

Respuesta de la comunidad bacteriana a alteraciones de la trama trófica planctónica en el Río de La Plata

Florencia Bertoglio

Tesina de Grado de la Licenciatura en Ciencias
Biológicas

Tutor: Dra. Cecilia Alonso

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)
Laboratorio de Microbiología – Ecología Microbiana Acuática
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Tribunal:

Dra. Claudia Piccini, Dra Gissell Lacerot, Dr. Danilo Calliari

Montevideo, Enero de 2012

Índice General

1.	RESUMEN	4
2.	INTRODUCCIÓN	5
2.1	Importancia ecológica del bacterioplancton	5
2.2	Factores de control de las comunidades bacterianas acuáticas	7
2.3	Estuario Río de la Plata y su comunidad microbiana	11
2.4	Aproximaciones metodológicas para el estudio de los factores de regulación sobre el bacterioplancton.....	12
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVO	14
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1	Muestreo y diseño experimental.....	15
4.2	Hibridación in situ con sondas fluorescentes (CARD-FISH)	18
4.3	Evaluación al microscopio de epifluorescencia.....	20
4.4	Incorporación y análisis de datos de producción bacteriana	21
4.5	Análisis estadísticos	21
5.	RESULTADOS	21
5.1	Consideraciones metodológicas.....	21
5.2	Abundancia bacteriana para los distintos tratamientos y en los diferentes ambientes.....	24
5.3	Respuesta de los distintos grupos bacterianos en los tratamientos.....	27
5.4	Composición de la comunidad bacteriana en los distintos tratamientos	30
5.5	Producción bacteriana.....	33
6.	DISCUSIÓN	37
7.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	43
8.	ANEXOS	45
8.1	Anexo 1: Determinación de nutrientes.....	45
8.2	Anexo 2: Estimación de la producción primaria	46
8.3	Anexo 3: Estimación de la ingesta bacteriana por nanoflagelados	48
8.4	Anexo 4: Fotos de los grupos bacterianos evaluados.....	49
9.	AGRADECIMIENTOS	52
10.	BIBLIOGRAFÍA	53

Índice de figuras

Figura 1. Trama trófica acuática.....	6
Figura 2. Modelo propuesto por Gasol respecto a la depredación como factor de control bacteriano.....	10
Figura 3 Hibridación con sondas fluorescentes (CARD-FISH).....	14
Figura 4. Transecto del Río de la Plata.	16
Figura 5. Foto de una muestra correspondiente a una réplica del tratamiento C para la zona límnic teñida con DAPI.	22
Figura 6. Porcentajes de los principales grupos bacterianos en la zona límnic para los distintos tratamientos	22
Figura 7. Abundancia bacteriana para los distintos tratamientos en las distintas regiones	25
Figura 8. Cambios en la abundancia bacteriana respecto al control para los distintos tratamientos y regiones	26
Figura 9. Abundancias bacterianas de los diferentes grupos evaluados en función de los tratamientos para los tres ambientes.	30
Figura 10. Composición de la comunidad bacteriana en los tratamientos realizados para la región límnic.	31
Figura 11. Composición de la comunidad bacteriana en los tratamientos realizados en la región de mezcla.	32
Figura 12. Composición de la comunidad bacteriana en los tratamientos realizados en la región marina.	33
Figura 13. Producción bacteriana en las tres zonas del gradiente ambiental.	35
Figura 14. Aumentos y descensos en la producción bacteriana respecto al control. ...	36
Figura 15. Producción primaria para las distintas estaciones del gradiente ambiental	47
Figura 16. Tasa de ingesta de FLB (fluorescently labeled bacteria) por flagelado heterótrofo (HF), en función del tiempo y para cada zona evaluada.	48
Figura 17. Alfa- <i>Proteobacteria</i> (ALF968).....	49
Figura 18. Gamma- <i>Proteobacteria</i> (GAM42a).....	50
Figura 20. <i>Bacteroidetes</i> (CF319a)	51
Figura 19. Beta- <i>Proteobacteria</i> (BET 42a)	50

Índice de tablas

Tabla 1. Diferentes tratamientos efectuados en el experimento.	17
Tabla 2. Sondas utilizadas en la hibridación con sus correspondientes porcentajes de formamida y volúmenes de NaCl.	19
Tabla 3. Nutrientes evaluados para las tres zonas del gradiente.....	45

1. RESUMEN

Las bacterias heterótrofas de los sistemas acuáticos marinos y continentales poseen un rol fundamental en el ecosistema, tanto como protagonistas en los ciclos biogeoquímicos como por su participación en la trama trófica planctónica, donde a través de la interacción con sus depredadores la materia orgánica es transferida hacia los niveles tróficos superiores. En particular en los sistemas oligotróficos como los sistemas marinos, las bacterias son los organismos más importantes tanto en lo que respecta a abundancia, como a su contribución en la producción y en la respiración. El bacterioplancton se encuentra regulado por una interacción entre factores de control que incluyen la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos (control *bottom up*), entre los factores de control ocasionados por la depredación (control *top-down*), y entre los efectos a causa de la lisis viral. La depredación es considerada la principal causa de mortalidad bacteriana en los sistemas acuáticos. La importancia relativa de la depredación como factor de control depende fuertemente de las condiciones ambientales. Sistemas como el estuario Río de la Plata resultan particularmente interesantes para el estudio de los factores bióticos y abióticos sobre las comunidades microbianas, dado que presenta un fuerte gradiente en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Este trabajo propone evaluar las respuestas de los principales grupos bacterianos del Río de la Plata, ante alteraciones efectuadas en la estructura de la trama trófica planctónica a lo largo de su gradiente ambiental (una región influenciada por río, una zona marina y una zona de mezcla ubicada entre ambas). Para ello se realizaron tratamientos de filtración en los cuales la muestra de agua original fue fraccionada para eliminar diferentes fracciones de tamaño específico de la red trófica. La comunidad bacteriana fue evaluada luego por la técnica CARD-FISH, utilizando sondas específicas para los grupos alfa-*Proteobacteria*, beta-*Proteobacteria*, gamma-*Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. La composición de la comunidad bacteriana varió ante los distintos cambios en la trama trófica y ante los distintos ambientes evaluados, sugiriendo un aprovechamiento diferencial de los recursos así como diferentes grados de susceptibilidad ante la depredación por parte de los distintos grupos. Por otro lado, las diferencias en la abundancia, la producción bacteriana y la composición de sus comunidades ante las variaciones en niveles tróficos superiores y en relación a las tres zonas del gradiente, sugiere que el balance entre los factores de control *bottom-up* y *top-down* varía a lo largo del Río de la Plata.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Importancia ecológica del bacterioplancton

Las bacterias cumplen un rol fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los elementos (C, N, P, S) al mineralizar la materia orgánica. Esto se da en todos los ecosistemas del planeta, ya que dichos microorganismos son ubicuos y han logrado colonizar inclusive ambientes con condiciones extremas para la vida. Tal es así que los microorganismos habitan por ejemplo profundidades marinas de hasta 4000 metros donde la radiación solar está ausente, la presión es muy alta y la concentración de nutrientes es muy pequeña, o ambientes anóxicos y con temperaturas extremas, como debajo de la corteza terrestre a varios miles de metros de profundidad, géiseres y ambientes polares (Madigan et al. 2003).

En particular, en los sistemas acuáticos marinos y continentales las bacterias son muy abundantes, y en los sistemas oligotróficos, como el océano abierto, son los organismos más relevantes en cuanto a su abundancia y a su rol en diversas funciones ecosistémicas tales como producción y respiración (Pomeroy et al. 2007, Sarmiento et al. 2010).

El estudio de las comunidades acuáticas bacterianas comenzó a desarrollarse recién a comienzos de los años setenta, debido a las limitaciones metodológicas en los métodos tradicionales para la cuantificación de las bacterias del ambiente en placas de cultivo, ya que éstos estiman como máximo un 10% de su abundancia real (Amman et al. 1995). El avance metodológico en la microscopía de fluorescencia acoplada con el desarrollo de nuevos métodos de tinción de los ácidos nucleicos, reveló su elevada abundancia en los sistemas acuáticos (Porter & Feig 1980).

A su vez, el desarrollo de métodos que permitieron medir el metabolismo bacteriano mediante la incorporación de sustratos marcados radioactivamente por parte de las bacterias, y los que posibilitaron medir la respiración bacteriana, demostraron que las bacterias son responsables de casi la mitad de la fotosíntesis del planeta (Pomeroy 1974), y de alrededor del 95% de la respiración en los océanos (del Giorgio & Duarte 2002).

El crecimiento y la actividad bacteriana en los sistemas acuáticos se basan principalmente en el uso de materia orgánica disuelta (DOM). El DOM es la forma más abundante de carbono en estado reducido en los sistemas acuáticos, y uno de los

reservorios más grandes de carbono orgánico del planeta, siendo equivalente al reservorio atmosférico de CO₂, por lo que tiene una importancia crucial en el ciclo de este elemento a escala global (Hedges et al. 2000).

Las bacterias heterótrofas al aprovechar una gran proporción de esta materia orgánica disuelta, la canalizan hacia niveles tróficos superiores mediante una vía denominada “bucle microbiano” (Azam et al. 1983). Esta transferencia de biomasa está dada por interacciones tróficas, donde las bacterias son depredadas principalmente por los nanoflagelados, los cuales son depredados por microciliados, y éstos a su vez son consumidos por organismos del mesozooplankton (Pomeroy et al. 2007) (Figura 1). La importancia de esta vía es tal que, en promedio y dependiendo del sistema, un 50% de la producción primaria es consumida directamente por las bacterias (Azam 1998). Además, en ciertos sistemas acuáticos donde el crecimiento bacteriano está también basado en el consumo de carbono proveniente de otras fuentes, por ejemplo compuestos orgánicos de origen alóctono, la producción bacteriana puede igualar o inclusive superar a la producción primaria fitoplanctónica (Cole et al. 1988, Foulland and Mostajir, 2010).

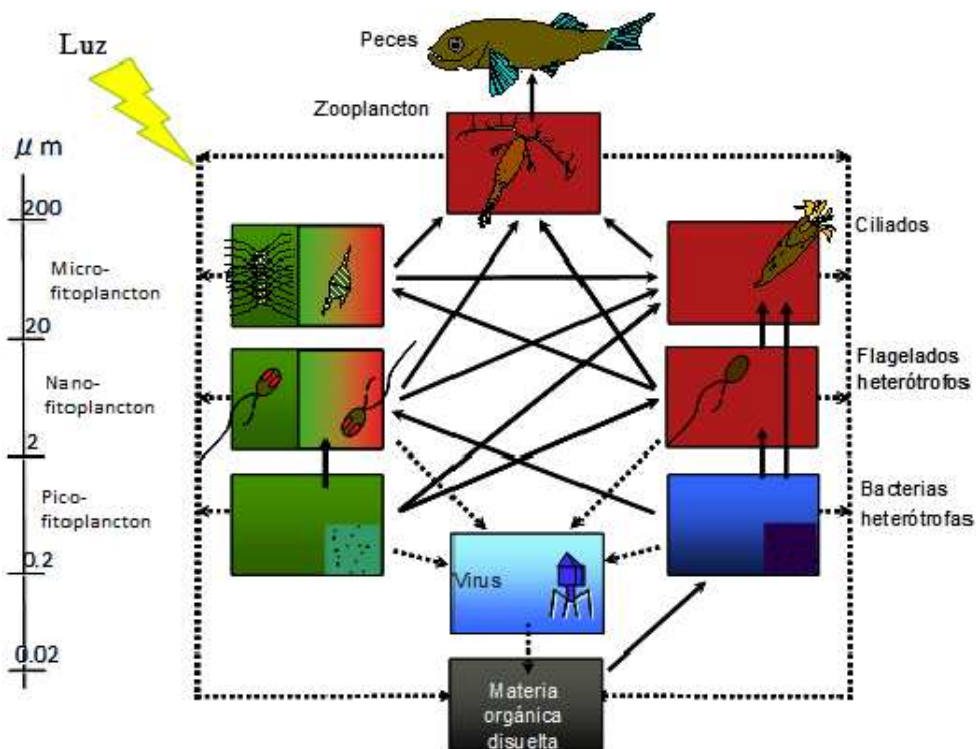


Figura 1. Trama trófica acuática, con énfasis en el bucle microbiano. A la izquierda se presentan los organismos autótrofos y a la derecha los heterótrofos con sus respectivas escalas. Modificado de materiales del curso “Herramientas para el estudio de tramas tróficas microbianas”.

Con la aparición de las herramientas moleculares principalmente basadas en el uso del ARN ribosomal 16S como marcador filogenético, se comenzó a tener una visión de la composición taxonómica y patrones evolutivos de las comunidades bacterianas (Woese 1987). La información filogenética generada en base a este marcador, permitió identificar una inesperada diversidad de bacterias de las cuales la mayoría guarda poca semejanza con la de los organismos cultivados (Giovannoni et al. 1990) y existen phyla enteros para los cuales no se tienen representantes cultivados (Rappe and Giovannoni, 2003). Además, estas herramientas posibilitaron estudiar la distribución de dichos organismos resultando en novedosos hallazgos, como por ejemplo el de la presencia de las Archaeas (grupo que se creía estaba restringido a ambientes extremos) en el mar, especialmente en las zonas profundas, donde pueden ser muy abundantes (Fuhrman et al. 1992, Teira et al. 2004).

Si bien existe una enorme diversidad procariota, los sistemas acuáticos se caracterizan por la predominancia numérica de unos pocos phyla bacterianos: normalmente las *Proteobacteria* de las clases Alfa, Beta y Gamma, y los *Bacteroidetes* (sobre todo de la clase *Flavobacteria*) constituyen casi la totalidad de las células bacterianas en una amplia variedad de sistemas tales como lagos (Glöckner et al. 1999), zonas marinas costeras (Eilers et al. 2001), ambientes estuarinos (Piccini et al. 2006), y océano abierto (Schattenhofer et al. 2009).

Los desarrollos metodológicos y conceptuales son por lo tanto, la base de la actual comprensión del papel clave que juegan las bacterias en el océano (Sarmiento et al. 2010), relacionándose su enorme abundancia, producción y diversidad genética y funcional con su importancia ecológica.

2.2 Factores de control de las comunidades bacterianas acuáticas

A diferencia de otros componentes del plancton (ej. fitoplancton, nano- y microzooplancton), la abundancia total de las bacterias en la columna de agua se mantiene relativamente constante. Sin embargo, aunque la abundancia total pueda presentar escasa variación, las abundancias relativas de los diferentes grupos bacterianos suelen variar considerablemente (Gasol et al. 2002).

Por lo tanto, resulta sumamente interesante conocer cuáles son los mecanismos ecológicos implicados en la regulación de la abundancia bacteriana, tanto a nivel global, como de los diferentes grupos que componen estas comunidades.

La abundancia y biomasa bacteriana, su actividad y crecimiento así como la composición de sus comunidades, se encuentran limitados por la disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos y por los factores físicos del ambiente (*control bottom-up*), por la mortalidad debido a la depredación (*control top-down*), y por la lisis a causa de la infección viral (Pernthaler 2005).

La disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos incide sobre el bacterioplancton principalmente condicionando sus tasas de crecimiento (Pernthaler 2005), así como también afectando a la composición de las comunidades, dado que los principales grupos de bacterias acuáticas presentan diferencias en sus preferencias hacia la materia orgánica disuelta. Esto fue demostrado por ejemplo en experimentos en los cuales las bacterias fueron incubadas con sustratos marcados de distinto peso molecular, resultando que las alfa-*Proteobacteria* prefieren sustratos de bajo peso molecular tales como aminoácidos, mientras que los *Bacteroidetes* los prefieren de alto peso molecular, como proteínas y quitina (Cottrell & Kirchman 2000). También se vio que existen diferencias en base a las preferencias sobre las concentraciones de los sustratos disponibles, encontrándose que las gamma-*Proteobacteria* y ciertos miembros del filo *Bacteroidetes* prefieren altas concentraciones de sustratos, mientras que determinados grupos dentro de la clase alfa-*Proteobacteria* prefieren bajas concentraciones (Alonso & Pernthaler 2006 a, Alonso & Pernthaler 2006 b).

Además del control llevado a cabo por estos factores químicos sobre las comunidades bacterianas, las características físicas del ambiente constituyen otro tipo de control *bottom up*. La salinidad en particular, al igual que con otros organismos acuáticos, ejerce un fuerte rol estructurante, resultando en importantes diferencias entre las comunidades bacterianas de sistemas marinos y de agua dulce. Por ejemplo, las beta-*Proteobacteria* dominan los sistemas de agua dulce en tanto que escasean en los sistemas marinos (Glöckner et al. 1999). Además, la salinidad incide sobre las bacterias de distinta manera, ya que algunos grupos, como los *Bacteroidetes* pueden verse afectados por su concentración, mientras que las alfa y las Gamma-*Proteobacteria*, por su composición (Barberán & Casamayor 2010).

