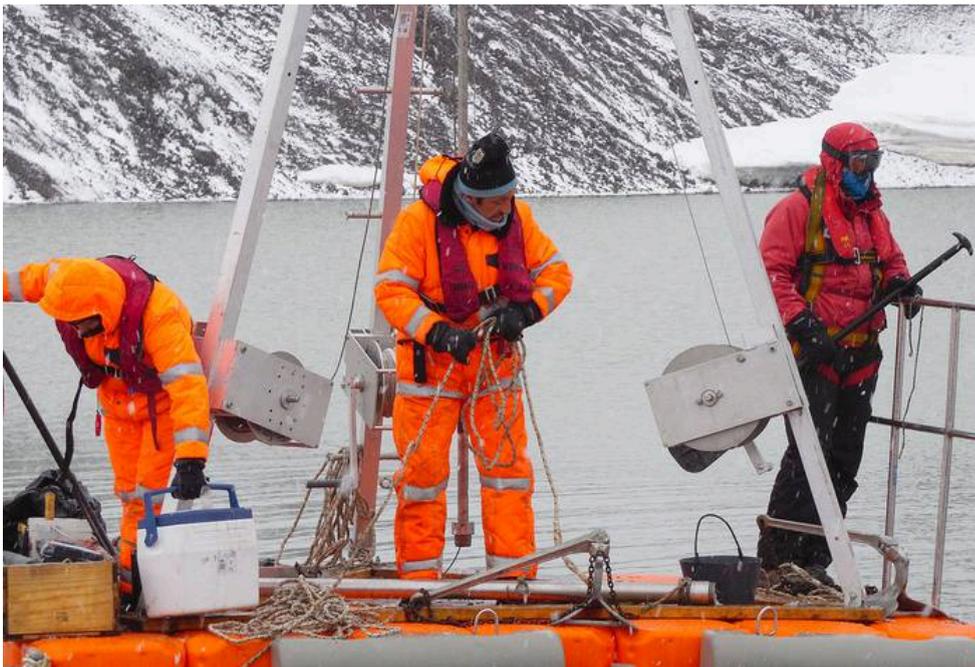


Diversidad y actividad bacteriana del lago antártico Uruguay en la Península Fildes



Tesina de Grado - Licenciatura en Ciencias Biológicas.
Departamento de Microbiología, Laboratorio de Ecología Microbiana
Acuática, IIBCE.

Lucía Leites

Tutora: Florencia Bertoglio

Co-tutora: Claudia Piccini

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi familia por apoyarme cuando decidí estudiar biología y acompañarme en todo momento.

También me gustaría agradecer a mis amigas de toda la vida y a los que hice a lo largo de la carrera por acompañarme en este proceso.

A mis tutoras Claudia y Florencia que hicieron posible esta tesis y me motivaron a seguir adelante en todo momento.

A todos los integrantes del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y en especial al Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática en el que hice mi tesis.

A Andrés di Paolo por su apoyo en la parte de microscopía que fue indispensable para la realización de este trabajo .

Finalmente, me gustaría agradecer a Cecilia y Gissell por aceptar ser parte del tribunal y por sus comentarios que enriquecieron mucho este trabajo.

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	4
2.1. Antártida Marítima	4
2.2 Bucle microbiano en lagos Antárticos	8
2.3 Estimación de la respiración bacteriana	9
2.4 Estudio de la diversidad microbiana	10
3 Objetivos	12
4 Materiales y métodos	12
4.1 Sitio de estudio y toma de muestra	12
4.2 Análisis del bacterioplancton del lago Uruguay	14
4.2.1 Abundancia bacteriana	14
4.2.2 Actividad bacteriana	16
4.2.3 Diversidad bacteriana	16
4.3 Efecto de las distintas fuentes de carbono sobre la abundancia bacteriana	18
4.4 Análisis estadísticos	19
5. Resultados	20
5.1 Abundancia bacteriana	20
5.2 Actividad bacteriana	22
5.3 Diversidad bacteriana	23
5.4 Experimento con fuentes de carbono	27
6 Discusión	29
6.1 Abundancia bacteriana	30
6.2 Actividad bacteriana	34
6.3 Diversidad bacteriana	36
6.4 Experimento con diversas fuentes de carbono	37
6.5 Conclusiones	39
Bibliografía	40

1. Resumen

La Península Fildes ubicada en la Antártida Marítima alberga numerosos lagos de origen glaciar, entre ellos el lago Uruguay. En estos lagos las duras condiciones climáticas suponen fuertes controles a las comunidades que los habitan dando como resultado cadenas tróficas relativamente cortas dominadas por microorganismos en las que el bucle microbiano es la forma predominante de transferencia de materia y energía. Estos microorganismos son muy sensibles a los cambios químicos y físicos que ocurren en el lago, y por lo tanto también a los que ocurren en su cuenca como por ejemplo el aumento de la escorrentía por el retroceso glaciar. El objetivo de este estudio es generar información acerca de las comunidades de bacterioplancton presentes en el agua superficial del lago Uruguay y su relación con las distintas fuentes de carbono presentes en su cuenca. A partir de un muestreo realizado en marzo de 2019 en el que se colectaron muestras de agua superficial del lago Uruguay, se estimó la abundancia del bacterioplancton, su diversidad a partir del gen ribosomal 16S, su actividad bacteriana mediante la respiración y finalmente se llevó a cabo un experimento en el que se incubó agua del lago con fuentes de carbono de distinto origen. Como principales resultados se obtuvo que la abundancia bacteriana se mantuvo en el orden de 10^5 y que gran parte de las bacterias se encontraban adheridas a partículas de materia orgánica. Además, se estimó que el 13% de la comunidad bacteriana se encontraba activa y los filos *Proteobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, *Actinobacteriota* y *Bacteroidota*, en conjunto constituyeron alrededor de un 75 % de la abundancia total. Las muestras presentaron una gran dominancia ya que los 10 ASVs (variantes de la secuencia del amplicón) más abundantes representaron alrededor del 25% de la abundancia total de los ASVs. Los experimentos empleando distintas fuentes de materia orgánica mostraron que aquella proveniente de musgos y líquenes presentes en la cuenca estimuló significativamente el crecimiento bacteriano, mientras que la proveniente de agua del glaciar no provocó aumento significativo de la abundancia. Este estudio representó un primer acercamiento para entender las dinámicas de actividad y crecimiento del bacterioplancton en agua superficial del lago antártico Uruguay. Dada la fuerte incidencia que el cambio climático está teniendo en esa zona, se espera ocurran variaciones ambientales en la cuenca del lago de los cuales el bacterioplancton podría dar cuenta, aumentando así el ya fuerte interés por estudiarlo.

2. Introducción

2.1. Antártida Marítima

La Antártida es el continente más remoto del planeta, a menudo descrito como el último entorno prístino en la Tierra. Su aislamiento geográfico, condiciones climáticas extremas y su limitada accesibilidad han limitado el impacto directo de las actividades humanas (Peck et al., 2006). No obstante, a partir del primer desembarco documentado en 1890 la presencia humana en el continente ha aumentado en gran magnitud, con una transición de la explotación económica (caza de focas, ballenas y pesca) y la exploración heroica, a la investigación científica y el turismo (Bjørn y Headland, 2008; Schiffer, 2013). Según la Asociación Internacional de Operadores Turísticos de la Antártida (IAATO, 2020) aproximadamente 74.000 turistas visitaron la Antártida en la temporada 2019-2020, un aumento del 32 % con respecto a la temporada 2018-2019, y más del doble que una década atrás. Tanto las actividades turísticas como las científicas en la Antártida han causado impactos ambientales en el aire, agua (dulce y marina) y la calidad del suelo incluyendo nieve y hielo, debido al movimiento de personas en los medios terrestres y marinos, la gestión y eliminación de residuos y aguas residuales (Tort et al., 2017).

Por su diversidad climática y geográfica el continente Antártico puede dividirse en 3 regiones, la Antártida Continental, la Región subantártica y la Antártida Marítima, que comprende la porción septentrional de la península antártica y los archipiélagos de las Shetland del Sur, Orcadas del Sur y Sandwich del Sur. La Antártida Marítima difiere de la región continental ya que posee un mayor número de precipitaciones con valores de entre 400 y 600 mm anuales, y temperaturas más altas con valores medios de más de 1°C en verano, lo que ha permitido el desarrollo de hábitats con mayor humedad y vegetación en ella (Serrano Cañadas, 2001; Bently, 2009). Es una de las regiones del mundo en la que se ha evidenciado de forma más drástica el efecto del cambio climático (Quayle, 2002). Por ej. en la última mitad del siglo pasado se registró un incremento de la temperatura promedio anual de unos 3,4 grados Celsius. Un

aumento de la temperatura de tal magnitud puede dar lugar a temporadas de deshielo más largas, mayor flujo de nutrientes hacia los lagos, incrementos significativos de la temperatura del agua y cambios en la estratificación de los lagos y vegetación de las cuencas (Lyons et al., 2006; Vega et al., 2021). Es probable que con el tiempo estos cambios repercutan en las comunidades que habitan los lagos generando cambios biológicos, como la persistencia de la producción de fitoplancton, como consecuencia de una temporada de crecimiento más larga (Quayle, 2002).

La Isla Rey Jorge es la más grande de las Islas Shetland del Sur, archipiélago ubicado al noreste de la Península Antártica (figura 1.a). Se caracteriza por poseer una gran diversidad biológica y fácil accesibilidad que ha permitido la presencia humana en el Archipiélago (Serrano Cañadas, 2001). Durante el verano se generan áreas libres de hielo principalmente en la costa sur de la isla. Allí se encuentran muchas de las bases científicas antárticas, situándose la mayoría en la Península Fildes (PF), al sureste de la isla, la cual funciona como un centro logístico con un elevado tránsito de personas que la visitan. En ella distintos intereses que van desde la investigación, la conservación de la naturaleza, geología e historia del sitio, las operaciones de las bases científicas, la logística del transporte y el turismo, se superponen.

La PF (62° 11' S, 58° 58' W) es un área de 38 km² siendo el área sin cobertura de hielo permanente más extensa de la isla (figura 1.b). Fue categorizada como Área Antártica Especialmente Protegida (ASPA, N°125) por el Comité del Tratado Antártico por su interés biológico y en paleobiología. Presenta líquenes y musgos a lo largo de su superficie y alberga numerosos lagos de origen glaciar, originados durante el Holoceno mediante el retroceso del Glaciar Collins, el cual se encuentra en el extremo noreste de la península (Carrizo et al., 2019). Posee un clima marítimo, durante el verano la temperatura oscila entre 2 y 3 °C mientras que en invierno la media desciende a -7°C (Michael et al., 2012). Actualmente es una de las regiones en la que el calentamiento y la retracción del hielo avanzan más rápido en el mundo (Quayle, 2002). Muchos de sus lagos se encuentran adyacentes a las bases de investigación, como es el caso del lago Uruguay, el cual suministra agua a la Base Científica Antártica Artigas (BCAA).

Parte de la superficie de los lagos se congela durante el otoño (~ 1 m) y permanece así durante todo el invierno, descongelándose durante el verano (Schmidt et al., 1990; Izaguirre et al., 2020).

