróficos, encontrándose un espectro de bacterivoría desde los taxa más bacterívoros (menos autotróficos), con tasas comparables a los FHET, hasta los menos bacterívoros (más autotróficos).

Predicción: Las especies *P. lacustris*, *C. erosa* (Clase Cryptophyceae) presentarán tasas de bacterivoría menores (asociada a su capacidad más autotrófica) que las especies *O. ovalis*, *D. divergens* (Clase Chrysophyceae).

Hipótesis 3: Los distintos flagelados tendrán un rango de preferencia de tamaños de presas que pueden ingerir, el cual estará asociado con el tamaño del depredador.

Predicción: Los taxa de menor tamaño como *C. parva*, *O. ovalis* y los FHET <5 μm , preferirán ingerir las presas de menor tamaño (bacterias), mientras que los flagelados de mayor tamaño *Pseudopedinella* sp., *C. erosa*, *P. lacustris* preferirán ingerir presas de mayor tamaño (PCY y/o PEUK).



III- 2. Materiales y métodos

III-2-1. Obtención de las muestras

Las experiencias se realizaron estacionalmente a lo largo de un ciclo anual en cada uno de los lagos estudiados. Las muestras de agua para cada experiencia fueron obtenidas a 3 m de profundidad durante los muestreos mensuales, descritos detalladamente en el Capítulo II. Las muestras fueron filtradas a través de una red de 200 μm lenta y cuidadosamente para evitar el daño a los organismos. El agua filtrada fue colectada en bidones de polipropileno de 5 litros de capacidad, los cuales fueron previamente lavados con ácido clorhídrico al 10 % y agua destilada en el laboratorio, y enjuagados con agua del mismo lago antes de comenzar con la recolección. Una alícuota de cada muestra fue fijada inmediatamente con glutaraldehído frío previamente filtrado por 0,2 μm (concentración final 1 %) para la cuantificación de picoplancton y nanoplancton. Las muestras fueron transportadas de inmediato al laboratorio en oscuridad y frío.

III-2-2. Preparación de las presas marcadas fluorescentemente (PMF)

Para las experiencias se utilizaron tres tipos de presas de diferente tamaño, las cuales fueron obtenidas a partir de cultivos, y marcadas con una sustancia fluorescente. En el laboratorio, se prepararon:

a) BACT marcadas fluorescentemente (BMF) a partir de una cepa de *Brevundimonas diminuta* (syn. *Pseudomonas diminuta*) de biovolumen $\sim 0,09 \mu\text{m}^3$. El cultivo fue obtenido de la “Colección Española de Cultivos Tipo” (Burjassot, Valencia, España). *B. diminuta* ha sido utilizado en varias ocasiones para preparar BMF (e.g. Vázquez-Domínguez et al., 1999) debido a su pequeño tamaño, comparable al de las poblaciones de bacterias nativas (Unrein et al., 2007).

b) PCY marcadas fluorescentemente (CMF) a partir de un cultivo de *Synechococcus* sp, con un biovolumen de aproximadamente $0,72 \mu\text{m}^3$. El cultivo fue provisto por la Dra. Sylvia Bonilla de la Universidad de la República, Uruguay.



c) Algas PEUK marcadas fluorescentemente (AMF) a partir de un cultivo de *Parachlorella kessleri*, con un biovolumen de $\sim 13,5 \mu\text{m}^3$. El cultivo fue provisto por la Dra. Ángela Juárez de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

La preparación de las PMF se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sherr et al. (1987). Las BACT crecidas en placas fueron resuspendidas en un *buffer* carbonato-bicarbonato ($\text{CO}_3\text{Na}_2\text{-HCO}_3\text{Na}$, pH 9,5), mientras que los cultivos en medio líquido de PCY y de algas PEUK fueron concentrados por centrifugación, y todos fueron teñidos con 100 pg mL^{-1} de DTAF (5-([4,6 diclorotriazin-2-yl]-amino)-fluoresceína) durante toda la noche en un baño de agua a 60°C . Posteriormente, las células teñidas fueron centrifugadas y resuspendidas en *buffer* carbonato-bicarbonato cinco veces (10 min, 10.000 rpm) a fin eliminar los residuos de DTAF del concentrado para evitar la tinción de las muestras naturales. El concentrado fue alicuotado y congelado a -20°C hasta su utilización.

III-2-3. Diseño experimental y procesamiento de las muestras

Se realizaron dos tipos de experiencias a partir de un mismo diseño experimental: *Experiencias de corto tiempo o de ingestión* (40 minutos de duración) y *Experiencias de largo tiempo o de desaparición* (48 hs de duración).

A partir de las *Experiencias de corto tiempo* fue posible obtener tasas de ingestión específicas para los flagelados más abundantes en cada momento del año. A partir de las *Experiencias de largo tiempo* se obtuvieron tasas de decaimiento o de desaparición de las PMF, que permitieron estimar el impacto de depredación del ensamble de organismos bacterívoros $<200 \mu\text{m}$ (flagelados, ciliados y algunos rotíferos) en cada estación del año.

Los experimentos se llevaron a cabo en una incubadora Sanyo MLR-350 con control de luz y de temperatura. La incubadora fue programada con el fotoperíodo correspondiente a la fecha del experimento y la temperatura del lago a la profundidad muestreada. La intensidad de la luz fue fijada en $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, este valor fue equivalente a la luz recibida en el lago a la profundidad aproximada de 1 a 3 m en el Escondido y de 2 a 4 m en el Morenito durante todo el año. El agua filtrada se mantuvo en la incubadora en las condiciones experimentales



hasta el inicio del experimento, el cual comenzó entre 3 y 4 horas después de la extracción de las muestras.

Se plantearon dos controles y tres réplicas por cada tipo de presa. En este sentido, para cada trazador se utilizaron cinco botellas de vidrio Duran-Schott® de 500 mL de capacidad, previamente lavadas con ácido clorhídrico al 10 % y agua destilada, y posteriormente, esterilizadas por autoclave. Para cada tipo de presa, tres botellas fueron llenadas con agua pre-filtrada por 200 μm (Réplicas A, B y C; Figura III-1), y otras dos botellas fueron llenadas con 500 mL de agua de cada lago filtrada a través de filtros GF/F (0,7-0,8 μm de poro) como control “sin depredadores” del experimento (Controles A y B).

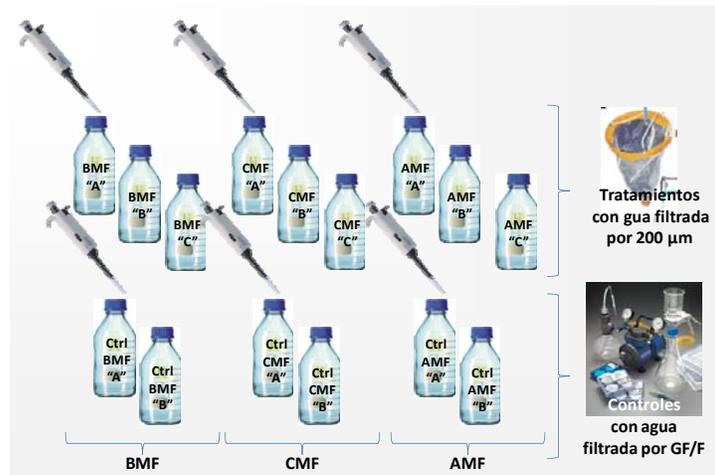


Figura III-1: Diseño experimental. Se incubaron por triplicado tres tratamientos con distintos tamaños de presas: BACT marcadas fluorescentemente (BMF), PCY marcadas fluorescentemente (CMF) y PEUK marcadas fluorescentemente (AMF). Además para cada tratamiento se adicionaron dos controles (CTRL) (para más detalles ver el texto).

III-2-4. Experiencias de corto tiempo (Ingestión)

Se realizaron experiencias de ingestión preliminares con agua de ambos lagos, para determinar el período de tiempo en el cual la curva de ingestión de los depredadores naturales era lineal. Para ello se evaluó la ingestión de los flagelados en cuatro tiempos: 0, 10, 20 y 40 minutos. A partir de los datos obtenidos en estas experiencias se eligieron tres tiempos de medición para determinar las tasas de ingestión de los depredadores: 0, 20 y 40 minutos.



Antes de iniciar cada experimento se estimó la abundancia de BACT, PCY y PEUK naturales a partir de las muestras fijadas con glutaraldehído en el lago, siguiendo el procedimiento detallado en el Capítulo II. Asimismo, una submuestra de la suspensión de cada una de las PMF fue descongelada y llevada a temperatura ambiente, y posteriormente sonicada durante 15 minutos para separar los posibles agrupamientos de células. Una alícuota de cada PMF fue filtrada sobre filtros negros de 0,2 μm (MSI). Las mismas fueron cuantificadas en microscopio de epifluorescencia bajo luz azul, la cual permite observar las PMF de color amarillo-verdoso fluorescente. A partir de estos recuentos, un volumen determinado de cada presa marcada correspondiente al 30% de la abundancia natural de cada presa se colocó en cada botella, tanto en los tratamientos como en los controles (Figura III-1). Se tomaron sub-muestras de cada una de las botellas inmediatamente después de la adición de las PMF (t_0), después de 20 minutos (t_1) y después de 40 minutos (t_2). Cien mililitros de cada una de las botellas se fijaron en 100 mL de glutaraldehído frío (4°C) al 4 % (2 % concentración final). Esta técnica de fijación reduce la egestión de las presas que han sido ingeridas por los FMIX, FHET y ciliados (Sanders et al., 1989).

Dentro de las 24 hs de fijadas, las sub-muestras tomadas en los tres tiempos (t_0 , t_1 y t_2) para cada réplica (A, B, C) y para cada presa (BMF, CMF y AMF) fueron filtradas sobre membranas de policarbonato negras con dos tamaños de poro: 0,8 y 3 μm (MSI). Para los filtros de 0,8 μm , el volumen filtrado osciló entre 50 y 80 mL, mientras que para los filtros de 3 μm varió entre los 80 y 120 mL, dependiendo de la abundancia de organismos en la muestra. Un tercer tipo de membrana (0,2 μm , MSI) se utilizó para filtrar el agua de los tres tratamientos (BMF, CMF y AMF) al tiempo inicial (t_0), en cuyo caso el volumen de filtración osciló entre 10 y 30 mL. Los filtros de 0,2 μm de poro obtenidos a partir de las réplicas de los tratamientos, se utilizaron para estimar la abundancia inicial de presas marcadas en cada experimento.

El recuento de los FMIX y FHET se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo II. Los flagelados <5 μm fueron cuantificados sobre los filtros de 0,8 μm , mientras que los flagelados >5 μm fueron identificados y cuantificados sobre los filtros de 3 μm . Los FMIX fueron identificados a la máxima



resolución taxonómica posible, mientras que los FHET se separaron en dos categorías de tamaño: $<5 \mu\text{m}$ y $>5 \mu\text{m}$. La ingestión de las PMF fue cuantificada al mismo tiempo que los flagelados, registrando el número de presas marcadas presentes dentro de las vacuolas digestivas de los mismos. Esta cuantificación se realizó en microscopio de epifluorescencia bajo luz azul. Esta luz permite identificar por fluorescencia en color amarillo-verdoso las PMF (con DTAF). Además bajo esta luz se pueden identificar los FMix por la autofluorescencia de la Cl a (la cual fluoresce en rojo). Para cada taxón se inspeccionaron entre 50 y 100 células.

III-2-5. Cálculos de Ingestión

A partir de los datos obtenidos en las *Experiencias de ingestión*, se determinaron cuatro parámetros: tasas de ingestión, tasas de clareado, tasas de depredación específica, e impacto de la depredación de cada taxón o grupo de organismos.

Las tasas de ingestión ($\text{PMF flag.}^{-1}\text{h}^{-1}$) fueron calculadas a partir de la pendiente de regresión entre el número de presas ingeridas en los tres tiempos (t_0 , t_1 y t_2), ya que en todos los casos las curvas de ingestión se mantuvieron lineales hasta los 40 minutos (t_2). En cada caso, un intervalo de confianza del 95 % fue calculado para t_0 y t_2 , en función de evaluar la significancia de las tasas de ingestión. El intervalo de confianza fue calculado de la siguiente manera:

$$P_{t_2} - 1.96 [P_{t_2} (1 - P_{t_2}) / n_{t_2}]^{1/2} > P_{t_0} - 1.96 [P_{t_0} (1 - P_{t_0}) / n_{t_0}]^{1/2}$$

donde P es el número de PMF dentro de cada flagelado, n es el número de flagelados inspeccionados a t_2 (40 minutos) y t_0 (inicio del experimento), respectivamente. La ingestión fue considerada significativa cuando los intervalos de confianza del 95 % de t_0 y t_2 no se solaparon (Rice, 1988, citado en Havskum y Riemann, 1996).

La tasa de clareado (TC – en inglés “*clearance rate*”) ($\text{nL flag.}^{-1}\text{h}^{-1}$) para cada tipo de presa fue obtenida a partir de la división de la tasa de ingestión ($\text{PMF flag.}^{-1}\text{h}^{-1}$) por la concentración de PMF (PMF nL^{-1}).



La tasa de depredación específica (TDE – en inglés “*cell-specific grazing rate*”) (presa $\text{flag.}^{-1}\text{h}^{-1}$) para cada grupo de flagelados fue estimada a partir del producto entre la correspondiente TC y la abundancia de las presas *in situ*, asumiendo que las presas naturales (BACT, PCY y algas PEUK) y sus respectivas PMF fueron depredadas a las mismas tasas (Tranvik et al., 1989).

El impacto de la depredación (ID – en inglés “*grazing impact*”) (presa $\text{mL}^{-1}\text{h}^{-1}$) fue estimado a partir del producto entre la TDE y la abundancia de cada flagelado (ind. mL^{-1}).

Las tasas de renovación (en inglés “*bacterial turnover rates*”) ($\% \text{ d}^{-1}$) de BACT, PCY y PEUK, fueron estimadas a partir de la expresión del ID ($\text{BACT mL}^{-1}\text{d}^{-1}$) como porcentaje de la abundancia de presas correspondiente (presa mL^{-1}).

Además, la tasa de ingestión específica, expresada en porcentaje de carbono por día ($\% \text{ C d}^{-1}$), fue calculada para cada taxón por división de las TDE expresada en biomasa de presa ($\text{fgC presa flag.}^{-1}\text{d}^{-1}$) por la biomasa promedio del flagelado (fgC flag.^{-1}). Para la estimación de la biomasa de carbono de las presas y depredadores se siguió la misma metodología explicada en el Capítulo II.

III-2-6. Experiencias de largo tiempo (Desaparición)

En este caso, las botellas experimentales se mantuvieron en la incubadora en las mismas condiciones que las *Experiencias de corto tiempo* y con el fotoperíodo correspondiente a cada época del año. Para estas experiencias se tomaron sub-muestras de las botellas tratamiento y control en tres tiempos: después de la adición de las presas marcadas con fluorescencia (t_0), después de 24hs (t_{24}) y después de 48hs (t_{48}) de iniciado el experimento. Todas las sub-muestras fueron fijadas con glutaraldehído frío (4°C) al 4% previamente filtrado por $0,2 \mu\text{m}$ (2% concentración final) con el mismo volumen de muestra que de fijador. En cada caso se filtró un volumen de muestra que osciló entre 10 y 30 mL sobre membranas de policarbonato negras de $0,2 \mu\text{m}$ de poro (MSI), dentro de las 24 hs de fijación. En este caso las botellas control fueron utilizadas para evaluar la desaparición de las presas marcadas no explicada por la depredación.



El cálculo de las presas totales consumidas se obtuvo siguiendo el modelo matemático de Salat y Marrasé (1994). La tasa de depredación (g) fue calculada con la siguiente fórmula:

$$g = - (1 / t) \ln (F_t / F_0)$$

donde t es el tiempo de incubación, F_t es la abundancia de PMF a tiempo final y F_0 es la abundancia de PMF a tiempo inicial (PMF mL⁻¹).

Luego, la tasa de crecimiento bacteriano neta (a) fue calculada como sigue:

$$a = (1 / t) \ln (N_t / N_0)$$

donde t es el tiempo de incubación, N_t y N_0 es la abundancia natural de presas a tiempo final e inicial, respectivamente (BACT mL⁻¹; PCY mL⁻¹; PEUK mL⁻¹).

El decrecimiento de la abundancia de las presas marcadas en los controles fue registrado en cada muestra y utilizado para corregir el valor de desaparición de los tratamientos, a fin de asegurar que la desaparición medida era únicamente producto de la ingestión de los depredadores. Para ello, en las muestras control se calculó un parámetro denominado tasa de desaparición aparente (g_c) calculado como:

$$g_c = - (1 / t) \ln ({}_cM_t / {}_cM_0)$$

donde t es el tiempo de incubación, ${}_cM_t$ y ${}_cM_0$ es la abundancia de presas marcadas a tiempo final e inicial en el control, respectivamente (BACT mL⁻¹; PCY mL⁻¹; PEUK mL⁻¹).

A partir de esto se calcula la tasa de depredación de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$G = [(g - g_c) / a] (N_t - N_0)$$

Esta modificación fue propuesta por Unrein et al. (2007) sobre la fórmula original de Salat y Marrasé (1994). Este resultado es dividido por el tiempo para obtener la tasa de depredación total (presa mL⁻¹d⁻¹).



III-2-7. Análisis de la selectividad de presas

Para analizar la selectividad de presas se utilizaron dos parámetros, por un lado las TC (Šimek et al., 1995, 1996; Pernthaler et al., 1996; Tarao et al., 2009; Izaguirre et al., 2012), y por otro, el índice de selectividad de Chesson (Chesson 1978, 1983). La TC indica el volumen de agua próximo al flagelado que éste debe “inspeccionar” para consumir un determinado número de presas por unidad de tiempo. Por su parte, el índice de Chesson, α , (Chesson 1978, 1983) calcula la selectividad de presas por parte de un depredador, relacionando las abundancias relativas de éstas dentro de los flagelados y fuera de ellos. El índice de selectividad se calcula con la siguiente fórmula:

$$\alpha_i = (r_i/n_i) / \sum_{i=1}^m (r_i/n_i)$$

donde i es el número de presas en la dieta del consumidor, el cual puede variar entre 1 y m . El r_i y el n_i son los porcentajes de tipo de presas “ i ” en la dieta y en el ambiente, respectivamente, (expresados como porcentaje de BACT + PCY). Este índice varía entre 0 y 1; valores de $1/m$ representan alimentación aleatoria, $< 1/m$ indican selección negativa, $> 1/m$ indican selección positiva.

Para simplificar el análisis de los resultados, se calculó el parámetro ε (Chesson, 1983), el cual es independiente de m . En este sentido, el valor α fue transformado en el valor ε como se muestra a continuación:

$$\varepsilon_i = (m\alpha_i - 1) / (m - 2)\alpha_i + 1$$

Este parámetro varía entre -1 y 1; $\varepsilon = 0$ implica selección aleatoria, los valores negativos indican selección negativa, mientras que los valores positivos indican selección positiva. Este parámetro puede ser utilizado para mostrar gráficamente los resultados del índice, ya que son visualmente más sencillos de interpretar, aunque no puede utilizarse para análisis estadísticos (Chesson, 1983).



III-2-8. Estimación del impacto de la depredación en el ciclo anual

El ID de los FMIX y FHET en Escondido y Morenito en las fechas donde no se realizaron experimentos (descriptas en el Capítulo II) se estimó utilizando el rango de variación de las TDE de cada taxón. Se calculó el producto de la TDE promedio, mínima y máxima (rango) por la abundancia de cada taxón en cada fecha. Se sumaron valores del ID debido a cada taxón (TDE x Abundancia) en cada fecha. Así se obtuvo el rango probable del impacto de depredación de todos los flagelados bacterívoros (FMIX y FHET) para todo el año.

III-2-9. Análisis de los datos

Mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA) se compararon las tasas de depredación específica entre taxa y entre lagos. Cuando las diferencias entre lagos no fueron significativas, este factor se excluyó del análisis, y se realizaron ANOVAs de una vía comparando las TDE entre los distintos taxa. Se realizaron análisis de regresión entre las TDE de cada taxón y las variables ambientales. Se ajustó con un análisis de regresión el % de carbono adquirido por los depredadores en función de la biomasa del depredador. Los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados con el programa *Sigma Stat* y *Sigma Plot*.



III- 3. Resultados

Las experiencias de ingestión permitieron estimar tasas de depredación sobre dos de las tres presas utilizadas en este estudio (BACT y PCY), ya que en ningún momento se observó ingestión sobre las algas PEUK por parte de los flagelados evaluados.

De esta manera, se estimó la actividad fagotrófica de ocho taxa de FMix (*C. parva*, *O. ovalis*, *Pseudopedinella* sp., *D. divergens*, *G. varians*, Chrysophyceae >5 μm , *P. lacustris*, *C. erosa*), y de dos categorías de tamaño de FHET (< y >5 μm) sobre las BACT y las PCY. La Figura III-2 muestra algunas de las especies con una PMF dentro de sus vacuolas digestivas.

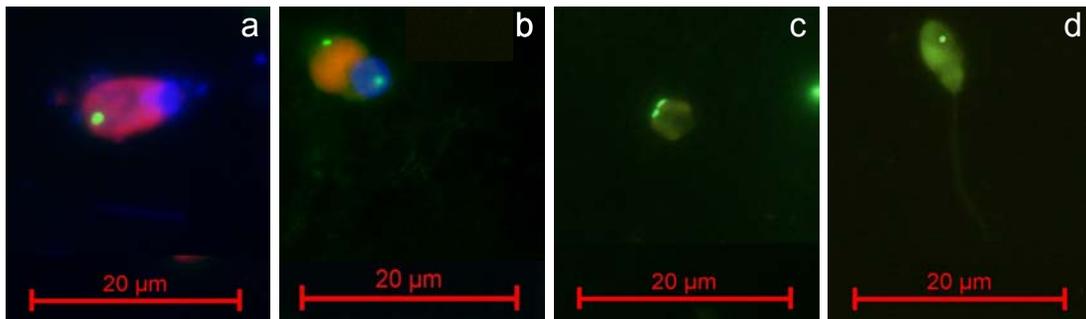


Figura III-2: a y b. Microfotografías combinadas a partir de la superposición de tres fotografías obtenidas en escalas de grises (8 bits) tomadas bajo luz azul, verde y UV, de: a. *Plagioselmis lacustris* con una CMF adentro de su vacuola digestiva; b. *Gymnodinium varians* con una BMF adentro de su vacuola digestiva; c y d: Microfotografías color tomadas bajo luz azul de: c. *Chrysochromulina parva* con dos BMF adentro de su vacuola digestiva; d. flagelado heterotrófico >5 μm con una BMF adentro de su vacuola digestiva.



III-3-1. Comparación de las tasas de depredación específica sobre BACT y PCY

Los mayores valores de TDE para BACT (Figura III-3) fueron registrados para *Pseudopedinella* sp. (6,74 BACT flag.⁻¹h⁻¹) seguidos por *G. varians* (2,43 BACT flag.⁻¹h⁻¹) y *D. divergens* (2,10 BACT flag.⁻¹h⁻¹), mientras que las tasas más bajas fueron observadas en *P. lacustris* (0,55 BACT flag.⁻¹h⁻¹). En el caso de las TDE sobre PCY los mayores valores fueron observados en *Pseudopedinella* sp. (2,66 PCY flag.⁻¹h⁻¹) y en los FHET <5 μm (1,14 PCY flag.⁻¹h⁻¹), mientras que las menores tasas fueron observadas siempre para *C. parva* (0,30 PCY flag.⁻¹h⁻¹) y *P. lacustris* (0,31 PCY flag.⁻¹h⁻¹). En ningún caso, para ningún taxón y ninguna presa, se observaron diferencias significativas de TDE entre fechas (Figura III-3).

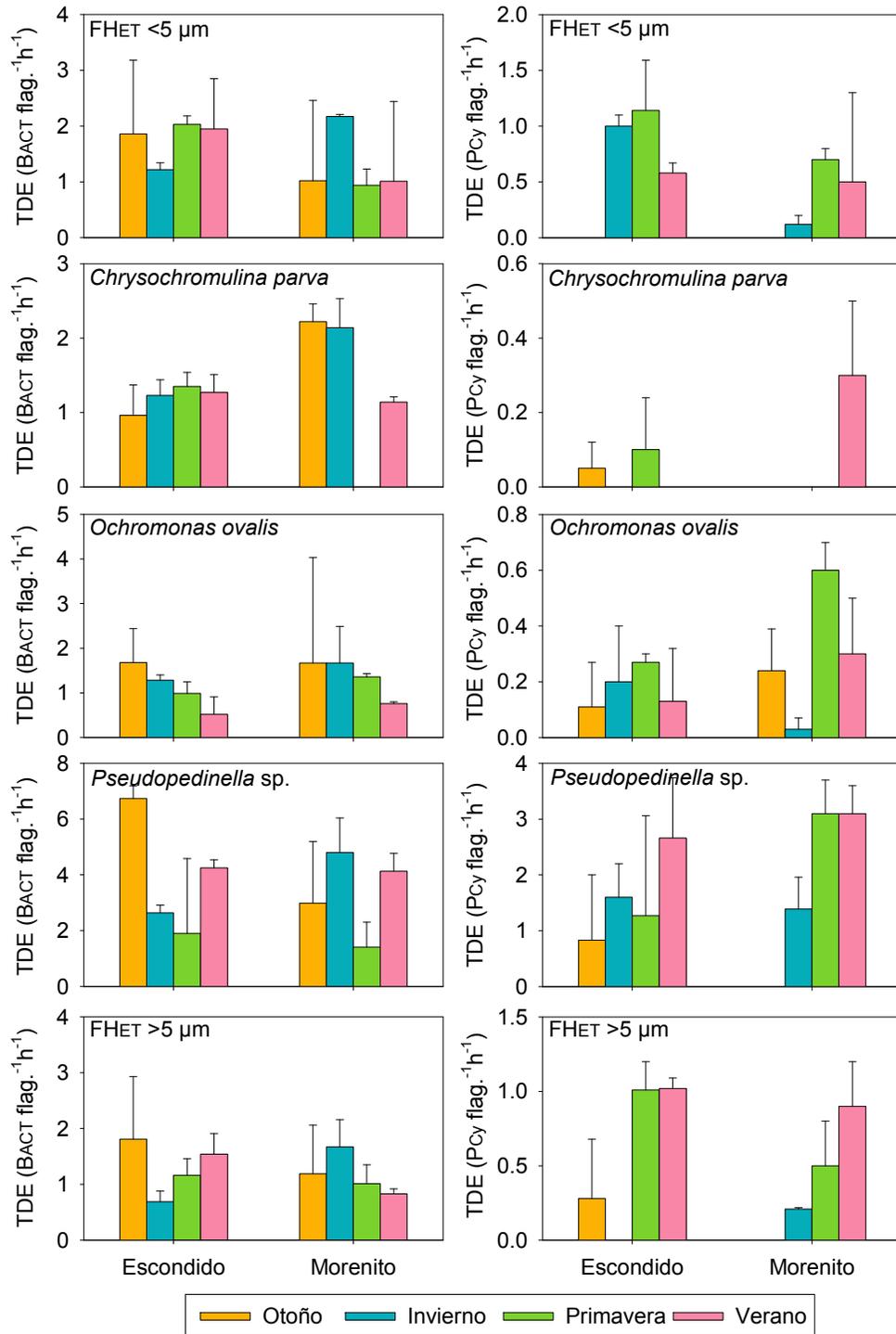


Figura III-3: Las tasa de depredación específica (TDE) promedio por estación de cada flagelado en cada lago. Las barras de error representan el desvío estándar. Los gráficos de la izquierda corresponden a las TDE sobre BACT, los gráficos de la derecha corresponden a las TDE sobre PCY. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula. *Continúa en la página siguiente.*

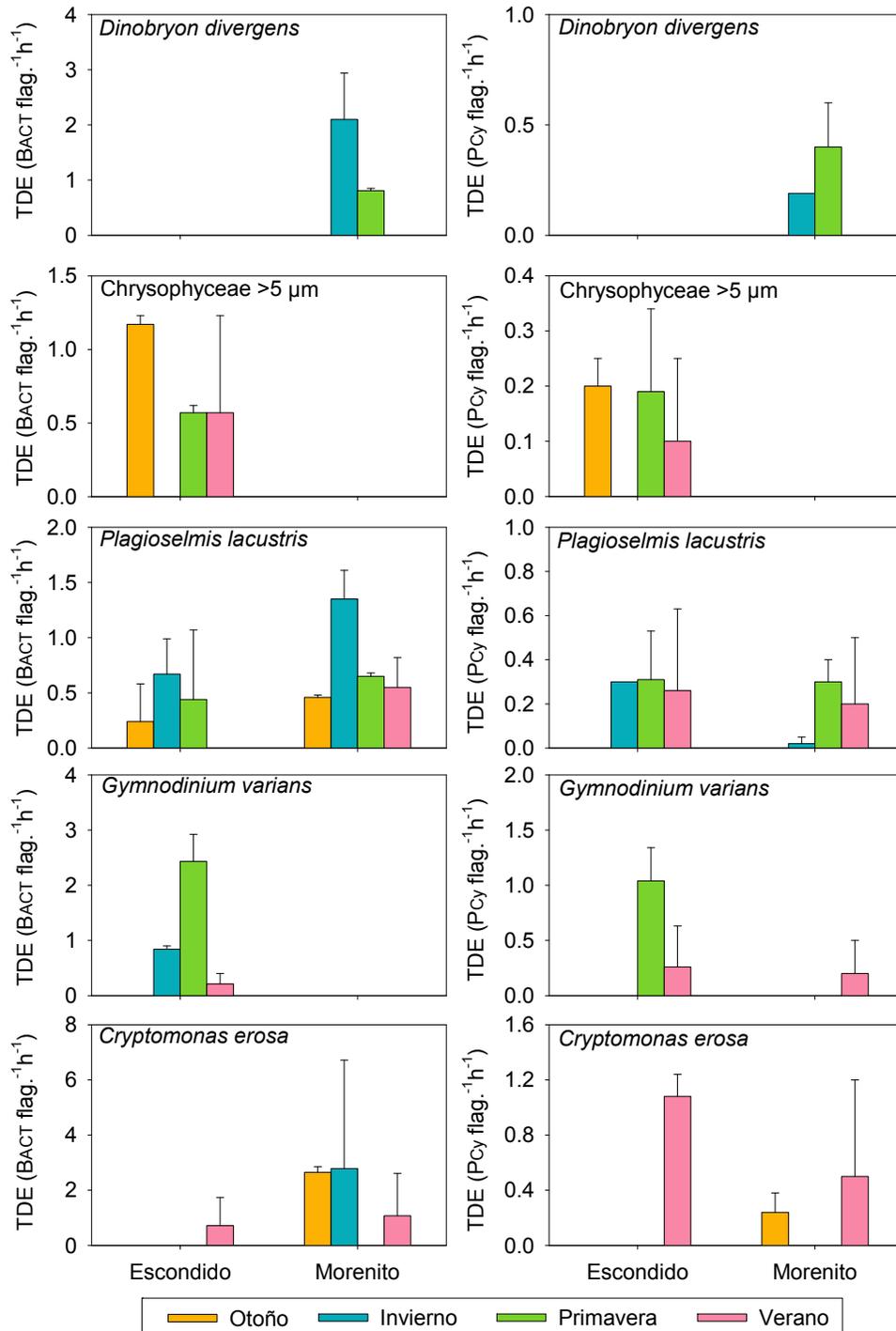


Figura III-3-Continuación: Las tasa de depredación específica (TDE) promedio por estación de cada flagelado en cada lago. Las barras de error representan el desvío estándar. Los gráficos de la izquierda corresponden a las TDE sobre BACT, los gráficos de la derecha corresponden a las TDE sobre PCY. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula.



El valor promedio anual de las TDE de cada flagelado sobre BACT, no mostró diferencias significativas entre los lagos ($F = 0,56$, $p = 0,456$), pero sí entre las especies ($F = 14,17$, $p < 0,001$). Al comparar las TDE entre los taxa se pueden diferenciar tres grupos homogéneos, los cuales se muestran en la Figura III-3a. Las menores TDE (BACT) fueron observadas en *P. lacustris* y las Chrysophyceae $>5 \mu\text{m}$. *P. lacustris* mostró una TDE promedio anual de 0,34 y de 0,75 BACT flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$ en Escondido y en Morenito, respectivamente. Por su parte, las Chrysophyceae $>5 \mu\text{m}$ presentaron una TDE promedio anual de 0,58 BACT flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$ en el lago Escondido, mientras que en el lago Morenito no fue posible detectar depredación debido a la baja abundancia de este grupo. Dentro de los flagelados $<5 \mu\text{m}$ (*C. parva*, *O. ovalis* y FHET $<5 \mu\text{m}$), es interesante destacar que mostraron TDE muy similares entre sí, que oscilaron entre 1,12 y 1,77 BACT flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$. En el caso de *D. divergens* sólo se observó depredación en el lago Morenito durante invierno y primavera (el momento de mayor abundancia de esta especie), mostrando una TDE promedio de 1,46 BACT flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$. Por su parte, los FHET $>5 \mu\text{m}$ presentaron una TDE de 1,30 y 1,18 BACT flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$ en Escondido y Morenito, respectivamente. Las mayores TDE se registraron para *Pseudopedinella* sp., siendo de 3,88 y 3,33 BACT flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$ en Escondido y Morenito, respectivamente. Los valores medios, máximos y mínimos de TDE para cada taxón se presentan en la Tabla III-1.

Al igual que para las BACT, las TDE de los FMix y FHET sobre las PCY tampoco presentaron diferencias significativas entre los lagos ($F = 1,32$, $p = 0,262$). Sin embargo, el análisis exclusivo entre los taxa mostró diferencias significativas ($F = 10,21$, $p < 0,001$), pudiéndose distinguir dos grupos homogéneos (Figura III-4.b). En primer lugar, destacamos que *C. parva*, *O. ovalis* (los dos FMix $<5 \mu\text{m}$), *P. lacustris* y las Chrysophyceae $>5 \mu\text{m}$ fueron los taxa que menores TDE presentaron sobre PCY, cuyos valores oscilaron entre 0,04 y 0,22 PCY flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$. Valores intermedios de TDE, en el rango 0,30 y 0,68 PCY flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$, fueron presentadas por *C. erosa*, *D. divergens* y las dos categorías de tamaño de FHET. Las mayores TDE sobre PCY fueron detectadas en *Pseudopedinella* sp. con valores de 1,59 y 1,90 PCY flag. $^{-1}\text{h}^{-1}$ en Escondido y Morenito respectivamente.

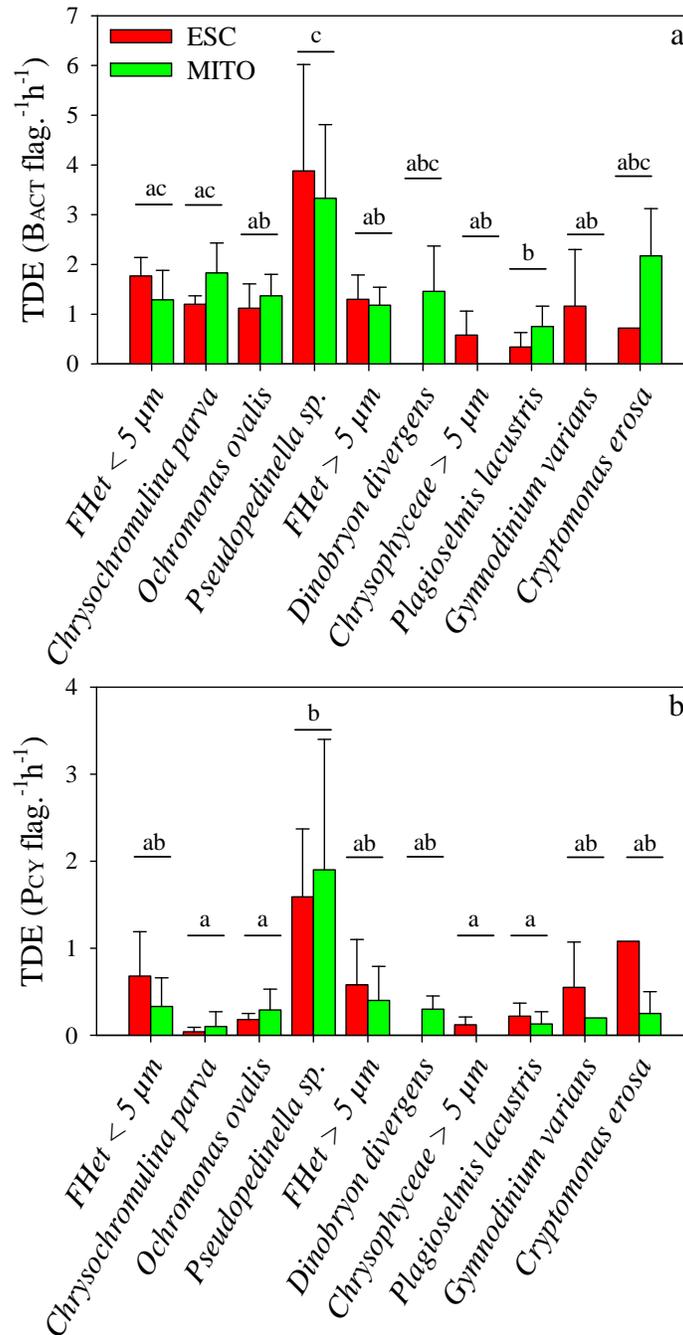


Figura III-4: Tasas de depredación específica (TDE) promedio de cada flagelado en ambos lagos; **a.** TDE sobre BACT; **b.** TDE sobre PCY. Las barras representan los valores promedio de las cuatro estaciones del año y su desvío estándar. *Referencias:* Las líneas con letras indican los grupos homogéneos. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula.



Tabla III-1. Valores estimados de depredación de BACT de los distintos taxa. Se presenta el promedio \pm desvío estándar, y el rango de variación entre paréntesis.