Por otro lado el control *top-down* representado por la depredación, efectuada principalmente por los protistas (nano- y micro-zooplancton), y la infección viral, son consideradas las principales fuentes de mortalidad microbiana. Su importancia relativa podría depender fuertemente de las condiciones ambientales (ej. estado trófico, concentración de oxígeno) (Pernthaler 2005).

Se ha postulado que la depredación por parte de los protistas limita principalmente la abundancia y la biomasa del bacterioplancton, mientras que los virus afectan a la composición de las comunidades bacterianas (Weinbauer & Rassoulzadegan 2004). Estas diferencias en los efectos de la depredación podrían deberse a que los protistas pueden alimentarse de varias especies de procariontes, mientras que los virus presentan alta especificidad por sus huéspedes (Pernthaler 2005). Sin embargo, existe evidencia creciente de que determinados grupos de protistas, en particular los flagelados, tienen preferencias hacia ciertas especies de bacterias (Beardsley et al. 2003), morfologías celulares (González et al. 1990), o tamaños celulares específicos (Jürgens et al. 1999). Por ejemplo, en experimentos en los cuales se removió a los depredadores de los protistas (mesozooplancton), se vio que las células bacterianas formaron estructuras de resistencia ante la alta presión de la depredación, como filamentos y células alargadas, además de que las comunidades bacterianas pasaron a estar dominadas por un grupo específico, miembro de la clase alfa-*Proteobacteria* (Jürgens et al. 1999).

Estos resultados demuestran como la presión por la depredación se ve reflejada no sólo en la abundancia bacteriana, sino también a nivel de cambios morfológicos y de composición de sus comunidades, constituyendo por lo general los efectos más importantes (Zöllner et al. 2003).

Existen indicaciones de que el balance entre los factores de control *bottom-up* y *top-down* estaría relacionado con la productividad global del sistema, tanto para las tramas tróficas microbianas marinas como de agua dulce (Pace & Cole 1994).

Empíricamente se ha observado que la relación entre flagelados y bacterias es mayor en sistemas oligotróficos, mientras que en los eutróficos dicha relación disminuye. Gasol (1994) postuló un modelo que refleja este desacople entre los flagelados y las bacterias en los sistemas eutróficos (Figura 2). En dicho modelo se establece que en los sistemas oligotróficos el control de la depredación ejercido por los flagelados sobre las bacterias es muy fuerte, en tanto que en los sistemas eutróficos, esta presión se relaja, postulándose así que el principal factor en limitar el crecimiento de las bacterias en los ambientes más productivo sería la competencia por los nutrientes, mientras que en los menos productivos lo haría principalmente la presión de la depredación (Gasol et al. 2002).

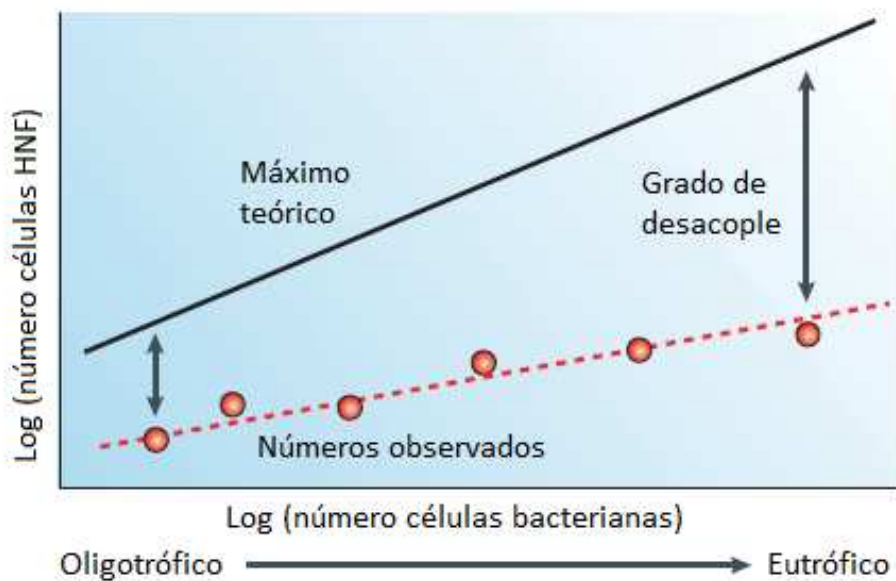


Figura 2. Modelo propuesto por Gasol respecto a la depredación como factor de control bacteriano. Dicho modelo explica la importancia relativa de la depredación bacteriana por HNFs (nanoflagelados heterótrofos) en condiciones oligotróficas y eutróficas. La abundancia bacteriana tiende a aumentar más abruptamente que la abundancia de sus depredadores a medida que aumenta el estado trófico del sistema (a diferencia del modelo teórico), por lo que el acople depredador-presa disminuye. Las bacterias se ven por lo tanto más controladas por la limitación de los nutrientes en los sistemas eutróficos, mientras que en los sistemas oligotróficos se encuentran limitadas por la depredación. La distancia entre las dos líneas de la figura refleja dicho grado de desacople entre el máximo teórico de abundancia y entre la abundancia observada entre los HNFs y las bacterias. Modificada de Pernthaler 2005.

El balance entre los mecanismos *bottom-up* y *top-down* aún está en discusión, así como también las condiciones ambientales que favorecen uno y otro. A modo de ejemplo, existe evidencia de que en los sistemas más productivos otros grupos de protistas -los ciliados- podrían ser los principales controladores de la abundancia bacteriana (Zingel et al. 2007). Por otra parte, existe también evidencia de que en los sistemas más productivos, los virus podrían tener una mayor importancia como factores de mortalidad y los metazoos podrían ejercer control sobre las bacterias (Gasol et al. 2002).

La complejidad de los factores interactuando, hace que aún no se haya llegado a ninguna conclusión definitiva en este tema, por lo que es necesario avanzar en la generación de información, en especial analizando sistemas particularmente idóneos para la experimentación.

2.3 Estuario Río de la Plata y su comunidad microbiana

Un escenario ideal para intentar comprender como actúan los distintos factores de control sobre el bacterioplancton, son los estuarios, ya que se caracterizan por fuertes gradientes en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Estas características permiten evaluar en un único sistema la influencia de las variaciones fisicoquímicas y biológicas sobre: i) la diversidad y actividad bacteriana, ii) la distribución de los distintos grupos bacterianos y iii) las interacciones de éstos con los diferentes componentes del plancton.

El estuario Río de la Plata está ubicado en la costa este de Sudamérica, cubre un área de 38.800 km², una longitud de 200 km y drena la segunda cuenca más grande de América del Sur, en la cual el principal aporte de agua está dado por la confluencia de los ríos Paraná y Uruguay. Además, el Río de la Plata constituye la principal fuente de agua dulce en el Océano Atlántico Sur.

Este sistema se caracteriza por presentar un marcado gradiente ambiental con interacciones dinámicas entre sus componentes dulceacuícolas y marinos (López Laborde 1998). Diversas actividades humanas dependen del Río de la Plata, en primer lugar, su alta productividad permite mantener una valiosa pesca comercial así como también sostener la navegación hacia y desde varios puertos importantes, recreación y turismo (Kurucz et al. 1998). A su vez, el Río de la Plata es un sistema de importancia global, por ejemplo por su rol en el ciclo del carbono (Feely et al. 2001), como en su presumible actuación como punto de quiebre en la distribución latitudinal de diferentes organismos acuáticos (García, G. com. pers.)

La comunidad bacteriana en el estuario Río de la Plata presenta importantes diferencias en cuanto a su abundancia y composición a lo largo del gradiente ambiental, comprendido entre la zona dulceacuícola (región interna del estuario) y entre la zona con una mayor influencia oceánica (región externa). En el primer estudio de las comunidades bacterianas en este sistema, se determinó que los factores estructurantes de mayor importancia para la diversidad bacteriana son la salinidad y la temperatura (Alonso et al. 2010). Los resultados obtenidos guardan relación con lo observado en otros sistemas estuarinos para los cuales se observan patrones como la dominancia de las *Betaproteobacteria* y *Actinobacteria* en la zona dulce, *Bacteroidetes*

en la zona mezcla y *Gammaproteobacteria* en la zona marina (Cottrell & Kirchman 2003, Zhang et al. 2006, Bouvier & del Giorgio, 2002).

Un aspecto aún no explorado para este sistema es evaluar el papel que juegan las interacciones con otros componentes del plancton sobre la estructura de la comunidad bacteriana a lo largo de este gradiente ambiental.

2.4 Aproximaciones metodológicas para el estudio de los factores de regulación sobre el bacterioplancton

El estudio de los factores de regulación de las bacterias acuáticas es posible mediante una serie de experimentos en los cuales se intenta determinar cómo un tipo de control específico actúa sobre éstas.

Para estimar los efectos ejercidos por los mecanismos de control *top-down*, se han desarrollado experimentos con el objetivo de modificar la estructura de la red trófica acuática fraccionando por tamaño la muestra original, de manera que se remueve una fracción de tamaño específica (Vaquer et al. 1994). También, dado que la abundancia de los depredadores bacterianos es casi un orden de magnitud menor a la de sus presas, es posible reducir o eliminar la presión ejercida por la depredación sobre las bacterias diluyendo la muestra original (González 1999).

Por otro lado, los efectos ejercidos por los factores de control *bottom-up*, se pueden evaluar realizando experimentos en los cuales se adicionan nutrientes a las muestras de agua, por ejemplo fósforo; así como experimentos en los cuales las muestras son incubadas en bolsas de diálisis y se trasplantan a otro medio el cual difiere del original en su disponibilidad de nutrientes (Simek et al. 2003). Las bolsas de diálisis están diseñadas para permitir el libre intercambio de solutos orgánicos e inorgánicos con el medio acuático.

Una vez realizado el experimento adecuado, se realiza un seguimiento sobre las respuestas de la comunidad bacteriana, evaluando por ejemplo su actividad, su abundancia y su composición.

La determinación de la actividad bacteriana se suele llevar a cabo midiendo su producción o su respiración. Esto es posible determinando la incorporación de

sustratos marcados para el caso de la producción, o a través de la aplicación de moléculas indicadoras de actividad del sistema de transporte de electrones para estimar la respiración bacteriana (Rodríguez et al. 1992).

La abundancia bacteriana se puede estimar aplicando la tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Porter & Feig 1980), el cual es un fluoróforo que se une al ADN de manera que permite contar las bacterias totales de una muestra al microscopio de fluorescencia. También es posible determinar la abundancia bacteriana mediante citometría de flujo, luego de aplicar una tinción para ácidos nucleicos (Fuchs 1998).

Por último, la evaluación cuali y cuantitativa de la composición de las comunidades bacterianas puede llevarse a cabo mediante la hibridación con sondas fluorescentes (FISH) (Amann et al. 1990). La misma se basa en el empleo de sondas de oligonucleótidos fluorescentes específicas hacia secuencias blanco presentes en el ARN ribosomal bacteriano, de manera que se realiza una hibridación entre la sonda y los ribosomas de las bacterias. De esta forma, los grupos diana aparecen teñidos con un fluorocromo (ej. verde o rojo) y es posible contar el número de células en referencia al número total de bacterias obtenido de la tinción con DAPI (Figura 3).

El FISH es la única técnica disponible que posibilita una adecuada cuantificación de los distintos grupos bacterianos, ya que es independiente de los sesgos asociados a la amplificación por PCR (reacción en cadena de la ADN-polimerasa) (Suzuki & Giovannoni 1996). De este modo, permite obtener una idea general de cómo está compuesta la comunidad bacteriana y de detectar por ejemplo los principales cambios debido a modificaciones en las condiciones bióticas y abióticas.

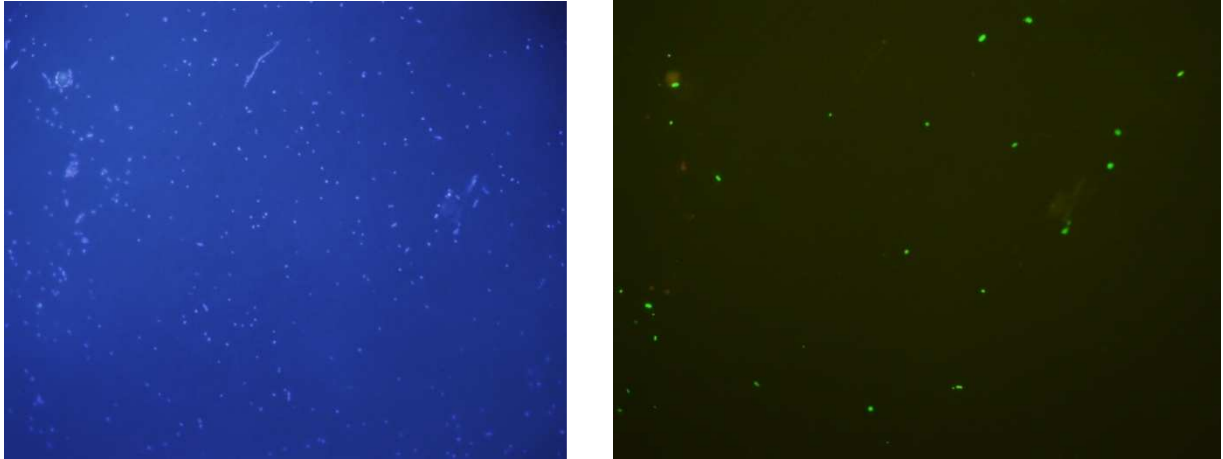


Figura 3. Hibridación con sondas fluorescentes (CARD-FISH). A la izquierda se observa una muestra de agua proveniente del Río de la Plata teñida con DAPI y excitada con luz UV para lograr su visualización. Dicho colorante se une al ADN por lo que la totalidad de las células son teñidas. A la derecha se observa la misma muestra pero con luz azul, la cual excita al fluoróforo asociado a la sonda de las células hibridadas, que para este ejemplo fue específica para el grupo de las *gamma-Proteobacteria*.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

Dado que en trabajos previos se han observado diferencias en la abundancia, actividad y composición de las comunidades microbianas en el gradiente ambiental del Río de la Plata, se postula que:

- 1) Estas diferencias responden a la interacción del bacterioplancton con otros componentes de la trama trófica planctónica.
- 2) El resultado de dicha interacción está afectado por las características del ambiente como la salinidad, temperatura, concentración de materia orgánica y nutrientes.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la respuesta de la comunidad bacteriana frente a cambios en la estructura de la trama trófica a lo largo del gradiente ambiental en el Río de la Plata (una región límnic, una zona marina y una zona de mezcla ubicada entre ambas).

Es de esperar que los distintos grupos bacterianos evaluados respondan de distinta forma ante las modificaciones en la trama trófica, debido a las posibles diferencias en las presiones de depredación sobre las diferentes poblaciones bacterianas.

A su vez las diferencias ambientales en el área de estudio podrían modificar las presiones de depredación, por lo que se espera diferentes respuestas dadas para un mismo grupo a lo largo del transecto.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestreo y diseño experimental

Durante una campaña realizada en mayo del 2009, se tomaron muestras de agua superficial en distintas estaciones sobre un transecto de 150 km en el Río de la Plata.

Las estaciones de muestreo fueron determinadas basándose en características hidrológicas del sistema (temperatura y salinidad), incluyendo tres regiones representativas del gradiente ambiental. Una de ellas, la región interna y media del río, está mayoritariamente influenciada por agua dulce y estuarina dado que es la porción más cercana a la desembocadura del Río Uruguay. La segunda estación, la región externa, posee una mayor salinidad debido a que es la porción más cercana al Océano Atlántico, denominándose región marina. Por último, quedando entre ambas regiones se destaca una zona de mezcla, donde fue realizado el tercer muestreo (Figura 4).

Las muestras de agua tomadas en cada zona fueron sometidas a un experimento que implicó la remoción por filtración secuencial de distintos integrantes de la trama trófica planctónica, en base a su tamaño. Para ello se realizaron una serie de tratamientos utilizando filtros con diferentes tamaños de poro como se describe en la tabla 1. En el tratamiento A (filtro de 1.2 μm), se pretendió remover a todos los niveles tróficos superiores al bacteriano, para evaluar la respuesta bacteriana en ausencia de depredadores. En el B, se filtró por 10 μm eliminando a todos los organismos superiores a dicho tamaño, con el fin de evaluar al bacterioplancton en presencia de sus depredadores más pequeños, los flagelados (nanoplancton). Por otro lado, en el tratamiento C se utilizó un filtro de 100 μm , pretendiendo evaluar la respuesta bacteriana en presencia de los flagelados y de sus depredadores superiores, los ciliados (microplancton).