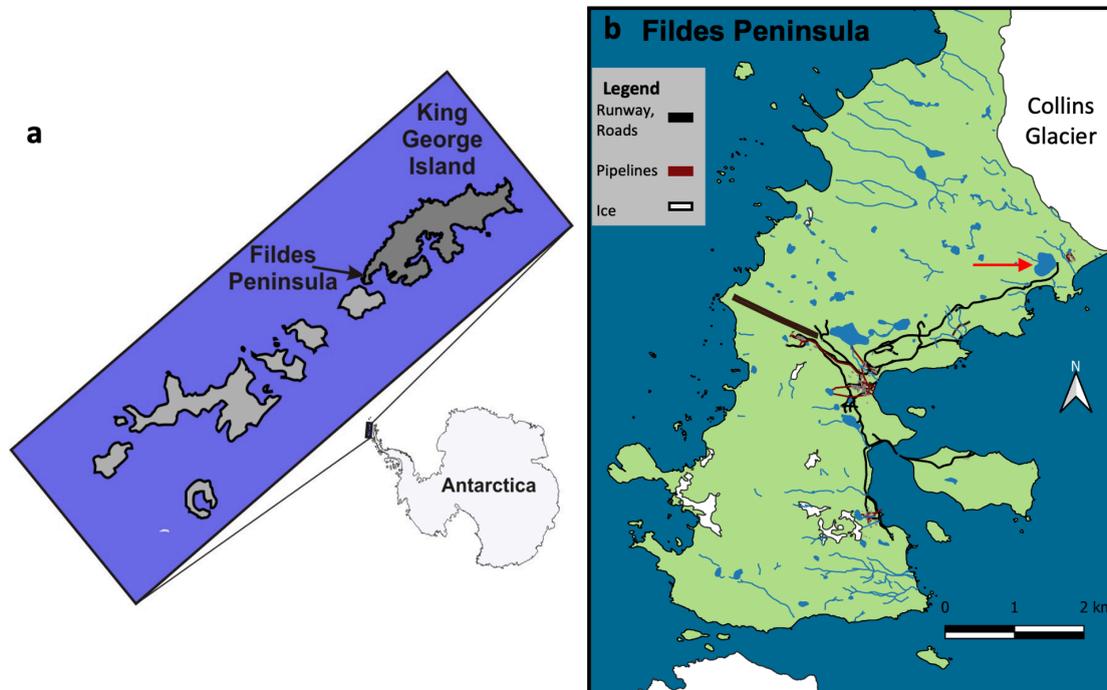


Figura 1. a) Localización de la Isla Rey Jorge (King George Island) y de la Península Fildes. b) Mapa de la Península Fildes con una flecha roja señalando al lago Uruguay.

Debido a que la superficie de los lagos ubicados en la Antártida marítima permanece la mayor parte del año congelada, estos lagos se caracterizan por alto grado de variabilidad intra e interanual en la morfometría, propiedades físicas, químicas, biológicas de sus masas de agua y en el grado de interacción con su entorno (Vincent, 2008). La recesión glacial, la capa de nieve y hielo, y el agua derretida que ingresa en los meses de verano son factores importantes que controlan dichos sistemas acuáticos en distintas escalas de tiempo. En general, estos lagos reciben pocos aportes de nutrientes y de materia orgánica desde sus cuencas, que provienen principalmente del deshielo de la nieve local y de los glaciares, a excepción de aquellos lagos cercanos a colonias de aves o mamíferos que pueden llegar a ser mesotróficos e hipertróficos (Izaguirre et al., 1998). En estos lagos, la dinámica del fitoplancton responde principalmente a estrategias de invernada, como la mixotrofia o formas en etapa de reposo,

aunque en verano reciben aportes alóctonos de materia orgánica e inorgánica que pueden sustentar la productividad del lago (Laybourn-Parry, 2002).

2.2 Bucle microbiano en lagos Antárticos

La actividad bacteriana en los ecosistemas acuáticos, como la respiración y la producción de biomasa, depende del suministro de carbono y energía proveniente principalmente de la MOD (materia orgánica disuelta). La producción bacteriana es la síntesis de biomasa bacteriana a partir de precursores orgánicos y de nutrientes inorgánicos. La respiración es el proceso por el cual un substrato es oxidado completamente a CO_2 y agua, con participación de una cadena de electrones ubicada en la membrana plasmática, en la cual el aceptor final es el oxígeno molecular u otro compuesto inorgánico. Dado que el bacterioplancton domina la cadena trófica en estos sistemas acuáticos antárticos dichas funciones ecosistémicas tienen una mayor influencia en el funcionamiento del sistema en relación con los lagos templados. Sin embargo, no toda la comunidad del bacterioplancton se encuentra activa en un momento determinado y poco es sabido acerca de cómo las condiciones ambientales extremas en estos ecosistemas repercuten sobre su actividad (Ducklow, 2000).

La composición y concentración de la MOD es uno de los principales factores que regulan a las comunidades microbianas acuáticas en términos de diversidad y actividad (Rossello-Mora et al., 1999; Findlay et al., 2003). Comprender cómo las variaciones en la MOD repercuten sobre la actividad del bacterioplancton y por lo tanto sobre el ciclo del carbono en un sistema como el lago Uruguay, que se encuentra afectado simultáneamente por la pronunciada variabilidad climática y la creciente variabilidad ambiental debida a las actividades humanas, resulta fundamental.

Debido a que las condiciones ambientales polares imponen serias restricciones a la vida, los lagos Antárticos poseen redes tróficas simplificadas dominadas por microorganismos, incluyendo virus, bacterias, fitoplancton, protozoos, y poblaciones de metazooplancton como copépodos, anostráceos y rotíferos (Rochera et al., 2011). Esto implica que la principal ruta de transferencia de

biomasa es mediada por el bacterioplancton a través del bucle microbiano, mediante el cual la incorporación de la MOD es transferida a niveles tróficos superiores gracias a la depredación (Azam et al., 1983). Debido a dicha simplicidad en su trama trófica y sus características físicas y químicas, estos lagos son considerados centinelas de cambio ambiental reflejándose por ejemplo en una sensibilidad a los impactos ambientales externos como aumentos en la cantidad de luz y nutrientes por parte de sus comunidades microbianas (Quayle et al., 2002; Vincent et al., 2008). Un estudio previo llevado a cabo en el lago Uruguay por Morel et al., 2015, demostró variaciones en la abundancia del bacterioplancton cultivable en respuesta a cambios fisicoquímicos del agua (temperatura, conductividad y pH). Otro estudio más reciente, que empleó un enfoque paleolimnológico y un método molecular para estimar diversidad bacteriana independiente de cultivo como el que se va a emplear en el presente proyecto, demostró que el retroceso del Glaciar Collins ocurrido en el último siglo provocó una disminución de la riqueza bacteriana y un cambio en la composición de las comunidades bacterianas que perdura hasta la actualidad (García-Rodríguez et al., 2021). Estos autores proponen que dichos cambios ocurrieron como consecuencia de un aumento de la escorrentía (causado por el derretimiento del Glaciar) y el consiguiente ingreso de materia orgánica alóctona al lago, configurando un posible proceso de eutrofización del lago Uruguay. Más recientemente, un estudio que exploró la diversidad de comunidades microbianas en siete lagos de la PF, encontró que las mayores variaciones en la diversidad fueron estacionales relacionándose con la desaparición de la cobertura del hielo durante el verano, lo que podría explicarse asimismo por aumentos de la escorrentía durante el período sin hielo (Bertoglio, et al., 2023).

2.3 Estimación de la respiración bacteriana

Con frecuencia se requiere la enumeración de bacterias metabólicamente activas en muestras ambientales para realizar distintos tipos de análisis como estimar la productividad del sistema, el recambio de biomasa, entre otros. Para este tipo de análisis los procedimientos de recuento en placa no son de gran utilidad para observar directamente células activas *in situ*, especialmente cuando

las células están adheridas a partículas suspendidas u otras superficies sólidas (Rodríguez et al.,1992). Décadas atrás del Giorgio y Scarborough recopilaron evidencia a través de varias fuentes y metodologías de estudio, llegando a la conclusión de que el recuento total de bacterioplancton marino y de agua dulce está dominado por células inactivas (del Giorgio y Scarborough, 1995). Los factores globales que limitan las tasas de crecimiento bacteriano a nivel unicelular y el rendimiento de biomasa que se relacionan directamente con el metabolismo bacteriano son la temperatura y el suministro de sustratos y nutrientes. Estos son los factores “de abajo hacia arriba”, mientras que la eliminación de biomasa por parte de los depredadores y los virus son los factores potenciales “de arriba hacia abajo” que controlan la biomasa a nivel de poblaciones y comunidades (Pace, 1999).

La respiración bacteriana puede ser utilizada como un indicador de actividad metabólica. Se puede estimar ya sea mediante la medición de la concentración de oxígeno usando sensores (nivel poblacional) o a nivel celular mediante técnicas que emplean colorantes fluorescentes (ej. el colorante redox CTC (5-ciano-2,3-ditolil cloruro de tetrazolio)) que al ser incorporados a células con una cadena de transporte de electrones activa se reduce intracelularmente formando un precipitado insoluble y fluorescente que se puede detectar y cuantificar por microscopía de epifluorescencia y/o confocal (Rodríguez et al.,1992).

La eficiencia de crecimiento bacteriano es un indicador que puede resultar muy útil para describir las dinámicas de estas poblaciones, es un estimador de la cantidad de biomasa fijada. Se obtiene al realizar la relación entre la producción secundaria bacteriana y el carbono orgánico asimilado por las bacterias. (del Giorgio y Cole, 1998).

2.4 Estudio de la diversidad microbiana

La diversidad microbiana se puede definir como la variedad de diferentes tipos de bacterias, arqueas, protistas y hongos microscópicos que habitan la biosfera.

Estos organismos definen los límites de la vida y crean condiciones propicias para la supervivencia y evolución de otros seres vivos (Dunlap, 2001).

El bacterioplancton se encuentra compuesto por miembros de los dominios Bacteria y Archaea que se encuentran en la columna de agua, y constituye la gran mayoría de la diversidad taxonómica en los océanos mundiales, así como la de los ambientes acuáticos de agua dulce (Ducklow, 2019).

Las técnicas de biología molecular que identifican microorganismos a través de marcadores moleculares son actualmente las más utilizadas para analizar su diversidad, incluyendo la estructura de las comunidades bacterianas y su riqueza, sin la necesidad de cultivos puros y permiten la detección de organismos no cultivables, por lo que son una gran herramienta en la microbiología ambiental (Cortés-López, 2021).

El marcador más empleado para este tipo de estudios es el gen que codifica para el ARN ribosomal de la subunidad menor del ribosoma bacteriano (ARNr 16S), que por ser parte de la síntesis proteica presenta regiones de su secuencia conservadas y por tanto comunes a la mayoría de los organismos, así como regiones variables e hipervariables que permiten realizar estudios filogenéticos detallados (Woese, 1987). Al ser comúnmente utilizado como marcador taxonómico existen bases de datos que contienen un gran número de secuencias, por ejemplo, la base de datos SILVA en su versión 138.1 (actualización hasta la fecha más reciente) posee más de 9 millones de secuencias de ARN ribosomal. (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-1381/>)

Actualmente existen métodos capaces de detectar variantes de secuencias de amplicón (ASV) que pueden resolver diferencias entre secuencias de hasta un solo nucleótido en la región secuenciada. Esto implica grandes ventajas ya que se puede lograr una resolución más fina de la diversidad presente en la muestra (Callahan et al., 2017).

Explorar aspectos del bacterioplancton en lagos antárticos, como su abundancia, diversidad, actividad y preferencias en las fuentes de carbono, es fundamental debido a su gran sensibilidad a los cambios ambientales. Estudiar estas

características nos ayudará a comprender mejor cómo estas comunidades microbianas responden a los cambios que actualmente están ocurriendo en su entorno.

3 Objetivos

El objetivo de este estudio es generar información acerca de la comunidad del bacterioplancton del agua superficial del lago Uruguay y su relación con las distintas fuentes de carbono presentes en su entorno.

Objetivos específicos:

- Conocer la abundancia de bacterias presentes en agua superficial del lago Uruguay y la proporción que se encuentra activa.
- Describir la diversidad de bacterias presentes en el agua superficial del lago Uruguay.
- Determinar cuáles de las fuentes de carbono disponibles en la cuenca del lago estimulan el crecimiento del bacterioplancton.