Taxa	TDE (BACT flag. ⁻¹ h ⁻¹)	TC (nL flag. ⁻¹ h ⁻¹)	Impacto Depr. (BACT mL ⁻¹ d ⁻¹)	% BACT d ⁻¹	fgC flag. ⁻¹ d ⁻¹ (BACT)	Núm. réplicas
FHET <5 μ m	1,53 \pm 0,52 (0,94 - 2,17)	1,77 \pm 0,81 (0,96 - 2,85)	2047 \pm 1030 (727 - 3585)	0,22 \pm 0,13 (0-0,43)	434 \pm 169 (237 - 624)	7
<i>Chrysochromulina parva</i>	1,47 \pm 0,50 (0,96 - 2,20)	1,75 \pm 0,84 (0,61 - 2,92)	3797 \pm 2305 (1523 - 8191)	0,41 \pm 0,25 (0,09-0,78)	410 \pm 107 (288 - 561)	8
<i>Ochromonas ovalis</i>	1,24 \pm 0,45 (0,52 - 1,68)	1,50 \pm 0,80 (0,48 - 3,01)	3500 \pm 4597 (940 - 14563)	0,34 \pm 0,29 (0,09-0,96)	344 \pm 121 (160 - 517)	8
<i>Pseudopedinella</i> sp.	3,61 \pm 1,73 (1,41 - 6,74)	3,93 \pm 1,52 (1,82 - 6,19)	7480 \pm 6666 (439 - 18804)	0,83 \pm 0,73 (0,04-2,27)	1019 \pm 531 (356 - 2074)	8
FHET >5 μ m	1,24 \pm 0,40 (0,69 - 1,81)	1,37 \pm 0,36 (0,79 - 2,01)	2463 \pm 1765 (964 - 6470)	0,27 \pm 0,21 (0,11-0,78)	348 \pm 127 (210 - 557)	8
<i>Dinobryon divergens</i>	1,46 \pm 0,91 (0,81 - 2,10)	1,79 \pm 1,05 (1,05 - 2,53)	6270 \pm 4234 (3276 - 9264)	0,78 \pm 0,49 (0,43-1,12)	368 \pm 230 (205 - 531)	2
Chrysophyceae >5 μ m	0,77 \pm 0,35 (0,57 - 1,17)	0,67 \pm 0,14 (0,51 - 0,75)	4372,00 \pm 5630 (868 - 10867)	0,32 \pm 0,33 (0,08-0,70)	237 \pm 106 (175 - 360)	3
<i>Plagioselmis lacustris</i>	0,62 \pm 0,35 (0,24 - 1,35)	0,72 \pm 0,61 (0,00 - 0,63)	2425 \pm 2129 (0 - 5304)	0,29 \pm 0,24 (0,00-0,54)	168 \pm 86 (73 - 341)	8
<i>Gymnodinium varians</i>	1,16 \pm 1,14 (0,21 - 2,46)	1,77 \pm 1,48 (0,19 - 3,13)	728 \pm 619 (141 - 1375)	0,09 \pm 0,08 (0,03-0,18)	357 \pm 352 (64 - 748)	3
<i>Cryptomonas erosa</i>	1,81 \pm 1,06 (0,72 - 2,79)	1,90 \pm 1,29 (0,64 - 3,39)	1245 \pm 900 (540 - 2563)	0,13 \pm 0,09 (0,05-0,25)	468 \pm 255 (221 - 706)	4



Tabla III-2. Valores estimados de depredación de PCY de los distintos taxa. Se presenta el promedio \pm desvío estándar (rango).

Taxa	TDE (PCY flag. ⁻¹ h ⁻¹)	TC (nL flag. ⁻¹ h ⁻¹)	Impacto Depr. (PCY mL ⁻¹ d ⁻¹)	% PCY d ⁻¹	fgC flag. ⁻¹ d ⁻¹ (PCY)	Núm. réplicas
FHET <5 μ m	0,51 \pm 0,44 (0,00 - 1,14)	50,30 \pm 80,81 (0,00 - 231,57)	758 \pm 675 (0 - 1802)	6,88 \pm 12,19 (0,00-36,40)	968 \pm 915 (0 - 2399)	8
<i>Chrysochromulina parva</i>	0,06 \pm 0,11 (0,00 - 0,30)	0,82 \pm 1,16 (0,00 - 2,60)	318 \pm 670 (0 - 1816)	0,37 \pm 0,64 (0,00-1,70)	104 \pm 158 (0 - 414)	7
<i>Ochromonas ovalis</i>	0,24 \pm 0,17 (0,03 - 0,60)	14,18 \pm 17,45 (1,75 - 52,29)	487 \pm 393 (50 - 1089)	2,53 \pm 3,12 (0,30 - 9,80)	407 \pm 273 (46 - 961)	8
<i>Pseudopedinella</i> sp.	1,74 \pm 1,12 (0,00 - 3,10)	55,77 \pm 59,89 (0,00 - 162,40)	2924 \pm 1959 (0 - 5923)	8,50 \pm 10,86 (0,30 - 32,30)	3107 \pm 1855 (0 - 5598)	8
FHET >5 μ m	0,53 \pm 0,45 (0,00 - 1,02)	10,26 \pm 9,68 (0,00 - 24,79)	1010 \pm 876 (0 - 2359)	2,20 \pm 2,47 (0,00 - 5,80)	1010 \pm 909 (0 - 2146)	8
<i>Dinobryon divergens</i>	0,30 \pm 0,15 (0,19 - 0,40)	180,72 \pm 237,18 (13,00 - 348,43)	780 \pm 383 (508 - 1051)	49,55 \pm 64,56 (3,90 - 95,20)	414 \pm 173 (219 - 537)	2
Chrysophyceae >5 μ m	0,16 \pm 0,06 (0,10 - 0,20)	3,11 \pm 1,62 (1,39 - 4,62)	608 \pm 359 (285 - 996)	1,10 \pm 0,62 (0,40 - 1,60)	343 \pm 115 (210 - 420)	3
<i>Plagioselmis lacustris</i>	0,17 \pm 0,14 (0,00 - 0,31)	11,27 \pm 14,52 (0,00 - 39,46)	540 \pm 738 (0 - 2092)	3,48 \pm 4,52 (0,00 - 11,70)	310 \pm 270 (0 - 652)	8
<i>Gymnodinium varians</i>	0,47 \pm 0,46 (0,00 - 1,04)	9,00 \pm 11,57 (0,00 - 25,43)	766 \pm 1010 (0 - 2203)	1,25 \pm 1,48 (0,00 - 3,10)	954 \pm 992 (0 - 2188)	4
<i>Cryptomonas erosa</i>	0,46 \pm 0,46 (0,00 - 1,08)	6,45 \pm 6,27 (0,00 - 14,96)	323 \pm 290 (0 - 700)	0,50 \pm 0,44 (0,00 - 1,00)	848 \pm 998 (0 - 2272)	4



III-3-2. Comparación de las TDE de los FMIX y los FHET en relación a las variables ambientales

En el 60 % de los taxa analizados, las TDE sobre BACT presentaron relación con alguna de las variables físico-químicas y/o con la abundancia de las presas determinadas en este estudio (Figuras III-5). Las TDE sobre BACT de *O. ovalis* estuvieron correlacionadas negativamente con la concentración de PDT, la Im y la temperatura del agua. Las TDE sobre BACT de *Pseudopedinella* sp. y los FHET >5 µm aumentaron significativamente con el incremento de las disponibilidad de presas en el ambiente. *P. lacustris* presentó una relación significativa y negativa con la concentración de NDT, mientras que *C. erosa* se relacionó negativamente con la concentración de PDT y la temperatura del agua.

Las TDE sobre PCY de cada taxón se presentan en la Tabla III-2. Sólo *Pseudopedinella* sp. mostró relación significativa entre las TDE sobre PCY y las variables físicas (Figura III-6). Presentó una relación significativa positiva con la temperatura del agua y una negativa con el Kd_{RFA} .

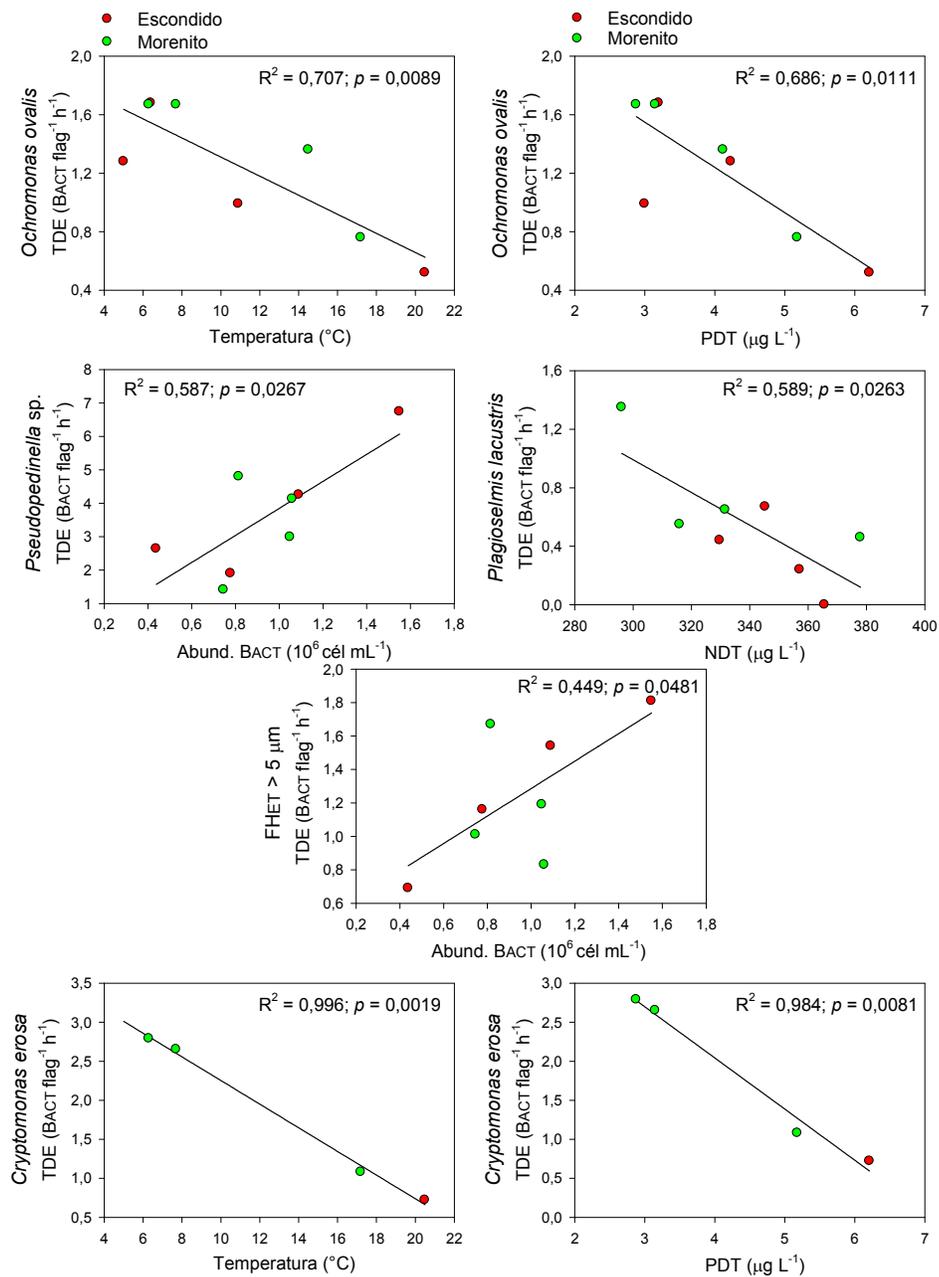


Figura III-5: Relación entre las TDE sobre BACT de cada taxón con varias variables físico-químicas y la concentración de presas.

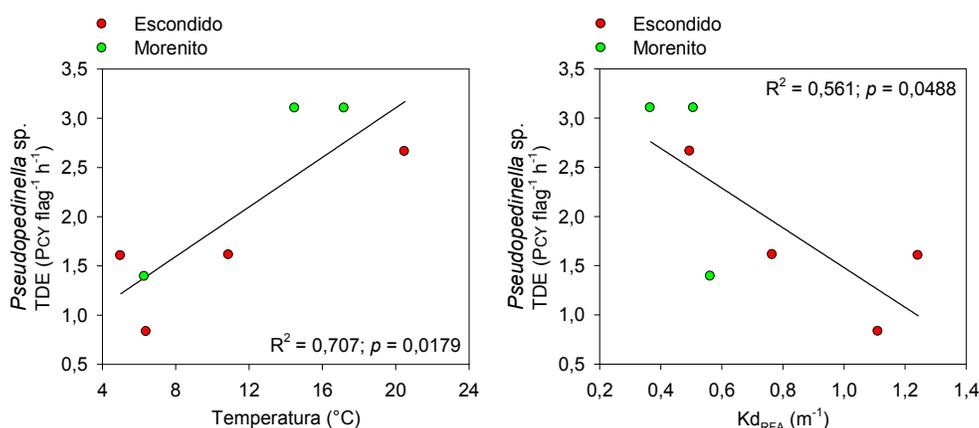


Figura III-6: Relación entre las TDE sobre PCY de cada taxón con varias variables físico-químicas.

II-3-3. Impacto relativo de los FMix y FHET sobre el picoplancton

Los FMix fueron responsables en promedio del 80 % de la depredación debida a los flagelados (FMix y FHET) sobre las BACT y las PCY durante todo el año. La contribución de cada uno de los taxa cambió a lo largo del año. En ocasiones, la contribución de un único taxón alcanzó más del 50 % de la bacterivoría debida a los flagelados.

Se hallaron diferencias estacionales en el impacto relativo de los distintos flagelados sobre las BACT (Figura III-7.a). Los FMix nunca fueron responsables de menos del 70 % del total de la bacterivoría. *Pseudopedinella* sp. fue claramente el taxón más importante en el lago Escondido representando entre un 20 y un 54 % de la ingestión. En el Morenito la importancia de este taxón fue más variable y representó en promedio el 20 % de la bacterivoría total, con un valor máximo del 40 % en otoño. Las Cryptophyceae fueron muy importantes en el Morenito, representando como máximo el 60 % de la bacterivoría (principalmente *P. lacustris*), mientras que en el lago Escondido no fueron relevantes (<10 % en promedio). *C. parva* cobró relevancia fundamentalmente en verano, alcanzando en Morenito un 35 % de la bacterivoría. *D. divergens* sólo estuvo presente en 2 de los 8 experimentos (invierno y primavera en el Morenito), aunque cuando estuvo presente, el impacto que provocó fue muy significativo (20-30 % de la bacterivoría



total de flagelados). *C. parva* presentó su mayor impacto de depredación en ambos lagos durante el verano. El impacto de FHET (< y >5 μm) fue máximo en primavera-verano en ambos lagos. Sin embargo, nunca superó el 20-30 % de la bacterivoría total debida a flagelados.

El impacto relativo de los distintos flagelados sobre las PCY mostró diferencias estacionales (Figura III-7.b). Los FMix representaron entre el 60 y el 90 % de la bacterivoría total de las PCY debida a flagelados. *Pseudopedinella* sp. fue el depredador más importante durante casi todo el año en ambos lagos, fundamentalmente en el Escondido (en promedio 45 % de bacterivoría total). La Clase Chrysophyceae representó en promedio el 20-30 % de la bacterivoría total, alcanzando un valor máximo durante el otoño en ambos lagos, cercano al 55-60 %. *D. divergens* fue responsable del 15 % de la bacterivoría de PCY durante la primavera. Los FHET presentaron el impacto máximo durante primavera-verano en ambos lagos, alcanzando el 40 % en la primavera del Escondido.

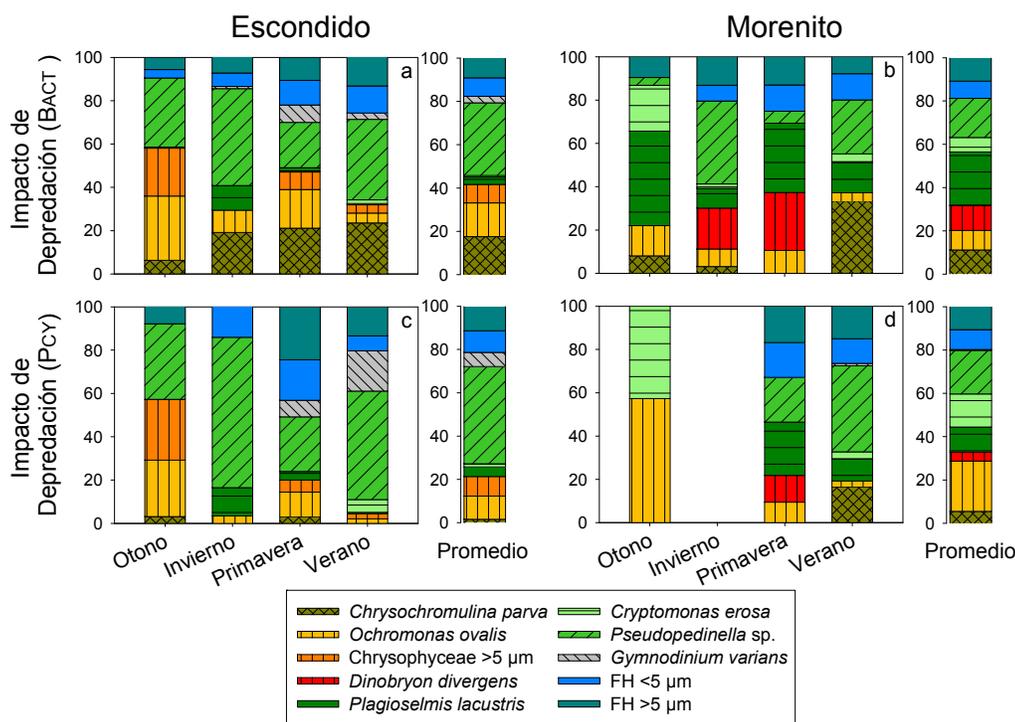


Figura III-7: Impacto relativo de la depredación de los distintos FMix y FHET en cada lago sobre BACT (a y b) y sobre las PCY (c y d). Los paneles de la izquierda muestran los resultados del Escondido; los paneles de la derecha muestran los resultados del Morenito. *Referencias:* Promedio: promedio anual para cada lago y cada presa. Los taxa se ordenaron por Clase distinguiendo desde abajo hacia arriba entre FMix y FHET, los colores diferencian los taxa y los patrones de líneas distinguen las distintas Clases algales, los FHET se presentan sin patrón de líneas.

III-3-4. Comparación del impacto de depredación de los organismos flagelados y del resto de la comunidad bacterívora <200 µm sobre las BACT y las PCY

Los resultados de los dos métodos de determinación de la depredación sobre BACT y PCY (ingestión vs. desaparición) estuvieron correlacionados ($\rho = 0,633$, $p = 0,013$), aunque el método de desaparición de presas presentó siempre mayor desviación estándar que el método de ingestión de presas. En la Figura III-8 se observa la relación entre ambas estimaciones. Los valores estimados por desaparición (comunidad planctónica <200 µm) fueron iguales o levemente superiores a los obtenidos por ingestión (FMix + FHET), a excepción del otoño en el



lago Morenito (Figura III-9.a, b). Esto indicaría que los flagelados serían generalmente los principales depredadores de BACT en ambos lagos.

El mismo patrón fue observado para la depredación sobre las PCY, ya que los valores estimados por desaparición e ingestión fueron muy similares (Figura III-9.c, d), a excepción de las estimaciones de primavera e invierno en ambos lagos, en donde se observó un patrón inverso al esperado. En estas fechas, la ingestión debida a flagelados fue mayor que la ingestión de toda la comunidad <200 μm . Estos resultados sugieren que existió una sobreestimación de la depredación de estas presas en los experimentos de ingestión durante estas fechas. Durante el invierno, los datos correspondientes a Morenito fueron excluidos del análisis debido a la baja abundancia natural de las presas.

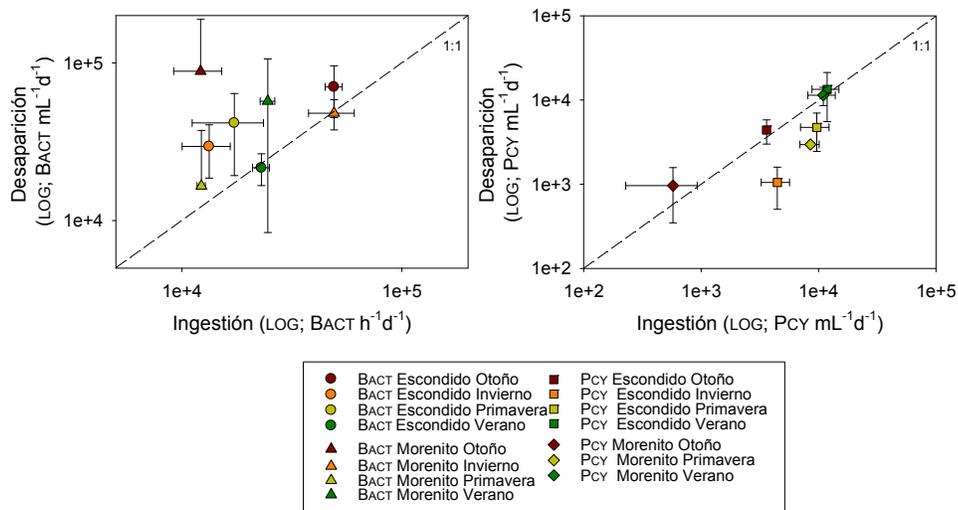


Figura III-8: Comparación de los resultados del Impacto de la depredación (presas mL⁻¹d⁻¹) estimados por ambos métodos en ambos lagos. El panel de la izquierda muestra los resultados de depredación sobre BACT; el de la derecha muestra los resultados de depredación sobre PCY. *Referencias:* Las barras de error representan el desvío estándar.

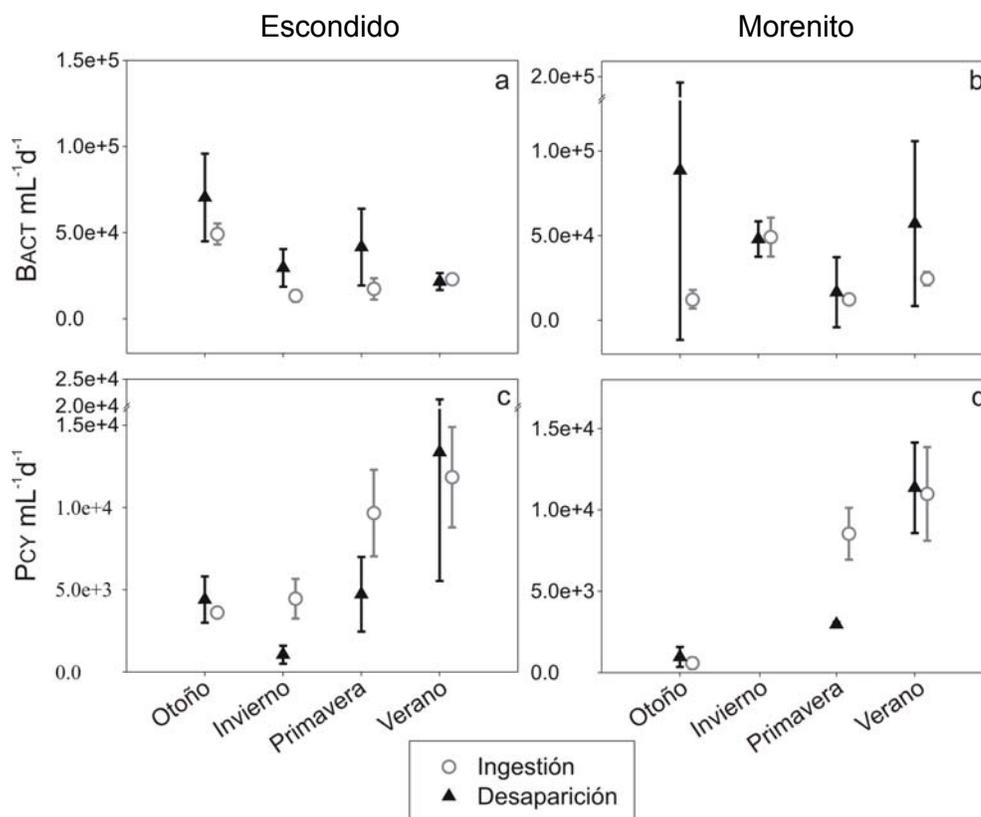


Figura III-9: Comparación del Impacto de Depredación (presas mL⁻¹d⁻¹) determinado a través de los dos métodos experimentales empleados en este estudio (ingestión y desaparición). *Referencias:* a. Escondido-BACT; b. Morenito-BACT; c. Escondido-PCY; d. Morenito-PCY. Las barras de error representan el desvío estándar.

La diferencia entre los resultados obtenidos por estos dos métodos permitió estimar la depredación relativa de los FMIX, FHET y el resto de la comunidad bacterívora (ciliados, rotíferos, etc.) que no fueron cuantificados en las experiencias de ingestión (Figura III-10). En el lago Escondido, durante el otoño los flagelados (FMIX y FHET) fueron responsables del 70 % de la depredación de BACT, dentro del cual el 65 % se debió a los FMIX (Figura III-10.a). Durante invierno y primavera, la comunidad bacterívora no flagelada <200 μ m (ciliados, rotíferos, etc.) fue responsable de aproximadamente el 60 % de la depredación. En el verano, los flagelados fueron responsables de prácticamente la totalidad de la ingestión, siendo los mixotróficos los principales depredadores (70 %). En el lago Morenito durante el otoño, el 85 % de la depredación de BACT se debió a los organismos no flagelados (Figura III-10.b). Durante el invierno y la primavera,



fueron los flagelados los responsables de la mayor parte de la depredación. En el verano el 40 % de la ingestión fue explicada por FMix y FHET.

Los promedios anuales de importancia relativa de estos tres grupos de depredadores indican un patrón muy similar entre los lagos (Figura III-10). Aproximadamente entre 58 y 65 % de la depredación de BACT correspondió a los flagelados, dentro de los cuales el 45 al 50 % del total fueron producto de la ingestión de FMix. La depredación restante (aproximadamente 35-40 %) se debió a los depredadores no flagelados (<200 μm).

La depredación de las PCY en ambos lagos se debió principalmente a los flagelados. En el lago Escondido los FMix fueron responsables del 70 % de la ingestión de PCY, mientras que los FHET fueron responsables de aproximadamente el 20 % de la ingestión (Figura III-10.c). Estos últimos tuvieron mayor impacto en primavera y verano. En el lago Morenito durante el otoño, la presión de depredación correspondió en un 60 % a los FMix y el 40 % restante a los depredadores no flagelados (Figura III-10.d). En las otras dos estaciones ambos tipos de flagelados fueron responsables de casi la totalidad de la depredación, fundamentalmente los FMix.

Los promedios anuales de importancia relativa de estos tres grupos de depredadores sobre PCY indican un patrón muy similar entre los lagos. Aproximadamente, entre un 85-90 % de la depredación de PCY correspondió a los flagelados, dentro de los cuales el 65 al 70 % del total correspondió a la ingestión de FMix. El 10 al 15 % de la depredación restante se debió a los depredadores no flagelados.

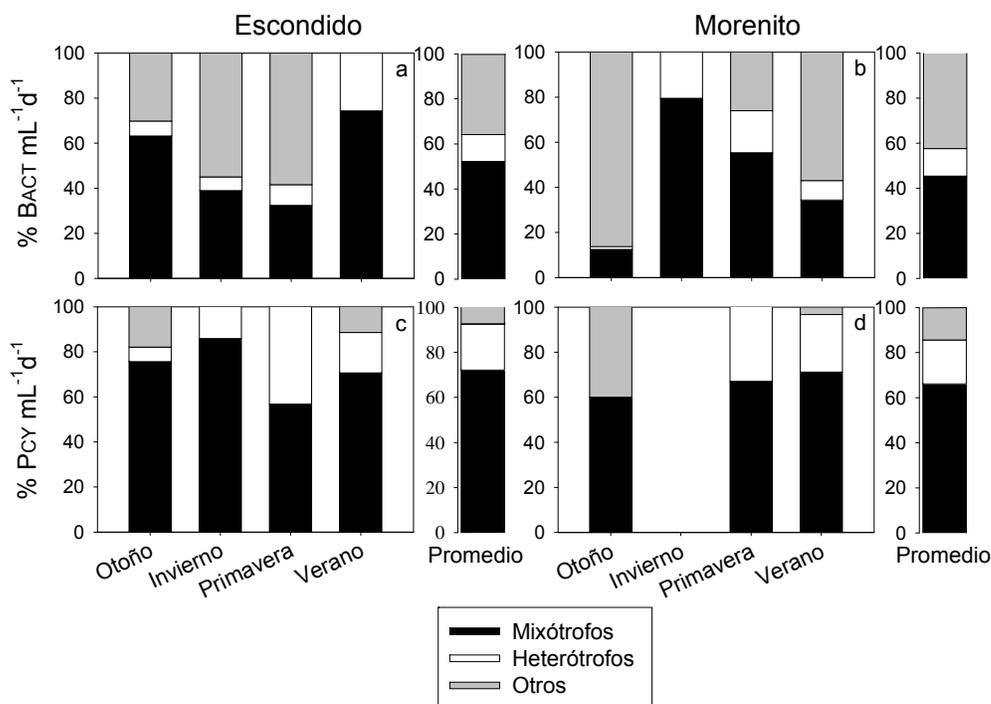


Figura III-10: Impacto de depredación relativo (presas mL⁻¹d⁻¹) de los FMix, FHET y el resto de la comunidad bacterívora <200 μm, determinado a través de dos métodos experimentales (ingestión y desaparición). *Referencias:* Promedio: valor promedio anual de los datos; **a.** Escondido-BACT; **b.** Morenito-BACT; **c.** Escondido-PCY; **d.** Morenito-PCY.

Los flagelados en su conjunto depredaron entre 0,9 y 8,1 % BACT d⁻¹ (Tabla III-1). Por su parte, las tasas de renovación de PCY (% PCY d⁻¹) debida a la depredación de flagelados (Tabla III-2), oscilaron entre 4,6 y 78 % de la población.

III-3-5. Estimación de la depredación en las fechas no experimentales

La Figura III-11 muestra los valores de ingestión total diaria estimados para todos los flagelados (FMix y FHET) y para cada presa en todas las fechas analizadas en el lago Escondido y Morenito en el Capítulo II. El impacto de la bacterivoría total fluctuó a lo largo del año siendo máximo durante el verano y mínimo durante final de invierno en ambos lagos. Para las BACT la presión de depredación promedio estimada en el lago Escondido fluctuó entre $1,7 \times 10^4$ y $7,3 \times 10^4$ BACT mL⁻¹d⁻¹, mientras que fue levemente superior, aunque más variable en el Morenito donde osciló entre $9,6 \times 10^3$ BACT mL⁻¹d⁻¹ y $9,4 \times 10^4$ BACT mL⁻¹d⁻¹. En



el caso de las PCY la presión de depredación media en el Escondido osciló entre $5,9 \times 10^3$ y $2,0 \times 10^4$ PCY mL⁻¹d⁻¹, y en el Morenito varió entre $2,8 \times 10^3$ y $2,6 \times 10^4$ PCY mL⁻¹d⁻¹.

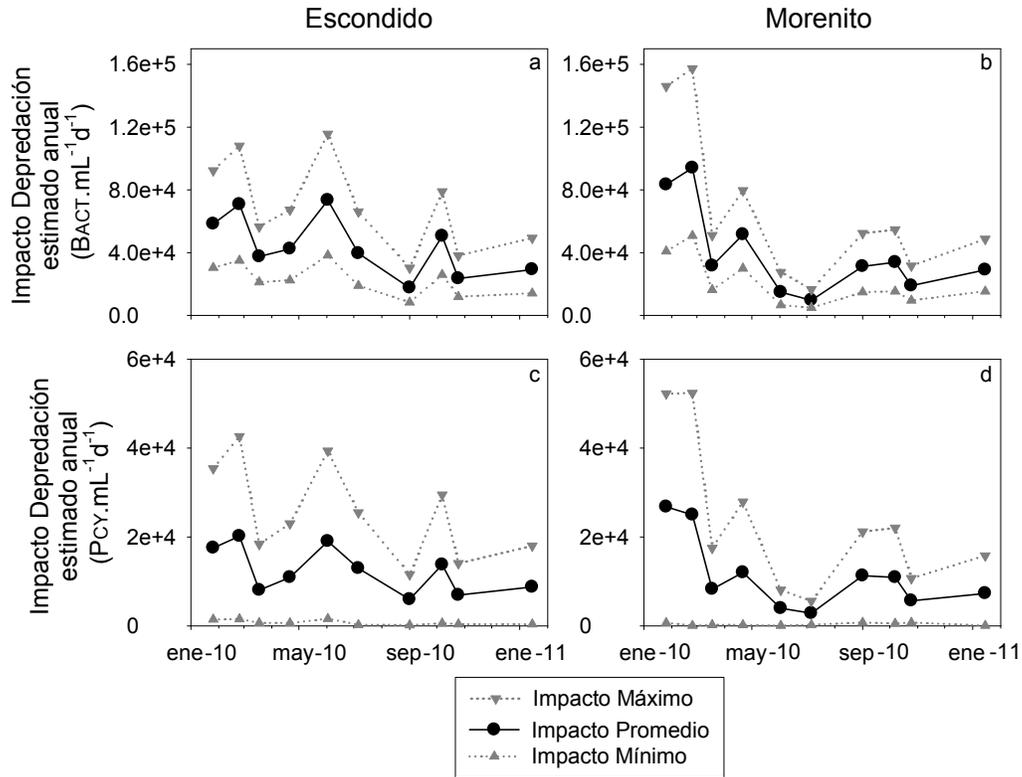


Figura III-11: Impacto de depredación estimado a través de las TDE y su rango de variación para todas las fechas muestreadas en el lago Escondido y Morenito y analizadas en el Capítulo II.



III-3-6. Transferencia de carbono a través de la bacterivoría y de la herbivoría

Asumiendo que las BACT y PCY son las principales presas de los flagelados, la oferta de carbono disponible en forma particulada (BACT + PCY) para los FMix y FHET fue relativamente similar entre los lagos (Figura III-12). El lago Escondido presentó una mayor variación estacional que el Morenito, siendo mínima en invierno y máxima en otoño-verano. A pesar de las variaciones estacionales, en el Escondido la proporción relativa BACT : PCY fue muy estable entre las estaciones. Las BACT representaron en promedio más del 76 % del carbono picoplanctónico. En tanto que en el Morenito fue mucho más variable, las BACT representaron más del 80 % durante otoño y primavera, en invierno las PCY prácticamente desaparecieron, mientras que en el verano las PCY representaron el 40 % del carbono.

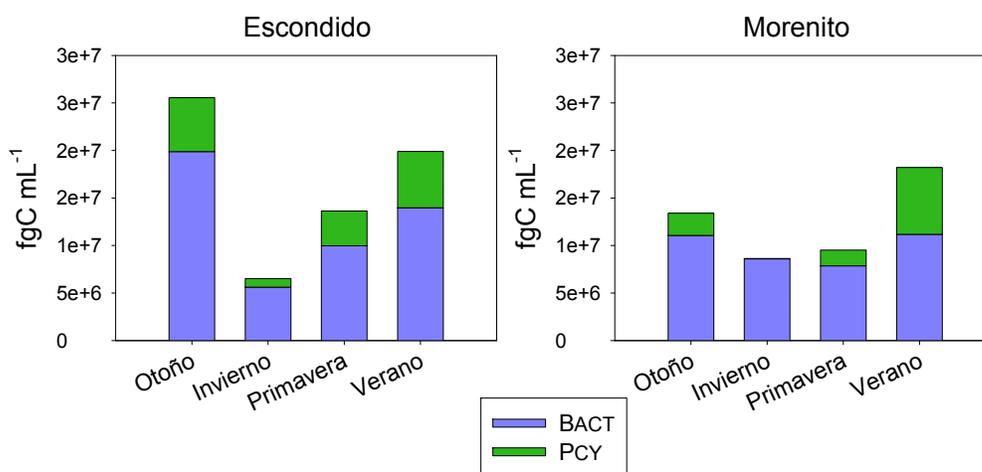


Figura III-12: Biomasa de carbono (fg C mL⁻¹) particulado disponible en los ambientes en forma de BACT y de PCY en cada estación experimental.

A partir de las TDE y de las biomásas de presas, para cada taxón se estimó la cantidad de carbono ingerido proveniente de BACT o de PCY (Figura III-13, Tablas III-1 y III-2). Es preciso aclarar que esta estimación no pretende determinar el carbono asimilado sino simplemente el ingerido por fagotrofia, de manera de proveer un estimador de la contribución relativa de cada presa para cada flagelado. En primer lugar, es destacable que *C. parva*, *O. ovalis* (los dos FMix <5



μm) y *P. lacustris*, presentaron los valores más bajos. Al mismo tiempo, en los dos primeros casos la mayor parte del carbono provino de la ingestión de BACT y no de PCY. Por otra parte, los FMix $>5 \mu\text{m}$ ingirieron más del 70 % del carbono a través de PCY durante primavera y verano. El taxón *Pseudopedinella* sp. fue el que mayor cantidad de carbono total ingirió, siendo más del 75 % de éste obtenido a través de PCY entre el invierno y el verano en ambos lagos. Sin embargo, este patrón se vio modificado durante el otoño en ambos cuerpos de agua. *D. divergens* sólo fue muy abundante durante invierno y primavera en el lago Morenito y presentó un patrón opuesto en cada una de estas estaciones (Figura III-13). Esto mismo también se observó en otros taxa como *P. lacustris* y los FHET $>5 \mu\text{m}$. En el lago Escondido, *G. varians* cobró relevancia entre el invierno y el verano. Este dinoflagelado ingirió más carbono en forma de BACT durante el invierno, pero invirtió la relación en primavera y verano ingiriendo más del 80 % de carbono a través de las PCY.