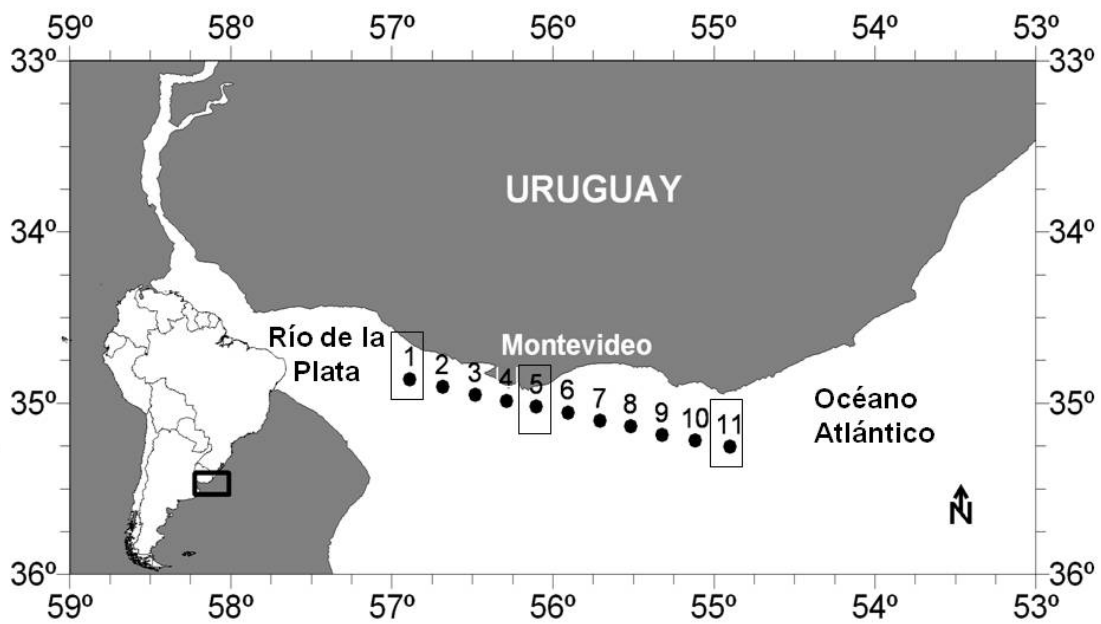


Figura 4. Transecto del Río de la Plata. Las estaciones 1 a 3 corresponden a la región interna y media límnic, las estaciones 4 a 6 a la zona de mezcla, y de la estación 7 a la 11 a la región externa marina. El experimento fue realizado para muestras de agua pertenecientes a las estaciones 1, 5 y 11 como se señala en la figura.

Los tratamientos A, B, C, D y K fueron realizados de la misma forma para las tres regiones del gradiente ambiental, en la región marina se efectuaron además los tratamientos E y F. Estos dos últimos tratamientos junto al D, implicaron un primer paso en el cual la muestra de agua se filtró por un filtro de 100 μm , con el fin de remover al mesozooplanton y luego las muestras fueron incubadas con diferentes componentes del mesozooplanton: copépodos (*Acartia spp*), noctilucas (*Noctiluca scintillans*) y cladóceros (*Penilia spp*) para los tratamientos D, E y F respectivamente. El tratamiento que incluyó a los copépodos (tratamiento D), fue realizado en las tres zonas del gradiente ambiental evaluadas, los tratamientos E y F en cambio, se realizaron únicamente en la zona marina. Estos últimos, tuvieron como objetivo detectar posibles cambios en las respuestas bacterianas, asociadas a variaciones en la composición del mesozooplanton (organismos representativos del mayor nivel trófico considerado en el experimento). La elección de dichos organismos dentro de los tres grupos implicados, fue en base a que constituyeron los más abundantes en las muestras de agua del experimento.

Tabla 1. Diferentes tratamientos efectuados en el experimento. Se detalla el tamaño del poro del filtro implicado en cada tratamiento y la estructura de la red trófica esperada como consecuencia de la filtración.

	TRATAMIENTO	RESULTADO
A	Agua filtrada por 1.2 μm	Bacterias
B	Agua filtrada por 10 μm	Bacterias y flagelados
C	Agua filtrada por 100 μm	Bacterias, flagelados y ciliados
D	Agua filtrada por 100 μm + copépodos (<i>Acartia spp.</i>)	Bacterias, flagelados, ciliados y copépodos
E	Agua filtrada por 100 μm + noctilucas (<i>Noctiluca scintillans</i>)	Bacterias, flagelados, ciliados y noctilucas
F	Agua filtrada por 100 μm + cladóceros (<i>Penilia spp.</i>)	Bacterias, flagelados, ciliados y cladóceros
K	Agua sin filtrar	Control sin modificar

Dado que los copépodos (*Acartia spp.*) son omnívoros, su variada dieta incluye tanto presas autótrofas como heterótrofas (Rollwagen & Penry 2003). Tradicionalmente se consideró únicamente la ingesta de fitoplancton por parte de estos organismos, sin embargo luego del hallazgo de los protistas como integrantes de la red trófica planctónica, se reveló que los copépodos se alimentan de estos e inclusive se ha demostrado experimentalmente que en algunas ocasiones prefieren la ingesta de protistas (en especial ciliados) que de fitoplancton (Stoecker & Egloff 1987).

Las noctilucas (*Noctiluca scintillans*, incluidas en el tratamiento E), son dinoflagelados heterótrofos, constituyen uno de los componentes más abundantes del plancton y se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en sistemas dulceacuícolas como marinos (Fonda-Umani et al., 2004). Su principal fuente de alimento es el fitoplancton, aunque su dieta puede ser muy amplia e incluir protistas, huevos de copépodos y peces, zooplancton (en especial copépodos), larvas (Nakamura 1998) y posiblemente bacterias (Kirchner et al., 1996). Es posible que la ingesta de bacterias tenga un impacto sobre su abundancia en la columna de agua (Kirchner et al., 1996).

Por último el género *Penilia* (considerado en el tratamiento F), es el único representante del suborden Cladóceras abundante en el mar y se alimenta exclusivamente de partículas pequeñas. Los cladóceros son más abundantes en sistemas dulceacuícolas y en sistemas más productivos que en los ambientes marinos. Es posible que estos organismos repercutan sobre el bacterioplancton de manera indirecta a través de la trama trófica mediante la ingesta de nanoflagelados (Katechakis et al., 2002).

Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado y en volúmenes de un litro a partir de las muestras iniciales de agua. Las muestras con dichos tratamientos se incubaron durante 48 horas, en oscuridad y a temperatura *in situ*.

Pasado el tiempo de incubación, se fijaron las muestras con paraformaldehído (concentración final 2%). Posteriormente, se filtraron alícuotas de 10 ml de muestra en filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 0.2 μm . Estos filtros se guardaron a -20°C hasta su posterior uso en el laboratorio.

4.2 Hibridación in situ con sondas fluorescentes (CARD-FISH)

Para la evaluación de la composición de las comunidades bacterianas de muestras provenientes de ambientes acuáticos, la aplicación de la técnica FISH original (Amann 1990) detallada previamente ha sido modificada. Las bacterias acuáticas, en comparación con sus contrapartes de sistemas más ricos, están estresadas y son muy pequeñas, con pocos ribosomas por célula, hecho que dificulta detectar la hibridación entre la sonda fluorescente y la secuencia de la célula diana (Pernthaler et al. 2002). Debido a esto, la metodología de aplicación estándar para sistemas acuáticos difiere de la original en que la sonda no está unida directamente a un fluorocromo, sino que está acoplada a la enzima peroxidasa revelándose su hibridación mediante la adición de un sustrato fluorescente para la peroxidasa. Esta técnica es denominada CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition- Fluorescence In Situ Hybridization) y permite amplificar la señal de las células hibridadas, facilitando su visualización al microscopio de fluorescencia (Pernthaler et al 2002).

En este trabajo, la técnica de CARD-FISH fue utilizada para la cuantificación de los distintos grupos bacterianos en los distintos tratamientos, aplicando el protocolo estándar de CARD-FISH para muestras de agua (Pernthaler 2002) a partir de los filtros

de policarbonato con un tamaño de poro de 0.2 micras (detallado a continuación). Las evaluaciones se realizaron para cada réplica de los tratamientos realizados, utilizando sondas dirigidas a los principales grupos bacterianos acuáticos (Tabla 2).

Tabla 2. Sondas utilizadas en la hibridación con sus correspondientes porcentajes de formamida y volúmenes de NaCl (Glöckner et al, 1999).

Sonda	Especificidad	Secuencia (5'-3') de sonda	Sitio diana	% formamida	µl 5 M NaCl en 50 ml de buffer de lavado
ALF968	<i>AlfaProteobacteria</i>	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	16S	40	270
BET42a	<i>BetaProteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	23S	55	30
GAM42a	<i>GammaProteobacteria</i>	GCCTTCCCACATCGTTT	23S	55	30
CF319a	<i>Bacteroidetes</i>	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S	55	30

Permeabilización de células e inactivación de peroxidasas endógenas. Los filtros fueron lavados con PBS y posteriormente sumergidos en agarosa 0.1%. Luego fueron incubados en una placa de Petri con 1 ml de una solución con lisozima por filtro (10 mg/ml en 100 µl de Tris 1M, 100 µl EDTA 0,5M y 800 µl de agua milli-Q), durante 60 min a 37°C, con el fin de permeabilizar a las células bacterianas presentes en el filtro. La lisozima permeabiliza a las células ya que actúa sobre la pared celular permitiendo así el ingreso de la sonda a la célula y su posterior hibridación con el ADN. Luego, los filtros se enjuagaron con agua MilliQ y fueron tratados con 1 ml de HCL 0,01M durante 10 minutos a temperatura ambiente en una placa de Petri, con el objetivo de eliminar la peroxidasa endógena de las células bacterianas. Finalmente los filtros se enjuagaron nuevamente con agua MilliQ.

Hibridación. Cada filtro fue fragmentado en secciones de 5 mm aproximadamente, las cuales se colocaron en portaobjetos de vidrio y se cubrieron con 400 µl de un buffer de hibridación (0,9 M NaCl, 20 mM HCl [Ph 7,5], 10% dextran sulfato, 0,02% SDS, 40% o 55% de formamida, 1% reactivo bloqueante) más 2 µl de solución stock que contiene la sonda correspondiente para cada hibridación. El buffer de hibridación contiene formamida como agente desnaturizante a una concentración específica según la sonda utilizada (tabla 2). La incubación con dicho buffer fue por 2 hrs a 35°C.

Terminado el tiempo de incubación, se preparó 50 ml de un buffer de lavado (5 M NaCl el volumen dependió de la concentración de formamida en el buffer de hibridación

(tabla 2), 1 ml 1M Tris HCl, 0,5 M EDTA, 50 ml de agua y 50 µl de 10% SDS), y se lo dejó reposar a 37°C durante 15 min. El buffer de lavado se utilizó para remover el buffer de hibridación presente en los filtros, por lo que los mismos fueron lavados con dicho buffer a 37°C durante 15 min. Finalmente, los filtros se sumergieron en PBS 1X a temperatura ambiente por 15 minutos.

Amplificación de la señal. Para revelar la hibridación en su sitio blanco de la sonda acoplada a la enzima peroxidasa, se utilizó una solución que le aportó un sustrato fluorescente a dicha enzima. Para esto, los filtros fueron incubados 15 min a 37°C y en oscuridad con una solución compuesta por: 989 µl de buffer de amplificación, solución de agua oxigenada (200 µl PBS y 1 µl agua oxigenada) y 1µl de sustrato fluorescente (FITC). Luego de esto, los filtros se sumergieron en PBS durante 15 min a 37°C en oscuridad, se los enjuagó con agua MilliQ y se los dejó secar en oscuridad. Posteriormente, los filtros se tiñeron con una solución de DAPI 1 µg/ml durante 3 minutos en oscuridad y se enjuagaron con agua MilliQ. Finalmente, habiéndose secado los filtros, se los montó sobre un portaobjetos utilizando una mezcla 5:1:1 de Citifluor:Vectashield:PBS, para su posterior evaluación al microscopio.

4.3 Evaluación al microscopio de epifluorescencia

Los filtros hibridados fueron evaluados en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81), con el objetivo de registrar las bacterias presentes en las distintas zonas del gradiente, en los respectivos tratamientos y con las distintas hibridaciones realizadas para cada grupo bacteriano evaluado. Se evaluaron un total de 183 muestras. El recuento fue manual y se llevó a cabo mediante la excitación en primer lugar, con luz UV del fluoróforo DAPI, el cual emite luz azul y como se une al ADN revela la totalidad de las bacterias. En segundo lugar, los filtros fueron analizados irradiándolos con luz azul, para excitar al fluóroforo asociado a la sonda de las células hibridadas, visualizando así a los grupos bacterianos hibridados.

Se contaron 1000 células marcadas con DAPI por sección del filtro, de las cuales se registró también la cantidad de esas mismas células que estaban hibridadas con la sonda.

4.4 Incorporación y análisis de datos de producción bacteriana

Para la misma serie de experimentos se llevó a cabo la estimación de la producción bacteriana en cada tratamiento realizado, aplicando el protocolo de Kirchman (2001) (C. Alonso, datos no publicados). Brevemente, se realizaron incubaciones de las muestras de agua con leucina radioactiva (10nM) y una vez finalizada la incubación (1 h en oscuridad a temperatura *in situ*) se fijó la muestra con formaldehído (3%). Posteriormente, fueron tratadas con ácido tricloroacético frío (TCA 5%) para proceder a la precipitación de las proteínas, y se midió la radioactividad presente en las mismas con un contador de centelleo líquido Beckman LS5000TD. A partir de estos datos se calculó la producción de biomasa bacteriana según Simon & Azam (1989). Estos datos fueron incorporados y analizados en el presente trabajo, de modo de integrar los tres aspectos fundamentales de la respuesta de las comunidades bacterianas frente a cambios en las condiciones ambientales.

4.5 Análisis estadísticos

La evaluación estadística se realizó aplicando un ANOVA multifactorial y se llevó a cabo el test Tukey para las comparaciones post hoc. Los datos fueron transformados utilizando la función logaritmo en base 10 para lograr su normalización. El software utilizado fue STATISTICA 7.

5. RESULTADOS

5.1 Consideraciones metodológicas.

Como se explicó previamente, mediante el microscopio de fluorescencia se contó la cantidad de bacterias de cada grupo (hibridadas con sus correspondientes sondas) respecto a la abundancia total (marcadas con DAPI). El procedimiento más ampliamente utilizado para determinar la abundancia de estos grupos (típicamente expresada en células por mililitro) es en base al porcentaje que representan de los recuentos totales de DAPI (Pernthaler et al. 2001).

En el presente trabajo, el conteo de las células teñidas con DAPI presentó dificultades en la identificación de las células bacterianas para ciertas muestras (Figura 5). En consecuencia, frecuentemente se obtuvo una subestimación de los recuentos totales, evidenciándose al sumar los porcentajes de abundancia de los principales grupos bacterianos y observar que sumaban más del 100% de los recuentos con DAPI. Este problema fue observado principalmente en la zona límnic (Figura 6).



Figura 5. Foto de una muestra correspondiente a una réplica del tratamiento C para la zona límnic teñida con DAPI.

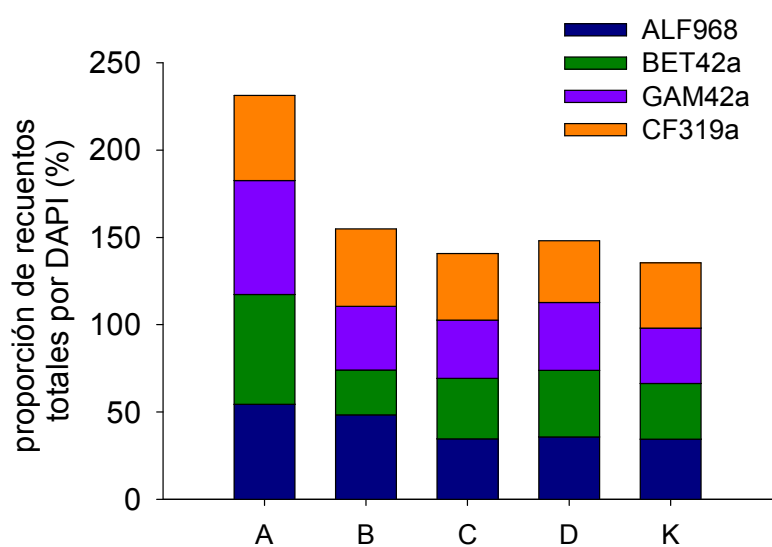


Figura 6. Porcentajes de los principales grupos bacterianos en la zona límnic para los distintos tratamientos. Obsérvese que la suma de los porcentajes superó al 100% en todos los

tratamientos. ALF968: alfa-*Proteobacteria*, BET42a: beta-*Proteobacteria*, GAM42a: gamma-*Proteobacteria*, CF319a: *Bacteroidetes*.

Las posibles razones para explicar las dificultades en la estimación precisa del número total de bacterias por DAPI incluyen: i) la tinción inespecífica de partículas orgánicas, muy frecuentes en las muestras provenientes de la zona límnic, ii) elevada exposición a la luz durante el recuento, que causa el “bleaching” (decoloración) del DAPI. Ambos factores tienen el efecto de dificultar la diferenciación de las células bacterianas de la matriz, en especial cuando ésta posee un alto contenido de materia orgánica (Mostajir et al. 1995).

Debido a las dificultades encontradas en establecer el número total de células bacterianas, para la estimación de la abundancia de los grupos particulares se siguió el protocolo propuesto por Gomez-Pereira et al. (2010). Brevemente, en campos seleccionados al azar se realizaron los recuentos de los grupos hibridados con cada sonda, y se estimó su densidad en la muestra en base al tamaño y número de campos contados, al tamaño del filtro y al volumen de muestra filtrado, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Sonda / ml} = \frac{(\text{área total del filtro}) (\text{células contadas por filtro}) / (\text{área contada del filtro})}{(\text{volumen de muestra filtrado})}$$

En donde el área total del filtro se calculó considerando el radio interno de la columna de filtración (18500 μm), el área contada del filtro se calculó como la cantidad de campos contados por filtro multiplicado por el área de la grilla utilizada en el microscopio (1000 μm^2) para definir el campo. El volumen de muestra filtrado fue de 10 ml.

En base a estudios previos realizados en el Río de la Plata (Alonso et al. 2010), y a lo esperable en general para sistemas estuarinos (Cottrell and Kirchman 2003, Zhang et al. 2006, Piccini et al. 2006), es posible asumir que los grupos aquí analizados constituyen la gran mayoría de las células bacterianas presentes en este sistema y cuantificables por microscopía. En base a ello, a efectos de la presentación y discusión de resultados, la abundancia total bacteriana fue estimada como la suma de las abundancias de estos grupos principales en lugar de su estimación mediante el DAPI.

5.2 Abundancia bacteriana para los distintos tratamientos y en los diferentes ambientes

Al analizar los resultados de abundancia bacteriana, se observa que las comunidades de los diferentes ambientes respondieron de distinta manera (Figura 7). Considerando la abundancia en el control (tratamiento K), la región marina presentó un valor significativamente mayor respecto a las demás regiones ($gl=2$, $F=5.017$ $p<0.05$). La abundancia máxima se observó en la región de mezcla, mientras que la mínima se dio en la región límnic (Figura 7).

Además, los patrones de variación en los distintos tratamientos fueron diferentes en las tres zonas del gradiente (Figura 7). Para un mismo tratamiento, la abundancia bacteriana varió significativamente en los distintos ambientes ($gl=8$ $F=5.97$ $p<0.01$).

En la zona límnic hubo un aumento significativo en la abundancia de la comunidad bacteriana en el tratamiento A (bacterias en ausencia de depredadores), respecto al C, al D y al K ($gl=4$ $F=6.481$ $p<0.05$) (Figura 7.1). La abundancia registrada en este tratamiento fue el doble con respecto a los tratamientos C y D, y el triple respecto al control (tratamiento K). Las abundancias observadas en el resto de los tratamientos no tuvieron diferencias significativas entre sí, aunque se observó una leve tendencia decreciente desde el tratamiento B hacia el control (Figura 7.1).

En la zona de mezcla, los valores de abundancia en los tratamientos A y B fueron significativamente más altos que para el resto de los tratamientos, incluyendo el control ($gl=4$ $F=20.50$ $p<0.01$) (Figura 7.2). En especial el tratamiento B (bacterias en presencia de sus depredadores de menor tamaño) tuvo la mayor abundancia, aumentando el triple respecto a los tratamientos C y D y fue cuatro veces mayor respecto al control. Las abundancias en los tratamientos C y D no difirieron significativamente entre sí, ni entre las abundancias de los tratamientos C y K, al igual que lo observado en la zona límnic, aunque la abundancia en el tratamiento D fue significativamente mayor a la del control (Figura 7.2).

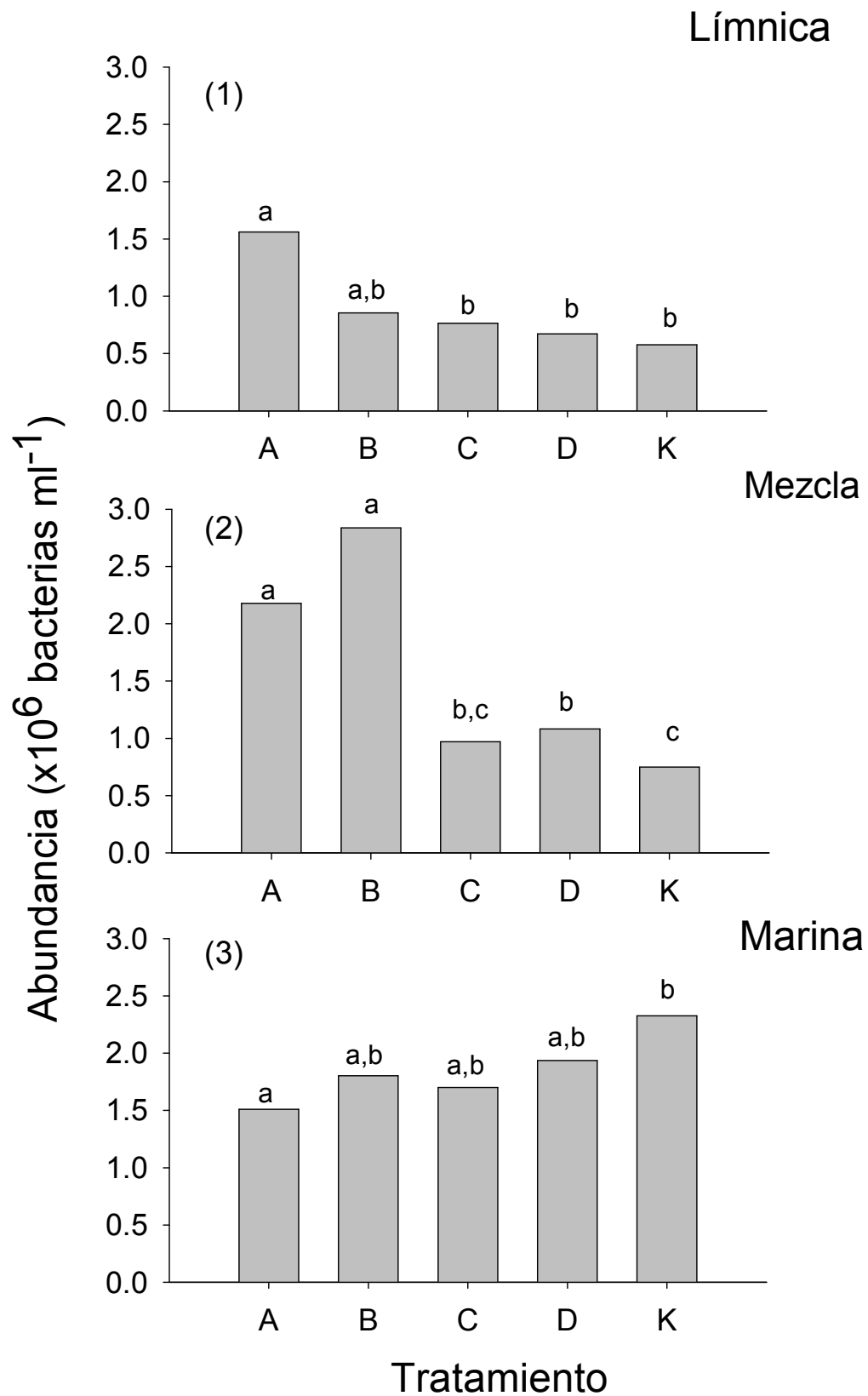


Figura 7. Abundancia bacteriana para los distintos tratamientos en las distintas regiones. A: muestra filtrada por 1.2 μm ; B: muestra filtrada por 10 μm ; C: muestra filtrada por 100 μm ; D: muestra con un número conocido de copépodos luego de filtrarla por 100 μm ; K: control. Las diferentes letras en minúscula (a, b y c) indican diferencias significativas entre las abundancias de los tratamientos para una misma zona ($p < 0.05$) dadas por el test de Tukey.

Por último, en la región marina, se observa una respuesta diferente a la observada en las demás regiones. La abundancia en el tratamiento A, fue significativamente menor a la del control ($F=2.797$ $p<0.05$), disminuyendo respecto a éste por un factor de 1.5 (Figura 7.3). En los demás tratamientos se observan variaciones no significativas entre sí, con valores similares al control (Figura 7.3).

En la figura 8 se resumen las abundancias bacterianas en respuesta a los distintos tratamientos efectuados, indicando sus aumentos y descensos respecto al control (tratamiento K). Como puede observarse, salvo en la región marina, la eliminación total de los depredadores bacterianos efectuada en el tratamiento A tuvo como consecuencia un aumento significativo de la abundancia bacteriana. En el caso del experimento realizado en la zona de mezcla, la remoción de los depredadores superiores a 10 micras (tratamiento B), también conllevó un aumento significativo en la abundancia.













Abundancia			
	Límnica	Mezcla	Marina
A			
B			
C			
D			

Figura 8. Cambios en la abundancia bacteriana respecto al control para los distintos tratamientos y regiones. Las flechas más gruesas indican aumentos o descensos significativos.

5.3 Respuesta de los distintos grupos bacterianos en los tratamientos

Las abundancias de los distintos grupos bacterianos ante los diferentes tratamientos variaron de distinta forma en cada región del gradiente ambiental evaluado (Figura 9). Dichas variaciones fueron significativas en la región de mezcla a causa de un aumento en la abundancia de las beta-*Proteobacteria* en los tratamientos A y B (Figura 9.2), y de un incremento en la abundancia de las gamma-*Proteobacteria* en el tratamiento B (Figura 9.3), respecto al control ($gl=12$ $F=2.14$ $p<0.05$).

Las alfa-*Proteobacteria* en la región límnic, tendieron a disminuir de abundancia al remover las sucesivas fracciones de la trama trófica (Figura 9.1). En la región de mezcla, se observa una mayor abundancia en los tratamientos A y B, sin embargo debido a la gran dispersión de los recuentos en las réplicas para dichos tratamientos, estas diferencias no son significativas (Figura 9.1). Finalmente, en la región marina, no se evidenciaron diferencias entre las abundancias para los distintos tratamientos, aunque la abundancia tendió a aumentar con los tratamientos, siendo máxima en el control (Figura 9.1).

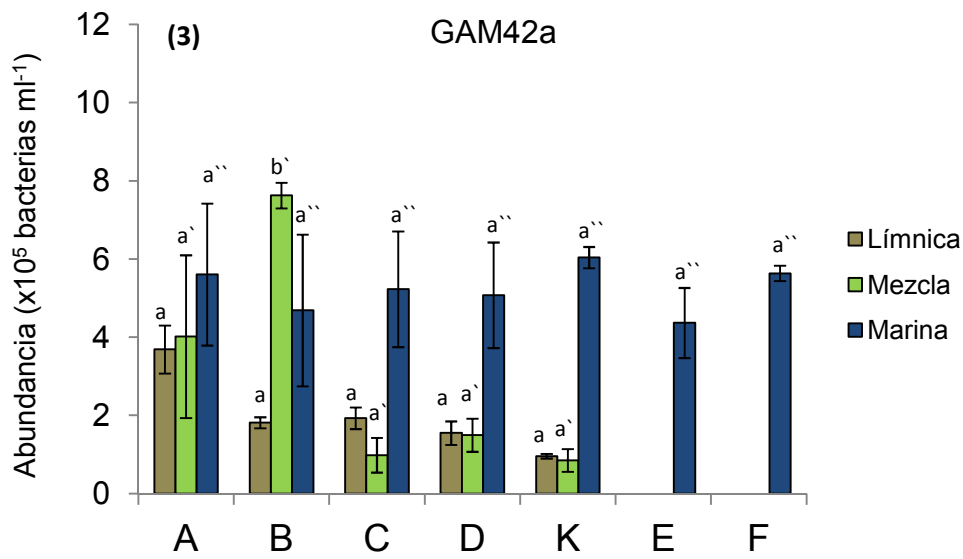
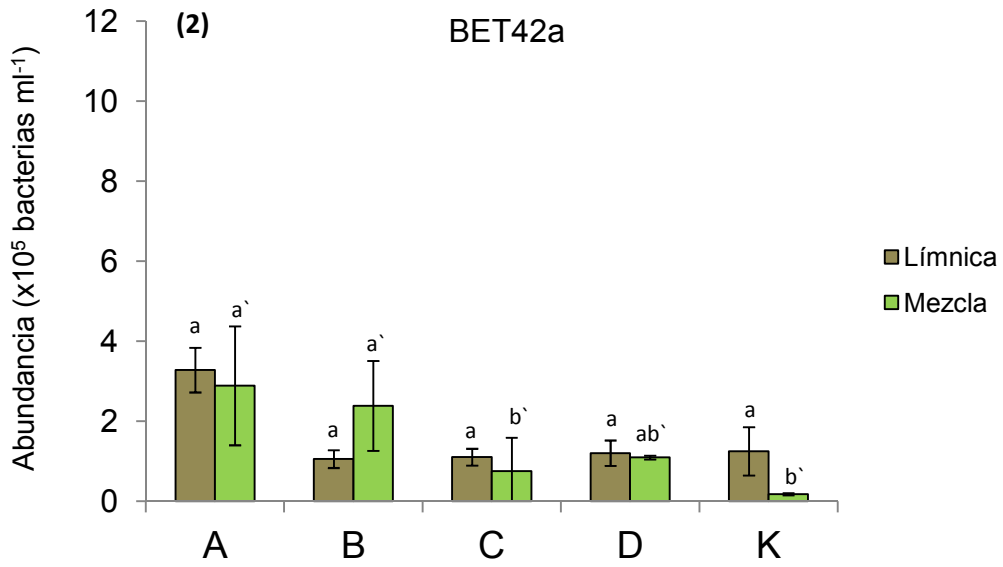
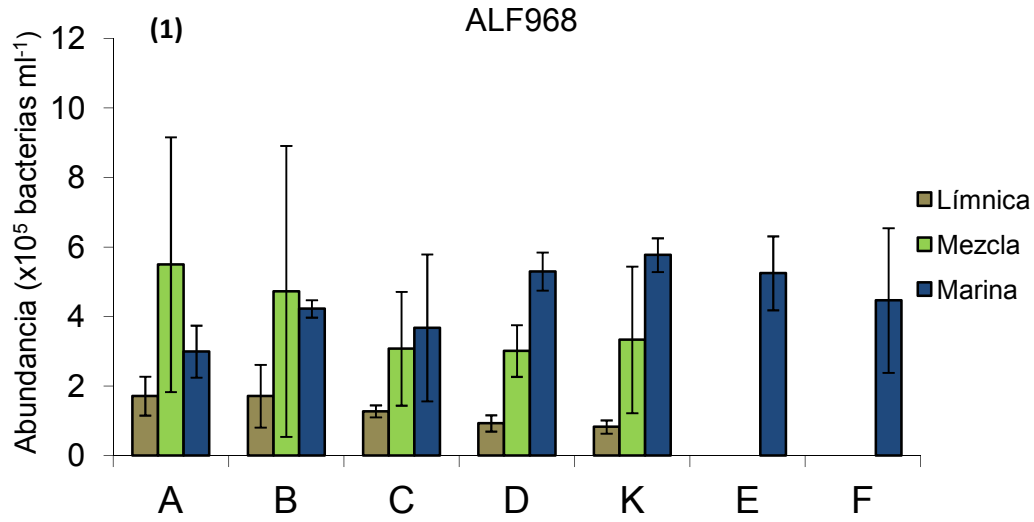
El grupo de las beta-*Proteobacteria* en la zona límnic, mostró su mayor abundancia en el tratamiento A, en tanto que en los demás tratamientos las abundancias fueron menores y con valores similares a los del control (Figura 9.2). En la región de mezcla, este grupo presentó abundancias significativamente mayores en los tratamientos A y B respecto al control (Figura 9.2), como se reportó anteriormente.

Para el caso de las gamma-*Proteobacteria*, se observa también en la región límnic el mayor valor de abundancia en el tratamiento A, mientras que en los demás tratamientos las abundancias tienden a disminuir, presentando el menor valor en el control (Figura 9.3). En la región de mezcla, se observa un incremento en los tratamientos A y B, siendo significativamente mayor la abundancia en B respecto al control, como se indicó anteriormente (Figura 9.3). En la región marina, las abundancias no variaron en los distintos tratamientos, y sus valores fueron siempre similares a los del control (Figura 9.3).

Finalmente, los *Bacteroidetes* en la región límnic presentaron su máxima abundancia en el tratamiento A, en tanto que en los demás tratamientos alcanzaron valores similares a los del control (Figura 9.4). En la región de mezcla, la abundancia en el

tratamiento A también se vio incrementada, pero en esta zona, el máximo valor se dio en el tratamiento B. Para el resto de los tratamientos las abundancias alcanzaron valores más cercanos a los del control, aunque fueron siempre superiores (Figura 9.4). En la región marina, las abundancias en todos los tratamientos fueron similares entre sí, observándose el menor valor en el tratamiento A (Figura 9.4).

Por otro lado, los resultados respecto a las diferencias en las abundancias bacterianas ante los cambios en la composición del mesozooplancton, evaluadas mediante los tratamientos D, E y F de la región marina, en los cuales luego de filtrar por 100 micras se agregó un número conocido de copépodos, noctiluca y cladóceros respectivamente, indican que no variaron significativamente entre sí ni respecto al control para ninguno de los grupos bacterianos ($gl=6$ $F=1.348$ $p>0.05$) (Figura 9).



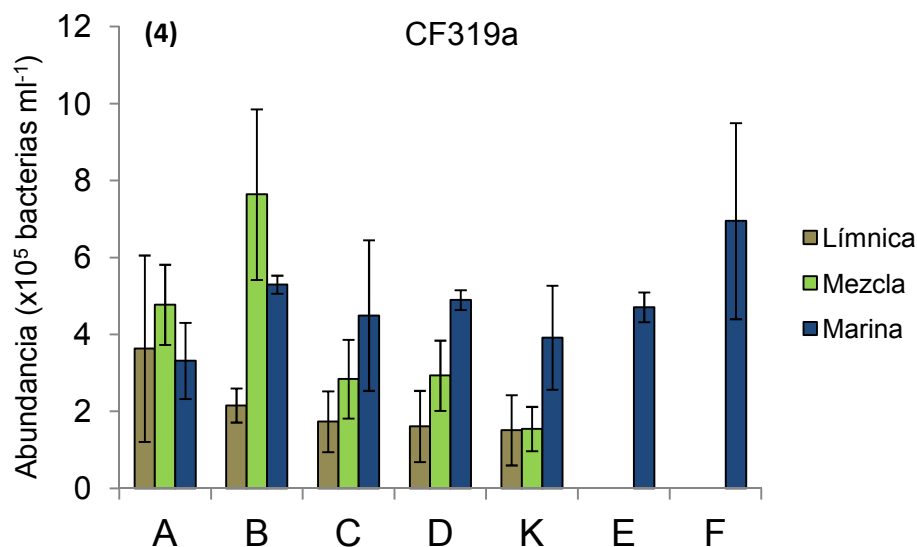


Figura 9. Abundancias bacterianas de los diferentes grupos evaluados en función de los tratamientos para los tres ambientes. ALF968: alfa-*Proteobacteria*, BET42a: beta-*Proteobacteria*, GAM42a: gamma-*Proteobacteria*, CF319a: *Bacteroidetes*. A: muestra filtrada por 1.2 μm ; B: muestra filtrada por 10 μm ; C: muestra filtrada por 100 μm ; D: muestra con un número conocido de copépodos luego de filtrarla por 100 μm ; E: muestra con un número conocido de noctilucas luego filtrarla por 100 μm ; F: muestra con un número conocido de cladóceros luego filtrarla por 100 μm ; K: control. Las diferentes letras en minúscula (a,b para la región límnica, a` b` para La región de mezcla y a`` b`` para La región marina) indican diferencias significativas entre los tratamientos de cada región ($P < 0.05$) dadas por el test de Tukey.

5.4 Composición de la comunidad bacteriana en los distintos tratamientos

La composición de la comunidad bacteriana, determinada como la abundancia relativa de los principales grupos bacterianos, fue distinta a lo largo de los diferentes tratamientos y en los distintos ambientes (Figuras 10-12).

Para la región límnica, en todos los tratamientos dominaron los *Bacteroidetes* y las gamma-*Proteobacteria*, mientras que en el control la comunidad estuvo dominada por los *Bacteroidetes* y las beta-*Proteobacteria* (Figura 10).

Las variaciones más importantes de los tratamientos con respecto al control, fueron un claro aumento en la proporción de gamma-*Proteobacteria*, y una disminución de las beta-*Proteobacteria*, especialmente en los tratamientos B y C. En el tratamiento B también se observó un aumento en la importancia relativa de las alfa-*Proteobacteria* (Figura 10).

Límnica

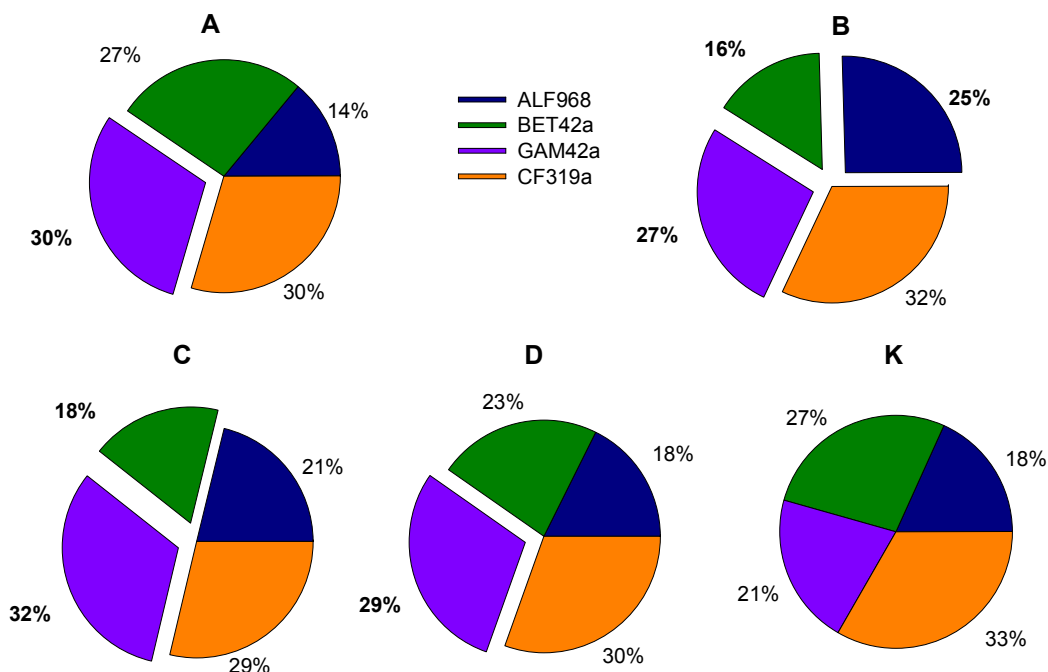


Figura 10. Composición de la comunidad bacteriana en los tratamientos realizados para la región límnica. Las porciones de las tortas separadas indican mayores cambios en la composición de la comunidad respecto al control. ALF968: alfa-*Proteobacteria*, BET42a: beta-*Proteobacteria*, GAM42a: gamma-*Proteobacteria*, CF319a: *Bacteroidetes*. A: muestra filtrada por 1.2 μm ; B: muestra filtrada por 10 μm ; C: muestra filtrada por 100 μm ; D: muestra con un número conocido de copépodos luego de filtrarla por 100 μm ; K: control.

En la región de mezcla, las alfa-*Proteobacterias* dominaron en todos los tratamientos, excepto en el B, seguidas por los *Bacteroidetes* (Figura 11).

Para esta zona, el mayor cambio respecto al control estuvo dado por una disminución en la proporción de la comunidad representada por las alfa, a expensas de los otros 3 grupos (Figura 11).

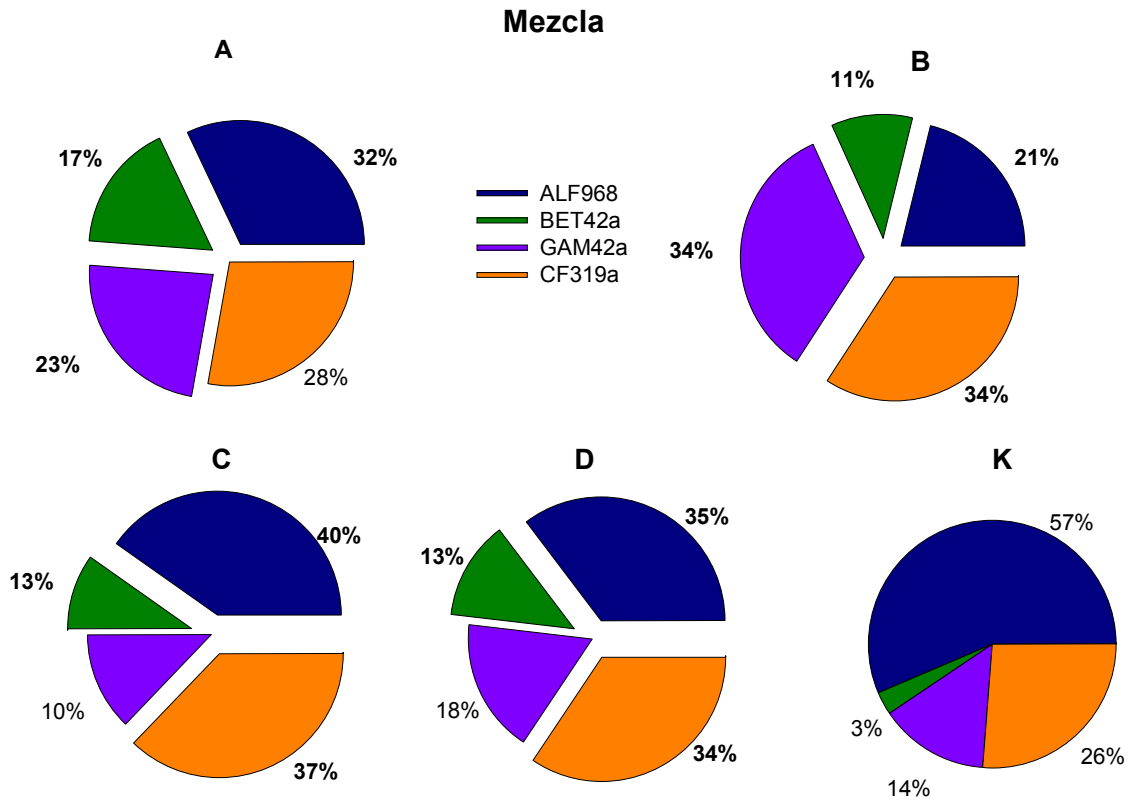


Figura 11. Composición de la comunidad bacteriana en los tratamientos realizados en la región de mezcla. Las porciones de las tortas separadas indican mayores cambios en la composición de la comunidad respecto al control. ALF968: alfa-*Proteobacteria*, BET42a: beta-*Proteobacteria*, GAM42a: gamma-*Proteobacteria*, CF319a: *Bacteroidetes*. A: muestra filtrada por 1.2 μm ; B: muestra filtrada por 10 μm ; C: muestra filtrada por 100 μm ; D: muestra con un número conocido de copépodos luego de filtrarla por 100 μm ; K: control.

En la región marina, se observaron leves cambios en la composición con respecto al control, en todos los tratamientos dominaron las gamma-*Proteobacteria* y los *Bacteroidetes* sobre las alfa-*Proteobacteria* (Figura 12).

Los mayores cambios para dicha zona se dieron en el tratamiento A donde la proporción de las gamma-*Proteobacteria* aumentó, acompañada de un descenso en la proporción de las alfa-*Proteobacteria* y *Bacteroidetes* (Figura 12).

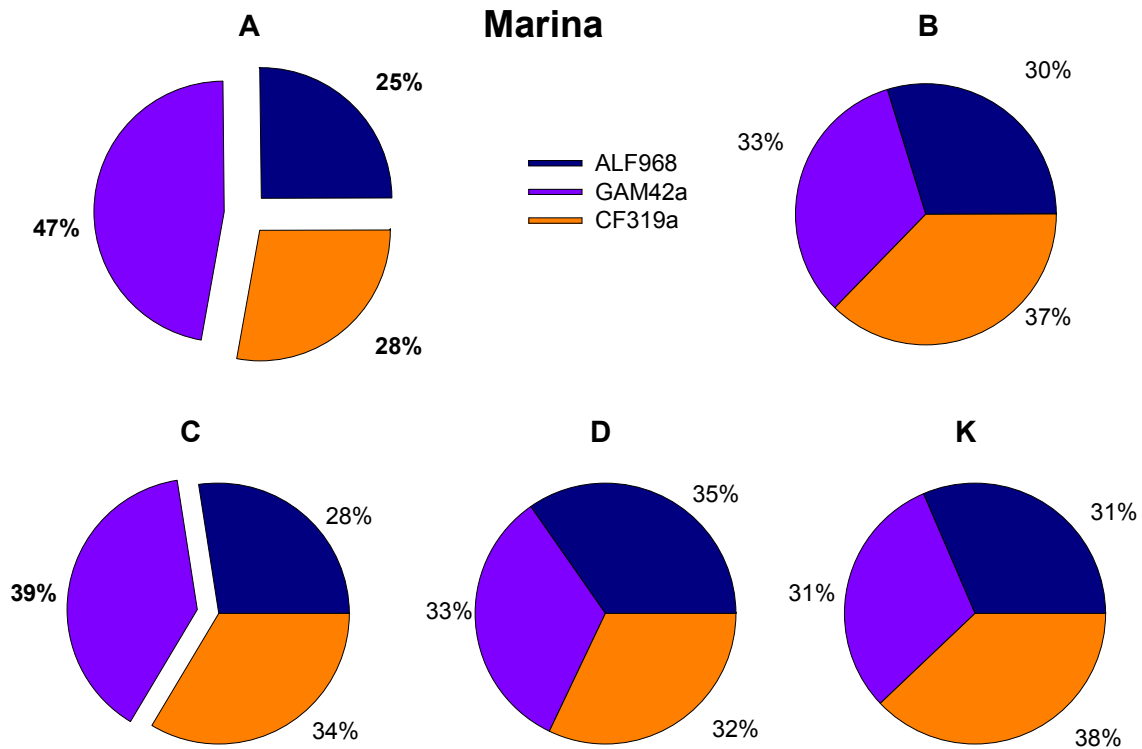


Figura 12. Composición de la comunidad bacteriana en los tratamientos realizados en la región marina. Las porciones de las tortas separadas indican mayores cambios en la composición de la comunidad respecto al control. ALF968: alfa-*Proteobacteria*, GAM42a: gamma-*Proteobacteria*, CF319a: *Bacteroidetes*. A: muestra filtrada por 1.2 µm; B: muestra filtrada por 10 µm; C: muestra filtrada por 100 µm; D: muestra con un número conocido de copépodos luego de filtrarla por 100 µm; K: control.

5.5 Producción bacteriana

Los datos de producción bacteriana indican una diferencia significativa entre los distintos ambientes evaluados ($gl=2$ $F=11.56$ $p<0.01$) (Figura 13). En el control, La producción bacteriana en la zona marina, fue significativamente mayor respecto a la región límnic y de mezcla, donde se observaron menores valores de producción sin variar significativamente entre sí ($gl= 2$, $F=11.07$, $p<0.05$).

Por otro lado, también se observa una diferencia significativa en la producción bacteriana a causa de los tratamientos, dado que sin considerar ninguna zona en particular esta fue significativamente menor en el control respecto a los demás tratamientos ($gl=4$ $F=10.72$ $p<0.01$) (Figura 13).

En la zona límnic se observa un aumento en la producción a lo largo de los tratamientos respecto al control (Figura 13.1), en donde la producción fue significativamente menor a la de los tratamientos C y D ($F=6.991$ $p<0.05$).

En la zona de mezcla también se observa un cambio significativo en la producción bacteriana, dado por un incremento en los tratamientos A y B respecto a los tratamientos C, D y K, ($F=30.07$ $p<0.01$), además la producción en B fue significativamente mayor a la de A (Figura 13.2).

En la región marina en cambio, no hubieron diferencias significativas entre las producciones de los distintos tratamientos ($F=1.422$ $p>0.05$), observándose valores similares para todos los tratamientos y entre estos y el control (Figura 13.3).

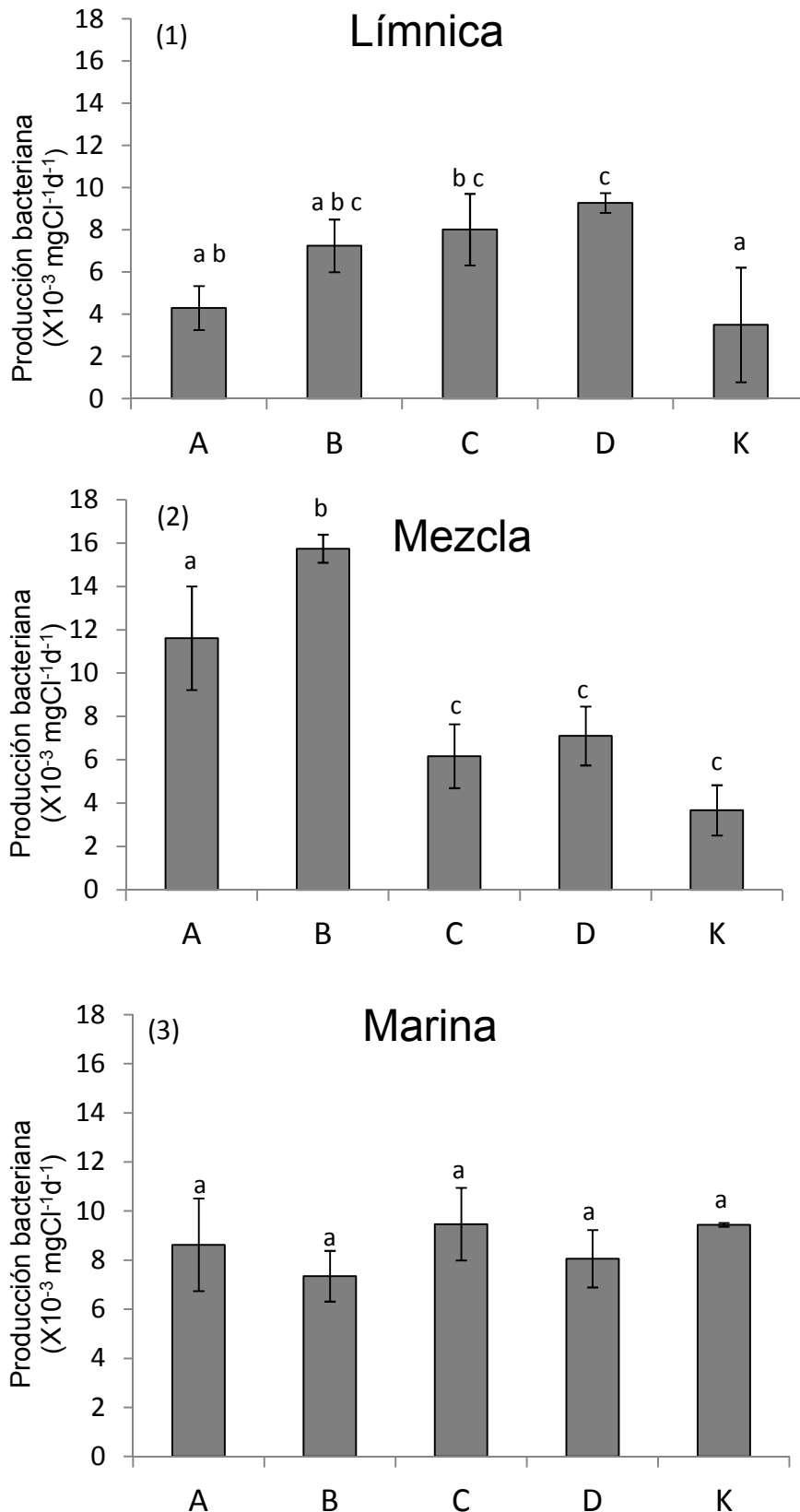


Figura 13. Producción bacteriana en las tres zonas del gradiente ambiental. A: muestra filtrada por $1.2 \mu\text{m}$; B: muestra filtrada por $10 \mu\text{m}$; C: muestra filtrada por $100 \mu\text{m}$; D: muestra con un número conocido de copépodos luego de filtrarla por $100 \mu\text{m}$; K: control. Las diferentes letras en minúscula (a, b y c) indican diferencias significativas entre las producciones de los tratamientos para una misma zona ($p < 0.05$) dadas por el test de Tukey.

En la figura 14 se esquematizan dichos resultados de producción bacteriana para los distintos tratamientos y en los tres ambientes.













Producción bacteriana			
	Límnica	Mezcla	Marina
A			
B			
C			
D			

Figura 14. Aumentos y descensos en la producción bacteriana respecto al control. Las flechas gruesas indican cambios significativos. A: muestra filtrada por 1.2 μm ; B: muestra filtrada por 10 μm ; C: muestra filtrada por 100 μm ; D: muestra con un número conocido de copépodos luego de filtrarla por 100 μm ; K: control.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluaron los efectos de la depredación sobre la abundancia, composición y producción de la comunidad bacteriana de diferentes zonas del Río de la Plata (Figura 4), mediante experimentos en los cuales la estructura de la trama trófica planctónica fue alterada fraccionando por tamaño la muestra original (Tabla 1).

Los resultados demostraron variaciones significativas en la abundancia bacteriana, asociadas a las diferencias ambientales y a las diferencias en la estructura de la red trófica alterada en cada tratamiento (Figura 7). Igualmente, se revelaron cambios significativos en la producción bacteriana respecto a las diferencias ambientales, y a las diferencias en la estructura trófica (Figura 13). También se encontraron cambios significativos en la abundancia de determinados grupos frente a cambios ambientales, y relacionados a los distintos tratamientos (Figura 9).

Los efectos observados son consistentes con respuestas previamente reportadas para comunidades bacterianas frente a la presión de la depredación. Una de las principales consecuencias de la depredación es claramente la limitación de la abundancia y biomasa bacteriana (Weinbauer & Rassoulzadegan 2004), pero también tiene efectos sobre la actividad y la producción (del Giorgio et al. 1996). Más recientemente se ha constatado que existe cierta capacidad selectiva por parte de los depredadores hacia grupos bacterianos específicos (Jürgens et al. 1999), así como también que diferentes grupos pueden diferir en sus estrategias de defensa frente a los depredadores (Pernthaler 2005), por lo que la depredación también actúa condicionando la composición de la comunidad bacteriana.

Los datos generados en este trabajo resultaron interesantes para analizar la concordancia o discordancia entre los cambios observados sobre los tres aspectos estudiados (abundancia, producción y composición), para los tratamientos efectuados. Es posible distinguir instancias en los que las tres propiedades fueron fuertemente alteradas para un tratamiento dado, como por ejemplo el tratamiento B realizado en la zona de mezcla, donde se observaron aumentos en la abundancia total, ligados a aumentos en la producción y a cambios en la composición de la comunidad (Figuras 7, 11 y 13). A diferencia de esto, para otros tratamientos como por ejemplo el tratamiento

A en la zona límnic, la abundancia aumentó significativamente, se observó un cambio a nivel de la composición, y sin embargo la producción se mantuvo constante (Figuras 7, 10 y 13), o el tratamiento C de la zona límnic, donde si bien la abundancia no varió significativamente, sí lo hicieron la composición y la producción (Figuras 7, 10 y 13).

Estos resultados indican la gran plasticidad en las respuestas de las comunidades bacterianas frente a cambios, a la vez que evidencian la necesidad de evaluar diferentes aspectos si se pretende realizar una caracterización informativa de las mismas. Por otra parte, son indicativos de que el acople/desacople entre las tres propiedades evaluadas podría estar condicionado por el ambiente, generando una hipótesis a testear en el futuro.

Para todas las zonas del gradiente, es posible concluir que en general el tratamiento A (remoción de todos los niveles superiores al bacteriano) fue el que mayor efecto tuvo sobre los tres aspectos evaluados (Figuras 7-13). Esto estaría reflejando un fuerte acople de las bacterias con el resto de la trama trófica planctónica.

Aparentemente, las alteraciones en la trama trófica en este sistema tienen un claro punto de corte en cuanto a los efectos ocasionados sobre la comunidad bacteriana, ya que dependiendo de la zona, a partir del tratamiento B ó C, ya no se observan efectos significativos sobre ninguna de las variables analizadas (Figuras. 7-13). Esto indica que, si bien en este sistema el bacterioplancton se encuentra influido por los niveles superiores, dicha influencia se limitaría hasta organismos de un tamaño menor a 100 μm . Esta observación estaría entonces en la misma línea que el patrón observado para la vía fitoplancton-zooplancton: aparentemente las cascadas tróficas son más frecuentemente observadas en sistemas de agua dulce en comparación con marinos, debido a las diferencias en la composición del zooplancton (cladóceros en lagos y copépodos en el mar) (Sommer and Sommer, 2006). Es de destacar que en el Río de la Plata los copépodos constituyen la fracción dominante del mesozooplancton (Padovani et al. 2011). Por otra parte, en nuestros experimentos, específicamente testeamos el efecto de la composición del mesozooplancton (tratamientos D, E y F realizados en la región marina), y no se obtuvieron diferencias en ninguno de los tres aspectos evaluados de las comunidades microbianas (Figura 9). De este modo, estos primeros experimentos indicarían una influencia relativamente menor del mesozooplancton sobre las comunidades bacterianas en el Río de la Plata.

Los principales depredadores bacterianos en los sistemas acuáticos, son los protistas menores a 20 μm : los nanoflagelados heterótrofos y los microciliados (Pernthaler 2005). En particular, los flagelados son considerados los depredadores más importantes de las bacterias en los sistemas marinos (Jurgens & Massana 2008). En el presente trabajo fue posible analizar distintas respuestas bacterianas en relación a diferencias en la presión de la depredación por parte de estos organismos, por ejemplo mediante las diferencias dadas en los tratamientos B y C, en donde se removieron los ciliados (presencia de flagelados) y el mesozooplankton (presencia de flagelados y ciliados) respectivamente (Figuras 7-12). Asimismo, los depredadores ejercieron distintos efectos en los diferentes ambientes evaluados, lo que sugiere que la importancia de los depredadores podría estar ligada a las diferencias ambientales.

Es posible concluir que en la zona de mezcla, el efecto de los ciliados sobre las bacterias es mayor al observado para los demás ambientes, dado que la abundancia y la producción bacteriana se vieron fuertemente impactadas en el tratamiento B (Figura 7.2 y 13.2). En la zona límnic, en cambio, las bacterias se vieron tanto impactadas en presencia de flagelados únicamente, como en presencia de ambos protistas (Figuras 7.1 y 13.1), lo que podría reflejar un mayor control por parte de los flagelados para esta zona.

Estas conclusiones se ven apoyadas con los resultados obtenidos en los experimentos de evaluación de ingesta de bacterias por parte de los flagelados (anexo 3), dado que indicaron una mayor tasa de depredación bacteriana para la zona límnic, en tanto que la zona de mezcla presentó el menor valor (ver anexo 3). El hecho de que en la zona de mezcla haya una menor presión por parte de los flagelados, podría corresponderse con una mayor depredación por parte de los ciliados. Si bien esta técnica permitió identificar a los nanoflagelados, no fue posible detectar a los microciliados, por lo que no tenemos datos directos respecto a la tasa de ingesta bacteriana de los ciliados.

Estos resultados ponen en evidencia además, una concordancia entre la mayor productividad primaria observada para la zona de mezcla (ver anexo 2), y una mayor depredación por parte de los ciliados en esta misma zona. Lo que resulta interesante porque es consistente con evidencia que reporta una mayor importancia en la depredación de las bacterias mediada por los ciliados en los sistemas más productivos (Zingel et al. 2006). A su vez, en sistemas turbios y someros aparentemente los ciliados no estarían tan controlados por el mesozooplankton (Zingel et al. 2006), lo

que podría explicar el desacople observado con los organismos de los niveles tróficos mayores a 100 μm .

El balance entre los factores de regulación bacterianos *top-down*, representados por la depredación y entre los factores *bottom-up*, como la disponibilidad de nutrientes o las condiciones fisicoquímicas del ambiente, es un tema complejo que presenta cierta controversia.

Se ha postulado que para los sistemas más oligotróficos, el control efectuado por la depredación es más importante que para los ambientes más eutróficos, donde el control por la disponibilidad de nutrientes es mayor (Gasol et al. 2002b). Esto es debido a que el acople entre las bacterias y los depredadores en los sistemas oligotróficos es más ajustado que en los sistemas eutróficos, dado que a medida que aumentan los nutrientes en un sistema la abundancia de las bacterias aumenta más deprisa que la de sus depredadores, por lo que el acople depredador-presa se ve relajado y la importancia de la depredación disminuye.

En este trabajo, las diferencias entre estos distintos factores de regulación bacteriana observadas para los distintos ambientes evaluados, permiten llegar a una conclusión preliminar respecto a dicho balance para el Río de la Plata.

La zona marina, fue la única zona que no mostró variación en las respuestas bacterianas, tanto a nivel de abundancia, producción y composición de sus comunidades (Figuras 7.3, 9, 12 y 13.3), lo que está indicando un reducido control por parte de la depredación. Esta conclusión junto al resultado que indicó una menor concentración de nutrientes en la región marina (ver anexo 1) va en contra de lo propuesto por Gasol, respecto a un control más ajustado por los depredadores en los sistemas más oligotróficos. Una posible explicación a esto, pudo haber sido la actuación de otro factor con mayor importancia que la depredación, sobre las comunidades bacterianas, ligado presumiblemente a un aumento en la disponibilidad de los nutrientes, dado por la manipulación experimental. Los efectos de la depredación, por lo tanto, no se vieron para esta zona dado que este efecto aparentemente benefició enormemente a dichas comunidades.

En condiciones experimentales similares a las utilizadas en el presente trabajo, suele darse un fenómeno denominado “efecto botella”, cuya explicación no se conoce con exactitud, aunque se presume que lleva a un incremento en la disponibilidad de

nutrientes (Pernthaler & Amann 2005), así como a otros fenómenos que favorecen a los organismos como la simplificación de la red trófica debido a la filtración y la eliminación de factores de incidencia desconocida como pueden ser las turbulencias. Este fenómeno, pudo haber favorecido más a las comunidades bacterianas de la zona marina, dado que fue la región con menor concentración de nutrientes, mientras que los demás ambientes son originalmente más ricos en nutrientes (Ver anexo 1). Por otro lado, es posible que el tiempo de incubación del experimento haya sido muy elevado (48 h), viéndose acentuado el efecto botella. De esta manera, una conclusión que surge de este trabajo es la recomendación de incubar por menos tiempo, por ejemplo por 24 h o inclusive por un tiempo menor para experimentos similares realizados en este ambiente.

El análisis de las respuestas a nivel de grupos bacterianos, reveló diferencias entre los mismos. En el global de los tratamientos y para las 3 zonas, las gamma-*Proteobacteria* aparecieron como el grupo que respondió más fuertemente a los tratamientos, aumentando su contribución a la comunidad microbiana con respecto al control (Figuras 10-12). Esta observación, no resulta únicamente de aumentos en su abundancia absoluta (Figura 9), sino de descensos concomitantes en la proporción de la comunidad representada por otros grupos, típicamente las alfa-*Proteobacteria* (Fig. 10-12). Estos resultados se corresponden con características ecofisiológicas que presentan los miembros de estas clases. A saber, ciertos miembros de la clase gamma-*Proteobacteria* (ej, *Alteromonas* spp.) son conocidos como estrategias r de rápido crecimiento, capaces de crecer muy rápidamente y llegar a dominar la comunidad cuando se generan cambios ambientales (Pernthaler & Amann, 2005). A modo de ejemplo, diferentes miembros de esta clase han sido reportados como transitoriamente dominantes en los más diversos sistemas como por ejemplo en el Mar Mediterráneo (Alonso-Sáez et al. 2007), lagunas costeras (Piccini et al. 2006, Simonato et al. 2010), océano abierto (Schattenhofer et al. 2009), e inclusive en una estación externa del propio Río de la Plata (Alonso et al. 2010).

Por el contrario, los miembros más ubicuos de las alfa-*Proteobacteria*, los organismos del clado SAR11, que por lo general dominan los sistemas marinos y estuarinos (Morris et al. 2002, Kirchman et al. 2005), incluyendo el Río de la Plata (Alonso et al., 2010), exhiben pequeños tamaños (ver anexo 4) y bajísimas tasas de crecimiento (Rappe et al., 2002), basadas en el consumo de sustratos simples (monómeros) y en bajas concentraciones (Malmstrom et al., 2004, Alonso & Pernthaler 2006b). Otra diferencia fundamental entre miembros representativos de estas dos clases, es que

mientras las gamma-*Proteobacteria* son fácilmente cultivables en condiciones de laboratorio (Eilers et al. 2000), constituyendo lo que se denomina “lab-weeds”, el aislamiento de la alfa-*Proteobacteria* representativa fue extremadamente laborioso, e implicó el uso de metodologías *ad hoc* (Rappe et al. 2002). Esta diferencia es posiblemente la causa por la cual, en general, en todos los tratamientos la proporción de gamma-*Proteobacteria* aumentó en relación al control, como parte del fenómeno conocido como “efecto botella”, mediante el cual la composición de las comunidades microbianas al ser confinadas se desplaza hacia la predominancia de miembros de grupos capaces de rápido crecimiento, que generalmente se encuentran en baja abundancia en los sistemas naturales (Pernthaler and Amann, 2005).

Interesantemente, las beta-*Proteobacteria* presentan un patrón de reducción en la proporción que constituyen en la comunidad al introducir los dos siguientes niveles tróficos (tratamientos B y C). En particular, es notorio, sobre todo en la región límnic, que en presencia de los depredadores, la proporción de beta-*Proteobacteria* en la comunidad disminuye (Figuras 10-11), indicando que estos organismos estarían siendo los mayormente afectados por la presión de la depredación en las zonas de influencia de agua dulce. La distribución de las beta-*Proteobacteria* aparece normalmente restringida a sistemas de agua dulce, donde suelen ser dominantes, como por ejemplo en la zona límnic de lagunas costeras en Uruguay (Alonso et al. 2009). Estudios previamente realizados en el arroyo y laguna de Rocha también indican que este grupo estaría fuertemente controlado por los depredadores en la zona de agua dulce (Alonso et al. 2008). Es interesante que en contraposición, en la zona de mezcla este grupo no parece estar tan afectado por la depredación, ya que su contribución a la comunidad bacteriana en los tratamientos B y C se ve relativamente poco alterada con respecto al tratamiento A (Figuras 10-11).

Se destaca, por último, el comportamiento observado para el grupo de los *Bacteroidetes*, quienes presentaron leves cambios en el global de los tratamientos (Figuras 10-12), y en particular para la región límnic mostraron siempre la misma contribución a la comunidad bacteriana (Figura 10). Estas observaciones son concordantes con evidencia de que este grupo posee mecanismos de resistencia ante la depredación, que implica la formación de filamentos (Pernthaler et al. 2004), lo que podría explicar el leve impacto de la depredación sobre este grupo. Dichas respuestas (Pernthaler et al. 2004), se dieron además para una laguna mesotrófica lo que concuerda también con la observación de que el menor impacto de la depredación para el grupo de los *Bacteroidetes* en este trabajo fue en la zona límnic.

Se concluye de todo esto, que las diferencias en la composición de la comunidad bacteriana, fueron debidas a un aprovechamiento diferencial de los recursos, y en parte a diferencias en la susceptibilidad ante la depredación, dada por ejemplo por diferencias en tamaños celulares o por diferencias en la capacidad para formar estructuras de resistencia.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La comunidad bacteriana del Río de la Plata se encuentra fuertemente acoplada al resto de la trama trófica planctónica, especialmente hasta organismos menores de 100 μm .

Las alteraciones en la composición de la trama trófica planctónica repercuten fuertemente en la abundancia, producción y composición de la comunidad bacteriana del Río de la Plata.

El gradiente ambiental influye en la relación del bacterioplancton con el resto de los componentes del plancton.

En la zona de la mezcla es donde se observaron los mayores efectos de la depredación sobre las tres características estudiadas, mientras que en la región marina, posiblemente el efecto de la manipulación experimental (presumiblemente aumentando la disponibilidad de nutrientes) fue más importante a la hora de explicar las alteraciones observadas.

Aparentemente, según la zona del gradiente cambia la importancia relativa de los grupos de depredadores bacterianos: en la región límnic serían los nanoflagelados heterótrofos y en la zona de mezcla, los microciliados.

Los diferentes grupos bacterianos respondieron en forma diferencial a las alteraciones en la trama trófica planctónica: las *Proteobacteria* de las clases beta y gamma aparecen como los grupos más afectados por las alteraciones, en especial las beta-*Proteobacteria* estarían fuertemente controladas por los depredadores en la zona límnic. Las alfa-*Proteobacteria* y los *Bacteroidetes* fueron menos sensibles a estas alteraciones.

La evaluación de las comunidades bacterianas con la técnica CARD-FISH, fue útil para revelar un patrón de diversidad general de los principales grupos bacterianos en el estuario Río de la Plata, Sin embargo, dadas las características metodológicas

(recuento al microscopio) la evaluación se realizó a un nivel filogenético muy grueso (Filo, clases), con lo cual no es posible tener el detalle de las variaciones de poblaciones más específicas. Teniendo en cuenta la enorme diversidad ecofisiológica de estos organismos, sería deseable e interesante realizar estas evaluaciones con un mayor nivel de resolución, por ejemplo mediante el empleo de secuenciación masiva.

Por otra parte, estos resultados son preliminares, derivados de un único experimento, por lo que para lograr una comprensión más exacta del balance entre los distintos factores involucrados en el control de las comunidades bacterianas en este sistema, sería deseable realizar más experimentos en diferentes campañas que contemplen, por ejemplo, posibles variaciones estacionales.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1: Determinación de nutrientes

Para la determinación de los nutrientes disueltos en las muestras de agua, las muestras fueron filtradas a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C. Las mediciones de las concentraciones de los nutrientes inorgánicos para cada estación, incluyeron fracciones disueltas de nitrito (NO_2) (Strickland & Parsons 1972), nitrato (NO_3) (Eaton et al. 2005), amonio (NH_4) (Koroleff 1976), fósforo reactivo soluble (PO_4) (Murphy & Riley 1962) y sílice reactivo (SiO_3). Las concentraciones de nutrientes fueron determinadas colorimétricamente empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101 PC, UV-VIS Scanning.

Tabla 3. Nutrientes evaluados para las tres zonas del gradiente. NH_4 : amonio, NO_2 : nitrito, NO_3 : nitrato, PO_4 : fosfato, SiO_3 : sílice reactivo, NID ($\text{NH}_4 + \text{NO}_2 + \text{NO}_3$): nitrógeno inorgánico disuelto, N: nitrógeno, P: fósforo.

	NH_4 (μM)	NO_2 (μM)	NO_3 (μM)	PO_4 (μM)	SiO_3 (μM)	NID (μM)	N:P
Zona							
límpnica	3.78	0.69	17.74	1.74	24.44	22.09	12.73
Zona de							
mezcla	1.81	0.39	0.00	0.65	59.34	2.20	3.40
Zona							
marina	1.42	0.24	0.00	0.83	13.31	1.66	1.99

En la tabla 3 se aprecia un gradiente de nutrientes para los distintos ambientes evaluados, correspondiéndose los menores valores para la zona marina, en tanto que la zona límpnica presentó la mayor concentración.

8.2 Anexo 2: Estimación de la producción primaria

Fuente (Calliari et al datos no publicados)

La producción primaria se estimó midiendo la incorporación de ^{14}C fotosintética acorde con Steeman-Nielsen (1952) y la modificación del método de acidificación-burbujeo (Gätcher et al. 1984). 20 mL de muestra de agua superficial *in situ* fueron incubados en seis viales de centelleo con $3\mu\text{Ci}$ (carbono inorgánico en forma de HCO_3), en oscuridad, a temperatura *in situ* y bajo tres niveles de irradiación representativos de las condiciones de luz en la capa de mezcla superficial. Las incubaciones se hicieron lo más rápido posible luego de que el agua fue colectada (< 15 min). Un vial control fue también incubado y procesado como se describió para las muestras estándar. Luego de 30 min, se detuvo la fotosíntesis fijando las muestras con formaldehído y se les agregó 100 μl de HCl para que el descenso del pH permita la transformación a CO_2 del carbono radiactivo que no fue incorporado. Posteriormente, las muestras fueron burbujeadas durante 30 minutos en una campana para acelerar la remoción del CO_2 .

Al finalizar el burbujeo, se les agregó 5 mL de un coctel de centelleo ReadyGel Beckman midiendo luego de 2 hs la radioactividad en un contador de centelleo ReadyGel Beckman. La estimación de la producción primaria volumétrica para la capa de mezcla superficial se obtuvo como el promedio aritmético de los valores de producción para los tres niveles de irradiación medidos.

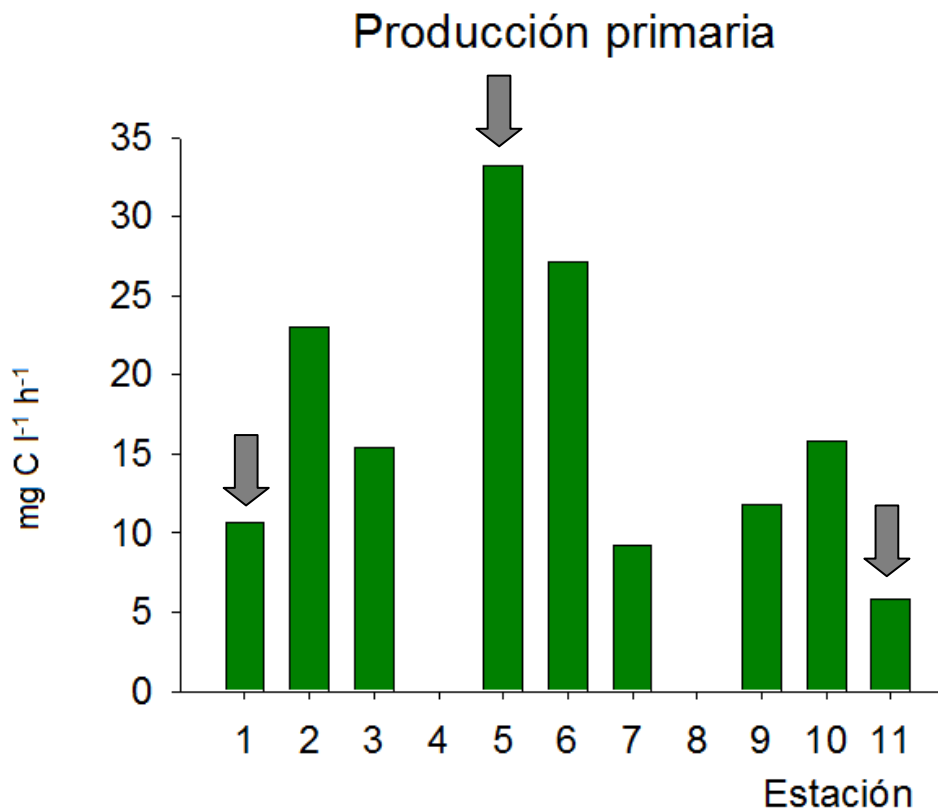


Figura 15. Producción primaria para las distintas estaciones del gradiente ambiental. Las flechas indican las estaciones 1,5 y 11 correspondientes a la zona límnic, de mezcla y marina respectivamente, donde se realizó el experimento para el presente trabajo.

Se observa un incremento en la producción primaria para la zona de mezcla (estación 5), luego le sigue la zona límnic (estación 1), en tanto que en la región marina se dio el menor valor.

8.3 Anexo 3: Estimación de la ingesta bacteriana por nanoflagelados

La tasa de ingesta de las bacterias por parte de los flagelados, se evaluó empleando una técnica que utiliza bacterias marcadas fluorescentemente (FLB: fluorescently labeled bacteria) como trazadores (Vaqué et al. 1999).

Las incubaciones de las FLBs se realizaron a temperatura *in situ*, en 50 mL de muestra de agua, en cuatro tiempos diferentes para cada zona evaluada del gradiente (t=0 min, t=10 min, t=20 min y t=30 min), y se realizaron dos réplicas por tiempo evaluado. Pasado el tiempo correspondiente las muestras fueron fijadas con paraformaldehído 2% y finalmente se filtraron por filtros con un tamaño de poro de 0,8 μm .

Se contaron 50 flagelados por muestra al microscopio de epifluorescencia, de los cuales se registró también la cantidad de las FLBs ingeridas. Luego se estimó la tasa de ingesta bacteriana por protista, calculada como FLB ingerida por protista por hora (Figura 16).

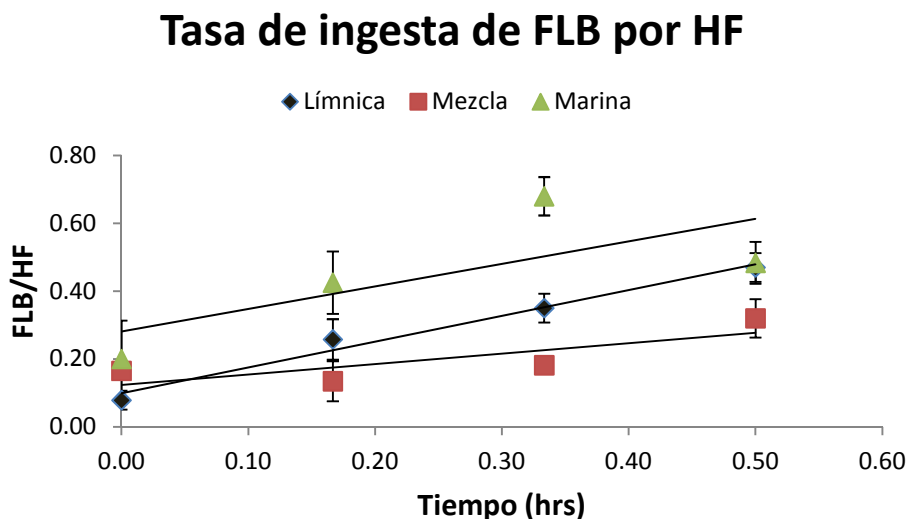


Figura 16. Tasa de ingesta de FLB (fluorescently labeled bacteria) por flagelado heterótrofo (HF), en función del tiempo y para cada zona evaluada.

Se observan las diferencias en las tasas de ingesta de FLBs por flagelado (HF) para cada zona. En la región límnic se observa una mayor ingesta, con una pendiente de 0.76; luego le sigue la zona marina con una pendiente de 0.66; mientras que en la mezcla, se dio el menor valor de ingesta, correspondiéndose con una pendiente de 0.07.

8.4 Anexo 4: Fotos de los grupos bacterianos evaluados

En las siguientes fotos tomadas con el microscopio de epifluorescencia, es posible observar las diferencias en tamaños de los distintos grupos bacterianos evaluados. Dichas diferencias son resultado de características ecofisiológicas que presentan los miembros de estas clases, por ejemplo como se señaló anteriormente se aprecia el pequeño tamaño de las *alfa-Proteobacteria* a diferencia del gran tamaño que presentan las *gamma-Proteobacteria*.

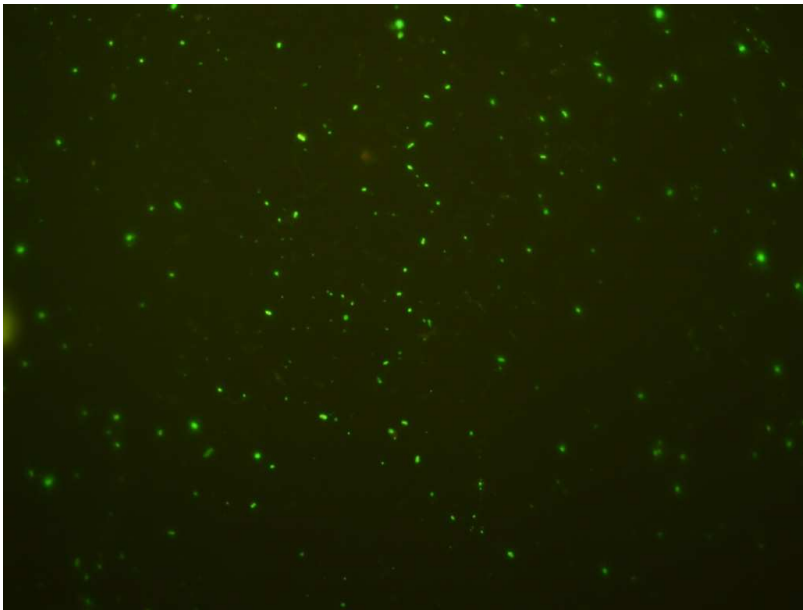


Figura 17. Alfa-*Proteobacteria* (ALF968)

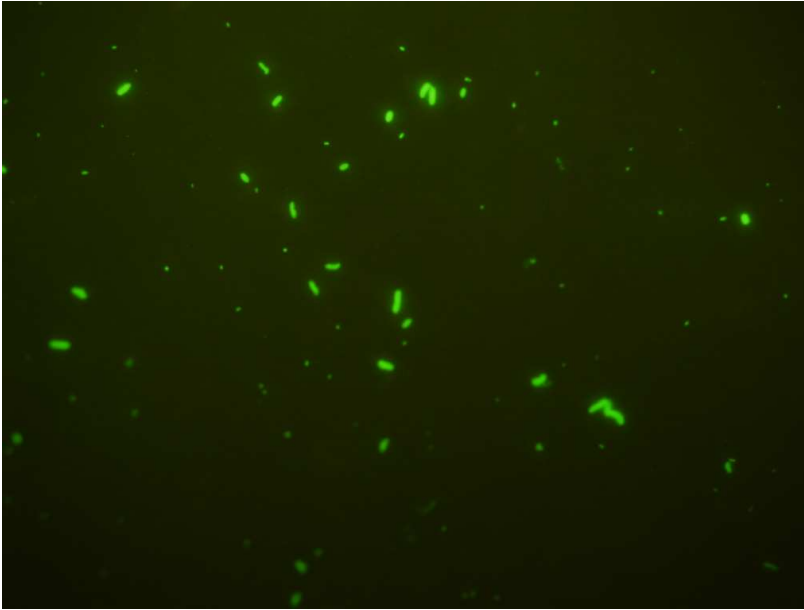


Figura 18. *Gamma-Proteobacteria* (GAM42a)

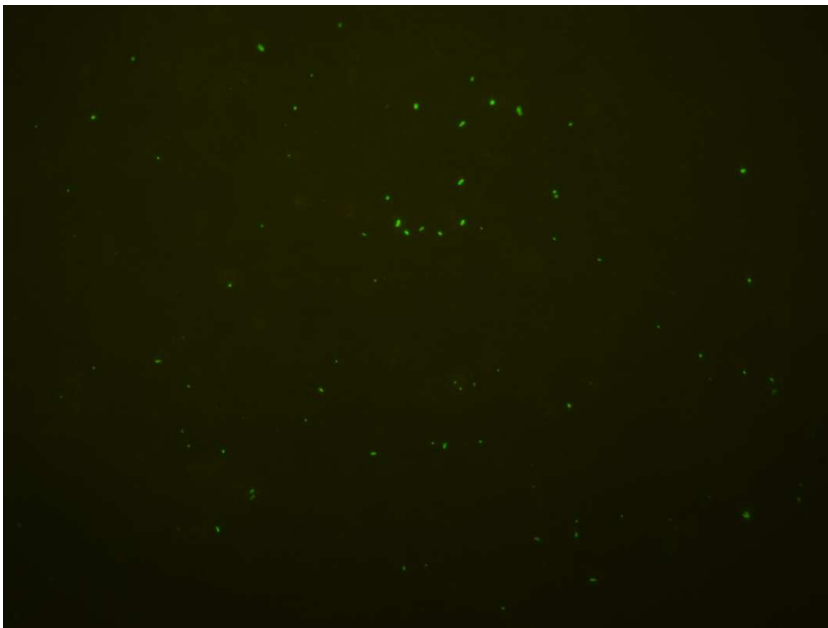


Figura 19. *Beta-Proteobacteria* (BET 42a)

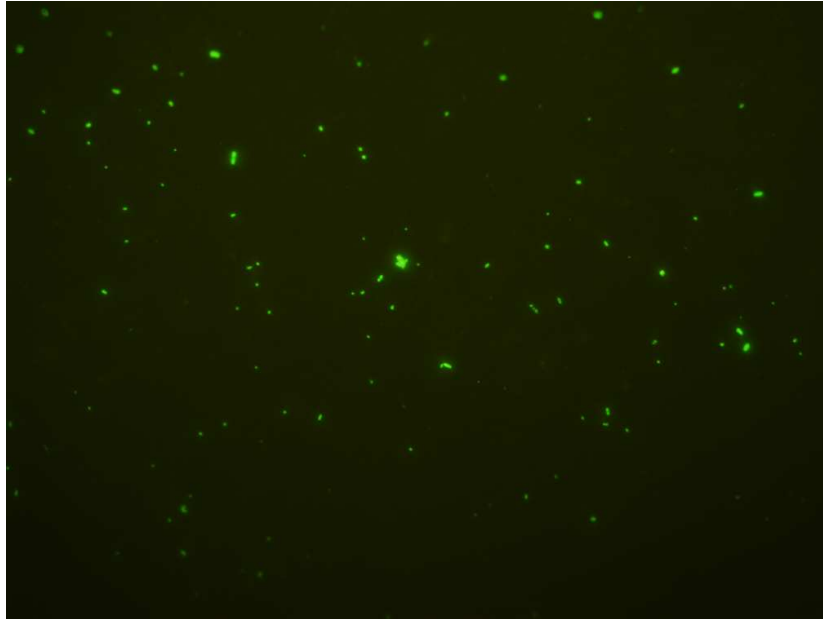


Figura 20. *Bacteroidetes* (CF319a)

9. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primero lugar a mi tutora Cecilia Alonso, por su calidad en trasmitirme sus sabios consejos que me permitieron realizar este trabajo, y por su constante paciencia.

Le agradezco también a Fernando Unrein, de Chascomús, por su dedicación enseñándome una técnica que fue un aporte para mi formación.

A mis padres, por sus valores, apoyo y confianza transmitidos a lo largo de toda mi carrera. A mis hermanas, quienes son mi mejor ejemplo de esfuerzo a seguir, para alcanzar los logros que uno más quiera. A Carlitos, por brindarme siempre su amor, comprensión, y por ser mi refugio preferido cuando parece que nada sale bien.

Les agradezco también a mis amigos, quienes estuvieron y estarán siempre, en las buenas y en las malas, y en especial a mis amigos de facultad por ser de lo mejor que me pasó a lo largo de mi carrera.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, C., Gomez-Pereira, P.R., Ramette, A., Ortega, L., Fuchs, B.M., and Amann, R. 2010. Multilevel analysis of the bacterial diversity along the environmental gradient Río de la Plata-South Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 61: 57-62.
- Alonso, C., Zeder, M., Piccini, C., Conde, D., and Pernthaler, J. 2009. Ecophysiological differences of betaproteobacterial populations in two hydrochemically distinct compartments of a subtropical lagoon. *Environmental Microbiology* 11: 867-876.
- Alonso, C., Piccini, C., Conde, D., and Pernthaler, J. 2008. Respuesta del bacterioplancton frente a cambios en la fuente de carbono orgánico disuelto en lagunas costeras de Uruguay. In *Informe final proyecto PDT 63/190*, p. 45.
- Alonso, C., and Pernthaler, J. 2006 a. Roseobacter and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology* 8: 2022-2030.
- Alonso, C., and Pernthaler, J. 2006 b. Concentration-dependent patterns of leucine incorporation in coastal picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2141-2147.
- Alonso-Sáez, L., V. Balagué, E. Sà, O. Sánchez, J. M. González, J. Pinhassi, R. Massana, J. Pernthaler, C. Pedrós-Alió, and J. M. Gasol. 2007. Seasonality in bacterial diversity in NW Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60:98-112.
- Amann, R. I., Krumholz, L., and Stahl, D.A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172: 762-770.
- Amann, R.I. 1995. In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA targeted nucleic acid probes. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 3.3.6, 1–15.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil, and F. Thingstad 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Azam, F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* 280: 694-696.
- Barberán, A., and Casamayor, E.O. 2010. Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology* 59: 1-10.

- Beardsley, C., Pernthaler, J., Wosniok, W., and Amann, R. 2003. Are readily cultured bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2624-2630.
- Cole, J.J., Findlay, S., and Pace, M.L. 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross system overview. *Marine Ecology Progress Series* 43: 1-10.
- Cottrell, M.T., and 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. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1692-1697.
- Cottrell, M. T. and Kirchman, D. L. 2003. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* 48: 168–178.
- del Giorgio, P.A., Gasol, J.M., Vaqué, D., Mura, P., Agustí, S., and Duarte, C.M. 1996. Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnology and Oceanography* 41: 1169-1179.
- del Giorgio, P. A. and Duarte, C. M. 2002. Respiration in the open ocean. *Nature* 420:379-84.
- Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., and Franson, M.A.H., eds. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: Centennial Edition*.
Washington DC, USA: American Public Health Association.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F.O., and Amann, R. 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3044-3051.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glöckner, F.O., Gerds, G., and Amann, R. 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contribution to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5134-5142.
- Feely, R.A., Sabine, C.L., Takahashi, T., and Wanninkhof, R. 2001. Uptake and Storage of Carbon Dioxide in the Ocean: The Global CO₂ Survey. *Oceanography* 14: 18-32.
- Fonda-Umani, S., A. Beran, J. Parlato, D. Virgilio, T. Zollet, A. de Olazabal, B. Lazzarini & M. Cabrini. 2004. *Noctiluca scintillans* (Macartney) in the northern Adriatic Sea: long-term dynamics, relationships with temperature and eutrophication, and role in the food web. *J. Plankton Res.*, 26(5): 545-561.

- Fouilland Eric and Behzad Mostajir. 2010. Revisited phytoplanktonic carbon dependency of heterotrophic bacteria in freshwaters, transitional, coastal and oceanic waters. *Fems Microbiology Ecology* 73: 419-429.
- Fuchs, B.M. 1998. Entwicklung von durchflußzytometrischen Methoden zur Analyse der Diversität und Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften des Wassers. In Lehrstuhl für Mikrobiologie. München: Technische Universität München, p. 122.
- Fuhrman, J.A., McCallum, K., and Davis, A.A. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* 356: 148-149.
- Gasol, J.M. 1994. A framework for the assessment of *top-down* vs *bottom-up* control of heterotrophic nanoflagellate abundance. *Marine Ecology-Progress Series* 113: 291-300.
- Gasol, J.M., Pedros-Alio, C., and Vaqué, D. 2002. Regulation of bacterial assemblages in oligotrophic plankton systems: results from experimental and empirical approaches. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 435-452.
- Gatcher R, A Mares and MM Tilzer. 1984. Determination of phytoplankton production by the radiocarbon method: a comparison between the acidification and bubblingmethod (ABM) and the filtration technique. *J. Plankton Res.* 6: 359-364
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., and Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63
- Glöckner, F.O., Fuchs, B.M., and Amann, R. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3721-3726.
- Gómez-Pereira P. R., Fuchs B. M; Alonso C; Oliver J. M; Beusekom J. E. E; and Amann R. 2010. Distinct flavobacterial communities in contrasting water masses of the North Atlantic Ocean. *ISME J.* 4:472–487.
- González, J.M., Sherr, E.B., and Sherr, B.F. 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 583-589.
- Gonzalez, J. M. 1999. Bacterivory rate estimates and fraction of active bacterivores in natural protist assemblages from aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1463-1469.
- Hedges, J.I., Eglinton, G., Hatcher, P.G., Kirchman, D.L., Arnosti, C., Derenne, S. et al. 2000. The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. *Org. Geochem.* 31: 945-958.

- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., and Amann, R. 1999. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1241-1250.
- Jürgens, K. and Massana, R. 2008. Protistan Grazing on Marine Bacterioplankton, in *Microbial Ecology of the Oceans, Second Edition* (ed D. L. Kirchman), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470281840.ch11.
- Katechakis, A., Stibor, H., Sommer, U. and Hansen, T. (2002) Changes in the phytoplankton community and in the microbial food web of Blanes Bay (Catalan Sea, NW Mediterranean) under prolonged grazing pressure by doliolids (Tunicata), cladocerans or copepods (Crustacea). *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 234, 55–69.
- Kirchman, D. 2001. Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. In *Methods in Microbiology*. Paul, J.H. (ed). London: Academic Press, pp. 227-237.
- Kirchman, D.L., A. I. Dittel, R.R., Malmstrom, and Cottrell., M.T. 2005. Biogeography of major bacterial groups in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* 50: 1697-1706.
- Kirchner, M., Sahling, G., Uhlig, G., Gunkel, W. and Klings, K.-W. (1996) Does the red tide-forming dinoflagellate *Noctiluca scintillans* feed on bacteria? *Sarsia*, 81, 45-55
- Koroleff, F. 1976. Determination of ammonia. Pages 126-133 in Grasshoff, K., editor. *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Kurucz Américo, Arianna Masello, Silvia Méndez, Ray Cranston and Peter G. Wells. 1998. Calidad ambiental del Río de la Plata. En P. G. Wells y G. R. Daborn. (Eds) 1998. *El Río de la Plata. Una Revisión Ambiental. Un informe de Antecedentes del Proyecto EcoPlata*. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. 256 pp.
- López Laborde J., 1998. Marco geomorfológico y geológico del Río de la Plata. En P. G. Wells y G. R. Daborn. (Eds) 1998. *El Río de la Plata. Una Revisión Ambiental. Un informe de Antecedentes del Proyecto EcoPlata*. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. 256 pp.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. Brock *Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid, 2003
- Malmstrom, R.R., Kiene, R.P., Cottrell, M.T., and Kirchman, D.L. 2004. Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4129-4135.
- Morris, R.M., Rappe, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., and Giovannoni, S.J. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420: 806-810.

- Mostajir B, Dolan JR, Rassoulzadegan F. 1995. A simple method for the quantification of a class of labile marine pico- and nano-sized detritus: DAPI Yellow Particles (DYP). *Aquat microb Ecol* 9:259-266.
- Murphy J, Riley J. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemical Acta* 27: 31-36.
- Nakamura Yasuo (1998). Growth and grazing of a large heterotrophic dinoflagellate, *Noctiluca scintillans*, in laboratory cultures. *Journal of Plankton Research*, 20 (9): 1711-1720.
- Pace, M. L. & Cole, J. J. 1994. Comparative and experimental approaches to *top-down* and *bottom-up* regulation of bacteria. *Microb. Ecol.* 28, 181–193
- Padovani, L.N., Vinas, M.D., and Pajaro, M. 2011. Importance of the Río de la Plata estuarine front (southwestern Atlantic Ocean) in the feeding ecology of Argentine anchovy, *Engraulis anchoita* (Clupeiformes, Clupeidae). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 39 205-213.
- Palacios, C., Olsson, B., Lebaron, P., and Sogin, M.L. 2006. New high-throughput biotechnologies for sampling the microbial ecological diversity of the oceans: the informatics challenge. In *Proceedings 'Ocean Biodiversity Informatics' – International Conference on Marine Biodiversity Data*. Vanden Berghe, E.e.a. (ed). Hamburg, Germany
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann R. 2002. Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. Environ.* 68, 3094-3101.
- Pernthaler, J., Zöllner, E., Warnecke, F., and Jürgens, K. 2004. Blooms of filamentous bacteria in a mesotrophic lake: Identity and potential controlling mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6272-6281.
- Pernthaler J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol.* 3:537–546
- Pernthaler, J., and Amann, R. 2005. Fate of Heterotrophic Microbes in Pelagic Habitats: Focus on Populations. *Microbiology and molecular biology reviews* 69: 440–461.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Schönhuber, W., and Amann, R. 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In *Methods In Microbiology*. Paul, J.H. (ed): Academic Press, San Diego, pp. 207-226.
- Piccini C, Conde D, Alonso C, Sommaruga R, and Pernthaler J. 2006. Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the southwestern Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol* 72:6560–6568.

- Pomeroy, L. R. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience* 24: 499-504.
- Pomeroy, L.R., P. J. leB. Williams, F. Azam, and J. E. Hobbie. 2007. The microbial loop. Special Issue: A Sea of Microbes. *Oceanography* 20(2): 28-33.
- Porter, K.G., and Feig, Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948.
- Rappe, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., and Giovannoni, S.J. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418: 630-633.
- Rappé, M.S., and S.J. Giovannoni. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Reviews of Microbiology* 57:369-394.
- Rodriguez, G., Phipps, D., Ishiguro, K., and Ridgway, H. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1801-1808.
- Rollwagen Bollens GC, Penry DL. 2003. Feeding dynamics of *Acartia* spp. copepods in a large, temperate estuary (San Francisco Bay, CA). *Marine Ecology Progress Series* 257:139-158.
- Sarmiento H., Montoya J. M., Vázquez-Domínguez E., Vaqué D., and Gasol J. M. 2010. Warming effects on marine microbial food web processes: how far can we go when it comes to predictions? *Phil. Trans. R. Soc. B* 365: 2137-2149.
- Schattenhofer, M., Fuchs, B., M., Amann, R., Zubkov, M., V., Tarran, G., A., and Pernthaler, J. 2009. Latitudinal distribution of prokaryotic picoplankton populations in the Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology* 11: 2078-2093.
- Šimek, K., Horňák, K., Mašín, M., Christaki, U., Nedoma, J., Weinbauer, M.G., Dolan, J.R. 2003. Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, 31: 123-135
- Simon, M., and Azam, F. 1989. Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 51: 201-213.
- Simonato, F., Gómez-Pereira, P.R., Fuchs, B.M., and Amann, R. 2010. Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 128-138.
- Sommer, U., and Sommer, F. 2006. Cladocerans versus copepods: the cause of contrasting *top-down* controls on freshwater and marine phytoplankton. *Oecologia* 147 183-194.
- Strickland J, Parsons T. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada 167:310.

- Suzuki, M.T., and Giovannoni, S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 625-630.
- Steemann-Nielsen E. 1952. The use of radioactive carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.* 18: 117-140
- Teira, E., T. Reinthaler, A. Pernthaler, J. Pernthaler, and G. J. Herndl. 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.
- Vaqué, D., Gasol, J. M., and Marrasé, C. 1994. Grazing rates on bacteria: the significance of methodology and ecological factors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 109: 263-274.
- Weinbauer, M. G. and Rassoulzadegan, F. 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ. Microbiol.* 6: 1–11
- Wiadnyana NN, Rassoulzadegan F (1989) Selective feeding of *Acartia clausi* and *Centropages typicus* on microzooplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 53:37–45
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-271.
- Zhang, Y., Jiao, N., Cottrell, M.T., and Kirchman, D.L. 2006. Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production along a salinity gradient in the South China Sea. *Aquatic Microbial Ecology* 43: 233-241.
- Zingel, P., Agasild, H., Nõges, T. and Kisand, V. 2007. Ciliates are the dominant grazers on pico- and nanoplankton in a shallow, naturally highly eutrophic lake. *Microb. Ecol.*, 53(1): 134–142.
- Zöllner, E., Santer, B., Boersma, M., Hoppe, H.G., and Jürgens, K. 2003. Cascading predation effects of *Daphnia* and copepods on microbial food web components. *Freshwater Biology* 48: 2174-2193.