Hipótesis: Debido a que los lagos antárticos suelen ser oligotróficos, cuentan con baja biomasa de productores primarios, sus tramas tróficas suelen ser cortas, y el bucle microbiano es su principal fuente de transferencia de biomasa y energía. El ingreso de materia alóctona característica de la cuenca generará una oferta de carbono que les permitirá a las poblaciones microbianas allí presentes aumentar su abundancia.

4 Materiales y métodos

4.1 Sitio de estudio y toma de muestra

El lago Uruguay ($62^{\circ}10'59.4''S$, $58^{\circ}54'31.6''W$) también conocido como lago Profundo, Ozore Gluboke (Rusia) y Tiefersee (Alemania) (figura 2), es un lago de origen glaciar que ocupa 69.781 m^2 de superficie (Carrizo et al., 2019). Se encuentra ubicado al noreste de la PF a 624 m del Glaciar Collins, y próximo a la Base Científica Artigas. Su profundidad máxima es de 14,7 m (Watcham et al., 2011). Por su ubicación en la PF se encuentra situado cerca de plataformas marinas y una playa formada durante el Holoceno tardío, por lo que recibe rocío marino (Carrizo et al., 2019). Durante el invierno se forma en él una capa de hielo de aproximadamente 1 m y en su cuenca no existen colonias de pingüinos ni de focas, lo que podría ser un potencial factor de eutrofización en esta zona (Schmidt et al. 1990).



Figura 2: lago Uruguay. Se observan los musgos que crecen a la orilla del lago (marrón) así como los líquenes que se encuentran más arriba de la orilla

Las muestras que se emplearon en este trabajo provienen de un muestreo realizado durante el mes de marzo de 2019 (fin del verano austral), en el que se tomó agua superficial del lago Uruguay (ver 4.2). Una vez tomadas las muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio de la base Antártica Artigas con el objetivo de realizar distintas aproximaciones experimentales.

4.2 Análisis del bacterioplancton del lago Uruguay

4.2.1 Abundancia bacteriana - se tomó una muestra de agua del lago en un bidón y se fraccionó en 6 frascos. Tres de esos frascos fueron fijados inmediatamente con paraformaldehído (PFA) (tres réplicas del control negativo), y el resto de los frascos fueron incubados del lago durante 120 horas. Con el fin de mantener a las muestras a la misma temperatura a la que se encontraba expuesto el lago la incubación se realizó fuera de la base, a la intemperie. Se tomaron muestras a tiempo 0, 15, 24, 48, 72 y 120 horas (tiempo final) (tres réplicas por tiempo). Además, a tiempo 0 y 120 horas se tomó una submuestra y se incubó con CTC (50mM) para determinar la actividad respiratoria al inicio y al final de la incubación. Las muestras obtenidas de cada tiempo de incubación fueron fijadas con PFA durante 1 hora y congeladas a -20 °C para su posterior procesamiento.

En el laboratorio de Microbiología del IIBCE se filtraron 1-2 ml de muestra de cada tratamiento por filtros de 0,2 μm con el objetivo de retener al bacterioplancton. Estos filtros fueron secados y teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a concentración 1 mg L⁻¹ preparado en PBS (solución salina tamponada con fosfato), durante 5 minutos en la oscuridad. Luego se enjuagaron con agua destilada durante 1 minuto en agitación y oscuridad, se secaron y montaron en un portaobjetos utilizando un medio de montaje anti-decoloración, ProLong™ Gold Antifade Mountant. El DAPI marca a la totalidad de las células fijadas en el filtro por ser un colorante con afinidad al ADN (Porter y Feig, 1980). Los filtros se analizaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus FV -300.

La estimación de la abundancia bacteriana se realizó utilizando la técnica descrita por Porter y Feig, (1980), que consta en realizar conteos de las células presentes en un gran número de campos de un área conocida del filtro al azar, para finalmente a partir del número de células contado, el volumen de agua filtrado, el área del filtro, y el área y número de campos, estimar la abundancia de bacterias (ver fórmula abajo). Debido a la tendencia que se observó de las bacterias a agregarse en acúmulos se realizó una distinción entre células libres, células en acúmulos y células totales. El conteo se realizó manualmente, contándose no menos de 1000 células por filtro.

$$\text{Abundancia} \quad = \quad \frac{\text{Bacterias contadas} \times \text{Área del filtro}}{\text{por ml} \quad \text{Campos} \times \text{Volumen filtrado} \times \text{Área de campos}}$$

4.2.2 Actividad bacteriana - Para determinar el número de células bacterianas con actividad respiratoria, se cuantificó la abundancia relativa de células que presentaron marca positiva con CTC en las muestras de tiempo inicial y final del experimento. El protocolo de tinción con CTC seguido fue tomado del trabajo de Kruk et al., 2017. Se incubaron 500 ml de las muestras extraídas a tiempo final e inicial con 50 ml de reactivo CTC 50 mM (Sigma) durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de PFA a una concentración final del 2%. La detección y cuantificación se realizó mediante microscopía confocal (Rodríguez et al., 1992), equipado con un láser de 488 nm emitiendo luz a 600 nm de manera de cuantificar las bacterias CTC positivas como consecuencia de la respiración. Se tomaron 20 fotos con el microscopio para cada réplica a tiempo inicial y final, a partir de las cuales se cuantificaron las bacterias totales (teñidas con DAPI) y las bacterias que presentaban superposición entre el DAPI y el CTC (activas). Como control negativo se utilizó una muestra de agua previamente fijada. Finalmente, se calculó la proporción de células activas respecto al total de las células, restándole la proporción obtenida en el control negativo.

4.2.3 Diversidad bacteriana- Se determinó la diversidad bacteriana del lago a través de una aproximación basada en *metabarcoding* del gen ARNr 16S (Meyer et al., 2008). Se filtraron 200 ml de muestra de agua del lago *in situ* y a tiempo final de incubación (120 h) a través de un filtro de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm el cual se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior extracción de ADN y análisis de la diversidad bacteriana.

Para la extracción de ADN en primer lugar se realizó la lisis celular de las muestras siguiendo el protocolo utilizado por Bertoglio et al., 2023, los filtros se colocaron en tubos de 2 ml conteniendo una solución de lisis compuesto por 1% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y EDTA, junto a esferas de cerámica de 1,4 mm de diámetro; y homogeneizadas en un equipo FastPrep durante 40 segundos a 6 ms^{-1} . Luego el lisado obtenido fue sujeto a purificación empleando un equipo "PurPrep 32 (MOLGENE)" basado en la tecnología de separación con esferas magnéticas. La concentración y calidad del ADN se confirmó mediante espectrofotometría (NanoDrop).

El ADN obtenido se empleó como molde para amplificar por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) la región V4 de la subunidad 16S del gen ARN ribosomal. El ciclado de la PCR se puso a punto a partir del empleado en Picazo et al., 2019 para muestras acuáticas de lagos antárticos. Consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 45°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos; y finalmente una extensión final a 72°C por 7 minutos. Para cada reacción de 25 μL se empleó: los *primers* 520F y 802R (0,2 μL de cada uno a 10 μM), 2,5 μL de buffer Taq, 0,2 μL de ADN Taq polimerasa (5U/ μL), 1,75 μL de cloruro de magnesio, 0,5 μL de dNTPs (10 mM), 0,5 μL de BSA (30 mM), 2 μL de ADN molde. La PCR se realizó por triplicado para cada muestra y su producto de amplificación se visualizó a través de una corrida electroforética en gel de agarosa. Finalmente al constatar que el ADN extraído fue de buena calidad y que el gen amplificado correspondió al gen ribosomal 16S de interés. Se juntaron en un *pool* las 3 amplificaciones y se secuenciaron en la plataforma de secuenciación masiva del IIBCE (IonTorrent S5).

A partir de los archivos de secuencias en formato FASTQ resultados de la secuenciación, se procedió con el análisis bioinformático mediante el algoritmo DADA2 (Callahan et al., 2017) utilizando en software R. Dicho algoritmo identifica los errores de secuenciación mediante un método automatizado aprendiendo de los propios datos, identificando las variaciones reales de los amplicones y generando ASVs (variantes de la secuencia del amplicón).

En primera instancia se realizó un análisis de calidad de las secuencias, seguido por un filtrado y recorte de estas a través de la función *filterAndTrim*, que se basa en la puntuación de calidad de secuencia para estimar la probabilidad de que haya un error. Se eliminaron las lecturas con un error máximo esperado (maxEE) superior a 2 y las lecturas se cortaron en ambos extremos a 10 y 230 pares de bases de modo que se obtuvieron únicamente secuencias de 220 pares de bases. Las variaciones de las secuencias se dedujeron con la función *learnErrors*. Se eliminaron las secuencias quimeras y finalmente se le asignó la taxonomía de reino a género con la función *assignTaxonomy*, mediante la base de datos SILVA (v138). Utilizando la librería Phyloseq, se creó un objeto phyloseq conteniendo información sobre las secuencias asociadas a su respectiva identidad taxonómica y la abundancia de *reads* de cada secuencia. Se eliminaron los ASVs que presentaron abundancia total menor a 5 *reads*, así como los que fueron identificados taxonómicamente como mitocondrias y cloroplastos y finalmente, los que no pudieron ser asociados a ningún phylum. Para asegurar que se alcanzó una profundidad de muestreo óptimo, con la librería Vegan se realizaron curvas de rarefacción de ASVs observados *versus* profundidad de muestreo (abundancia de *reads*).

4.3 Efecto de las distintas fuentes de carbono sobre la abundancia bacteriana

Con el objetivo de determinar si la fuente de carbono utilizada por las bacterias afecta la abundancia de estas, se realizó un experimento que consistió en incubar una muestra de agua del lago Uruguay con extracto de musgos y líquenes recolectados a orillas del lago (de aquí en adelante denominado

extracto vegetal), una segunda muestra incubada con agua proveniente directamente del Glaciar Collins y una tercera muestra como control negativo que sólo contenía agua del lago. Tanto el agua de glaciar y como el extracto vegetal una vez recolectados se mantuvieron 10 días a 4°C, pasado este tiempo fueron pasados por un filtro de 1,2 μm . Se le añadió 5 gr de los filtrados de glaciar y extracto vegetal a las respectivas incubaciones. Cada tratamiento (extracto vegetal, agua del glaciar y control negativo) se incubó por triplicado, se extrajeron submuestras cada 0, 96 y 192 hrs (tiempo final) y las muestras se trataron de la misma forma que en el experimento anterior: se fijaron con PFA y se conservaron a -20 °C. Luego en Montevideo se filtró 5 ml de cada muestra en filtros de 0,22 μm , se tiñeron con DAPI y se cuantificó la abundancia bacteriana por microscopía de epifluorescencia (figura 3).

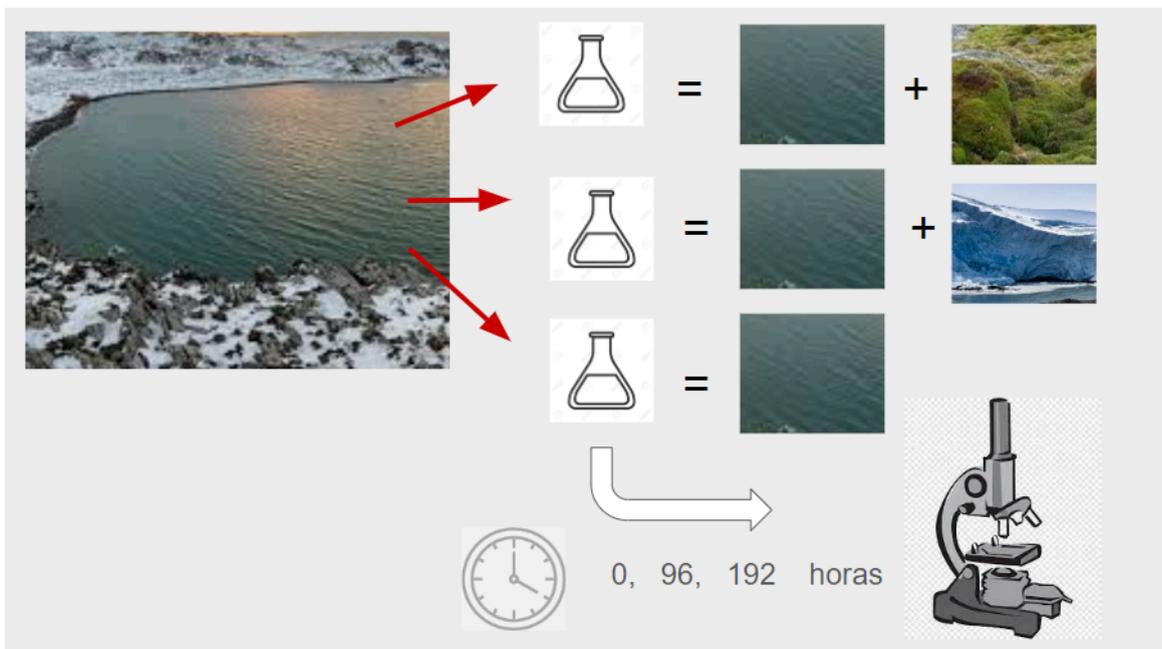


Figura 3: Esquema del experimento con las distintas fuentes de carbono del presente estudio.

4.4 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para la variable abundancia bacteriana de los diferentes experimentos. Luego de corroborar que dicha variable cumplía con el supuesto de normalidad, se realizaron test de ANOVA para explorar la significancia en las diferencias de abundancia bacteriana entre los distintos tiempos de incubación. Para el análisis de la actividad bacteriana en

el lago se realizó nuevamente el test de normalidad Shapiro-Wilk seguido de una prueba T pareada. Finalmente, a partir de los resultados de secuenciación masiva se estimó la diversidad alfa a través de la riqueza observada y los índices de Shannon y Simpson en R.

5. Resultados

5.1 Abundancia bacteriana

Para la estimación de la abundancia bacteriana presente en el lago se analizaron 24 filtros y se cuantificaron 29.524 células. Se distinguió entre bacterias en acúmulos (formando agregados en torno a partículas) y bacterias libres, cuya suma constituyó a las bacterias totales. En la figura 4 pueden apreciarse ejemplos de bacterias libres y en acúmulos. La abundancia total promedio (bacterias libres + bacterias en acúmulos) se osciló entre $1,40 \times 10^5$ y $4,25 \times 10^5$ bacterias por ml durante toda la incubación, siendo el promedio de las bacterias en acúmulos el que mostró una mayor variación temporal, disminuyendo en el tiempo final a una abundancia de $4,32 \times 10^3$ bacterias/ml. A las 24 horas de incubación, el 45% de las bacterias se encontraban formando acúmulos, seguido de un máximo que alcanzó el 84% de las bacterias totales a las 48 horas, para volver a un 42% a las 72 horas y finalmente disminuir alcanzadas las 120 horas de incubación (figura 5). Los valores promedio obtenidos en las muestras que correspondían a 48 horas de incubación presentaron valores tan altos debido a que en una de las réplicas contabilizada se encontraba una cantidad inusual de materia orgánica y grandes acúmulos. Por lo tanto, el aumento y disminución de abundancia de bacterias totales fueron acompañados por un aumento y disminución en el número de acúmulos (Tabla 1).

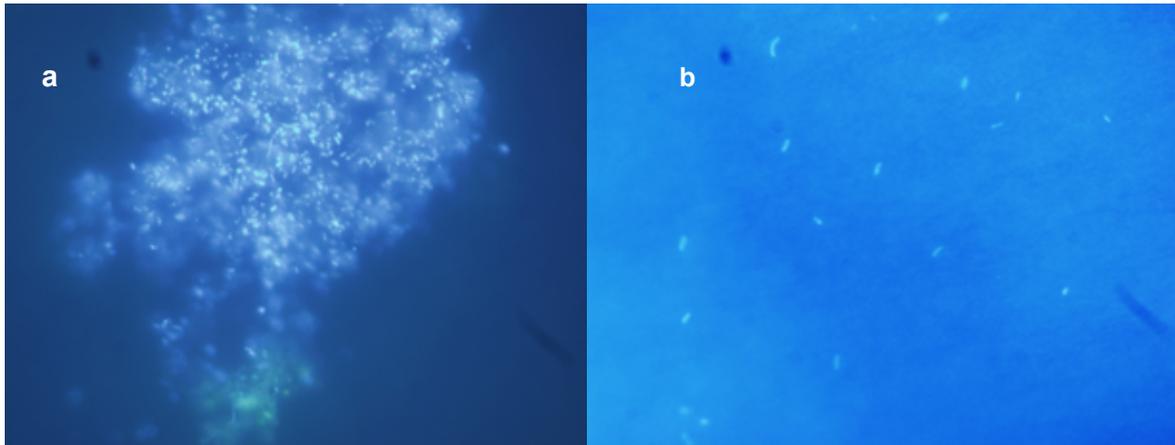


Figura 4: Fotos tomadas a partir de muestras de agua superficial del lago Uruguay. a) Foto de una aglomeración de bacterias en torno a materia orgánica, b) bacterias de vida libre.

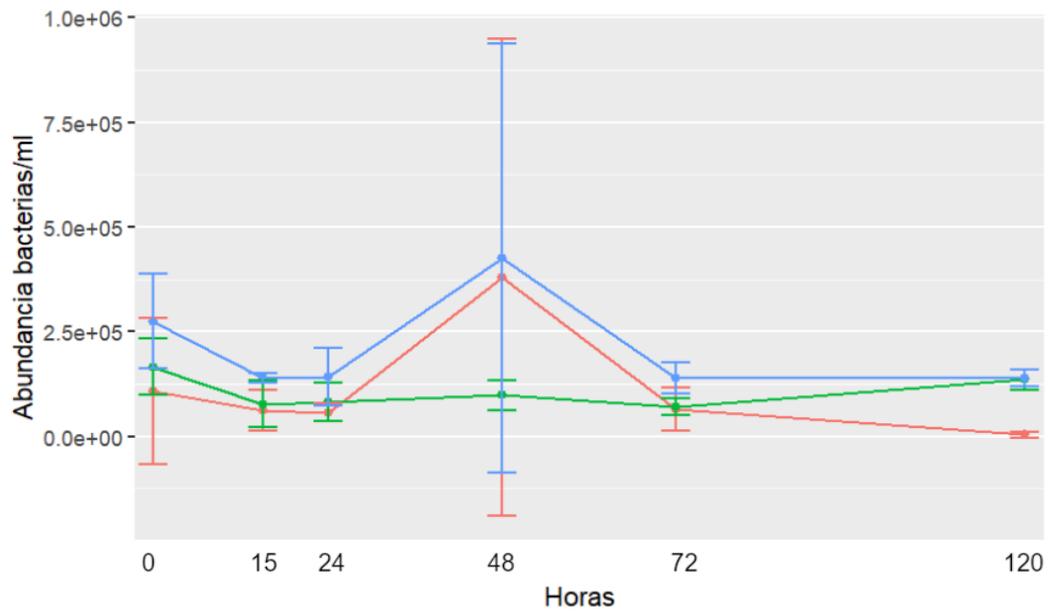


Figura 5: Abundancia de bacterias por ml en función del tiempo de incubación de bacterias totales (azul), bacterias en acúmulos (rosado) y bacterias libres (verde)

Tabla 1 número de acúmulos promedio registrados para cada tiempo de incubación.

Horas	Número de acúmulos
0	10
15	10
24	12
48	8
72	10
120	1

5.2 Actividad bacteriana

Se observó que al inicio de la incubación el 13% de las células contabilizadas se encontraban activas, mientras que a tiempo final no se observaron bacterias activas. En la figura 6a se observan las bacterias totales teñidas con DAPI, mientras que en la figura 6b se pueden observar únicamente las células activas (CTC positivas), ambas imágenes corresponden a un mismo campo.

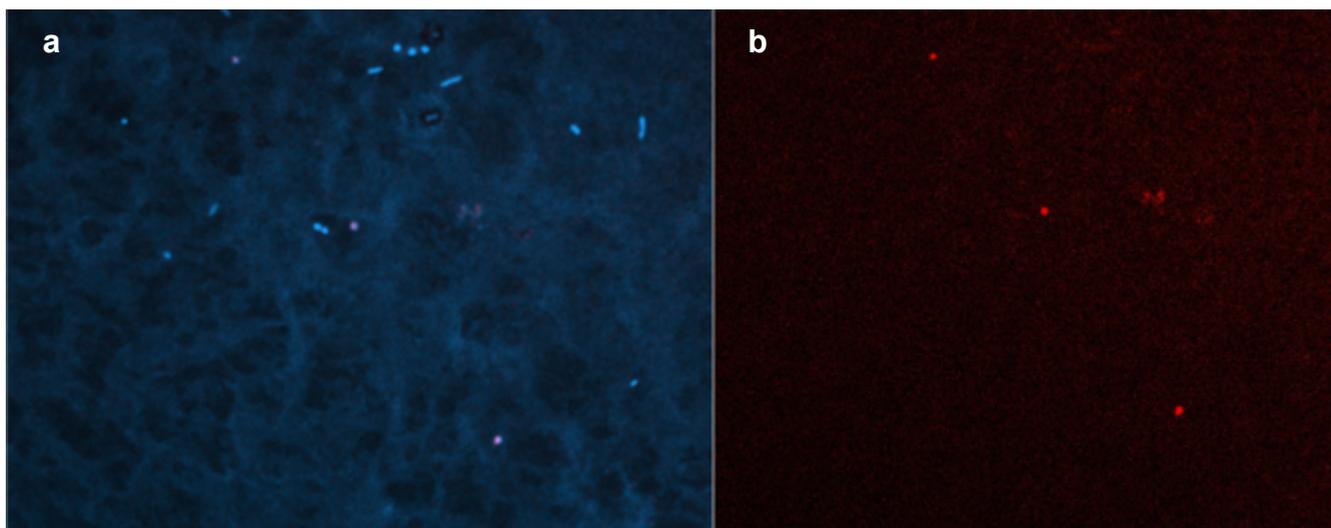


Figura 6: Microscopía confocal de bacterias presentes en el lago Uruguay. a) señal emitida por DAPI y CTC, b) señal emitida por el CTC (filtración de la señal emitida por el DAPI).

5.3 Diversidad bacteriana

En la figura 7 se observan los productos de amplificación de las PCRs obtenidos para cada una de las tres réplicas de agua tomadas luego de 120 horas de incubación, para una muestra control de la incubación fijada con PFA a tiempo cero (K) y para la muestra *in situ* del lago. El producto de amplificación fue el esperado de 282 pares de bases.

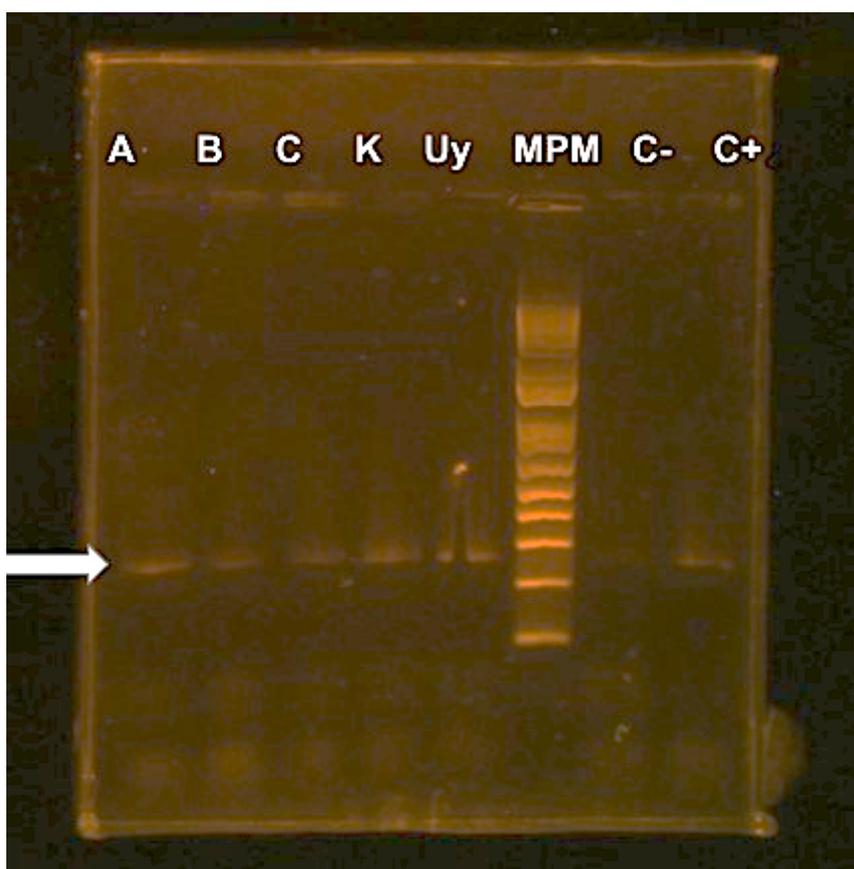


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa teñida con GelRed de los productos de amplificación obtenidos para cada muestra. A, B y C: tres réplicas de la incubación a tiempo final, K: control de la incubación fijado a tiempo 0, Uy: muestra de agua *in situ* del lago Uruguay, MPM: marcador de peso molecular, C-: control negativo y C+: control positivo. La flecha muestra el amplicón del tamaño esperado.

Mediante el análisis de secuencia de los productos de amplificación obtuvieron un total de 1789 ASVs. A partir de las curvas de rarefacción se logró determinar que la profundidad de secuenciación fue adecuada para capturar la diversidad bacteriana en las 4 muestras (Figura 8).

Los índices de diversidad calculados (Shannon, inverso de Simpson) y riqueza a partir de las muestras incubadas durante 120 horas y la muestra tomada *in situ* no muestran grandes diferencias (figura 9). Si bien la réplica B de la muestra incubada durante 120 horas obtuvo el menor tamaño de muestra (menor abundancia de *reads*) y menor riqueza específica, presentó un mayor valor del inverso de Simpson (figuras 8 y 9).

Proteobacteria fue el filo dominante en las muestras alcanzando más del 50% de la abundancia en 3 de las 4 muestras seguido de *Verrucomicrobiota*, *Actinobacteriota* y *Bacteroidota*. En conjunto estos 4 filos constituyeron alrededor de un 75 % de la abundancia total (figura 10). Los 10 ASVs mayormente representados en las 4 muestras pertenecieron a los géneros *Rhodopseudomonas*, *Bradyrhizobium* y *Methylobacillus* y representaron alrededor del 25% de la abundancia total de los ASVs cuantificados exceptuando la réplica B donde representaron un 12%.

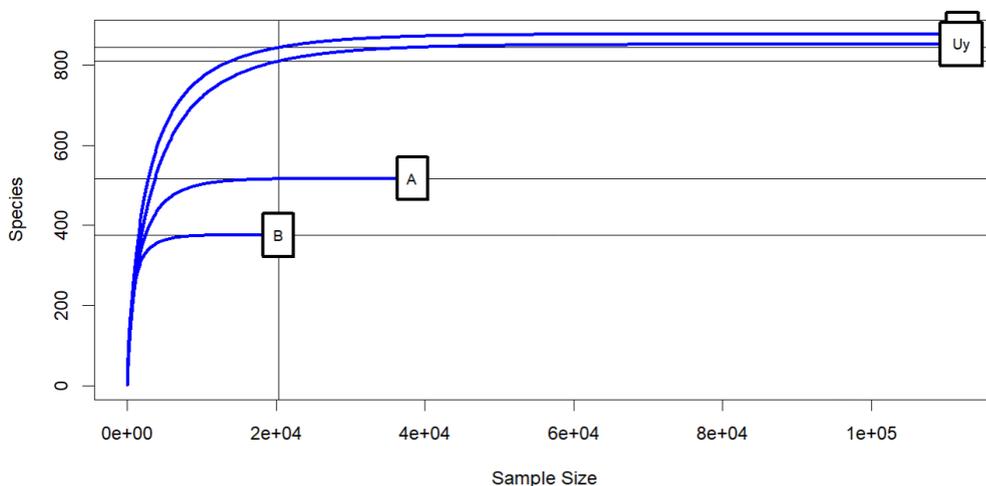


Figura 8: Curvas de rarefacción obtenidas a partir de muestras de agua superficial del lago Uruguay; A, B y C: réplicas a 120 horas de incubación, Uy: muestra de agua *in situ* del lago Uruguay.

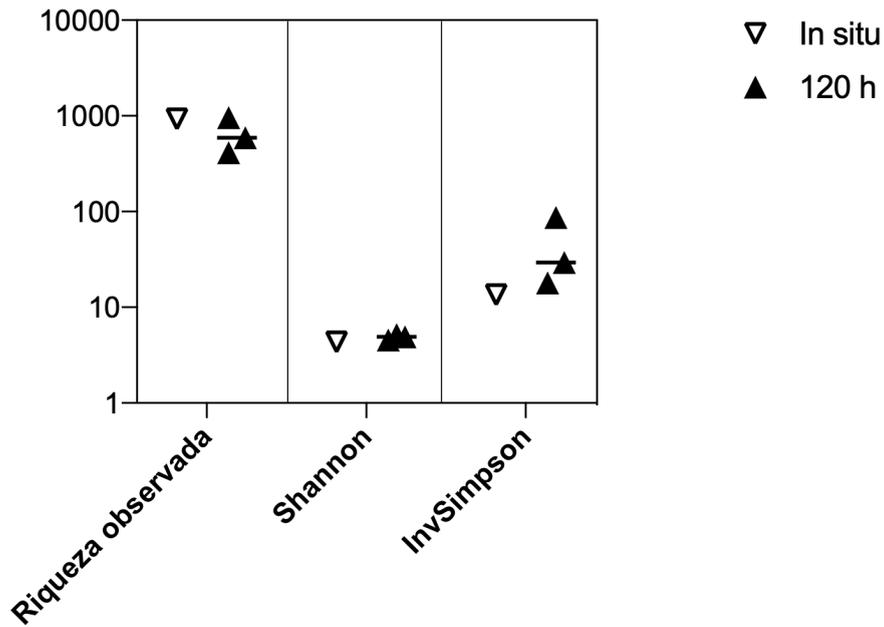


Figura 9: Diversidad alfa (riqueza observada, índice de Shannon e inverso de Simpson) para una muestra de agua *in situ* del lago Uruguay (*In situ*) y para tres réplicas luego de las 120 horas de incubación (120 h).

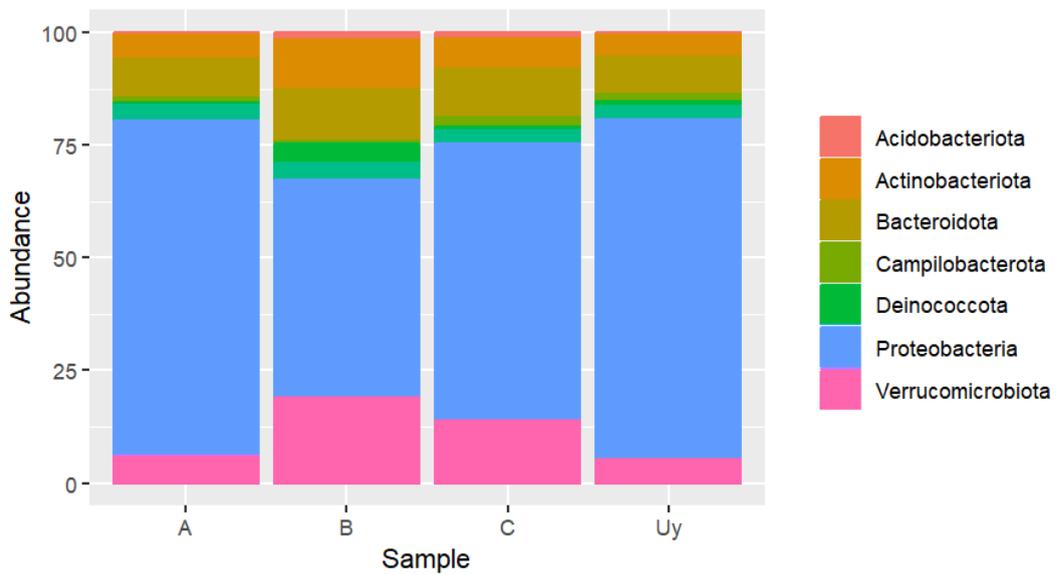


Figura 10: Abundancia relativa de los filos con porcentajes mayores al 5%. A, B y C: réplicas del agua superficial del lago Uruguay luego de 120 horas incubación, Uy: muestra de agua superficial *in situ*.

5.4 Experimento con fuentes de carbono

En las 27 muestras procesadas se contabilizaron un total de 29310 bacterias. En el tratamiento con extracto vegetal, la abundancia total de bacterias aumentó significativamente a lo largo del tiempo y con respecto a los dos restantes tratamientos (ANOVA de dos vías, $p < 0,05$), alcanzando una abundancia de $8,45 \times 10^5$ bacterias/ml (figura 11). Las bacterias incubadas con el extracto vegetal a partir de las 96 horas de incubación presentaron un aspecto y distribución uniforme, la mayor parte de la comunidad consistió en bacilos de gran tamaño en comparación al resto de las bacterias observadas en este estudio (figura 12). No se observaron diferencias significativas de abundancia bacteriana entre el tratamiento control y el tratamiento con agua de glaciar. Tampoco se observaron diferencias significativas en la abundancia del bacterioplancton a lo largo del tiempo de incubación en ambos tratamientos, manteniéndose entre $6,91 \times 10^4$ y $1,09 \times 10^5$ bacterias/ml en el tratamiento control. Los valores más bajos de abundancia de todo el estudio se obtuvieron en el tratamiento inoculado con agua de glaciar como fuente de materia orgánica, presentando una abundancia mínima promedio de $4,56 \times 10^4$. No se observaron cambios en el aspecto de las bacterias a lo largo del tiempo en la incubación con agua de glaciar, siendo la comunidad observada muy similar a la comunidad de las bacterias en el control (Figura 13).

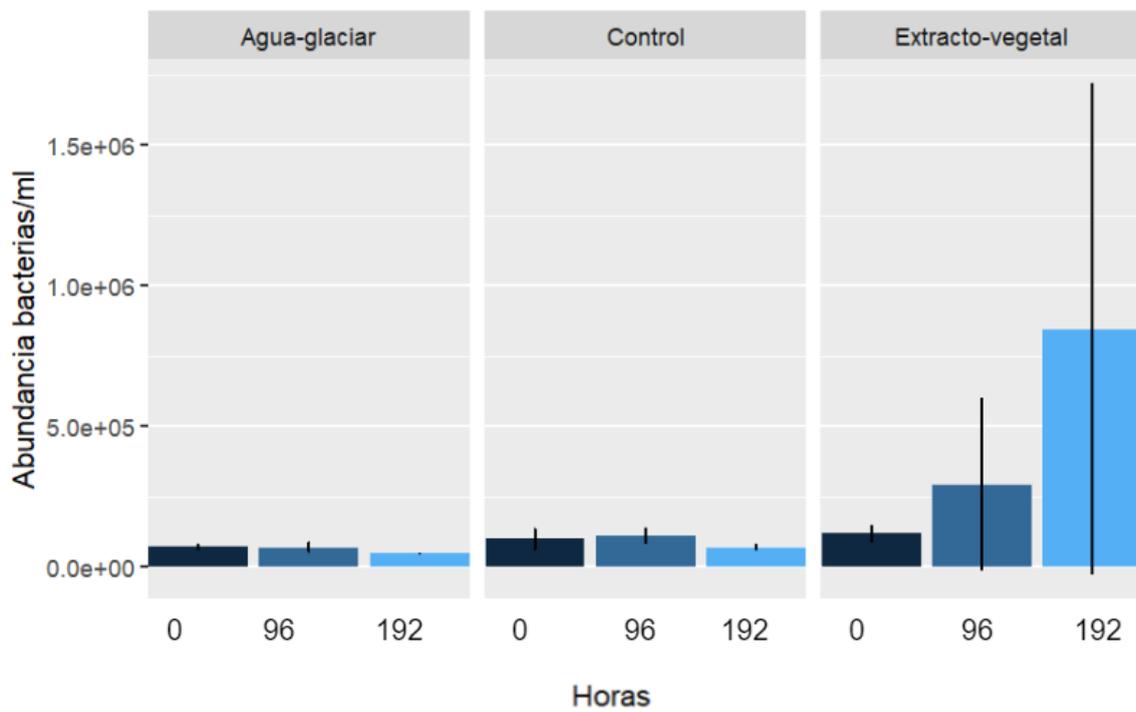


Figura 11: Abundancia de bacterias por ml en función del tiempo para los tres tratamientos del experimento: agua de glaciación, control negativo y extracto vegetal.

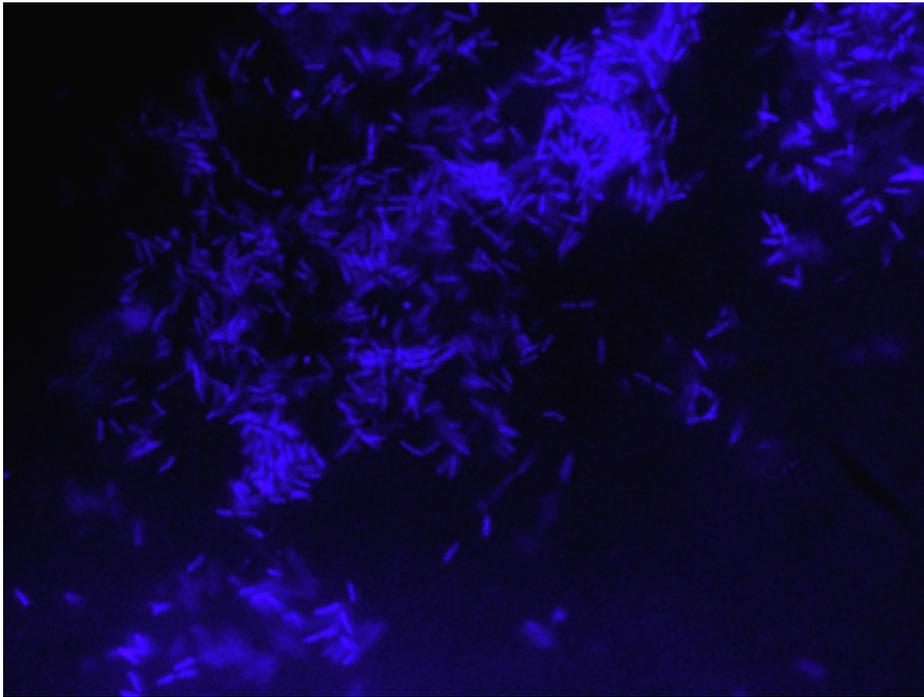


Figura 12: Microscopía de epifluorescencia de una muestra incubada con extracto vegetal a tiempo final (192 hrs).

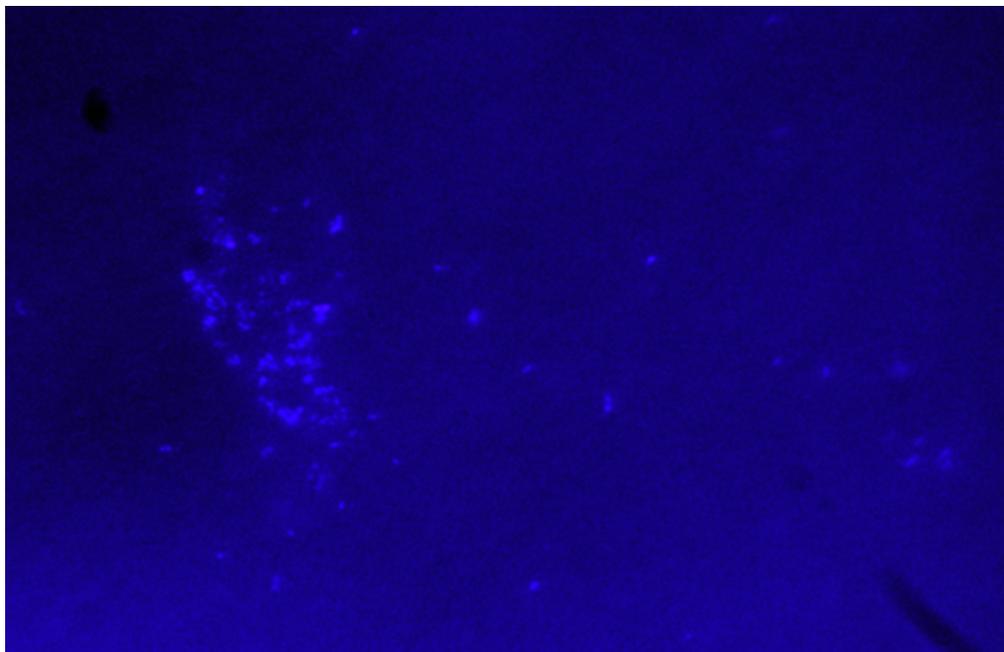


Figura 13: Microscopía de epifluorescencia de una muestra incubada con agua del glaciar Collins a tiempo final (192 hrs).

6 Discusión

Es reconocido el importante rol que posee el bacterioplancton en la trama trófica de todos los ecosistemas acuáticos, pero esta cobra mayor dominancia en los lagos polares debido a que poseen cortas cadenas tróficas (Laybourn-Parry et al., 2001), y median la principal vía de nutrientes a través del bucle microbiano. Estos lagos son particularmente sensibles a los cambios de temperatura, lo que se ve reflejado en los periodos libres de hielo, momento en donde cambia radicalmente la producción del sistema (Rocheira et al., 2010). Dichos periodos productivos son muy importantes ya que en ellos el lago recibe entradas de nutrientes orgánicos e inorgánicos que subsidian el sistema (Camacho, 2006).

6.1 Abundancia bacteriana del lago Uruguay

Las abundancias bacterianas obtenidas a partir de la incubación del agua del lago se mantuvieron en el rango entre $1,40 \times 10^5$ y $4,25 \times 10^5$, siendo el presente estudio el primero en cuantificar la abundancia del bacterioplancton en agua superficial en el lago antártico Uruguay. Las abundancias registradas para los lagos antárticos muestran una gran variabilidad, debido al distinto aporte de nutrientes al que se encuentran expuestos. En un estudio en el que se estimó la abundancia del bacterioplancton a través de epifluorescencia en conjunto con el colorante DAPI y citometría de flujo en 7 lagos antárticos con distinto estado trófico en la Península Antártica se encontraron abundancias que iban desde $5,5 \times 10^4$ hasta $1,2 \times 10^6$ células por ml. Estas diferencias en abundancias fueron atribuidas a los distintos estados tróficos de los lagos, obteniéndose los valores más altos en los lagos con mayor suministro de nutrientes (Schiaffino et al., 2011). En particular para los lagos antárticos, árticos y montañosos, la descarga generada por el deshielo es la entrada más importante de nutrientes y materia orgánica, la cual asimismo es responsable del transporte de sedimentos (Vincent, 2008).

En el presente estudio, las muestras fueron tomadas en marzo (finales del verano), momento en el cual el lago ya ha recibido la mayor parte de nutrientes a través de escorrentía por descongelamiento y producción primaria, siendo probablemente el momento del año de mayor actividad metabólica y abundancia del bacterioplancton. En un estudio estacional sobre el bacterioplancton previamente realizado en varios lagos de la PF incluyendo al lago Uruguay, las principales diferencias en su diversidad fueron debido a la presencia- ausencia del hielo (Bertoglio et al; 2023). Es posible que la escorrentía no solo aumente los niveles de nutrientes del lago, sino que trae consigo bacterias presentes en el suelo, hielo, vegetación entre otros. De hecho, uno de los diez taxones detectados con mayor abundancia en la secuenciación corresponde al género *Bradyrhizobium*, caracterizado por su capacidad de fijar nitrógeno y encontrarse asociado a raíces (Jordan, 1982).

Al realizar las primeras observaciones al microscopio, una de las características más llamativas de las muestras es la distribución espacial heterogénea que presentan las células en la que gran parte de la comunidad se encontraba aglomerada en torno a partículas, distribución que se encuentra asociada a ambientes oligotróficos acuáticos (Yawata, et al., 2014). El número de bacterias formando acúmulo varió mucho entre las muestras. En promedio fue responsable de un 44% de la abundancia, y el principal responsable del aumento de abundancia registrado a las 48 horas de incubación, ya que para dicho tiempo se duplicó el número de bacterias formando acúmulos, alcanzando en promedio un 82% de la abundancia total. Si bien no se observó en total un mayor número de acúmulos promedio, los que se observaron fueron de mayor tamaño.

Las abundancias presentaron altos desvíos estándar debido a que las réplicas eran muy heterogéneas entre sí, al estar la abundancia de bacterias muy asociada a la abundancia y tamaño de los acúmulos. Dado que estos no presentaron una distribución homogénea en los filtros, se obtuvieron mayores desvíos en los filtros que presentaban mayor cantidad de bacterias formando parte de acúmulos, en comparación con los filtros que presentaban mayor abundancia en bacterias de vida libre.

Desde hace varias décadas se ha descrito la presencia de acúmulos de bacterias en ecosistemas acuáticos. Para Grossart (2010) el conjunto de bacterias de "vida libre" consta de dos tipos: bacterias de vida "verdaderamente" libres que pasan todo su ciclo de vida como células individuales, y bacterias que pasan la mayor parte de su ciclo de vida unidos a partículas vivas y/o no vivas. Esta conclusión se basa en trabajos como los de Stocker et al., (2008) en el que mediante el uso de dispositivos de microfluidos, demostraron que las bacterias son realmente capaces de explotar eficientemente parches de nutrientes. La especie bacteriana utilizada *Photobacterium haloplanktis* mostró una rápida respuesta quimiotáctica a un pulso de nutrientes. También se demostró mediante experimentos utilizando perlas de agar artificiales, que las bacterias pueden unirse y desprenderse rápidamente a partículas (Kjørboe et al., 2002). En otro trabajo utilizaron bacterias marcadas y demostraron que existe un intercambio frecuente entre bacterias de vida libre y bacterias adheridas a organismos superiores (Grossart et al., 2003). Esta capacidad de las bacterias de aglomerarse y luego separarse volviéndose de vida libre en la columna de agua, se atribuye a una estrategia de supervivencia que les permite adaptarse rápidamente a los cambios temporales y espaciales en su entorno al explotar fuentes puntuales de materia orgánica, como partículas/agregados y organismos superiores. Lo que les permite responder eficientemente a las fluctuaciones ambientales, incluyendo períodos de reducción de materia orgánica y disponibilidad de energía (Grossart et al., 2010).

A lo largo del tiempo de incubación la cantidad de bacterias en acúmulos disminuyó drásticamente, esto puede deberse en parte a un agotamiento en los nutrientes de las partículas en torno a las cuales se generan los acúmulos. Asimismo, la disminución de los acúmulos a lo largo del tiempo podría explicarse debido a que fueron un blanco más atractivo para la depredación que las bacterias de vida libre. En uno de los filtros utilizados para realizar la estimación de la abundancia se observó un organismo multicelular que se lograba vislumbrar incluso con un aumento de 10X. Que este organismo se trate de un potencial depredador capaz de generar una disminución en el número de acúmulos es la hipótesis más factible para explicar su disminución hacia el final de la incubación. Según esta hipótesis la depredación obraría como uno de los

grandes influenciadores en la comunidad de bacterias, al menos en la incubación realizada para este estudio.

Las duras condiciones climáticas que experimentan los organismos que habitan los lagos polares generan un fuerte control abiótico. Este factor es considerado el más importante en este tipo de ambientes, estructurando a las comunidades planctónicas y relegando a las interacciones bióticas a un rol más secundario (Krebs, 2001). De esta manera los factores decisivos en la estructuración de las comunidades que habitan los lagos serían los ciclos de congelación, la disponibilidad de nutrientes, la influencia marina y la estratificación química (Simmons et al., 1993). Sin embargo, se ha propuesto que durante el verano, momento en el que fueron tomadas las muestras del presente estudio, las restricciones climáticas se atenúan y el control “de arriba hacia abajo” de las poblaciones podría empezar a jugar un rol más importante en la comunidad planctónica. (Camacho y Fernández-Valiente, 2005; Camacho, 2006). Las redes tróficas en lagos antárticos carecen de depredadores vertebrados y en ellas el zooplancton, cuando está presente, asume el papel de nivel trófico superior actuando como consumidor tanto de bacterioplancton como de protozoos flagelados y ciliados (Roberts et al., 1999). Se han reportado en diversos lagos antárticos la presencia de rotíferos, copépodos, ciliados y anostráceos (Izaguirre et al., 2003; Toro et al., 2007). En un estudio realizado en dos lagos con distintos niveles de productividad de la Antártida Marítima, se demostraron fuertes interacciones tróficas entre copépodos, flagelados y bacterias (Tranvik y Hansson, 1997). Previo a dicho trabajo, varios autores ya habían hipotetizado la importancia de la depredación como un factor relevante para explicar la abundancia del fitoplancton en lagos antárticos (Hansson, 1992; Hansson et al., 1993). Este potencial control por los consumidores marcaría una importante diferencia entre los lagos de la Antártida continental, carentes de poblaciones conspicuas de zooplancton respecto a los lagos de la Antártida marítima, donde la presencia de zooplancton, y concretamente de copépodos calanoides es habitual (Bayliss et al., 1997). Debido a que la disminución de abundancia total registrada a tiempo final en la incubación se vio acompañada de una drástica disminución de la cantidad de acúmulos, es posible que haya sido generada por

la depredación por parte de organismos de un tamaño tal que les permitiera ingerir acúmulos o parte de ellos.

Estos organismos depredadores forman parte del bucle microbiano al consumir la biomasa y energía que acumularon las bacterias. Debido a las características oligotróficas de estos ecosistemas cualquier vía que incremente su transferencia hacia niveles superiores podría adquirir mayor relevancia (Azam et al., 1983; Camacho y Fernández, 2005).

6.2 Actividad bacteriana

Es importante destacar que, si bien en la bibliografía se han documentado mediciones de la actividad bacteriana en ambientes oligotróficos árticos, no se han reportado estudios de este tipo para lagos antárticos hasta este momento, por lo que este trabajo constituye el primer aporte en ese sentido.

El CTC ha sido utilizado con bastante frecuencia para mediciones de la actividad bacteriana en ambientes árticos, probablemente debido a restricciones en el uso de leucina tritiada (detallada en el anexo 3 del protocolo de protección ambiental del tratado antártico), con resultados variables. En estimaciones previas de la actividad bacteriana otros autores observaron que en las bacterias adheridas a partículas entre el 15% y el 19% se encontraban activas mientras que para las bacterias de vida libre el porcentaje descendía a valores entre 3% y el 5% (Sherr, 1999; Meiners et al., 2008).

Otro estudio realizado en hielo en invierno en el mar Ártico reportó que el porcentaje de bacterias activas era de entre 0.5 a 4% y que alrededor de un 82% de las bacterias activas se encontraban asociadas a partículas,. Sumado a esto se observó que el número de bacterias activas asociadas a partículas aumentaba a medida que disminuía la temperatura (Junge et al., 2004). Por lo tanto, dichos autores infirieron que este comportamiento es una ventaja ante condiciones más severas. Estos resultados poseen gran similitud con los

obtenidos en el presente estudio dado que un 13% de las bacterias evidenciaron actividad de la cadena respiratoria.

Es importante tener en cuenta que las muestras utilizadas para medir la actividad bacteriana fueron las mismas que se utilizaron para estimar la abundancia. Dado que se observó una drástica disminución en la abundancia de bacterias presentes en acúmulos a tiempo final, una posible hipótesis para explicar la no detección de actividad es que las bacterias metabólicamente activas se encontraban en su mayoría formando parte de acúmulos, disminuyendo a la par de estos.

Es también importante destacar que en este estudio no se ha podido discernir entre las bacterias asociadas a partículas y bacterias de vida libre al medir su respiración, obteniéndose un 13% de bacterias activas. Este representa un resultado intermedio entre los obtenidos por otros estudios entre bacterias de vida libre y bacterias en acúmulos (Sherr, 1999; Meiners et al., 2008), que es congruente con el hecho de que para tiempo inicial se estimó que la proporción de bacterias en acúmulos fue del 45%.

Realizar la distinción y conteo de las bacterias que habían incorporado CTC, fue un proceso complejo debido a que el microscopio captaba mucho ruido en la señal debido a que varios elementos presentes en la muestra emitían fluorescencia a la misma longitud de onda que el CTC. Problema que probablemente se acrecentó en los acúmulos, en donde se presume se encontraban la mayoría de las bacterias activas detectadas en este estudio. Sería muy interesante realizar este mismo estudio en invierno, principios del verano y final del verano para tener una percepción de cómo varía la actividad en el año y utilizar un citómetro de flujo para contrastar los resultados obtenidos con los de este estudio.

6.3 Diversidad bacteriana

La poca variación en la composición de la comunidad bacteriana a lo largo del tiempo coincidió con una escasa variabilidad temporal en su abundancia. La réplica B de la muestra de agua incubada durante 120 horas presentó un índice invertido de Simpson mucho mayor que las restantes dos réplicas. Si bien fue la muestra que presentó menor riqueza específica, el valor tan alto obtenido en este índice se explica debido a que presentó menor dominancia. Los 10 ASVs más abundantes en promedio representaron el 12% de la abundancia en la réplica B, mientras que en las réplicas restantes e in situ representaron alrededor de un 25%. Si bien esta réplica llegó a saturar al realizar la curva de rarefacción, presentó el menor tamaño de muestra y es posible que de haberse alcanzado una mayor profundidad de secuenciación la muestra hubiera presentado una mayor dominancia. Por otro lado, la abundancia del bacterioplancton a las 120 horas también presentó diferencias para esta réplica, con una mayor cantidad de acúmulos y bacterias en acúmulos respecto a las restantes dos réplicas. El aumento de la diversidad acompañada por un aumento en el número de acúmulos puede atribuirse a que los parches de nutrientes pueden operar como microambientes propicios de materia orgánica que pueden ser explotados por bacterias que requieren recursos similares, en lugares distantes en el espacio, disminuyendo las presiones competitivas (Simon et al., 2002).

Otro dato importante a tener en cuenta es que el género *Bradyrhizobium* asociado principalmente con el suelo y el crecimiento vegetal, fue uno de los más abundantes. Esto sugiere que la esorrentía es un proceso importante que no sólo aporta materia orgánica desde la cuenca, sino que además aporta bacterias asociadas a dicha materia orgánica. Asimismo, esto podría estar relacionado con la preferencia demostrada por las bacterias del lago a utilizar el carbono proveniente de la vegetación en comparación con el proveniente del glaciar Collins (ver 6.4).

Para futuros estudios de diversidad sería beneficioso considerar un mayor número de réplicas para poder entender mejor cómo se conforman las

comunidades microbianas de los lagos, y tomar muestras a distintas profundidades del lago ya que los resultados obtenidos en el presente estudio corresponden a una foto de una porción muy pequeña de la columna de agua.

6.4 Experimento con diversas fuentes de carbono

Uno de los resultados más relevantes obtenido en este estudio fue el aumento de la abundancia bacteriana tras la incubación con el extracto de material vegetal adyacente al lago, lo que nos podría estar indicando que los pulsos de crecimiento en el lago se darían con el ingreso de material proveniente de los líquenes y musgos presentes en la zona. En un lago de características similares al lago Uruguay situado en la Península Byers (Península Antártica), observaron que los aportes de materia orgánica procedentes de los tapetes microbianos y musgos distribuidos a lo largo de la cuenca del lago suministran carbono orgánico que contribuye a incrementar la abundancia del bacterioplancton heterótrofo (Villaescusa et al 2013). Sería interesante evaluar si existieron cambios a nivel de la estructura comunitaria bacteriana en el tratamiento con extracto de material vegetal, ya que nos daría información acerca de las especies que se podrían ver beneficiadas ante un posible aumento de la vegetación en la cuenca en un escenario de incremento de temperatura en la región. Esto podría darnos un indicio de que especies aumentarían su proporción en las comunidades del futuro. Caracterizar estas especies es de suma relevancia, no solo debido a que las comunidades bacterianas sustentan la transferencia de energía en la cadena trófica. El lago Uruguay junto con otros lagos antárticos funcionan como suministro de agua potable para la población que habita las bases antárticas.

Por otro lado, la abundancia bacteriana no se vio estimulada al incubarla con agua proveniente del glaciar. Lo que puede estar indicando que la oferta de carbono presente en el agua derretida del glaciar podría ser de difícil acceso para la degradación bacteriana. En el estudio de paleolimnología llevado a cabo por García-Rodríguez et al., 2021, encontraron que durante el periodo de retroceso del Glaciar Collins como consecuencia del calentamiento, la diversidad bacteriana del lago Uruguay disminuyó debido al ingreso del agua derretida del

glaciar. Posiblemente esto también se explica por el ingreso de materia orgánica preservada en el glaciar, la cual es difícil de degradar por la mayoría de las comunidades bacterianas, resultando probablemente en la dominancia de grupos bacterianos particulares que sí pueden explotarla.

El aumento de la temperatura ha afectado a los lagos antárticos a distintos niveles. Por ejemplo, han ocurrido cambios en la disponibilidad de agua, expresado a través de un aumento de las precipitaciones y al derretimiento de los glaciares especialmente durante el verano (Turner et al., 1997). Las nuevas áreas libres de hielo como consecuencia del deshielo suelen aparecer cerca de la costa, donde ocurre la mayor parte de la llegada y asentamiento de especies vegetales naturales e introducidas (Smith 1994). El retroceso de los glaciares está ocurriendo principalmente a lo largo de la Península Antártica (Cook et al. 2006), exponiendo nuevos hábitats potenciales para ser colonizados por la biota terrestre, que también se ve afectada por el calentamiento. En estas condiciones se prevé que sean favorables para la colonización de parte de especies invasoras. En este escenario, la flora antártica nativa ha sido capaz de colonizar el suelo desnudo expuesto, aumentando el tamaño de su población y expandiendo su distribución local (Gerighausen et al. 2003). Sumado a esto se han realizado experimentos de calentamiento pasivo en especies de plantas vasculares antárticas en los que se observó que un aumento de temperatura contribuye a generar mayores tasas de crecimiento y de reproducción (Smith, 1994). De hecho, al igual que el bacterioplancton de los lagos antárticos, las plantas vasculares de la región también son consideradas como buenos indicadores del cambio climático por lo que han sido objeto de numerosos estudios. Se ha documentado que tanto las plantas vasculares *Deschampsia antarctica* como *Colobanthus quitensis* han incrementado sus poblaciones en tres territorios principalmente: Isla Signy (Islas Orcadas del Sur) (Smith 1990, 1994, 2003), PF (Gerighausen et al. 2003) y en el archipiélago de las Islas Malvinas (Fowbert y Smith 1994; Parnikoza et al. 2009).

Actualmente la Antártida Marítima está experimentando un aumento en su temperatura media (Quayle et al., 2002; Villaescusa et al., 2013). La variación en

las condiciones climáticas influye en la duración del período sin hielo de los lagos (Rochera et al., 2010) y puede provocar cambios importantes en los aportes de nutrientes inorgánicos y materia orgánica en sus cuencas afectando directamente a la estructura microbiana de los lagos (Pearce, 2003); potenciando su actividad microbiana y alterando el periodo productivo del fitoplancton y musgos acuáticos, así como de los tapetes microbianos que cubren amplias áreas de la cuenca de los lagos de la Península Antártica (Fernández-Valiente et al., 2007).

6.5 Conclusiones

Este trabajo es una primera aproximación para entender cómo funciona el bacterioplancton en el lago Uruguay. Como resultados más importantes se obtuvo que a fines del verano la abundancia de bacterias en la columna de agua alcanzó valores altos comúnmente observados en lagos templados, y que el carbono proveniente de material vegetal fue capaz de estimular fuertemente el crecimiento del bacterioplancton a diferencia del carbono proveniente del Glaciar Collins. Esto podría tener fuertes implicancias dado el aumento de material vegetal en la cuenca como resultado del incremento de las áreas de colonización para las plantas y de la humedad de la zona, particularmente en un escenario aumento de temperatura producto del cambio climático. Por otra parte, vimos que los principales cambios del bacterioplancton ocurrieron a nivel de las bacterias presentes en la columna de agua adheridas a partículas. El bacterioplancton de los lagos antárticos varía en gran medida con los cambios que ocurren ambientalmente en la cuenca en la que se encuentran insertos por lo que conocer su diversidad, así como su abundancia y respuesta ante distintas fuentes de carbono nos permitirá en el futuro detectar cambios en sus patrones de manera temprana y relacionarlo con los cambios ambientales que ocurren tanto en el lago como en su entorno.

Bibliografía

- ASPA. (2006). Plan de gestión revisado de la Zona Antártica Especialmente Protegida No 125 Península Fildes, isla Rey Jorge (isla 25 de Mayo).
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*, 257-263.
- Bayliss, P., Ellis-Evans, J. C., Laybourn-Parry, J. (1997). Temporal patterns of primary production in a large ultra-oligotrophic Antarctic freshwater lake. *Polar Biology*, 18, 363-370.
- Bentley, M. J., Hodgson, D. A., Smith, J. A., Cofaigh, C. Ó., Domack, E. W., Larter, R. D., Evans, J. (2009). Mechanisms of Holocene palaeoenvironmental change in the Antarctic Peninsula region. *The Holocene*, 19, 51–69. <https://doi.org/10.1177/0959683608096603>
- Bertoglio, F., Piccini, C., Urrutia, R., Antoniades, D. (2023). Seasonal shifts in microbial diversity in the lakes of Fildes Peninsula, King George Island, Maritime Antarctica. *Antarctic Science*, 35, 89-102. [10.1017/S0954102023000068](https://doi.org/10.1017/S0954102023000068)
- Bjørn, B., Headland, K.R. (2008). The 19th Century Antarctic Sealing Industry. Sources, Data and Economic Significance, Norwegian School of Economics and Business Administration <https://core.ac.uk/reader/30799899>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME journal*, 11, 2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>

- Camacho, A., Fernández-Valiente, E. (2005). Un mundo dominado por los microorganismos. *Ecología microbiana de los lagos antárticos.. Ecosistemas*, 14(2). Recuperado a partir de <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/155>
- Camacho, A. (2006). Planktonic microbial assemblages and the potential effects of metazooplankton predation on the food web of lakes from the maritime Antarctica and sub-Antarctic islands. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5, 167–185. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-0003-2>
- Carrizo, D., Sánchez-García, L., Menes, R. J, García-Rodríguez, F. (2019). Discriminating sources and preservation of organic matter in surface sediments from five Antarctic lakes in the Fildes Peninsula (King George Island) by lipid biomarkers and compound-specific isotopic analysis. *Science of The Total Environment*, 672, 657-668.
- Cook, A. J. (2006). Retreating Glacier Fronts on the Antarctic Peninsula over the Past Half-Century. *Science* 308, 541-544. [10.1126/science.1104235](https://doi.org/10.1126/science.1104235)
- Cortés-López, N; Ordóñez-Baquera, P; Domínguez-Viveros, J. (2021). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 11(4), 1150-1173. doi: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- Del Giorgio, P. A., Scarborough, G. (1995). Increase in the proportion of metabolically active bacteria along gradients of enrichment in freshwater and marine plankton: implications for estimates of bacterial growth and production rates, *Journal of Plankton Research*, 17, 1905–1924, <https://doi.org/10.1093/plankt/17.10.1905>
- Del Giorgio, P., Cole, J. (1998). Bacterial Growth Efficiency in Natural Aquatic Systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 503-541.

- Dunlap, P.V. (2001). Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition), 280-291.
- Ducklow, H. (2000). Bacterial Production and Biomass in the Oceans. Microbial ecology of the oceans, 85-120.
- Ducklow, H. (2019). Encyclopedia of Ocean Sciences (Second Edition). Bacterioplankton, 269-275.
<https://doi.org/10.1016/B978-012374473-9.00493-8>.
- Fernández-Valiente, E. Camacho, A. Rochera, C. Rico, E. Vincent F., A. Quesada A. (2007). Community structure and physiological characterization of microbial mats in Byers Peninsula. Livingston Island (South Shetland Islands, Antarctica). FEMS Microbiology Ecology, 59, 377–385.
- Findlay, S., Sinsabaugh, L., Sobczak, W., Hoostal, M. (2003). Metabolic and structural response of hyporheic microbial communities to variations in supply of dissolved organic matter. Limnology and Oceanography 48, 1608–1617. 10.4319/lo.2003.48.4.1608
- Fowbert, J. A., Smith, R. I. L. (1994). Rapid population increases in native vascular plants in the Argentine Islands, Antarctic Peninsula. Arctic and Alpine Research, 26(3), 290-296.
- García-Rodríguez, F., Piccini, C., Carrizo, D., Sánchez-García, L., Pérez, L., Crisci, C., ...Lüning, S. (2021). Centennial glacier retreat increases sedimentation and eutrophication in Subantarctic periglacial lakes: A study case of Lake Uruguay. Science of The Total Environment, 754.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142066>
- Gerighausen, U., Brautigam, K., Mustafa, O., Peter, H. (2003). Expansion of vascular plants on an Antarctic island. A consequence of climate change? Antarctic biology in a global context. Backhuys Publishers, 79–83.

- Grossart, H.P., Hietanen, S., Ploug, H. (2003). Microbial dynamics on diatom aggregates in Øresund, Denmark. *Marine Ecology Progress Series* 249, 69–78.
- Grossart, H.P. (2010). Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. *Environment Microbiology*, 706-14. 10.1111/j.1758-2229..00179.x. PMID: 23766274.
- Hansson, L.A. (1992). The role of food-chain composition and nutrient availability in shaping algal biomass development. *Ecology*, 73, 241-247.
- Hansson, L. A., Lindell, M., Tranvik, L. J. (1993). Biomass distribution among trophic levels in lakes lacking vertebrate predators. *Oikos*, 66, 101-106.
- IAATO. (2020). IAATO Antarctic visitor figures 2019-2020, accessed 22.09.2020.
- Izaguirre, I., Vinocur, A., Mataloni, G., Pose, M. (1998). Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula) *Hydrobiologia*, 369-370, 10.1023/A: 101707041502
- Izaguirre, I., Allende L., Marinone, M.C. (2003). Comparative study of the planktonic communities of three lakes of contrasting trophic status at Hope Bay (Antarctic Peninsula) *Journal of Plankton Research* 25, 1079-1097.
- Izaguirre, I., Allende, L., Schiaffino, R.M. (2020). Phytoplankton in Antarctic lakes: biodiversity and main ecological features. *Hydrobiologia* 848, 177–207. doi: <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04306-x>
- Jordan, D. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32, 136-139.

- Junge, K., Eicken, H., Deming, J. (2004). Bacterial Activity at -2 to -20°C in Arctic Wintertime Sea Ice *ASM Journals Applied and Environmental Microbiology*, 70.
- Kjørboe, T., Grossart, H.P., Ploug, H., Tang, K. (2002). Bacterial colonization of sinking aggregates: mechanisms and rates. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 3996–4006.
- Krebs, C. J. (2001). *Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance*. 695 pp., Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., de la Escalera, G. M., ... & Piccini, C. (2017). A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean. *Harmful algae*, 70, 23-36.
- Laybourn-Parry, J., Quayle, W.C., Henshaw, T., Ruddell A. y Marchant, H. J. (2001). Life on the edge: the plankton and chemistry of Beaver Lake, an ultra-oligotrophic epishelf lake, Antarctica. *Freshwater Biology*, 46, 1205-1217.
- Laybourn-Parry, J. (2002). Survival mechanisms in Antarctic lakes. *Philosophical Transactions of The Royal Society. London Series B* 357, 863-869.
- Levins, R., Culver, D. (1971). Regional coexistence of species and competition between rare species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68, 1246–1248.
- Lyons, WB., Laybourn-Parry, J., Welch, KA., Priscu JC. (2006). Antarctic lake systems and climate change. *Trends in Antarctic terrestrial and limnetic ecosystems: Antarctica as a global indicator*. Springer, 273-295.
- Michael, R.F.M., Schaefer, C., Poelking, E.L., Simas, F.N.B., Fernandes, E.I., Bockheim, J.G. (2012). Active layer temperature in two Cryosols from

- King George Island, Maritime Antarctica. *Geomorphology*, 155, 1-12. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2011.12.013>
- Meiners, K., Krembs, C., Gradinger, R. (2008). Exopolymer particles: microbial hotspots of enhanced bacterial activity in Arctic fast ice (Chukchi Sea). *Aquatic Microbiology Ecology*, 52, 195-207. <https://doi.org/10.3354/ame01214>
 - Meyer, M., Stenzel, U., Hofreiter, M. (2008). Parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Nature Protocols*, 3, 267–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.520>
 - Morel, M. A., Braña, V., Martínez-Rosales, C. (2015). Five-year biomonitoring of aquatic ecosystems near Artigas Antarctic Scientific Base, King George Island. *Adv Polar Science*, 26, 102–106.
 - Oliva, M., Navarro, F., Hrbacek, F., Hernández, A., Nyvut, D., Pereira, P. (2017). Recent regional climate cooling on the Antarctic Peninsula and associated impacts on the cryosphere. *Science of the Total Environment*, 580, 210- 223
 - Pace, M., Cole, J., Carpenter, S., Kitchell, J. (1999) Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution*. 483-488. 10.1016/s0169-5347(99)01723-1.
 - Parnikoza, I., