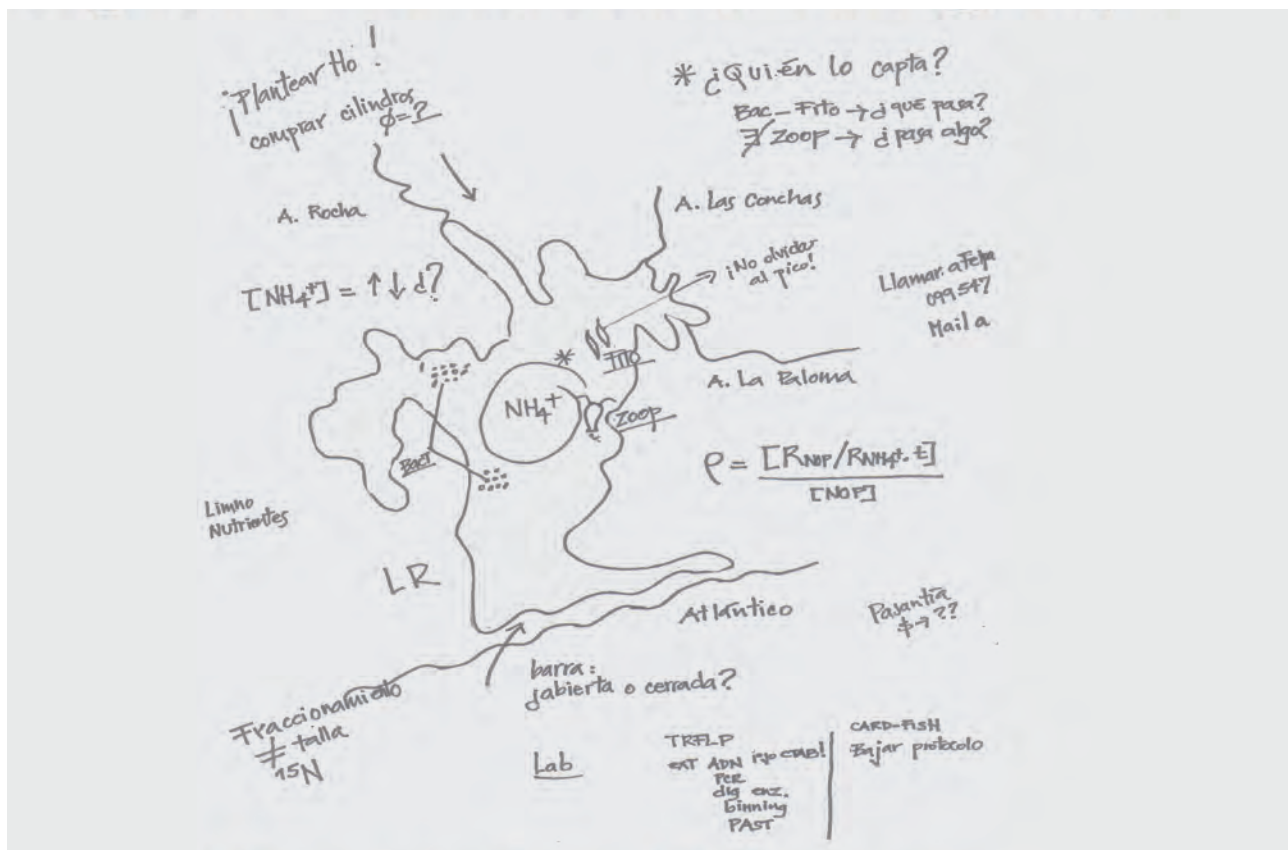


ROL DE LA COMUNIDAD BACTERIANA EN LA CAPTACIÓN DE AMONIO EN UNA LAGUNA COSTERA

LAGUNA DE ROCHA, URUGUAY



RESUMEN

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial con gran relevancia ecológica ya que limita a la producción primaria o está involucrado en la eutrofización de sistemas acuáticos. Un componente clave en el ciclado y transferencia a niveles tróficos superiores en la columna de agua es el bacterioplancton, que mineraliza la materia orgánica y aporta N al medio, estimulando así el crecimiento de los productores primarios. Sin embargo, este no es el único rol de la comunidad bacteriana planctónica, ya que se ha descrito que puede competir en determinadas condiciones con los productores primarios (especialmente fitoplancton) por la captación de este nutriente. Así, tanto la naturaleza de la interacción bacterio-fitoplancton, como su conexión con los niveles tróficos superiores mediante la predación, son mecanismos relevantes para el funcionamiento y productividad del ecosistema.

La Laguna de Rocha es una laguna costera somera altamente productiva y con una compleja hidrología, debido a sus intermitentes conexiones con el Océano Atlántico y a su extensa cuenca. A pesar de ser un área protegida, la Laguna de Rocha ha tenido indicios de eutrofización que incluyen crecimiento desmedido de macrofitas y de floraciones de cianobacterias y bacterias heterótrofas. Ambas floraciones estuvieron asociadas al aumento en la concentración de NH_4^+ en la columna de agua en 2003, nutriente cuya concentración es normalmente baja o indetectable en este sistema. Por eso se planteó como hipótesis que el NH_4^+ es captado por la comunidad microbiana planctónica favoreciendo su baja concentración en la columna de agua.

Para ello, se empleó una aproximación experimental, por medio de microcosmos en la zona de influencia límnic (Norte) y marina (Sur) de la Laguna de Rocha con la adición del trazador ^{15}N . En ambos casos se filtró el agua original de cada zona para remover determinado grupo trófico y comparar la captación de NH_4^+ por las comunidades microbianas en dicha situación con respecto a la presencia del ensamblaje planctónico total. En el primer experimento (interacción fitoplancton-bacterioplancton) se removió al fitoplancton y en el segundo (efecto de cascada trófica) la fracción removida fue el mesozooplancton con el fin de estudiar cómo estos dos mecanismos incidían en el proceso en estudio. Las tasas de captación de NH_4^+ fueron calculadas para las diferentes fracciones tróficas (bacterio, fito y mesozooplancton), dependiendo del experimento. Además, se estudiaron las fluctuaciones en la abundancia y en la composición de la comunidad bacteriana a través de CARD-FISH y (PAT)-TRFLP.

El tipo de interacción entre el fitoplancton y el bacterioplancton en relación a la captación del NH_4^+ varió de acuerdo a los niveles de NH_4^+ en la Laguna de Rocha. Cuando los niveles de éste fueron detectables (zona Norte), ambas comunidades estuvieron acopladas en la captación (comensalismo). Probablemente debido al carbono orgánico secretado por el fitoplancton, el bacterioplancton estuvo más activo en la captación. No obstante, cuando los niveles de NH_4^+ fueron muy bajos (zona Sur) el fitoplancton compitió eficazmente por dicho nutriente. Esto haría suponer que el proceso de captación de NH_4^+ en esa zona de la Laguna de Rocha estaría limitado por carbono. En este experimento se vio que la predación controló al bacterioplancton heterótrofo en la zona Norte y a las cianobacterias en el Sur, sugiriendo una presión selectiva sobre grupos activos en la captación.

El experimento de cascada trófica mostró que la captación de NH_4^+ por el bacterioplancton no varió significativamente cuando se removió al mesozooplancton. En el Norte, la predación del mesozooplancton sobre el fitoplancton y posiblemente sobre los protozoarios, generó cambios en la composición del ensamblaje bacteriano. En cambio, en el Sur no se observaron fluctuaciones en la captación de NH_4^+ por el bacterioplancton o el fitoplancton debido a la remoción del mesozooplancton, sugiriendo una menor incidencia de la predación en dicha zona de la Laguna de Rocha. Posiblemente existan otros factores en la zona Sur que estén influyendo en la composición de la comunidad bacteriana como limitación de C o P. En ambos experimentos la rápida captación de NH_4^+ , indicaría que este nutriente genera una intrincada respuesta que involucra a toda la comunidad planctónica y el bacterioplancton de acuerdo a las condiciones ambientales tendría un rol versátil en dicho proceso.

Rol de la comunidad bacteriana en la captación de amonio en una laguna costera (Laguna de Rocha, Uruguay)

Lic. Germán Pérez Pesamosca

Tesis de Maestría PEDECIBA

Área Biología, Sub-Área Microbiología

Tutora: Dra. Claudia Piccini

Depto. Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

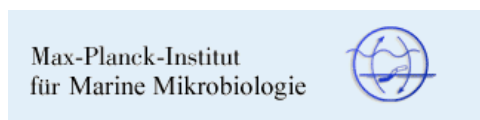
Co-Tutor: Dr. Daniel Conde

Secc. Limnología. Facultad de Ciencias

Tribunal: Dr. Omar Defeo, Dra. Cecilia Alonso y Dr. Luis Aubriot

2012

Este proyecto y mi trabajo fueron parcialmente financiados gracias a las siguientes instituciones y/o agencias:



Índice General

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 Procesos biológicos y fisicoquímicos asociados al pool de NH_4^+ en la columna de agua.....	2
1.3 Rol del bacterioplancton y su interacción con el fitoplancton en la captación del nitrógeno disuelto.....	4
1.4 Efecto del zooplancton en el ciclo del N.....	8
1.5 Justificación del estudio.....	10
2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....	13
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivo general y específicos.....	13
2.3 Estructura de la tesis.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Estrategia general.....	15
3.2 Sitios de muestreo.....	15
3.3 Mediciones <i>in situ</i>	16
3.4 Experimentos.....	16
3.4.1 Interacción entre bacterioplancton y fitoplancton en la captación de amonio.....	16
3.4.2 Efecto de “cascada trófica”.....	18
3.5 Técnicas y cálculos.....	19
3.5.1 Tasas de captación de amonio.....	19
3.5.2 Abundancia bacteriana y biomasa del fitoplancton.....	20
3.5.3. Extracción de ADN genómico total, PCR y TRFLP	21
3.5.3.1 Análisis de composición de la comunidad bacteriana (CARD-FISH).....	22
3.5.6 Análisis Estadístico.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1 Interacción bacterioplancton fitoplancton.....	24
4.1.1 Resultados.....	24

4.1.1.1 Características del ambiente.....	24
4.1.1.2 Tasas de captación de amonio.....	25
4.1.1.3 Abundancia bacteriana y concentración de clorofila <i>a</i>	27
4.1.1.4 Composición de la comunidad bacteriana.....	29
4.2 Discusión.....	30
4.2.1 Tasas de captación	31
4.2.2 Abundancia y composición de comunidad bacteriana	34
4.2.3 Comunidad fitoplanctónica	36
4.3. Efecto cascada trófica.....	38
4.3.1 Resultados.....	38
4.3.1.1 Características del ambiente.....	38
4.3.1.2 Tasas de captación	38
4.3.1.3 Abundancia y composición de la comunidad bacteriana.....	42
4.3.2 Discusión.....	46
4.3.2.1 Tasas de captación.....	46
4.3.2.2 Abundancia y composición del bacterioplancton.....	48
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	51
5.1 El bucle microbiano y la captación de NH_4^+ en la Laguna de Rocha.....	51
6. CONCLUSIONES.....	54
7. PERSPECTIVAS.....	56
8. REFERENCIAS.....	57
9. ANEXOS	

Índice de Tablas

Tabla 1. Sondas empleadas para determinar la composición de la comunidad bacteriana (CARD-FISH).	22
Tabla 2. Características fisicoquímicas y biológicas de la Laguna de Rocha en las zonas límnic (N) y estuarina (S) durante el experimento 4.3.1 realizado en el mes de mayo de 2009.	24
Tabla 3. Concentraciones de los nutrientes en las zonas Norte y Sur de la Laguna de Rocha. ..	25
Tabla 5. Variables ambientales registradas en las zonas Norte y Sur de la Laguna de Rocha durante la realización del experimento del efecto “cascada” en la captación de NH_4^+	38
Tabla 6. Abundancias relativas de cada grupo bacteriano ensayado (porcentaje de células híbridadas del total de células teñidas con DAPI).	39

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema del ciclo microbiano del N.....	2
Figura 3. Diagrama de las interacciones microbianas en el ciclo del N.....	5
Figura 2. Rangos de tamaño de la MOD e interacciones microbianas en sistemas acuáticos.	7
Figura 4. Diagrama simplificado de la trama trófica	8
Figura 5. Mapa de la costa Atlántica del Uruguay indicando la ubicación de las lagunas costeras.....	11
Figura 6. Mapa de la Laguna de Rocha y sus principales tributarios.....	16
Figura 7. Esquema del tratamiento CT del experimento 3.4.1 para ambas zonas de la Laguna de Rocha.	17
Figura 8. Esquema del tratamiento PF del experimento 3.4.2 para ambas zonas de la Laguna de Rocha.	18
Figura 9. Diagrama de la estrategia de TRFLP.	21
Figura 10. Tasas de captación de NH_4^+ en la zona Norte en la Laguna de Rocha (3.4.1).....	26
Figura 11. Abundancia bacteriana de los tratamiento PF en las zonas Norte y Sur respectivamente de la Laguna de Rocha (mayo de 2009).	28
Figura 12. Composición de la comunidad bacteriana determinada por T-RFLP-PAT del tratamiento CT de las zonas Norte y Sur de la Laguna de Rocha.....	29

Figura 13. Representación de las OTUs bacterianos específicos (en el círculo) y comunes (intersección) entre el inicio y el final de las incubaciones en la zona Norte (A) y en la zona Sur (B).....	30
Figura 14. Tasas de captación de NH_4^+ del tratamiento CT (A) para las fracciones FITO (1.2 μm), BACT (0.5 μm) y ZOO (35 μm) y de las fracciones FITO y BACT del tratamiento NZOO (B) en la zona Norte (mayo de 2010).....	40
Figura 15. Tasas de captación de NH_4^+ del tratamiento CT (A) para las fracciones FITO (1.2 μm), BACT (0.5 μm) y ZOO (35 μm) y de las fracciones FITO y BACT del tratamiento NZOO (B) en la zona Sur (4.3.2).....	42
Figura 16. (A y B). Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en los dos tratamientos CT y NZOO tanto en el Norte como el Sur de la Laguna de Rocha (4.3.2).....	43
Figura 17. Análisis de <i>clusters</i> a partir de T-RFLP para el tratamiento CT y NZOO en la zona Norte.....	44
Figura 18. Análisis de <i>clusters</i> a partir de T-RFLP para los tratamientos CT y NZOO en la zona Sur.	45
Figura 19. Esquema de los principales resultados obtenidos en el experimento de interacción entre el bacterioplancton y fitoplancton (4.3.1).	52
Figura 25. Esquema de los principales resultados obtenidos en el experimento del efecto de cascada trófica (4.3.2).	53

LISTA DE ABREVIACIONES

ADN: ácido desoxirribonucleico
ANAMMOX: anaerobic ammonium oxidation
ANOVA: analysis of variance
ARN: ácido ribonucleico
BACT: bacterioplankton
Chl α : clorofila α
COD: carbono orgánico disuelto
CT: comunidad total
DAPI: 4, 6-diamino-2-fenilindol
FAM: 6-carboxi-fluoresceína
FISH: fluorescence *in situ* hybridization
FITO: fitoplancton
HEX: 6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexacloro-fluoresceína
MOD: materia orgánica disuelta
NID: nitrógeno inorgánico disuelto
NMDS: non metric multidimensional scaling
NOD: nitrógeno orgánico disuelto
NOP: nitrógeno orgánico particulado
NZOO: sin mesozooplankton
OTU: unidad taxonómica operacional
PAT: phylogenetic assignment tool
PCR: polymerase chain reaction
PBS: phosphate buffered saline
PF: pre- filtrado
TRFLP: terminal restriction fragment length polymorphism

AGRADECIMIENTOS

Sin dudas esta es la parte más grata de la ejecución de mi Tesis: el AGRADECER. Más allá de la adquisición o aprendizaje de técnicas o profundizar sobre un tema en especial, a nivel personal también aprendí mucho. A través de estos años me he encontrado con gente increíble que me tendió una mano desinteresadamente en esos momentos que uno largaría todo, me enseñó y me enriqueció, prestó cosas y muchos etcs. para llevar adelante este proyecto. A todas ellas y a la VIDA por ponerlos en mi camino... mi eterna gratitud.

A la Laguna de Rocha, un lugar mágico que me permitió desarrollar mi trabajo y me dejó con más preguntas que respuestas. Despertó mi curiosidad, mi avidez por aprender y también fomentó mi conexión con la Naturaleza.

En particular quisiera agradecer:

A Claudia (Dra. Piccini) por haberme dado la oportunidad de “sumergirme” en el fantástico mundo de la ecología microbiana acuática y por ser mi tutora. Navegamos por aguas turbulentas y otras más calmas, también llegamos a zonas abisales pero siempre buscamos la vuelta para llegar a la superficie y seguir timoneando este barco tan difícil que es estudiar esta disciplina en Uruguay. Gracias por las libertades, las enseñanzas y las charlas, las cuales creo me ayudaron y me ayudaran a forjarme como investigador y como persona. Gracias además por hacerme ver que las bacterias son mi mundo.

Al Dr. Daniel Conde por aceptar ser co-tutor de esta tesis, por atender a mis preguntas, por hacerme ver que el contenido debe estar contenido en un formato y por preguntarme una vez “¿para cuándo una cara de contento...?” Además, por guiar mi viaje inaugural en la Laguna de Rocha en el zodiaco... ¡qué experiencia!

Al Dr. Pablo Zunino que sin conocerme me conectó con Claudia para poder empezar mi Maestría en el Depto. Microbiología del IIBCE. Gracias por las oportunidades, por apoyar a nuestra línea de investigación y también por las jocosas y profundas charlas sobre la vida.

A los miembros del Tribunal por aceptar integrarlo y por los aportes y críticas que ayudaron a ordenar y mejorar el manuscrito final.

A mis compañeras del Depto. de Microbiología que me han apoyado durante todos estos años a seguir adelante y siempre que fue posible me extendieron una mano y siempre mostraron su interés en esto “raro” de trabajar con bacterias acuáticas. A Paola (por los *super entrete* viajes en Chile y el aguante po), Vanessa (siempre atenta y serena... un bálsamo para mi aceleramiento interno), Karina (por el interés y preocupación), Karen (porque hay que ser ordenado y prolijo en el lab... y en la vida), Bruno (por el reencuentro y las charlas) y Martín (por las carcajadas y la música).

A la *New Generation* (Anita, Majo y Matilde) que bien supimos forjar una amistad y disfrutar de nuestros aciertos y estar en aquellos momentos más difíciles. Yo siempre las sentí muy cerca... ¡Gracias!

A Cecilia Alonso por su apoyo, sus charlas y por permitirme ir a unos de los mejores centros de ecología microbiana acuática en el mundo. Gracias por el arroz con huevo a la 1 am en el MPI cuando hubo que empezar de cero... y quedaban días para retornar, ¡esas cosas no

se olvidan! A Florencia por participar en el segundo experimento. ¡Mucha suerte en la nueva etapa en Rocha!

A las más nuevas del Lab. Belén, Daniela, Sofía, Martina, Gabriela, Natalia, Loreley, Luis y Magalí por su compañerismo.

A la Dra. Laura Farías (PROFC, Univ. Concepción) no tengo palabras por su generosidad e inmensa paciencia para que pudiera tomarle gusto a la biogeoquímica y fundamentalmente su apoyo para que este proyecto saliera adelante. También por dejarme participar junto a su equipo (el Barty, la Estrella y el Juan) de las series de tiempo y aprender “en terreno” mucho más de todo esto.

A la Dra. Camila Fernández (Centro Copas, Chile) por compartir sus conocimientos conmigo desde cualquier punto del planeta. De sus “Master Classes” y los millones de e-mails que me ayudaron a perder un poco el miedo a los isótopos estables y por tener siempre una frase de ánimo...

A los colombianos en Conce que le dieron color y calor a mis estadias en Chile. Gracias Alex, Ivette y Santiago por compartir su casa, sus tradiciones y hacerme sentirme uno más. Al experto en DMS, mi amigo “El gran Lennin Flores” de Santa Marta, Colombia! Gracias por el humor, las charlas y los consejos...

Al Dr. Amann por dejarnos hacer la pasantía en el Depto. Ecología Molecular del MPI (Alemania). Al Dr. Alban Ramette (Habitat Group, MPI) que siempre se mostró dispuesto a ayudarme durante mi estadía y también por hacer el *binning* del TRFLP. A Nicole Rödiger por el asesoramiento técnico y la paciencia a un uruguayo que se sentía “... en el Lab de las Maravillas...”

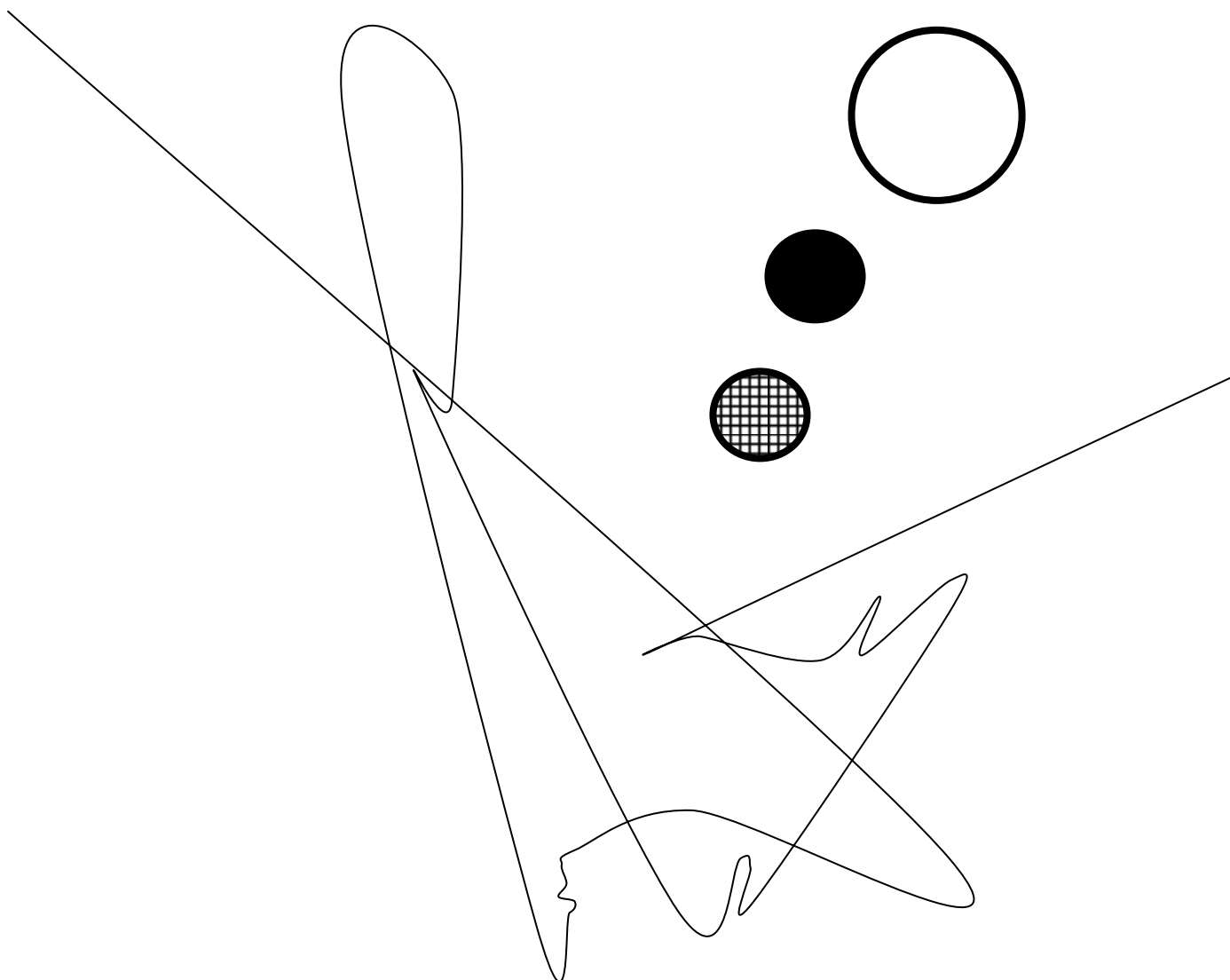
A la gente de Limnología: Sylvia, Luis, Carla, Carmela y Amelia que siempre fue un gusto compartir momentos y siempre me sentí bien recibido. Gracias por el aprendizaje, la ayuda en estadística y las ganas de trabajar.

A mis compañeras de Microbiología de FAGRO (Pilar, Andrea, Gabriela y Gastón), gracias por el interés y el apoyo. También a Martita (por su amistad y humor), Esteban, Marianella, Leticia Bao y Estela por su apoyo y compañerismo.

A Federico, Julio y Adriana que me ayudaron pila con la presentación y me aguantaron en la previa.

A mi familia: a mis padres por dejarme elegir y seguir mi vocación con responsabilidad. Gracias por los valores que explícita o implícitamente me han inculcado. A mis hermanas por su apoyo desde el inicio de la carrera, sus consejos y esa conexión especial que nos hace hermanos.

Last but not least a la persona que le dedico mi trabajo, a mi compañera de ruta. Gracias Adriana por tu paciencia, amor y ánimo... por sacrificar nuestros momentos por mi trabajo y ayudarme en lo que te fuera posible.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 El nitrógeno, nutriente estructurador en la Naturaleza

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para todos los organismos ya que forma parte de ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes celulares (Schockman *et al.*, 1958). En la biosfera el N se encuentra en diversos estados de oxido-reducción, lo que lo convierte en una fuente de energía potencial para los microorganismos (Coci, 2007). Todas las vías del ciclo del N en la biosfera están asociadas a una gran diversidad de microorganismos pertenecientes a los tres Dominios: Bacteria, Arquea y Eucariota (Ward *et al.*, 2007).

Al ser un nutriente esencial, el N controla la producción primaria en la biosfera (Gruber y Galloway, 2008). En los últimos 100 años el ciclo del N ha sufrido dramáticas alteraciones debido a factores antropogénicos, tales como el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, el aumento en la plantación de cultivos fijadores de N (asociación leguminosa-rizobio) y el uso de combustibles de origen fósil (Galloway y Cowling, 2002). El aumento en la deposición de N en los ecosistemas ha llevado a la acidificación de suelos, la pérdida de ozono en la estratosfera y a la eutrofización de sistemas acuáticos (Gruber y Galloway, 2008). La eutrofización (enriquecimiento en nutrientes en un ecosistema acuático) causa el incremento en la biomasa de productores primarios (fitoplancton y macrófitas), la hipoxia debida a la descomposición de la biomasa generada y finalmente la pérdida de diversidad biológica (Nixon *et al.*, 1995). En particular, el exceso de crecimiento de fitoplancton tiene como consecuencia la dominancia de algunas especies que generalmente tienen un impacto negativo en la productividad o funcionamiento del sistema. Tal es el caso de la aparición de floraciones de cianobacterias tóxicas, las cuales suponen un riesgo que puede ser directo para diferentes organismos como macroalgas, invertebrados y vertebrados (incluyendo al ser humano), e indirecto para aquellos que consumen las toxinas acumuladas en peces y moluscos (Rasbalais, 2002). El proceso de eutrofización promueve también el desarrollo potencial de bacterias patógenas y/o protozoarios, eg. los causantes del cólera y la malaria respectivamente (Townsend *et al.*, 2003).

El ciclo del N en sistemas acuáticos quizá sea uno de los más complejos ciclos biogeoquímicos (Fig. 1) Como se mencionó anteriormente, al ser un nutriente limitante de la productividad primaria, ejerce una significativa influencia sobre la utilización biológica de otros elementos como el Carbono (C) y el Fósforo (P) (Gruber, 2008). El interés en este ciclo ha aumentado en la última década debido al impacto de las acciones antropogénicas, que han generado perturbaciones en los sistemas terrestres y acuáticos y en el clima (Gruber y Galloway, 2008). En este sentido, el óxido nitroso (N_2O) es un gas traza que proviene de procesos microbianos como la desnitrificación y la nitrificación. Al igual que el CO_2 son gases

con efecto invernadero (GEI), aunque su potencial es 100 veces superior al del CO_2 (Jain *et al.*, 2000). El aumento de gases como el N_2O desde el océano hacia la atmósfera ha contribuido en parte el calentamiento global del planeta (Gruber, 2008).

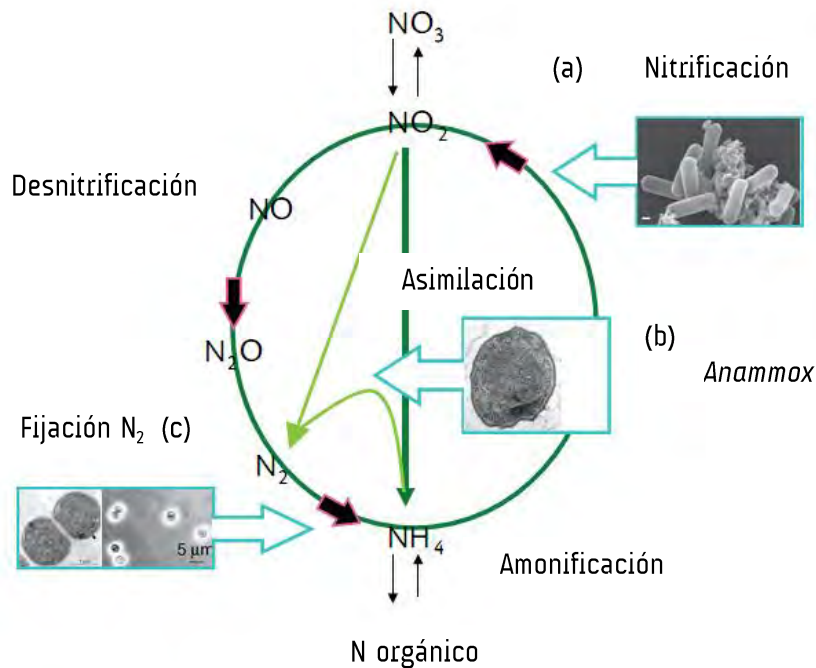


Figura 1 Esquema del ciclo microbiano del N donde se representan los principales procesos que son llevados a cabo por bacterias. Las fotografías muestran bacterias involucradas en los procesos de: a) nitrificación; b) *anammox*, c) fijación de N_2 . Ver más detalles en sección 1.2. Tomado de Ward *et al.* (2007).

1.2 Procesos biológicos y fisicoquímicos asociados al pool de NH_4^+ en la columna de agua

En la columna de agua se encuentran diversas formas de N inorgánico disuelto (NID) como ser amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-). Por otro lado, existen también diversos compuestos orgánicos que contienen N y conforman el *pool* de N orgánico disuelto (NOD), como urea, aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Además se encuentra la fracción de N orgánico particulado (NOP) constituida por organismos y detritus.

En general, las concentraciones de NH_4^+ en la columna de agua son bajas. Una de las razones es que el NH_4^+ se adsorbe fácilmente al sedimento (Peterson *et al.*, 2001), disminuyendo su concentración en la columna de agua. Esta adsorción a las partículas del sedimento puede

ser reversible (Rosenfeld, 1979). En ese sentido, Morse y Morin (2005) observaron que en condiciones reductoras (típica de sedimentos anóxicos marinos) la adsorción es dos veces más fuerte que en condiciones oxidantes. Por tanto, los procesos físicos que mezclan los fluidos del sedimento con el agua de la columna afectan al ciclo del N, ya que las concentraciones de NH_4^+ en los sedimentos son mucha más elevadas. La concentración de NH_4^+ en aguas intersticiales puede llegar al orden de mM mientras que en la superficie rondan generalmente μM o menos (Joye y Anderson, 2008). Estas diferencias de concentraciones generan flujos de difusión y de advección desde los sedimentos a la columna de agua, aumentando su concentración en esta última (Rowe *et al.*, 1975). Además, la resuspensión del sedimento (Fanning *et al.*, 1982) ejercida por la perturbación del viento u oleaje (Chang *et al.*, 2001), entre otros factores mecánicos, transfiere nutrientes desde el sedimento al agua adyacente al mismo (Joye y Anderson, 2008).