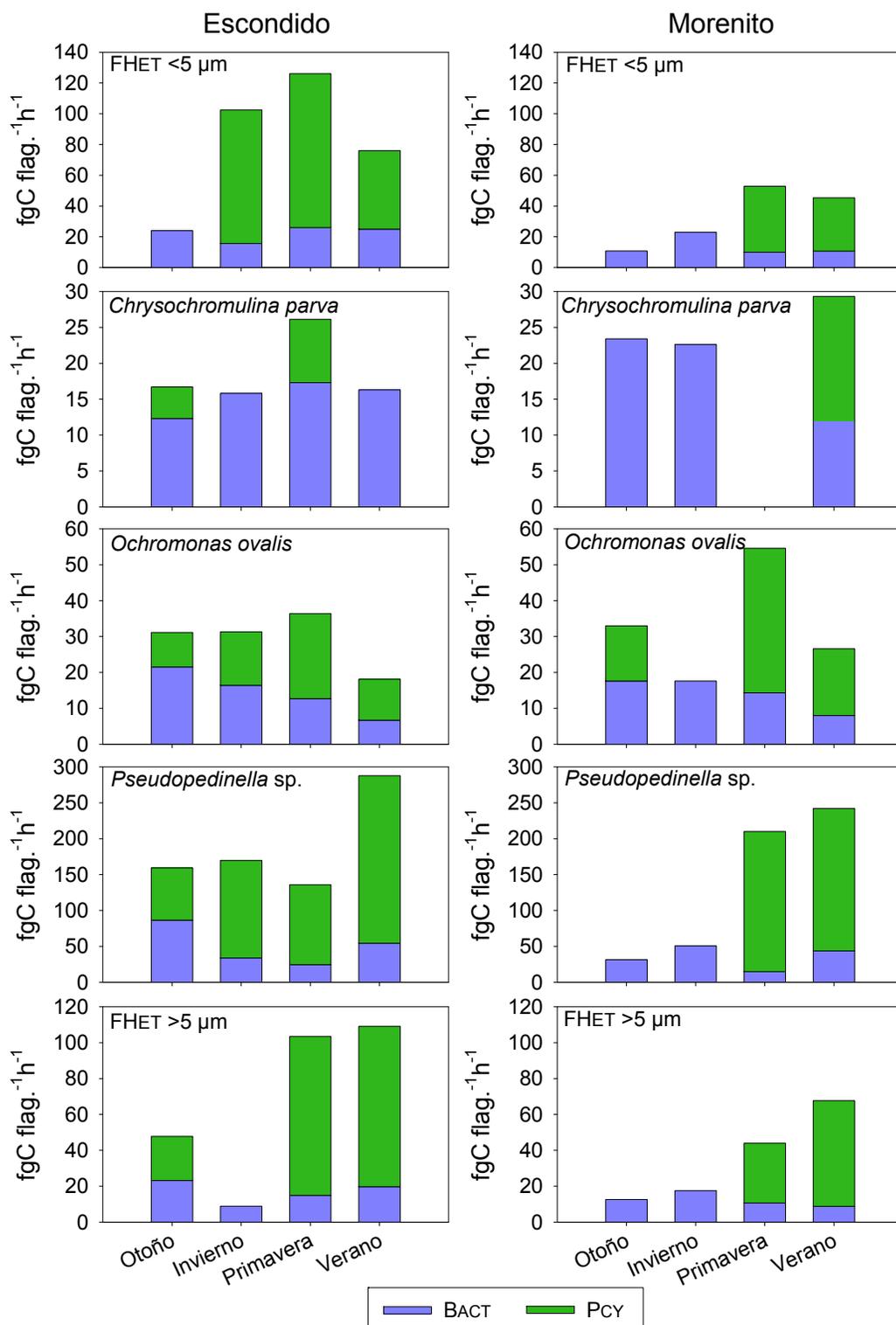


Figura III-13: Cantidad de carbono ingerido por cada taxa a partir de cada tipo de presa (BACT y PCY) en ambos lagos en cada estación. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula. *Continúa en la página siguiente.*

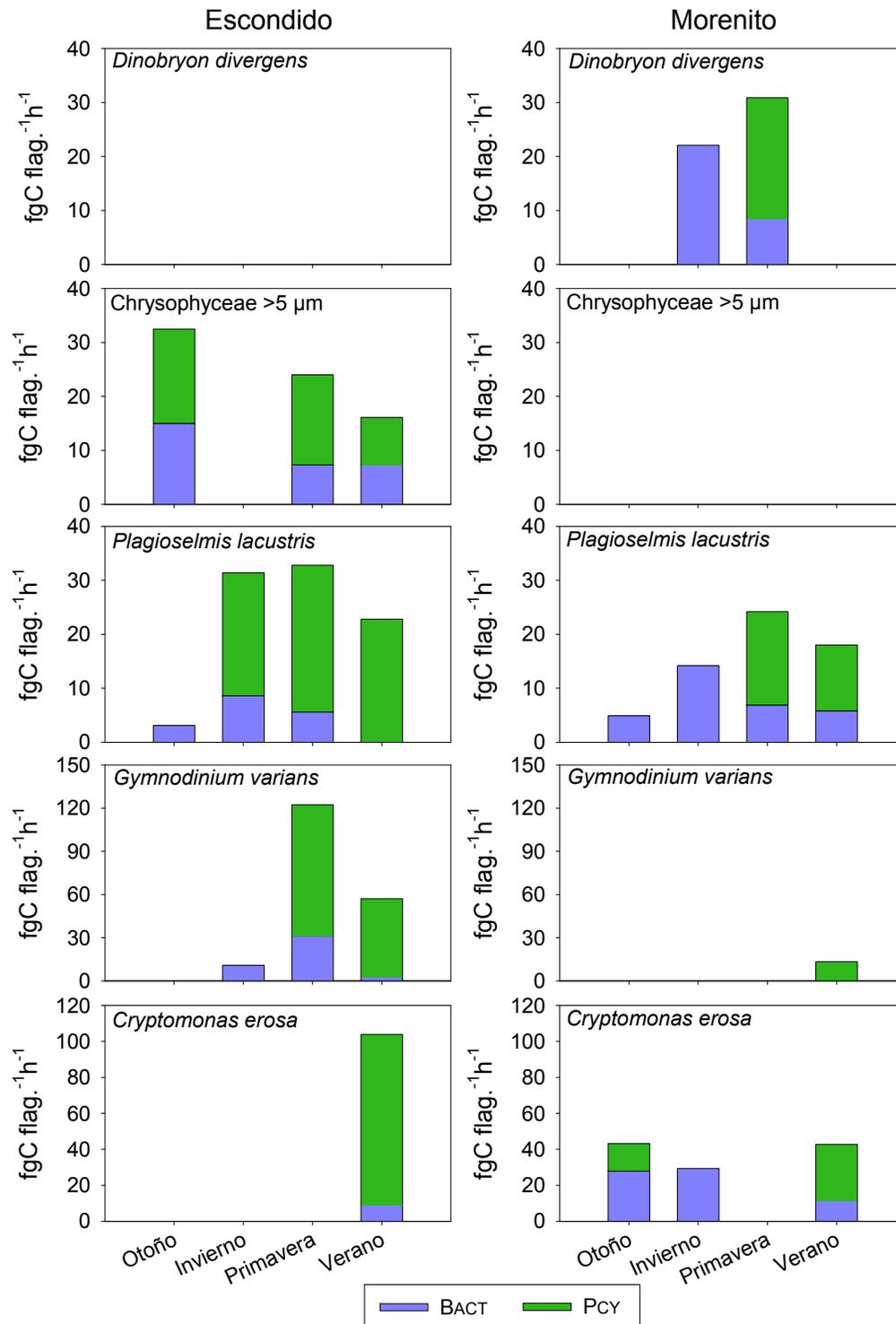


Figura III-13-Continuación: Cantidad de carbono ingerido por cada taxón a partir de cada tipo de presa (BACT y PCY) en ambos lagos en cada estación. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula.



Se encontró una relación inversa para cada tipo de presa entre el porcentaje de carbono adquirido ($\% C d^{-1}$) en relación a la biomasa de cada flagelado (Figura III-14). La Figura III-14 muestra que los flagelados de menor talla adquieren una proporción mayor de carbono respecto a su biomasa que los flagelados de mayor talla. Es interesante destacar que a pesar de observarse una relación inversa muy clara, algunos taxa como *Pseudopedinella* sp. presentan valores de $\% C d^{-1}$ por encima de la tendencia general de los datos.

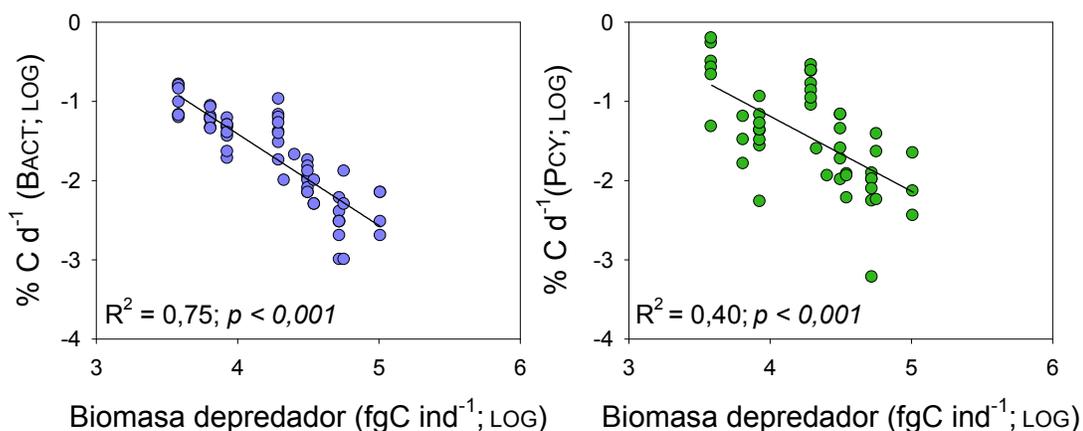


Figura III-14: a. Porcentaje de carbono adquirido como BACT en función de la biomasa individual de los depredadores; b. Porcentaje de carbono adquirido como PCY en función de la biomasa individual de los depredadores.

III-3-7. Selectividad de presas por tamaño

La comparación de las TC sobre BACT vs las TC sobre PCY mostraron que todos los puntos se ubicaron por encima de la línea 1:1. Este resultado sugiere que tanto los FMIX como los FHET seleccionaron positivamente las presas picoplanctónicas de mayor tamaño (PCY) (Figura III-15).

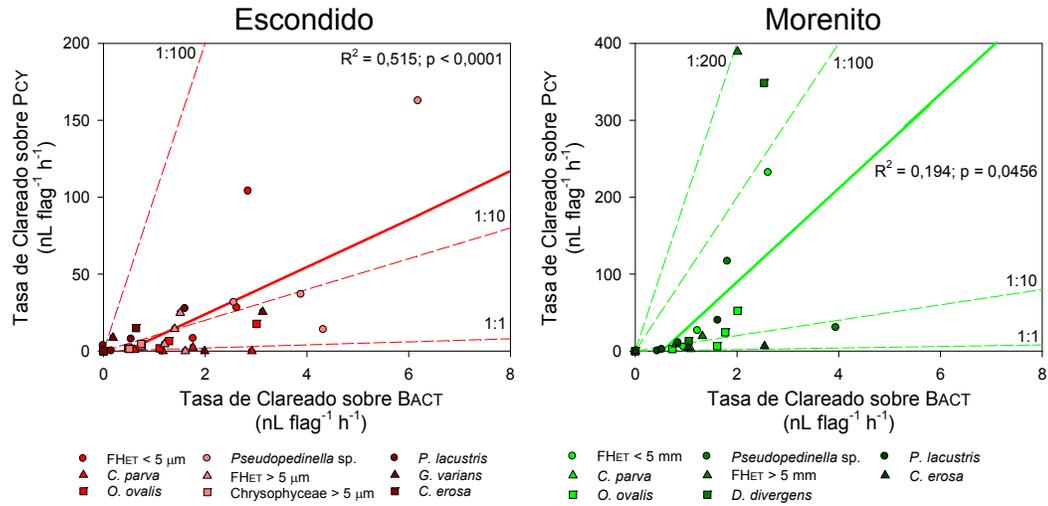


Figura III-15: Las TC sobre BACT vs las TC sobre PCY, en cada caso se indican las líneas correspondientes a la pendiente 1:1, 1:10; 1:100. Con símbolos diferentes se identifica cada taxa de FMix y FHET.

Los resultados de selectividad obtenidos aplicando el índice de selectividad de Chesson fueron similares a los obtenidos a partir de las TC. Los resultados del épsilon de Chesson, calculados para cada taxa en cada experimento, muestran que las PCY son seleccionadas positivamente (preferidas) por todos los flagelados en el 95 % de los casos (Figura III-16). Esto indicaría que los resultados de ambos métodos de determinación de la selectividad de presas son comparables e indican que las PCY fueron seleccionadas positivamente por sobre las BACT.

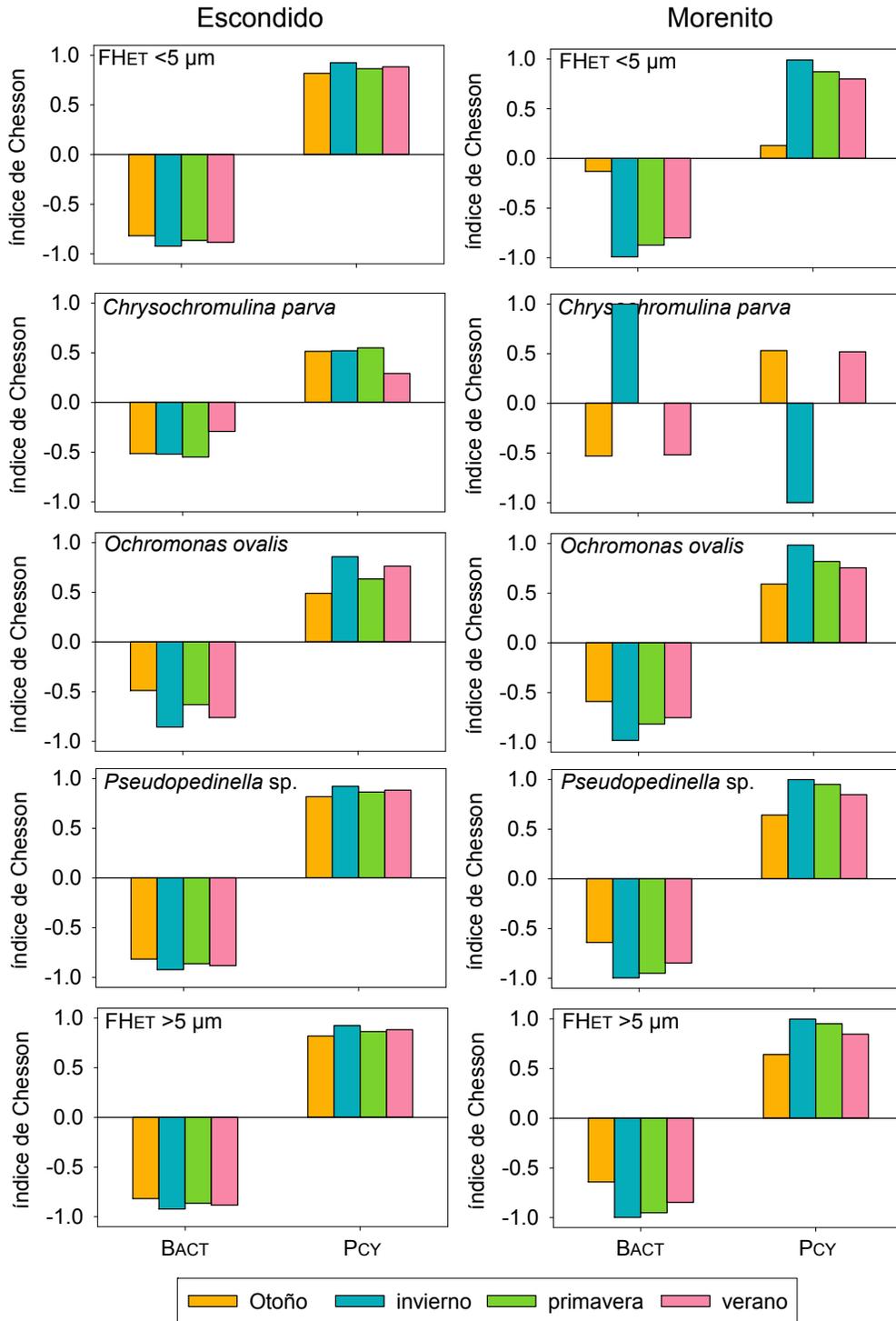


Figura III-16: Épsilon del índice de selectividad de Chesson para los distintos taxa en relación a cada presa (BACT y PCY) y cada lago, en las cuatro estaciones del año. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula. *Referencias:* valores positivos indican selección positiva y valores negativos indican selección negativa. *Continúa en la página siguiente.*

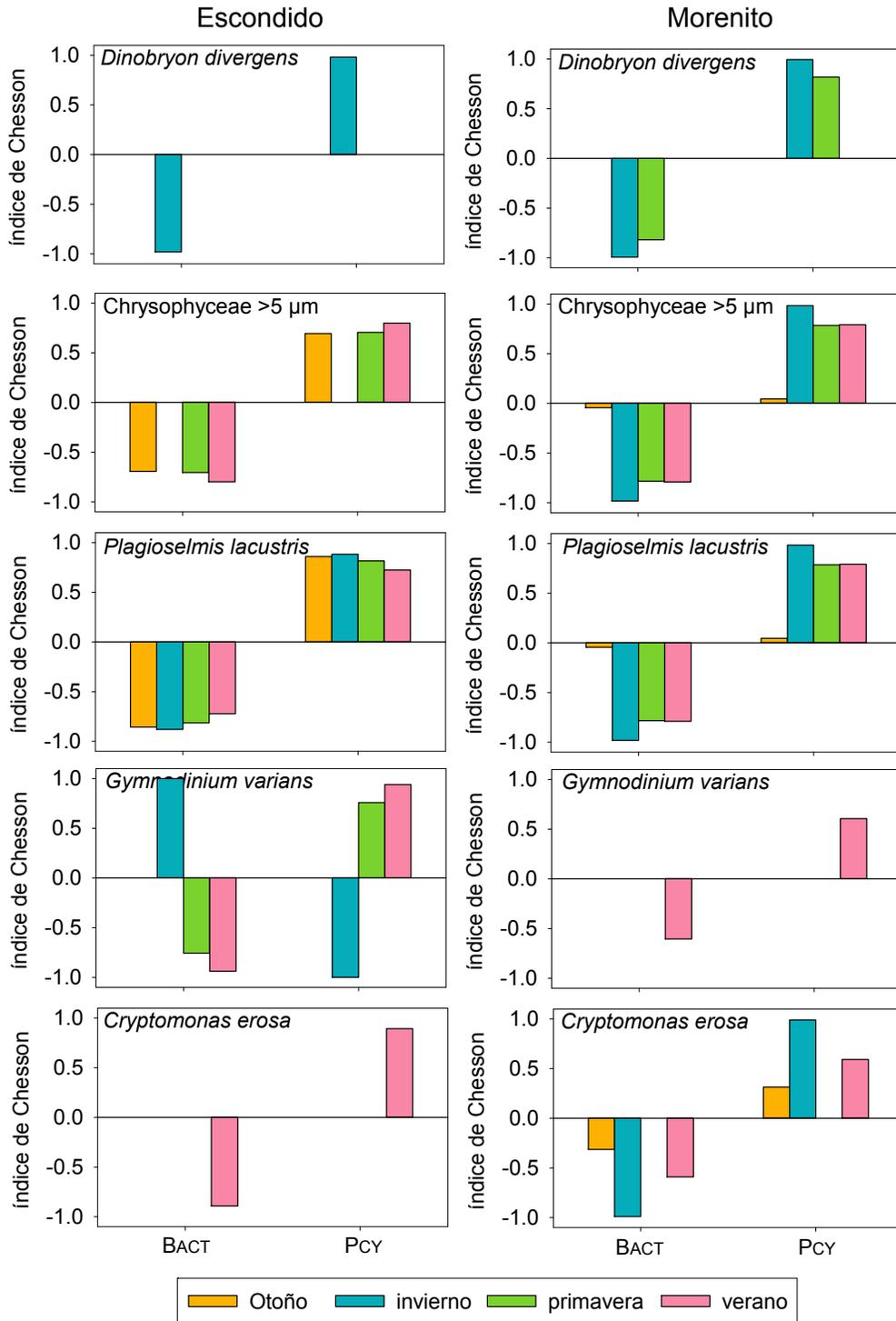


Figura III-16-Continuación: Épsilon del índice de selectividad de Chesson para los distintos taxa en relación a cada presa (BACT y PCY) y cada lago, en las cuatro estaciones del año. Los taxa se ordenaron en forma creciente según la biomasa por célula. *Referencias:* valores positivos indican selección positiva y valores negativos indican selección negativa.



III- 4. Discusión

Todos los FMix y FHET analizados presentaron ingestión sobre BACT y PCY en ambos lagos durante todo el año, aunque en ningún caso se observó que ninguno de los taxa analizados ingirieran algas PEUK. Estos resultados pueden deberse a que el tamaño de estas presas (diámetro 2,96 μm) era relativamente grande en relación con las algas PEUK presentes en los lagos (diámetro 1,78 μm).

Los resultados de las TDE obtenidos en este estudio estuvieron dentro del rango de las TDE halladas por muchos otros investigadores en especies similares a éstas (Carrias et al., 1996; Domaizon et al., 2003; Pålsson y Granéli, 2003; Unrein et al., 2007, 2010). Se encontraron diferencias significativas en las TDE entre las especies, esto estaría apoyando la **Hipótesis 2** acerca de un *espectro de estrategias nutricionales* entre los organismos mixotróficos planteada por R. Jones (1994) y extendida por H. Jones (1997) y R. Jones (2000).

Existen taxa que parecen ser mayormente fagotróficos, presentando altas TDE, como *Pseudopedinella* sp. Este taxón presentó las TDE más altas en estos dos lagos (6,74 BACT $\text{flag}^{-1}\text{h}^{-1}$; 3,10 PCY $\text{flag}^{-1}\text{h}^{-1}$). Estos resultados sugieren que la fagotrofia sería cuantitativamente muy importante para el crecimiento de esta alga. *Pseudopedinella* sp. fue hallada en estos dos ambientes oligotróficos con baja abundancia, y si bien en ningún momento del año dominó la comunidad fitoplanctónica, las elevadas tasas de bacterivoría y herbivoría la convierten en el organismo que mayor impacto global tuvo sobre el picoplancton. *Pseudopedinella* sp. suele encontrarse en ambientes oligotróficos o distróficos siendo en general poco abundante (Jansson et al., 1996; Lepistö y Rosenström, 1998; Isaksson et al., 1999; Hobbie et al., 2000; Unrein et al., 2005; Gerea et al., 2013), y por este motivo las estimaciones de TDE referenciadas de este grupo son muy escasas (Nygaard y Tobiesen, 1993). Nuestros resultados indican además que sus TDE (sobre BACT) estuvieron relacionados directamente con la disponibilidad de presas. Este tipo de relaciones es esperable que ocurra en organismos netamente heterotróficos, como efectivamente se observó en este estudio con los FHET $>5 \mu\text{m}$ (Figura III-5). Este comportamiento podría explicarse de dos modos, por un lado puede ser un alga “oportunista”, es decir que cuando mayor disponibilidad de



presas tiene más ingiere. Por otro lado, puede ser que el modo de nutrición principal de *Pseudopedinella* sp. sea la fagotrofia, y que en sus tasas de bacterivoría estén limitadas por la densidad de presas en estos lagos. Así, el incremento del recurso limitante permitiría que la especie aumente sus tasas de ingestión. Varios trabajos sugieren que existiría una concentración umbral de BACT, por debajo del cual su abundancia sería limitante para los organismos mixotróficos que dependen de su subsistencia como principal fuente de alimento (Caron 1990; Zubkov y Sleight, 1995; Havskum y Riemann, 1996). La densidad de presas que informó Caron et al. (1990) para *P. malhamensis* fue de 1×10^6 BACT.mL⁻¹, este mismo valor también fue propuesto para *Ochromonas* sp. (Rothhaupt, 1996a,b). Estos valores de densidad de BACT umbrales son similares a los que habitualmente se registran en estos dos lagos (Tabla II-2). Existe la posibilidad de que debido a una limitación en la abundancia de presas disponibles, *Pseudopedinella* sp. sea incapaz de dominar la comunidad fitoplanctónica de Escondido y Morenito. Dadas estas características podría categorizarse a este género dentro del “Grupo A” propuesto por H. Jones (1997) y R. Jones (2000; Tabla I-1), ya que sus TDE no responden diferencialmente a los cambios en la luz (Im, Kd), pero sí a los cambios en la concentración de BACT.

Un caso similar al de *Pseudopedinella* sp. es el de las Chrysophyceae >5 µm. Este grupo heterogéneo de Chrysophyceae presenta tasas de bacterivoría menores a las de *Pseudopedinella* sp. (1,17 BACT flag.⁻¹h⁻¹; 0,20 PCY flag.⁻¹h⁻¹), pero presenta un comportamiento similar a ésta en relación a la abundancia de las BACT en el medio. Este taxón muestra una tendencia a incrementar sus TDE con el aumento de la disponibilidad de BACT (datos no mostrados). Además, no presenta un claro patrón de variación respecto a la luz en el ambiente. Por todo esto, la incluimos dentro del “Grupo A” propuesto por H. Jones (1997) y R. Jones (2000; Tabla I-1).

La especie *C. parva* presentó un patrón claro de reducción de las TDE con el incremento de la disponibilidad de luz en el lago Morenito (datos no mostrados). Este patrón ya ha sido descrito para otras especies de este mismo género como *C. brevifilum* (R. Jones et al., 1993, 1995) y *C. ericina* (R. Jones, 1994). Todas estas especies han sido incluidas dentro del “Grupo B”. En ninguno de los lagos



estudiados se observó relación entre las TDE y la disponibilidad de nutrientes en el ambiente, por todo esto se propone incluir esta especie en el “Grupo B” (H. Jones, 1997; R. Jones 2000; Tabla I-1).

La especie *D. divergens* ha sido incluida por H. Jones (1997) dentro del “Grupo B”. Aunque la dinámica anual de esta especie en estos lagos sólo nos permitió obtener tasas de ingestión en 2 de los ocho experimentos llevados a cabo, la ingestión debida a esta especie fue muy relevante en el lago Morenito.

El género *Ochromonas* ha sido ubicado dentro del “Grupo A” en la clasificación de H. Jones (1997), pero ocasionalmente, también se lo ha ubicado dentro del “Grupo B” (H. Jones, 1997). Particularmente, las TDE de *O. ovalis* (1,68 BACT flag.⁻¹h⁻¹; 0,60 PCY flag.⁻¹h⁻¹) estimadas en este trabajo mostraron una relación inversa con la disponibilidad de luz (Im) y de nutrientes (Figura III-5). Estas relaciones nos permiten ubicar a esta especie dentro del “Grupo B”, a partir de lo cual se podría deducir que esta especie utiliza la bacterivoría cuando la luz y la concentración de nutrientes limitan su crecimiento autotrófico.

C. erosa (Cryptophyceae) ha sido descrita como una especie con bajas tasas de ingestión de presas (R. Jones, 1994). Los resultados hallados para esta especie en este estudio (2,79 BACT flag.⁻¹h⁻¹; 1,08 PCY flag.⁻¹h⁻¹) son similares a los presentados por otros estudios (Tranvik et al., 1989; Urabe et al., 2000). Tranvik et al. (1989) demostraron que aunque *Cryptomonas* puede ingerir bacterias, su ganancia energética por fagotrofía es limitada. Urabe et al. (2000) han sugerido que este género podría ingerir bacterias para adquirir algunas sustancias esenciales para su crecimiento (e.g. vitaminas), proponiendo la inclusión de este grupo dentro del “Grupo C” propuesto por H. Jones (1997). Particularmente, en este estudio observamos que las TDE sobre BACT de esta especie respondieron inversamente a la variación de la concentración de PDT.

Las determinaciones de TDE de *G. varians* en este estudio fueron escasas debido a su baja abundancia, pero presentó una relación inversamente proporcional a la disponibilidad de PDT en el ambiente (datos no mostrados).

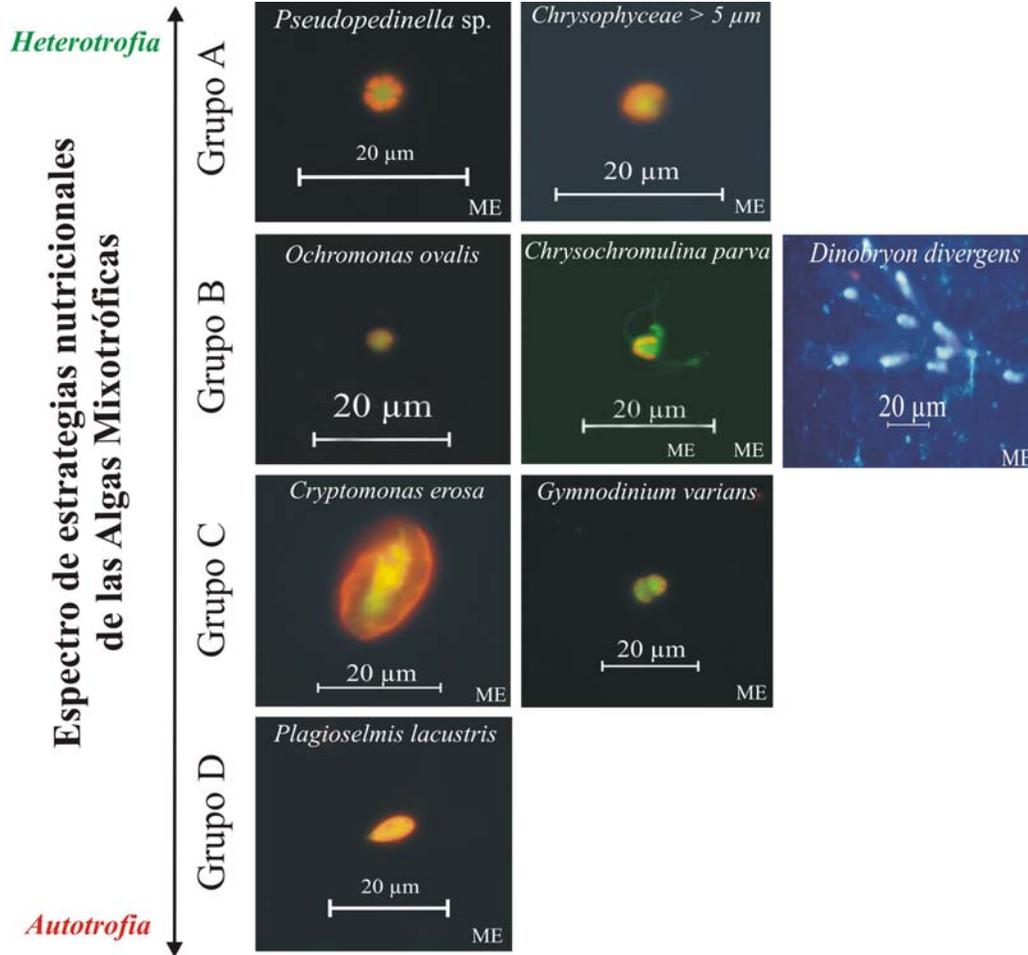


Figura III-17: Espectro de estrategias nutricionales propuesto por R. Jones (1994), extendido por H. Jones (1997) y R. Jones (2000), para las especies mixotróficas presentes en los lagos Escondido y Morenito deducido a partir de datos experimentales y de campo.

El impacto de la depredación de los FMix y FHET sobre las presas indica que los FMix fueron responsables de más del 80 % de la bacterivoría y la herbivoría debida a los flagelados. La comparación con los valores obtenidos por desaparición (impacto de los depredadores <200 μm) sugieren además que los flagelados serían los principales bacterívoros en ambos sistemas, representando los FMix en promedio aproximadamente el 50 % de la bacterivoría total y 65 % de la herbivoría total. Estos resultados confirman la **Hipótesis 1** planteada en este estudio que proponía que las especies mixotróficas dominarían la depredación de organismos picoplanctónicos en estos dos ambientes. Además, coincide con los



resultados hallados en otros estudios en ambientes meso a oligotróficos, tanto marinos como continentales, en los cuales se registró que la bacterivoría debida a mixótrofos puede ser mayor al 40 % (Isaksson et al., 1999; Hitchman y R. Jones, 2000; Domaizon et al., 2003; Medina-Sánchez et al., 2004; Unrein et al., 2007; Zubkov y Tarran, 2008). Asimismo, también se ha observado un alto impacto de depredación sobre las PCY (Pernthaler et al., 1996; Tarbe et al., 2011; Izaguirre et al., 2012). Nuestros resultados, en conjunto con los antecedentes obtenidos hasta el presente, confirman la tendencia general de que las algas mixotróficas serían los principales bacterívoros en los ambientes oligotróficos.

Por otro lado, si bien el impacto de los FHET sobre las BACT no superó nunca el 25 % de la bacterivoría debida a los flagelados, presentó una marcada estacionalidad, con valores más elevados durante las estaciones cálidas. Un patrón similar se observó en otro estudio realizado en el Mediterráneo (Unrein et al., 2007).

Las tasas de renovación de BACT (% BACT d⁻¹, Tabla III-1) obtenidas fueron similares a las observadas en otros estudios sobre flagelados en agua dulce y en el mar (Tranvik et al., 1989; Vaqué y Pace, 1992; Ichinotsuka et al., 2006; Unrein et al., 2007; entre otros). En total, entre 5 y 39 % de las bacterias fueron removidas por día. Comparando estas tasas de depredación con los únicos valores publicados hasta el momento de producción bacteriana para estos lagos (Bastidas Navarro et al., 2008), aproximadamente 22 y 69 % de la PB estival del lago Escondido y Morenito respectivamente, estaría siendo consumida diariamente por los bacterívoros.

Por su parte, las tasas de renovación de PCY fueron considerablemente más elevadas que las de las bacterias, llegando a remover hasta 78 % de biomasa de PCY por día (Tabla III-2). Este resultado estaría indicando que la presión de depredación de los FMIX y FHET es mayor sobre el picoplancton autotrófico que sobre el picoplancton heterotrófico.

Se encontró una relación inversa entre % C d⁻¹ (por cada presa) y la biomasa de cada flagelado (Figura III-13). Estos resultados ya han sido previamente descritos por otros autores (Pernthaler et al., 1996; Unrein et al., 2007; Izaguirre



et al., 2012) y sugieren que los flagelados de menor tamaño ($<5 \mu\text{m}$) depredarían preferentemente sobre presas más pequeñas (BACT). Contrariamente, es esperable que taxa más grandes prefieran presas de mayor tamaño, sin embargo, los experimentos con agregado de PEUK no mostraron tasas de depredación detectables para ninguno de los taxa analizados, por lo cual es imposible arribar a una conclusión definitiva en relación a este patrón.

La extrapolación de los datos de ingestión para toda la comunidad bacterívora permitió estimar que la presión de depredación probable tanto sobre BACT como sobre PCY a lo largo del año de estudio fue más variable para el lago Morenito que para el Escondido. En el primero de estos ambientes se observó que la máxima depredación debida a flagelados ocurriría durante el verano, tal como se ha observado en otros ambientes oligotróficos del mundo (Unrein et al., 2007).

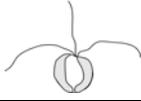
El análisis de la selectividad de presas entre BACT y PCY mostró que, a excepción de *C. parva*, todos los FMix y FHET ingirieron selectivamente PCY. La preferencia de FHET y algunos taxa mixotróficos por las PCY coinciden con los hallados en otros estudios (Pernthaler et al., 1996; Tarbe et al., 2011; Izaguirre et al. 2012). Por lo que, contrariamente a lo planteado en la **Hipótesis 3**, solo uno de los flagelados $<5 \mu\text{m}$ mostró una selección positiva por las presas de tamaño pequeño.

La selectividad entre estas dos presas (bacterivoría vs. herbivoría) implica diferencias en el flujo de energía en las tramas tróficas. Esta última diferencia tiene consecuencias relevantes en el reciclado de nutrientes de los ambiente (Tarbe et al., 2011). Sherr y Sherr (2002), sugirieron que la herbivoría es el principal proceso de reciclado de carbono en aguas oligotróficas, probablemente más significativo que la bacterivoría. Estos autores enfatizaron que la herbivoría dominaría en ambientes oligotróficos porque la biomasa de picoplancton total estaría dominada por picoplancton autotrófico. Nuestros resultados coinciden, con el planteo de Sherr y Sherr (2002), respecto a la importancia relativa de la herbivoría, a pesar de que en estos dos lagos oligotróficos más del 70 % de la biomasa del picoplancton correspondió a BACT. Un resultado similar fue encontrado por Pernthaler et al. (1996) en el Piburger See (Austria).



El tamaño de la presa es un factor determinante de la selectividad por parte de los protistas (Jürgens y Matz, 2002 y referencias dentro). Estos autores demostraron que las partículas de aproximadamente 0,5 μm de diámetro serían entre 4 y 6 veces menos depredadas que las partículas de 1 μm . En los lagos aquí analizados, en diámetro medio de las BACT y de las PCY fue de 0,40 y 0,87 μm , respectivamente. Esto explicaría la preferencia de la mayoría de los depredadores sobre PCY.

Sin embargo, se podría plantear otra posible explicación para los resultados obtenidos en estos experimentos. Hipotetizamos que el proceso de selección de presas en estos ambientes fuertemente limitados por nutrientes y particularmente por nitrógeno (Diaz et al., 2007), puede estar asociado a una relación estequiométrica de las presas (BACT y PCY). En algunos trabajos se ha sugerido que los FMIX pueden volverse limitados por N debido a la ingestión de bacterias ricas en P (Jansson et al., 1996; Pålsson y Granéli, 2004). Algunos estudios indican que las BACT son ricas en contenido de P (Fagerbakke et al., 1996; Jansson et al., 1996; Isaksson et al., 1999; Vandstein, 2000). Por otro lado, Bertilsson et al. (2003) sugirieron que *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (dos grupos de PCY) presentan una relación C:P y N:P alta respecto al “cociente de Redfield” (106C:16N:1P) bajo condiciones eutróficas y de limitación de nutrientes. Lo cual indicaría que estas PCY pueden tener requisitos relativamente bajos de P en el campo, siendo más rica proporcionalmente en N que en P. Desde el punto de vista de la estequiometría, ingerir presas con alto contenido relativo de P en un ambiente limitado por N sería desfavorable, ya que esto incrementaría la limitación por N de los depredadores (FMIX y FHET). Esta situación resultaría energéticamente costosa de revertir. Sin embargo, los flagelados capaces de seleccionar presas proporcionalmente ricas en N se beneficiarían respecto a los que no seleccionan, reduciendo así su limitación. Si se analiza paralelamente la selectividad de presas y la cantidad de carbono ingerido a través de BACT y PCY, se observa claramente que, a excepción de *C. parva*, todos los flagelados ingirieron mayor cantidad de carbono a través de PCY que de BACT. Estos resultados podrían estar apoyando la hipótesis de que la selectividad de presas



estaría asociada en parte al tamaño, pero también podría estar relacionada con la calidad del alimento o el balance estequiométrico que éste presente.



CAPÍTULO IV:

Selección de presas *in situ* en flagelados mixotróficos y heterotróficos en lagos someros oligotróficos antárticos: un análisis del contenido de vacuolas digestivas



GEREA, M., C. QUEIMALIÑOS, R. SCHIAFFINO, I. IZAGUIRRE, I. FORN, R. MASSANA & F. UNREIN (2013). *In situ* prey selection of mixotrophic and heterotrophic flagellates in Antarctic oligotrophic lakes: an analysis of the digestive vacuole content. *Journal of Plankton Research*, 35(1): 201-212. DOI: 10.1093/plankt/fbs085



IV- 1. Introducción

La depredación selectiva de los protistas bacterívoros es un mecanismo de estructuración fuerte de las redes tróficas planctónicas (Strom y Loukos, 1998). Cada depredador puede tener diferente preferencia de presas, y por lo tanto, estar adaptado a consumir una parte específica del ensamble de BACT. Como ha sido previamente descrito, la selección de presas por parte de FHET depende principalmente del tamaño y la morfología de la presa (Pernthaler et al., 1997; Simek et al., 1997). Sin embargo, existen también otras características que pueden influenciar la depredación selectiva de los flagelados, como por ejemplo la movilidad y el estado fisiológico de la presa (González et al. 1993; Strom y Loukos, 1998; Matz y Jürgens, 2005). La selectividad de presas ha sido ampliamente estudiada para FHET (González et al. 1990a; Boenigk et al., 2001a; Matz et al., 2002; Massana et al., 2009), pero menos estudiada en FMix (Boenigk et al., 2001b; Tarbe et al., 2011; Izaguirre et al., 2012).

En los últimos años, los avances de la ciencia han permitido el desarrollo de técnicas moleculares innovadoras que proporcionan nuevas vías para el análisis de la composición de la comunidad microbiana. La técnica de deposición catalizada e hibridización *in situ* con sondas fluorescentes (CARD-FISH: *Catalyzed Reporter Deposition- Fluorescence in situ Hybridization*; Pernthaler et al., 2002) originalmente desarrollada para identificar distintos filotipos de bacterias, fue recientemente utilizada para identificar bacterias dentro de vacuolas digestivas de ciertos protistas bacterívoros (Medina-Sánchez et al., 2005; Jezbera et al., 2005, 2006; Modenutti et al., 2008; Massana et al., 2009). En particular, esta aproximación ha permitido evaluar la selectividad de presas *in situ* de FHET (Jezbera et al., 2005, 2006), comparando las abundancias relativas de los filotipos de presas *in situ* y dentro de las vacuolas digestivas. Una característica destacable de esta técnica, es que no requiere de incubaciones ni de trazadores. En lo que respecta a los FMix, la técnica de CARD-FISH fue utilizada en un solo estudio (Medina-Sánchez et al., 2005), en el cual los autores mostraron que esta técnica permite la identificación de bacterias dentro de las vacuolas digestivas de las algas sin perder la autofluorescencia de los cloroplastos. Sin embargo, Medina-Sánchez et al. (2005) no realizaron un estudio acerca de la preferencia de



presas por parte de las algas mixotróficas. En este sentido, es de destacar que la selectividad de presas *in situ* por parte de las algas mixotróficas no ha sido determinada hasta la actualidad.

El Objetivo del presente Capítulo es analizar, mediante la técnica de CARD-FISH, la selectividad de presas *in situ* de las algas mixotróficas (identificadas al mayor detalle taxonómico posible) y de los flagelados heterotróficos sobre los principales filotipos de procariotas heterotróficos (*Bacteria* y *Archaea*) en lagos someros oligotróficos Antárticos dominados por algas mixotróficas.

Hipótesis y predicciones

Hipótesis 1: Las distintas estrategias nutricionales y la afiliación filogenética de los flagelados bacterívoros determina la selectividad de presas por diferentes filotipos de bacterias.

Predicción: Los FHET preferirán ingerir *Betaproteobacteria*, como ha sido observado en otros ambientes del mundo, mientras que los FMix preferirán ingerir otros grupos de bacterias debido a sus diferentes requerimientos de nutrición y su distinta afiliación filogenética

Hipótesis 2: El pequeño tamaño les confiere a las *Actinobacteria* protección contra la depredación.

Predicción: Las *Actinobacteria* serían seleccionadas negativamente por la mayor parte de los depredadores.



IV- 2. Sitio de estudio

Ubicación geográfica y características generales de los lagos

Para este estudio se seleccionaron cuatro cuerpos de agua situados en Bahía Esperanza: lagos Esperanza, Flora, Encantado y Chico. Bahía Esperanza está ubicada en el extremo Norte de la Península Antártica (63°24'S, 57°00'O), donde la mayoría de los lagos son de origen glaciar. Durante el verano los lagos se encuentran libres de hielo o cubiertos por una delgada capa de hielo que oscila entre 1-35 cm de espesor. Los lagos Esperanza, Flora y Encantado están situados en el Valle de los Cinco Lagos, y están conectados por un pequeño arroyo; el lago Chico se encuentra localizado en la plataforma del Monte Flora (Figura IV-1).

Las características morfométricas y fisicoquímicas de estos lagos han sido previamente descritas por Izaguirre et al. (Izaguirre et al., 1998; Unrein et al., 2005; Schiaffino et al., 2009) y se resumen en la Tabla IV-1. Estos lagos son someros y presentan una profundidad máxima entre 1 y 7 m. Además, son oligotróficos con una concentración de $Cl a < 1 \mu g L^{-1}$, y comparten una composición fitoplanctónica relativamente similar dominada por taxa mixotróficos pertenecientes a la Clase Chrysophyceae (Izaguirre et al., 1998, 2003; Allende y Izaguirre, 2003; Unrein et al., 2005).

Inicialmente se planteó desarrollar el objetivo de este Capítulo en los lagos Escondido y Morenito. Sin embargo, surgieron inconvenientes en la observación de las presas dentro de las vacuolas digestivas de las algas mixotróficas, ya que, llamativamente, estas células algales se encontraron sistemáticamente deformadas. Posteriormente, este hecho fue atribuido a la fijación utilizada en las muestras (paraformaldehído, concentración final 1 %; según Medina Sánchez et al., 2005). Entonces, en función de contar con estos novedosos resultados, se tomó la decisión de utilizar muestras previamente obtenidas por el Dr. Fernando Unrein (co-Director de esta Tesis) y la Dra. Irina Izaguirre en cuatro lagos antárticos durante la campaña de investigación de 2004. Las muestras antárticas habían sido fijadas con formaldehído (concentración final 2 %) y almacenadas en *freezer* -80°C durante 5 años, hasta su fecha de hibridación con las sondas



correspondientes y su posterior e inmediato recuento. Se sabe que el almacenamiento de los filtros en *freezer* de -20 o -80°C permite mantener los muestras en óptimas condiciones por años (Wendeberg, 2010). En este caso fue posible realizar las observaciones y los recuentos sin inconvenientes, hecho que permitió lograr el objetivo con éxito (Gerea et al., 2013).

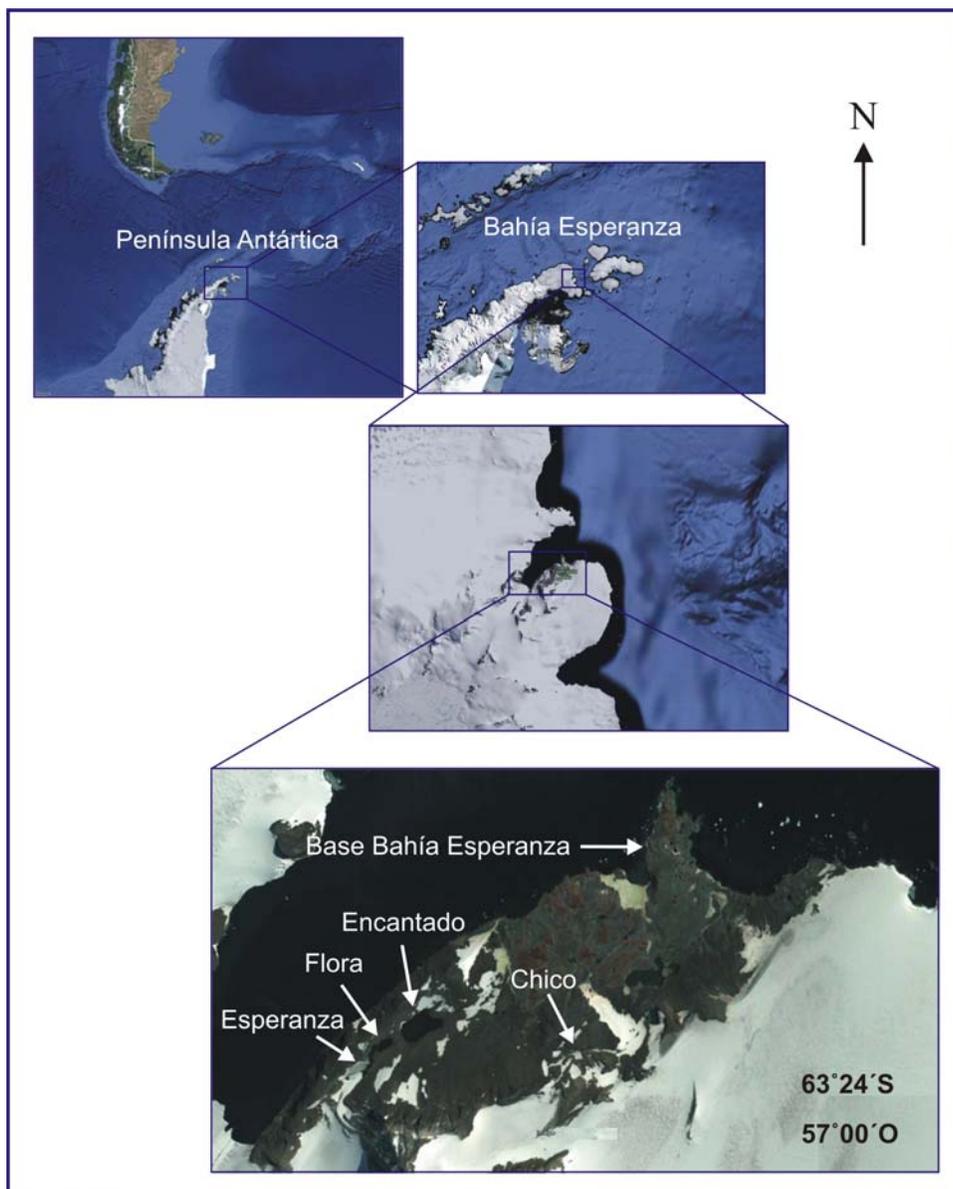


Figura IV-1: Localización geográfica de los lagos Esperanza, Flora Encantado y Chico, ubicados en Bahía Esperanza (Antártida).



Tabla IV-1. Datos físico-químicos de los lagos estudiados. *Referencias:* OD: Oxígeno disuelto; N-NH₄⁺: concentración de amonio; N-NO₃⁻: concentración de nitratos; COD: carbono orgánico disuelto; Cl *a*: clorofila *a*; ND: datos no detectable; NA: datos no determinados.

	Encantado	Flora	Esperanza	Chico
Área (Ha)	0,3	0,6	3,0	0,3
Temperatura (°C)	0-0,6	0-3,9	0-4,1	0-0,6
pH	6,1-6,6	6,3-6,6	6,4-6,7	6,5-6,9
Conductividad (μS cm ⁻¹)	67-258	28-74	33-91	44-198
OD (mg L ⁻¹)	18,5-21,5	NA-26,3	13,4-16,8	11,7-20,5
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	ND-0,03	ND-0,02	ND-0,07	ND-0,18
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,02-0,12	0,07-0,12	0,04-0,13	0,08-0,19
Kd _{RFA} (m ⁻¹)	0,90	0,13	0,13	0,96
COD (mg L ⁻¹)	0,9	0,4	0,5	0,5
Cl <i>a</i> (μg L ⁻¹)	0,58-1,02	0,65-0,76	0,22-0,44	0,44-0,87



IV- 3. Materiales y métodos

IV-3-1. Obtención de las muestras

Los cuerpos de agua fueron muestreados en dos fechas diferentes durante el verano austral, entre enero y marzo de 2004. Las muestras fueron extraídas de un sitio cerca de la orilla, debajo de la superficie durante los períodos libres de hielo, o inmediatamente por debajo de la capa de hielo cuando los lagos se encontraban congelados. Las muestras fueron obtenidas con bidones plásticos (lavados con ácido clorhídrico al 10 %, y enjuagadas con agua destilada y con agua de lago). Inmediatamente, una submuestra de 200 mL fue fijada con glutaraldehído 10 % frío previamente filtrado por 0,2 μm (concentración final 1 %) para la cuantificación de picoplancton y nanoplancton. Otra submuestra de 500 mL fue fijada con Lugol acético para el recuento del microfitoplancton y ciliados. Otra submuestra de 200 mL fue fijada con formaldehído 10 % frío (4°C) previamente filtrado por 0,2 μm (concentración final 2 %) para la obtención de las muestras que se utilizaron en la hibridación con la técnica de CARD-FISH a fin de analizar la selectividad de presas. Las mismas fueron, transportadas en oscuridad al laboratorio y procesadas dentro de las 2 h posteriores a la extracción.

IV-3-2. Determinación de la abundancia de los distintos organismos

Para estimar la abundancia del picoplancton, el nanoplancton, el microplancton se utilizaron las muestras fijadas con glutaraldehído y Lugol acético, siguiendo la metodología detallada en el Capítulo II.

IV-3-3. Procesamiento de las muestras mediante la técnica de CARD-FISH

Los principales filotipos de procariotas heterotróficos (FPH) se identificaron aplicando la técnica de CARD-FISH (Pernthaler et al., 2002; Pernthaler et al., 2004). El término FPH incluye a *Bacteria* y *Archaea*, haciendo referencia a todo el picoplancton procariota no fotosintético, excluyendo por lo tanto a *Cyanobacteria*.



Las muestras para la cuantificación de los distintos FPH en el ambiente se prepararon filtrando alícuotas de 2 a 10 mL de las muestras fijadas con formaldehído, a través de filtros blancos de policarbonato de 0,22 μm de poro (MSI). Los filtros se dejaron secar con la cara de filtrado hacia arriba sobre una superficie plana y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras para la cuantificación de los distintos FPH dentro de las vacuolas digestivas de los flagelados fueron procesadas de la misma forma que las anteriores, excepto por el volumen de filtración que osciló entre 10 y 20 mL, y que fueron filtrados a través de membranas de 0,8 μm (MSI).

Los filtros fueron divididos en secciones, las cuales fueron hibridadas de acuerdo a Pernthaler et al. (2002) y Sekar et al. (2003) siguiendo el protocolo detallado en el *Anexo II* de esta Tesis. Se utilizaron 8 sondas de oligonucleótidos para identificar los principales grupos de *Bacteria* y *Archaea*, las cuales se detallan en la Tabla B del *Anexo II*. Las sondas (Thermo Electron Corporation) fueron ligadas a una enzima peroxidasa (HPR: Horseradish peroxidase) (Urdea et al., 1988). Luego de la hibridación, la señal fue amplificada con tiramida marcada con Alexa 488. Las porciones de los filtros hibridadas con distintas sondas fueron montadas entre portaobjetos y cubreobjetos con Vectashield (con DAPI) y fueron observadas en microscopio de epifluorescencia (Olympus BX50, Japón) bajo excitación de luz azul y radiación UV.

En cada muestra se midió el tamaño celular de los FPH más abundantes usando el programa Image Pro Plus 4.5, siguiendo el protocolo de análisis de imágenes propuesto por Massana et al. (1997a). El cálculo del biovolumen de los FPH a partir de las mediciones de las células se realizó siguiendo detalladamente el protocolo propuesto por Massana et al. (1997a), empleando las 7 ecuaciones planteadas por dichos autores. Las mediciones fueron realizadas sobre imágenes obtenidas de las muestras hibridadas con CARD-FISH. Si bien las dimensiones de las células estimadas de esta manera son mayores que cuando se analizan sobre la imagen teñida con DAPI, comparaciones realizadas entre ambos métodos permitieron determinar que no existen diferencias significativas en la sobreestimación debida al CARD-FISH entre células de distintos FPH hibridados con distintas sondas. En función de esto, en esta Tesis, las dimensiones



bacterianas fueron determinadas a partir de la señal de CARD-FISH, y por lo tanto, los tamaños celulares obtenidos fueron comparables entre los distintos FPH y con los de otros estudios que analizaron las dimensiones bacterianas del mismo modo (e.g. Jezbera et al., 2005, 2006). Se consideraron a las células de longitud mayor que 3 μm como protegidas contra la depredación para la mayoría de los protistas bacterívoros (Hahn y Höfle, 2001; Pernthaler, 2005; Šimek et al., 2005).

IV-3-4. Análisis de la selectividad de presas por afiliación filogenética

En base a estudios previos realizados en estos ambientes (Izaguirre et al., 1998, 2003; Allende e Izaguirre, 2003; Unrein et al., 2005) se identificaron tres flagelados mixotróficos diferentes: *Pseudopedinella* sp., Chrysophyceae <5 μm (cf. *Ochromonas*) y Chrysophyceae >5 μm . Los FHET fueron considerados como un único grupo. Para evaluar la presencia de cada FPH en las vacuolas digestivas se inspeccionaron en cada muestra setenta y cinco células de cada tipo de flagelado.

Con el objetivo de determinar la preferencia de cada flagelado bacterívoro por un FPH, se comparó la abundancia relativa de cada uno de los siete FPH dentro de las vacuolas digestivas en relación con su abundancia relativa en el plancton. En estudios previos, la abundancia relativa de cada FPH fue calculada en relación a la abundancia de células hibridadas con la sonda general de *Bacteria* EUB338 (Šimek et al., 1997; Jezbera et al., 2005, 2006). Sin embargo, en el presente estudio se observó que la sonda EUB338-II-III también hibrida los cloroplastos de los FMIX, haciendo imposible la identificación de *Bacteria* ingeridas en las vacuolas digestivas de estos organismos. Para resolver este inconveniente se refirió la estimación a la suma de todos los FPH identificados. En este sentido, se definió a la totalidad de procariotas identificados (TPI) como la suma de siete FPH, cinco correspondientes al grupo de las *Bacteria* (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*) y dos correspondientes al grupo de las *Archaea* (*Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*). El TPI en las muestras de plancton representó en promedio un 80,2 % (entre 65,2 % y 95,2 %) del total de procariotas heterotróficos identificados



por DAPI. Con el propósito de validar esta asunción, en el caso particular de los FHET se calcularon los índices de selectividad (ver más abajo) utilizando los valores obtenidos tanto por TPI como por la sonda EUB338-II-III, y se compararon los resultados obtenidos.

Para analizar la selectividad de presas se utilizó el índice de Chesson, α , (Chesson 1978, 1983), tal como se describió en el Capítulo III. Este índice fue calculado en todos los casos en que FPH fueron superiores al 4 % de las TPI. Como el número de tipos de presas varió en función de la abundancia relativa de las mismas, y por lo tanto el límite para la selección ($1/m$) debería ser diferente en cada caso, se calculó el parámetro ε (Chesson, 1983), el cual es independiente de m . En este sentido, el valor α fue transformado en el valor ε como se muestra a continuación:

$$\varepsilon_i = (m\alpha_i - 1)/(m - 2)\alpha_i + 1$$

este parámetro varía entre -1 y 1; $\varepsilon = 0$ implica selección aleatoria, los valores negativos indican selección negativa, mientras que los valores positivos indican selección positiva. Este parámetro puede ser utilizado para mostrar gráficamente los resultados del índice, ya que son visualmente más sencillos de interpretar, aunque no puede utilizarse para análisis estadísticos (Chesson, 1983).

IV-3-5. Análisis de los datos

Se calculó el índice de correlación de Pearson para los valores α del índice de selectividad entre todos los flagelados bacterívoros. Además, este análisis también se aplicó para comparar los índices de selectividad calculados para los FHET en función de las TPI y de las células hibridadas por la sonda EUB338-II-III. Como se mencionó anteriormente, no se realizó este análisis sobre el ε porque sus propiedades estadísticas no están claramente definidas (Chesson, 1983). Se aplicó un análisis de regresión lineal para comparar la relación entre la abundancia de células hibridadas con la sonda EUB338-II-III y las TPI en todas las muestras.



IV-4. Resultados

IV-4-1. Composición de la comunidad de procariontas heterotróficos

La abundancia de los FPH osciló entre 0.9×10^5 y 6.8×10^6 cél.mL⁻¹ (Figura IV-2.a). Las *Alphaproteobacteria* (Alf986) y las *Betaproteobacteria* (Bet42a) fueron los grupos más abundantes, y en conjunto alcanzaron más del 60 % del TPI (Figura IV-2.b). En particular, las *Alphaproteobacteria* presentaron valores superiores al 40 % en la mayoría de los sistemas evaluados. La abundancia de células hibridadas con las sondas de los grupos de *Bacteroidetes* (CF319a), *Actinobacteria* (HGC69a) y *Gammaproteobacteria* (Gam42a) promedió el 15 %, 10 % y 4 % del TPI, respectivamente. La abundancia de las *Archaea* (Cren554 y Eury806) fue baja en todas las muestras (<1 %) excepto en dos lagos donde su proporción relativa alcanzó el 11 % (Figura IV-2.b). No se observaron *Cyanobacteria* picoplanctónicas en ninguno de los ambientes estudiados (Izaguirre, Unrein y Schiaffino, com. pers.).

El tamaño celular de los FPH fue medido para los cuatro grupos más abundantes (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*) en las muestras donde representaron una proporción mayor al 4 % de las TPI. En promedio, las *Betaproteobacteria* presentaron las células de mayor tamaño, seguidos por las *Alphaproteobacteria*, mientras que las *Actinobacteria* fueron siempre las más pequeñas (Tabla IV-2). Además, en ambos grupos (*Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*) se observaron recurrentemente células mayores a 3 µm de largo en todas las muestras (Figura IV-3). La contribución relativa de las células de tamaño mayor a 3 µm al biovolumen total osciló entre el 11 y el 66 % (promedio: 32 ± 18 %) y entre el 2 y el 57 % (promedio: 25 ± 18 %) en *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*, respectivamente. En los otros dos grupos de bacterias los porcentajes promediaron el 15 % en el caso de los *Bacteroidetes* y el 10 % en el caso de *Actinobacteria*. Los *Bacteroidetes* presentaron un tamaño celular levemente menor, y fueron mayormente representados por una típica forma de bacilo.

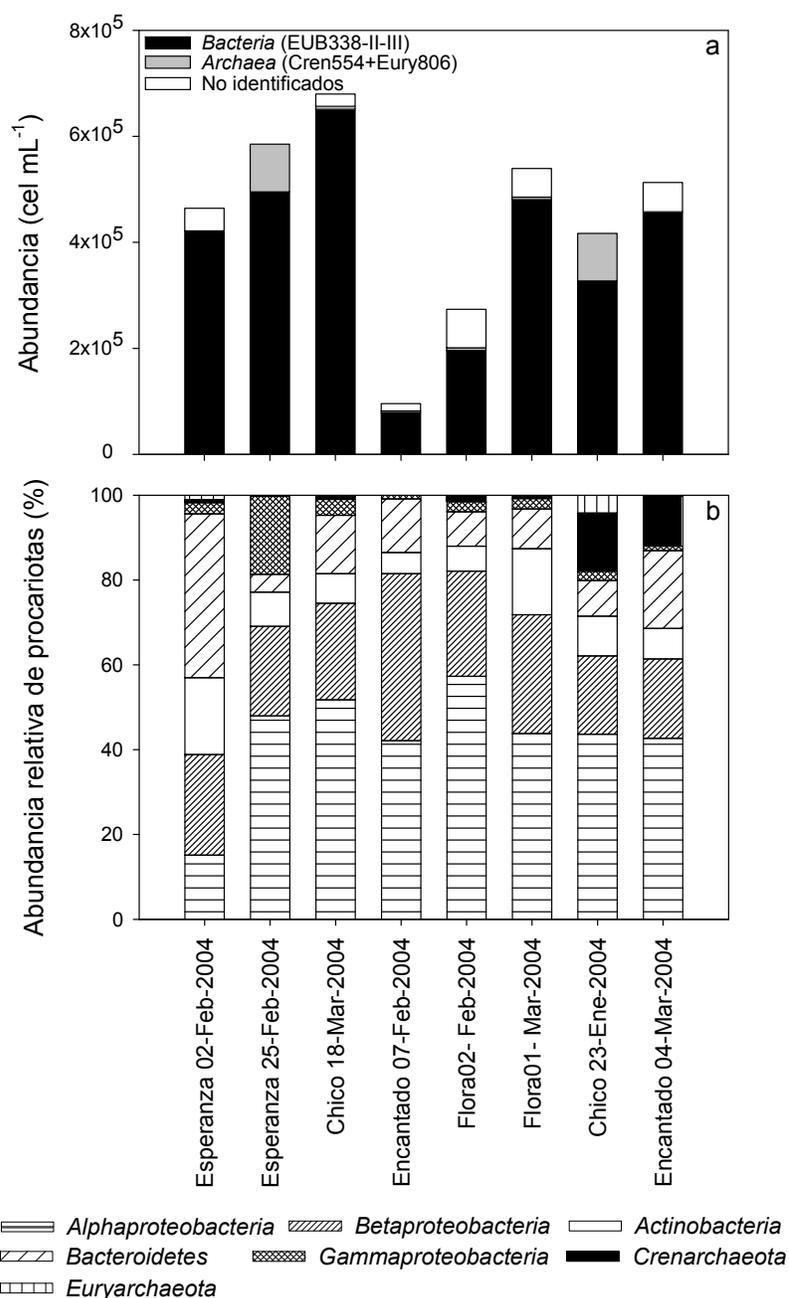


Figura IV-2: a. Abundancia de procariontes heterotróficos. Las abundancias de procariontes heterotróficos *no identificados* fueron calculadas a partir de la diferencia de abundancia entre las células teñidas con DAPI y la suma de la abundancia de las células de *Bacteria* (EUB338-II-III) más *Archaea* (Cren554 + Eury806); b. La abundancia relativa de los siete filotipos de procariontes heterotróficos (FPH) en relación a la abundancia total de procariontes identificados (TPI; ver el texto para mayor explicación). *Referencias:* Las muestras están ordenadas según concentración creciente de clorofila *a*.



Tabla IV-2. Biovolúmenes celulares promedios (μm^3) de los cuatro filotipos de procariontas heterotróficos más abundantes medidos sobre imágenes de CARD-FISH en todos los lagos (se midieron entre 100 y 700 células en cada caso). Alpha: *Alphaproteobacteria*; Beta: *Betaproteobacteria*; Actino: *Actinobacteria*; Bacteroi: *Bacteroidetes*. ND: no determinado. *Referencias:* las muestras están ordenadas según concentración creciente de clorofila *a*.

	Alpha	Beta	Actino	Bacteroi
Esperanza 2-Feb-2004	1,450	1,393	0,174	0,347
Esperanza 25-Feb-2004	0,686	0,833	0,167	0,941
Chico 18-Mar-04	1,291	1,348	0,515	ND
Encantado 7-Feb-2004	ND	2,433	ND	0,838
Flora 2-Feb-2004	0,479	0,409	0,121	0,272
Flora 1-Mar-2004	0,680	0,562	0,401	0,847
Chico 23-Ene-04	1,104	0,616	0,140	0,743
Encantado 4-Mar-2004	0,989	0,855	0,239	0,847

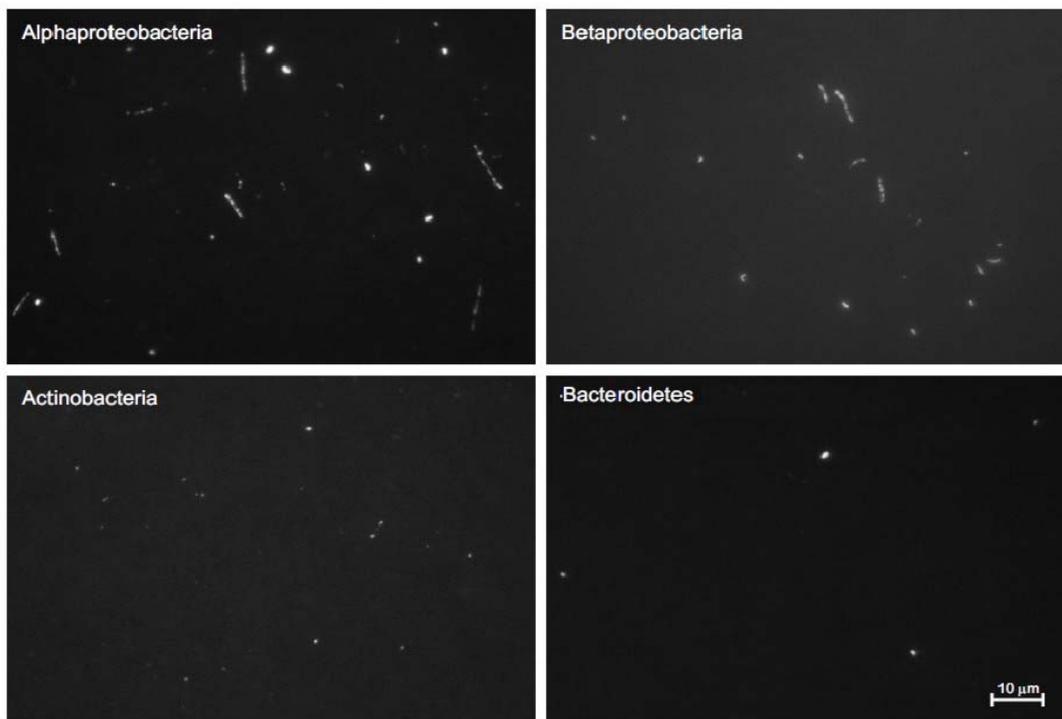


Figura IV-3: Fotografías de los cuatro filotipos de procariontas heterotróficos más abundantes hibridados con la técnica de CARD-FISH y observados en microscopio de epifluorescencia bajo excitación de luz-azul. La escala de 10 μm se aplica para todas las fotografías.



IV-4-2. Composición de la comunidad del nano- y microplancton

En todos los casos la comunidad nano-microplanctónica estuvo dominada numéricamente por los flagelados bacterívoros. Se registraron algunas especies de cf. *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) estrictamente autotróficas, aunque siempre estuvieron presentes en muy bajas abundancias (inferiores al 5%). Todos los lagos estuvieron dominados por FMix, excepto en una fecha en particular para el lago Flora (02-Feb-2004), donde prevalecieron los FHET. La abundancia de ciliados fue muy baja ($<10 \text{ ind L}^{-1}$) en todos los casos (Figura IV-4). En todos los lagos, los FMix estuvieron dominados por algas de la Clase Chrysophyceae (Figura IV-4), las cuales fueron categorizadas en dos clases de tamaño: $<5 \mu\text{m}$ (cf. *Ochromonas*) y $>5 \mu\text{m}$. Mientras que la mayoría de las células de cf. *Ochromonas* fueron morfológicamente similares (esféricas y con un diámetro de 3 a 4 μm), las Chrysophyceae más grandes ($>5 \mu\text{m}$) estuvieron representadas por un grupo heterogéneo de células con diferente morfología. El género *Pseudopedinella* sp. (Dictyochophyceae) fue registrado en 5 de las 8 muestras, aunque siempre en baja abundancia. Las células de *Pseudopedinella* sp. presentaron una simetría radial, con 3 a 6 cloroplastos, y un diámetro de aproximadamente 7 μm en todos los lagos.

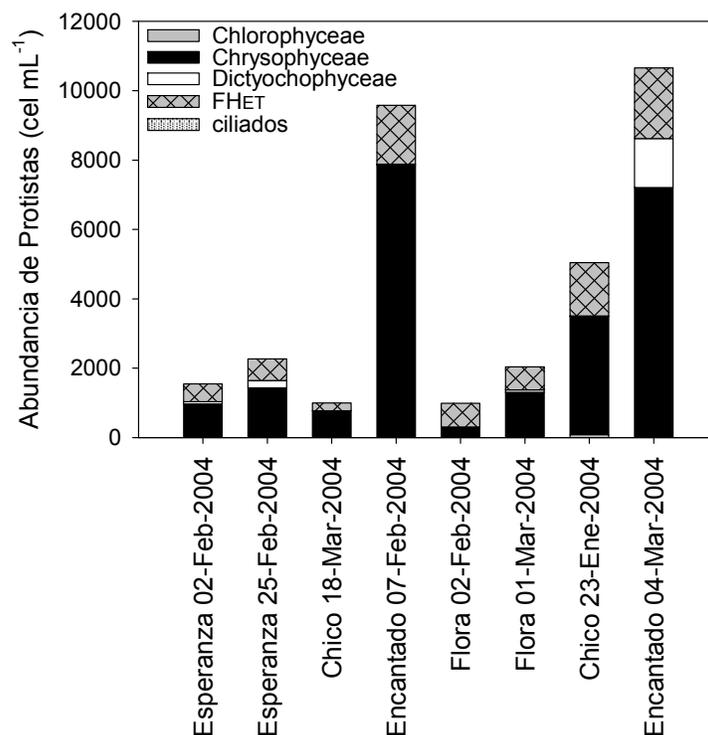


Figura IV-4: Abundancia de células autotróficas (Chlorophyceae), flagelados mixotróficos (Chrysophyceae y Dictyochophyceae), flagelados heterotróficos (FHET) y ciliados en cada sitio de muestreo. *Referencias:* las muestras están ordenadas según concentración creciente de clorofila *a*.

IV-4-3. Selectividad de presas por afiliación filogenética

El índice de selectividad de Chesson fue calculado para todos los flagelados bacterívoros, los tres taxa de los FMix (cf. *Ochromonas*; Chrysophyceae >5 μm ; *Pseudopedinella* sp.) y el ensamble completo de los FHET. El número de presas ingeridas encontradas dentro de las vacuolas digestivas de cada flagelado bacterívoro osciló entre 1 y 3 células, aunque la mayoría de los flagelados presentó sólo una célula dentro de las vacuolas digestivas (Figura IV-5). En la Tabla IV-3 se presenta el número de células de cada FPH que fueron encontrados en las vacuolas digestivas de los setenta y cinco flagelados para cada taxón. En la tabla se muestra el valor promedio de presas hallado entre los lagos estudiados, así como su desvío estándar y rango de variación para cada FPH.

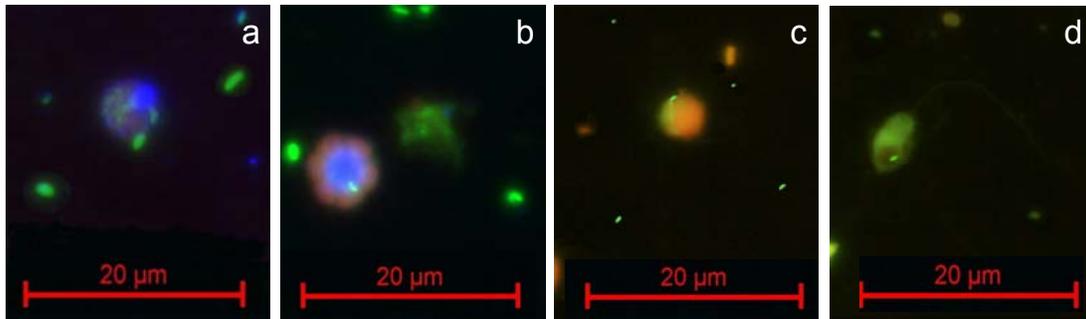
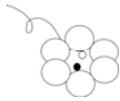


Figura IV-5: **a** y **b.** Microfotografías de tres fotografías superpuestas tomadas en escala de grises (8 bits) bajo luz azul, verde y UV, de Chrysophyceae $>5 \mu\text{m}$ (**a**) y *Pseudopedinella* sp. (**b**) con una *Betaproteobacteria* adentro de su vacuola digestiva; **c** y **d:** Microfotografías tomadas bajo luz azul de cf. *Ochromonas* (**c**) y un flagelado heterotrófico (**d**) con una *Betaproteobacteria* ingerida.

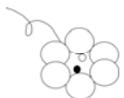
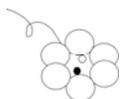


Tabla IV-3.

	Alpha	Beta	Actino	Bacteroi	Gamma	Crenar	Euryar	TPI
<i>cf. Ochromonas</i>	25 ± 9 (7 – 39)	16 ± 4 (9 – 21)	15 ± 14 (3 – 45)	11 ± 10 (0 – 24)	4 ± 5 (0 – 15)	3 ± 3 (0 – 8)	4 ± 3 (0 – 10)	78 ± 16 (57 – 102)
Chrysophyceae >5 µm	25 ± 14 (4 – 49)	17 ± 9 (0 – 26)	11 ± 10 (0 – 30)	13 ± 6 (0 – 18)	5 ± 3 (0 – 8)	5 ± 4 (0 – 9)	5 ± 4 (0 – 11)	80 ± 18 (61 – 115)
<i>Pseudopedinella</i> sp.	34 ± 17 (14 – 57)	29 ± 18 (15 – 54)	20 ± 10 (8 – 32)	12 ± 9 (0 – 23)	1 ± 3 (0 – 6)	6 ± 5 (0 – 14)	5 ± 4 (0 – 9)	102 ± 35 (53 – 147)
FHET	22 ± 10 (5 – 38)	16 ± 7 (8 – 30)	10 ± 7 (0 – 18)	7 ± 8 (0 – 21)	4 ± 7 (0 – 21)	5 ± 3 (0 – 8)	5 ± 4 (0 – 11)	70 ± 17 (42- 101)



Los resultados de los índices de Chesson calculados para los FHET con la abundancia relativa de FPH respecto al TPI se correlacionaron significativamente con los obtenidos utilizando la abundancia relativa de FPH respecto a las EUB338-II-III (Figura IV-6). El análisis de regresión lineal entre la abundancia de las TPI y de las células hibridadas con la sonda EUB338-II-III en todos los lagos, indicó que las TPI son un buen estimador de las *Bacteria* (células hibridadas con la sonda EUB-II-III) en las muestras tal como se asumió en este estudio ($R^2 = 0,937$, $p < 0,001$).

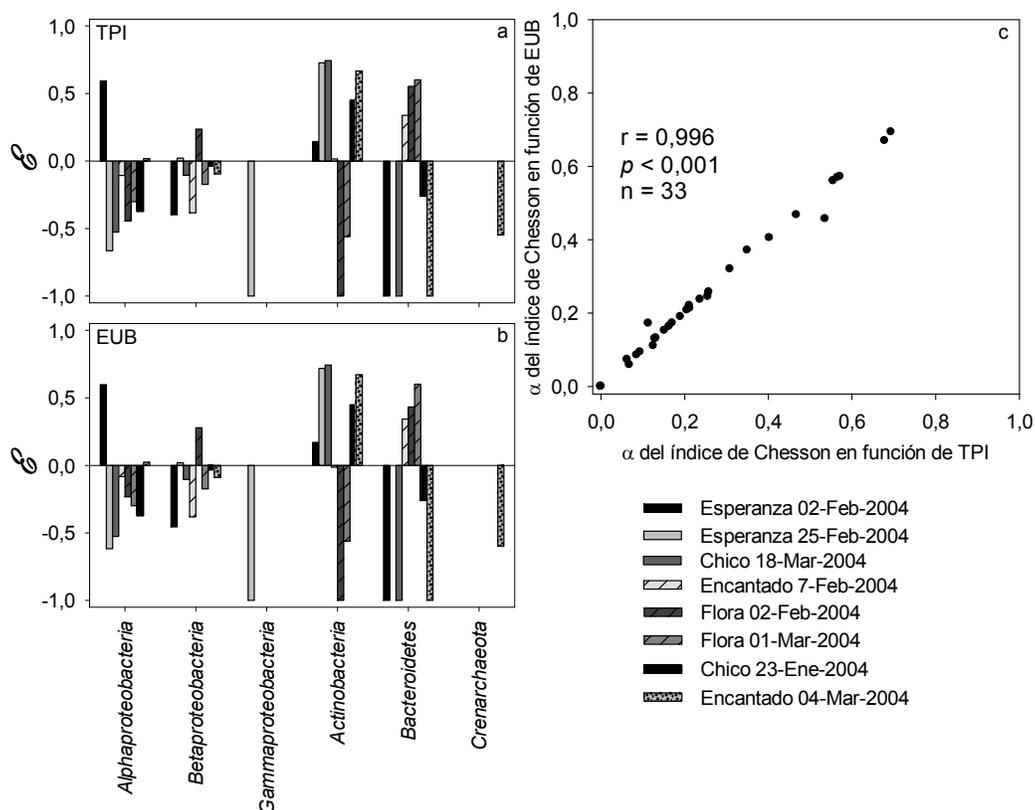


Figura IV-6: a. Las barras representan los valores del ϵ de Chesson calculados para los flagelados heterotróficos en cada lago y fecha en relación a cada presa (eje x), utilizando los TPI como 100% respectivamente; b. Las barras representan los valores del ϵ de Chesson calculados para los flagelados heterotróficos en cada lago y fecha en relación a cada presa (eje x), utilizando las células hibridadas con la sonda EUB338-II-III como 100%; c. Relación entre el α del índice de Chesson calculado para los flagelados heterotróficos utilizando como valor de referencia a las células hibridadas por la sonda EUB338-II-III (como 100%), en relación con los valores obtenidos utilizando como valor de referencia el TPI.



Las *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* fueron seleccionadas negativamente por todos los FMix y FHET en la mayoría de las muestras (Figura IV-7). En el 73 % de las muestras se observaron valores de selección negativos para las *Alphaproteobacteria* y en el 67 % para las *Betaproteobacteria*. Contrariamente, las *Actinobacteria* fueron, en general, seleccionadas positivamente por los FHET y por *Pseudopedinella* sp., mientras que las cf. *Ochromonas* y las Chrysophyceae >5 μm no mostraron una clara preferencia por las mismas. En el 66 % de los casos, los valores del índice obtenidos para este grupo de bacterias fueron positivos. Para el grupo de los *Bacteroidetes* no se observó una clara tendencia de selección por parte de ninguno de los flagelados bacterívoros analizados (Figura IV-7). Por su parte, los dos valores del índice que fueron calculados para el grupo de las *Archaea* (datos no mostrados) sugieren una selección positiva por todos los depredadores. Notablemente, se observó que todos los flagelados mostraron preferencias similares (i.e. selección positiva o negativa) respecto a los grupos FPH más abundantes (Figura IV-7). Este resultado fue sustentado por la correlación significativa obtenida de la comparación pareada de los valores α del índice de selectividad de Chesson entre los diferentes taxa de los flagelados evaluados (Tabla IV-4).

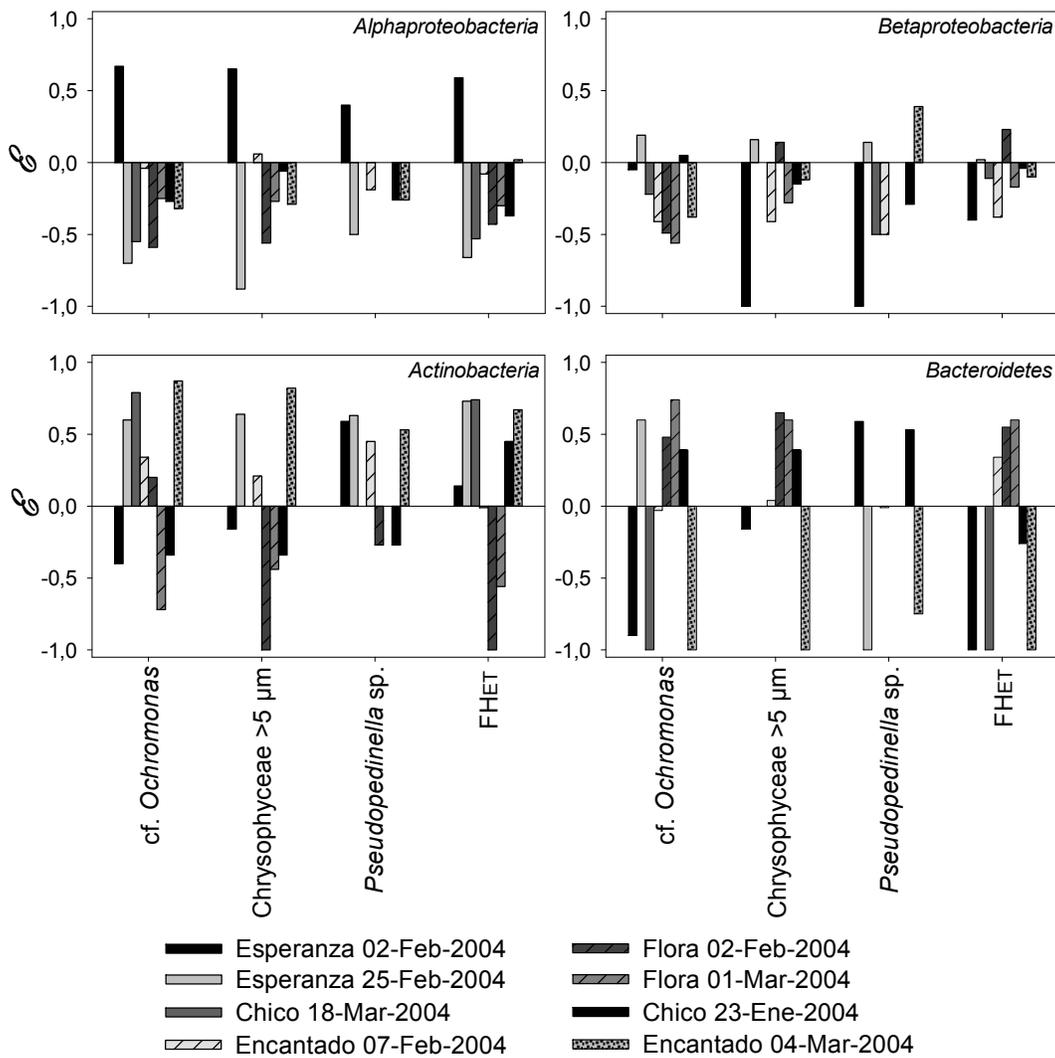


Figura IV-7: Valor del ϵ del índice de selectividad de Chesson para cada flagelado y para los cuatro filotipos de procariontes heterotróficos más abundantes. *Referencias:* las muestras dentro de cada depredador están ordenadas según concentración creciente de clorofila *a*.



Tabla IV-4. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre los valores α del índice de Chesson de todos los flagelados bacterívoros. *Referencia:* *: p valor $<0,001$.

	Chrysophyceae $>5 \mu\text{m}$	<i>Pseudopedinella</i> sp.	HF
cf. <i>Ochromonas</i>	0,878 * (n = 29)	0,718 * (n = 21)	0,817 * (n = 33)
Chrysophyceae $>5 \mu\text{m}$		0,782 * (n = 21)	0,845 * (n = 29)
<i>Pseudopedinella</i> sp.			0,703 * (n = 21)



IV- 5. Discusión

El ensamble de FPH en los lagos antárticos estudiados estuvo generalmente dominado por las *Alphaproteobacteria*. Si bien esta dominancia ya ha sido reportada en otros lagos alrededor del mundo (Kirchman et al., 2004; Nishimura y Nagata, 2007; Salcher et al., 2011), existe el consenso general de que las *Alphaproteobacteria* dominan los ambientes marinos, mientras que los ambientes de agua dulce son dominados por las *Betaproteobacteria* (Glöckner et al., 1999) y, en menor medida, por las *Actinobacteria*, *Citophaga* y *Verrucomicrobia* (Glöckner et al., 1999; Urbach et al., 2001; Warnecke et al., 2005). Algunos autores observaron que un alto tiempo de residencia del agua (Lindström et al., 2005) y una alta presión de depredación (Pernthaler et al., 1997; Salcher et al., 2005) podrían incrementar la abundancia de las *Alphaproteobacteria* en ambientes continentales. Un estudio reciente de la composición de la comunidad bacteriana en 45 lagos localizados en Antártida y la región más austral de Sudamérica reveló que el 78 % de los lagos estudiados están dominados por *Alphaproteobacteria* (Schiaffino, 2011). Estos resultados sugieren que la idea general de que las *Alphaproteobacteria* no serían cuantitativamente importantes en ambientes continentales es probablemente errónea.

La técnica de CARD-FISH aplicada en este estudio permitió evaluar exitosamente la depredación de los FMix y FHET sobre los diferentes FPH en ambientes naturales. Cabe destacar, en lo que respecta a la metodología aplicada, la importancia de la utilización de formaldehído (concentración final 2 %) como fijador para las células. No obstante, en ensayos preliminares se utilizó paraformaldehído (concentración final 1 %) como fijador, tal como lo sugiere Medina-Sánchez et al. (2005), observándose una deformación sistemática de las células de las algas mixotróficas presentes en las muestras. Por todo esto, resulta poco conveniente la aplicación del paraformaldehído en estudios futuros que pretendan evaluar la selectividad de algas mixotróficas.

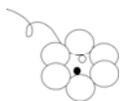
Resulta interesante destacar que los valores del índice de Chesson calculados para los FHET en función de la abundancia de las *Bacterias* (células híbridadas con la sonda EUB338-II-III) y de las TPI (suma de las cinco sondas



correspondientes a los grupos de *Bacteria* y las dos sondas correspondientes a los grupos de *Archaea*) resultaron muy similares, mientras que la abundancia de las *Bacterias* y las TPI presentaron una relación altamente significativa. Estos resultados avalan los cálculos de los índices de selectividad de FMix basados en las TPI en este estudio, y al mismo tiempo permiten la comparación de estos resultados con otros trabajos similares.

En relación a la selectividad de presas *in situ*, los resultados obtenidos mostraron tendencias generales de selección sobre los diferentes FPH, aunque no se encontró un patrón general aplicable en todos los sistemas. Las *Alphaproteobacteria* y las *Betaproteobacteria*, los dos grupos más abundantes de bacterias, en general fueron seleccionados negativamente (73 % y 67 % de los casos, respectivamente) por todos los depredadores. Estos grupos presentaron células más largas que otros FPH, incluyendo filamentos (>3 μm), los cuales han sido previamente descritos como morfologías resistentes a la depredación (Jürgens et al., 1999; Jürgens y Matz, 2002; Pernthaler, 2005; Salcher et al., 2005). Sin embargo, si bien los filamentos representaron una parte significativa de la biomasa total de cada grupo, la presencia de estos morfotipos de resistencia explicaría solo parcialmente la tendencia negativa de la selección observada, ya que su abundancia fue relativamente baja. Es bien conocido que existen otros factores tales como la calidad de alimento que podrían influenciar la selectividad de presas sobre FPH (Boenigk et al., 2001a; Shannon et al., 2007), sin embargo lamentablemente se carece de esta información para los ambientes estudiados.

Por otro lado, para el grupo de los *Bacteroidetes* no se observó una clara tendencia de selección, sino que por el contrario, los flagelados parecerían depredar sobre este filotipo de manera aleatoria. Es sabido que los protistas no pueden ingerir todos los tamaños de procariontes heterotróficos con igual eficiencia, debido a sus mecanismos de captura de presas (Pernthaler, 2005). En un experimento de manipulación de la red trófica, Grossart et al. (2008) encontraron un fuerte incremento en la abundancia de los *Bacteroidetes* ante la ausencia de depredadores, sugiriendo que este grupo podría ser fuertemente controlado por la depredación de los protozoos. En un experimento similar, otros autores hallaron un cambio en la preferencia alimenticia durante el transcurso del



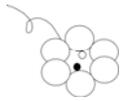
experimento; los *Bacteroidetes* fueron positivamente seleccionados en el comienzo del experimento y negativamente seleccionados hacia el final del mismo, debido a un incremento en su tamaño (Jezbera et al., 2005). En otras investigaciones, una selección negativa por parte de este grupo estuvo también asociada con la presencia de células filamentosas (Jezbera et al., 2006; Pernthaler et al., 2001; Salcher et al., 2005). Considerando los datos publicados y los resultados aquí obtenidos, la susceptibilidad de este grupo parece fluctuar en relación a la presión de depredación de un ambiente.

Respecto a las *Actinobacteria*, se observó una tendencia de selección positiva para *Pseudopedinella* sp. y los FHET. Estos resultados no apoyan lo planteado en la **Hipótesis 2**, acerca de que el pequeño tamaño de las *Actinobacteria* les conferiría protección contra la depredación. Además, tampoco concuerdan con algunas investigaciones previas, las cuales sugieren que las *Actinobacteria* serían evitadas por los depredadores (Hahn et al., 2003; Šimek et al., 2005; Jezbera et al., 2005). Su pequeño tamaño celular y la gruesa pared celular les conferiría a estas bacterias una resistencia a la depredación (Warnecke et al., 2004). Los resultados hallados parecen contradictorios con la mayoría de las investigaciones hasta el momento, sin embargo la explicación de estas diferencias podría deberse a diferencias en la morfología de estas bacterias.

Por un lado, el tamaño celular de las *Actinobacteria* en los lagos estudiados fue relativamente más grande que lo observado en otros trabajos en donde estas bacterias fueron seleccionadas negativamente por los FHET (Jezbera et al., 2005). Notablemente, el biovolumen de las *Actinobacteria* estimado por Jezbera et al. (2005) utilizando la misma metodología que en este estudio ($0,072 \mu\text{m}^3$) fue tres veces menor que el biovolumen hallado para las células de este grupo en los lagos estudiados ($0,251 \mu\text{m}^3$). Apoyando la idea de que la morfología diferente (mayor tamaño celular) de este grupo puede ser responsable de la selección positiva hallada, un estudio previo demostró que *Ochromonas* sp. puede depredar sobre *Actinobacteria* (Pernthaler et al., 2001), y que éstas algas mixotróficas prefieren ingerir presas con un biovolumen superior a las $0,2 \mu\text{m}^3$ (Andersson et al., 1986).



Por otro lado, recientemente Tarao et al. (2009) describieron que algunas cepas de *Actinobacteria* pertenecientes al grupo (“cluster”) Luna-2 presentan una capa superficial proteica, denominada capa-S, la cual les confiere protección contra la depredación de protistas ya que incrementa el tiempo de digestión. En este sentido, el gran número de *Actinobacteria* observado dentro de las vacuolas digestivas de los flagelados podría explicarse por un alto tiempo de digestión, probablemente debido a la presencia de la capa-S en las cepas de *Actinobacteria* presentes en los cuerpos de agua estudiados. Sin embargo, la capa-S no es exclusiva de las *Actinobacteria*, ya que fue descrita en varios grupos de procariotas (Schuster y Leytr, 2000; Sleytr et al., 2001; Claus et al., 2005; Šmarda et al., 2002). La capa-S fue también hallada en algunas cepas de *Betaproteobacterias* (Murray et al., 1988), *Gammaproteobacteria* (Kawai et al., 1998) y, en particular para *Cyanobacteria*, se ha descrito como una característica genero-específica (Šmarda et al., 2002). Considerando estas evidencias, se realizó una revisión de las tasas de digestión (vida media de las presas dentro de los flagelados) publicadas para diferentes depredadores, en relación a la presencia o ausencia de la capa-S en cada presa (Tabla IV-5). En promedio, el tiempo de vida medio dentro de las vacuolas digestivas de las bacterias que poseen capa-S fue tres veces mayor que para aquellas bacterias que no poseen dicha capa protectora. Estos resultados apoyan la idea de que la capa-S efectivamente incrementa el tiempo de digestión. Sin embargo, tal como se describió anteriormente para los grupos de *Archaea* y *Bacteria*, también en las *Actinobacteria* podría ocurrir que algunos géneros o cepas sean capaces de producir esta capa-S y otros no. De hecho, las secuencias obtenidas de *Actinobacteria* de los lagos antárticos aquí estudiados (Schiaffino, 2011) pertenecen al linaje acI, mientras que las cepas aisladas por Tarao et al. (2009) pertenecen al linaje acIII (*sensu* Newton et al., 2011). Esto podría explicar nuestro resultado contradictorio; probablemente, la ausencia de la capa-S en las cepas de *Actinobacteria* que habitan estos lagos antárticos permitiría que este grupo sea altamente depredado. Finalmente, dado que la presencia de la capa-S no es exclusiva de las *Actinobacteria*, este factor podría ser otra de las razones que expliquen la marcada selección negativa observada para las *Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*.



A pesar de las tendencias generales observadas, los FPH no fueron siempre positiva o negativamente seleccionados por un determinado protista. Esto sugiere que la afiliación filogenética determina solo en parte el proceso de selección de presas por protistas. En este sentido, el tamaño celular y la morfología, que se encuentran muchas veces ligados a la afiliación filogenética, explican parcialmente los patrones observados. Por ejemplo, *Betaproteobacteria* usualmente forma filamentos no palatables bajo situaciones de alta presión de depredación, o *Actinobacteria* reduce su tamaño celular para escapar de la depredación (Jürgens y Matz, 2002). Sin embargo, otras características, como la composición química de las membranas de las presas, fisiológicas como las defensas, o comportamentales como el movimiento de escape de algunas bacterias (químicas, fisiológicas, comportamentales, etc.) también contribuirían significativamente a la selectividad de presas de los protistas (Boenigk et al., 2001 a; Shannon et al., 2007; Engelhardt, 2007; Jousset, 2012).



Los resultados generales de selección de presas por parte de los FMix y FHet no apoyan la **Hipótesis 1**, llamativamente los cuatro grupos de protistas evaluados presentaron tendencias de selección muy similares entre sí para cada uno de los FPH (Figura IV-7, Tabla IV-4). Este resultado fue inesperado ya que, debido a la heterogeneidad de tamaños, estrategias nutricionales (e.g. mixótrofos y heterótrofos) y afiliación taxonómica entre los depredadores, se esperaban encontrar diferentes patrones de selectividad entre los flagelados evaluados. De acuerdo con esto, algunos estudios experimentales han demostrados diferentes preferencias de presas para diferentes protistas bacterívoros, los cuales estuvieron principalmente asociados a una relación de tamaño predador-presa (e.g. Andersson et al., 1986; Jürgens y Matz, 2002; Massana et al., 2009). La similitud de las preferencias de presas halladas *in situ* en este estudio para los cuatro grupos de flagelados evaluados, sugiere la existencia de algunas características celulares de los FPH (e.g. tamaño celular, morfología, presencia de la capa-S, etc.) que interactúa con los diferentes bacterívoros de manera similar.



CAPÍTULO V:

Conclusiones Generales



V- 1. Principales Resultados

- ✓ Durante el estudio anual, se observó una fuerte sincronía en la fluctuación de diversas variables físico-químicas entre los lagos Escondido y Morenito, indicando una influencia determinante por parte de factores externos (e.g. variables climáticas).
- ✓ En ambos lagos, los mayores valores de K_d se hallaron en invierno en concordancia con las fuertes lluvias y, consecuentemente, con el ingreso de material alóctono del medio circundante. Además, conjuntamente aumentó el color del agua, así como el tamaño molecular de la MOD. En verano (época seca) la falta de ingreso de material externo, probablemente en asociación con el aumento de la fotodegradación y la actividad microbiana redujeron el color y el tamaño molecular de la MOD en los dos ambientes.
- ✓ El Escondido presentó mayor concentración de MOD alóctona (color) y de mayor tamaño molecular que el Morenito, por lo tanto de menor calidad para el consumo bacteriano. Probablemente, esta menor biodisponibilidad de la MOD en asociación a una fuerte limitación por nutrientes, permitan explicar la similitud encontrada en la abundancia y la biomasa de bacterias entre ambos lagos, a pesar de la diferencia de concentración de MOD entre ellos.
- ✓ Ambos lagos estuvieron dominados ($\approx 75\%$ de la biomasa) por taxa mixotróficos. Aunque la composición específica fue similar, la dominancia relativa de los grupos fue diferente entre los lagos. Las especies de la Clase Chrysophyceae dominaron en el lago Escondido durante todo el año, mientras que las especies de la Clase Cryptophyceae siempre dominaron en el Morenito.
- ✓ La predicción de R. Jones (2000) de esperar mayor abundancia de algas autótrofas en lagos con baja concentración de MOD, se cumplió parcialmente, si consideramos el distinto grado de autótrofia o heterotrofia de las algas mixotróficas dominantes en cada lago, siendo las Cryptophyceae mayormente autótrofas y las Chrysophyceae principalmente fagotróficas.



- ✓ Las especies de la Clase Cryptophyceae, fundamentalmente *Plagioselmis lacustris*, presentaron una relación positiva y significativa con la disponibilidad de la luz verde en los ambientes. Estos resultados fueron atribuidos a la presencia de ficobilinas en este grupo algal, pigmentos que presentan su máxima absorbancia en las longitudes de onda correspondientes al verde.
- ✓ Además, estos datos muestran por primera vez una respuesta específica no experimental con la calidad de la luz por parte de algas nano- microplanctónicas. Esto indica que la calidad de la luz, además de su cantidad, influyen fuertemente sobre la composición de las especies de un ambiente.
- ✓ Los resultados experimentales revelaron que todos los flagelados mixotróficos y heterotróficos ingirieron bacterias y picocianobacterias durante todo el año, y no así las algas picoeucariotas ofrecidas en los experimentos.
- ✓ Las algas mixotróficas dominaron la depredación debida a flagelados de los organismos picoplanctónicos (fagotrofia) en estos dos ambientes durante todo el año, siendo responsables en promedio del 80 % de la misma. Por su parte, los flagelados heterotróficos incrementaron su importancia fagotrófica durante el verano.
- ✓ Los diferentes taxa mixotróficos mostraron tasas de depredación específicas (TDE) diferentes entre sí, apoyando el espectro de estrategias de nutrición planteados por R. Jones (1994).
- ✓ *Pseudopedinella* sp. (Dictyochophyceae) fue el taxón que mayores tasas de bacterivoría y herbivoría presentó, mientras que *Plagioselmis lacustris* (Cryptophyceae) fue la especie con menores tasas de ingestión. *Dinobryon divergens* (Chrysophyceae) y *Chrysochromulina parva* (Haptophyceae) mostraron ser bacterívoros importantes con tasas intermedias.
- ✓ Los organismos fagotróficos consumieron entre el 5 y 39 % de las bacterias y hasta el 78 % de las picocianobacterias por día.



- ✓ *Chrysochromulina parva* fue el único flagelado que ingirió más carbono en forma de bacterias que de picocianobacterias, indicando una cierta preferencia por las presas de menor tamaño (bacterias).
- ✓ Todos los flagelados fagotróficos mostraron una fuerte selectividad sobre las picocianobacterias, probablemente debido a su tamaño intermedio ($\approx 1 \mu\text{m}$) y a la calidad de alimento.
- ✓ Por primera vez fue posible determinar la selectividad de ingestión de presas *in situ* a través del análisis de las vacuolas digestivas de las algas mixotróficas mediante la técnica de CARD-FISH.
- ✓ En general, en los cuatro lagos Antárticos estudiados, las *Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* fueron seleccionados negativamente, mientras que las *Actinobacteria* fueron seleccionadas positivamente. Sin embargo, la afiliación filogenética determinaría sólo parcialmente la selectividad para los protistas, ya que otras características, como el tamaño y la morfología celular, también contribuirían significativamente a la selectividad de presas de los protistas
- ✓ Todos los flagelados bacterívoros analizados mostraron preferencias similares sobre los diferentes filotipos de procariontes heterotróficos (FPH). Esto sugiere la existencia de algunas características celulares de los FPH (e.g. tamaño celular, morfología, presencia de la capa-S, etc.) que interactúan con los diferentes bacterívoros de manera similar.

V- 2. Conclusiones Generales

La presente Tesis destaca la importancia de los organismos mixotróficos en los ambientes oligotróficos someros, ya que dominan la biomasa fitoplanctónica y ejercen una fuerte presión de depredación sobre el picoplancton. Considerando que los organismos mixótrofos combinan las dos estrategias de nutrición (autotrofia y heterotrofia), en esta Tesis se analizó la importancia de la luz y de las presas para los FMix en lagos someros oligotróficos. La primera parte de los



resultados obtenidos demuestran que la estructura de la comunidad fitoplanctónica está fuertemente impactada por la disponibilidad de luz en los lagos, la cual está a su vez determinada por la fluctuación del ingreso de MOD alóctona al cuerpo de agua. En este sentido, se encontró una muy buena relación entre la disponibilidad de luz verde y la dominancia de *P. lacustris* (Cryptophyceae), un alga mixotrófica asociada al extremo más autotrófico del espectro de estrategias nutricionales. Esta especie está ampliamente distribuida en ambientes acuáticos oligotróficos del mundo, por lo que esta relación con la luz, que ha sido previamente hallada con las Pcy (Vörös et al., 1998), podría también hallarse en otros ambientes similares a los aquí estudiados.

Considerando la estrategia fagotrófica, los análisis de campo y experimentales mostraron diferencias en las tasas de ingestión entre distintos taxones de FMix. Dichas diferencias dependen de la importancia relativa de la autotrofia y heterotrofia en la estrategia nutricional de cada taxón. Estos resultados apoyan la clasificación de las algas mixotróficas dentro de un espectro de estrategias nutricionales, siendo *Pseudopedinella* sp. y algunos géneros de Chrysophyceae las algas más heterotróficas de las encontradas en este estudio. Por lo tanto, puede decirse que el impacto de depredación ejercido por cada taxón es diferente, lo que destaca la importancia de analizar en forma detallada los organismos mixotróficos en futuros trabajos, evitando tratarlos como un grupo homogéneo. A pesar de las diferencias respecto a las tasas de ingestión, los análisis de selectividad de presas por tamaño y por afiliación filogenética, mostraron tendencias de selección similares entre todos los flagelados evaluados (FMix y FHET) en todos los ambientes evaluados. Estos resultados sugieren que la selectividad de presas no depende del ambiente en el que se encuentra el flagelado, sino que sería una característica específica de los taxa.



BIBLIOGRAFÍA



- Adrian, R., O'Reilly, C., Zagarese, H. et al. (2009) Lakes as sentinels of climate change. *Limnol. Oceanogr.*, **54**, 2283-2297.
- Allende, L. e Izaguirre, I. (2003) The role of physical stability on the establishment of steady states in the phytoplankton community of two maritime Antarctic lakes. *Hydrobiologia*, **502**, 211-224.
- Alonso, C., Rocco, V., Barriga, J.P. et al. (2004) Surface avoidance by freshwater zooplankton: field evidence on the role of ultraviolet radiation. *Limnol. Oceanogr.*, **49**, 225-232.
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J. et al. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1919-1925.
- Andersen, T. y Hessen, D.O. (1991) Carbon, nitrogen, and phosphorus content of freshwater zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **36**, 807-814.
- Andersson, A., Larsson, U. y Hagström, Å. (1986) Size-selective grazing by a microflagellate on pelagic bacteria. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **33**, 51-57.
- Andersson A., Falk S., Samuelsson G. et al. (1989) Nutritional characteristics of a mixotrophic nanoflagellate, *Ochromonas* sp. *Microbial Ecol.*, **17**, 251-262.
- APHA (1989) Standard Methods for the examination of water and wastewater. New York, 15^o Ed. American Public Health Assoc, 1052 pp.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. et al. (1983) The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **10**, 257-263.
- Bachmann, R.W. y Canfield Jr., D.E. (1996) Use of an alternative method for monitoring total nitrogen concentrations in Florida lakes. *Hydrobiologia*, **323**, 1-8.
- Bade, D.L., Carpenter, S.R., Cole, J.J. et al. (2007) Sources and fates of dissolved organic carbon in lakes as determined by whole-lake carbon isotope additions. *Biogeochemistry*, **84**, 115-129.
- Baines, S.B., Webster, K.E., Kratz, T.K. et al. 2000. Synchronous behavior of temperature, calcium and chlorophyll in lakes of northern Wisconsin. *Ecology*, **81**, 815-825.
- Balseiro, E.G. y Modenutti, B.E. (1990) Zooplankton dynamics of Lake Escondido (Río Negro, Argentina), with special reference to a population of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Calanoida). *Int. Rev. ges. Hydrobiol.*, **76**, 475-491.
- Bastidas Navarro, M. y Modenutti, B.E. (2012) Precipitation patterns, dissolved organic matter and changes in the plankton assemblage in Lake Escondido (Patagonia, Argentina). *Hydrobiologia*, **691**, 189-202.



- Bastidas Navarro, M., Balseiro, E. y Modenutti, B. (2011) UV radiation simultaneously affects phototrophy and phagotrophy in nanoflagellate-dominated phytoplankton from an Andean shallow lake. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **10**, 1318-1325.
- Bastidas Navarro, M., Modenutti, B., Callieri, C. et al. (2009) Balance between primary and bacterial production in North Patagonian shallow lakes. *Aquat. Ecol.*, **43**, 867-878.
- Bell, E.M. y Laybourn-Parry, J. (2003) Mixotrophy in the Antarctic phytoflagellate, *Pyramimonas gelidicola* (Chlorophyta: Prasinophyceae). *J. Phycol.*, **39**, 644-649.
- Belzile, C., Vincent, W.F. y Kumagai, M. (2002) Contribution of absorption and scattering to the attenuation of UV and photosynthetically available radiation in Lake Biwa. *Limnol. Oceanogr.*, **47**, 95-107.
- Bennett, S., Sanders, R.W., y Porter, K.G. (1990) Heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic nanoflagellates: Seasonal abundance and bacterivory in a eutrophic lake. *Limnol. Oceanogr.*, **35**, 1821-1832.
- Berggren, M., Laudon, H., Haei, M. et al. (2010) Efficient aquatic bacterial metabolism of dissolved low-molecular-weight compounds from terrestrial sources. *The ISME J.*, **4**, 408-416.
- Bergström, A-K., Jansson, M., Drakare, S. et al. (2003) Occurrence of mixotrophic flagellates in relation to bacterioplankton production, light regime and availability of inorganic nutrients in unproductive lakes with differing humic contents. *Freshwater Biol.*, **48**, 868-877.
- Bertilsson, S., Berglund, O., Karl, D.M., et al. (2003) Elemental composition of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnol. Oceanogr.*, **48**, 1721-1731.
- Biecheler, B. 1936. Observation de la capture et de la digestion des protées chez un peridinéen vert. *C. R. Séances Soc. Biol.*, **122**, 1173-1175.
- Bird, D.F. y Kalff, J. (1986) Bacterial grazing by planktonic lake algae. *Science*, **231**, 498-495.
- Bird, D.F. y Kalff, J. (1987) Algal phagotrophy: Regulating factors and importance relative to photosynthesis in *Dinobryon* (Chrysophyceae). *Limnol. Oceanogr.*, **32**, 277-284.
- Blomqvist, P., Jansson, M., Drakare, S. et al. (2001) Effects of additions of DOC on pelagic biota in a clearwater system: results from a whole lake experiment in Northern Sweden. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **42**, 383-394.



- Boenigk, J., Matz, C., Jürgens, K. et al. (2001a) The influence of preculture conditions and food quality on the ingestion and digestion process of three species of heterotrophic nanoflagellates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **42**, 168-176.
- Boenigk, J., Matz, A. C., Jürgens, K. et al. (2001b) Confusing selective feeding with differential digestion in bacterivorous nanoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**, 425-432.
- Boraas, M.E., Seale, D.B. y Holen, D. (1992) Predatory behaviour of *Ochromonas* analyzed with video microscopy. *Arch. Hydrobiol.*, **123**, 459-468.
- Børsheim, K.Y. y Bratbak, G. (1987) Cell volume to cell carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from seawater. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **36**, 171-175.
- Bottrell, H.H., Duncan, A., Gliwicz, Z.M. et al. (1976) A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.*, **24**, 419-456.
- Brett, M.T. y Müller-Navarra, D. (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biol.*, **38**, 483-499.
- Brett, M.T., Müller-Navarra, D. y Park, S. (2000) Empirical analysis of the effect of phosphorus limitation on algal food quality for freshwater zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **45**, 1564-1575.
- Bukaveckas, P.A. y Robbins-Forbes, M. (2000) Role of dissolved organic carbon in the attenuation of photosynthetically active and ultraviolet radiation in Adirondack lakes. *Freshwater Biol.*, **43**, 339-354.
- Burkholder, J.M., Glibert, P.M. y Skelton, H.M. (2008) Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, **8**, 77-93.
- Burns, C.W., Brett, M.T. y Schallenberg, M. (2011) A comparison of the trophic transfer of fatty acids in freshwater plankton by cladocerans and calanoid copepods. *Freshwater Biol.*, **56**, 889-903.
- Callieri, C. (2007) Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Rev.*, **1**, 1-28.
- Callieri, C., Amicucci, E., Bertoni, R. et al. (1996) Fluorometric characterization of two picocyanobacteria strains from different underwater light quality. *Int. Revue. Hydrobiol.*, **81**, 13-23.
- Callieri, C., Caravati, E. y Morabito, G. (2006) The unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus* and mixotrophic flagellates: evidence for a functional association in an oligotrophic, subalpine lake. *Freshwater Biol.*, **51**, 263-273.
- Caron, D.A., Porter, K.G. y Sanders, R.W. (1990) Carbon, nitrogen, and phosphorus budgets for the mixotrophic phytoflagellate *Poterochromonas*



- malhamensis* (Chrysophyceae) during bacterial ingestion. *Limnol. Oceanogr.*, **35**, 433–443.
- Caron, D.A., Sanders, R.W., Lira, E.L. et al. (1993) Light-dependent phagotrophy in the freshwater mixotrophic Chrysophyte *Dinobryon cylindricum*. *Microbial Ecol.*, **25**, 93-111.
- Caron, D.A., Peele, E.R., Lim, E.L. et al. (1999) Picoplankton and nanoplankton and their trophic coupling in surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnol. Oceanogr.*, **44**, 259-272.
- Carpenter, S.R., Cole, J.J., Pace, M.L. et al. (2005) Ecosystem subsidies: terrestrial support of aquatic food webs from ^{13}C addition to contrasting lakes. *Ecology*, **86**, 2737-2750.
- Carrias, J-F., Amblard, C. y Bourdier, G. (1996) Protistan bacterivory in an oligomesotrophic lake: importance of attached ciliates and flagellates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **31**, 249-268.
- Chesson, J. (1978) Measuring preference in selective predation. *Ecology*, **59**, 211-215.
- Chesson, J. (1983) The estimation and analysis of preference and its relationship to foraging models. *Ecology*, **64**, 1297-1304.
- Christaki, U., Wambeke, F.V. y Dolan, J.R. (1999) Nanoflagellates (mixotrophs, heterotrophs and autotrophs) in the oligotrophic eastern Mediterranean: standing stocks, bacterivory and relationship with bacterial production. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **181**, 297-307.
- Christaki, U., Giannakourou, A., Wambeke, F.V. et al. (2001) Nanoflagellate predation on auto- and heterotrophic picoplankton in the oligotrophic Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.*, **23**, 1297-1310.
- Conmy, R.N., Coble, P.G., Cannizzaro, J.P. et al. (2009) Influence of extreme storm events on West Florida Shelf CDOM distributions. *J. Geophys. Res.*, **114**, 1-17.
- Corte, A. (1962) Algas de agua dulce en lagos semicongelados de Bahía Esperanza, Península Antártica. *Contrib. Inst. Antarct. Argentino*, **69**, 1-38.
- Cottrell, M.T. y Kirchman, D.L. (2000) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microb.*, **66**, 1692-1697.
- Croft, M.T., Warren, M.J. y Smith, A.G. (2006) Algae need their vitamins. *Eukariotic cell*, **5**, 1175-1183.
- Currie, D.J. y Kalff, J. (1984) A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnol. Oceanogr.*, **29**, 298-310.



- Dahl, E., Bagøien, E., Edvardsen, B. et al. (2005) The dynamics of *Chrysochromulina* species in the Skagerrak in relation to environmental conditions. *J. Sea Res.*, **54**, 15-24.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R. et al. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 434-444.
- Davis-Colley, R.J. y Vant, W.N. (1987) Absorption of light by yellow substance in freshwater lakes. *Limnol. Oceanogr.*, **32**, 416-425.
- De Lange, H.J., Morris, D.P. y Williamson, C.E. (2003) Solar ultraviolet photodegradation of DOC may stimulate freshwater food webs. *J. Plankton Res.*, **25**, 111-117.
- de Tezanos Pinto, P., y Litchman, E. (2010) Eco-physiological responses of nitrogen-fixing cyanobacteria to light. *Hydrobiologia*, **639**, 63-68.
- del Giorgio, P.A. y Davis, D.J. (2003) Patterns in dissolved organic matter lability and consumption across aquatic ecosystems. En: *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter* (Findlay, D.L. y Sinsabaugh, R.L., Eds), pp. 400-425. Academic Press.
- Diaz, M.M. y Pedrozo, F. (1993) Seasonal succession of phytoplankton in a small Andean patagonian lake (Rep. Argentina) and some considerations about the PEG Model. *Arch. Hydrobiol.*, **127**, 167-184.
- Diaz, M., Pedrozo, F., Reynolds, C. et al. (2007) Chemical composition and the nitrogen-regulated trophic state of Patagonian lakes. *Limnologica*, **37**, 17-27.
- Dolan, J.R. y Šimek, K. (1998) Ingestion and digestion of a autotrophic picoplankter, *Synechococcus*, by a heterotrophic nanoflagellate, *Bodo saltans*. *Limnol. Oceanogr.*, **43**, 1740-1746.
- Domaizon, I., Viboud, S. y Fontvieille, D. (2003) Taxon-specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **46**, 317-329.
- Domaizon, I., Wahl, B., Fehr, G. et al. (2005) Microbial Biodiversity. Eurolakes Project D22, pp. 1-43.
- Dumont, H.J., van de Velde, I. y Dumont, S. (1975) The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia*, **19**, 75-97.
- Edmondson, W.T. y Winberg, G.G. (Eds) (1971) A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters. En: *IBP Handbook*, pp.17-358. Oxford, Blackwell Scientific Publications.



- Eimers, M.C., Buttle, J. y Watmough, S.A. (2008) Influence of seasonal changes in runoff and extreme events on dissolved organic carbon trends in wetland- and upland-draining streams. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **65**, 796-808.
- Fagerbakke, K.M., Heldal, M. y Norland, S. (1996). Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.*, **10**, 15-27.
- Farjalla, V.F., Faria, B.M. y Esteves, F. (2002) The relationship between DOC and planktonic bacteria in tropical coastal lagoons. *Arch. Hydrobiol.*, **156**, 97-119.
- Flynn, K.J., Stoecker, D.K., Mitra, A. et al. (2013) Misuse of the phytoplankton – zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. *J. Plankton Res.*, **35**, 3-11.
- Franke, G. (2010) Efectos del sismo del 27 de febrero en Presas de la región Comahue. VI Congreso Argentino de Presas y Aprovechamientos Hidroeléctricos.
- Fujii, M., Kojima, H., Iwata, T. et al. (2012) Dissolved organic carbon as major environmental factor affecting bacterioplankton communities in mountain lakes of Eastern Japan. *Environ. Microbiol.*, **63**, 496-508.
- Gasol J.M., Massana R. y Pedrós-Alió C. (2005) Xarxes invisibles, o l'art d'esbrinar quants microorganismes marins hi ha, qui són i què fan. *Mètode* **46**, 73-79.
- Gerea, M., Queimaliños, C.P., Schiaffino, M.R. et al. (2013) *In situ* prey selection of mixotrophic and heterotrophic flagellates in Antarctic oligotrophic lakes: an analysis of the digestive vacuole content. *J. Plankton Res.*, **35**, 201-212.
- Gerroth J. (2003) Conjugating Green Algae and Desmids. En: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, Wehr, J.D. y Sheath R.G., Eds, pp. 353-385. Elsevier Science, California, USA.
- Glöckner, F.O., Fuchs, B.M. y Amann, R. (1999) Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3721-3726.
- González, J.M., Sherr, E.B. y Sherr, B.F. (1990a) Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 583-589.
- González, J.M. (1999) Bacterivory rate estimates and fraction of active bacterivores in natural protist assemblages from aquatic systems. *Appl. Environ. Microb.*, **65**, 1463-9.
- González, J.M., Sherr, E.B. y Sherr, B.F. (1993) Differential feeding by marine flagellates on growing versus starving, and on motile versus nonmotile, bacterial prey. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **102**, 257-267.



- González, J.M., Iriberry, J., Egea, L. et al. (1990b) Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1851-1857.
- Green, S.A. y Blough, N.V. (1994) Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, **39**, 1903-1916.
- Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (2013) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.
- Güde, H. (1989) The role of grazing on bacteria in plankton succession. En: Sommer, U. (ed.) Plankton ecology. Succession in plankton communities, pp. 337-364. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Hahn, M.W. y Höfle, M.G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 113-121.
- Hahn, M.W., Lünsdorf, H., Wu, Q. et al. (2003). Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1442-1451.
- Hajdu, S., Larsson, U. y Moestrup, Ö. (1996) Seasonal variation of *Chrysochromulina* species (Prymnesiophyceae) in a coastal area and nutrient-enriched inlet of the northern Baltic proper. *Bot. Mar.*, **39**, 281-295.
- Håkanson, L. (2005) The importance of lake morphometry and catchment characteristics in limnology – ranking based on statistical analyses. *Hydrobiologia*, **541**, 117-137.
- Hanson, P.C., Hamilton, D.P., Stanley, E.H. et al. (2011) Fate of allochthonous dissolved organic carbon in lakes: a quantitative approach. *PLoS ONE*, **6**, 1-12.
- Havskum, H. y Riemann, B. (1996) Ecological importance of bacterivorous, pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **137**, 251-263.
- Havskum H. y Hansen A.S. (1997) Importance of pigmented and colourless nano-sized protists as grazers on nanoplankton in a phosphate-depleted Norwegian fjord and in enclosures. *Aquat. Microb. Ecol.*, **12**, 139-151.
- Helbling, E.W., Holm-Hansen, O. y Villafañe V. (1994) Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of mixing. *Antarct. Res. Ser.*, **62**, 207-227.
- Helms, J.R., Stubbins, A., Ritchie, J.D. et al. (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.*, **53**, 955-969.



- Hitchman, R.B. y Jones, H.L.J. (2000) The role of mixotrophic protists in the population dynamics of the microbial food web in a small artificial pond. *Freshwater Biol.*, **43**, 231-241.
- Hobbie, J.E., Bahr, M., Bettez, N. (2000) Microbial food webs in oligotrophic Arctic lakes. En: Bell, C.R., Brylinksy, M., Johnson-Green, P., (eds) Microbial biosystem: new frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, pp. 293-298. Atlantic Canadian Society for Microbial Ecology, Halifax.
- Holen, D.A. (1999) Effects of prey abundance and light intensity on the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis* from a mesotrophic lake. *Freshwater Biol.*, **42**, 445-455.
- Hope, D., Billett, M.F. y Cresser, M.S. (1994) A review of the export of carbon in river water: fluxes and processes. *Environ. Pollut.*, **84**, 301-324.
- Huber-Pestalozzi, G. (1941) Chrysophyceae, Farblose flagellaten Heterokonten. Das phytoplankton des Susswassers Band XVI, Teil 2. (Thienemann, A., Ed). E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Huber-Pestalozzi, G. (1968) Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae. Das phytoplankton des Susswassers Band XVI, Teil 3. (Thienemann, A., Ed). E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Huber-Pestalozzi, G. (1983) Chlorophyceae, Chlorococcales. Das phytoplankton des Susswassers Band XVI, Teil 7. (Thienemann, A., Ed.). E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Ichinotsuka, D., Ueno, H. y Nakano, S. (2006) Relative importance of nanoflagellates and ciliates as consumers of bacteria in a coastal sea area dominated by oligotrichous *Strombidium* and *Strobilidium*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **42**, 139-147. <http://www.int-res.com/abstracts/ame/v42/n2/p139-147/>.
- Isaksson, A., Bergström, A., Blomqvist, P. et al. (1999) Bacterial grazing by phagotrophic phytoflagellates in a deep humic lake in northern Sweden. *J. Plankton Res.*, **21**, 247-268.
- Izaguirre, I., Allende, L. y Marinone, M. C. (2003) Comparative study of the planktonic communities from lakes of contrasting trophic status at Hope Bay (Antarctic Peninsula). *J. Plankton Res.*, **25**, 1079-1097.
- Izaguirre, I., Vinocur, A., Mataloni, G. et al. (1998) Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Hydrobiologia*, **369/370**, 73-87.
- Izaguirre, I., Sinistro, R., Schiaffino, M.R. et al. (2012) Grazing rates of protists in wetlands under contrasting light conditions due to floating plants. *Aquat. Microb. Ecol.*, **65**, 221-232.



- Jacobs, J. (1974) Quantitative measurement of food selection a modification of the forage ratio and Ivlev's Electivity Index. *Oecologia*, **14**, 413-417.
- James, M.R., Hall, J.A., Zealand, N. et al. (1996) Grazing by protozoa in marine coastal and oceanic ecosystems off New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.*, **30**, 313-324.
- Jansson, M., Blomqvist, P., Jonsson, A. et al. (1996) Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Örräsket. *Limnol. Oceanogr.*, **41**, 1552-1559.
- Jansson, M., Bergström, A-K., Blomqvist, A. et al. (1999) Impact of allochthonous organic carbon on microbial food web carbon dynamics and structure in Lake Örräsket. *Arch. Hydrobiol.*, **144**, 409-428.
- Jansson, M., Bergström, A-K., Blomqvist, P. et al. (2000) Allochthonous organic carbon and phytoplankton/bacterioplankton production relationship in lakes. *Ecology*, **81**, 3250-3255.
- Jansson, M., Bergström, A-K., Lymer, D. et al. (2006) Bacterioplankton growth and nutrient use efficiencies under variable organic carbon and inorganic phosphorus ratio. *Microbial Ecol.*, **52**, 358-364.
- Jardillier, L., Basset, M., Domaizon, I. et al. (2004) Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.*, **35**, 259-273.
- Jeong, H.J., Park, J.Y., Nho, J.H. et al. (2005a) Feeding by red-tide dinoflagellates on the cyanobacterium *Synechococcus*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **41**, 131-143.
- Jeong, H.J., Yoo, Y.D., Seong, K.A. et al. (2005b) Feeding by the mixotrophic red-tide dinoflagellate *Gonyaulax polygramma*: mechanisms, prey species, effects of prey concentration, and grazing impact. *Aquat. Microb. Ecol.*, **38**, 249-257.
- Jezbera, J., Nedoma, J. y Šimek, K. (2003) Longitudinal changes in protistan bacterivory and bacterial production in two canyon-shaped reservoirs of different trophic status. *Hydrobiologia*, **504**, 115-130.
- Jezbera, J., Hornák, K. y Šimek, K. (2005) Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **52**, 351-363.
- Jezbera, J., Hornák, K. y Šimek, K. (2006) Prey selectivity of bacterivorous protists in different size fractions of reservoir water amended with nutrients. *Environ. Microbiol.*, **8**, 1330-1339.
- Jones, H.L.J. (1997) A classification of mixotrophic protists based on their behaviour. *Freshwater Biol.*, **37**, 35-43.



- Jones, H.L.J., Leadbeater, B.S.C. y Green J.C. (1993) Mixotrophy in marine species of *Chrysochromulina* (Prymnesiophyceae): ingestion and digestion of a small green flagellate. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **73**, 283–296.
- Jones, H.L.J., Durjun, P., Leadbeater, B.S.C. et al. (1995) The relationship between photo acclimation and phagotrophy with respect to chlorophyll *a*, carbon and nitrogen content, and cell size of *Chrysochromulina brevifilum* (Prymnesiophyceae). *Phycologia*, **34**, 128-134.
- Jones, R.I. (1992) The influence of humic substances on lacustrine planktonic food chains. *Hydrobiologia*, **229**, 73-91.
- Jones, R.I. (1994) Mixotrophy in planktonic protist as a spectrum of nutritional strategies. *Mar. Microb. Food Webs*, **8**, 87-96.
- Jones, R.I. (2000) Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biol.*, **45**, 219-226.
- Jones, R.I. y Rees, S. (1994a) Influence of temperature and light on particle ingestion by the freshwater phytoflagellate *Dinobryon*. *Arch. Hydrobiol.* **132**, 203-211.
- Jones, R.I. y Rees, S. (1994b) Characteristics of particle uptake by the phagotrophic phytoflagellate, *Dinobryon divergens*. *Mar. Microb. Food Webs*, **8**, 97-110.
- Jousset, A. (2012) Ecological and evolutive implications of bacterial defences against predators. *Environ. Microbiol.*, **14**, 1830-1843.
- Jürgens, K. y Matz, C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *A. van Leeuw. J. Microb.*, **81**, 413-434.
- Jürgens, K. y Massana, R. (2008) Protistan Grazing on marine bacterioplankton. En: Kirchman D. L., (ed.) *Microbial Ecology of the Oceans*. 2nd Edn. , pp. 383-441. Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S. et al. (1999) Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1241-1250.
- Kamjunke, N., Henrichs, T. y Gaedke, U. (2007) Phosphorus gain by bacterivory promotes the mixotrophic flagellate *Dinobryon* spp. during re-oligotrophication. *J. Plankton Res.*, **29**, 39-46.
- Katechakis, A. y Stibor, H. (2006) The mixotroph *Ochromonas tuberculata* may invade and suppress specialist phago- and phototroph plankton communities depending on nutrient conditions. *Oecologia*, **148**, 692-701.



- Keller, M.D., Shapiro, L.P., Haugen, E.M. et al. (1994) Phagotrophy of fluorescently labeled bacteria by an oceanic phytoplankter. *Microb. Ecol.*, **28**, 39-52.
- Kieber, R.J., Zhou, X. y Mopper, K. (1990) Formation of carbonyl compounds from UV-induced photodegradation of humic substances in natural waters: Fate of riverine carbon in the sea. *Limnol. Oceanogr.*, **35**, 1503-1515.
- Kimura, B. y Ishida, Y. (1985) Photophagotrophy in *Uroglena americana*, Chrysophyceae. *Jpn. J. Limnol.*, **46**, 315-318.
- Kingston, J.C. (2003) Araphid and Monoraphid Diatoms. En: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, Wehr, J.D. y Sheath R.G., Eds, pp. 595-636. Elsevier Science, California, USA.
- Kirchman, D., Dittel, A.I., Findlay, S.E.G. et al. (2004) Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquat. Microb. Ecol.*, **35**, 243-257.
- Kirk, J.T.O. (1980) Spectral absorption properties of natural waters: contribution of the soluble and particulate fractions to light absorption in some inland waters of South-eastern Australia. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, **31**, 287-296.
- Kirk, J.T.O. (1981) Monte Carlo study of the nature of the underwater light field in, and the relationships between optical properties of, turbid yellow waters. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, **32**, 517-32.
- Kirk, J.T.O. (1984). Dependence of relationship between inherent and apparent optical properties of water on solar altitude. *Limnol. Oceanogr.*, **29**, 350-356.
- Kirk, J.T.O. (1994). Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press. Cambridge. 509 pp.
- Kirk, J.T.O. (2011). Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press. Cambridge. 645 pp.
- Kling, G.W., Kipphut, G.W., Miller, M.M. et al. (2000). Integration of lakes and streams in a landscape perspective: The importance of material processing on spatial patterns and temporal coherence. *Freshwater Biol.*, **43**, 477-497.
- Kratz, T.K., Webster, K.E., Bowser, C.J. et al. (1997) The influence of landscape position on lakes in northern Wisconsin. *Freshwater Biol.*, **37**, 209-217.
- Kritzberg, E.S., Cole, J.J., Pace, M.L. et al. (2004) Autochthonous versus allochthonous carbon sources of bacteria: Results from whole-lake ¹³C addition experiments. *Limnol. Oceanogr.*, **49**, 588-596.
- Kociolek, J.P. y Spaulding S.A. (2003a) Symmetrical Naviculoid Diatom. En: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, Wehr, J.D. y Sheath R.G., Eds, pp. 637-653. Elsevier Science, California, USA.



- Kociolek, J.P. y Spaulding, S.A. (2003b) Eunotiod and Asymmetrical Naviculoids Diatoms. En: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, Wehr, J.D. y Sheath R.G., Eds, pp. 665-667. Elsevier Science, California, USA.
- Komárek, J. y Komarkova, J. (2003) Filamentous Cyanobacteria. En: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, Wehr, J.D. y Sheath R.G., Eds, pp. 117-195. Elsevier Science, California, USA.
- Lampert, W. (1987) Predictability in lake ecosystems: the role of biotic interactions. En: *Potential and limitations of ecosystem analysis. Ecological studies*, Schulze, E. D., Zwölfer, H. P. (ed.), vol. 61, pp. 333-346. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Laybourn-Parry, J. y Marshall, W.A. (2003) Photosynthesis, mixotrophy and microbial plankton dynamics in two high Arctic lakes during summer. *Polar Biol.*, **26**, 517-524.
- Legrand, C., Johansson, N., Johnsen, G. et al. (2001) Phagotrophy and toxicity variation in the mixotrophic *Prymnesium patelliferum* (Haptophyceae). *Limnol. Oceanogr.*, **46**, 1208-1214.
- Lepistö, L. y Rosenström, U. (1998) The most typical phytoplankton taxa in four types of boreal lakes. *Hydrobiologia*, **369/370**, 89-97.
- Lindell, M., Granéli, W. y Tranvik, L.J. (1995) Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 195-199.
- Lindström, E. S., Agterveld Kamst-van, M. P. y Zwart, G. (2005) Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8201-8206.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W. et al. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**, 593-600.
- Manz, W., Amann, R., Vancanneyt, M. et al. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroidetes* in the natural environment. *Microbiology*, **142**, 1097-1106.
- Marshall, W.A. y Laybourn-Parry, J. (2002) The balance between photosynthesis and grazing in Antarctic mixotrophic cryptophytes during summer. *Freshwater Biol.*, **47**, 2060-2070.
- Massana, R., Gasol, J., Børnsen, P.K. et al. (1997a). Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Sci. Mar.*, **61**, 397-407.



- Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M. et al. (1997b) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 50-56.
- Massana, R., Unrein, F., Rodríguez-Martínez, R. et al. (2009) Grazing rates and functional diversity of uncultured heterotrophic flagellates. *The ISME J.*, **3**, 588-596.
- Matz, C. y Jürgens, K. (2005) High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 921-929.
- Matz, C., Boenigk, J., Arndt H. et al. (2002) Role of bacterial phenotypic traits in selective feeding of the heterotrophic nanoflagellate *Spumella* sp. *Aquat. Microb. Ecol.*, **27**, 137-148.
- Medina-Sánchez, J.M., Villar-Argaiz, M. y Carrillo, P. (2004) Neither with nor without you: A complex algal control on bacterioplankton in a high mountain lake. *Limnol. Oceanogr.*, **49**, 1722-1733.
- Medina-Sánchez, J. M., Felip, M. y Casamayor, E. O. (2005) Catalyzed reported deposition-fluorescence *in situ* hybridization protocol to evaluate phagotrophy in mixotrophic protists. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7321-7326.
- Menden-Deuer, S. y Lessard, E.J. (2000) Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.*, **45**, 569-579.
- Modenutti, B.E. y Pérez, G.L. (2001) Planktonic ciliates from an oligotrophic South Andean Lake, Morenito lake (Patagonia, Argentina). *Braz. J. Biol.*, **61**, 389-395.
- Modenutti, B.E., Balseiro, E.G. y Queimalinos, C.P. (2000) Ciliate community structure in two South Andean lakes: the effect of lake water on *Ophrydium naumanni* distribution. *Aquat. Microb. Ecol.*, **21**, 299-307.
- Modenutti, B.E., Balseiro, E.G., Queimaliños, C.P. et al. (1998) Structure and dynamics of food webs in Andean lakes. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, **3**, 179-186.
- Modenutti, B. E. Balseiro, E. G., Callieri, C. et al. (2008). Light versus food supply as factors modulating niche partitioning in two pelagic mixotrophic ciliates. *Limnol. Oceanogr.*, **53**, 446-455.
- Monger, B.C. y Landry, M.R. (1991) Prey-size dependency of grazing by free-living marine flagellates. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **74**, 239-248.
- Moorthi, S., Caron, D.A., Gast, R.J. et al. (2009) Mixotrophy: a widespread and important ecological strategy for planktonic and sea-ice nanoflagellates in the Ross Sea, Antarctica. *Aquat. Microb. Ecol.*, **54**, 269-277.



- Morris, D.P. y Hargreaves, B.R. (1997) The role of photochemical degradation of dissolved organic carbon in regulating the UV transparency of three lakes on the Pocono Plateau. *Limnol. Oceanogr.*, **42**, 239-249.
- Morris, D.P., Zagarese, H., Williamson, C.E. et al. (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of Dissolved Organic Carbon. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 1381-1391.
- Neef, A. (1997) Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen biozöosen. PhD Thesis. Technische Universität München. Munich, Germany.
- Nicholls, K.H. (2003) Haptophyte algae. En: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, Wehr, J.D. y Sheath R.G., Eds, pp. 511-519. Elsevier Science, California, USA.
- Nishimura, Y. y Nagata, T. (2007) Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquat. Microb. Ecol.*, **48**, 231-240.
- Norland, S. (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria, p. 303-307. En: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (Kemp, P., Sherr, B.F., Sherr E.B. y Cole, J.J., Eds). Lewis Publishing.
- Nusch, E.A. (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Archiv. Hydrobiol.*, **14**, 14-36.
- Nygaard, K. y Tobiesen, A. (1993). Bacterivory in algae: A survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, **38**, 273-279.
- Ostroff, C., Karlander, E. y Van Valkenburg, S. (1980) Growth rates of *Pseudopedinella pyriforme* (Chrysophyceae) in response to 75 combinations of light, temperature and salinity. *J. Phycol.*, **16**, 421-423.
- Pace, M.L. y Cole, J.J. (2002) Synchronous variation of dissolved organic carbon and color in lakes. *Limnol. Oceanogr.*, **47**, 333-342.
- Pålsson, C. y Granéli, W. (2003) Diurnal and seasonal variations in grazing by bacterivorous mixotrophs in an oligotrophic clear- water lake. *Arch. Hydrobiol.*, **157**, 289-307.
- Pålsson, C. y Daniel, C. (2004) Effects of prey abundance and light intensity on nutrition of a mixotrophic flagellate and its competitive relationship with an obligate heterotroph. *Aquat. Microb. Ecol.*, **36**, 247-256.
- Pålsson, C. y Granéli, W. (2004) Nutrient limitation of autotrophic and mixotrophic phytoplankton in a temperate and tropical humic lake gradient. *J. Plankton Res.*, **26**, 1005-1014.
- Paruelo, J.M., Beltrán, A., Jobbágy, E. et al. (1998) The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. *Ecología Austral*, **8**, 85-101.



- Pawlowski, D., Gruszka, B., Gallas, H. et al. (2013) Changes in the biota and sediments of glacial Lake Kozmin, Poland, during the late Saalian (Illinoian). *J. Paleolimnol.*, **49**, 679-696.
- Pereyra, F. y Helms, F. (2005) Estudio geocientífico aplicado al ordenamiento territorial. *SEGEMAR Anales*, **42**, 48-59.
- Pérez, G.L., Queimaliños, C. y Modenutti, B. (2002) Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *J. Plankton Res.*, **24**, 591-599.
- Pérez, G.L., Torremorell, A., Bustingorry, J. et al. (2010) Optical characteristics of shallow lakes from the Pampa and Patagonia regions of Argentina. *Limnologica*, **40**, 30-39.
- Pérez, M-T. y Sommaruga, R. (2006) Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnol. Oceanogr.*, **51**, 2527-2537.
- Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature*, **3**, 537-46.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. y Amann, R. (2002) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3094-3101.
- Pernthaler, J., Šimek, K., Sattler, B. et al. (1996) Short-term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligo-mesotrophic lake. *J. Plankton Res.*, **18**, 443-462.
- Pernthaler, J., Posch, T., Šimek, K. et al. (1997) Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 596-601.
- Pernthaler, J., Posch, T., Šimek, K. et al. (2001) Predator-Specific enrichment of Actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2145-2155.
- Pfandl, K., Posch, T. y Boenigk, J. (2004) Unexpected effects of prey dimensions and morphologies on the size selective feeding by two bacterivorous flagellates (*Ochromonas* sp. y *Spumella* sp.). *J. Eukaryotic Microbiol.*, **51**, 626-633.
- Pomeroy, L.R. (1974) The Ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*, **24**, 499-504.
- Pommier, J., Frenette, J-J., Massicotte, P. et al. (2012) Seston fatty acid composition and copepod RNA:DNA ratio with respect to the underwater light climate in fluvial. *Aquatic Sciences*. 10.1007/s00027-011-0246-z.
- Porter, K.G. (1988) Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia*, **159**, 89-97.



- Porter, K.G. y Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- Posch, T., Šimek, K., Vrba, J. et al. (1999) Predator-induced changes of bacterial size- structure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquat. Microb. Ecol.*, **18**, 235-246.
- Queimaliños, C. (2002) The role of phytoplanktonic size fractions in the microbial food webs in two north Patagonian lakes (Argentina). *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **28**, 1236-1240.
- Queimaliños, C.P. y Modenutti, B.E. (1993). Experimental analysis of the rotifer-cladoceran effect on phytoplankton. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **25**, 943-946.
- Queimaliños, C., Reissig, M., Diéguez, M.C. et al. (2012) Influence of precipitation, landscape and hydrogeomorphic lake features on pelagic allochthonous indicators in two connected ultraoligotrophic lakes of North Patagonia. *Sci. Total Environ.*, **427-428**, 219-228.
- Rapacioli, R.A. (2011) Caracterización hidrológica de la Reserva Natural Urbana Lago Morenito – Laguna Ezquerria. Informe Técnico, 1-34.
- Rasmussen, J.B., Godbout, L. y Schallenberg, M. (1989) The humic content of lake water and its relationship to watershed and lake morphometry. *Limnol. Oceanogr.*, **34**, 1336-1343.
- Raven, J.A. (1997) Phagotrophy in Phototrophs. *Limnol. Oceanogr.*, **42**(1), 198-205.
- Reche, I., Pace, M.L. y Cole, J.J. (1999) Relationship of trophic and chemical conditions to photobleaching of dissolved organic matter in lake ecosystems. *Biogeochemistry*, **44**, 259-280.
- Reche, I., Pace, M.L. y Cole, J.J. (2000) Modeled effects of dissolved organic carbon and solar spectra on photobleaching in lake ecosystems. *Ecosystems*, **3**, 419 - 432.
- Rhodes, L. y Burke, B. (1996) Morphology and growth characteristics of *Chrysochromulina* species (Haptophyceae = Prymnesiophyceae) isolated from New Zealand coastal waters. *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.*, **30**, 91-103.
- Rice, J.A. (1988) Mathematical statistics and data analysis. En: Havskum y Riemann, Eds, pp. 1-594. Wadsworth y Brooks/Cole Statistics/Probability Series, Pacific Grove, CA.
- Roesler, C.S., Perry, M.J. y Garder, K.L. (1989) Modeling *in situ* phytoplankton absorption from total absorption spectra in productive inland marine waters. *Limnol. Oceanogr.*, **34**, 1510-1523.



- Rossa, D.C., Bonecker C.C. y Fulone, L.J. (2007) Biomassa de rotíferos em ambientes dulcícolas: revisão de métodos e fatores influentes. *Interciencia*, **32**(4), 220-226.
- Rothhaupt, K.O. (1996a) Utilization of substitutable carbon and phosphorus sources by the mixotrophic chrysophyte *Ochromonas* sp. *Ecology*, **77**, 706-715.
- Rothhaupt, K.O. (1996b) Laboratory experiments with a mixotrophic chrysophyte and obligate phagotrophic and phototrophic competitors. *Ecology*, **77**, 716-724.
- Ruttner-Kolisko, A. (1977) Suggestions for biomass calculation of planktonic rotifers. *Arch. Hydrobiol. (Beih. Ergebn. Limnol.)*, **8**, 71-6.
- Safi, K. A. y Hall, J. A. (1999) Mixotrophic and heterotrophic nanoflagellate grazing in the convergence zone east of New Zealand. *Aquat. Microb. Ecol.*, **20**, 83-93.
- Salat, J. y Marrasé, C. (1994) Exponential and linear estimations of grazing on bacteria: effects of changes in the proportion of marked cells. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **104**, 205-209.
- Salcher, M. M., Pernthaler, J., Psenner, R. et al. (2005) Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquat. Microb. Ecol.*, **38**, 215-229.
- Salcher, M. M., Pernthaler, J. y Posch, T. (2011) Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria "that rule the waves" (LD12). *The ISME J.*, **5**, 1242-1252.
- Samuelsson, K., Berglund, J., Haecky, P. et al. (2002) Structural changes in an aquatic microbial food web caused by inorganic nutrient addition. *Aquat. Microb. Ecol.*, **29**, 29-38.
- Sanders, R.W. (1991) Mixotrophic protists in marine and freshwater ecosystems. *J. Protozool.*, **38**, 76-81.
- Sanders, R.W. y Porter, K.G. (1988) Phagotrophic phytoflagellates. En: *Advances in Microbial Ecology* (Marshall, K., Ed.), Vol. 10, pp. 167-192. Plenum Press, New York.
- Sanders, R.W., Porter, K.G. y Caron, D.A. (1990) Relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic Chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. *Microbial Ecol.*, **19**, 97-109.
- Sanders, R.W., Porter, K.G., Bennett, S.J. et al. (1989) Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnol. Oceanogr.*, **34**, 673-687.
- Schiaffino, M. R. (2011) Análisis de la estructura del picoplancton y sus patrones biogeográficos en lagos comprendidos en una transecta patagónico-antártica. PhD Thesis - Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.



- Schiaffino, M. R., Unrein, F., Gasol, J. M. et al. (2009) Comparative analysis of bacterioplankton assemblages from maritime Antarctic freshwater lakes with contrasting trophic status. *Polar Biol.*, **32**, 923-936.
- Sciandra, A., Lazzara, L., Claustre, H. et al. (2000) Responses of growth rate, pigment composition and optical properties of *Cryptomonas* sp. to light and nitrogen stresses. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **201**, 107-120.
- Scully, N.M., Cooper, W.J. y Tranvik, L.J. (2003) Photochemical effects on microbial activity in natural waters: the interaction of reactive oxygen species and dissolved organic matter. *FEMS Microbial. Ecol.*, **46**, 353-357.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J. et al. (2003) An improved protocol for quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2928-2935.
- Seong, K.A., Jeong, H.J., Kim, S. et al. (2006) Bacterivory by co-occurring red-tide algae, heterotrophic nanoflagellates, and ciliates. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **322**, 85-97.
- Shannon, S.P. (2006) Comparison of ingestion and digestion rates of *Ochromonas danica* grazing on *Pseudomonas fluorescens* of varying food quality. PhD Thesis, The University of Texas at Arlington.
- Shannon, S. P., Chrzanowski, T. H. y Grover, J. P. (2007) Prey food quality affects flagellate ingestion rates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 66-73.
- Sherr, E.B. y Sherr, B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Anton. Leeuw.*, **81**, 293-308.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B. y Fallon, R.D. (1987) Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. Envir. Microbiol.*, **53**, 958-965.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B. y Rassoulzadegan, F. (1988) Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: temperature dependence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1091-1095.
- Shooter, D., Davies-Colley, R. y Kirk, J.T. (1998) Light absorption and scattering by ocean waters in the vicinity of the Chatham Rise, South Pacific Ocean. *Mar. Freshwat. Res.* **49**, 455-461.
- Shubert, L.E. (2003) Nonmotile coccoid and Colonial Green Algae. En: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, Wehr, J.D. y Sheath R.G., Eds, pp. 2053-2309. Elsevier Science, California, USA.



- Šimek, K., Bobkova, J., Macek, M. et al. (1995) Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: A study at the species and community level. *Limnol. Oceanogr.*, **40**, 1077-1090.
- Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, J. et al. (1997) Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 587-595.
- Šimek, K., Hornak, K., Jezbera, J. et al. (2005) Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 Subcluster of α -Proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2381-2390.
- Šimek, K., Hornák, K., Jezbera, J. et al. (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ. Microbiol.*, **8**, 1613-1624.
- Simon, M. y Azam, F. (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **51**, 201-213.
- Spencer, R.G.M., Aiken, G.R., Butler, K.D. et al. (2009) Utilizing chromophoric dissolved organic matter measurements to derive export and reactivity of dissolved organic carbon exported to the Arctic Ocean: A case study of the Yukon River, Alaska. *Geophys. Res. Lett.*, **36**, 1-6.
- Stabell, T., Andersen, T. y Klaveness, D. (2002) Ecological significance of endosymbionts in a mixotrophic ciliate — an experimental test of a simple model of growth coordination between host and symbiont. *J. Plankton Res.*, **24**, 889-899.
- Stibor, H. y Sommer, U. (2003) Mixotrophy of a Photosynthetic Flagellate viewed from an Optimal Foraging Perspective. *Limnol. Oceanogr.*, **154**, 91-98.
- Stoecker, D.K. (1998) Conceptual Models of Mixotrophy in Planktonic Protists and some Ecological and Evolutionary Implications. *Eur. J. Protist.*, **34**, 281-290.
- Stoermer, E.F. y Julius, M.L. (2003) Centric Diatoms. En: *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*, Wehr, J.D. y Sheath R.G., Eds, pp. 559-594. Elsevier Science, California, USA.
- Strom, S. L. y Loukos, H. (1998) Selective feeding by protozoa: model and experimental behaviors and their consequences for population stability. *J. Plankton Res.*, **20**, 831-846.
- Stomp, M., Huisman, J., Vörös, L. et al. (2007) Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol. Lett.*, **10**, 290-298.
- Striebel, M (2008) Plankton dynamics: The influence of light, nutrients and diversity. PhD Thesis, Universität München.



- Sun, J. y Liu, D. (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.*, **25**, 1331-1346.
- Tarao, M., Jezbera, J. y Hahn, M. W. (2009) Involvement of cell surface structures in size-independent grazing resistance of freshwater Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4720-4726.
- Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A. et al. (2004) Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by Bacteria and Archaea in the deep ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4411-4414.
- Tittel, J., Bissinger, V., Zippel, B. et al. (2003) Mixotrophs combine resource use to out-compete specialists: Implications for aquatic food webs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 12776-12781.
- Tranvik, L.J. (1992) Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop. *Hydrobiologia*, **229**, 107-114.
- Tranvik, L.J., Porter, K.G. y Sieburth, J.M. (1989) Occurrence of bacterivory in *Cryptomonas*, a common freshwater phytoplankter. *Oecologia*, **78**, 473-476.
- Troost, T., Kooi, B.W. y Kooijman, S. (2005) Ecological specialization of mixotrophic plankton in a mixed water column. *Am. Nat.*, **166**, 45-61.
- Tsai, A., Gong, G., Sanders, R. et al. (2011) Importance of bacterivory by pigmented and heterotrophic nanoflagellates during the warm season in a subtropical western Pacific coastal ecosystem. *Aquat. Microb. Ecol.*, **63**, 9-18.
- Unrein, F., Gasol, J.M. y Massana, R. (2010) *Dinobryon faculiferum* (Chrysophyta) in coastal Mediterranean seawater: presence and grazing impact on bacteria. *J. Plankton Res.*, **32**, 559-564.
- Unrein, F., Gasol, J.M., Not, F. et al. (2013) Mixotrophic haptophytes are key bacterial grazers in oligotrophic coastal waters. *ISME J.*, 1-13, doi: 10.1038/ismej.2013.132.
- Unrein, F., Izaguirre, I., Massana, R. et al. (2005) Nanoplankton assemblages in maritime Antarctic lakes: characterization and molecular fingerprinting comparison. *Aquat. Microb. Ecol.*, **40**, 269-282.
- Unrein, F., Massana, R., Alonso-Sáez, L. et al. (2007) Significant year-round effect of small mixotrophic flagellates on bacterioplankton in an oligotrophic coastal system. *Limnol. Oceanogr.*, **52**, 456-469.
- Urabe, J., Gurung, T.B., Yoshida, T. et al. (2000) Diel changes in phagotrophy by *Cryptomonas* in Lake Biwa. *Limnol. Oceanogr.*, **45**, 1558-1563.



- Urbach, E., Vergin, K. L., Young, L. et al. (2001) Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnol. Oceanogr.*, **46**, 557-572.
- Urdea, M. S., Warner, B. D., Running, J. A. et al. (1988) A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. *Nucleic Acids. Res.*, **16**, 4937-4956.
- Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, **9**, 1-38.
- Vähätalo, A.V., Aarnos, H., Hoikkala, L. et al. (2011) Photochemical transformation of terrestrial dissolved organic matter supports hetero- and autotrophic production in coastal waters. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **423**, 1-14.
- Vadstein, O. (2000) Heterotrophic, planktonic bacteria and cycling of phosphorus: phosphorus requirements, competitive ability, and food web interactions. *Adv. Microb. Ecol.*, **16**, 115-167.
- Vaqué, D. y Pace, M.L. (1992) Grazing on bacteria by flagellates and cladocerans in lakes of contrasting food-web structure. *J. Plankton. Res.*, **14**, 307-321
- Vaqué, D., Gasol, J.M. y Marrasé, C. (1994) Grazing rates on bacteria: the significance of methodology and ecological factors. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **109**, 263-274.
- Vázquez-Dominguez, E., Peters, F., Gasol, J.M. et al. (1999) Measuring the grazing losses of picoplankton: methodological improvements in the use of fluorescently labeled tracers combined with flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.*, **20**, 119-128.
- Vázquez-Domínguez, E., Casamayor, E. O., Català, P. et al. (2005) Different marine heterotrophic nanoflagellates affect differentially the composition of enriched bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**, 474-485.
- Venrick, E. L. (1978). How many cells to count? Paris, Unesco.
- Vörös, L., Callieri, C., V.-Balogh, K. et al. (1998) Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia*, **369/370**, 117-125.
- Warnecke, F., Amann, R. y Pernthaler, J. (2004) Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microb.*, **6**, 242-253.
- Warnecke, F., Sommaruga, R., Sekar, R. et al. (2005) Abundances, identity, and growth state of Actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5551-5559.



- Webster, K.E., Soranno, P.A., Cheruvilil, K.S. et al. (2008) An empirical evaluation of the nutrient-color paradigm for lakes. *Limnol. Oceanogr.*, **53**, 1137-1148.
- Wendeberg, A. (2010) Fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microbes. *Cold Spring Harb. Protoc.*, doi:10.1101/pdb.prot5366.
- Wetzel, R.G. (2001) *Limnology, Lake and River Ecosystems*. Academic Press, New York, 1006 pp.
- Woelfl, S. y Geller, W. (2002) *Chlorella*-bearing ciliates dominate in an oligotrophic North Patagonian lake (Lake Pirehueico, Chile): abundance, biomass and symbiotic photosynthesis. *Freshwater Biol.*, **47**, 231-242.
- Worden, A.Z., Nolan, J.K. y Palenik, B. (2004) Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: the importance of the eukaryotic component. *Limnol. Oceanogr.*, **49**, 168-179.
- Xenopoulos, M.A., Lodge, D.M., Frentress, J. et al. (2003) Regional comparisons of watershed determinants of dissolved organic carbon in temperate lakes from the Upper Great Lakes region and selected regions globally. *Limnol. Oceanogr.*, **48**, 2321-2334.
- Zagarese, H.E., Cravero, W., González, P. et al. (1998) Copepod mortality induced by fluctuating levels of natural solar radiation waters simulating vertical water mixing. *Limnol. Oceanogr.*, **43**, 169-174.
- Zohary, T., Padisák, J. y Naselli-flores, L. (2010) Phytoplankton in the physical environment: beyond nutrients, at the end, there is some light. *Hydrobiologia* **639**, 261-269.
- Zubkov, M. V. y Sleigh, M. A. (1995) Bacterivory by starved marine heterotrophic nanoflagellates of two species which feed differentially, estimated by uptake of dual radioactive-labeled bacteria. *FEMS Microbial. Ecol.*, **17**, 224-226.
- Zubkov, M. V. y Tarran, G. A. (2008) High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature*, **455**, 224-226.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos:

- ✓ En primer lugar quiero agradecer a mis Directores **Claudia Queimaliños** y **Fernando Unrein** por todo lo que me enseñaron durante estos cinco años. A Fer por recibirme en el INTECH, siempre bien predispuesto para trabajar, responder siempre a mis dudas “existenciales”, por las comidas exquisitas que compartimos con Hebe, con los chicos del lab y las charlas, Gracias. A Clau por todo lo que me enseñó durante estos 5 años, no solo académicamente, sino humana y espiritualmente, por las infinitas y profundas charlas desde el día en que nos conocimos. Muchísimas Gracias por TODO!
- ✓ A Miguel Battini y sus hijos Leandro y Nicolás Battini, por las innumerables veces que remaron y colaboraron en los muestreos de esta Tesis! Sin quejarse! Muchísimas gracias... qué paciencia! ☺
- ✓ A la gente de España, Ramon Massana, Irene Forn, Hugo Sarmiento y toda la gente del ICM Barcelona (CSIC), muchas gracias por recibirme tan amablemente en su instituto. A Raquel Rodriguez por compartir su hogar conmigo y por hacer tan amena la estadía.
- ✓ Gracias a Mónica Diaz y toda la gente de su laboratorio por prestarme el microscopio de epifluorescencia durante mis inicios en este nuevo y apasionante mundo.
- ✓ A Félix por prestarme los data loggers, gracias.
- ✓ Agradezco a la gente del laboratorio de Microbiología por prestarme la ultracentrífuga y el vortex, por aguantarme y hacerme un espacio en su laboratorio durante mis visitas y por ofrecerme siempre unos matecitos.
- ✓ A Valeria Outes por facilitarme el sonicador, Gracias.
- ✓ También a Liliana Semenas por compartir el bote con nosotros.
- ✓ A Alejandra Ruffini por su buena predisposición y su ayuda cuantas veces la necesité, muchas gracias.

- ✓ A Gonzalo Pérez por ayudarme con el estudio en la parte óptica de esta Tesis, Muchas Gracias!
- ✓ A Mariana Reissig por su valiosa ayuda en la edición de esta Tesis, una Genia! Muchas gracias también por los dibujitos que me prestaste!, y por todo lo que compartimos durante este tiempo.
- ✓ A la gente del laboratorio de Química y de Suelos por prestarnos agua desionizada, unas cuantas veces, y por prestarnos la centrífuga, muchas gracias.
- ✓ A Alejandra Kenigsten y a Marcelo Aizen por prestarme el sonicador, y a la gente de Ecotono por permitirme utilizarlo en su laboratorio.
- ✓ A Laura Alonso por su buena predisposición para responder mis consultas técnicas, Muchas Gracias.
- ✓ A Irina Izaguirre por colaboración y apoyo durante esta Tesis.
- ✓ A María Arribére y Sergio Ribeiro por su colaboración durante los inicios de esta Tesis.
- ✓ A la Comisión de Doctorado en Biología de la UNC, a Patricia y Gustavo, por su predisposición y por todo su trabajo. Muchísimas Gracias!
- ✓ A CONICET y la Universidad Nacional del Comahue por brindar el espacio y las condiciones para la realización de esta Tesis.
- ✓ Al financiamiento de este trabajo por medio de los subsidios PICT 2007-00393, CONICET-CSIC PROBA 2007AR0018 y UNComahue B166.
- ✓ A la gente que nos permitió ingresar al Morenito, Muchas gracias...
- ✓ A Nicolás Battini por las Fotos de los sitios! Muchas gracias.
- ✓ A Nelson Delmoral por acompañarnos al muestreo.
- ✓ A Carolina Soto mi compañera de campo y laboratorio, cuántos días llenando frasquitos y midiendo muestras, con charla y mate fue divertido, muchas gracias.

- ✓ A Patito por su ayuda en el mundo cibernético... Muchas gracias.
- ✓ A los chicos del laboratorio de Botánica-Arquitectura (Cristian, Javier, Amaru, Marina) por albergarme algunos días en su oficina.
- ✓ A todos mis compañeros de oficina: Caro, Lina, Gus, Dani, Marce, Patito, Fabix, Mariana P, por todos los almuerzos, mates y charlas compartidas... con algunos “*derrapes*”, pero divertidas.
- ✓ A todos mis compañeros de la Salmo: Mari, Marian, Negro, Gaby, Felix, Dany, Riqui, Gonza, Pato P, Cori... Gracias por soportarme durante todos estos años, por aconsejarme, compartir experiencias y por supuesto por las charlas, almuerzos, asados y mates compartidos.
- ✓ A la gente del laboratorio de Aguas del INTECH, Horacio, Marcela, Gonza, María, Leo, Paulina, Anita, Nadia, Pepe, Roberto y Fer por hacerme un lugarcito tantas veces por aquellos pagos... muchísimas gracias por hacer de mi estadía tan amena. Por las comidas, charlas y mates... muchas gracias. También a las chicas de Buenos Aires, Romi y Laurita por el tiempo y trabajo compartido!
- ✓ A mis amigos Euge, Sil, Santi, Gera, Flavia, Agus, Alex (“los vecinos”), Fer Reyes por aguantarme durante todo este tiempo y fundamentalmente estos últimos meses de locura! Muchas gracias por estar siempre ahí!
- ✓ A la Flia Sosa y Cerón por siempre abrirnos las puertas de su casa.
- ✓ A Ceci, Carla, Dai y Maqui Straccia por recibirme siempre de la mejor manera en su casa en Buenos Aires para cada curso y congreso que hice... Muchísimas Gracias.
- ✓ A Laura Sánchez, por impulsarme a este desafío en mi vida académica, muchas gracias por confiar en mí.
- ✓ A mi familia, mis padres Alicia y Raúl y mis hermanos (Naty y Vic) cuñados (Dani y Juan), mi sobrina (Cata), y mis abuelas... por sus visitas, por escucharme, confiar en mí, por apoyarme siempre y acompañarme durante todos estos años. Muchísimas Gracias a todos...

- ✓ A mi familia del corazón! Mis suegros Jorge y Mirta, mi cuña Vale y mi sobrino joaco y los abuelos Feli y Teo. Muchas gracias por soportarme durante este tiempo hablando de la Tesis, y por dejarme ser parte de su familia.
- ✓ Y por último un profundo agradecimiento a la persona que hace 9 años elegí como mi compañero de vida, Cristian. Gracias Amor por todo lo que has hecho y haces cada día, por soportarme en los peores momentos de locura, durante esta Tesis, con el mejor de tus ánimos. Gracias por compartir tu vida y tu música conmigo. Y muchas gracias por la vida hermosa que tenemos juntos.



ANEXO I

Biovolumen y contenido de carbono de las
algas mixotróficas y flagelados heterotróficos



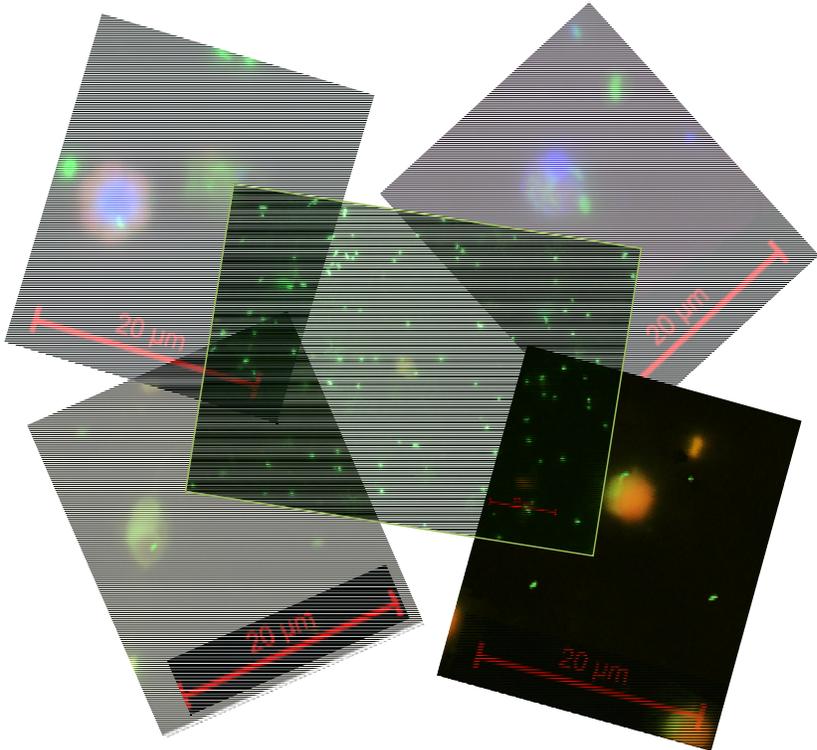
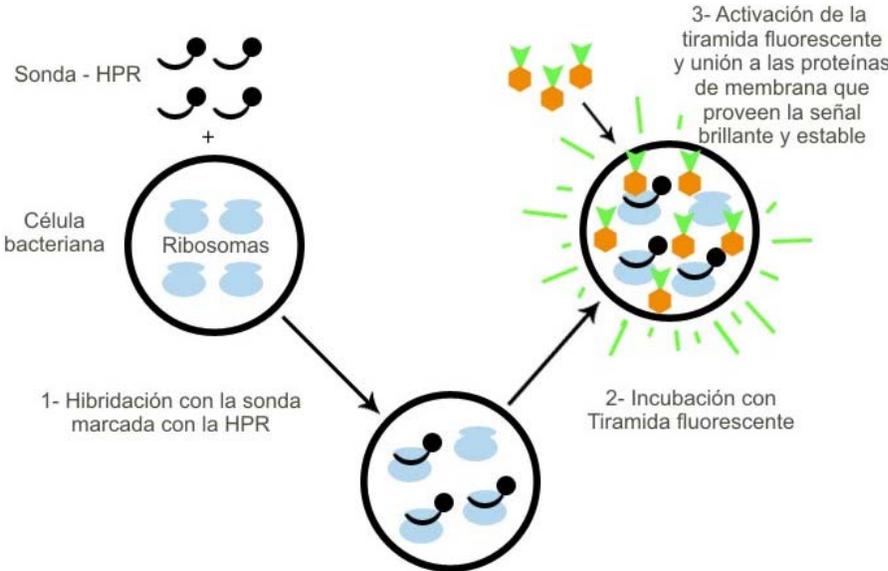
Anexo I:

Tabla A: Biovolumen y contenido de carbono de las algas mixotróficas y flagelados heterotróficos evaluados en esta Tesis. FHET: flagelados heterotróficos.

Taxa	Biovolumen (μm^3)	Contenido de carbono (fgC/Flag)
FHET <5 μm	17,8	3860
<i>Chrysochromulina parva</i>	37,4	6484
<i>Ochromonas ovalis</i>	49,9	8503
<i>Pseudopedinella</i> sp.	118,5	19627
FHET >5 μm	144,1	31682
<i>Dinobryon divergens</i>	210,1	32741
Chrysophyceae >5 μm	226,0	35073
<i>Plagioselmis lacustris</i>	349,3	52874
<i>Gymnodinium varians</i>	378,5	56929
<i>Cryptomonas erosa</i>	712,0	103069

ANEXO II:

Protocolo técnica de CARD-FISH



Anexo II:

Detalle del protocolo de Deposición Catalizada e Hibridación in situ con Sondas Fluorescentes (CARD-FISH)

para *Bacteria* y *Archaea* planctónicas en vida libre y dentro de las vacuolas digestivas de los flagelados

Fijación de muestras

- ✓ Fijar las muestras con Formaldehído filtrado (concentración final 2 %), y mantener durante una noche a 4°C.

Filtración de muestras

- ✓ Filtrar (5 mm Hg) una alícuota de las muestras utilizando filtros blancos de policarbonato de 0,2 µm de poro (para identificar las *Bacterias* y *Arqueas* en vida libre) o de de 0,8 µm de poro (para identificar las *Bacterias* y *Arqueas* dentro de las vacuolas digestivas de los flagelados).
- ✓ Lavar los filtros dos veces con agua MiliQ (5-10 mL).
- ✓ Rotular los filtros con lapiz en el borde la cara brillante.
- ✓ Almacenar los filtros en *freezer* a -20°C ó -80°C hasta su procesamiento.

Adhesión de las células a los filtros

- ✓ Preparar agarosa 0,1% (0,05 g de agarosa de bajo punto de gelificación en 50 mL de agua MiliQ).
- ✓ Calentar la agarosa en un microondas hasta su ebullición.
- ✓ Depositar la agarosa en una caja de petri y dejar enfriar hasta aproximadamente 35-40°C.
- ✓ Sumergir los filtros de ambos lados dentro de la agarosa y ubicarlos con la cara brillante hacia arriba sobre parafilm en placas de vidrio.
- ✓ Secar los filtros en un horno de hibridación durante 10-30 minutos a 37°C.

- ✓ Una vez secos, despegarlos agregando gotas de agua MiliQ sobre los bordes de los filtros y apoyarlos sobre papel absorbente con la cara brillante hacia arriba hasta que se sequen.

Permeabilización con lisozima y acromopeptidasa

- ✓ Preparar 10 ml de solución de lisozima fresca (esta solución se utiliza una sola vez y luego se descarta)

- 1 mL de EDTA 0,5 M
 - 1 mL de Tris-HCl 1M, pH 8
 - 8 mL de agua MiliQ
 - 100 mg de lisozima

- ✓ Incubar los filtros en la solución de lisozima durante 60 minutos en horno a 37°C.

- ✓ Preparar 10 mL de solución de acromopeptidasa:

- 10 mL de buffer de achromopeptidasa:
 - 100 µL NaCl 5M
 - 500 µL Tris-HCl 1M
 - 50 mL agua MiliQ
 - ajustar el pH a 8 se puede conservar a 4°C ≈ cinco días
 - 20 µL acromopeptidasa (30000 U/ml)

- ✓ Incubar los filtros en la solución de acromopeptidasa durante 30 minutos a 37°C.

- ✓ Lavar los filtros con agua MiliQ en cajas de petri pequeñas.

- ✓ Dejar secar los filtros sobre papel absorbente.

(Después de la permeabilización los filtros pueden ser almacenados a -20°C por varias semanas)

Preparar el buffer de hibridación (BH)

- ✓ Pipetear en un tubo de 50 mL:
 - 3,6 mL NaCl 5M
 - 0,4 mL Tris-HCl 1M
- Agregar agua MiliQ y formamida deionizada dependiendo de la sonda utilizada (ver Tabla BH y Lista de sondas al final del protocolo)
- 2 mL de *blocking reagent*
- 50 µL SDS (10%)
- Agregar 2 g de *dextran sulfate*. Calentar hasta 40-60°C en horno y agitar hasta que el *dextran sulfate* se haya disuelto completamente.

Tabla BH

% Formamida	Formamida (mL)	Agua MiliQ (mL)
20%	4	10
45%	9	5
50%	10	4
55%	11	3
60%	12	2

Hibridación

- ✓ Cortar los filtros con bisturí sobre una placa de vidrio esterilizada en secciones iguales y rotularlos con lápiz negro en el borde.
- ✓ Mezclar el BH y la sonda con la HRP [50 ng µL⁻¹] a (300:1 o 100:1 dependiendo de la sonda) en un eppendorf (generalmente 900 µL de BH: 3 µL de sonda*). Poner las secciones de los filtros dentro de los tubos eppendorf (entre 10 y 12 secciones por tubo).
- ✓ Dejar hibridar en horno a 35°C durante toda la noche.

***Importante:** Nótese que las sondas correspondientes a *Betaproteobacterias*, *Gammaproteobacterias* y *Bacteroidetes*, requieren de la inclusión de un volumen de sonda igual de su correspondiente competidor.

(IMPORTANTE: No utilizar vortex en este paso porque la enzima HRP es muy sensible y puede desprenderse de la sonda).

Preparar el buffer de lavado (BL)

- ✓ Pipetear en un tubo de 50 mL:
 - 45 mL de agua MiliQ precalentada a 37°C
 - 0,5 mL EDTA 0,5M
 - 1mL Tris-HCl 1M, pH8
 - Un volumen determinado de NaCl dependiendo del % de formamida utilizado en el BH (Tabla BL)
 - Enrasar hasta 50 mL con agua MiliQ
 - 50 µL SDS (10%)
- ✓ Calentar la mezcla anterior hasta 37°C.

(Es muy importante realizar el lavado post hibridación dos grados centígrados por encima de la temperatura de hibridación).

Tabla BL

% Formamida en BH	NaCl 5M (µL en 50 mL de BL)
20%	1350
45%	160
50%	90
55%	30
60%	0

Lavado

- ✓ Lavar las secciones de los filtros durante 15 minutos en 50 mL de BL precalentado a 37°C en horno a esa misma temperatura.
- ✓ Remover las secciones de los filtros del BL y colocarlos en cajas de petri con PBS (1X) durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Deposición catalizada (amplificación)

- ✓ Preparar el buffer de amplificación (BA) en un tubo de 50 mL:

2 mL PBS (20X)

0,4 mL *blocking reagent*

16 mL NaCl (5M)

Enrasar hasta 40 mL con agua MiliQ.

Agregar 4 g de *dextran sulfate*.

Calentar (entre 40 a 60°C) y mezclar hasta que el *dextran sulfate* se haya disuelto completamente.

(El BA puede ser almacenado en alícuotas de 1 ml a 4°C por varias semanas).

- ✓ Preparar stock de H₂O₂ fresco:

200 µL PBS (1X)

1 µL H₂O₂ (30%)*

Mezclar con vortex

*Importante: el H₂O₂ debe ser de buena calidad y debe prepararse en cada ocasión.

- ✓ Preparar tiramida marcada Alexa 448:

Resuspender o reconstituir la tiramida con 20 µL de N-N dimetil formamida conteniendo IPBA (20 mg de IPBA (ácido p-iodofenilborónico)

1 mL de N-N diemetil formamida).

- ✓ Mezclar en un tubo eppendorf :

1 mL de BA

10 µL del stock de H₂O₂ fresco

4 µL de tiramida marcada Alexa 448.

- ✓ Colocar las secciones de los filtros en la mezcla anterior e incubarlos durante 15 minutos en oscuridad en horno a 46°C.

- ✓ Remover los filtros de la solución y quitar el exceso de líquido sobre un papel absorbente. Lavar los filtros en PBS (1X) en una caja de petri a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos.
- ✓ Lavar los filtros con abundante agua MiliQ en un colador de porcelana durante aproximadamente 5 minutos. Posteriormente dejar los filtros en cajas de petri con agua MiliQ durante 5 minutos a oscuridad.
- ✓ Colocar los filtros sobre papel absorbente y dejarlos secar en oscuridad.

(Si no se realizará de inmediato el recuento de estos filtros hibridados, es mejor almacenarlos sin montar sobre portaobjetos, bien rotulados y en oscuridad. Los filtros en tales condiciones pueden conservarse durante meses en *freezer* a -20 o -80°C)

- ✓ Al momento de cuantificar las muestras, montar los filtros entre porta y cubreobjetos utilizando Vectashield (con DAPI) y guardar los preparados a -20°C.

Tabla B: Lista de sondas

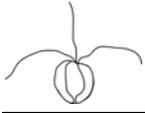
Sonda (fuente)	Secuencia (5' 3')	Presencia HPR	% Formamida	Volumen sonda (µL)	Organismo blanco
Eury806 (Teira et al. 2004)	CACAGCGTTTACACCTAG	si	20	3	Euryarchaeota
Cren554 (Massana et al. 1997)	TTAGGCCCAATAATCMTCT	si	20	3	Crenarchaeota
Eub338 (Amann et al. 1990)*	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	si	55	9	Mayoría de Bacteria
Eub338(II) (Daims et al. 1999)*	GCAGCCACCCGTAGGTGT	si	55	3	Plantomycetes
Eub338(III) (Daims et al. 1999)*	GCTGCCACCCGTAGGTGT	si	55	3	Verrucomicrobia
Alf968 (Neef 1997)	GGTAAGTTCTGCGCGTT	si	45	9	Alphaproteobacteria
Gam42a (Manz et al. 1992)	GCCTTCCCACATCGTTT	si	55	3	Gammaproteobacteria
Bet42a (Manz et al. 1992)	GCCTTCCCCTTCGTTT	si	55	3	Betaproteobacteria
CF319a (Manz et al. 1996)	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	si	55	3	Bacteroidetes
HGC69a (Amann et al. 1995)	TATAGTTACCACCGCCGT	si	30	3	Actinobacteria
Competidor Gam42a ¹	GCCTTCCCCTTCGTTT	no	55	3	Betaproteobacteria
Competidor Bet42a ²	GCCTTCCCACATCGTTT	no	55	3	Gammaproteobacteria
Competidor HGC69a ³	TATAGTTACGGCCGCGT	no	30	3	Actinobacteria

¹ Competidor Gam42a (Manz et al. 1992) corresponde a la sonda Bet42a sin la HPR.

² Competidor Bet42a (Manz et al. 1992) corresponde a la sonda Gam42a sin la HPR.

³ Competidor HGC69a (Amann et al. 1995) sin la HPR.

*Se utilizan las tres sondas en una misma hibridación para detectar todas las Bacteria.



TRABAJO DE RESPALDO



J. Plankton Res. (2013) 35(1): 201–212. First published online November 29, 2012 doi:10.1093/plankt/fbs085

In situ prey selection of mixotrophic and heterotrophic flagellates in Antarctic oligotrophic lakes: an analysis of the digestive vacuole content

MARINA GERE^{1,2*}, CLAUDIA QUEIMALIÑOS^{1,2}, M. ROMINA SCHIAFFINO^{2,3}, IRINA IZAGUIRRE^{2,3}, IRENE FORN⁴, RAMON MASSANA⁴ AND FERNANDO UNREIN^{2,5}

¹LABORATORIO DE FOTOBIOLOGÍA, INIBIOMA (INSTITUTO INVESTIGACIONES EN BIODIVERSIDAD Y MEDIO AMBIENTE), UNCOMAHUE-CONICET, QUINTRAL 1250, BARILOCHE R8400FRE ARGENTINA, ²CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TÉCNICA (CONICET), BUENOS AIRES, ARGENTINA, ³DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA, GENÉTICA Y EVOLUCIÓN, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES, UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES, PABELLÓN II, CIUDAD UNIVERSITARIA, BUENOS AIRES C1428EHA, ARGENTINA, ⁴DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MARINA Y OCEANOGRAFÍA, INSTITUT DE CIÈNCIES DEL MAR, CSIC, BARCELONA 08003, ESPAÑA AND ⁵LABORATORIO DE ECOLOGÍA Y FOTOBIOLOGÍA ACUÁTICA, IIB-INTECH (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS - INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHASCOMÚS), CAMINO CIRCUNVALACIÓN LAGUNA KM 6, CC 164, CHASCOMÚS 7130, ARGENTINA

*CORRESPONDING AUTHOR: geream@comahue-conicet.gob.ar

Received June 7, 2012; accepted November 3, 2012

Corresponding editor: John Dolan

We investigated the selective predation of mixotrophic and heterotrophic flagellates (MF and HF) on different heterotrophic prokaryote phylotypes (HPP; *Bacteria* + *Archaea*) living in natural assemblages from oligotrophic Antarctic lakes. *In situ* prey preference was analyzed for the first time on different mixotrophic taxa (*Pseudopedinella* sp., *Ochromonas*-like cells, Chrysophyceae >5 µm). The relative abundances of seven different HPP hybridized by CARD-FISH (catalyzed reporter deposition-fluorescent *in situ* hybridization) in natural community were compared with the proportions of hybridized cells inside digestive vacuoles. Our results showed some general trends to selectivity over some HPP. *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* were the most abundant groups, and strikingly, a negative selection trend was detected in most samples by all bacterivorous protists. In contrast, for *Actinobacteria* a positive selection trend was observed in most samples, whereas *Bacteroidetes* seemed to be randomly preyed upon. Interestingly, similar prey preferences were observed in all bacterivorous flagellates. Our results suggest that

phylogenetic affiliation determines part of the process of prey selection by protists in these lakes. Nevertheless, other features, such as cell size, morphology and the presence of the S-layer, might also significantly contribute to prey selectivity on the HPP.

KEYWORDS: mixotrophic flagellates; heterotrophic flagellates; prey selection; CARD-FISH; oligotrophic lakes

INTRODUCTION

Planktonic protists [mixotrophic and heterotrophic flagellates (MF and HF) and ciliates] are considered the main bacterivorous organisms in aquatic ecosystems (Azam *et al.*, 1983; Jürgens and Matz, 2002; Pernthaler, 2005). Besides controlling bacterial abundances in a wide range of ecosystem conditions, they also channel organic carbon to higher trophic levels and release inorganic nutrients that often limit primary production (Pernthaler, 2005; Jürgens and Massana, 2008). Selective feeding of bacterivorous protists is recognized as an important mechanism for the structuring of planktonic food webs (Strom and Loukos, 1998). Size-structured predator–prey interactions are of particular importance (Lampert, 1987), and bacterial cell size must be considered a major feature that influences susceptibility towards different grazers (Corte, 1962; Güde, 1989). Different protists might have different prey preferences, being adapted to consume a specific part of the bacterial assemblage. Thus, each predator may exert specific and a highly complex top-down pressure shaping the bacterial community composition and diversity (Jardillier *et al.*, 2004; Šimek *et al.*, 2005; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2005). Food selection by HF mostly depends on prey size and morphology (Pernthaler *et al.*, 1997; Šimek *et al.*, 1997). However, prey features other than size and shape, such as motility, digestibility, cell surface, physiological state, and food quality (as determined by the C:N:P ratio) can also mediate selective grazing (González *et al.*, 1990a; Boenigk *et al.*, 2001a, b; Matz *et al.*, 2002; Jezbera *et al.*, 2005, 2006; Matz and Jürgens, 2005; Shannon *et al.*, 2007; Massana *et al.*, 2009; Jousset, 2012).

Despite the fact that HF were formerly considered the main bacterivores in aquatic systems, several studies support the idea that MF, which combine phototrophy and phagotrophy, can be as important grazers as HF, especially in oligotrophic systems (Havskum and Riemann, 1996; Safi and Hall, 1999; Unrein *et al.*, 2007; Zubkov and Tarran, 2008). Mixotrophy is a nutritional strategy widely distributed among phytoplankton; it presents an advantage over strictly autotrophic and

phagotrophic organisms when resources (e.g. nutrients) are scarce (Nygaard and Tobiesen, 1993; Marshall and Laybourn-Parry, 2002). Prey selection by mixotrophs has been poorly studied, only culture experiments have been performed on prey-size preference for some Chrysophyceae (Posch *et al.*, 1999; Boenigk *et al.*, 2001a, b; Šimek *et al.*, 2005).

In the last years, a modification of a molecular technique was developed to identify different bacterial phylotypes with a better resolution. The catalyzed reporter deposition-fluorescent *in situ* hybridization (CARD-FISH) protocol (Pernthaler *et al.*, 2002) was recently used to identify bacteria inside digestive vacuoles of certain bacterivorous protists (Jezbera *et al.*, 2005, 2006; Medina-Sánchez *et al.*, 2005; Modenutti *et al.*, 2008; Massana *et al.*, 2009). In particular, recent studies have analyzed the *in situ* prey selection of HF considered as a unique entity (Jezbera *et al.*, 2005, 2006), by comparing the relative abundances of specific prey phylotypes *in situ* and within food vacuoles. The power of this approach is that no incubations are needed. In relation to MF, it is worth noting that Medina-Sánchez *et al.* (Medina-Sánchez *et al.*, 2005) showed that the CARD-FISH technique enabled the identification of bacteria inside the digestive vacuoles without losing the autofluorescence of algal chloroplasts, although they did not perform a detailed study on prey preference of MF. Remarkably, the prey selectivity of MF has not been determined, until now.

In this investigation, we evaluated for the first time the prey preference of different taxa within the natural mixotrophic assemblage. The *in situ* prey selectivity on different prokaryote phylotypes (*Bacteria* and *Archaea*) was analyzed for MF and also HF in oligotrophic Antarctic lakes dominated by mixotrophic organisms (Allende and Izaguirre, 2003; Izaguirre *et al.*, 2003; Unrein *et al.*, 2005). We applied the CARD-FISH technique in order to estimate the relative proportions of seven different heterotrophic prokaryote phylotypes (HPP) in the natural community compared with their proportions inside protistan digestive vacuoles.

METHOD

Study site

Four lakes were sampled in Hope Bay: Esperanza, Flora, Encantado and Chico. Hope Bay is situated at the northern end of the Antarctic Peninsula (63°24'S, 57°00' W), where most of the lakes are of glacial origin. During summer, lakes are ice-free or covered by a thin ice layer ranging between 1 and 35 cm. Esperanza, Flora and Encantado are situated in the Five Lakes Valley, and are connected by a small stream; Chico is located on the Mount Flora shelf. Morphometric and physicochemical features of these Antarctic lakes have been previously described (Izaguirre *et al.*, 1998; Unrein *et al.*, 2005; Schiaffino *et al.*, 2009). All these lakes are oligotrophic ($<1 \mu\text{g}$ chlorophyll *a* L^{-1}) and shallow (maximum depth between 1 and 7 m), and share a roughly similar phytoplankton composition dominated by mixotrophic chrysophytes (Izaguirre *et al.*, 1998, 2003; Allende and Izaguirre, 2003; Unrein *et al.*, 2005).

Sample collection

Samples of Antarctic lakes were collected during the austral summer period, between January and March 2004 on two different dates. Samples were collected in acid-washed plastic bottles pre-rinsed with lake water from a single site near the shore of the lake, beneath the surface during the ice-free periods, or immediately below the ice layer when the lakes were frozen. Physical–chemical parameters measured on these dates have already been published by Schiaffino *et al.* (Schiaffino *et al.*, 2009).

Heterotrophic prokaryote and flagellate abundance

Samples for heterotrophic prokaryotes (*Bacteria* + *Archaea*) and flagellates were fixed with ice-cold filtered 10% glutaraldehyde (final concentration 1%). For heterotrophic prokaryote enumeration, between 2 and 5 mL of fixed sample were stained with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (final concentration) of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) according to Porter and Feig (Porter and Feig, 1980), and then filtered through a 0.22- μm black polycarbonate membrane filters (Millipore). Samples for flagellate enumeration were processed in a similar way, except that the filtered volume was 10 or 20 mL and the filters had a 0.8- μm pore size. All filters were mounted on a microscope slide with a drop of immersion oil for fluorescence microscopy (Immersol 518 F) and stored at -20°C . Samples were inspected at $\times 1000$ magnification using an epifluorescence

microscope (Olympus BX50, Japan) equipped with an HBO 50W lamp, and a filter set for blue light excitation (BP 420–480 nm, BA 515 nm), green light excitation (BP 480–550 nm, BA 590 nm) and UV excitation (BP 330–385 nm, BA 420 nm). Flagellates smaller than 10 μm were first detected by UV excitation, and then inspected by blue light excitation in order to identify the presence or absence of chloroplast autofluorescence (phototrophic and heterotrophic flagellates, respectively). Coccoid picoeukaryotic chlorophytes ($<2 \mu\text{m}$ and without flagellae) were frequently observed in our samples, though they were not considered in the present study. The phytoplankton cells $>10 \mu\text{m}$ and ciliates were counted following the Utermöhl technique, for which additional water samples were fixed with acid Lugol's solution and were counted under an inverted microscope (Olympus CKX41, Japan) using 50-mL Utermöhl chambers. Phytoplankton and ciliates were enumerated by scanning the entire chamber surface at $\times 400$.

Identification of heterotrophic prokaryote phylotypes in the plankton

The term HPP includes *Bacteria* and *Archaea*, making reference to all the microorganisms which are neither autotrophic nor eukaryotic cells. HPP were identified by applying the CARD-FISH technique. Water samples were fixed with formaldehyde (2% final concentration), and aliquots between 2 and 10 mL were filtered through 0.22- μm pore size (47 mm diameter) white polycarbonate filters (for prokaryotes in the plankton), dried and kept frozen until processed. Samples for identification of the HPP inside the flagellate's digestive vacuoles were processed in a similar way, except for the sample volume (10 and 20 mL) and the pore size filter (0.8 μm). Sections of filters were hybridized according to Pernthaler *et al.* (Pernthaler *et al.*, 2002) and Sekar *et al.* (Sekar *et al.*, 2003) using the following oligonucleotide probes: EUB338-II-III, to target most *Bacteria* including *Verrucomicrobia* and *Planctomycetes* (Amann *et al.*, 1990; Daims *et al.*, 1999); ALF968, specific for *Alpha-proteobacteria* (Neef, 1997); BET42a, specific for *Betaproteobacteria* (Medina-Sánchez *et al.*, 2005); GAM42a, to target *Gamma-proteobacteria* (Manz *et al.*, 1992); CF319a, to target the *Bacteroidetes* (Manz *et al.*, 1996); HGC69a, specific for *Actinobacteria* (Amann *et al.*, 1990); CREN554, to target *Crenarchaeota* (Massana *et al.*, 1997a) and EURY806, specific for *Euryarchaeota* (Teira *et al.*, 2004). Probes were supplied by Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, USA) with an aminolink (C6) at the 5' end, bound with a horseradish peroxidase enzyme (Urdea *et al.*, 1988). After hybridization, the signal was amplified with Alexa 488-labeled tyramide and

counter-stained with DAPI. Filter pieces were mounted on a slide with Vectashield with DAPI and observed by epifluorescence microscopy (Olympus BX50, Japan) under blue and UV light excitation.

Average cell size of the prokaryotes targeted by specific oligonucleotide probes was measured on each sample using Image Pro Plus, following the image analysis protocol proposed by Massana *et al.* (Massana *et al.*, 1997b). Dimensions of cells were overestimated because they were measured from the specific probe signal. Previously, we performed comparisons between bacterial size determinations obtained from DAPI and CARD-FISH signals in the study lakes, and no significant differences were found in the enlargement of cells among all probes (data not shown). Despite this, in the present investigation, bacterial dimensions were determined from CARD-FISH, and size values are comparable with other studies that analyzed bacterial dimension in a similar way (e.g. Jezbera *et al.*, 2005, 2006). Cells longer than 3 μm were assumed to be protected against grazing by most bacterivorous protists (Hahn and Höfle, 2001; Pernthaler, 2005; Šimek *et al.*, 2005).

Enumeration of HPP inside flagellate digestive vacuoles

We identified three different MF: *Pseudopedinella* sp., Chrysophyceae <5 μm (*Ochromonas*-like cells), and Chrysophyceae >5 μm . The identification of these flagellates was achieved based on previous studies (Izaguirre *et al.*, 1998, 2003; Allende and Izaguirre, 2003; Unrein *et al.*, 2005). The HF were considered as a single group. Seventy-five cells of each flagellate type were inspected for evaluating the presence of each HPP directly in the digestive vacuoles on each sample.

To determine the preference of each bacterivorous flagellate for a given HPP, we compared the percentage of each of the seven HPP inside digestive vacuoles in relation to their percentage in the plankton. In previous studies, these percentages were calculated with respect to the abundance of EUB338 targeted cells (Šimek *et al.*, 1997; Jezbera *et al.*, 2005, 2006). However, in the present investigation we found that the EUB338-II-III probe also hybridized the chloroplasts of MF, making it impossible to identify ingested *Bacteria* in food vacuoles of these organisms. To solve this drawback, we referred the estimations to the sum of all the identified HPP. In this sense, we defined total identified prokaryotes (TIP) as the sum of the following seven HPP, five of *Bacteria* (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*) and two of *Archaea* (*Crenarchaeota* and *Euryarchaeota*). TIP in plankton samples represented on average 80.2% (between 65.2 and 95.2%) of the

total heterotrophic prokaryotes detected by DAPI. To validate this assumption, in the case of HF we calculated all the parameters using TIP and EUB338-II-III targeted cells values, and compared the obtained results.

Selectivity index

For assessing prey selection, we applied the Chesson selectivity index (α) (Chesson, 1978, 1983):

$$\alpha_i = \frac{(r_i/n_i)}{\sum_{i=1}^m (r_i/n_i)},$$

where i is the number of items of food type i in the consumer's diet, which can vary between 1 and m . The r_i and n_i are the percentage of food type " i " in the diet and the environment, respectively (expressed as percentage of TIP). This index varies between 0 and 1; values of $1/m$ represent random feeding, $<1/m$ indicate negative selection, $>1/m$ indicate positive selection. This index was calculated in all the cases when HPP was above 4% of the TIP. As the number of prey types varies as a function of the abundance percentage, and the limit for the selection should be different in each case, we calculated the parameter ε (Chesson, 1983), which becomes independent of m . The α values were transformed in ε values as follows:

$$\varepsilon_i = \frac{(m\alpha_i - 1)}{(m - 2)\alpha_i + 1}.$$

This parameter varies between -1 and 1 ; $\varepsilon = 0$ implies random selection, negative values represent negative selection, whereas positive values represent positive selection.

Statistical analysis

Pearson correlation indexes were calculated relating the α value of Chesson selectivity index among all bacterivorous flagellates, and between the Selectivity indexes calculated for HF in relation to TIP and EUB338-II-III-targeted cells. A linear regression was used to compare the relation between the EUB338-II-III-targeted cells and the TIP abundances in all samples.

RESULTS

Characterization of the heterotrophic prokaryote assemblage

HPP abundance ranged from 0.9×10^5 to 6.8×10^5 cells mL^{-1} (Fig. 1a). *Alphaproteobacteria* (ALF968

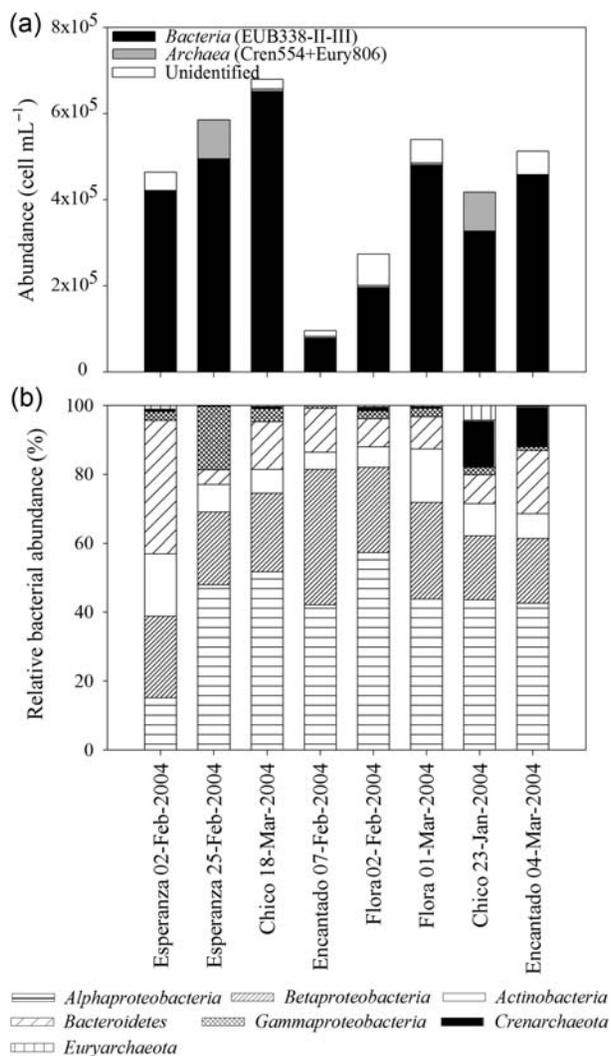


Fig. 1. (a) Abundance of heterotrophic prokaryotes. Unidentified heterotrophic prokaryote cells were estimated from the difference between DAPI counts and the sum of *Bacteria* plus *Archaea*. (b) Relative abundance of the seven heterotrophic prokaryote phylotypes (HPP) related to total identified prokaryotes (TIP) (see text for further explanations); samples are ordered by increasing Chl *a* concentration.

probe) and *Betaproteobacteria* (BET42a probe) were the most abundant groups, and together accounted for >60% of TIP (Fig. 1b). In particular, *Alphaproteobacteria* presented values >40% in most systems. The abundance of bacteria targeted by *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Gammaproteobacteria* probes averaged 15, 10, 4% of TIP, respectively. The *Archaea* abundance was low in all samples (<1%) except in two lakes where their relative abundance reached 11% (Fig. 1b).

HPP cell size was measured for the four most abundant groups (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*) in the samples where they represented >4% of the TIP. The largest cell

biovolumes and lengths were registered for *Betaproteobacteria*, followed by *Alphaproteobacteria*, whereas *Actinobacteria* were always the smallest (Table I). In addition, cells >3 μm of both phylotypes were recurrently observed in all samples (Fig. 2). The relative contribution of cells >3 μm to the total biovolume ranged from 11 to 66% (mean, $32 \pm 18\%$) and 2–57% (mean, $25 \pm 18\%$) in *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*, respectively. In the other two groups, the percentages averaged 15% in the case of *Bacteroidetes* and 10% in the case of *Actinobacteria*. *Bacteroidetes* had slightly lower cell size, and it was represented by typically rod-shaped cells.

Protistan community assemblage

In all cases the protist community was numerically dominated by bacterivorous flagellates. A few truly autotrophic species of Chlorophyceae (mostly *Chlamydomonas*-like species) were registered always in very low abundances (<5%). All lakes were dominated by MF, except one particular date for Flora (02 February 2004) when HF prevailed; Ciliate abundance was very low (<10 ind L^{-1}) in all cases, and for this reason we considered that their contribution was negligible (Fig. 3). In all lakes, MF were dominated by Chrysophyceae (Fig. 3), which were categorized in two size classes: <5 μm (*Ochromonas*-like cells) and >5 μm . Although most *Ochromonas*-like cells were morphologically similar (round shaped and $\sim 3\text{--}4 \mu\text{m}$ in diameter), larger Chrysophyceae (>5 μm) were represented by a heterogeneous group of cells with different morphologies. *Pseudopedinella* sp. (Dictyochophyceae) was present in five out of eight samples, although almost always in low abundances. Cells were radially symmetrical, with three to six peripheral chloroplasts, and $\sim 7 \mu\text{m}$ in diameter in all lakes.

Selectivity index

The Chesson index was calculated for all bacterivorous flagellates, both the MF taxa (*Ochromonas*-like cells; Chrysophyceae >5 μm ; *Pseudopedinella* sp.) and the whole HF assemblage. The number of ingested prey found inside digestive vacuoles in each bacterivorous flagellate usually varied between one and three cells, although most flagellates had only one cell inside the digestive vacuoles. The real number of each HPP found inside digestive vacuoles of each flagellate are detailed in the Supplementary data, Table SA.

The results of the Chesson index calculated for HF with the percentage of HPP in relation to the EUB338-II-III-targeted cells were similar to those

Table 1: Cell volume (μm^3) of different heterotrophic prokaryotes phylotypes (HPP) targeted by oligonucleotide probes in all studied lakes

	Esperanza 2 February 2004	Esperanza 25 February 2004	Chico 18 March 2004	Encantado 7 February 2004	Flora 2 February 2004	Flora 1 March 2004	Chico 23 January 2004	Encantado 4 March 2004
Alpha								
<i>n</i>	305	709	478		481	649	662	1242
Mean	1.450	0.686	1.291	ND	0.479	0.680	1.104	0.989
SD	4.706	1.763	2.575		0.676	0.907	2.458	1.243
Median	0.298	0.237	0.456		0.244	0.344	0.372	0.638
Beta								
<i>n</i>	297	243	240	455	167	209	189	433
Mean	1.393	0.833	1.348	2.433	0.409	0.562	0.616	0.855
SD	2.154	1.145	1.944	2.644	0.367	0.558	0.769	0.837
Median	0.585	0.528	0.749	1.665	0.316	0.391	0.358	0.584
Actino								
<i>n</i>	119	168	145		44	288	522	128
Mean	0.174	0.167	0.515	ND	0.121	0.401	0.140	0.239
SD	0.518	0.371	0.838		0.133	0.569	0.863	0.275
Median	0.060	0.055	0.136		0.086	0.196	0.019	0.137
Bacteroi								
<i>n</i>	104	107		190	86	125	295	380
Mean	0.347	0.941	ND	0.838	0.272	0.847	0.743	0.847
SD	0.532	1.467		0.588	0.275	1.283	0.955	0.950
Median	0.235	0.510		0.676	0.186	0.400	0.317	0.373

Alpha, *Alphaproteobacteria*; Beta, *Betaproteobacteria*; Actino, *Actinobacteria*; Bacteroi, *Bacteroidetes*; ND, not determined. The samples are ordered by increasing Chl *a* concentration.

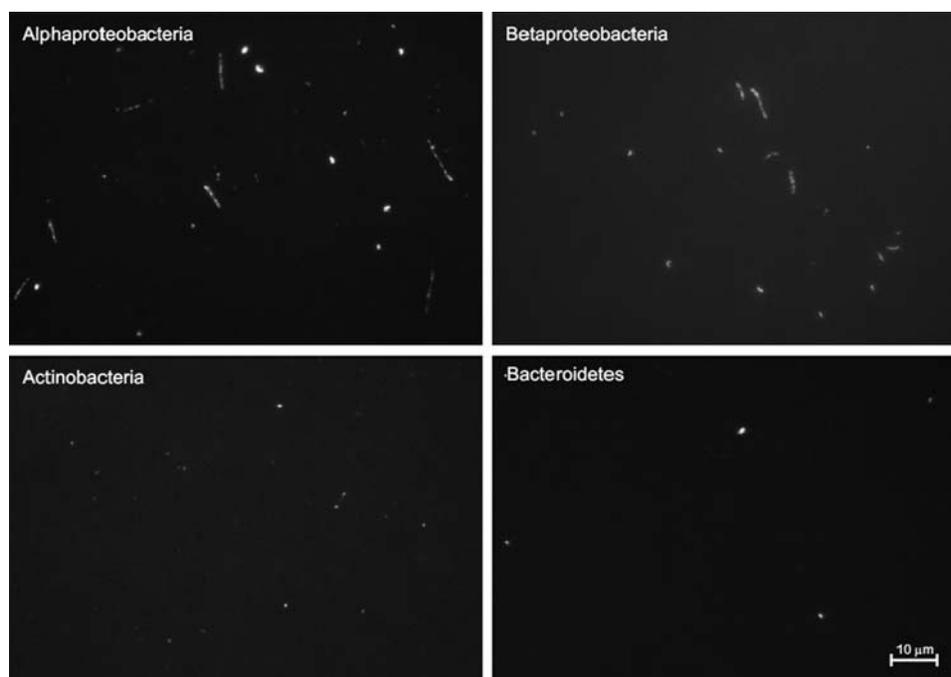


Fig. 2. Epifluorescence micrographs of CARD-FISH hybridized cells of the most abundant heterotrophic prokaryote phylotypes (HPP) observed under blue-light excitation. Scale bar is 10 μm and applies to all pictures.

calculated based on TIP abundance, and both estimations were significantly correlated (Supplementary data, Fig. SA). The significant linear regression analysis between the TIP and the EUB338-II-III-targeted cells

abundances in all studied lakes ($R^2 = 0.937$; $P < 0.001$; $F = 89.773$), supported our assumption that TIP are a good proxy of the EUB338-II-III-targeted cells in these samples.

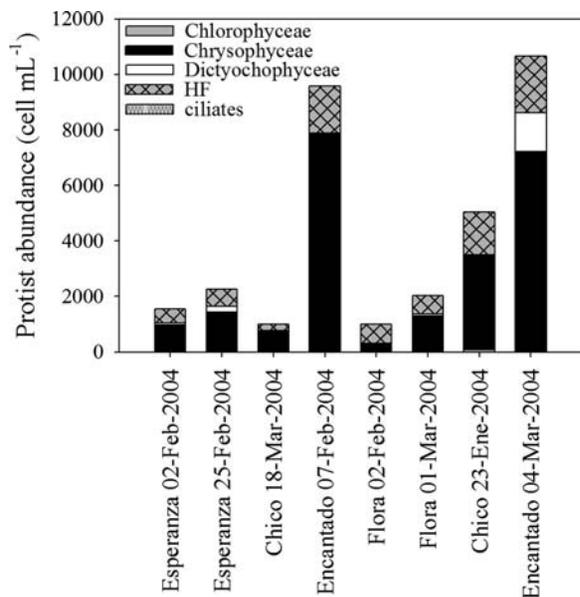


Fig. 3. Abundance of autotrophic (Chlorophyceae), mixotrophic (Chrysophyceae, Dictyochophyceae), heterotrophic flagellates (HF) and ciliates at each sampling site. The samples are ordered by increasing Chl *a* concentration.

A negative trend of selection was observed by all MF and HF in relation to the *Betaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* group (Fig. 4). In contrast, *Actinobacteria* were, in general, positively selected by HF and *Pseudopedinella* sp., whereas *Ochromonas*-like cells and Chrysophyceae $>5 \mu\text{m}$ did not show a clear preference. For *Bacteroidetes* no clear trend was observed in any of the bacterivorous flagellates analyzed (Fig. 4). On the other hand, the two index values calculated for the *Archaea* group suggested a negative selection by all predators (data not shown). Overall, we found that all flagellates generally showed a very similar feeding preference with respect to the majority of HPP (Fig. 4). This finding was further supported by the significant correlations obtained when comparing the Chesson selectivity index values between each pair of flagellate taxa (Table II).

DISCUSSION

The HPP assemblage was generally dominated by *Alphaproteobacteria*. Although this dominance has already been reported in other lakes around the world (Kirchman *et al.*, 2004; Nishimura and Nagata, 2007; Salcher *et al.*, 2011), the general assumption is that *Alphaproteobacteria* dominates marine waters, whereas freshwater environments are dominated by *Betaproteobacteria* (Glöckner *et al.*, 1999) and, to a lesser extent, by

Actinobacteria, *Cytophaga* and *Verrucomicrobia* (Glöckner *et al.*, 1999; Urbach *et al.*, 2001; Warnecke *et al.*, 2005). It has been observed that a high water residence time (Lindström *et al.*, 2005) and a high grazing pressure (Pernthaler *et al.*, 1997; Salcher *et al.*, 2005) seems to increase the abundance of *Alphaproteobacteria* in freshwater environments. In this sense, a recent study comparing the bacterial community composition in 45 lakes located in Antarctica and the southernmost region of South America revealed that 78% of the surveyed lakes are dominated by the *Alphaproteobacteria* group (Schiaffino, 2011).

The CARD-FISH technique was successfully applied in this study allowing us to evaluate the predation of MF and HF on different HPP in natural environments. As a methodological comment, we note that these good results were obtained when analyzing the cells fixed with 2% formaldehyde. However, in previous investigations we have used paraformaldehyde (1%) as fixative, as suggested by Medina-Sánchez *et al.* (Medina-Sánchez *et al.*, 2005), and we observed that this caused a systematic deformation of the mixotrophic algal cells present in our samples. So, we discourage the application of paraformaldehyde in studies that assess prey selectivity of mixotrophic algae.

In relation to the selectivity behavior, our results showed general trends of selectivity over different HPP, although we did not find a general pattern applicable in all systems. In the case of *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria*, the two more abundant bacterial groups, a negative selection trend (73 and 67% of the cases, respectively) was generally observed in all grazers. These groups had longer cells than other HPP, including filaments ($>3 \mu\text{m}$), which have been previously described as grazing-resistant morphologies (Jürgens *et al.*, 1999; Jürgens and Matz, 2002; Pernthaler, 2005; Salcher *et al.*, 2005). However, the presence of these resistant morphotypes could only partially explain the negative selection trend observed, since they were present in relatively low abundance. It is well known that other factors such as food quality could influence the prey selectivity over the HPP (Boenigk *et al.*, 2001a; Shannon *et al.*, 2007), although further studies are necessary to analyze the food quality of HPP in these environments. On the contrary, in the case of *Bacteroidetes* there was a similar number of cases with positive and negative selection in all the flagellates (11 samples with positive selection and 13 samples with negatives values). This lack of pattern lead us to propose a randomly selectivity behavior.

In relation to *Actinobacteria*, our results show a positive selection trend by *Pseudopedinella* sp. (four samples positive and one negative) and HF (six samples positive and

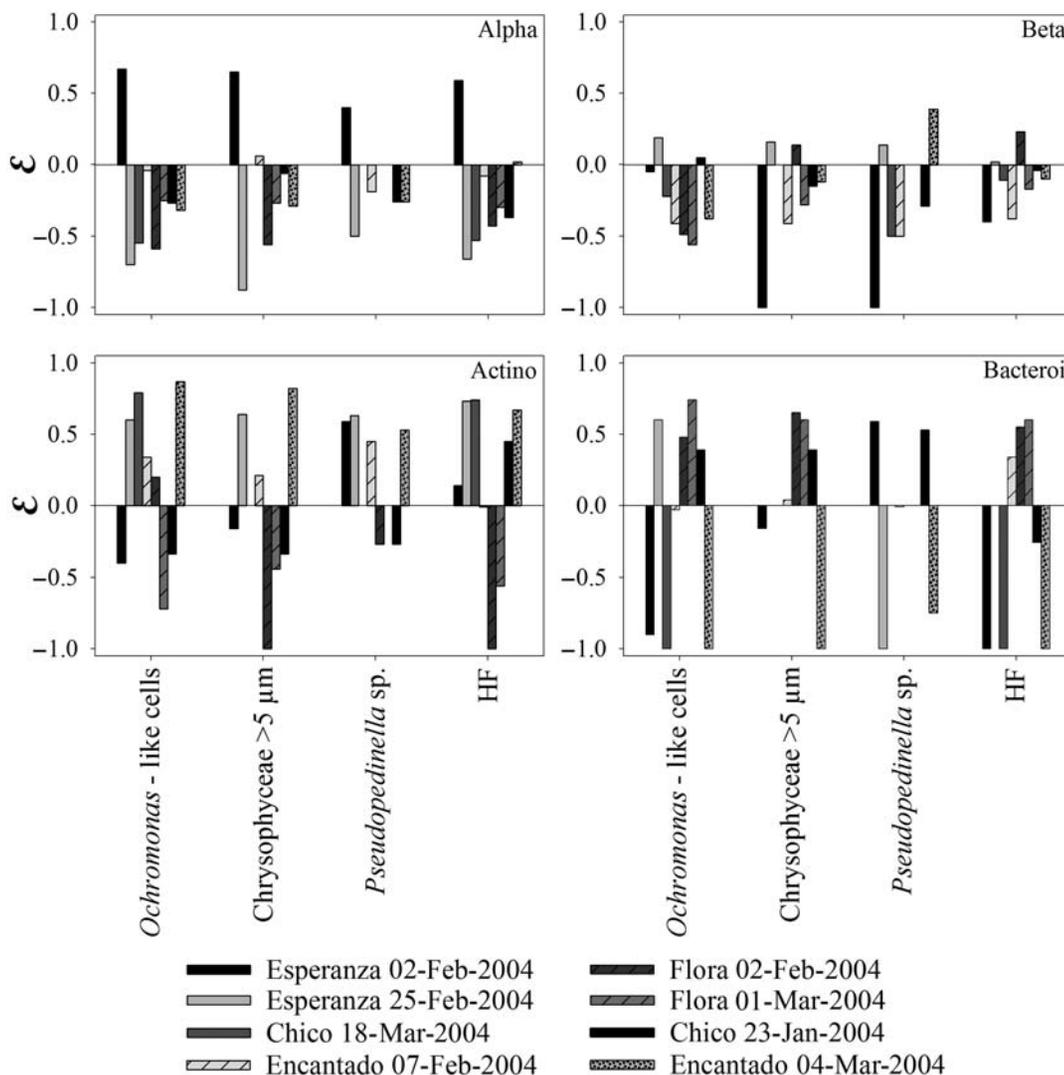


Fig. 4. Chesson selectivity index (ϵ) of each protist for the most abundant heterotrophic prokaryote phylotypes (HPP). Alpha, *Alphaproteobacteria* group (ALF968); Beta, *Betaproteobacteria* group (BET42a); Actino, *Actinobacteria* group (HGC69a); Bacteroi, *Bacteroidetes* group (CF319a); HF, heterotrophic flagellates. The samples are ordered by increasing Chl *a* concentration.

Table II: Pearson correlation values among selectivity indexes of all bacterivorous flagellates

	Chrysophyceae >5 μm	<i>Pseudopedinella</i> sp.	HF
<i>Ochromonas</i> -like cells	0.878* (n = 29)	0.718* (n = 21)	0.817* (n = 33)
Chrysophyceae >5 μm		0.782* (n = 21)	0.845* (n = 29)
<i>Pseudopedinella</i> sp.			0.703* (n = 21)

* $P < 0.001$.

two negative). These results do not agree with previous investigations which have shown that *Actinobacteria* are avoided by predators (Hahn *et al.*, 2003; Jezbera *et al.*,

2005; Šimek *et al.*, 2005). It was suggested that the small cell size and the thick cell wall of these bacteria conferred resistance against protistan grazing (Warnecke *et al.*, 2004). Nevertheless, this is not the first study that has shown grazing over *Actinobacteria*. Pernthaler *et al.* (Pernthaler *et al.*, 2001) observed the size-selective grazer *Ochromonas* (*Poteroiochromonas*) sp. grazing upon the *Actinobacteria* (acI) lineage and other freshwater lake lineages. Other authors have also noted a decrease in the abundance of the *Actinobacteria* during periods of enhanced grazing pressure (Newton *et al.*, 2006). Experimentally, an increase of the number of *Poteroiochromonas* cells has been observed in the presence of *Actinobacteria* cells, probably associated with the availability of essential lipids in these prey (Tarao *et al.*, 2009).

Besides, the existence of *Actinobacteria* cells with a thin cell wall has recently been demonstrated (Hahn *et al.*, 2003), contrary to what was known. Further, it is important to note that our results relate to *in situ* samples, and that the *Actinobacteria* strains of the study lakes are included in the size range of edible prey by flagellates. Moreover, the relatively high number of *Actinobacteria* cells observed inside digestive vacuoles could also be related to a high digestion time. Recently, the existence of a surface protein layer (S-layer) was described associated to the cell wall, present in several species including some strains of *Actinobacteria* (Tarao *et al.*, 2009). It has been suggested that the S-layer of *Actinobacteria* impairs digestion by flagellates (Jousset *et al.*, 2012). Considering such evidence, we analyzed all the available information about the digestion times (half-life of prey inside flagellate) of different predators, in relation to the presence or absence of the S-layer in each prey (Table III, and references therein). The estimated half-time of prey inside digestive vacuoles was three times greater when the S-layer was present in the prey. This supports the idea that the S-layer effectively increases digestion times. Summarizing, our results show that *Actinobacteria* were grazed by flagellates in these Antarctic lakes, and the positive selection by the flagellates could be explained by a higher digestion time, probably due to the presence of the S-layer in these prey.

Despite these general trends, HPP were not always positively or negatively selected by a given protist. This suggests that phylogenetic affiliation determines part of the process of prey selection by protists. Even though cell size and morphology, that are sometimes linked to phylogenetic affiliation (e.g. *Betaproteobacteria* usually form inedible filaments under high grazing pressure or *Actinobacteria* reduce cell size to escape from grazing; Jürgens and Matz, 2002), partially explained the observed patterns. Other features (chemical, behavioral, physiological, etc.) might also significantly contribute to the prey selectivity over the HPP (Boenigk *et al.*, 2001a; Shannon *et al.*, 2007; Jousset, 2012).

Interestingly, the four groups of protists had a very similar trend in the selectivity for each HPP (Fig. 4 and Table II). This result was unexpected since, due to the heterogeneity of sizes, nutritional strategies (i.e. mixotrophs and heterotrophs) and taxonomic affiliation among predators, we expected to find different selectivity behaviors among the flagellates assessed. Accordingly, experimental studies have illustrated different prey preferences by different protistan grazers, which were mostly related to predator–prey size relationship (e.g. Andersson *et al.*, 1986; Jürgens and Matz, 2002; Massana *et al.*, 2009). The similarity of *in situ* prey preference observed in our study for the four group of

flagellates, suggests the existence of some features of HPP cells (e.g. cell size, morphology, presence of the S-layer, etc.) that interacts with the different bacterivores in the same way.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data can be found online at <http://plankt.oxfordjournals.org>.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank three anonymous reviewers for their comments that improved the manuscript.

FUNDING

This study was financed by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CSIC-CONICET) (Spain-Argentina) Project PROBA (2007 AR0018, CSIC), the Spanish Project MIXANTAR (REN 2002-11396-E/ANT) and the Argentinean projects CONICET-PIP 01301, FONCYT PICT 32732 and UNComahue 04/B166. Marina Gereá and M. Romina Schiaffino were supported by CONICET fellowships. Irina Izaguirre, Claudia Queimaliños and Fernando Unrein are CONICET researchers.

REFERENCES

- Allende, L. and Izaguirre, I. (2003) The role of physical stability on the establishment of steady states in the phytoplankton community of two Maritime Antarctic lakes. *Hydrobiologia*, **502**, 211–224.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J. *et al.* (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1919–1925.
- Andersson, A., Larsson, U. and Hagström, Å. (1986) Size-selective grazing by a microflagellate on pelagic bacteria. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **33**, 51–57.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. *et al.* (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **10**, 257–263.
- Boenigk, J., Matz, A. C., Jürgens, K. *et al.* (2001b) Confusing selective feeding with differential digestion in bacterivorous nanoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**, 425–432.
- Boenigk, J., Matz, C., Jürgens, K. *et al.* (2001a) The influence of pre-culture conditions and food quality on the ingestion and digestion process of three species of heterotrophic nanoflagellates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **42**, 168–176.

- Brinster, S., Furlan, S. and Serró, P. (2007) C-Terminal WxL domain mediates cell wall binding in *Enterococcus faecalis* and other Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, **189**, 1244–1253.
- Chesson, J. (1978) Measuring preference in selective predation. *Ecology*, **59**, 211–215.
- Chesson, J. (1983) The estimation and analysis of preference and its relationship to foraging models. *Ecology*, **64**, 1297–1304.
- Corte, A. (1962) Algas de agua dulce en lagos semicongelados de Bahía Esperanza, Península Antártica. *Contrib. Inst. Antarct. Argentino*, **69**, 1–38.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R. et al. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 434–444.
- Dolan, J. R. and Šimek, K. (1998) Ingestion and digestion of a autotrophic picoplankton, *Synechococcus*, by a heterotrophic nanoflagellate, *Bodo saltans*. *Limnol. Oceanogr.*, **43**, 1740–1746.
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. and Amann, R. (1999) Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3721–3726.
- González, J. M., Iriberrí, J., Egea, L. et al. (1990b) Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1851–1857.
- González, J. M., Sherr, E. B. and Sherr, B. F. (1990a) Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 583–589.
- González, J. M., Sherr, E. B. and Sherr, B. F. (1993) Differential feeding by marine flagellates on growing versus starving, and on motile versus nonmotile, bacterial prey. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **102**, 257–267.
- Güde, H. (1989) The role of grazing on bacteria in plankton succession. In Sommer, U. (ed.) *Plankton Ecology: Succession in Plankton Communities*. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 337–364.
- Hahn, M. W. and Höfle, M. G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 113–121.
- Hahn, M. W., Lünsdorf, H., Wu, Q. et al. (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1442–1451.
- Havskum, H. and Riemann, B. (1996) Ecological importance of bacterivorous, pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, **137**, 251–263.
- Izaguirre, I., Allende, L. and Marinone, M. C. (2003) Comparative study of the planktonic communities from lakes of contrasting trophic status at Hope Bay (Antarctic Peninsula). *J. Plankton Res.*, **25**, 1079–1097.
- Izaguirre, I., Vinocur, A., Mataloni, G. et al. (1998) Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Hydrobiologia*, **369/370**, 73–87.
- Jardillier, L., Basset, M., Domaizon, I. et al. (2004) Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.*, **35**, 259–273.
- Ježbera, J., Hornák, K. and Šimek, K. (2005) Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **52**, 351–363.
- Ježbera, J., Hornák, K. and Šimek, K. (2006) Prey selectivity of bacterivorous protists in different size fractions of reservoir water amended with nutrients. *Environ. Microbiol.*, **8**, 1330–1339.
- Jousset, A. (2012) Ecological and evolutive implications of bacterial defences against predators. *Environ. Microbiol.*, **14**, 1830–1843.
- Jürgens, K. and Massana, R. (2008) Protistan Grazing on marine bacterioplankton. In Kirchman, D. L., (ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*. 2nd edn. Wiley-Blackwell, New Jersey, pp. 383–441.
- Jürgens, K. and Matz, C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *A. van Leeuwen J. Microb.*, **81**, 413–434.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S. et al. (1999) Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1241–1250.
- Kirchman, D., Dittel, A. I., Findlay, S. E. G. et al. (2004) Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquat. Microb. Ecol.*, **35**, 243–257.
- Lampert, W. (1987) Predictability in lake ecosystems: the role of biotic interactions. In Schulze, E. D. and Zwölfer, H. P. (eds), *Potential and Limitations of Ecosystem Analysis*. Ecological studies, vol. 61. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 333–346.
- Lederer, F. L., Günther, T. J., Raff, J. et al. (2011) *E. coli* filament formation induced by heterologous S-layer expression. *Bioengineered Bugs*, **2**, 178–181.
- Lindström, E. S., Agterveld Kamst-van, M. P. and Zwart, G. (2005) Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8201–8206.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W. et al. (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**, 593–600.
- Manz, W., Amann, R., Vancanneyt, M. et al. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroidetes* in the natural environment. *Microbiology*, **142**, 1097–1106.
- Marshall, W. A. and Laybourn-Parry, J. (2002) The balance between photosynthesis and grazing in Antarctic mixotrophic cryptophytes during summer. *Freshwater Biol.*, **47**, 2060–2070.
- Massana, R., Gasol, J., Bjørnsen, P. K. et al. (1997b) Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Sci. Mar.*, **61**, 397–407.
- Massana, R., Murray, A. E., Preston, C. M. et al. (1997a) Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 50–56.
- Massana, R., Unrein, F., Rodríguez-Martínez, R. et al. (2009) Grazing rates and functional diversity of uncultured heterotrophic flagellates. *ISME J.*, **3**, 588–596.
- Matz, C., Boenigk, J., Arndt, H. et al. (2002) Role of bacterial phenotypic traits in selective feeding of the heterotrophic nanoflagellate *Spumella* sp. *Aquat. Microb. Ecol.*, **27**, 137–148.
- Matz, C. and Jürgens, K. (2005) High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 921–929.
- Medina-Sánchez, J. M., Felip, M. and Casamayor, E. O. (2005) Catalyzed reported deposition-fluorescence *in situ* hybridization

- protocol to evaluate phagotrophy in mixotrophic protists. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7321–7326.
- Modenutti, B. E., Balseiro, E. G., Callieri, C. *et al.* (2008) Light versus food supply as factors modulating niche partitioning in two pelagic mixotrophic ciliates. *Limnol. Oceanogr.*, **53**, 446–455.
- Murray, R. G. E., Dooley, J. S. G., Whippey, P. W. *et al.* (1988) Structure of an S Layer on a Pathogenic Strain of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, **170**, 2625–2630.
- Neef, A. (1997) Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen biozöosen. PhD Thesis. Technische Universität München. Munich, Germany.
- Newton, R. J., Kent, A. D., Triplett, E. W. *et al.* (2006) Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. *Environ. Microbiol.*, **8**, 956–970.
- Nishimura, Y. and Nagata, T. (2007) Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquat. Microb. Ecol.*, **48**, 231–240.
- Nygaard, K. and Tobiesen, A. (1993) Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, **38**, 273–279.
- Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature*, **3**, 537–546.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3094–3101.
- Pernthaler, J., Posch, T., Šimek, K. *et al.* (1997) Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 596–601.
- Pernthaler, J., Posch, T., Šimek, K. *et al.* (2001) Predator-Specific enrichment of *Actinobacteria* from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2145–2155.
- Porter, K. G. and Feig, Y. S. (1980) The use of DAPI for identifying aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943–948.
- Posch, T., Šimek, K., Vrba, J. *et al.* (1999) Predator-induced changes of bacterial size- structure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquat. Microb. Ecol.*, **18**, 235–246.
- Pseudomonas* Genome Database: http://www.pseudomonas.com/genomeMenu.do?strain_id=113&submit=Submit
- Safi, K. A. and Hall, J. A. (1999) Mixotrophic and heterotrophic nanoflagellate grazing in the convergence zone east of New Zealand. *Aquat. Microb. Ecol.*, **20**, 83–93.
- Salcher, M. M., Pernthaler, J. and Posch, T. (2011) Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria “that rule the waves” (LD12). *ISME J.*, **5**, 1242–1252.
- Salcher, M. M., Pernthaler, J., Psenner, R. *et al.* (2005) Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquat. Microb. Ecol.*, **38**, 215–229.
- Schiaffino, M. R. (2011) Análisis de la estructura del picoplancton y sus patrones biogeográficos en lagos comprendidos en una transecta patagónico-antártica. PhD Thesis. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Schiaffino, M. R., Unrein, F., Gasol, J. M. *et al.* (2009) Comparative analysis of bacterioplankton assemblages from maritime Antarctic freshwater lakes with contrasting trophic status. *Polar Biol.*, **32**, 923–936.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J. *et al.* (2003) An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2928–2935.
- Shannon, S. P., Chrzanowski, T. H. and Grover, J. P. (2007) Prey food quality affects flagellate ingestion rates. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 66–73.
- 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.
- Šimek, K., Hornak, K., Jezbera, J. *et al.* (2005) Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of α -proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2381–2390.
- Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, J. *et al.* (1997) Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 587–595.
- Šmarda, J., Smajs, D., Komrska, J. *et al.* (2002) S-layers on cell walls of cyanobacteria. *Micron*, **33**, 257–277.
- Strom, S. L. and Loukos, H. (1998) Selective feeding by protozoa: model and experimental behaviors and their consequences for population stability. *J. Plankton Res.*, **20**, 831–846.
- Tarao, M., Jezbera, J. and Hahn, M. W. (2009) Involvement of cell surface structures in size-independent grazing resistance of freshwater *Actinobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4720–4726.
- Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A. *et al.* (2004) Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by *Bacteria* and *Archaea* in the deep ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4411–4414.
- Thomas, S. R. and Trust, T. J. (1995) Tyrosine phosphorylation of the tetragonal paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*: molecular cloning and high-level expression of the S-layer protein gene. *J. Mol. Biol.*, **245**, 568–581.
- Unrein, F., Izaguirre, I., Massana, R. *et al.* (2005) Nanoplankton assemblages in maritime Antarctic lakes: characterization and molecular fingerprinting comparison. *Aquat. Microb. Ecol.*, **40**, 269–282.
- Unrein, F., Massana, R., Alonso-Sáez, L. *et al.* (2007) Significant year-round effect of small mixotrophic flagellates on bacterioplankton in an oligotrophic coastal system. *Limnol. Oceanogr.*, **52**, 456–469.
- Urbach, E., Vergin, K. L., Young, L. *et al.* (2001) Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnol. Oceanogr.*, **46**, 557–572.
- Urdea, M. S., Warner, B. D., Running, J. A. *et al.* (1988) A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 4937–4956.
- Vázquez-Domínguez, E., Casamayor, E. O., Català, P. *et al.* (2005) Different marine heterotrophic nanoflagellates affect differentially the composition of enriched bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**, 474–485.
- Warnecke, F., Amann, R. and Pernthaler, J. (2004) Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microb.*, **6**, 242–253.
- Warnecke, F., Sommaruga, R., Sekar, R. *et al.* (2005) Abundances, identity, and growth state of *Actinobacteria* in mountain lakes of different UV transparency. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5551–5559.
- Zubkov, M. V. and Tarran, G. A. (2008) High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature*, **455**, 224–226.