La asimilación del NH_4^+ es un proceso que no implica un elevado gasto energético celular, lo cual favorece su rápida captación por los microorganismos y consecuentemente favorecen a la baja concentración en la columna de agua (Dodds *et al.*, 1991). Otro proceso biológico que disminuye la concentración del NH_4^+ en el agua es la nitrificación (Peterson *et al.*, 2001). Los microorganismos nitrificantes utilizan al NH_4^+ como fuente de energía (Ward, 2008), oxidándolo a NO_2^- que es posteriormente oxidado a NO_3^- . Las bacterias que realizan este proceso incluyen a miembros de las subdivisiones *Beta* y *Gammaproteobacteria* (Ward, 2008). Recientemente, se ha descubierto en bibliotecas metagenómicas la presencia de genes con la capacidad de oxidar al NH_4^+ en Arqueas (Schleper *et al.*, 2005).

Por otro lado, el NH_4^+ puede ser utilizado en condiciones anóxicas (i.e: columna de agua y sedimentos) oxidándose anaeróbicamente, proceso denominado oxidación anaerobia del NH_4^+ o *anammox* (de su sigla en inglés *anaerobic ammonium oxidation*) (Emerson *et al.*, 1980; Bender *et al.*, 1989) que es mediado por miembros del filo bacteriano *Planctomycetes* (Strouss *et al.*, 1999; Kuypers *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Este proceso Junto con la desnitrificación las reacciones de *anammox* son un proceso de producción de una forma gaseosa de N (N_2) y constituyen una pérdida de N para el sistema (Ward, 2008).

Entre los procesos que incrementan el pool de NH_4^+ en la columna de agua se encuentra la regeneración de NH_4^+ , que se da a partir de la mineralización o amonificación de la materia orgánica disuelta (MOD) presente tanto en la columna de agua como en el sedimento (Goldman *et al.*, 1987), el cual es realizado por bacterias. El NH_4^+ es también liberado en los productos de excreción (fecas) (Steinberg y Saba, 2008) y predación (*sloppy feeding*) por el zooplancton (Sellner, 1992). Asimismo, se han descrito otros procesos biológicos como la lisis viral (Proctor y Furhman, 1990) o el ataque de hongos u otros parásitos (Holdfeld, 1998) que aportan NH_4^+ al *stock* de la columna de agua. Bushaw *et al.* (1996) demostraron que las fototransformaciones que sufre la MOD al absorber radiación ultravioleta pueden provocar la liberación del NH_4^+ presente en el pool de MOD y dejarlo así biodisponible en los sistemas

acuáticos (fotoamonificación). En particular, la radiación UV-B es la que más influencia tiene en la fotoamonificación (Buffam y McGlathery, 2003).

1.3 Rol del bacterioplancton y su interacción con el fitoplancton en la captación del nitrógeno disuelto

La mayoría de los microorganismos deben competir por nutrientes para poder subsistir en el ambiente que habitan (Hibbing *et al.*, 2009). Cuando la tasa de crecimiento de una población microbiana está limitada por la disponibilidad de nutrientes, se dice que el ambiente ejerce un control *bottom-up* sobre la misma (Mcqueen *et al.*, 1989).

La interacción entre el fitoplancton (productores primarios) y el bacterioplancton heterótrofo (mineralizadores) asegura la funcionalidad en un ecosistema a partir de dos procesos básicos: 1) el acoplamiento entre compuestos de origen mineral y energía para formar biomasa y 2) la conversión de la biomasa a compuestos inorgánicos (Daufresne *et al.*, 2008). La mineralización de detritos por parte del bacterioplancton provee al fitoplancton de una entrada importante de nutrientes esenciales como N y P (Pomeroy, 1974). Sin embargo, puede ocurrir que el detrito a mineralizar no provea una cantidad suficiente de nutrientes, por lo que el bacterioplancton se verá forzado a captarlo del medio que le rodea (inmovilización, *sensu* Bosatta y Berendse, 1984) para poder satisfacer sus necesidades y alcanzar el equilibrio estequiométrico entre detrito y biomasa. Por eso, si bien antes se suponía que rol del bacterioplancton era únicamente la mineralización de MOD en la columna de agua, actualmente se sabe que posee otras funciones que son clave en la trama trófica y en el ciclo del N de los sistemas acuáticos (Fig. 2).

El bacterioplancton es capaz de emplear tanto NID como NOD, por lo que también puede competir con el fitoplancton por su captación (Middelburg y Nieuwenhuize, 2002; Bradley *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, la limitante en el uso de N inorgánico proveniente de la columna de agua dependerá de la relación C: N de los sustratos metabolizados. La relación estequiométrica de C: N en la biomasa bacteriana es 8:1. Por lo tanto, si la materia orgánica a mineralizar se acerca a esa relación el bacterioplancton no captará (o inmovilizará) al N del medio, sino que su demanda de N quedará satisfecha con la mineralización de la MOD. Contrariamente, si la relación C: N de la MOD es superior a la relación característica del bacterioplancton (caso de limitación de N), el mismo se verá obligado a satisfacer su demanda de N captándolo de otras sustancias presentes en el medio (Goldman y Denner, 2000).

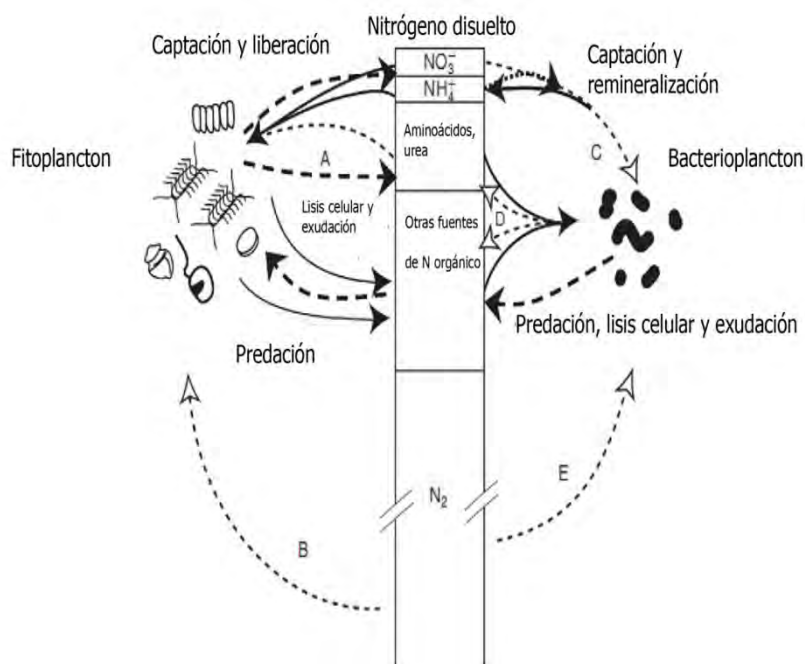


Figura 2. Diagrama de las interacciones microbianas en el ciclo del N descrito para aguas oceánicas oligotróficas superficiales en la última década. La composición del *pool* de N disuelto está representada de acuerdo a su concentración relativa en escala con el tamaño de las cajas. Las flechas punteadas representan las nuevas transformaciones y procesos incluidos: A) el fitoplancton utiliza diversas fuentes de N tanto de origen inorgánico como orgánico. B) Algunas especies de fitoplancton fijan N_2 (ej.: cianobacterias). C) el bacterioplancton compete por NO_3^- y NH_4^+ ; D) el bacterioplancton excreta urea y es fuente de compuestos nitrogenados orgánicos de alto peso molecular. E) Parte del bacterioplancton marino es capaz de fijar N_2 que proviene de la atmósfera. Las flechas enteras indican las vías clásicas del ciclo del N. Modificado de Zehr y Ward, 2002.

En relación al NH_4^+ , el bacterioplancton podrá captarlo de su entorno, aportar NH_4^+ al medio (por mineralización) o realizar ambos procesos a la vez (Zehr y Ward, 2002). Si bien no está claro cómo esto ocurre, se postula que en realidad diferentes miembros del ensamblaje microbiano son responsables de los diferentes procesos (Kirchman, 2000; Frette *et al.*, 2009).

El fitoplancton y bacterioplancton pueden competir por nutrientes, aunque existen otro tipo de interacciones entre ambas comunidades (Caron, 1994; del Giorgio *et al.*, 1997; Fouilland y Mostajir, 2010; Morán y Alonso-Sáez, 2011). En principio, la dependencia del bacterioplancton de sustratos orgánicos o inorgánicos determinará la naturaleza de la interacción entre éste y el fitoplancton. Cuando el bacterioplancton está limitado por un sustrato orgánico, estará estimulado por la presencia del fitoplancton (comensalismo). Por el contrario, cuando la limitante está dada por nutrientes inorgánicos la interacción es de tipo competitiva (Bratbak y Thingstad, 1985). El resultado de esta competencia influye potencialmente en el ciclo del C por un lado, el bacterioplancton heterótrofo limitará de nutrientes a los productores primarios

(Joint *et al.*, 2002) y por otro lado el fitoplancton limitará indirectamente el grado de degradación heterótrofa de la materia orgánica (Havskum *et al.*, 2003). Además, el proceso de competencia influye en la composición de las especies (Jacobsen *et al.*, 1995; Samuelsson *et al.*, 2002) y afecta al balance de dominancia entre ambas comunidades en el sistema (Bratbak y Thingstad, 1985).

En los sistemas acuáticos, cerca del 13% de la producción primaria total del fitoplancton es liberado al ambiente en forma de polímeros, constituyendo una importante fuente de C orgánico para el anillo microbiano (Baines y Pace, 1991; Azam, 1998) (Fig. 3A). El fitoplancton libera por exocitosis moléculas condensadas de polímeros, que luego en el agua forman geles (Chin *et al.*, 2004) (Fig.3B) constituidos por polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Chin *et al.*, 1998). Si bien una parte de la MOD es refractaria a la degradación bacteriana, los geles constituyen una fuente de nutrientes para el bacterioplancton heterótrofo (Verdugo *et al.*, 2004). Eso se debe a que otras fracciones de MOD se adsorben a la superficie de los geles, como también lo hacen las bacterias (Long y Azam, 1998; Alldredge *et al.*, 1998), que por tener hidrolasas de superficie pueden utilizar a dichos nutrientes (Smith *et al.*, 1992; Gómez-Pereira, 2010).

Otra de las ventajas de los geles como sustrato para el bacterioplancton yace en la habilidad del bacterioplancton de clivar grandes polímeros y transformarlos en monómeros de bajo peso molecular. Esto se debe a la actividad de las exoenzimas que son liberadas al medio; siendo su producción y liberación más alta cuando el bacterioplancton se encuentra adherido a dichas macromoléculas (Azam y Long, 2001).

El grado de acoplamiento del bacterioplancton con la producción primaria es muy variable y afecta el funcionamiento del ecosistema (Azam y Malfatti, 2007). El bacterioplancton puede disponer del contenido celular del fitoplancton a través de hidrolasas bacterianas con efecto algicida (Mayali y Azam, 2004). Por otro lado, el fitoplancton produce un mucus superficial formando una zona a su alrededor denominada ficosfera (Bell *et al.*, 1974), la cual es rica en nutrientes que pueden ser asimilados por las bacterias. Entonces, una estrategia de las bacterias es agruparse cerca del fitoplancton (Bell *et al.*, 1974; Gómez-Pereira, 2010) (Fig. 3 C y D) llegando a abundancias mucho más altas que las que se pueden encontrar al bacterioplancton en “vida libre” (Bowen *et al.*, 1993). En estas condiciones, el fitoplancton se beneficia de la regeneración bacteriana de nutrientes a partir del NOD y del fósforo orgánico disuelto (POD) presentes en la ficosfera (Azam y Malfatti, 2007).

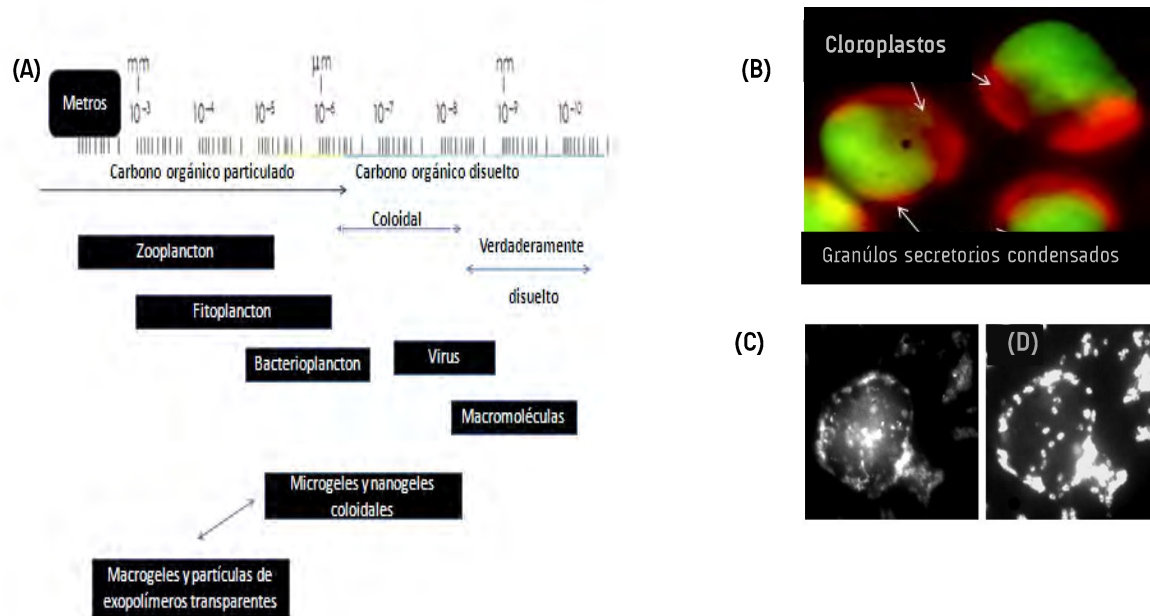


Figura 3. (A) Rangos de tamaño de la MOD e interacciones microbianas en sistemas acuáticos. La materia orgánica ha sido tradicionalmente dividida en disuelta (MOD) o particulada (MOP) de acuerdo a la filtración con filtros GF/F (ϕ 0.7 μ m). La misma abarca desde monómeros, polímeros, coloides y geles de una intrincada arquitectura tridimensional. El plancton vivo y el detrito se encuentran embebidos en una estructura semejante a una telaraña dinámica en el tiempo y en el espacio. La arquitectura de esta materia orgánica provee de un contexto espacial en el que los microorganismos interactúan entre ellos y con el ambiente (Adaptado de Verdugo *et al.*, 2004). (B) Vesículas de exocitosis de polímeros de C en *Phaeocystis globosa* por microscopia de fluorescencia. El anticuerpo de conejo anti-polímeros de *Phaeocystis* fluoresce se ve verde al excitarlo con una λ_{exc} 494 y en rojo se observa la clorofila de los cloroplastos (Chin *et al.*, 2004). (C) Fotomicrografía de una célula de fitoplancton colonizada con bacterias (tinción con DAPI) en la zona Sur de la Laguna de Rocha. (D) Células bacterianas hibridadas con la sonda SteMaL_439 específica, diseñada en el trabajo citado para la *Gammaproteobacteria Stenotrophomonas maltophilia* (Piccini *et al.*, 2006).

Se ha discutido que existen otros factores que pueden incidir en el tipo de interacción entre ambas comunidades. Entre ellos se incluyen: disponibilidad de NOP y POD, bacterivoría, luz y temperatura (Björkman y Karl, 1994, Felip *et al.*, 1996; Lind *et al.*, 1997) y la radiación UV (Fortune y Ochs, 2008).

1.4 Efecto del zooplancton en el ciclo del N

Si bien el ambiente condiciona a través de la disponibilidad de nutrientes entre otros parámetros abióticos a las comunidades planctónicas a través del control *bottom-up* (McQueen *et al.* 1989), se ha descrito que la biomasa de determinado nivel trófico no solo estaría influida por la disponibilidad de energía sino también por la predación (control *top-down*). Por lo tanto, la tasa de crecimiento de una población estará regulada por un control *bottom-up* y la densidad de una población o comunidad estará limitada por el control *top-down* (Gliwicz *et al.*, 2002).

En un sistema acuático entonces habrá, además de interacciones de competencia y comensalismo, otro tipo de interacción importante que es de naturaleza trófica, es decir, la adquisición de nutrientes a través de la predación (Lampert y Sommer, 1997). La predación es compleja y engloba efectos que surgen a través de la interacción directa entre los organismos (predador-presa) o indirecta a través del efecto de “cascada trófica” (Stibor *et al.*, 2004) (Fig. 4A).

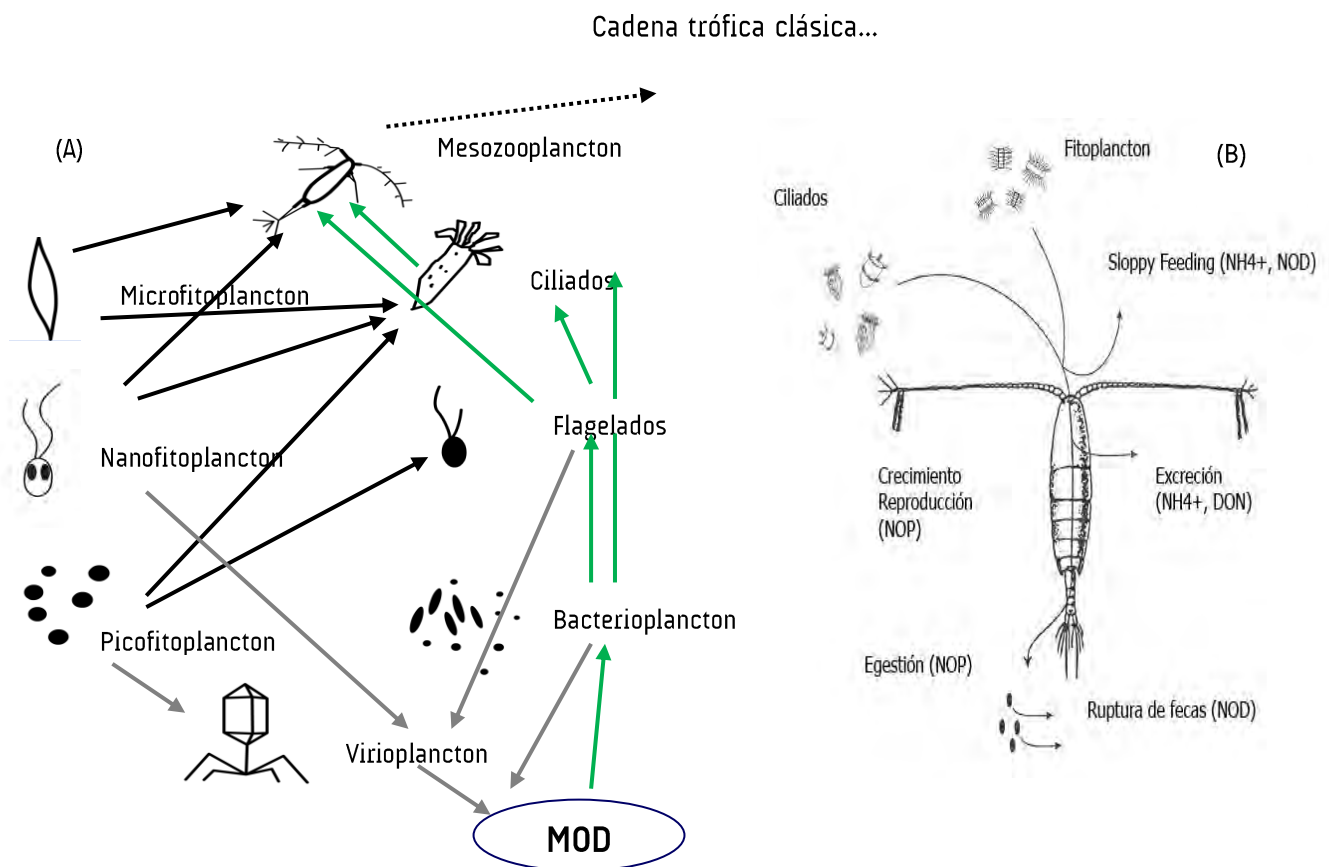


Figura 4. (A) Diagrama simplificado de la trama trófica en un sistema acuático, indicando el rol del bucle microbiano (flechas verdes). Los flujos principales de C y energía están indicados con líneas negras mientras que las líneas grises representan flujos de menor magnitud. Los dibujos no están a escala (modificado de Pomeroy *et al.*, 2007). (B) Diagrama ejemplificado de las vías de consumo y metabolismo del N del zooplancton (adaptado de Møller *et al.*, 2003).

Los efectos de dichas interacciones pueden tener un impacto transitorio o generar fluctuaciones más profundas que pueden alterar las propiedades y apariencia de un ecosistema (Pace *et al.*, 1999).

La composición de la trama trófica microbiana en los sistemas acuáticos incluye virus, bacterioplancton heterótrofo y autótrofo (cianobacterias, entre otros grupos bacterianos) y organismos unicelulares eucarióticos, tanto auto como heterótrofos (revisado en Pomeroy *et al.*, 2007). A través del bucle microbiano los niveles tróficos superiores liberaran MOD que posteriormente es reincorporada por el bacterioplancton (Fig. 4A). El cierre de este bucle está dado por el nanoflagelados, que por la predación del bacterioplancton y posteriormente su predación por el mesozooplancton se da la transferencia de energía a niveles tróficos superiores (Azam *et al.*, 1983). El microzooplancton está conformado por ciliados (15 a 200 μm), flagelados heterótrofos (200 a 1000 μm) y rotíferos (100 a 1000 μm) y el mesozooplancton por copépodos (300 a 1500 μm) y cladóceros (200 a 3000 μm) (Lampert y Sommer, 1997).

El zooplancton juega un rol esencial y multifacético en el ciclo del N (Fig. 5B) ya que al consumir NOP controla por un lado a la producción primaria, pero también estimula el crecimiento del fitoplancton al excretar N al medio (Miller y Landry, 1984; Pérez-Aragón *et al.*, 2011). Además, puede mantener al crecimiento bacteriano al liberar MOD durante el consumo de fitoplancton (Carlson *et al.*, 2002; Jumars *et al.*, 1989). La identidad del predador planctónico superior no es lo único relevante de la estructura de la comunidad, sino también la calidad y el tipo de alimento que predomine en la misma (Rautio y Vincent, 2006), ya que el tipo de presa modifica el comportamiento de los micro-invertebrados y su rol en el ciclo del N (Rocha *et al.*, 2008).

Una fracción significativa de la producción primaria de los océanos es depredada por el zooplancton (Steinberg y Saba, 2008). Las tasas de depredación de microzooplancton indican en promedio que el mismo consume entre 60 y 75% de la producción primaria diaria, tanto en zonas de océano abierto como en zonas costeras (Calbet y Landry, 2004). Además, el mesozooplancton es responsable de remover entre 10 y 40% de la producción primaria (Calbet, 2001). Como se mencionó anteriormente el bacterioplancton es consumido directamente por nanoflagelados y ciliados (Azam *et al.*, 1983; Strom, 2000; Pernthaler, 2005). Sin embargo, el bacterioplancton no es depredado directamente por el mesozooplancton, aunque si está colonizando pellets fecales o nieve marina que puede ser consumido por organismos detritívoros, como por ejemplo copépodos (Steinberg, 1995).

Un efecto indirecto de la depredación es la generación de cantidades significativas de MOD que ocurre con el *sloppy feeding*, definido como la ruptura física de células de fitoplancton o de presas animales por la acción de la predación (Møller y Nielsen, 2001). Dicho proceso se ve favorecido cuando las presas son de gran tamaño (ya que impide su completa ingestión) o por una alta abundancia de las mismas (como por ejemplo cuando se dan

floraciones del fitoplancton) (Roy *et al.*, 1989; Møller, 2007). Vincent y colaboradores (2007) estudiaron a copépodos alimentados con diatomeas marcadas con ^{15}N y observaron que la liberación de NOD por *sloppy feeding* era equivalente a la mitad del NOD liberado por excreción.

Otro proceso que involucra al zooplancton con la liberación de nutrientes y al ciclado de N es la producción de fecas, ya que a través de ellas se transportan nutrientes hacia aguas más profundas y al sedimento (Steinberg y Saba, 2008). La composición de las mismas varía de acuerdo al tipo de presa (tamaño, cantidad y tipo) (Urban-Rich *et al.*, 1998) y pueden contener productos digestivos no absorbidos que constituyen una importante fuente de MOD para el bacterioplancton (Lampitt *et al.*, 1990). El producto nitrogenado principal en la excreción del mesozooplancton (Bidigare, 1983) y del microzooplancton es el NH_4^+ (Caron y Goldman, 1990). El NH_4^+ es generado como producto final del catabolismo de proteínas y aminoácidos y sus tasas de excreción dependen, entre otros factores, del tamaño del animal, de la temperatura y de la dieta (Steinberg y Saba, 2008). La cantidad de compuestos nitrogenados orgánicos (urea y aminoácidos) excretados por el mesozooplancton suele ser menor que la de NH_4^+ (Bidigare, 1983). Sin embargo, en un estudio realizado en la zona de surgencia en Concepción (Chile) se observó que el NH_4^+ no era el principal producto de excreción de copépodos, sino que lo eran compuestos no ureícos del NOD (Pérez-Aragón *et al.*, 2011).

1.5 Justificación del estudio

Los sistemas costeros como lagunas, estuarios y marismas están entre los sistemas más productivos del planeta (Abreu *et al.*, 1994; Castel *et al.*, 1996). Las lagunas costeras son cuerpos de agua someros separados del océano por una barra de arena y conectados a éste en forma intermitente (Kjerve, 1994). La ecología de las lagunas costeras está fuertemente influenciada por el ambiente fisicoquímico: flujos generados por mareas y corrientes, entrada de sedimento y agua marina y aportes de nutrientes desde la cuenca o aguas subterráneas. La mezcla esporádica de agua dulce y marina provoca una alta variabilidad fisicoquímica tanto en el espacio como en el tiempo (Oliveira y Kjerve, 1993). Además son sitios de nidación de aves, de desove de varias especies ictícolas de interés comercial que sustentan la pesquería artesanal y actividades de ecoturismo, entre otras. Según Schuyt y Brander (2004), la productividad de las lagunas costeras mundiales asciende a US\$ 5.3×10^9 / año.

Tanto el aumento del nivel del mar como la frecuencia e intensidad de lluvias e inundaciones de ríos o arroyos hacen que estas lagunas se encuentren entre los sistemas acuáticos más amenazados por el cambio climático global imperante (Troussellier y Gattuso, 2007) y por la polución antropogénica (Benlloch *et al.*, 1995).

La costa atlántica uruguaya cuenta con una serie de lagunas costeras entre las que se encuentra la Laguna de Rocha ($34^\circ 33' \text{ S} - 54^\circ 22' \text{ W}$) (Fig. 5). Ésta posee una profundidad media

de 0.6 m, un área de 72 km² y su cuenca abarca 1312 km². Se encuentra separada del océano Atlántico por medio de una barra arenosa que se abre naturalmente por al aumento del nivel de agua de la laguna o por acción del oleaje (Conde *et al.*, 2000). La entrada de agua marina provoca un gradiente salino en el sentido sur-norte (Pintos *et al.*, 1991), generándose dos zonas bien diferenciadas desde el punto de vista fisicoquímico: una zona de influencia marina (Sur) con alta conductividad y la zona límnic (Norte) con alta concentración de nutrientes, atenuación lumínica y alta producción primaria (Conde *et al.*, 2000).



Figura 5. Mapa de la costa Atlántica del Uruguay indicando la ubicación de las lagunas costeras.

Debido a su alta biodiversidad, tanto el Estado uruguayo como diversos organismos internacionales han reconocido formalmente la importancia de las lagunas costeras y la necesidad de su conservación y uso sustentable. Es así que, al igual que las demás lagunas de la costa atlántica uruguaya, la Laguna de Rocha es Área Natural Protegida (Decreto 260/77), Reserva de Biosfera “Bañados del Este” (MaB-UNESCO en 1977), constituye Zonas Núcleo y de Amortiguación a propuesta de PROBIDES (1999) y fue incluida recientemente en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP; Ley 17.234 de 2000). Sin embargo, pese a su *status* de Área Protegida, las actividades humanas se han seguido desarrollando en la cuenca de la Laguna de Rocha sin un monitoreo riguroso de su impacto sobre la salud del ecosistema. Desde 1997 esta laguna comenzó a mostrar signos de alteración en su funcionamiento, como el desarrollo y expansión de macrófitas en la zona norte (Conde *et al.*, 2000), floraciones de cianobacterias (Conde *et al.*, 2004), crecimiento explosivo de bacterias heterótrofas (Piccini *et al.*, 2006) y aumento tanto en la concentración de clorofila *a* (C_{lo a}) como de materia orgánica en suspensión (Aubriot *et al.*, 2005). A su vez, se ha observado que en los últimos años las concentraciones de NH₄⁺, NO₃⁻ y NO₂⁻ en la columna de agua han disminuido respecto a las medias históricas. Concomitantemente, se detectó un aumento de la concentración de fósforo

total (PT) hasta cinco veces el promedio histórico (Conde *et al.*, 1999), así como una variación en la relación atómica N/P, con una disminución de casi un orden de magnitud, hasta valores de 10 (Aubriot *et al.*, 2005).

Si bien los datos indican una pérdida de N del sistema, la aparición de la primera floración de cianobacterias (Conde *et al.*, 2004) y de bacterias heterótrofas (Piccini *et al.*, 2006) en la Laguna de Rocha se asoció significativamente con un aumento en la concentración de NH_4^+ en la columna de agua. La disminución de N en la columna de agua, sugiere una posible limitación por N en las comunidades planctónicas (Aubriot *et al.*, 2005), por lo que aportes de NH_4^+ podrían explicar la aparición de estas floraciones. Sabido es que la fotodegradación por la radiación ultravioleta de la MOD induce la liberación de NH_4^+ , por lo que Piccini *et al.* (2009) llevaron a plantear que la mineralización de la MOD por la radiación UV contribuye a la liberación de nutrientes y tiene un efecto sobre la composición de la comunidad del bacterioplancton en la Laguna de Rocha. Debido a que es un cuerpo de agua tan somero, la resuspensión del sedimento debería generar la entrada de pulsos de nutrientes (puntuales o continuos) por la acción del viento, como ha sido reportado en varios sistemas (revisado en Joye y Anderson, 2008), aunque en la laguna dicho proceso ha sido poco estudiado. Existen dos investigaciones cuyos resultados son contradictorios. En Alonso *et al.* (1997) no se observó aumento en la concentración de nutrientes ni en la composición de la comunidad fitoplanctónica en experimentos con agitación intermitente de sedimentos. Por el contrario, Pérez *et al.* (2007), en *corers* que contenían una fracción de sedimento y agua de la zona Norte de la Laguna de Rocha, observaron un aumento en el NH_4^+ y en la abundancia de bacterias en la columna de agua a las 4 horas de incubación. Asimismo, se observó que luego de 18 horas de incubación la concentración de NH_4^+ disminuyó junto con la abundancia bacteriana. Por otro lado, Aubriot y colaboradores (2005) demostraron experimentalmente que la producción primaria en la Laguna de Rocha no solo estaría limitada por N sino también por P. Asimismo, la radiación UV es capaz de inhibir o estimular la incorporación de P dependiendo del estado nutricional del fitoplancton (Aubriot *et al.*, 2004). Esto estaría indicando que si bien el sistema está limitado por N, existen procesos puntuales tales como la (foto)-mineralización y resuspensión del sedimento, entre otros, que aportarían nutrientes (especialmente NH_4^+) que sustentarían el crecimiento de las comunidades microbianas. Por otro lado, se están analizando otras hipótesis para explicar las observaciones relacionadas a la concentración de N disuelto en la Laguna de Rocha, como por ejemplo que la pérdida de N a la atmósfera es debida al proceso de desnitrificación, prediciéndose así que el sistema se comporta biogeoquímicamente como una fuente de N (Rodó, com. pers.).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Para explicar los eventos observados en la Laguna de Rocha en esta Tesis se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1: Se ha registrado una disminución en la concentración de NID en la columna de agua de la Laguna de Rocha (Aubriot *et al.*, 2005), sin embargo una floración de bacterias heterótrofas de la especie *Stenotrophomonas maltophilia* (Gammaproteobacteria) ocurrida en diciembre de 2003 estuvo asociada a un incremento en la concentración de NH_4^+ (Piccini, 2006). Por otro lado, en marzo de 2003 ocurrió otra floración de bacterias heterótrofas, *Sphingomonas echinoides* (Alfaproteobacteria), esta vez en relación a una floración de cianobacterias y por ende a un pico en la concentración de Chl *a*. La concentración de NH_4^+ fue menor pero detectable con respecto a la floración ocurrida en diciembre de 2003 (Conde *et al.*, 2004; Piccini *et al.*, 2006). En este contexto se postula la hipótesis que *el NH_4^+ que ingresa al sistema genera una incorporación activa del nutriente por la comunidad bacteriana y del fitoplancton que llevan a la disminución en la concentración en la columna de agua.*

Hipótesis 2: Las bacterias que fueron capaces de formar floraciones son en general poco abundantes en otras condiciones en la Laguna de Rocha. En particular, *Stenotrophomonas maltophilia* declinó su abundancia relativa a menos de un 10% al tercer día de ocurrido la floración (Piccini *et al.*, 2006). Esto estaría sugiriendo que la depredación mantendría la resiliencia del sistema al controlar el crecimiento explosivo de ciertas poblaciones bacterianas. En este marco, la segunda hipótesis de esta Tesis postula que *el crecimiento de las comunidades microbianas planctónicas estimulado por la disponibilidad de NH_4^+ es afectado por la presencia de depredadores.*

2.2 Objetivos General y Específicos

La presente tesis tiene como **objetivo general** dilucidar el rol de la comunidad bacteriana planctónica en la captación de NH_4^+ en la Laguna de Rocha.

Se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar las tasas de captación de NH_4^+ por parte del bacterioplancton en presencia y ausencia de fitoplancton o de mesozooplancton, así como también la naturaleza de la interacción entre el bacterioplancton y el fitoplancton.
- Conocer cómo el efecto cascada trófica afecta a la captación de NH_4^+ .
- Estimar cómo la composición del ensamblaje bacteriano se ve afectada por la interacción con el fitoplancton o por el efecto cascada trófica.

2.3 Estructura de la Tesis

En la presente Tesis se realizaron dos tipos de experimentos (Secciones 4.3.1 y 4.3.2 respectivamente) que se basaron en la incubación de agua de dos zonas de la Laguna de Rocha con la adición de un trazador ($^{15}\text{NH}_4^+$). En cada experimento se realizaron dos tratamientos que consistieron en la prefiltración del agua para remover a un componente de la trama trófica microbiana y así poder comparar la captación de NH_4^+ bacteriana en esas situaciones así como también las posibles fluctuaciones en la composición del ensamblaje bacteriano por técnicas independientes de cultivo. Los resultados de los mismos fueron analizados por separado con su respectiva discusión. Por último, se hizo una discusión general de los principales resultados obtenidos en ambos experimentos y también se detallan las principales conclusiones obtenidas en esta Tesis. Se adjunta un anexo con un breve fundamento de las técnicas empleadas así como también una discusión de la aproximación experimental empleada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estrategia general

Para lograr el objetivo general de esta tesis se realizaron dos experimentos que incluyeron microcosmos con agua proveniente de dos zonas de la Laguna de Rocha con características fisicoquímicas diferentes. El abordaje experimental se basó, según el objetivo específico, en la comparación de la captación de NH_4^+ por bacterioplancton en diferentes fracciones (con y sin fitoplancton y zooplancton) en tratamientos con agua original y con agua pre filtrada proveniente de las zonas en estudio. Se utilizó una aproximación con isótopos estables de ^{15}N para el cálculo de las tasas de captación por las diferentes comunidades y un abordaje independiente de cultivo para estudiar el efecto de los procesos evaluados en la abundancia y composición de la comunidad bacteriana.

3.2 Sitios de muestreo

En ambos experimentos el agua de la Laguna de Rocha fue tomada de dos áreas típicamente influidas por agua dulce y marina (Fig. 6). La selección se basó en estudios previos acerca de las características abióticas y biológicas del sistema (Conde *et al.*, 1999; Conde *et al.*, 2002). Brevemente, la estación Norte se caracteriza por tener influencia de agua dulce, una mayor concentración de nutrientes y de COD. La estación elegida en dicha zona para la colecta de agua fue cercana al sitio donde se ubican los “limnocorrales” 3 a 5 km de la desembocadura del Arroyo Rocha y a 50 m de la costa W de la Laguna de Rocha (Arocena, 2000). La estación Sur, se caracteriza por aguas de influencia marina, lo que implica menor concentración de nutrientes y menor turbidez, entre otros. El sitio de colecta fue próximo a la barra que conecta o aísla a la Laguna de Rocha del océano Atlántico.



Figura 6. Mapa de la Laguna de Rocha y sus principales tributarios. Los puntos indican las dos estaciones de muestreo.

3.3 Mediciones *in situ*

En ambos experimentos y para cada zona se midieron los siguientes parámetros ambientales:

- pH, temperatura y conductividad con un sensor ES-12 (Horiba Inc., Irvine, CA).
- Concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo inorgánico disuelto y total) mediante técnicas de rutina (APHA, 1995).
- Clorofila *a*: se filtraron de 0.1 a 0.5 L de agua por medio de filtros GF/C de fibra de vidrio (Whatman Inc., Florham Park, NJ) e inmediatamente conservados a -20°C. Luego se realizó la extracción del pigmento por la técnica de etanol caliente (ISO 10260, 1992).

3.4 Experimentos

3.4.1 Interacción entre bacterioplancton y fitoplancton en la captación de amonio

Para analizar la interacción entre el bacterioplancton y el fitoplancton se diseñó un experimento que se realizó de acuerdo a Parker (2005) a principios de mayo de 2009.

Para ello se abordó la aproximación de fraccionamiento por tamaño (filtración) y el empleo de isótopos estables del ^{15}N en los puntos indicados en la Fig. 6. Los ensayos se llevaron a cabo en corers de PVC (3 L) previamente lavados con ácido al 10%. El agua de cada zona se incubó en condiciones de temperatura y luz similares a las *in situ* ($\approx 15^\circ\text{C}$; $689 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$). Se utilizó como trazador $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una concentración cercana a 10 % de la concentración ambiental de NH_4^+ para así evitar el sobre-enriquecimiento. Para calcular esta concentración, se utilizó la base histórica de nutrientes de la Laguna de Rocha de la Secc. Limnología (FCIEN) (Rodríguez, L. com pers.). La concentración final empleada en las incubaciones fue de 50 nmol L^{-1} del trazador. Se realizaron dos tratamientos que se detallan a continuación y se emplearon triplicados para estudiar a las variables biológicas (captación de NH_4^+ , abundancia bacteriana, etc.). Un tratamiento consistió en incubar agua de la Laguna de Rocha sin filtrar (*comunidad total*, CT) y así representar a las interacciones que tienen lugar normalmente en el sistema en estudio por captación de NH_4^+ (Fig. 7A). El otro tratamiento, realizado con el fin de evaluar el efecto del fitoplancton sobre la captación de NH_4^+ por parte de las bacterias planctónicas en un pre-filtrado (PF) de agua por un filtro de fibra de vidrio pre-calcinada (GF/C; $1.2 \mu\text{m } \varnothing$ Whatman Inc. Florham, NJ) para remover a la fracción mayor o igual a $1.2 \mu\text{m}$ (fitoplancton y protozoarios). Las incubaciones estuvieron compuestas entonces

principalmente por bacterioplancton y allí se evaluó la captación directa del N inorgánico de esta fracción de la comunidad bacteriana (Fig. 7B).

Se colectaron muestras en cada zona a diferentes tiempos (0, 0.5, 2 y 4 horas) para analizar la captación de NH_4^+ del fitoplancton y del bacterioplancton, la abundancia bacteriana y para fluorescencia *in vivo*. Al inicio y final del tratamiento CT, se filtraron 100 mL de agua para posteriormente realizar la extracción de ADN genómico total.

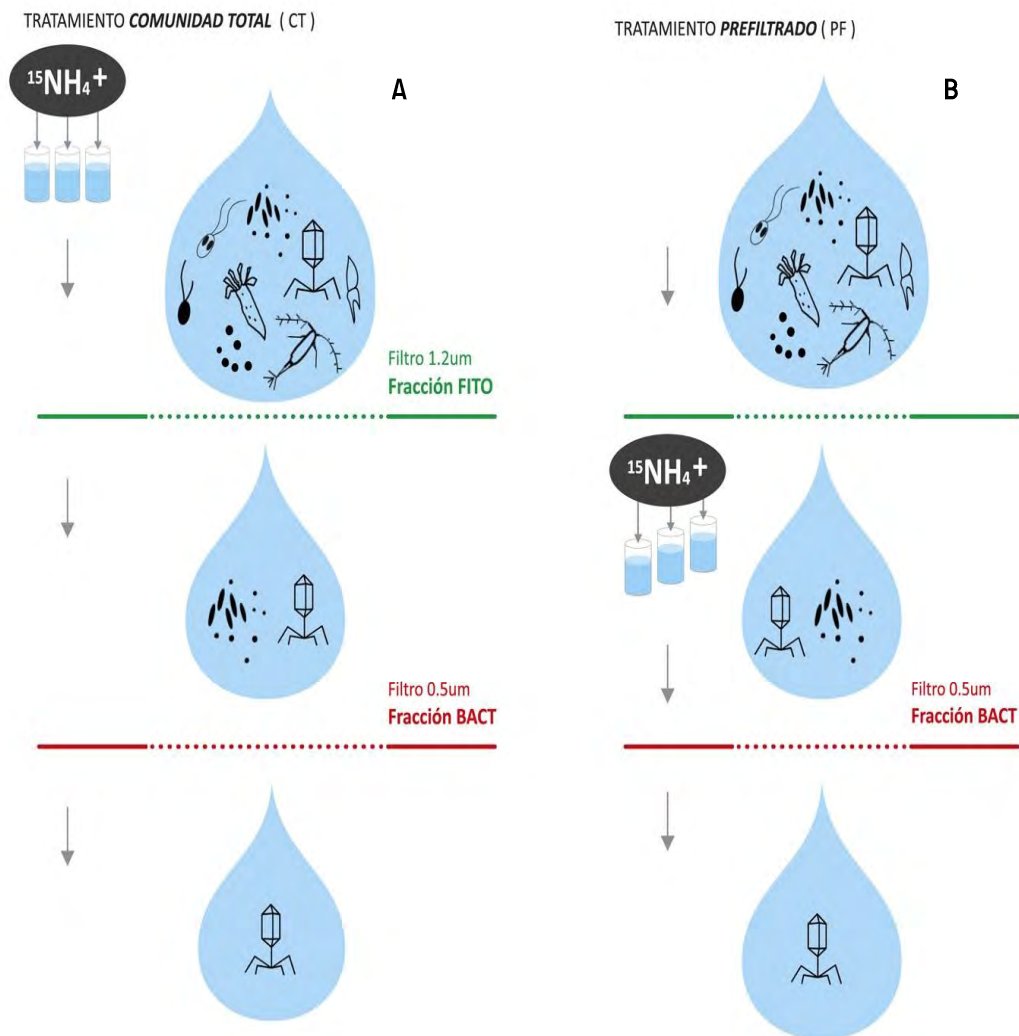


Figura 7. Esquema del tratamiento CT (izquierda) y PF (derecha) del experimento 3.4.1 para ambas zonas de la Laguna de Rocha. Se muestran los corers (microcosmos) y cada una de las comunidades microbianas planctónicas con las que se trabajó. Los dibujos de los diferentes miembros del ensamblaje microbiano planctónico no están a escala (ver Fig. 5 por leyendas).

3.4.2 Efecto de “cascada trófica”

Para evaluar el efecto “cascada trófica” en la captación de NH_4^+ se realizó un experimento en mayo de 2010 con agua proveniente de los puntos indicados anteriormente en la Fig.6. En dicho experimento también se hicieron dos tratamientos y se tomaron muestras por triplicado. Un tratamiento consistió en incubar agua de la Laguna de Rocha sin filtrar (*comunidad total*, CT) (Fig. 8A) y el otro tratamiento (*sin mesozooplankton*, NZ00) (Fig. 8B) consistió en pre-filtrar el agua por una malla de 35 μm de diámetro, para remover la fracción de mesozooplankton (Calliari *et al.*, 2009). Este tratamiento estuvo compuesto principalmente por bacterioplancton, (pico y nano)-fitoplancton, ciliados y virioplancton.

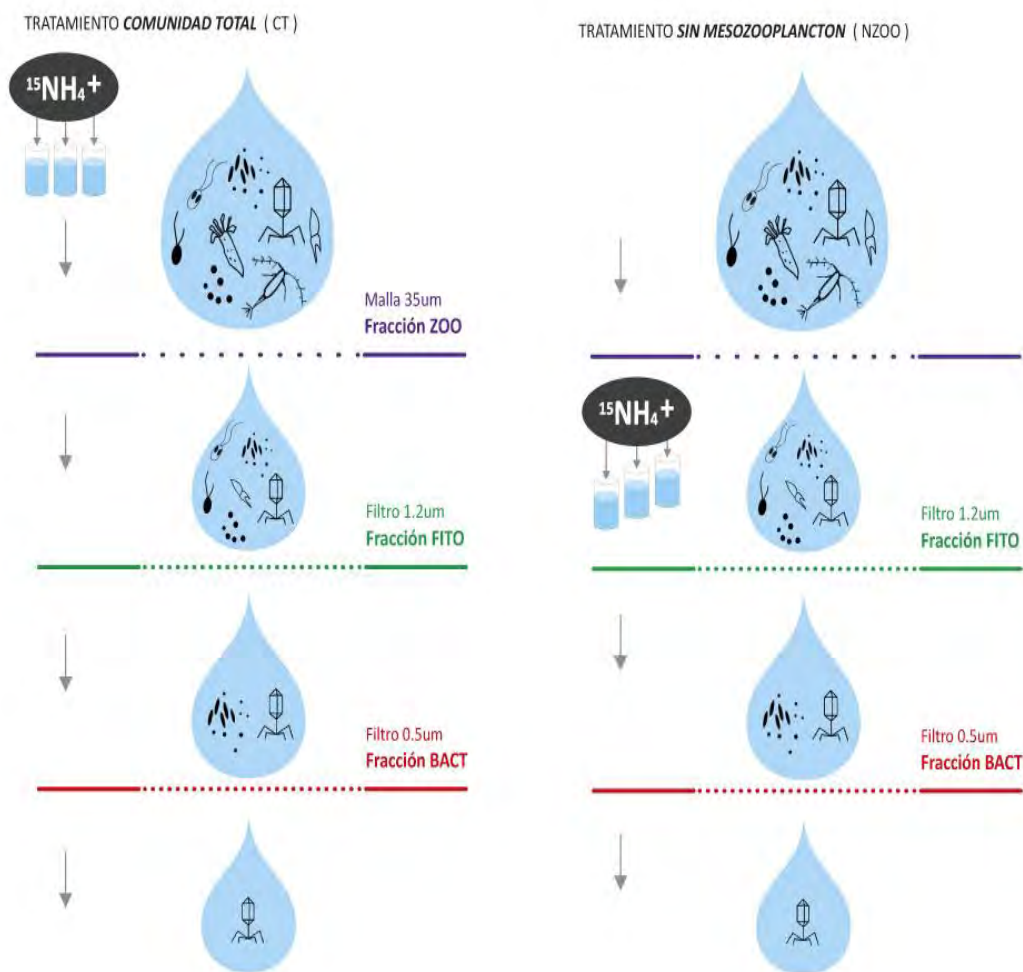


Figura 8. Esquema del tratamiento CT (A) y NZ00 (B) del experimento 3.4.2 para ambas zonas de la Laguna de Rocha. Se muestran los corers (microcosmos) y cada una de las comunidades con las que se trabajó. Los dibujos de los diferentes miembros del ensamblaje microbiano planctónico no están a escala (ver Fig. 5 por leyendas).

Se colectaron muestras de cada tratamiento de los experimentos de cada zona a diferentes tiempos (0, 1, 2 y 4 horas) para analizar la captación de amonio, abundancia y composición de la comunidad bacteriana por *CARD-FISH* y para la extracción de ADN genómico con el fin de analizar cambios en la comunidad bacteriana (*T-RFLP*). Las incubaciones se finalizaron al filtrar las muestras por filtros de fibra de vidrio (pre- calcinadas durante 4 h). En ambos tratamientos se realizó un fraccionamiento post-incubación. En el tratamiento CT se filtró primero por una malla de 35 μm (fracción ZOO) y lo retenido en la malla luego fue transferido a un filtro de 1.2 μm para hacer el análisis isotópico. El agua filtrada se continuó filtrando con un filtro de 1.2 μm (fracción FITO) y finalmente se volvió a filtrar por un filtro de fibra de vidrio de 0.5 μm $\varnothing$ (fracción BACT).

3.5 Técnicas y cálculos

3.5.1 Tasas de captación de amonio

La captación neta de NH_4^+ ($\rho_{\text{NH}_4^+}$) por parte de las diferentes fracciones analizadas en ambos experimentos fue calculada de acuerdo a Dugdale y Wilkerson (1986):

$$\rho_{\text{NH}_4^+} = (R_{\text{NOP}}/R_{\text{NH}_4^+} \times t) \times [\text{NOP}]$$

donde R_{NOP} y $R_{\text{NH}_4^+}$ representan el exceso de enriquecimiento en ^{15}N de los *pools* de NOP y NH_4^+ , respectivamente, $[\text{NOP}]$ representa la concentración de N orgánico particulado NOP; y t representa la duración (h) de la incubación. Los filtros conteniendo a la biomasa tomados en cada tiempo de incubación fueron mantenidos a -20°C , desecados a 60°C durante 24 horas y finalmente colocados en cápsulas de estaño (Santis, Suiza). Para los experimentos de la interacción entre el bacterioplancton y fitoplancton (experimento 4.3.1), las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de relación isotópica de flujo continuo (Finnigan Delta Plus) en el Laboratorio de Procesos Oceanográficos y Clima de la Univ. de Concepción (Concepción, Chile). Las muestras del experimento del efecto cascada (experimento 4.3.2) fueron enviadas a la *Stable Isotope Facility* de la Universidad de Davis (E.E.U.U). En ambas ocasiones las técnicas de análisis por medio del IRMS fueron las mismas.

3.5.2 Abundancia bacteriana y biomasa del fitoplancton

Se determinó el número total de bacterias *in situ* y para cada tratamiento a partir de muestras fijadas con 1% PFA (vol/vol) por triplicado. Se filtraron 3 mililitros de agua por membranas de polycarbonato (diámetro: 25 mm; tamaño de poro 0,2 µm; tipo GTTP; Millipore) que se tiñeron con DAPI (1 µg mL⁻¹ cf.) por 5 min en oscuridad (Porter y Feig, 1980). El conteo manual de hasta 1000 células por muestra, se hizo en un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX81). Para observar posibles fluctuaciones en la biomasa de la comunidad fitoplanctónica durante el experimento de interacción entre bacterioplancton y fitoplancton (experimento 4.3.1) se utilizó como parámetro indirecto de la misma, la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* (Unidades Relativas de Fluorescencia, URF). Para ello se usó un fluorímetro AquaFluor (Turner Designs, E.E.U.U).

3.5.3 Extracción de ADN genómico total, PCR y TRFLP

Las muestras de 100 mL de agua de los tiempos inicial (0h) y final (4h) de cada tratamiento en ambos experimentos fueron filtradas en membranas de nitrato de celulosa y almacenadas inmediatamente a -20°C hasta su procesamiento. La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo modificado de Zhou *et al.* (1996). La calidad y concentración de ADN se confirmó mediante geles de agarosa (1%) y espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Scientific). El ADN extraído del experimento de interacciones entre bacterioplancton y fitoplancton (4.3.1) del tratamiento CT (0 y 4 h) en ambas zonas se envió al *Microbiome Core Facility* (Universidad de Carolina del Norte, E.E.U.U). Brevemente, se amplificó el gen del 16S ARNr con los *primers* generales bacterianos 8F (Liu *et al.*, 1997) marcado con 6 -carboxi- fluoresceína (6-FAM) and 1492R (Lane, 1991). Los amplicones obtenidos fueron sometidos a restricción enzimática con las siguientes enzimas *MspI*, *HhaI* y *RsaI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, E.E.U.U), mezclados con GeneScan-500 Size Standard (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, E.E.U.U) e ingresados a un secuenciador.

Para el análisis de los experimentos del efecto de “cascada trófica” (4.3.2) el T-RFLP se realizó en el Departamento de Ecología Molecular del Instituto de Microbiología Marina Max Planck (Bremen, Alemania). Para ello, se amplificó al gen del 16S ARNr mediante la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) en un Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se utilizaron los *primers* generales bacterianos 27f -YM (Frank *et al.*, 2008) marcados con 6-carboxifluoresceína (FAM) y GM4R (Muyzer *et al.*, 1993) marcados 6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexacloro-fluoresceína (HEX). Por cada muestra se realizaron 3 reacciones de PCR independientes en las condiciones que se mencionan en la (Fig. 9). Posteriormente se hizo la digestión con las siguientes enzimas de restricción: *AluI*, *HhaI* y *MspI* (New England BioLabs), en las condiciones de reacción recomendadas por el fabricante. Cada reacción de PCR fue digerida con las 3 enzimas por separado. Luego se utilizaron columnas de *Sephadex* para purificar los productos de

restricción y se cuantificó al ADN utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific). Por último, se prepararon las muestras para ingresarlas al secuenciador. Para eso se hizo un *mix* con un marcador de fragmentos de diferentes longitudes de pares de bases (Map Marker), un colorante, formamida-HiDi desionizada y una concentración de ADN cercana a 100 ng.

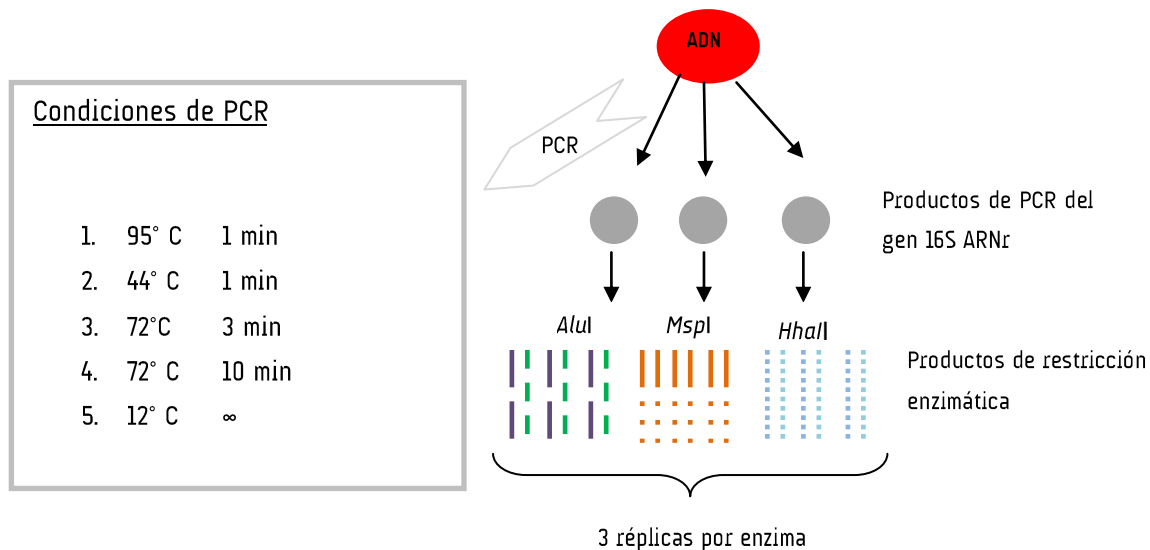


Figura 9. Diagrama de la estrategia de TRFLP donde se indica las condiciones de la PCR y el tratamiento enzimático aplicado a los productos de PCR obtenidos.

3.5.3.1 Análisis de los T-RF

Los fragmentos de restricción terminales (*T-RF*) del experimento 4.3.1 fueron procesados con la herramienta bioinformática PAT (*Phylogenetic Assignment Tool*) para compararlos con la base de datos de *Ribosomal Data Project* (RDP). De esa manera, se le asignó una afiliación filogenética a cada *T-RF*. En este análisis se llegó hasta nivel de filo o de clase en el filo Proteobacteria (Gil *et al.*, 2005; de la Iglesia *et al.*, 2006).

A continuación se procede a detallar cómo se procesaron los *T-RF* obtenidos de las muestras de ADN obtenidos de las incubaciones del experimento 4.3.2. Los electroferogramas obtenidos del análisis de fragmentos fueron ingresados al software GeneMapper v 3.7 (Applied Biosystems) y luego las tablas obtenidas se procesaron con *binning scripts* desarrollados por Ramette (2009) utilizando el programa R. Una vez hecho el *binning* de todos los *T-RFs*, los datos de Intensidad de Fluorescencia Relativa se utilizaron para realizar análisis estadísticos multivariados (ver Sección Análisis estadístico).

3.5.5 Composición de la comunidad bacteriana (CARD-FISH)

En el experimento de efecto de cascada trófica (4.3.2), 3 mL de cada muestra previamente fijada con PFA al 1% cf. se filtraron en filtros de polycarbonato de 0.2 µm de diámetro de poro (GTPP, 47 mm de diámetro, Millipore). Los filtros se enjuagaron con PBS (1%), se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis. Se realizó hibridación *in situ* (FISH) empleando sondas marcadas con peroxidasa y deposición catalizada con tiramidas (CARD) como se describe en Pernthaler *et al.* (2002). Se utilizó un protocolo de permeabilización modificado (Teira *et al.*, 2004) y el fluorocromo que se usó fue el isotiocianato de fluoresceína (FITC, excitación 494 nm/emisión 518 nm). Las sondas grupo-específica empleadas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Sondas empleadas para determinar la composición de la comunidad bacteriana (CARD-FISH).

** Miembros del filo Bacteroidetes.

Sonda	Hibrida a:	Cita
EUBI-III	<i>Eubacteria</i> *	Daims <i>et al.</i> ,1999
ALF968	<i>Alfaproteobacteria</i>	Glockner <i>et al.</i> ,1999
BET42a	<i>Betaproteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> ,1992
GAM42a	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz <i>et al.</i> ,1992
CF319a	<i>Citófaga-Flavobacteria</i> **	Manz <i>et al.</i> ,1996
HGC69a	<i>Actinobacteria</i>	Roller <i>et al.</i> ,1994
ARC915	<i>Arquea</i>	Stahl y Amann, 1991
PLA46	<i>Planctomycetes</i>	Neef <i>et al.</i> ,1996

Las secciones de filtros utilizadas para la hibridación fueron teñidas con DAPI (1 µg mL⁻¹, cf.) y embebidas en medio montante (Pernthaler *et al.*, 2004). Al menos 1000 células teñidas con DAPI por muestra se contaron manualmente con un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81).

3.5.6 Análisis estadístico

Para evaluar diferencias significativas en las abundancias bacterianas, tasas de captación, fluorescencia *in vivo* y la abundancia relativa de diferentes grupos bacterianos durante los experimentos se realizó un Análisis de la Varianza de Medidas Repetidas (ANOVA MR), tomándose como factores a los tratamientos (CT y PF o CT y NZ00). Si el supuesto de esfericidad no se cumplía (Test de Mauchly), los grados de libertad fueron modificados utilizando los factores de Greenhouse-Geisser (1959) y Huynh y Felt (1976). Las comparaciones *Post hoc* se hicieron empleando el Test de Tukey.

Las comparaciones de los parámetros biológicos (abundancia bacteriana y Clo *a*) entre zonas se hizo a través de ANOVA de una vía (ANOVA). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico Statistica v 7.0 (StatSoft Inc.).

En el caso de T-RFLP se realizaron análisis estadísticos multivariados como lo son el escalamiento multidimensional no métrico (*Non Metric Multidimensional Scaling*, NMDS) y análisis de *clusters*. Con el NMDS se obtuvo el valor de *stress* (s), el cual es una medida de cuánto se ajusta la distribución del algoritmo iterativo (*goodness of fit*). Por ende un valor de “s” superior a 0.2 indica un ordenamiento al azar, un valor menor a 0.2 indica una buena ordenación en dos dimensiones (2D); mientras que un valor 0.1 representa una ordenación ideal (Clarke y Warwick, 2001). Por otro lado, se realizó un análisis de *clusters* que permite a una serie de objetos que sean similares entre sí asignarle un mismo grupo (*cluster*). Dichos análisis se hicieron a partir de matrices cuantitativas (área relativa de cada T-RF) y se ingresaron al programa PAST 1.38 (Paleontological Statics, <http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Interacción bacterioplancton fitoplancton

4.1.1 Resultados

4.1.1.1 Características del ambiente

La temperatura del agua de Laguna de Rocha fue mayor (15.5 °C) en la zona Norte pero el valor de conductividad fue casi el doble en la zona Sur (42.9 mS cm⁻¹). No hubo diferencias significativas en las abundancias bacterianas entre ambas zonas ($p > 0.05$), pero la concentración de Clo *a* fue significativamente mayor en el Norte (7.78 µg L⁻¹; $p = 0.016$) (Tabla 2).

Tabla 2. Características fisicoquímicas y biológicas de la Laguna de Rocha en las zonas límnic (N) y estuarina (S) durante el muestreo realizado en el mes de mayo de 2009. ND: no determinado. Los valores con ¥ corresponden a medidas únicas (dichos valores no se utilizaron para realizar análisis estadísticos). Letras diferentes indican que hubo diferencias significativas entre las zonas.

Variable	Norte	Sur
Temperatura (°C)	15.5 ¥	12.6 ¥
pH	7.73 ¥	ND ¥
Conductividad (mS cm ⁻¹)	24.7 ¥	42.9 ¥
Z (m)	1.35 ¥	0.47 ¥
Clo <i>a</i> (µg L ⁻¹)	7.78 ± 2¥01a	2.60 ± 0.90b
Abundancia bacteriana (N° cél mL ⁻¹)	1.82 x10 ⁶ (3.7x10 ⁵)a	1.62x10 ⁶ (4.6x10 ⁵)a

En cuanto a los nutrientes (Tabla 3), en la zona Norte tanto la concentración de N total como las fracciones de NID fueron mayores. El NO₂⁻ estuvo siempre por debajo del límite de detección en ambas zonas. En cambio, el NH₄⁺ fue detectable en el Norte (0.18 µmol L⁻¹) pero no así en el Sur. La concentración de NO₃⁻ fue casi 13 veces más alta en el Norte que en el Sur.

Tabla 3. Concentraciones de nutrientes en las zonas Norte y Sur de la Laguna de Rocha. DL: debajo del límite de detección.

Nutriente ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Norte	Sur
Nt	11.8	7.1
NO_2^-	DL	DL
NO_3^-	3.04	DL
NH_4^+	0.18	DL

4.1.1.2 Tasas de captación de amonio

En la Fig. 10 A se muestran las tasas de captación (ρ) de NH_4^+ para las fracciones FITO y BACT del tratamiento CT en el Norte de la Laguna de Rocha. En ambas fracciones las tasas de captación (ρ) de NH_4^+ tuvieron una cinética similar y llegaron al máximo al término de la incubación. No hubo diferencias significativas entre ambas fracciones y tampoco hubo diferencias significativas durante el transcurso de las incubaciones en las tasas de captación de las fracciones FITO o BACT (casi 10 veces) ($p > 0.05$).

Al comparar la incorporación de NH_4^+ de las fracciones BACT entre los dos tratamientos (CT y PF) se observó que las correspondientes a CT fueron significativamente mayores (Fig. 10 B) ($p < 0.05$).

En el Sur se vio que en el tratamiento CT la captación de NH_4^+ correspondiente a la fracción FITO fue significativamente mayor a las 4 horas en relación a las tasas obtenidas a las 0.5 y 2 horas en la fracción BACT ($p < 0.05$). Al comparar las tasas de captación correspondientes a las fracciones BACT entre ambos tratamientos (CT y PF) no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Además, tampoco se observaron diferencias significativas en las tasas de captación durante el desarrollo de las incubaciones para ninguna de las fracciones analizadas ($p < 0.05$) (Fig. 10 C y D). Las tasas de captación de NH_4^+ de las fracciones BACT de CT y PF fueron significativamente superiores en el Norte a las tasas calculadas para el Sur ($p < 0.05$).

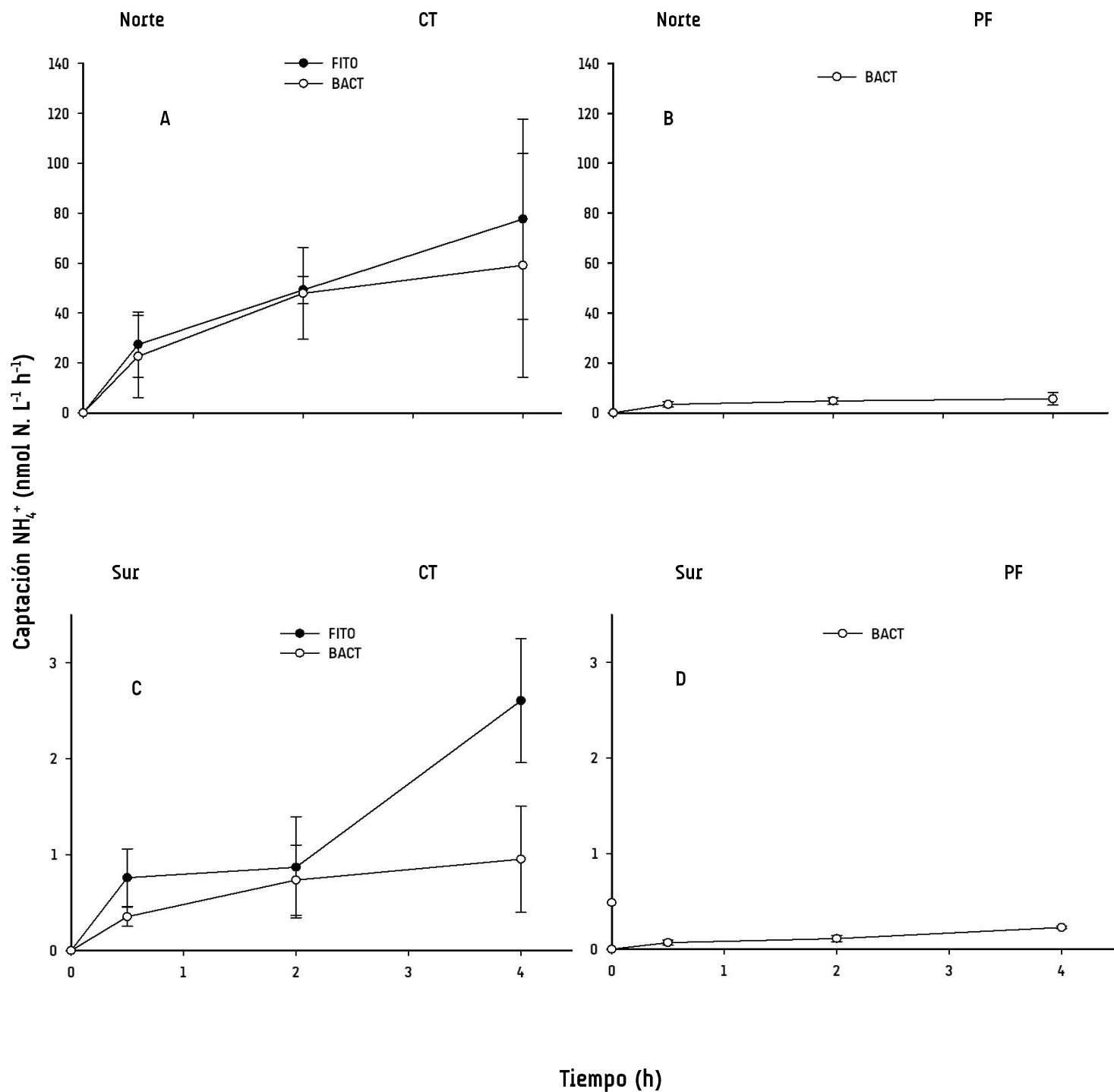


Figura 10. Tasas de captación de NH_4^+ para las fracciones FITO ($\geq 1.2 \mu\text{m}$) del tratamiento CT de la zona Norte y Sur respectivamente. (A y C) Tasas de captación correspondientes a la fracción BACT ($1.2 - 0.5 \mu\text{m}$) del tratamiento PF en la zona Norte y Sur (B y D) respectivamente en la Laguna de Rocha (mayo de 2009).

4.1.1.3 Abundancia bacteriana y concentración de clorofila *a* *in vivo*

En la Fig. 11 A se muestran las abundancias bacterianas del tratamiento CT, donde se observa que en la zona Norte la abundancia bacteriana disminuyó significativamente durante el transcurso del experimento. En particular, las abundancias a los tiempos 2 y 4 h fueron significativamente menores a la de los tiempos 0 y 0.5 h ($p < 0.05$). En cambio, en el tratamiento PF de la misma zona no hubo diferencias significativas durante el transcurso de la incubación ($p > 0.05$) (Fig. 11B). Al comparar las abundancias entre ambos tratamientos, se vio que la abundancia a las 0.5 horas del tratamiento CT fue significativamente mayor a las abundancias calculadas para los tiempos 2 y 4 horas del tratamiento PF ($p < 0.05$).

En el tratamiento CT de la zona Sur la abundancia bacteriana aumentó durante la incubación, siendo significativamente mayor a las 2 y 4 horas que a los tiempos 0 y 0.5 h ($p < 0.05$). Por el contrario, en el tratamiento PF no se encontraron diferencias significativas durante la incubación ($p > 0.05$). Al comparar ambos tratamientos se vio que la abundancia bacteriana del tiempo 4 h fue significativamente mayor en CT ($p = 0.0036$). Al confrontar los mismos tratamientos entre zonas, se vio que no hubo diferencias significativas en PF ($p > 0.05$), mientras que en CT, la abundancia bacteriana en la zona Norte a las 0.5 h fue significativamente mayor a la de los tiempos 0, 0.5 y 2 horas de la zona Sur ($p < 0.05$).

La observación al microscopio de epifluorescencia del filtrado obtenido luego de pasar a la muestra por el filtro de 0.5 μm mostró la ausencia de bacterias, confirmando que en dichos filtros se retuvo una gran proporción o toda la comunidad bacteriana de ambas zonas.

Para evaluar la evolución de la comunidad fitoplanctónica durante las incubaciones se empleó el monitoreo de la concentración de la Chl *a* utilizando a la fluorescencia *in vivo* como *proxy* (Fig. 11C). En el transcurso del tratamiento CT de la zona Norte no hubo fluctuaciones significativas ($p > 0.05$). Tampoco se observaron diferencias significativas en el mismo tratamiento de la zona Sur ($p > 0.05$). Los valores de fluorescencia *in vivo* de la Chl *a* siempre fueron significativamente más altos en la zona Norte que en la Sur ($p < 0.05$). Por otro lado, en los tratamientos PF los valores de fluorescencia siempre estuvieron debajo del límite de detección del equipo.

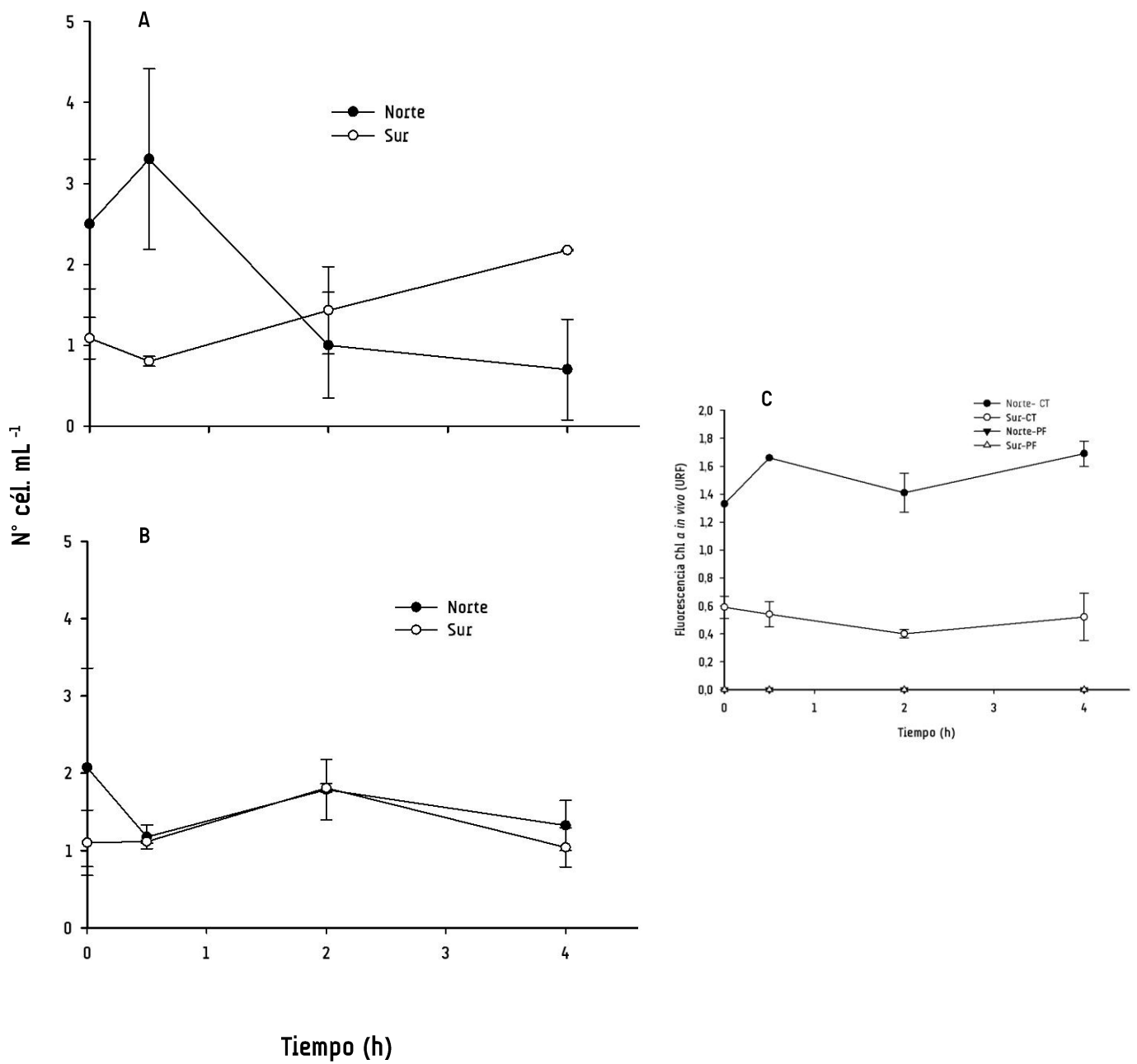


Figura 11. (A y B) Abundancia bacteriana en el transcurso de los tratamientos CT y PF en las zonas Norte y Sur respectivamente. (C) Fluorescencia *in vivo* de la Chl *a* en experimentos de la zona Norte y Sur en la Laguna de Rocha. URF (Unidades Relativas de Fluorescencia).

4.1.1.4 Composición de la comunidad bacteriana

Dado que se observaron diferencias significativas en la abundancia bacteriana del tratamiento CT, la composición del ensamblaje bacteriano se evaluó únicamente para este tratamiento. Para ello, se analizaron y compararon los T-RF de CT en ambas zonas en los tiempos iniciales (0 h) y finales (4 h).

En el tiempo inicial, *Gammaproteobacteria* fue el filo con mayor presencia en ambas zonas de estudio (Fig. 12 A y B). Las Actinobacterias y Cianobacterias tuvieron una abundancia relativa similar tanto en el Norte como el Sur. Por otro lado, las *Alphaaproteobacteria* y Bacteroidetes fueron más abundantes en el Norte de la Laguna de Rocha.

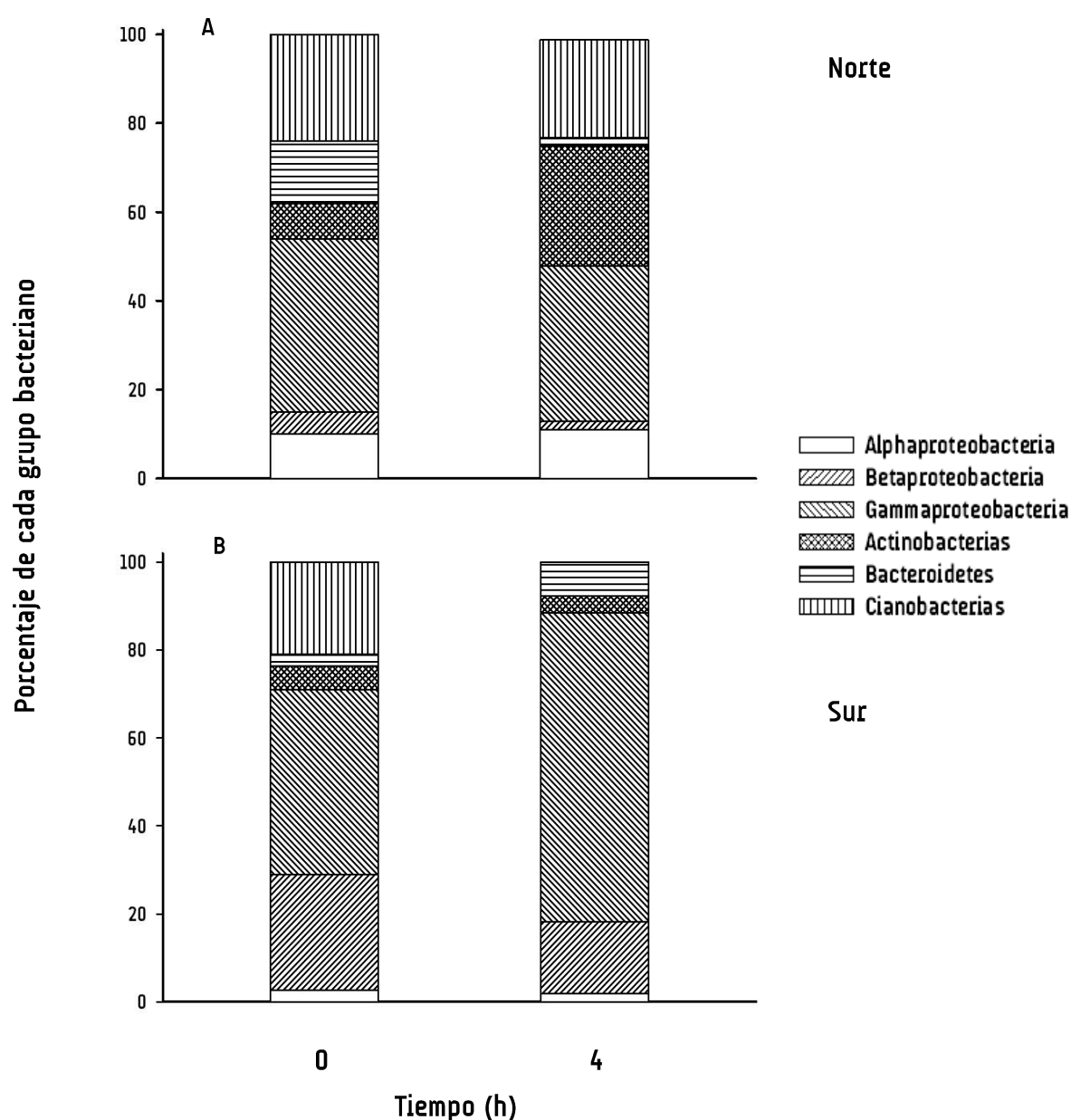


Figura 12 (A y B). Composición de la comunidad bacteriana determinada por T-RFLP-PAT del tratamiento CT de las zonas Norte y Sur de la Laguna de Rocha.

Al término de las incubaciones se observó que en la zona Norte la abundancia relativa de Actinobacterias aumentó con respecto a su abundancia inicial. El resto de los grupos permaneció relativamente constante a excepción del filo Bacteroidetes, el cual disminuyó su abundancia relativa. En el Sur, el ensamblaje al término de las incubaciones estuvo dominado por *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. No se detectó la presencia de Cianobacterias y los Bacteroidetes aumentaron luego de 4 horas de incubación. En cambio, las *Betaproteobacterias* disminuyeron su abundancia al término de la incubación.

En la figura 13 A y B se muestran los cambios en el número de OTUs al inicio y al término de las incubaciones del tratamiento CT en las dos zonas de la Laguna de Rocha. En los mismos se observa que no hubo variaciones en el número de OTUs entre el comienzo y el final de la incubación en relación a las OTUs específicas para cada tiempo. Sin embargo, el número de OTUs compartidas entre el inicio y el final del experimento fue mayor en el Norte.



Figura 13 (A y B). Representación de las OTUs bacterianos específicos (en el círculo) y comunes (intersección) entre el inicio y el final de las incubaciones en la zona Norte (A) y en la zona Sur (B).

4.2 Discusión

4.2.1 Tasas de captación de NH_4^+

La captación de N por parte del fitoplancton y bacterioplancton ha sido estudiada en diversos sistemas acuáticos (Bronk *et al.*, 2007). Es sabido que en condiciones donde un nutriente es limitante para ambas comunidades, éstas pueden competir por él (Joint *et al.*, 2002).

En este trabajo se observó que las tasas de captación de NH_4^+ para las fracciones FITO y BACT en el tratamiento CT de la zona Norte no presentaron diferencias significativas. Esto estaría sugiriendo que en la zona Norte las condiciones ambientales probablemente propiciaron una sinergia entre ambas comunidades planctónicas en el proceso de captación del nutriente en estudio. En los tratamientos CT y PF quedó en evidencia que la presencia del fitoplancton estimuló la captación bacteriana de NH_4^+ . Esto se confirmaría al comparar las tasas de captación de NH_4^+ de las fracciones BACT entre los tratamientos CT y PF, observándose valores de captación significativamente mayores en el tratamiento CT con respecto al tratamiento PF para dicha fracción. Bradley *et al.* (2010) estudiaron la captación de N del bacterioplancton y fitoplancton en mesocosmos durante una floración de *Phaeocystis pouchetii* y observaron tendencias similares a las encontradas en el tratamiento CT en la zona Norte de la Laguna de Rocha. Los autores concluyen que cuando las tasas de captación de NH_4^+ en ambas comunidades son similares, ocurriría entonces un acoplamiento metabólico entre ellas. Así, en el tratamiento CT de la zona Norte la interacción entre ambas comunidades pudo haber sido del tipo comensalista, posiblemente debido a que el fitoplancton excretó COD y éste estimuló la captación de NH_4^+ del bacterioplancton.

Asimismo, las bajas tasas de captación del bacterioplancton cuando está solo denotan que el proceso de captación NH_4^+ estuvo limitado por C. Esta idea concuerda con los resultados obtenidos por Joint *et al.* (2002), quienes encontraron que el agregado de nutrientes minerales (N y P) no estimuló las tasas de captación de NO_3^- y NH_4^+ en las comunidades planctónicas (fitoplancton y bacterioplancton), en mesocosmos realizados en una zona costera de Dinamarca. Sin embargo, al agregarle una fuente lábil de C como la glucosa, las tasas de captación de NO_3^- y NH_4^+ fueron más altas. Si bien en ese trabajo no pudieron diferenciar la captación entre ambas comunidades, es posible que debido a la disminución de la captación C inorgánico (por el fitoplancton), la glucosa haya estimulado a la comunidad bacteriana y por tanto su captación de NO_3^- y NH_4^+ . Esta condición de limitación del fitoplancton provocada por el bacterioplancton (por el agregado de C) pudo deberse a varias causas: que las bacterias fueran patógenas para el fitoplancton, a la liberación de metabolitos secundarios que inhibieron al fitoplancton, o a la generación de turbidez debida al crecimiento bacteriano y una concomitante atenuación de la luz.

Si bien en esta tesis no se determinó la concentración de COD ni su procedencia, resulta interesante discutir el origen de la fuente de C que pudo haber sido utilizada por la comunidad bacteriana. Esto ayudaría a fundamentar las diferencias significativas que hubo en las tasas de captación de NH_4^+ en las fracciones BACT de ambos tratamientos en el Norte, así como apoyar que la interacción entre el fitoplancton y el bacterioplancton en la captación de NH_4^+ fuera del tipo comensal. En el Norte de la Laguna de Rocha se ha reportado, en condiciones de conexión con el océano Atlántico (al igual que la presente tesis), que existiría una mayor concentración de COD comparado con la situación cuando no existe conexión entre el océano y la laguna (Conde *et al.*, 2000). Sin embargo, esa fuente de C no está necesariamente disponible para su utilización por el bacterioplancton heterótrofo. Piccini (2006) demostró en incubaciones con diversas fuentes de MOD (plantas acuáticas, sedimento y suelo) expuestas a la radiación solar total, que no todas tuvieron un efecto sobre la abundancia, composición y/o actividad bacterianas. Más precisamente, solo la MOD proveniente de las plantas generó cambios significativos en las variables evaluadas en la comunidad bacteriana. Teniendo en cuenta que días previos a la realización del experimento hubo precipitaciones, es probable que grandes cantidades de MOD de origen terrestre (suelo) hayan sido aportados desde la cuenca a la laguna por escorrentía. Si esta fuente de C alóctona no fue la utilizada por el bacterioplancton, cabe suponer que la comunidad bacterioplanctónica en el Norte dependió de una fuente de C proveniente del fitoplancton (autóctona) y por ende deja en evidencia una dependencia entre ambas comunidades, explicando los resultados obtenidos en la zona Norte.

Los resultados del tratamiento CT en el Sur de la Laguna mostraron un comportamiento diferente al observado en la zona Norte. En este caso, la fracción FITO en el tratamiento CT tuvo una tasa de captación significativamente mayor a la de la fracción BACT recién a las 4 horas. Esto haría suponer que hubo un desacople en la captación entre ambas comunidades. En dicha competencia la comunidad fitoplanctónica fue la más efectiva a la hora de captar al NH_4^+ con respecto a la comunidad bacterioplanctónica. Grover (2000) postula que las comunidades de fitoplancton que excretan importantes fracciones de COD pueden ser susceptibles a la competencia de nutrientes inorgánicos por parte del bacterioplancton. Esto haría suponer que en el Sur la comunidad fitoplanctónica estuvo más activa en la captación de NH_4^+ , no obstante ello no debió haber estado excretando compuestos carbonados al medio que pudieran estimular el proceso de captación de NH_4^+ por el bacterioplancton. Por tanto, el bacterioplancton pudo haber estado limitado por una fuente de C (especialmente autóctona) y eso habría afectado su desempeño en la captación de dicho recurso. Esta suposición estaría avalada por los resultados que obtuvieron Joint *et al.* (2002) detallados anteriormente. Además debe considerarse a las variables ambientales presentes en el Sur como la hidrología, que al estar la barra abierta la biomasa de fitoplancton fuera menor (Bonilla *et al.*, 2005) y también una mayor salinidad hayan influido en el estado fisiológico de las comunidades planctónicas (Macarelli *et al.*, 2007). Otra explicación posible de lo ocurrido en el Sur es lo que encontraron Fouilland *et al.* (2007). Dichos autores, estudiando la interacción entre el bacterioplancton y el fitoplancton en la captación de N, comprobaron que cuando la concentración de Chl *a* fue menor o igual a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, el bacterioplancton captó más NO_3^- . En el Sur el valor de Chl *a* fue de $2.60 \pm 0.90 \mu\text{g.L}^{-1}$ y se

podría llegar a suponer que el bacterioplancton en el Sur estuviera captando NO_3^- y no NH_4^+ . El NO_3^- estaba más bajo (por debajo del límite de detección) en el Sur que en el Norte y se podría interpretar que la diferencia en la concentración entre dichas zonas haya sido por una mayor captación de NO_3^- en el Sur. Sabido es que cuando las concentraciones de NH_4^+

Otro hecho a tener en cuenta es que en condiciones de intrusión marina dominan sedimentos arenosos en la Laguna de Rocha (Conde *et al.*, 2000) y el efecto de la entrada de COD por resuspensión es despreciable (Morales-Zamorano *et al.*, 1991), lo que también apoyaría la idea que en la zona Sur el proceso de captación del NH_4^+ estuvo limitado por una fuente de C, tanto alóctona como autóctona.

La captación de NH_4^+ correspondiente a la fracción BACT siempre fue mayor en el tratamiento CT (ambas zonas). Lo mismo fue observado por Parker (2005), quien observó que la captación correspondiente a la fracción bacteriana fue superior en presencia de toda la comunidad planctónica a que cuando fueron incubadas solas en el estuario Delaware (E.E.U.U.). Sin embargo, en ese mismo estudio también se observó que en algunos puntos del estuario con mayor influencia terrestre las bacterias solas captaban más N que aquellas que estaban en presencia del fitoplancton, probablemente debido a que la producción bacteriana estaba influida por el aporte de C alóctono. Esto pudo haber generado una baja transferencia de MOD desde el fitoplancton al bacterioplancton y entonces para que el bacterioplancton pudiera balancear a la relación C: N de la fuente alóctona de C, debió captar DIN del medio para satisfacer sus demandas. Si bien en el Norte las entradas de C alóctona son relevantes, el hecho que no se hubiera observado que la fracción BACT captara más en ausencia del fitoplancton sustenta aun más que el bacterioplancton en esta zona dependió de una fuente de C autóctona.

Debe tenerse en cuenta además que el fitoplancton puede aportar COD y NOD al bacterioplancton en forma de aminoácidos libres disueltos u otros compuestos nitrogenados (Bronk y Glibert, 1993). En el trabajo mencionado anteriormente, Parker (2005) observó que a los 18 min el fitoplancton enriqueció su materia orgánica particulada (MOP) isotópicamente en N y C y que luego de una fase *lag* se observó un enriquecimiento en la MOP bacteriana. Esa diferencia en el tiempo de enriquecimiento isotópico del bacterioplancton es debida al tiempo que lleva la formación de la MOD marcada y su liberación al medio. Además, se considera que en incubaciones de entre 2-6 h la forma dominante de producción de MOD es de origen fitoplanctónico (Parker, 2005) y no por predación (Jumars *et al.*, 1989) o por lisis viral o excreción del zooplancton (Fuhrman y Noble, 1998). Por ende, no debe descartarse que el enriquecimiento observado en la MOP bacteriana en el experimento de esta tesis, sea debido no solo a la captación de NH_4^+ marcado sino a la captación de NOD marcado liberado por el fitoplancton. Esto también explicaría las diferencias observadas en las fracciones BACT de los tratamientos CT en ambas zonas.

4.2.2 Abundancia y composición de la comunidad bacteriana

El bacterioplancton es responsable de una gran fracción de la respiración y la mineralización de la MOD en sistemas acuáticos, por lo que los cambios en su composición taxonómica provocados por entradas de nutrientes pueden tener importantes implicancias biogeoquímicas. A su vez, el impacto de la entrada de nutrientes sobre la abundancia y composición de la comunidad dependerá de si ésta es continua o intermitente y de las condiciones ambientales iniciales en el sistema (Teira *et al.*, 2010).

Al tiempo inicial, la composición de la comunidad bacteriana mostró estar dominada en ambas zonas por *Gammaproteobacterias*. En general, se ha reportado para la Laguna de Rocha la dominancia de las *Alfaproteobacterias* (Piccini *et al.*, 2006). Por tanto, la hidrología y las condiciones ambientales al momento del muestreo pudieran haber favorecido a este grupo bacteriano y explicarían dicha observación.

La disminución observada en la abundancia bacteriana en el tratamiento CT y las diferencias encontradas en relación al tratamiento PF en el Norte, pudieron haber sido consecuencia de la depredación o de lisis viral sobre el bacterioplancton. La depredación de la comunidad bacteriana está sujeto a la depredación de nano y/o microzooplancton. Entre ellos, principalmente se encuentran los nanoflagelados heterótrofos (protistas) que conectan la producción bacteriana a niveles tróficos superiores a través del bucle microbiano (Sherr y Sherr, 2002). Por el contrario, en el mismo tratamiento en el Sur se observó un comportamiento opuesto al del Norte. La evolución de la abundancia de la comunidad bacteriana denota una etapa exponencial de su crecimiento. En otras palabras, que estaba activa fisiológicamente y ocurrió el máximo crecimiento bacteriano. De todos modos, como las captaciones de NH_4^+ fueron siempre bajas en ambos tratamientos en dicha zona, posiblemente la ausencia de depredación favoreció el aumento en la abundancia bacteriana en el tratamiento CT en la zona Sur.

Otro punto a discutir de las diferencias del tratamiento CT entre las zonas es que la abundancia bacteriana en el Norte disminuyó pero dicha comunidad fue más eficiente que la presente en el Sur en captar NH_4^+ . Esto pudo estar relacionado con diferencias en la composición del ensamblaje bacteriano (ver más abajo) debido a las condiciones ambientales de cada zona. En el tratamiento PF no se evidenció ninguna alteración significativa de la abundancia en el transcurso de la incubación, lo que sugiere que la remoción de los predadores por la filtración evitó fluctuaciones en el número de bacterias durante la incubación. Por otro lado, el hecho que no haya habido un incremento en ausencia de predadores concuerda con otros estudios donde el agregado de un nutriente mineral como el NH_4^+ no afectó ni a la abundancia ni a la actividad bacteriana (Teira *et al.*, 2010; Joint *et al.*, 2002). Esto se debería a que en ambos tratamientos de las dos zonas de la Laguna de Rocha, la comunidad bacterioplanctónica estuvo limitada por compuestos orgánicos más que por sustratos inorgánicos, al igual que propone Teira *et al.* (2010).

Cabe mencionar que se considera que por la pre-filtración se removieron a los principales predadores bacterianos, la actividad viral no habría afectado significativamente a la abundancia de la comunidad bacteriana en estos tratamientos y por ende reforzaría la idea que en el tratamiento CT de la zona Norte la disminución se haya dado principalmente por la presión de predación. En general, se postula que la abundancia del bacterioplancton está controlada más por la depredación que por la acción viral (revisado en Pernthaler, 2005). Algunos trabajos han reportado que la lisis viral lleva a la reducción de filotipos bacterianos (Winter *et al.*, 2004; Hewson y Fuhrman, 2006) o también se ha reportado el aumento de la riqueza bacteriana cuando los virus fueron los únicos agentes causantes de la mortalidad bacteriana (Berjeb *et al.*, 2011).

La composición del ensamblaje de la comunidad bacteriana del tratamiento CT en las dos zonas estudiadas mostró diferencias en la abundancia relativa de los grupos bacterianos, como ha reportado Teira *et al.* (2010) luego de incubaciones con diversos nutrientes en el océano Atlántico. En el tratamiento CT de la zona Norte de la Laguna de Rocha el grupo bacteriano que se vio favorecido fue el de las Actinobacterias. Dicho grupo abarca a bacterias Gram positivas de alto contenido GC que suelen habitar típicamente en el suelo (Goodfellow y Williams, 1983) pero también ha sido reportada su presencia en varios sistemas acuáticos de agua dulce (Bruns *et al.*, 2003; entre otros) y recientemente se ha discutido su existencia y relevancia en sistemas marinos (Bull y Stach, 2007). No obstante, su presencia no significa que sean microorganismos activos sino más bien microorganismos alóctonos en estado de dormancia (Warnecke *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que estas bacterias dependen de fuentes de C de origen terrestre, el agregado de NH_4^+ quizás las favoreció aun más frente al resto de los grupos bacterianos allí presentes. Por otro lado, las diferencias halladas entre zonas podrían explicarse porque las Actinobacterias se asocian a bajas salinidades y altas concentraciones de nutrientes (Alonso *et al.*, 2010).

Por otro lado, los Bacteroidetes son bacterias asociadas a floraciones de fitoplancton (Simon *et al.*, 1999), zonas de altos niveles de nutrientes (Abell y Bowman, 2005) o de máxima turbidez (Alonso *et al.*, 2010) y pueden degradar polímeros de C, proteínas, etc. (Gómez-Pereira, 2010). En esta tesis se observó que contrariamente a ser estimuladas por las condiciones de incubación su abundancia relativa disminuyó en la zona Norte. Una razón para explicar este hallazgo pudo haber sido que los Bacteroidetes allí presentes hayan sido de origen marino y como consecuencia de la corriente llegaron a la zona Norte. Por ende, se encontraron en un ambiente con menor conductividad y esto los pudo haber limitado. Lo contrario fue observado en el Sur, donde hubo un pequeño incremento en su abundancia relativa. Los resultados de experimentos de explantes en la Laguna de Rocha concuerdan con lo observado en estos tratamientos con respecto a los Bacteroidetes. En ese estudio se observó que dicho grupo bacteriano sufrió una estimulación cuando muestras de una zona de influencia límnic fueron incubadas en una zona más salobre (Alonso, 2008). A su vez se notó un control de dicha población por la predación, lo cual podría explicar el leve incremento en su abundancia relativa en el tratamiento CT en la zona Sur.

Las *Betaproteobacterias* tienen un rol preponderante en los ciclos de nutrientes y flujos de energía en sistemas de agua dulce (Schweitzer *et al.*, 2001). Tanto en el Norte como en el Sur se vio una

disminución en su abundancia relativa que pudo estar asociada a la alta salinidad (*i.e.* conductividad) registrada durante este estudio.

Las *Gammaproteobacterias* se mantuvieron constantes en el tratamiento del Norte pero en el Sur aumentaron su abundancia relativa y en ambas zonas fueron el grupo bacteriano más abundante. El resultado en el tratamiento de la zona Norte estaría en concordancia con lo reportado por Teira *et al.* (2010) aunque difiere con lo ocurrido en el tratamiento CT en el Sur. En cambio, Allers *et al.* (2007) observaron un aumento en las *Gammaproteobacterias* (específicamente en la familia *Alteromonadaceae*) luego del agregado del NH_4^+ . Varios trabajos han reportado que las *Gammaproteobacteria* se ven favorecidas por las condiciones de incubación como cultivos diluidos (Fuchs *et al.*, 2000), entre otras variables. Sin embargo, los resultados del tratamiento CT no mostraron una tendencia similar para ambas zonas ni tampoco el enriquecimiento de ningún grupo bacteriano. Esto indicaría entonces que los resultados se debieron más a las interacciones biológicas entre microorganismos que a la manipulación experimental (Teira *et al.*, 2010).

Al analizar el número de OTUs encontradas al inicio y al final del tratamiento CT, se vio que no hubo grandes fluctuaciones entre los tiempos de incubación de acuerdo a los cambios hallados en la composición del ensamblaje mediante el uso de PAT. Por otro lado, hubo pocas OTUs en común entre tiempo inicial y final, sugiriendo entonces que hubo cambios durante la incubación. El hecho que las OTUs comunes hayan sido pocas estaría indicando un cambio (“shift”) ocasionado quizás por la predación.

4.2.3 Comunidad fitoplanctónica

El agregado de NH_4^+ no generó fluctuaciones significativas en la biomasa de la comunidad fitoplanctónica durante la realización de las incubaciones. Esto pudo estar ocasionado por las condiciones experimentales que evitaron que esta comunidad proliferara luego del agregado del trazador. En particular, puede ser que la duración de la incubación (4 h) no haya sido suficiente para observar un incremento en la biomasa del fitoplancton debido a sus bajas tasas de crecimiento (μ) (Haney y Jackson, 1996). Otro motivo pudo haber sido que otro nutriente estuviera limitando a dicha comunidad. En relación a esto último, Joint *et al.* (2002) encontraron un aumento en la biomasa del fitoplancton solo luego del agregado concomitante de una fuente de N y P. Cabe destacar que para la Laguna de Rocha se reportó que el fitoplancton puede estar co-limitado por ambos nutrientes (Aubriot *et al.*, 2005).

En cuanto a la composición de la comunidad fitoplanctónica procariota, se vio que en el tratamiento CT de la zona Sur la abundancia relativa de las cianobacterias llegó a ser cero sugiriendo que la predación sobre este grupo fue importante. Esto concuerda con los resultados de van Gremberghe *et al.* (2007) que indican que la estructura de la comunidad de las cianobacterias dependió de la depredación y que este proceso puede ser tan importante en su estructuración como los procesos de control *bottom-up*. El hecho que la fluorescencia de la Chl *a* no haya variado en el tratamiento CT en el Sur, podría indicar que dominaron organismos fitoplanctónicos eucariotas en lugar de las cianobacterias (procariotas). En la Laguna de Rocha, se ha reportado que en condiciones ambientales similares a las que se encontraron

durante el experimento, dominan especies planctónicas unicelulares tanto en el Norte como el Sur (Bonilla *et al.*, 2005). En cuanto a las cianobacterias, se ha indicado la presencia ocasional de *Pseudoanabaena* cf., *moniliformis* o la picocianobacteria *Synechococcus* sp. (Conde *et al.*, 2004; Piccini *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2007).

En relación a las cianobacterias unicelulares, se ha visto que compiten exitosamente frente a algas coloniales por nutrientes. En particular, en ensayos de laboratorio las cianobacterias compiten mejor por el NH_4^+ cuando éste es aportado en pequeños pulsos y con gran frecuencia mientras que el alga fue más exitosa cuando el cultivo creció en un sistema *batch* (sin agregado continuo de nutrientes) (Por ende se podría suponer que debido a la presión por depredación sobre las cianobacterias y las condiciones experimentales, el proceso estuvo dominado por el fitoplancton eucariota (Hyenstrand *et al.*, 2000).

4.3 Efecto de “cascada trófica”

4.3.1 Resultados

4.3.1.1 Características del ambiente

En la Tabla 5 se detallan las principales variables fisicoquímicas y biológicas de la Laguna de Rocha al momento de realizarse los experimentos.

Tabla 5. Variables ambientales registradas en las zonas Norte y Sur de la Laguna de Rocha durante la realización del experimento del efecto “cascada” en la captación de NH_4^+ . DL: debajo del límite de detección. Nitrógeno Inorgánico Disuelto (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-). Los valores de abundancia bacteriana corresponden al valor promedio de tres réplicas y los valores entre paréntesis al desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas. Los datos con un ¥ corresponden a un dato único.

Parámetro	Norte	Sur
Conductividad (mS cm^{-1})	1.67 ¥	2.24 ¥
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	18.0 ¥	18.7 ¥
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.96 ¥	2.11 ¥
Abundancia bacteriana ($\text{N}^{\circ}\text{cél mL}^{-1}$)	2.72×10^6 (5.39×10^5) _a	1.93×10^6 (1.72×10^5) _a
NID ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	DL	DL
NT ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	46.8 ¥	43.5 ¥
Fósforo reactivo soluble ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.45 ¥	0.88 ¥
Fósforo Total ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.63 ¥	1.09 ¥

Ambas zonas no presentaron fluctuaciones en la temperatura y Clo *a*. En esta ocasión, la conductividad en el Sur (2.24 mS cm^{-1}) fue apenas superior a la del Norte (1.67 mS cm^{-1}). La fracción de NID (NO_3^- , NH_4^+ y NO_2^-) estuvo por debajo del límite de detección en ambas zonas. El fósforo reactivo soluble y el Fósforo Total fueron casi dos veces más altos en el Sur que en el Norte.

Tanto en la zona Norte como en la zona Sur predominaron las *Alfaproteobacterias*, seguidas por las Actinobacterias (Tabla 6).

Tabla 6. Los valores de las sondas corresponden a las abundancias relativas de cada grupo bacteriano ensayado (porcentaje de células hibridadas del total de células hibridadas con la sonda para EUB I-III). Los valores entre paréntesis representan al desvío estándar. DL: debajo del límite de detección.

Sonda empleada	Zona Norte	Zona Sur
% Hibridación		
EUB I-III (Dominio <i>Eubacteria</i>)	48.6 (1.3)	53.7 (3.4)
ALF968 (<i>AlfaProteobacteria</i>)	28.5 (2.0)	29.0 (1.5)
BET42a (<i>BetaProteobacteria</i>)	2.7 (0.8)	1.6 (0.4)
GAM42a (<i>GammaProteobacteria</i>)	2.2 (0.5)	1.8 (0.6)
HGC69 (<i>Actinobacteria</i>)	17.7 (1.1)	20.8 (1.8)
CFB (Citofagas-Flavobacterias)	0.9 (0.3)	0.9 (0.1)
PLA46 (<i>Planctomycetes</i>)	DL	DL
ARCH195 (Arqueas)	DL	DL

4.3.1.2 Tasas de captación de NH_4^+

El “efecto cascada” en la captación de NH_4^+ , no incidió de la misma manera sobre las fracciones analizadas (Fig. 14 A-F).

En el Norte no se detectaron diferencias significativas entre las tasas de captación de NH_4^+ de la fracción BACT de ambos tratamientos ($p > 0.05$). Las tasas de captación de la fracción BACT fueron similares para ambos tratamientos, observándose además que su cinética llegó rápidamente a una meseta antes de las 4 horas luego del agregado del trazador. Por el contrario, la fracción FITO mostró observaron diferencias significativas entre tratamientos. En el tratamiento CT de la zona Norte la fracción FITO siempre tuvo tasas de captación de NH_4^+ significativamente superiores al resto de las fracciones analizadas ($p < 0.05$). Dicha fracción mostró además una disminución al término de la incubación, aunque ésta no fue estadísticamente significativa.

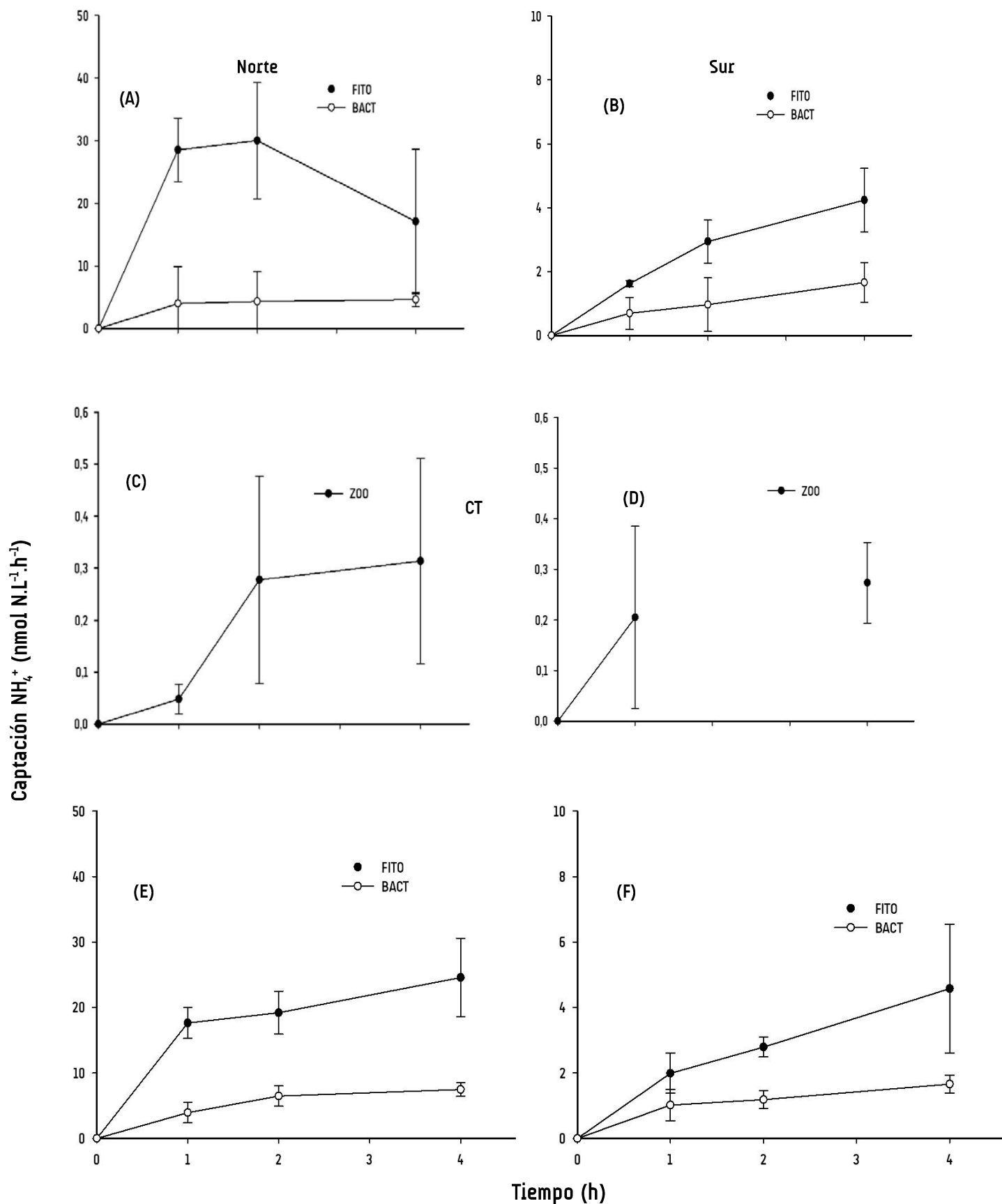


Figura 14 (A y B). Tasas de captación de NH_4^+ para las fracciones FITO ($1.2 \mu\text{m}$) y BACT ($0.5 \mu\text{m}$), (C y D) fracción ZOO ($35 \mu\text{m}$) del tratamiento CT en las zonas Norte y Sur. (E y F) Tasas de captación de NH_4^+ para la fracciones FITO y BACT del tratamiento NZOO en las zonas Norte y Sur en las zona Norte y Sur respectivamente (mayo de 2010). Nótese la diferencia en escala en las tasas de captación de las fracciones FITO, BACT y ZOO. En el gráfico D no hay dato para el tiempo 2 horas.

El aumento en la captación de NH_4^+ observado para fracción FITO durante las dos primeras horas de incubación fue significativamente mayor en CT que en NZ00 ($p < 0.05$).

En relación a la fracción ZOO, además de presentar las tasas de captación de NH_4^+ más bajas, aumentó luego de la primera hora y no llegó a saturarse durante la incubación. Se detectó enriquecimiento isotópico en ^{15}N en la fracción ZOO, indicando un rápido ingreso del nutriente a niveles tróficos superiores.

En el tratamiento NZ00 también se observaron diferencias significativas entre las fracciones analizadas para la zona Norte (Fig. 14E). En particular, las tasas de captación de NH_4^+ de la fracción FITO fueron significativamente superiores a las tasas de la fracción BACT ($p < 0.05$). Ambas tuvieron cinéticas similares, aunque en la fracción FITO el proceso de captación de NH_4^+ no llegó a la saturación.

En la zona Sur, se observó que en CT hubo diferencias significativas durante las incubaciones (Fig. 14B). Más precisamente, la fracción FITO fue la que presentó valores de captación de NH_4^+ significativamente más altos ($p < 0.05$). Al igual que lo observado en el Norte, las tres fracciones presentaron una tendencia similar durante la incubación.

En el tratamiento NZ00 de esta zona la captación de NH_4^+ de la fracción FITO siempre fue significativamente mayor a las tasas de captación encontradas para la fracción BACT. No se observaron diferencias significativas en las tasas de captación de cada fracción estudiada durante la incubación ($p > 0.05$) (Fig. 14B y F). La comparación entre las captaciones de BACT y FITO entre tratamientos en el Sur no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

Al comparar a las tasas de captación de NH_4^+ de cada comunidad entre zonas de la Laguna de Rocha se detectaron diferencias significativas únicamente en la fracción FITO ($p < 0.05$).

4.3.1.3 Abundancia y composición de la comunidad bacteriana

La abundancia bacteriana no mostró cambios significativos durante el transcurso de las incubaciones para ninguno de los tratamientos realizados en cada zona ($p>0.05$) (Fig. 15 A y B).

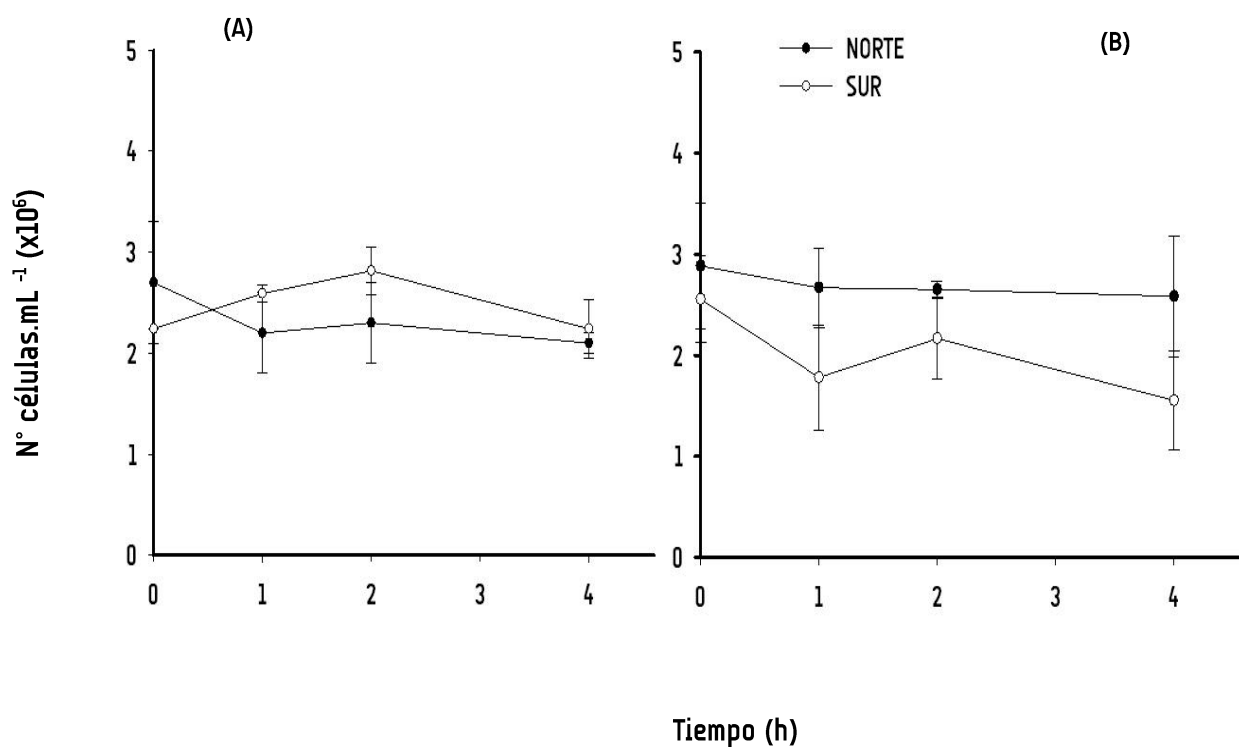


Figura 15 (A y B). Abundancia relativa de la comunidad bacteriana en los dos tratamientos CT y NZ00 tanto en el Norte como el Sur de la Laguna de Rocha (mayo de 2010).

La composición bacteriana por medio de CARD-FISH (Fig. 16 A-D) tampoco mostró cambios significativos durante las incubaciones realizadas en ambas zonas de la Laguna de Rocha ($p>0.05$).

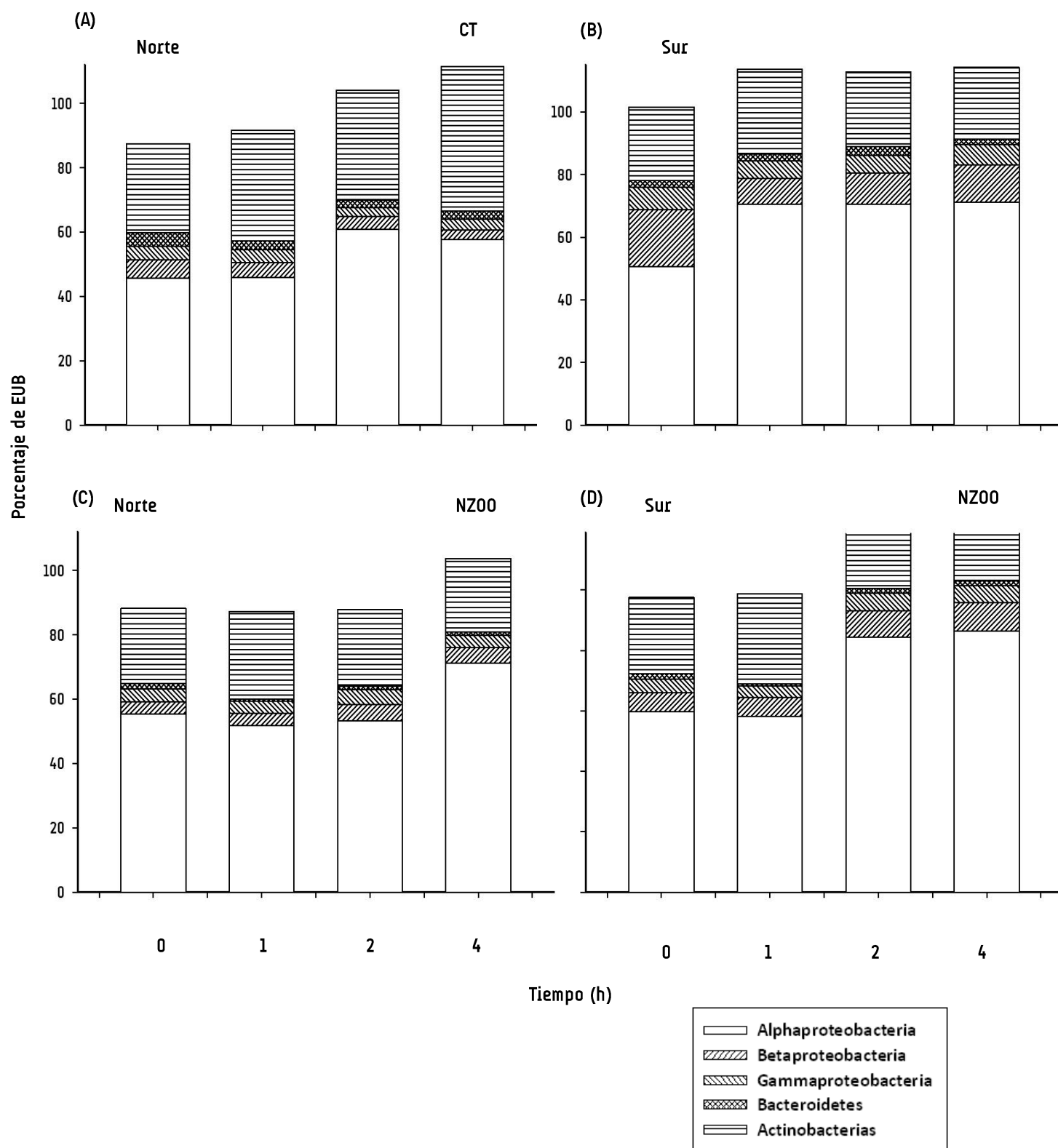


Figura 16 (A-D). Abundancia relativa de los principales grupos bacterianos determinados por CARD-FISH. Los valores expresados representan el porcentaje de células hibridadas con la sonda EUB I-III. Tratamientos CT y NZ00 de la zona Norte (A y C) y de la zona Sur de la Laguna de Rocha respectivamente (B y D) (mayo de 2010).

El análisis de los T-RFs obtenidos en cada tratamiento mostró que en el tratamiento CT de la zona Norte (Fig. 17), la similitud entre la comunidad al inicio y fin del experimento fue 93%. Además, ambas comunidades se ubicaron dentro del mismo grupo o *cluster*. Es decir, que las condiciones experimentales provocaron poca alteración en la composición de la comunidad bacteriana. En cambio, las comunidades desarrolladas en el tratamiento NZ00 fueron menos similares entre sí, observándose que el ensamblaje desarrollado durante el experimento (NZ00_{4h}) se agrupó más cercano al *cluster* del experimento CT que al inicial del propio tratamiento. Este tratamiento por tanto sí indujo cambios en la estructura de la comunidad bacteriana.

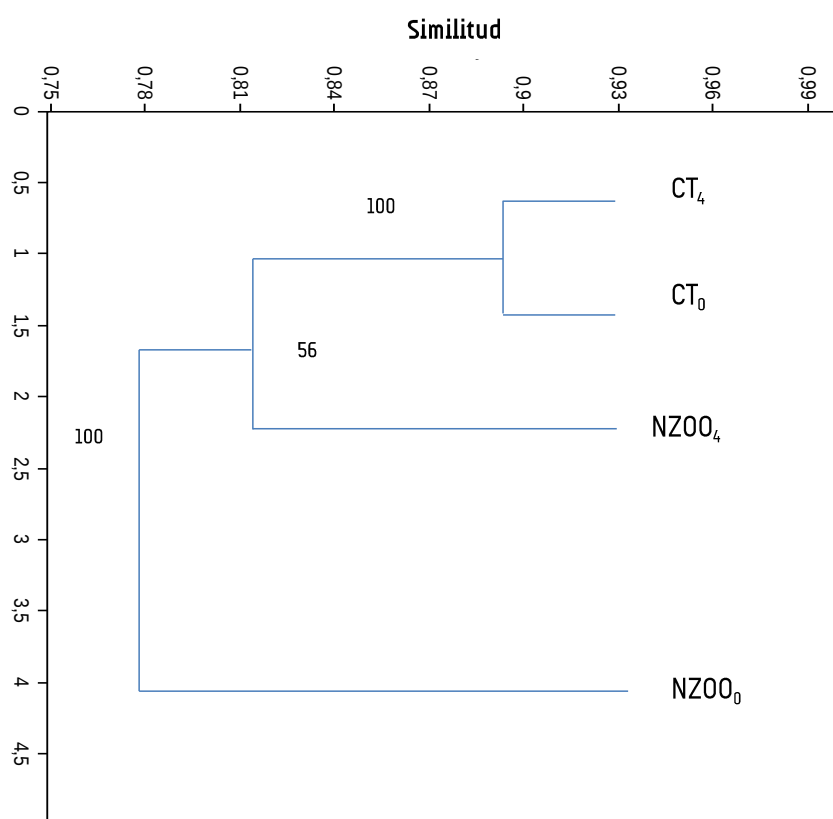


Figura 17. Análisis de *clusters* a partir de T-RFLP para el tratamiento CT y NZ00 en la zona Norte, fue realizado con una matriz de abundancia a partir de los T-RF obtenidos con tres enzimas (*AluI*, *HhaI* y *MspI*) y utilizando el índice de diversidad Bray-Curtis. El *Bootstrap number* fue 100. CT₀: comunidad total a tiempo 0h; CT₄: comunidad total a tiempo 4h; NZ00₀: sin mesozooplankton a tiempo 0; NZ00₄: sin mesozooplankton a tiempo 4h.

En la zona Sur de la Laguna de Rocha se observó que las comunidades de los tratamientos CT y NZ00 al término de las incubaciones quedaron ubicadas en el mismo *cluster* y el porcentaje de similitud fue superior a 70% (Fig. 18). Además, las comunidades al inicio de los experimentos se ubicaron por fuera del *cluster* de las comunidades de los tiempos finales de cada experimento. De acuerdo al análisis de *clusters* las comunidades bacterianas presentes al finalizar cada tratamiento se asemejaron más entre ellas que a las comunidades iniciales, sugiriendo que los cambios ocurridos no fueron dependientes de los tratamientos realizados (prefiltración).

El análisis NMDS dio un valor de *stress* (s) de 0.047 para el caso del *cluster* del Norte y de 0.059 en el *cluster* del Sur. Cabe mencionar que a diferencia de los resultados de CARD-FISH, sí se observaron cambios en la composición del ensamblaje bacteriano a través de TRFLP.

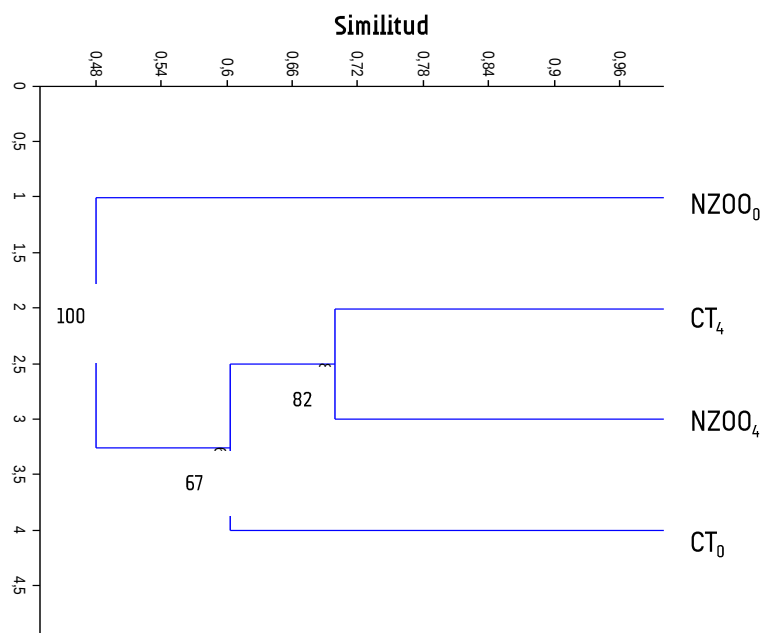


Figura 18. Análisis de *clusters* a partir de *T-RFLP* para los tratamientos CT y NZ00 en la zona Sur. El análisis fue realizado con una matriz de abundancia a partir de los *T-RF* obtenidos con 2 enzimas (*A*lul y *M*spl) y utilizando el índice de diversidad Bray-Curtis. El *Bootstrap number* fue 100. SCT0: comunidad total a tiempo 0h; SCT4 comunidad total a tiempo 4h; NZ00₀: sin mesozooplancton a tiempo 0; NZ00₄: sin mesozooplancton a tiempo 4h.

4.2.2 Discusión

4.2.2.1 Tasas de captación de NH_4^+

La remoción del mesozooplancton no generó cambios significativos en la captación de NH_4^+ de la fracción BACT en las dos zonas estudiadas. Por lo tanto, la fracción removida ($\geq 35 \mu\text{m}$) no afectó significativamente al proceso de captación de NH_4^+ en el bacterioplancton. En general se supone que la interacción entre el bacterioplancton y el mesozooplancton es a través de la mineralización bacteriana de la MOD que el zooplancton libera al medio. Sin embargo, como se hizo mención en la discusión del experimento 4.3.1 de esta tesis, por la duración de las incubaciones realizadas se asume que la regeneración de nutrientes llevada a cabo por el bacterioplancton sea a partir de MOD proveniente del fitoplancton y no del zooplancton (Parker, 2005).

En ambos tratamientos (CT y NZ00) de las dos zonas de la Laguna de Rocha la fracción FITO presentó tasas de captación de NH_4^+ significativamente más altas con respecto a las fracciones BACT. El motivo por el cual la fracción FITO fue más eficiente en el proceso de captación del nutriente estudiado pudo deberse a la composición de la comunidad y/o a la actividad alelopática fitoplanctónica. En referencia a lo primero, la observación al microscopio de epifluorescencia develó la presencia de diatomeas del género *Cylindrotheca* y/o *Nitzschia*. De acuerdo a Bonilla *et al.* (2005) estos organismos son estrategias R (*Cylindrotheca* spp.) o CR (intermedio entre C y R) para el caso de *Nitzschia* spp. en base a la clasificación morfo-funcional de Reynolds (1991). Esto implica entonces que los grupos C son organismos oportunistas e invasivos con altas tasas de crecimiento, captación y asimilación de nutrientes. Por otro lado, los estrategias R que están adaptados a ambientes con alta disponibilidad de nutrientes y condiciones de baja energía. Por ende, la composición del fitoplancton y las estrategias de vida que éstos poseen podrían explicar la alta captación de NH_4^+ que presentó dicha fracción con respecto a la BACT. Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con el trabajo de Bradley *et al.* (2010) quienes valores de captación de NH_4^+ más altos en el fitoplancton que en el bacterioplancton (principalmente cuando hubo una floración del alga colonial *Phaeocystis pouchetii*) en mesocosmos. Como argumentan dichos autores el fitoplancton compitió mejor por el NH_4^+ que el bacterioplancton y quizás este satisfizo su demanda de N con el NOD liberado por el fitoplancton.

Las mayores tasas de captación de NH_4^+ en la fracción FITO también pueden haberse debido a la alelopatía, la cual se define como la liberación de compuestos químicos por una población que afecta a otra población (Hulot y Huisman, 2004). En particular, las diatomeas pueden liberar aldehídos poliinsaturados como metabolitos secundarios (Wichard *et al.*, 2005) que pueden inhibir la reproducción de copépodos y el crecimiento de otras especies de fitoplancton (Miralto *et al.*, 1999; Casotti *et al.*, 2005). Con respecto al efecto de los mismos en el bacterioplancton Balestra *et al.* (2011) encontraron que los aldehídos poliinsaturados tienen un efecto diferencial en la actividad celular (*single-cell activity*) de distintas poblaciones bacterianas. Es decir que los mismos pueden tener un efecto neutro, positivo o

negativo en la actividad metabólica de acuerdo al grupo bacteriano. Entonces se podría suponer que la presencia de estos organismos pudo haber inhibido al proceso de captación de NH_4^+ en la fracción BACT. Además, se ha visto que en un escenario donde haya limitación de nutrientes la liberación de compuestos alelopáticos es una estrategia adaptativa potencial para la sobrevivencia de especies de fitoplancton no muy eficientes en la captación de nutrientes (Roy, 2009). Debido a que la concentración de DIN estuvo por debajo del límite de detección, una estrategia por parte del fitoplancton quizás haya sido por medio intermedio de la alelopatía para ser más efectivos en captar al nutriente que fuera adicionado.

Antes de empezar con la discusión de los resultados obtenidos en la fracción ZOO conviene precisar qué componentes del ensamblaje microbiano fueron considerados y porqué. Si bien las diatomeas pueden presentar tamaños mayores a $35\ \mu\text{m}$ y por tanto haber sido retenidas en la malla utilizada para fraccionar a la comunidad planctónica, éstas fueron observadas en muestras del tratamiento NZOO (datos no mostrados), por lo que se considera que la fracción ZOO estuvo principalmente compuesta por micro y mesozooplancton.

En lo referido a las fracciones ZOO, las tasas de captación de NH_4^+ obtenidas siempre fueron significativamente menores a las del resto de las fracciones estudiadas (FITO y BACT) en ambas zonas de la Laguna de Rocha. Rojo *et al.* (2008) encontraron resultados similares en incubaciones con NO_3^- . Estos autores trabajando en el Lago Colgada (España) hallaron que las tasas de captación de NO_3^- correspondientes al zooplancton fueron 30 veces menor a las tasas correspondientes a la fracción del fitoplancton luego de 6 horas de incubación.

Debe considerarse cuál fue el origen del enriquecimiento isotópico registrado en la biomasa de la fracción ZOO. Habiendo especificado que se considera principalmente al zooplancton en dicha fracción, el origen se debe entonces como consecuencia de la acción predatoria de esta comunidad y no a la captación directa del nutriente (NH_4^+). Es decir que si se hace una secuencia de lo que ocurrió durante la incubación podría haber sido así: primero hubo captación y asimilación del NH_4^+ por parte del fito y bacterioplancton, se asimiló y posteriormente se dio la transferencia de éste a un nivel trófico superior por predación.

En relación a las diferencias observadas en las captaciones de NH_4^+ entre el tratamiento CT y NZOO en la zona Norte, se vio que hubo diferencias significativas solo en la fracción FITO. Más precisamente, éstas fueron más altas en el tratamiento CT que en el NZOO. Esto sugeriría que la presencia de grandes predadores (*i.e.* copépodos) pudo haber controlado al microzooplancton que se alimenta del fitoplancton y así mantener constante la abundancia del fitoplancton y explicar las altas tasas de captación de NH_4^+ . En cuanto a los copépodos en la Laguna de Rocha, se ha observado que *Acartia tonsa* es el más abundante en dicho sistema con individuos que pueden llegar a $750\ \mu\text{m}$ de longitud (Calliari *et al.*, 2009). En este trabajo quedó en evidencia que la presión por herbivoría ejercida por los copépodos en la Laguna de Rocha es baja incluso cuando la producción primaria fue alta. Para explicar la alta producción observada en *A. tonsa*, estos autores proponen, que la misma se sustenta en la carnivoría. En otras palabras, que sus presas serían componentes del microzooplancton y de esta manera quedaría en evidencia que en la

Laguna de Rocha el control *top-down* ejercido por los copépodos tiene un nexo fuerte con el bucle microbiano. Así se podría explicar que su presencia reguló la actividad del microzooplancton y permitió que el fitoplancton con menos presión de predación captara más NH_4^+ .

En forma opuesta, en el tratamiento de NZOO la ausencia de grandes predadores hizo que la presión de predación sobre el fitoplancton fuera mayor y por ende haya afectado al proceso de captación del NH_4^+ al disminuir la abundancia del fitoplancton. No obstante, resulta muy interesante destacar que más allá de las diferencias significativas, hubo diferencias en la cinética y lo que ocurrió al término de las incubaciones en ambos tratamientos. En el caso del tratamiento CT la fracción FITO tuvo un máximo de captación de NH_4^+ hasta las dos horas para luego decaer hacia el final de la incubación. Por el contrario, en el tratamiento NZOO la fracción FITO pareció no alcanzar la saturación hacia las 4 horas y posiblemente podría haber seguido captando activamente dicho nutriente. En la relación a la situación en el Sur, ésta fue diferente, donde quedó en evidencia que la remoción de una fracción del zooplancton no tuvo tanta relevancia en la captación de NH_4^+ como en el Norte. Esta tendencia está en concordancia con los resultados observados en el experimento 4.3.1 de esta tesis donde se vio que en el tratamiento CT fue más notoria la presión de predación en el Norte que en el Sur.

4.2.2.2 Abundancia y composición del bacterioplancton

La interacción entre la predación y la competencia interespecífica es un tema central dentro de la ecología (Grover, 2004). En general, tanto el bacterioplancton como el zooplancton (en especial el mesozooplancton) son vistos como dos grupos funcionales separados, vinculados indirectamente a través del ciclado de nutrientes y las cascadas tróficas (Tang *et al.*, 2010) y existen pocos trabajos que lo hayan estudiado (Jing *et al.*, 2010). Por otro lado, los protistas y en especial los nanoflagelados heterótrofos, son los que tienen un impacto más relevante en el control de la biomasa del bacterioplancton (Sanders *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos al analizar la composición de la comunidad bacteriana en los tratamientos CT y NZOO mediante CARD-FISH indican que ni la abundancia ni la composición del ensamblaje de la comunidad del bacterioplancton fueron afectadas significativamente por el efecto “cascada trófica”. Sin embargo, al analizarlas mediante T-RFLP sí se pudo detectar que hubo un cambio asociado a dicho proceso. Esto pone de manifiesto la importancia de las técnicas a emplear cuando se trata de evaluar cambios a nivel de ensamblajes microbianos. Entonces a través del T-RFLP se podría suponer que en realidad sí hubo fluctuaciones en la composición de la comunidad bacteriana por el efecto cascada trófica. Más concretamente, en el tiempo 0 h se vio que las comunidades en los tratamientos CT y NZOO siempre se ubicaron en *clusters* diferentes. En realidad la fracción de zooplancton principalmente removida (copépodos) no se alimenta directamente de bacterias por lo que ese resultado podría ser indirecto como consecuencia de la pre-filtración. Al efectuarse la pre-filtración pudo haberse removido grandes partículas de detritus conteniendo bacterias adheridas o tal vez bacterias asociadas directamente al mesozooplancton (Tang *et al.*, 2010). Por otro lado, al finalizar las incubaciones se vio que

las comunidades de ambos tratamientos se agruparon en el mismo *cluster* (zona Sur) o asociado al *cluster* CT₀-CT₄ (zona Norte). Esto estaría indicando que en el Sur habría una menor incidencia de la presión por predación sobre la comunidad bacteriana y por ende un menor efecto sobre la composición del ensamblaje. En cambio en el Norte, la remoción del mesozooplancton habría provocado que el microzooplancton incrementara su predación sobre el fitoplancton y también sobre el bacterioplancton. En cuanto a estudios sobre el *control top-down* y *bottom-up* en la Laguna de Rocha, se vio que de acuerdo a las condiciones fisicoquímicas imperantes en el sistema cada uno de éstos podía ejercer un control que afectara en menor o mayor grado a los principales grupos del ensamblaje bacterioplanctónico (Alonso, 2008). Las *Gammaproteobacterias* disminuyeron su abundancia mientras que las *Betaproteobacterias* la aumentaron en presencia de depredadores y estos resultados indicarían que en el sistema existe una presión por predación selectiva sobre dicha comunidad. En la presente tesis no se observaron cambios significativos en cada grupo bacteriano evaluado por CARD-FISH pero quizás haya habido cambios en la composición dentro de cada grupo bacteriano (a nivel de género o especie) y debido al tipo de sondas utilizadas con el FISH no fueron detectados y apoyen los resultados obtenidos del T-RFLP (De Corte *et al.*, 2009). De acuerdo a Jürgens *et al.* (1994) el efecto de cascada trófica tiene un impacto significativo y puede alterar rápidamente a la estructura de la comunidad bacteriana. Además Jing *et al.* (2010) a través de DGGE determinó el impacto del mesozooplancton en la comunidad microbiana y reportó que el efecto en la cascada trófica generó una disminución de organismos eucariotas mayores a 3 µm, aumento en los organismos eucariotas menores a 3 µm y una disminución en el bacterioplancton.

Probablemente los diferentes resultados encontrados mediante ambas técnicas hayan sido debidos a las diferencias en el nivel de profundidad filogenética inherente a cada uno. En el caso de CARD-FISH se usaron sondas generales, cuya resolución filogenética es baja ya que discriminan a nivel de filos y clases. Además, la eficiencia alcanzada con el CARD-FISH, o sea el porcentaje de *Eubacteria* (total de bacterias) detectado por ejemplo durante el tratamiento CT en el Norte fue en promedio de todos los tiempos 59.1 ± 7.7 al inicio (n= 12). Este resultado estaría indicando que la comunidad bacteriana no fue cuantificada totalmente por esta técnica. Esto pudo deberse a una ineficiente permeabilización de las membranas celulares o debido a células muertas que pudieron ser teñidas con DAPI pero carecían de suficiente ARN por lo cual no se detectaron con la sonda empleada en el CARD-FISH (Del Giorgio y Gasol, 2008).

En cambio, el T-RFLP es una herramienta de *fingerprinting* basado en la amplificación de un gen por medio de PCR. En esta tesis se usó el *primer* 27f Y-M diseñado por Frank *et al.* (2008) el cual tiene unas pequeñas modificaciones para así captar en forma más precisa a la diversidad bacteriana. Además, se usaron ambos *primers* con fluoróforos y dirigidos a una porción del gen 16S ARNr que posee un alto número de regiones variables y menor número de regiones conservadas. Por lo tanto, las condiciones TRFLP generó una mejor discriminación y evitó una baja resolución (Abdo *et al.*, 2006). En este caso, el nivel de resolución que fue posible llegar alcanza al de familia, género y/o especie. Por lo tanto, tomando lo que se hizo mención anteriormente y a los valores de *stress* obtenidos por el NMDS que indican que los

agrupamientos no son azarosos, se estima que hubo cambios a nivel de especie en la composición del ensamblaje bacteriano por el efecto cascada.

Otros parámetros que no fueron evaluados y sí pueden ayudar a discernir si hay efecto de la predación en la comunidad bacteriana son su biomasa y su morfología. Sabido es que la bacterivoría puede basar su selección de su presa por su tamaño y que los nanoflagelados prefieren bacterias activas y grandes, dejando de lado y haciendo que sean las más persistentes en el sistema bacterias menos activas y más pequeñas (revisado en Pernthaler, 2005).

5. DISCUSIÓN GENERAL

5.1 El bucle microbiano y la captación de NH_4^+ en la Laguna de Rocha

En la presente tesis se abordaron dos temáticas fundamentales en ecología microbiana acuática de relevancia para la comprensión de la productividad y funcionamiento de sistemas acuáticos: la competencia por recursos entre el fitoplancton y el bacterioplancton y como también la incidencia de la predación en la transferencia trófica de energía y nutrientes. En definitiva, se abordó la interconexión entre los diversos componentes del bucle microbiano y su incidencia en la captación de NH_4^+ .

En general, se ha descrito que el balance entre las interacciones de competencia y/o mutualismo en los ecosistemas acuáticos dependerá del C y del aporte de nutrientes al sistema (Danger *et al.*, 2007). La Laguna de Rocha no fue la excepción en la Laguna de Rocha. La competencia, como se ha mencionado anteriormente, surge como consecuencia de la relación (o estequiometría) del C con los demás nutrientes (*i.e.* C:N) y también de la transferencia de materia orgánica desde los productores primarios al bacterioplancton heterótrofo (Daufresne y Loreau, 2001). Los resultados obtenidos en el experimento de la sección 4.1 de esta tesis demostraron que el tipo de interacción existente entre las dos comunidades estudiadas en un mismo momento no siempre es la misma, sino que varía según la zona de la laguna (Fig. 19). Esto hace suponer que la hidrodinámica y las condiciones fisicoquímicas del sitio de estudio influye en cómo serán las interacciones y determinarían la vía del flujo o transferencia de nutrientes captados (en este caso NH_4^+) a niveles tróficos superiores. Se podría afirmar que el rol de la microbiota en la captación de NH_4^+ y su posterior transferencia a niveles tróficos superiores tiene una gran relevancia en la Laguna de Rocha y puede contribuir a la baja concentración de DIN que se ha observado en estos últimos años en dicho sistema. En particular, el rol del bacterioplancton es flexible, en cuanto a que puede tener tasas de captación del mismo orden de magnitud que la comunidad del fitoplancton, pero también puede ser menos eficaz en la captación o podría estar realizando otra función en el sistema (mineralización o captación de otra fuente de N).

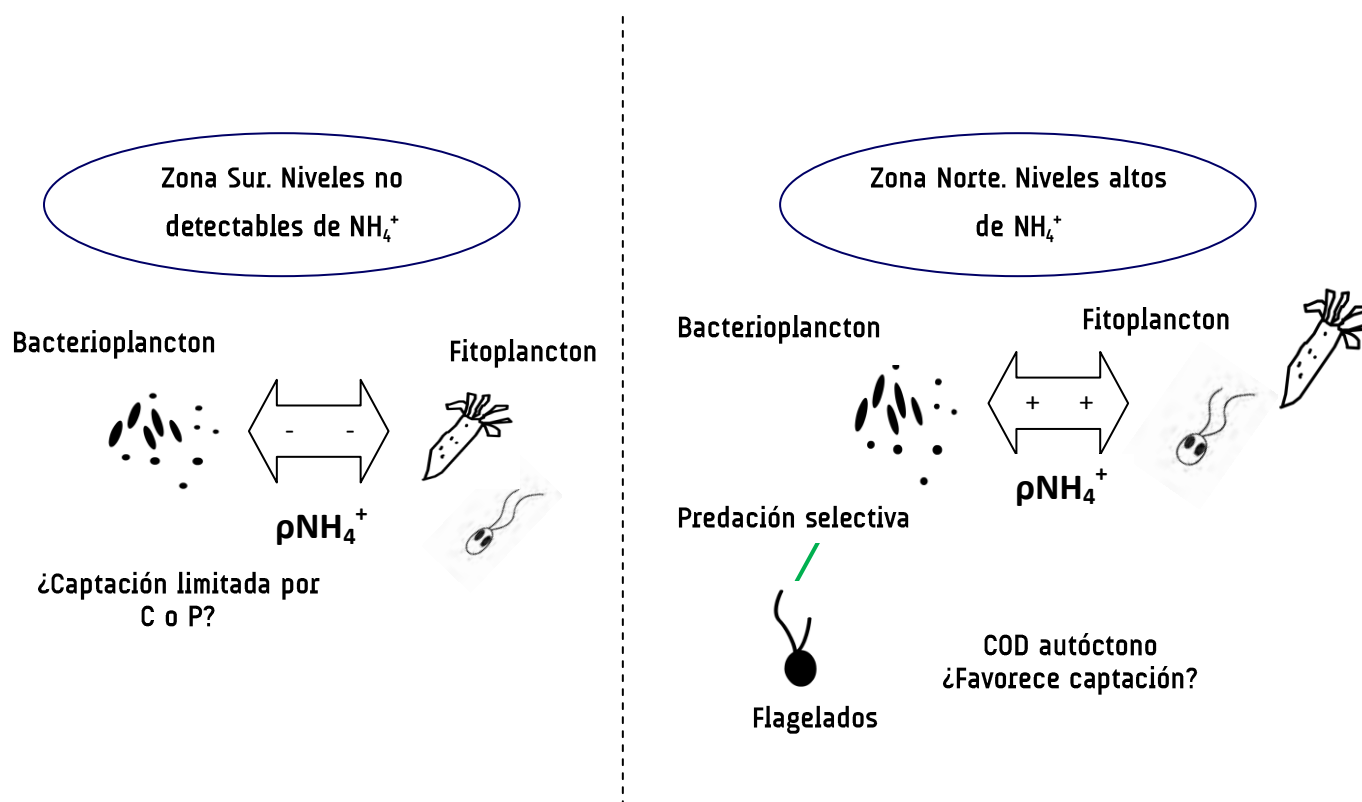


Figura 19. Esquema de los principales resultados obtenidos en el experimento de interacción entre el bacterioplancton y fitoplancton (4.3.1). Las flechas dobles indican el tipo de interacción entre ambas comunidades y cuál de ellas captó más NH_4^+ . Los signos (+) indican una interacción del tipo comensalista mientras que (-) indican una interacción del tipo competitiva. El color blanco indica que la comunidad captó menos y el gris la que captó más. El símbolo ρ representa la captación de NH_4^+ . Las flechas rojas representan la predación de los flagelados sobre el bacterioplancton. Ver más detalles en la discusión de la Sección 4.3.1.

Los resultados obtenidos sugieren además que la transferencia de biomasa desde bacterioplancton y fitoplancton hacia niveles tróficos superiores es un proceso importante. Esto hace pensar que aquella comunidad más activa en la captación de N será la que sufra mayor presión por predación, como se vio en los resultados de ambos experimentos en la Laguna de Rocha (Fig. 20). Estos hallazgos confirmarían por tanto la hipótesis planteada en esta tesis, corroborando que la entrada de NH_4^+ al sistema hace que sea captado rápidamente por la microbiota y que este proceso estaría regulado por la predación. Esto implica que los nutrientes como la energía alcanzan a niveles tróficos superiores a través de la conexión del bucle microbiano con la cadena trófica clásica (Azam *et al.*, 1983), incidiendo en la producción de COD, ciclado de nutrientes e impactar en la diversidad bacteriana pero también incidiendo en la diversidad y funcionamiento del ecosistema (Bonilla-Findji *et al.*, 2009).

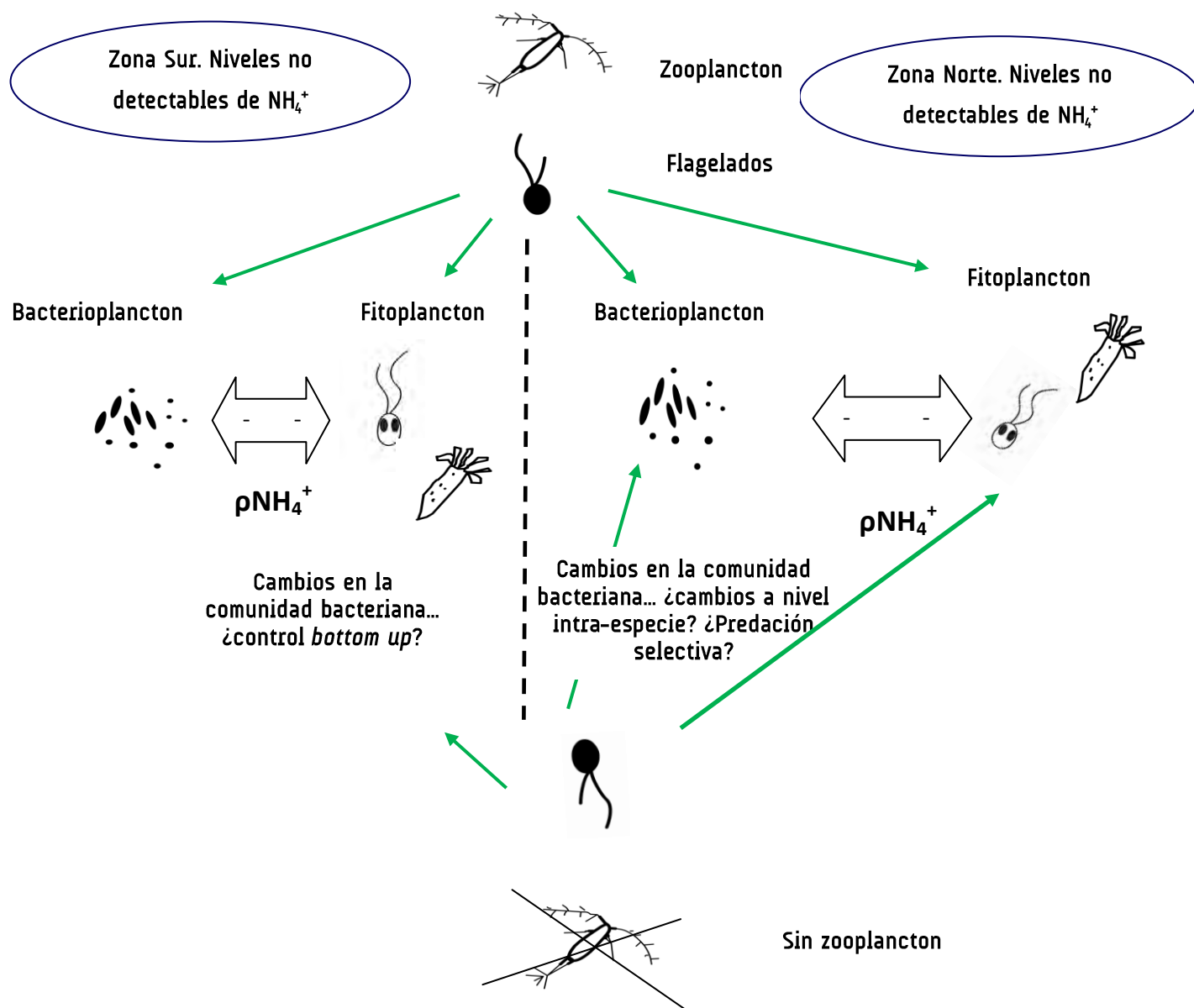


Figura 20. Esquema de los principales resultados obtenidos en el experimento del efecto de cascada trófica en la captación de NH_4^+ (4.3.2). La flecha doble indica el tipo de interacción entre ambas comunidades y la flecha más grande (derecha) indica cuál captó más. Los signos son (-) indican un desacople en la captación de NH_4^+ entre ambas comunidades. La remoción del mesozooplankton no alteró el proceso de captación de NH_4^+ en el bacterioplancton pero sí al del fitoplancton en la zona Norte. En el Sur, la predación no sería un factor tan relevante en el control de la comunidad planctónica sino más bien que ésta estaría regulada por factores ambientales (control *bottom-up*).

Más allá de determinar el tipo de interacción (y el porqué ocurre) que se establece entre el fitoplancton y el bacterioplancton, también es importante conocer o predecir las consecuencias de las mismas en el funcionamiento ecosistémico y en la productividad en un área protegida como lo es la Laguna de Rocha. Existen diversas teorías o modelos que han sido utilizadas para la “convivencia” entre productores primarios y mineralizadores (bacterias), como el “Modelo de competencia por exclusión” (Tilman, 1982), la hipótesis del C (Dafrasne y Loreau, 2001) o el modelo que incluye “competencia-comensalismo” en la hipótesis de C (Schade *et al.*, 2005; Daufresne *et al.*, 2008). La idea de que un sistema colapse porque el bacterioplancton compite y deja sin recursos al fitoplancton o, en el caso contrario, que el fitoplancton deje sin nutrientes minerales al bacterioplancton limitando así su actividad mineralizadora para que finalmente el sistema quede sin nutrientes (Dafrasne y Loreau, 2001), resulta un discutible en términos relativos. Han surgido nuevas propuestas que postulan que en realidad el bacterioplancton puede estar limitado por múltiples recursos (Danger *et al.*, 2008) que dominen especies que toleren dicha situación. También se ha postulado que existen variables tales como la predación o fluctuaciones temporales en los recursos que previenen la exclusión por competencia en la comunidad. Por otro lado, Dafrasne *et al.* (2008) demostraron en experimentos con un alga y una comunidad bacteriana (tomada de un lago en Francia), la coexistencia estable de ambas comunidades en ausencia de los factores como predación y entrada de nutrientes, lo que sugeriría una alternancia en las funciones inherentes a cada comunidad. Por tanto, la extrapolación de estos resultados a un sistema indicaría que cuando aumenta la carga de nutrientes desde la cuenca la mineralización sería el proceso biológico dominante. Por otra parte, cuando lo ocurre lo contrario, la entrada de C estaría aportada por los productores primarios, lo que implicaría entonces una alternancia de los procesos biológicos en el sistema (Daufresne y Loreau, 2001). Así, en la Laguna de Rocha, donde la tendencia es al aumento en la entrada de nutrientes desde la cuenca y a la disminución de los nutrientes en la columna de agua, es posible que la captación de N por parte de la comunidad microbiana sea un proceso biológico relevante.

6. CONCLUSIONES

En la presente tesis se abordó el estudio de la captación de NH_4^+ en tres componentes del bucle microbiano como son el bacterioplancton, el fitoplancton y el zooplancton en la Laguna de Rocha. Dicho trabajo incluyó determinar cómo era la interacción de las comunidades fito y bacterioplanctónicas en relación a la captación de NH_4^+ , así como también la relevancia del efecto cascada trófica en dicho proceso. Para poder lograrlo se utilizó, por primera vez en

un estudio en un sistema acuático uruguayo, el isótopo de ^{15}N como trazador. Además, se utilizaron dos técnicas de amplio uso en ecología microbiana como lo son el FISH y TRFLP para el estudio de la comunidad bacteriana. Del presente trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

En cuanto a la interacción fitoplancton-bacterioplancton:

- En el Norte la presencia del fitoplancton estimuló la captación de NH_4^+ por el bacterioplancton (mutualismo). Este tipo de interacción dependería de la composición y estado fisiológico de la comunidad de productores primarios, como también de los niveles de NH_4^+ .
- En el Sur, la interacción fue competitiva entre ambas comunidades y el fitoplancton dominó la captación de NH_4^+ .
- La composición de la comunidad bacteriana fluctuó en las condiciones experimentales favoreciendo a grupos bacterianos con mayor plasticidad o capacidad de adaptación a las condiciones ambientales de cada zona: Actinobacterias en el Norte o *Gammaproteobacterias* en el Sur.

En cuanto al efecto “cascada trófica”:

- El bacterioplancton no se vio afectado en la captación de NH_4^+ pero sí en su composición por la remoción del mesozooplancton en ambas zonas de la Laguna de Rocha. El fitoplancton disminuyó su captación solo en el Norte debido a un aumento de la presión de predación. El escenario más probable es que en esta zona la predación controlaría más a la comunidad planctónica (control *top-down*) mientras que en el Sur el control lo ejercerían las condiciones ambientales (control *bottom-up*).
- La transferencia de energía o nutrientes desde niveles tróficos inferiores a los superiores es un proceso rápido y selectivo en la Laguna de Rocha. La predación principalmente controlaría a aquellas comunidades o dentro de ellas, a aquellos grupos más eficaces en la captación del NH_4^+ .

En resumen, en esta Tesis se determinó que el bacterioplancton juega un rol relevante en la captación del NH_4^+ en la Laguna de Rocha, por ser capaz de inmovilizar a dicho nutriente de la columna de agua, fluctuar la composición de su comunidad frente a perturbaciones (como la entrada de un nutriente) y estar involucrado en la transferencia de nutrientes en el bucle microbiano. De esta tesis surgen nuevas preguntas que ayudarían a comprender mejor el ciclo del N y la dinámica de la comunidad microbiana en la Laguna de Rocha.

7. PERSPECTIVAS

Para profundizar en el conocimiento de la interacción entre el fitoplancton y el bacterioplancton, sería relevante repetir esta clase de estudio a nivel estacional, para poder así para poder correlacionarlo con los niveles de NH_4^+ encontrados en diferentes condiciones ambientales (barra abierta o cerrada, etc.). Asimismo, se debería determinar la influencia de las intrusiones marinas en el sistema, así como los efectos del COD alóctono o la radiación UV-B en los procesos de captación de compuestos nitrogenados. Además, resultaría relevante saber qué sucede con otros compuestos nitrogenados inorgánicos como NO_3^- u orgánicos (urea y aminoácidos) y si existe una estacionalidad en su captación en la Laguna de Rocha o no. En cuanto al efecto de cascada trófica, sería conveniente realizar mesocosmos removiendo diferentes miembros del zooplancton, para determinar así la incidencia de cada especie en la captación de N en la trama trófica. Esto ayudaría a conocer mejor el grado de transferencia de energía desde el bucle microbiano a la trama trófica clásica.

Por último, para avanzar en el entendimiento de las fluctuaciones que ocurren en la comunidad bacteriana como respuesta al control *top-down* y *bottom-up*, el empleo de otras metodologías como el secuenciamiento del gen 16S ARNr significaría un paso significativo. Incluso, el conjugar técnicas de identidad filogenética con aquellas que brindan información sobre la función metabólica de células individuales (ej espectrometría de masas de ion secundaria a escala nanométrica (*Nanometer Scale Second Ion Mass Spectrometer*, NanoSIM, Li *et al.*, 2008) permitiría ahondar el conocimiento de las interacciones que se dan entre bacterias y fitoplancton en relación a la captación de MOD derivada de éste último.

8. REFERENCIAS

- Abell, G.C.J. and Bowman, J.P. (2005). Ecological and biogeographic relationships of class Flavobacteria in the Southern Ocean. *FEMS Microbiol Ecol.* **51**:265-277.
- Abdo, Z., Schütte, U. M. E., Bent, S.J., Williams, C.J., Forney, L.J. and Joyce, P. (2006). Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environ Microbiol.* **8**:929-938.
- Allredge, A.L., Passow, U. and Logan, B.E. (1993). The existence, abundance, and significance of large transparent exopolymer particles in the ocean. *Deep-Sea Res.* **140**:1131-1140.
- Allers, E., Gomez-Consarnau, L., Pinhassi, J., Gasol, J.M., Simek, K. and Pernthaler, J. (2007). Response of Alteromonadaceae and Rhodobacteriaceae to glucose and phosphorus manipulation in marine mesocosms. *Environ Microbiol.* **9**:2417-2429.
- Alonso, C., Calliari, D., Forni, F., García, R., Goyenola, G., Meerhoff, M. y Saona, G. (1997). Efectos de la resuspensión de sedimentos en la productividad fitoplanctónica de una laguna costera somera (Laguna de Rocha) Trabajo de pasaje de curso de Limnología profundización Secc Limnología-FC-UDELAR ICP 97/1 (no publicado) Montevideo 9 pp.
- Alonso, C., Gómez-Pereira, P., 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. *Aquat Microb Ecol* **61**: 57-62.
- Alonso, C. Respuesta del bacterioplancton frente a cambios en la fuente de carbono orgánico disuelto en lagunas costeras de Uruguay. En *Informe final de proyecto PDT 63/190*.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**:143-169.
- Amann, R. and Fuchs, B. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol.* **6**:339-348.
- APHA (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA/AWWA/WPCF Washington, pp. 1230.
- Aubriot, L., Conde, D., Bonilla, S. and Britos, A. (2005). Evolución histórica de la carga de nutrientes asociada a cambios en el estado trófico actual. En: Conde, Rodríguez, Fagetti, Vintacourt (Eds). Avances científico técnicos para el manejo del área protegida Laguna de Rocha. Montevideo.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. and Thingstad, F. (1983). The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser.* **10**:257-263.
- Azam, F. (1998). Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickness. *Science.* **280**:694-696.
- Azam, F. and Long, R. A. (2001). Sea snow microcosms. *Nature.* **414**:495 -498.
- Azam, F. and Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol.* **5**:782 791.
- Baines, S.B. and Pace, M.L. (1991). The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: Patterns across marine and freshwater systems. *Limnol Oceanogr.* **6**:1078-1090.
- Balestra, C., Alonso-Sáez, L., Gasol, J.M. and Casotti, R. (2011). Group-specific effects on coastal bacterioplankton of polyunsaturated aldehydes produced by diatoms. *Aquat Microb Ecol.* **63**:123-131.
- Bell, Y.H., Lang, J.M. and Mitchell, R. (1974). Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Biol Bull.* **143**:265-277.
- Bender, M., Jahnke, R., Weiss, R., Martin, W., Heggie, D.T., Orchard, J. and Sowers, T. (1989). Organic-carbon oxidation and benthic nitrogen and silica dynamics in San-Clemente Basin, a Continental Borderland site. *Geochim Cosmochim Acta.* **3**:685-697.
- Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F. and Martínez-Murcia, A.J. (1995). Bacterial diversity in two coastal lagoons deduced from 16S rDNA PCR amplification and partial sequencing. *FEMS Microbiol Ecol.* **18**:267-279.
- Berdjeb, L., Pollet, T., Domaizon, I. and Jacquet, S. (2011). Effect of grazers and viruses on bacterial community structure and production in two contrasting trophic lakes. *BMC Microbiology.* **11**: 88-106.

- Berg, G.M., Glibert, P.M., Jorgensen, A.O.G., Balode, M. and Purina, I. (2001). Variability in inorganic and organic nitrogen uptake associated with riverine nutrient input in the Gulf of Riga, Baltic Sea. *Estuaries*. **24**:204–214.
- Bidigare, R.R. (1983). Nitrogen excretion by marine zooplankton. In “Nitrogen in the Marine Environment” (Carpenter, E. J., and Capone, D. G., Eds.). Academic Press, New York. pp. 385–409.
- Björkman, K. M and Karl, D. M. (2003). Bioavailability of dissolved organic phosphorus in the euphotic zone at Station ALOHA, North Pacific Subtropical Gyre. *Limnol. Oceanogr.* **3**:1049–1057.
- Blackwood, C.B., Waldrop, M.P., Zak, D.R., Sinsabaugh, R.L. (2007). Molecular analysis of fungal communities and laccase genes in decomposing litter reveals differences among forest types but no impact of nitrogen deposition. *Environ Microbiol.* **5**:1306–1316.
- Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L. and Pérez, M. (2005). Influence of hydrology on phytoplankton species composition and life strategies in a subtropical coastal lagoon periodically connected with the Atlantic Ocean. *Estuaries*. **28**:884–895.
- Bonilla-Findji, O., Herndl, G.J., Gattuso, J.P. and Weinbauer, M.G. (2009). Viral and Flagellate Control of Prokaryotic Production and Community Structure in Offshore Mediterranean Waters. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 4801–4812.
- Bosatta, E. and Berendse, F. (1984). Energy or nutrient regulation of decomposition: implications for the mineralization-immobilization response to perturbations. *Soil Biol Biochem.* **16**:63–67.
- Bowen, J. D., Stolzenbach, K. D. and Chisholm, S. W. (1993). Simulating bacterial clustering around phytoplankton cells in a turbulent ocean. *Limnol Oceanogr.* **1**:36–51.
- Bradley, P.B., Sanderson, M.P., Nejstgaard, J.C., Sazhin, A.F., Frischer, M.E., Killberg-Thoreson, L.M., Verity, L., Campbell, P.G. and Bronk, D. A. (2010). Nitrogen uptake by phytoplankton and bacteria during an induced *Phaeocystis pouchetii* bloom, measured using size fractionation and flow cytometric sorting. *Aquat Microb Ecol.* **61**:89–104.
- Bratbak, G. and Thingstad, T.F. (1985). Phytoplankton-bacteria interactions: an apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. *Mar Ecol Prog Ser.* **25**:23–30.
- Bronk, D. A. and P. M. Glibert (1993). Application of a ¹⁵N tracer method to the study of dissolved organic nitrogen uptake during spring and summer in Chesapeake Bay. *Mar Biol.* **115**:501–508.
- Bronk, D.A., See, J.H., Bradley, P. and Killberg, L. (2007). DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton. *Biogeosciences*. **4**:283–296.
- Brown, T. L., H. E., Bruce Edward Bursten, B.E., Burdge, J.R. (2002). *Chemistry: The Central Science*. (9th Ed.) Prentice Hall. USA.
- Bruns, A., Phillip, H., Cypionka, H., and Brinkhoff, T. (2003). *Aeromicrobium marinum* sp. nov., an abundant pelagic bacterium isolated from the German Wadden Sea. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**:1917–1923.
- Buffam, I., and McGlathery, K. J. (2003). Effect of ultraviolet light on dissolved nitrogen transformation in coastal lagoon water. *Limnol Oceanogr.* **48**:723–734.
- Bull, A.T. and Stach, J.E.M. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trend Microbiol.* **15**:491–499.
- Bushaw, K.L., Zepp, R.G., Tarr, M.A., Schulz-Janders, D., Bourbonniere, R.A., Hodson, R.E., Miller, W.L. and Bronk, D.A., Moran, M.A. (1996). Photochemical release of biologically available nitrogen from aquatic dissolved organic matter. *Nature*. **381**:404–407.
- Calbet, A. (2001). Mesozooplankton grazing effect on primary production: a global comparative analysis in marine ecosystems. *Limnol Oceanogr.* **46**:1824–1830.
- Calliari, D.A., Britos, A. and Conde, D. (2009). Testing the relationship between primary production and *Acartia tonsa* grazing pressure in an estuarine lagoon. *J Plank Res.* **31**:1045–10581.
- Carlson, C.A. (2002). Production and removal processes. 91–151 pp. *In: Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (Hansell DA & Carlson CA, Eds.). Academic Press, San Diego, CA.

- Carlson**, C.A., Giovannoni, S.J., Hansell, D.A., Goldberg, S.J., Parsons, R., Otero, M.P., Vergin, K. and Wheeler, B.R. (2002). The effect of nutrient amendments on bacterioplankton production, community structure and DOC utilization in the northwestern Sargasso Sea. *Aquat Microb Ecol.* **30**:19 – 36.
- Caron**, D.A. (1994). Inorganic nutrients, bacteria and the microbial loop. *Microb Ecol.* **28**:295-298.
- Caron**, D.A. and Goldman, J.C. (1990). Protozoan nutrient regeneration. *In*: Capriulo.G.M. (ed.), *Ecology of marine protozoa*. Oxford University Press, New York, 283-30 pp.
- Casotti**, R., Mazza, S., Brunet, C., Vantrepotte, V., Ianora, A. and Miralto, A. (2005). Growth inhibition and toxicity of the algal aldehyde 2-trans-2-cis decadienal on *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J Phycol.* **41**:7-20.
- Chang**, G.C., Dickey, T.D. and Williams, A.J., (2001). Sediment resuspension over a continental shelf during Hurricanes Edouard and Hortense. *J Geophys Res.* **106**:9517-9531.
- Chin**, W.C., Orellana, M.V., and Verdugo, P. (1998). Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature.* **391**:568-571.
- Chin**, W.C., Orellana, M.V., Quesada, I., and Verdugo, P. (2004). Secretion in Unicellular Marine Phytoplankton: Demonstration of Regulated Exocytosis in *Phaeocystis globosa*. *Plant Cell Physiol.* **5**:535-542.
- Clarke**, K.R. and Warwick, R.M. (2001). *Changes in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation*. 2nd edition. PRIMER-E: Plymouth. 144 pp.
- Coci**, M. (2007). Niche differentiation between ammonia-oxidizing bacteria in aquatic environments. PhD Thesis. Nederlands Instituut voor Ecologie (NIOO). Wageningen, Holanda.
- Conde**, D., Bonilla, S., Aubriot, L., De León R. and Pintos W. (1999). Comparison of the areal amount of chlorophyll a of planktonic and attached microalgae in a shallow coastal lagoon. *Hydrobiologia.* **408/409**:285-291.
- Conde**, D., Aubriot, L. and Sommaruga, R. (2000). Changes in UV penetration associated with marine intrusions and freshwater discharge in a shallow coastal lagoon of the Southern Atlantic Ocean. *Mar Ecol Prog Ser.* **207**:19-31.
- Conde**, D., Aubriot, L., Bonilla, S. and Sommaruga, R. (2002). Marine intrusions in a coastal lagoon enhances the effects of UV radiation on the phytoplankton photosynthetic rate. *Mar Ecol Prog Ser.* **240**:57-70.
- Conde**, D., Rodríguez-Gallego, L., Lacerot, G., Hein, V., Piccini, C., Meerhof, E., Cervetto, G., Rodríguez-Graña, L., Calliari, D. y Masciardi, S. (2004). Impacto ecológico de la apertura artificial de una laguna costera propuesta como sitio RAMSAR en Uruguay: fundamentos científicos para la gestión de la Laguna de Rocha. Informe Final, Facultad de Ciencias RAMSAR-FPS 2 URY/02. Montevideo.
- Culman**, S.W., Bukowski, R., Gauch, H.G., Cadillo-Quiroz, H. and Buckley, D.H., (2009). T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* **10**:171-181.
- Daims**, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, KH. and Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol.* **22**:434-444.
- Danger**, M., Oumarou, C., Benest, D. and Lacroix, G. (2007). Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. *Funct Ecol.* **21**:202-210.
- Danger**, M., Daufresne, T., Lucas, F., Pissard, S., and Lacroix, G. (2008). Does Liebig's Law of the Minimum scale up from species to communities? *Oikos.* **117**:1741-1751.
- Daufresne**, T., and Loreau, M. (2001). Ecological stoichiometry, indirect interactions between primary producers and decomposers, and the persistence of ecosystems. *Ecology.* **82**:3069-3082.
- Daufresne**, T., Lacroix, G., Benhaim, D. and Loreau, M. (2008). Coexistence of algae and bacteria: a test to the carbon hypothesis. *Aquat Microb Ecol.* **53**:323-332.
- De Corte**, D., Yokokawa, T., Varela, M. M., Agogué, H. and Herndl, G. (2009). Spatial distribution of Bacteria and Archaea and amoA gene copy numbers throughout the water column of the Eastern Mediterranean Sea. *ISME J.* **3**: 147-158.
- del Giorgio**, P.A., Bird, D.F., Prairie, Y.T., and Planas, D. (1996). Flow cytometric determination of bacterial abundance in lake plankton with the green nucleic acid stain SYTO 13. *Limnol Oceanogr.* **41**:783-789.

- del Giorgio, P.A.** and Gasol, J.M. (2008). Physiological structure and single-cell activity in marine bacterioplankton. 243– 298 pp. *In: Microbial Ecology of the Oceans*, D.L. Kirchman (Ed). 2nd edition, John Wiley and Sons.
- De la Iglesia, R.**, Castro, D., Ginocchio, R., van der Lelie, D., and Gonzalez, B. (2006). Factors influencing the composition of bacterial communities found at abandoned copper-tailings dumps. *J Appl Microb.* **100**:537–544.
- Dodds, W.K.**, Priscu, J.C., and Ellis, B.K. (1991). Seasonal uptake and regeneration of inorganic nitrogen and phosphorus in a large oligotrophic lake: size-fractionation and antibiotic treatment. *J Plank Res.* **13**:1339–1358.
- Dugdale, R.C.** and Wilkerson F.P. (1986). The use of ^{15}N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans., experimental considerations. *Limnol Oceanogr.* **31**:673–689.
- Dunbar, J.**, Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* **67**:190–197.
- Eller, G.**, Kanel, L., and Kruger, M. (2005). Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of Lake Plüsee. *Appl Environ Microbiol.* **71**:8925–8928.
- Emerson, S.R.**, Jahnke, R., Bender, M., Froelich, P., Klinkhammer, G., Bowser, C., and Setlock, G. (1980). Early diagenesis in sediments from the eastern equatorial Pacific. I. Pore water nutrient and carbonate results. *Earth Planet. Sci. Lett.* **49**:57–80.
- Falkowski, P.G.** and Raven, J. A. (2007). *Aquatic photosynthesis* (2 Ed.). Princeton, New York: University Press. 484 pp.
- Fanning, K.A.**, Carder, K.L., and Betzer, P.R. (1982). Sediment resuspension by coastal waters: A potential mechanism for nutrient re-cycling on the ocean's margins. *Deep Sea Res.* **29**:1223–1229.
- Fernandez, C.**, Farías, L., and Alcamán, M.E. (2009). Primary production and nitrogen regeneration processes in surface waters of the Peruvian upwelling system. *Prog Oceanogr.* **85**:159–168.
- Fhlip, M.**, Pale, M.L., and Cor, J.J. (1996). Regulation of planktonic bacterial growth rates: The effects of temperature and resources. *Microb. Ecol.* **31**:15–28.
- FitzJohn, R.** and Dickie, I. (2007). TRAMPR: AN R package for analysis and matching of terminal-restriction fragment length polymorphism (TRFLP) profiles. *Mol Ecol Notes.* **7**:583–587.
- Fortune, E.O.** and Ochs, C. (2008). Bacterioplankton and phytoplankton production rates compared at different levels of solar ultraviolet radiation and limiting nutrient ratios. *J Plank Res.* **11**:1271–1284.
- Fouillard, E.**, Gosselin, M., Rivkin, R.B., Vasseur, C., and Mostajir, B. (2007). Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in Arctic surface waters. *J Plank Res.* **29**:369–376.
- Fouillard, E.** and Mostajir, B. (2010). Revisited phytoplanktonic carbon dependency of heterotrophic bacteria in freshwaters, transitional, coastal and oceanic waters. *Fems Microbiol Ecol.* **73**:419–429.
- Fouillard, E.** and Mostajir, B. (2011). Complementary support for the new ecological concept of 'bacterial independence on contemporary phytoplankton production' in oceanic waters. *Fems Microbiol Ecol.* **78**:206–209.
- Frank, J.A.**, Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., and Olsen, G.J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* **74**:2461–2470.
- Frey, C.** (2010). Uptake of dissolved organic nitrogen (DON) by phytoplankton communities of the Baltic Sea. Diplomarbeit. Leibniz Institut für Ostseeforschung Warnemünde (IOW) an der Universität Rostock. Rostock, Alemania.
- Frette, L.**, Jørgensen, N.O., Nybroe, O., Del Giorgio, P.A., and Kroer, N. (2009). Effect of availability of nitrogen compounds on community structure of aquatic bacteria in model systems. *Microb Ecol.* **1**:104–16.

- Fuchs, B.M., Glöckner, F.O., Wulf, J., and Amann, R. (2000). Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* **66**:3603-3607.
- Fuhrman, J. A. and Bell, T. M. (1985). Biological considerations in the measurement of dissolved free amino acids in seawater and implications for chemical and microbiological studies. *Mar Ecol Prog Ser.* **25**:13-21.
- Fuhrman, J.A. and Noisei, R.T. (1995). Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnol Oceanogr* **40**:1236-1242.
- Galloway, J.N. and Cowling, E.B. (2002). Nitrogen and the world. *Ambio.* **31**:64-71.
- Genney, D. R., Anderson, I. C., and Alexander, I. J. (2006). Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytol.* **170**:381-390.
- Gil, F., De la Iglesia, R., Mendoza, L., Gonzalez, B., and Wilkens, M. (2006). Soil Bacteria are Differentially Affected by the Resin of the Medicinal Plant *Pseudognaphalium vira vira* and Its Main Component Kaurenoic Acid. *Microb Ecol.* **52**:10-18.
- Glibert, P.M., Lipschultz, F., McCarthy, J.J., and Altabet, M. (1982). Isotope dilution models of uptake and remineralization of ammonium by marine plankton. *Limnol Oceanogr.* **27**:639-650.
- Glibert, P.M., Garside, C., Fuhrman, J. A., and Roman, M.R. (1991). Time dependent coupling of inorganic and organic nitrogen uptake and regeneration in the plume of the Chesapeake Bay estuary and its regulation by large heterotrophs. *Limnol Oceanogr.* **36**:895-909.
- Gliwicz, Z. M. (2002). On the different nature of top-down and bottom-up effects in pelagic food webs. *Freshwater Biol.* **12**:2296-2312.
- 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. *Appl Environ Microbiol.* **65**:3721-3726.
- Goldman, J.C., Caron, D.A., and Denner, R.M. (1987). Regulation of gross growth efficiency in bacteria by substrate C: N ratio. *Limnol Oceanogr.* **32**:1239-1252.
- Goldman, J.C. and Denner, M.R. (2000). Rapid nitrogen uptake by marine bacteria. *Limnol Oceanogr.* **5**:1195-1198.
- Goodfellow, M. and Williams, S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol.* **37**:189-216.
- Gómez-Pereira, P. R. (2010). Marine Bacteroidetes: distribution patterns and role in the degradation of organic matter. PhD Thesis. Max Planck Institute für Marine Mikrobiologie. Bremen, Alemania.
- Gómez-Pereira, P.R., Fuchs, B.M., Alonso, C., Oliver, M.J., van 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.
- Greenhouse, S.W. and Geisser, S. (1959). On methods in the analysis of profile data. *Psychometrika.* **24**:95-112.
- Grover, J.P. (2000). Resource competition and community structure in aquatic micro-organisms: experimental studies of algae and bacteria along a gradient of organic carbon to inorganic phosphorus supply. *J Plank Res.* **22**:1591-1610.
- Grover, J.P. (2004). Predation, competition, and nutrient recycling: a stoichiometric approach with multiple nutrients. *J Theor Biol.* **229**:31-43.
- Gruber, N and J. E Galloway (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature.* **451**:293.
- Gruber, N. (2008). The Marine Nitrogen Cycle: Overview and Challenges. pp 1-50. In: Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ (Eds.) *Nitrogen in the marine environment*, 2nd Ed. Academic Press, Boston, MA, USA.
- Hamersleya, M.R., Woebken, D., Boehrerb, Schultzeb, B.M, Lavika, G and Kuypers, M.M.M (2009). Water column anammox and denitrification in a temperate permanently stratified lake (Lake Rassnitzer, Germany). *Syst Appl Microbiol.* **32**: 571-582.
- Havskum, H., Thingstad, T.F., Scharek, R., Peters, F., Berdalet, E., Sala, M., Jan, M.A., Bangsholt, C., Zweifel, U.L., Hagström, E., Perez, M., and Dolan, J.R. (2003). Silicate and labile DOC interfere in structuring the microbial food web via algal-bacterial competition for mineral nutrients: Results of a mesocosm experiment. *Limnol Oceanogr.* **1**:129-140.

- Hewson, I. and Fuhrman, J.A. (2006). Improved strategy for comparing microbial assemblage fingerprints. *Microb. Ecol.* **51**:147-153.
- Hewson, I. and Fuhrman, J.A. (2006). Viral impacts upon marine bacterioplankton and sediment bacterial assemblage composition. *J Mar Biol Assoc UK* **86**:577-589.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. (2009). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol.* **8**:15-25.
- Hobson, K.A. (2005). Flying fingerprints: making connections with stable isotopes and trace elements. pp. 235-246 *In: Greenberg R y Marra PP (Eds.) Birds of two worlds: the ecology and evolution of migration.* Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Holfeld, R. (1998). Fungal infections of the phytoplankton, seasonality, minimal host density, and specificity in a mesotrophic lake. *New Phytol.* **138**:507-517.
- Hopman, A.H.N., Ramaekers, F.C.S., and Speel, E.J.M. (1998). Rapid synthesis of biotin-, digoxigenin-, trinitrophenyl-, and fluorochromelabeled tyramides and their application for in situ hybridization using CARD-amplification. *J. Histochem. Cytochem.* **46**:771-777.
- Hulot, F.D. and Huisman, J. (2004). Allelopathic interactions between phytoplankton species: The roles of heterotrophic bacteria and mixing intensity. *Limnol Oceanogr.* **49**:1424-1434.
- Huynh, H. and Feldt, L.S. (1976). Estimation of the Box correction for degrees of freedom from sample data in randomised block and split-plot designs. *J Edu Stat.* **1**:69-82.
- Jacobsen, A., Egge, J.K., and Heimdal, B.R. (1995). Effects of increased concentration of nitrate and phosphate during a springbloom experiment in mesocosm. *J Exp Mar Biol Ecol.* **187**:239-251.
- Jain, A.K., Briegleb, B.P., Minschwaner, K., and Wuebbles, D. J. (2000). Radiative forcings and global warming potentials of thirty-nine greenhouse gases, *J Geophys Res.* **105**:20,773-20,790.
- Hongmei, J., Hongbin, L., Wong, T., and Chen, M. (2010). Impact of mesozooplankton grazing on the microbial community revealed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *J Exp Mar Biol Ecol.* **383**:39-47.
- Hyenstrand, P., Rydin, E. and Gunnerhed, M. (2000) Response of pelagic cyanobacteria to iron additions-enclosure experiments from Lake Erken. *J. Plankton Res.* **22**: 113-1126.
- Joint, I. P. I., Henriksen, P., Fonnes, A.G., Bourne, D., Thingstad, T.F., and Riemann, B. (2002). Competition for inorganic nutrients between phytoplankton and bacterioplankton in nutrient manipulated mesocosms. *Aquat Microb Ecol.* **29**:145-159.
- Joye, S.B. and Anderson, I.C. (2008). Nitrogen Cycling in coastal sediments. pp 868-900. *In: Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ (Eds.) Nitrogen in the marine environment, 2nd Ed.* Academic Press, Boston, MA, USA.
- Jumars, P.A., Penry, D.L., Baross, J.A., Perry, M.J., and Frost, B.W. (1989). Closing the microbial loop: dissolved carbon pathway to heterotrophic bacteria from incomplete ingestion digestion and absorption in animals. *Deep-sea Res.* **36**:485-495.
- Kanda, J., Saino, T. and Hattori, A. (1985). Nitrogen uptake by natural populations of phytoplankton and primary production in the Pacific Ocean: Regional variability of uptake capacity. *Limnol Oceanogr.* **30**:987-999.
- Kent, A.D., Smith, D.J., Benson, B.J., and Triplett, E.W. (2003). Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* **69**:6768-6776.
- Kirchman, D. L. (2000). Uptake and regeneration of inorganic nutrients by marine heterotrophic bacteria. 261-288 pp. *In D. L. Kirchman (Ed.) Microbial ecology of the oceans.* Wiley-Liss, New York, N.Y.
- Kjerfve, B. (1994). Coastal lagoons. pp 1-8. *En: Kjerfve (Ed.) Coastal lagoon processes.* Elsevier, Amsterdam.
- Koroleff, J. (1970). Revised version of "Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue". *Int. Con. Explor. Sea C. M. 1969/ C:9 ICES information on techniques and methods for sea water analysis.* Interlab. Rep., **3**:19-22.

- Kuypers, M., Lavick, M.M., and Thamdrup, B. (2006). Anaerobic ammonium oxidation in the marine environment. In L. N. Neretin [ed.], Past and present marine water column anoxia. Nato Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences. Springer-Verlag.
- Landry, M.R. and Calbet, A. (2004). Microzooplankton production in the oceans. ICES J Mar Sci. **4**:501-507.
- Lampert, W. and Sommer, U. (1997). Limnology: The ecology of Lakes and Streams. Oxford University Press. pp 370.
- Lampitt, R., Noji, T. and von Bodungen, B. (1990). What happens to zooplankton faecal pellets? Implications for material flux. Mar Biol. **104**:15-23.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics, Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., (Eds.), John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Lee, S. and Fuhrman, J.A. (1987). Relationship between Biovolume and Biomass of Naturally Derived Marine Bacterioplankton. Appl Environ Microbiol. **6**:1298-1303.
- Leybo, A. I., Netrusov, A.I. and Conrad, R. (2006). Effect of hydrogen concentration on the community structure of hydrogenotrophic methanogens studied by T-RFLP analysis of 16S rRNA gene amplicons. Microbiology. **75**:683-688.
- Li, T., Wu, T. D., Mazéas, L. T., Guerquin-Kern, J.L., Leblond, G. and Bouchez, T. Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. **63**:4516-4522.
- Lind, O.T., Chrzanowski, T.H., Davalos-Lind, L. (1997). Clay turbidity and the relative production of bacterioplankton and phytoplankton. Hydrobiologia. **353**:1-18.
- Lipschultz, F. (1995). Nitrogen-specific uptake rates of marine phytoplankton isolated from natural populations of particles by flow cytometry. Mar Ecol Progr Ser. **123**:245-258.
- Lipschultz, F. (2008). Isotope tracer methods for studies of the marine nitrogen cycle. 1345-1384 pp. In: Nitrogen in the marine environment. Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ (Eds.), 2nd Ed. Academic Press, Boston, MA, USA.
- Long, R.A. and Azam, F. (2001). Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. App Environm Microbiol. **67**: 4975-4983.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. System Appl Microbiol. **15**:593-600.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. and Schleifer, K.H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. Microbiology. **142**:1097-1106.
- Mayali, X. and Azam, F. (2004). Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. J. Eukaryot Microbiol. **51**:139-144.
- Mcqueen, D.J., Johannes, M.R.S., Post, J.R., Stewart, T.J. and Lean, D.R.S. (1989). Bottom-up and top-down impacts on freshwater pelagic community structure. Ecological Monographs. **59**:289-309.
- Middelburg, J. J. and Nieuwenhuize, J. (2000). Uptake of dissolved inorganic nitrogen in turbid, tidal estuaries. Mar Ecol Progr Ser. **192**:79-88.
- Miller, C.A. and Landry, M.R. (1984). Ingestion-independent rates of ammonium excretion by the copepod *Calanus pacificus*. Mar Biol. **78**:265-270.
- Miralto, A., Barone, G., Romano, G., Poulet, S.A., Ianora, A., Russo, G.L., Buttino, I., Mazzarella, G., Laabir, M., Cabrini, M. and Giacobbe, M.G. (1999). The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. Nature. **402**:173-176.
- Mohanty, S.R., Bodelier, P.L.E., Floris, V. and Conrad, R. (2006). Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils. Appl Environ Microbiol. **72**:1346-1354.
- Møller, E.F. and Nielsen, T.G. (2001). DOM production by marine copepods: Effect of phytoplankton biomass and cell size. J. Plankton Res. **23**:527-536.

- Møller**, E.F., Thor, P. and Neilsen, T.G. (2003). Production of DOC by *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus* through sloppy feeding and leakage from fecal pellets. *Mar Ecol Prog Ser.* **262**:185-191.
- Møller**, E.F. (2007). Production of dissolved organic carbon by sloppy feeding in the copepods *Acartia tonsa*, *Centropages typicus*, and *Temora longicornis*. *Limnol Oceanogr.* **1**:79-84.
- Morales-Zamorano**, L.A., Cajal-Medrano, R., Orellana-Cepeda, E. and Jimenez-Perez, L.C. (1991). Effect of tidal dynamics on a planktonic community in a coastal lagoon of Baja California, Mexico. *Mar Ecol Progr Ser.* **78**:229-239.
- Morán**, G.X.A. and Alonso-Sáez, L. (2011). Independence of bacteria on phytoplankton? Insufficient support for Fouilland & Mostajir's (2010) suggested new concept. *Fems Microbiol Ecol.* **78**:203-205.
- Morse**, J.W. and Morin, J.P. (2005). Ammonium adsorption on coastal marine sediment: Influence of redox conditions. *Mar Chem.* **95**:107-112.
- Mulholland**, M.R. and Lomas, M.W. (2008). Nitrogen uptake and assimilation. 303-384 pp. *In: Nitrogen in the marine environment*. Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ (Eds.), 2nd Ed. Academic Press, Boston, MA, USA.
- Muyzer**, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *App Environ Microbiol.* **59**:695-700.
- Neef**, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H. and Schleifer, K.H. (1996). Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **62**:4329-39.
- Nixon**, S.W., Granger, S.L. and Nowicki, B.L. (1995). An assessment of the annual mass balance of carbon, nitrogen, and phosphorus in Narragansett Bay. *Biogeochemistry* **31**:15-61.
- Noble**, R. T. and Fuhrman, J. A. (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat Microb Ecol.* **14**: 113-118.
- Oliveira**, A.M. and Kjerfve, B. (1993). Environmental Responses of a Tropical Coastal Lagoon System to Hydrological Variability: Mundaú-Manguaba, Brazil. *Estuar Coast Shelf Sci.* **37**:575-591.
- Oremland**, R.S. and Capone, D.G. (1988). Use of "specific inhibitors" in biogeochemistry and microbial ecology. 285-383 pp. *In: Advances Microbial Ecology.* (10), K.C. Marshall (ed.), Plenum Publish. Co., NY.
- Pace**, M. L., Cole, J. J., Carpenter, S. R., Kitchell, J. F. (1999). Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Tree.* **14**:483-488.
- Parker**, A. E. (2005). Differential Supply of Autochthonous Organic Carbon and Nitrogen to the Microbial Loop in the Delaware Estuary. *Estuaries.* **28**:856-867.
- Piccini**, C. (2006). Efecto de la radiación solar ultravioleta sobre la materia orgánica disuelta: respuesta y dinámica de la comunidad bacteriana en una laguna costera Reserva de la Biosfera (Laguna de Rocha). Tesis Doctorado PEDECIBA/Biología. Uruguay.
- 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.* **10**:6560-6568.
- Piccini**, C., Conde, D., Pernthaler, J. and Sommaruga, R., (2009). Alteration of chromophoric dissolved organic matter by solar UV radiation causes rapid changes in bacterial community composition. *Photochem Photobiol Sci.* **8**: 1321-1328.
- Pérez**, G., Conde, D. y Piccini, C. (2007). Flujo de amonio a través del bacterioplancton y el fitoplancton en la Laguna de Rocha mediante el empleo de isótopos estables (¹⁵N). XII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Montevideo, Uruguay.
- Pérez-Aragón**, M., Fernández, C. and Escribano, R., (2011). Nitrogen excretion by mesozooplankton in a coastal upwelling area: Seasonal trends and implications for biological production. *J Exp Mar Biol Ecol.* **1-2**:116-124.

- Pernthaler, A., Pernthaler, J. and Amann, R. (2002).** Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **6**:3094-101.
- Pernthaler, A. and Amann, R. (2004).** Simultaneous fluorescence *in situ* hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **70**:5426-543.
- Pernthaler, J. (2005).** Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol.* **7**:537-46.
- Peterson, B. J., Wollheim, W. M., Mulholland, P. J., Webster, J. R., Meyer, J. L., Tank, E. M., Bowden, W. B., Valett, H. M., Hershey, A. E., McDowell, W. H., Dodds, W. K., Hamilton, S. K., Gregory, S. and Morrall, D. D. (2001).** Control of Nitrogen Export from Watersheds by Headwater Streams. *Science.* **292**:86-90.
- Pintos, W., Conde, D., De León, R., Cardezo, M.J., Jorcín, A. and Sommaruga, R. (1991).** Some limnological characteristics of Laguna de Rocha (Uruguay). *Rev Brasil Biol.* **51**:79.
- Pomeroy, L. R. (1974).** The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience.* **24**:499-504.
- Pomeroy, L. R., Williams, P.J., Azam, F. and Hobbie, J. E. (2007).** The microbial loop. *Oceanography.* **20**:28-33.
- Porter, K.G. and Feig, Y.S. (1980).** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr.* **25**:943-948.
- Poulsen, L. K., Ballard, G. and Stahl, D. A. (1993).** Use of rRNA Fluorescence *in situ* Hybridization for Measuring the Activity of Single Cells in Young and Established Biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **59**:1354-1360.
- Proctor, L.M. and Fuhrman, J.A. (1990).** Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature.* **343**:60-62.
- Rabalais, N. (2002).** Nitrogen in aquatic environments *AMBIO.* **31**:102-112.
- Rautio, M. and Vincent, W. F. (2006).** Benthic and pelagic food resources for zooplankton in shallow high-latitude lakes and ponds. *Freshwater Biol.* **51**:1038-1052.
- Ramette, A. (2009).** Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* **8**:2495-2505.
- Rappe, M.S. and Giovannoni, S.J. (2003).** The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* **57**:369-394.
- Reynolds, C. S. (1991).** Functional morphology and adaptative strategies of freshwater phytoplankton, p. 388-426. *In* C. Sandgren (ed.), *Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton*, Volume 1. Cambridge University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Rodríguez-Graña, L., Calliari, D., Conde, D., Sellanes, J., and Urrutia, R. (2008)** Food web structure of an extremely shallow coastal lagoon in the subtropical South Atlantic assessed by the stable isotope analysis (¹³C and ¹⁵N). *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **362**:69-83.
- Rojo, C., Rodrigo, M. A., Salazar, G., and Álvarez-Cobelas, M. (2008).** Nitrate uptake rates in freshwater plankton: the effect of food web structure. *Mar Fresh Wat Res.* **59**:717-725.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. (1994).** *In situ* probing of Grampositive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology.* **140**:2849-2858.
- Rosenfeld, J. K. (1979).** Ammonium absorption in nearshore anoxic sediments. *Limnol Oceanogr.* **24**:356-364.
- Roy, S., Harris, R.P. and Poulet, S.A. (1989).** Inefficient feeding by *Calanus helgolandicus* and *Temora longicornis* on *Coscinodiscus wailesii*—quantitative estimation using chlorophylltype pigments and effects on dissolved free amino acids. *Mar Ecol Prog Ser.* **52**:145-153.
- Roy, S. (2009).** The coevolution of two phytoplankton species on a single resource: Allelopathy as a pseudo-mixotrophy. *Theor Popul Biol.* **75**:68-75.
- Rowe, G.T., Clifford, C.H., Smith, K.L. and Hamilton, P.L. (1975).** Benthic nutrient regeneration and its coupling to primary productivity in coastal waters. *Nature.* **255**:215-217.
- Samuelsson, K., Berglund, J., Haecky, P. and Andersson, A. (2002).** Structural changes in an aquatic microbial food web caused by inorganic nutrient addition. *Aquat Microb Ecol.* **29**:29-38.

- Sanders**, R.W., Caron, D.A. and Berninger, U.G. (1992). Relationship between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and freshwaters: an interecosystem comparison. *Mar Ecol Prog Ser.* **86**:1-14.
- Schade**, J.D., Espeleta, J.F., Klausmeier, C.A., McGroddy, M.E., Thomas, S.A., Zhang, L. (2005). A conceptual framework for ecosystem stoichiometry: balancing resource supply and demand. *Oikos.* **109**:40-51.
- Schleper**, C., Jurgens, G. and Jonscheit, M. (2005). Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol.* **6**:479-88.
- Schuylt**, K. and Brander, L. (2004). The economic values of the world's wetlands. Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape (SAEFL) Gland/Amsterdam, 29pp.
- Schockman**, G.D., Kolb, J.J. and Toennies, G. (1958). Relations between bacterial cell wall synthesis, growth phase, and autolysis. *J Biol Chem.* **2**:961-977.
- Schütte**, U. M. E., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D. and Forney, L. J. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol.* **80**:365-380.
- Schweitzer**, B., Huber, I., Amann, R., Ludwig, W., Simon, M. (2001). α - and β -Proteobacteria control the consumption and release of amino acids on lake snow aggregates. *Appl Environ Microbiol.* **67**:632-645.
- Sellner**, K.G. (1992). Trophodynamics of marine cyanobacteria blooms, p. 75-94, in: *Marine Pelagic Cyanobacteria: Trichodesmium and other Diazotrophs*, edited by: Carpenter, E. J., Capone, D. G., Rueter, J. G., Kluwer Academic Publisher.
- Sherr**, E.B., Sherr, B.F. and Paffnhöfer, G.A. (1986). Phagotrophic protozoa as food of metazoans: A "missing" trophic link in marine pelagic webs? *Mar Microb Food Webs.* **1**:61-80.
- Sherr**, B. and Sherr, E. (2003). Community respiration/production and bacterial activity in the upper water column of the central Arctic Ocean. *Deep-Sea Res I.* **50**:529-542.
- Shyu**, C., Soule, T., Bent, S.J., Foster, J.A. and Forney, L.J. (2007). MiCA: a webbased tool for the analysis of microbial communities based on terminal-restriction fragment length polymorphisms of 16S and 18S rRNA genes. *Microb Ecol.* **53**:562-570.
- Smith**, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L. and Azam, F. (1992). Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature.* **359**:139-142.
- Smith**, R.C., Prozelin, B.B., Baker, K.S., Bidigare, R.R., Boucher, N.P., Coley, T., Karentz, D., MacIntyre, S., Matlick, H. A., Menzies, D., Ondrusek, M., Wan, Z. and Waters, K.J. (1992). Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science.* **255**:952.
- Stahl**, D.A. and Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes 205-248 pp. *In* *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, editors. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK.
- Steinberg**, D.K. (1995). Diet of copepods (*Scolopatum vorax*) associated with mesopelagic detritus (giant larvacean houses) in Monterey Bay, California. *Mar Biol.* **122**:571-584.
- Steinberg**, D.K. and Saba, G.K. (2008). Nitrogen consumption and metabolism in marine zooplankton. 1135-1196 pp. *In*: *Nitrogen in the marine environment*. Capone D.G, Bronk D.A, Mulholland M.R, Carpenter E.J (Eds.), 2nd edn. Academic Press, Boston, MA, USA.
- Strom**, S.L. (2000). Bacterivory: interactions between bacteria and their grazers, p. 351-386. *In*: D. L. Kirchman (ed.), *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, New York.
- Strous**, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T., Webb, R., Kuenen, J.G., and Jetten, M.S. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature.* **674**:446-449.
- Torres Dowdall**, J., Farmer, A., y Bucher, E. H. (2005). Uso de isótopos estables para determinar conectividad migratoria en aves: alcances y limitaciones. *Hornero.* **21**:73-84.
- Tan**, Z., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. (2003). Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environ Microbiol.* **5**:1009-1015.

- Tang, K. W., Turk, V. and Grossart, H.-P.** (2010). Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. *Aquat Microb Ecol.* **61**:261-277.
- Teira, E., Martínez-García, S., Calvo-Díaz, A. and Morán, X.A.G.** (2010). Effects of inorganic and organic carbon nutrient inputs on bacterioplankton community composition along a latitudinal transect in the Atlantic Ocean. *Aquat Microb Ecol.* **60**:299-313.
- Thies, F.L., König, W. and König, B.** (2007). Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprint. *J Med Microbiol.* **56**:755-761.
- Tilman, D.** (1982). Resource competition and community structure. Monographs in population biology. Princeton University Press, Princeton, NJ. 296 pp.
- Townsend, A.R., Howarth, R.H., Bazzaz, F.A., Booth, M.S., Cleveland, C.C., Collinge, S.K., Dobson, A.P., Epstein, P.R., Holland, E.A., Keeney, D.R., Mallin, M.A., Rogers, C.A., Wayne, P., and Wolfe, A.H.** (2003). Human health effects of a changing global nitrogen cycle. *Front Ecol Environ.* **1**:240-246.
- Trottet, A., Fouilland, E., Le Boulanger, C., Lanouguère, E. and Bouvy, M.** (2011). Use of inhibitors for coastal bacteria and phytoplankton: Application to nitrogen uptake rates. *Est Coast Shelf Sci.* **93**:151-159.
- Trousselier, Marc** (Lead Author), **Jean-Pierre Gattuso** (Topic Editor). (2007). "Coastal lagoon." *In: Encyclopedia of Earth*. Eds. Cutler J. Cleveland (Washington, D.C.: Environmental Information Coalition, National Council for Science and the Environment). http://www.eoearth.org/article/Coastal_lagoon
- van Gremberghe, I., Van der Gucht, K., Vanormelingen, P., Asmelash, T., Dejenie, T., D'hondt, S., Declerck, S., De Meester, L. and Vyverman, W.** (2011). Genetic diversity of Microcystis blooms (Cyanobacteria) in recently constructed reservoirs in Tigray (Northern Ethiopia) assessed by rDNA ITS. *Aquat Biol.* **45**:289-306.
- Vigil, P., Countway, P.D., Rose, J., Lonsdale, D.J., Gobler, C.J. and Caron, D.A.** (2009). Rapid shifts in dominant taxa among microbial eukaryotes in estuarine ecosystems. *Aquat Microb Ecol.* **54**:83-100.
- Vincent, W.F., Rautio, M. and Pienitz, R.** (2007). Climate control of underwater UV exposure in polar and alpine aquatic ecosystems. 227-249 pp. *In: Arctic Alpine Ecosystems and People in a Changing Environment* (J.B. Orbaek, R. Kallenborn, I. Tombre, E. Hegseth, A. Falk-Petersen & A.H. Hoel, Eds). Springer, Berlin.
- Veuger, B.** (2006). A new method for tracing flows of nitrogen and carbon through bacteria and algae in aquatic microbial communities: Analysis of ¹⁵N- and ¹³C-incorporation into D-alanine and other hydrolysable amino acids. PhD Thesis. Nederlands Instituut voor Ecologie (NIOO). Wageningen, Holanda.
- Verdugo, P., Alldredge, A. L., Azam, F., Kirchman, D. L., Passow, U. and Santschi, P. H.** (2004). The oceanic gel phase: a bridge in the DOM-POM continuum. *Mar Chem.* **92**:67-85.
- Urban-Rich, J., Hansell, D. A. and Roman, M. R.** (1998). Analysis of copepod fecal pellet carbon using a high temperature combustion method. *Mar Ecol Progr Ser.* **171**:199-208.
- Zehr, J. P. and Ward, B. B.** (2002). Nitrogen Cycling in the Ocean: New Perspectives on Processes and Paradigms. *Appl Environ Microbiol.* **68**:1015-1024.
- Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M.** (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol.* **62**:316-322.
- Ward, B. B.** (2008). Nitrification in marine systems. 199-261 pp. *In: Nitrogen in the marine environment*. Capone DG, Bronk DA, Mulholland MR, Carpenter EJ (Eds). 2nd edn. Academic Press, Boston, MA, USA.
- Ward, B.B., Capone, D.G. and Zehr, J.P.** (2007). What's new in the nitrogen cycle? *Oceanography* **2**:101-109.
- Wichard, T., Poulet, S. A., Halsband-Lenk, C., Albaina, A., Harris, R., Liu, D. and Pohnert, G.** (2005). Survey of the chemical defence potential of diatoms: screening of fifty species for unsaturated aldehydes. *Chem Ecol.* **31**:949-958.
- Winter, C., Smit, A., Herndl, G.J. and Weinbauer, M.G.** (2004). Impact of viroplankton on archaeal and bacterial community richness as assessed in seawater batch cultures. *Appl Environ Microbiol.* **70**:803-813.
- Woese, C.R. and Fox, G. E.** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **74**:5088-5090.
- Yang, S.J., Choo, Y.J. and Cho, J.C.** (2007). *Lutimonas vermicola* gen. nov., sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae isolated from the marine polychaete *Periserrula leucophryna*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:1679-1684.

A.1 Técnicas para el estudio de la captación de NH_4^+ y su efecto en la comunidad bacteriana

Isótopos estables en el estudio del ciclo del N

Los elementos pueden ocurrir en diversas formas, denominadas *isótopos* (Veuger, 2006), que difieren en el número de neutrones presentes en su núcleo. Algunos isótopos pueden estar sujetos a decaimiento radiactivo, proceso caracterizado por la descomposición espontánea del núcleo para generar núcleos de menor masa, partículas y energía. Existen tres tipos de decaimiento: α (núcleos de ^4_2He), β (electrones de alta velocidad) y γ (fotones de alta energía). Aquellos isótopos que no decaen radiactivamente se denominan estables (Brown *et al.*, 2002).

Un elemento puede tener dos o más isótopos estables en la biosfera. Uno de ellos será el más abundante (liviano) y el otro será “raro” (pesado). En el caso del N, el ^{14}N (o liviano) constituye el 99.6% y el ^{15}N (o pesado) el 0.4 % (Veuger, 2006). El N posee un isótopo radiactivo (^{13}N) pero como su vida media es de tan solo 10 min, resulta dificultosa su aplicación.

Los isótopos estables han sido utilizado para determinar el impacto antropogénico o estudiar cadenas tróficas en sistemas acuáticos (revisado en Veuger, 2006). En estos casos la estrategia implicó el análisis de la abundancia natural del isótopo raro (^{15}N) y la del más abundante (^{14}N). En este tipo de estudios la información relevante yace en pequeñas diferencias en la abundancia relativa del isótopo pesado, como consecuencia de la diferencia de su abundancia entre diferentes compartimentos de un sistema (Torres Dawdal *et al.*, 2006). Las diferencias son debidas al fraccionamiento isotópico que ocurre en reacciones dependientes de masa entre el isótopo pesado y el liviano. Dicho proceso surge como consecuencia del cambio en la composición isotópica de un elemento que se da por medio de un cambio de estado físico o de composición química. Esto hará que los recursos que se encuentren en el ambiente tengan cierta proporción de isótopos estables y éstos serán entonces asimilados de acuerdo a la misma (Hobson, 2005).

El uso de ^{15}N como trazador es central en el estudio de la biogeoquímica del N en ecosistemas acuáticos, en la fisiología de organismos marinos (Lipschultz, 2008) y también en estudios de ecología microbiana, como por ejemplo en interacciones entre el fitoplancton y el bacterioplancton (Bradley *et al.*, 2010). En este tipo de estudios se utiliza un sustrato altamente marcado en el isótopo pesado para posteriormente analizar su abundancia en varios componentes de un ambiente en particular. De esta manera se sigue su “rastreo” (*trace*) y se cuantifican flujos del mismo en los compartimentos analizados del sistema en estudio (Veuger, 2006).

Por lo general, para analizar las tasas de captación de un nutriente por la comunidad microplanctónica se realizan incubaciones en la que se utilizan filtros de fibra de vidrio GF/F

de tamaño de poro nominal 0.7 µm para retenerlo y determinar la concentración del nutriente en estudio (Kanda *et al.*, 1985). También se han empleado otras alternativas como filtros de Teflon o de plata. Posteriormente a la filtración, las muestras deben ser conservadas antes de ser analizadas para eso pueden conservarse desecadas, liofilizadas o congeladas (Lipschultz, 2008).

La abundancia de los isótopos es medida en un espectrómetro de masas de razón isotópica (*isotope ratio mass spectrometer*, IRMS), en el cual las muestras se pasan a estado gaseoso y las moléculas son separadas por diferencias en los pesos moleculares como consecuencia de la composición isotópica de la muestra (Lipschultz, 2008).

Hibridación *in situ* del ARNr (FISH)

La Hibridación *in vivo* fluorescente (*Fluorescence in vivo Hybridization*, FISH) es una técnica que se basa en el uso de sondas de oligonucleótidos fluorescentes específicas a secuencias diana presentes en el ARN ribosomal bacteriano. La hibridación de la sonda con los ribosomas hace posible la detección de las bacterias mediante microscopía de fluorescencia, ya que estas aparecen teñidas por el fluorocromo. Esto permite cuantificar las células teñidas con la sonda en relación al número total de células bacterianas obtenido de la tinción con DAPI (4, 6-diamino-2-fenilindol).

A través de la hibridación *in situ* ha sido posible la identificación y cuantificación de microorganismos en su propio hábitat (Amann *et al.*, 1995). El análisis por hibridación a nivel celular (*single-cell level*) de microorganismos no cultivables permite conocer además de su abundancia, su morfología y distribución espacial *in situ* (Poulsen *et al.*, 1993). La hibridación *in situ* del ARNr empleando sondas de oligonucleótidos derivadas del ARNr conjugadas a fluorocromos (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) ha sido aplicada en bacterias oxidantes del amonio epífitas en plantas de lagos en Holanda (Coci, 2007) o para bacterias *anammox* en un lago estratificado en Alemania (Hamersley *et al.*, 2009).

CARD- FISH

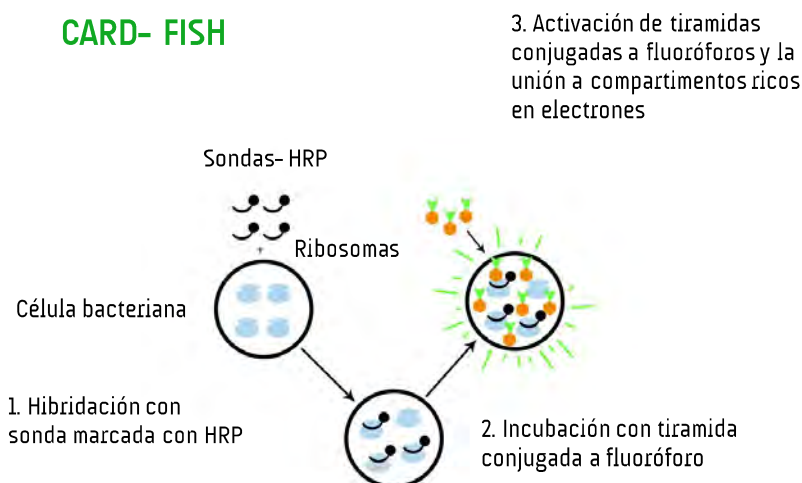


Figura. A1. Diagrama de los pasos básicos para la hibridación *in situ*. La muestra es primero fijada para estabilizar a las células y permeabilizar a las membranas. Luego se agrega la sonda de oligonucleótidos marcada para que se hibride con su molécula diana (ARNr) y el exceso de sonda es eliminado por lavado. Por último, se procede a la identificación individual de las células y a su cuantificación por microscopia de epifluorescencia (Tomado del sitio arb-silva.de)

En esta tesis, se empleó la técnica de *FISH* con sondas marcadas con peroxidasa y la amplificación de la señal mediante tiramidas (Fig. 4). En este proceso denominado “deposición catalizada de reporteros” (*CARD*), la sonda en lugar de estar unida directamente al fluorocromo está acoplada a la enzima peroxidasa del rábano picante (*horseradish peroxidase*, *HRP*). Al agregarle un sustrato fluorescente a la peroxidasa, es posible revelar la hibridación con la sonda. Los sustratos más comunes son las tiramidas conjugadas a fluoróforos y los haptenos para su reconocimiento por anticuerpos (Hopman *et al.*, 1998). Parte del conjugado de las tiramidas consiste en un anillo fenólico, al cual luego de la activación por radicales libres (i.e: radicales hidroxilo) se une covalentemente a los residuos de tirosina de las proteínas y así se fija la señal en las células. La reacción de *CARD* se utiliza para aumentar la señal que se obtiene con *FISH*, obteniéndose una señal suficiente y apropiada para la detección de bacterias de bajo contenido de ARNr (*CARD-FISH*; Pernthaler *et al.*, 2002).

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Los métodos moleculares independientes de cultivo constituyen una aproximación frecuente para la caracterización de la composición de comunidades microbianas (Blackwood *et al.*, 2007). Los mismos están basados en la heterogeneidad de un gen específico que posea algún atributo filogenético. En general, se ha utilizado al gen de la subunidad 16S del ARNr (Abdo *et al.*, 2006) que forma parte de la maquinaria de síntesis proteica celular y que posee atributos filogenéticos (Woese y Fox, 1977).

Las técnicas de *fingerprinting* microbianas tienen como objetivo la visualización rápida de ensamblajes microbianos, constituyendo una herramienta para determinar diferencias en la composición de los mismos (Hewson y Fuhrman, 2006). Estas técnicas se basan en que cada comunidad posee un patrón específico “huella” que está determinado por la composición de especies microbianas presentes. Entre las técnicas de *fingerprinting* más utilizadas se encuentran *DGGE* (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), *T-RFLP* y *ARISA* (*Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis*). La comparación de los *fingerprints* (huellas) se basa en la estimación precisa de la longitud (*T-RFLP* o *ARISA*) o de la secuencia en el caso del *DGGE*, de todos los fragmentos de ADN amplificados. Cada fragmento corresponderá a una Unidad Taxonómica Operativa (OTU) (Hewson y Fuhman, 2006).

La técnica de *T-RFLP* fue primeramente desarrollada por Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 1997). Se realiza por medio de una *PCR* que, en el caso del *T-RFLP*, utiliza *primers* marcados con uno o dos fluoróforos en sus extremos terminales. La mezcla resultante de amplicones es luego digerida con una o más enzimas de restricción y los productos de digestión marcados (*T-RF*) se analizan con un secuenciador para determinar sus tamaños y abundancias relativas. El patrón de *T-RFs* está compuesto por fragmentos de ADN con longitudes únicas que reflejan diferencias en sus secuencias génicas (polimorfismos), y por lo tanto, en poblaciones de microorganismos filogenéticamente diferentes (Schütte *et al.*, 2008). Una vez obtenidos los *T-RFs*, éstos pueden utilizarse para predecir a qué especie conocida corresponden. Por ende, la técnica de *T-RFLP* puede potencialmente identificar organismos específicos de una comunidad teniendo en cuenta la longitud de sus *T-RFs* (Kent *et al.*, 2003). Si bien un mismo *T-RF* podría estar asociado a múltiples especies bacterianas, la digestión con múltiples enzimas incrementa la precisión de la afiliación filogenética resultante (Dunbar *et al.*, 2001).

Como ventajas de esta técnica se destaca la obtención de mucha información y que su interpretación es más completa que la que pueden proveer las técnicas de *fingerprinting* dependientes de cultivo (Rappe y Giovannoni, 2003). El *T-RFLP* ha sido empleado con éxito en el análisis de comunidades utilizando a la subunidad del 16S ARNr para el dominio Eubacteria (Thies *et al.*, 2007 entre otros) y Arquea (Leybo *et al.*, 2006) o para la subunidad 18S de hongos (Genney *et al.*, 2006) o de fitoplancton (Vigil *et al.*, 2009). También se han empleado genes funcionales como el gen para la oxidación del metano (Mohanty *et al.*, 2006) o para la fijación de N₂ (Tan *et al.*, 2003), entre otros. Sin embargo, la técnica se ha utilizado con mayor

frecuencia para la amplificación del gen para la subunidad menor (16S o 18S) del ribosoma a partir de ADN genómico de la comunidad total (Schütte *et al.*, 2008).

Se han desarrollado varios programas informáticos de acceso libre como *MiCA* (Shyu *et al.*, 2007), *PAT* (Kent *et al.*, 2003), *TRAMP* (Fitzjohn y Dickie, 2007) y *T-REX* (Culman *et al.*, 2009) con el objetivo de referenciar los perfiles del *T-RFLP* con bases de secuencias y así asignarle una afiliación filogenética a los mismos. En particular, en *PAT* (*Phylogenetic Assignment Tool*) la tarea de asignarle la afiliación filogenética se hace de manera automatizada con el perfil de *T-RFs* obtenidos a partir de digestiones múltiples. El uso de múltiples digestiones aumenta la especificidad de la inferencia filogenética al aumentar los perfiles de *T-RFLP* y la automatización torna a la tarea más eficiente a la hora de analizar comunidades complejas. El análisis concomitante de *PAT* con una biblioteca de la subunidad 16S del ARNr construida a partir del ADN genómico de la comunidad bacteriana de un lago húmico probó la alta efectividad de este programa a la hora de asignarle a los *T-RF* una afiliación filogenética (Kent *et al.*, 2003).

A.2 Consideraciones experimentales

Las ecuaciones para calcular las tasas de captación de NH_4^+ utilizadas en el presente trabajo fueron desarrolladas por Dugdale y Wilkerson (1986) y han sido empleadas en diversos sistemas acuáticos para calcular las tasas de captación de compuestos nitrogenados, tanto inorgánicos como orgánicos (Glibert *et al.*, 1991; Bronk y Glibert, 1993; Fernández *et al.*, 2009). Para calcular las tasas de captación *in situ*, es recomendable agregar una concentración de trazador que ronde 10% de la concentración ambiental del nutriente en estudio (Dugdale y Wilkerson, 1986). Por el contrario, si la concentración de trazador fue superior a 10% debido a que la concentración ambiental del nutriente está por debajo del límite de detección de la técnica o por desconocer de antemano la concentración ambiental, se considerarán tasas potenciales. Para saberlo, se calcula el porcentaje de enriquecimiento (R_o) obtenido durante las incubaciones. De acuerdo a Fernández *et al.* (2009), si ese porcentaje no supera el 50%, se considera que las tasas de captación calculadas son reales. Cuando el porcentaje supera el 50%, se considera que esas tasas son potenciales. Es decir que esos valores indican la capacidad que tiene la comunidad para captar al NH_4^+ , si existe en el medio (Fernández, C., com. pers.). El valor de R_o para los experimentos de la zona Sur (sección 4.3.1) y los de la sección 4.3.2 (ambas zonas) fueron cercanos a 100%. Esto fue debido a que la concentración de NH_4^+ ambiental estuvo por debajo del límite de detección de la técnica empleada (0.1 μM ; Koroleff, 1970). Por lo tanto, en estos casos las tasas de captación de NH_4^+ fueron consideradas como potenciales. Por el contrario, para la zona Norte en los experimentos del experimento

4.3.1, el valor de R_o calculado en esos experimentos fue 3%, indicando que las tasas pueden considerarse reales.

Otro factor a considerar en los valores de las tasas obtenidos en este trabajo es que no se corrigieron por el efecto de dilución isotópica (Glibert *et al.*, 1982). La dilución isotópica hace referencia a que durante la incubación, además del proceso de captación de NH_4^+ , puede ocurrir el proceso de regeneración de NH_4^+ . Esto genera que se recicle el $^{14}\text{NH}_4^+$ mineralizado (no marcado) durante las incubaciones con ^{15}N . Es decir que el pool de $^{14}\text{NH}_4^+$ aumenta y por ende “diluye” la cantidad de trazador (^{15}N) en el sistema provocando una subestimación de las tasas de captación de NH_4^+ (Glibert *et al.*, 1982).

En un principio, Dugdale y Wilkerson (1986) propusieron que en incubaciones de hasta 6 horas el efecto de la regeneración en la dilución isotópica podía llegar a ser despreciable y no tenía porqué considerarse. Sin embargo, en la actualidad existen trabajos que indican que en un lapso de 4 horas de incubación las tasas de regeneración de NH_4^+ , por ende el efecto de la dilución isotópica pueden ser significativas y afectar a los valores de las tasas de captación de NH_4^+ (Fouilland *et al.*, 2007). En esta tesis no se determinó si hubo “dilución isotópica”, por lo que las tasas de captación de NH_4^+ podrían estar subestimadas.

El abordaje para calcular las tasas de captación de ^{15}N en sistemas acuáticos por diferentes comunidades ha sido diverso. Para poder diferenciar la captación entre el fitoplancton y el bacterioplancton se han utilizado: antibióticos (Kirchman, 2000; Fouilland *et al.*, 2007; Trottet *et al.*, 2011), incubaciones en la oscuridad (Frey, 2010), fraccionamiento por talla por filtración (Parker, 2005), análisis de D-aminoácidos bacterianos (Veuger, 2006) y también por citometría de flujo (Lipzschult, 1995; Bradley *et al.*, 2010). Las estrategias utilizadas más ampliamente son el uso de antibióticos, separación por talla (utilizada en esta tesis) e incubación en oscuridad.

El uso de antibióticos ha tenido varias críticas por su falta de eficiencia y especificidad (Oremland y Capone, 1988). Por lo que es necesario un estudio previo para saber cuáles son los mejores inhibidores de acuerdo al sistema en estudio (Trottet *et al.*, 2011) o el tiempo de incubación (Fouilland *et al.*, 2007). Se ha criticado también que el uso de antibióticos puede interferir en las interacciones entre el bacterioplancton y el fitoplancton al eliminar la dependencia por C o en la competencia por nutrientes (Sherr *et al.*, 1986).

Diversos estudios no hallaron diferencias significativas entre las incubaciones con luz y oscuridad, constatándose que el porcentaje de las tasas en oscuridad pueden llegar a representar desde 10 a 100% de las tasas en presencia de luz. Estas diferencias pueden deberse al estado fisiológico y a las especies de la comunidad fitoplanctónica en estudio, como también a la fuente de N (Mulholland y Lomas, 2008). Cabe resaltar además que a diferencia de los procesos fotosintéticos, la captación de N no cesa en ausencia de luz. La captación de N en oscuridad podría depender de fotosintatos acumulados durante las condiciones lumínicas y luego ser empleados en oscuridad (Falkowsky y Raven, 2007).

Por lo anteriormente expuesto se consideró que el fraccionamiento por talla era la mejor opción para alcanzar el objetivo planteado en esta tesis. Sin embargo, el fraccionamiento por talla por filtración uno de los grandes problemas es que la mayoría de los estudios realizados con ^{15}N han empleado filtros GF/F (0.7 μm tamaño de malla) y el promedio de porcentaje de retención de bacterias en los filtros oscila entre 40 y 75% (Lee y Fuhrman, 1987; Berg *et al.*, 2001) e incluso Kirchman (2000) reportó hasta 93% de retención de esta comunidad. Así, esta aproximación no ha resultado eficiente a la hora de diferenciar la captación del fitoplancton del bacterioplancton. Otros de los problemas que se han discutido es que la existencia de especies coloniales puede generar artefactos ya que las mismas se rompen por la filtración y esto puede alterar su fisiología (Frey, 2010) o la liberación al medio de su contenido celular (Fuhrman y Bell, 1985). Además, los sólidos en suspensión generan problemas ya que colmatan rápidamente los filtros y pueden retener organismos adheridos a los mismos, entre ellos bacterias y/o fitoplancton (Veuger, 2006). Otra de las dificultades es que resulta difícil separar la fracción del picofitoplancton del bacterioplancton a través de un filtro GF/F (Bronk *et al.*, 2007).

En esta tesis se utilizaron dos tipos de filtros de fibra de vidrio de tamaño de malla diferente (1.2 y 0.5 μm). Al utilizarse el filtro GF/C se comprobó que no hubo diferencias significativas en la abundancia bacteriana de los tiempos iniciales de ambos tratamientos (ambas zonas). Esto indicaría que la aproximación de pre-filtrar con la malla de 1.2 μm no afectó la abundancia bacteriana existente en el agua sin filtrar. Cuando se empleó el filtro de fibra de vidrio de 0.5 μm no se observó en el filtrado la presencia de bacterioplancton por microscopia de epifluorescencia. Esto indicaría que el método para retener la biomasa del bacterioplancton fue eficiente y no hubo pérdidas de biomasa (N orgánico particulado) que hicieran subestimar los valores de las tasas de captación de NH_4^+ calculadas para dicha fracción.

Cuando se realizó el experimento para estudiar la interacción entre el bacterioplancton y el fitoplancton, la observación a través de microscopia de fluorescencia reveló la presencia de microorganismos unicelulares con autofluorescencia. Si bien algunas cianobacterias unicelulares pueden tener en promedio un diámetro de 0.8 μm , el bacterioplancton heterótrofo suele ser de menor talla (Kirchman, 2000) lo cual haría suponer *a priori* que el empleo de filtros GF/C no lograría una buena separación entre ambas comunidades. Sin embargo, se constató que los valores de fluorescencia *in vivo* en el tratamiento PF estaban por debajo del límite de detección, lo que indica que la estrategia empleada (separación por talla) permitió diferenciar efectivamente ambas comunidades planctónicas.

A3. Microfotografías de bacterias hibridadas con la sonda (HGC69) para Actinobacterias y miembros del fitoplancton eucariota presente en el momento de realizar los experimentos (secc. 4.3.2) en la Laguna de Rocha.

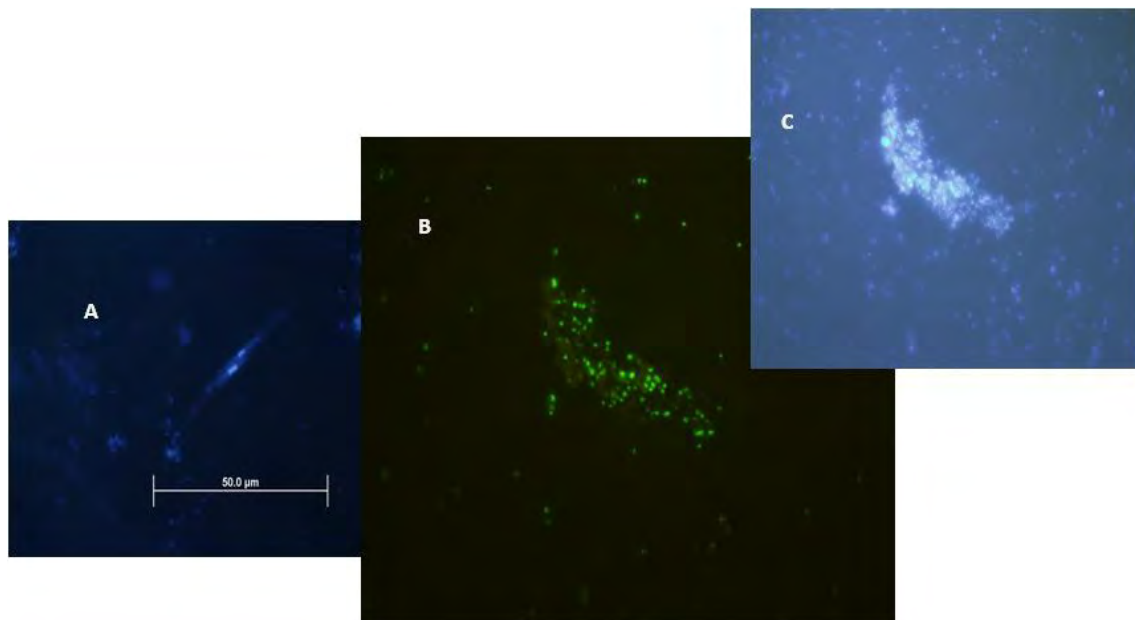


Figura 2A. Microfotografía (100X) de dos diatomeas (flecha) del género *Nitzschia* o *Cylindrotheca* spp. en el momento de realizar los experimentos. (B). Microfotografías (100X) de las bacterias hibridadas con la sonda HGC69 del tratamiento CT en la zona Norte y (C) y de la misma muestra teñida con DAPI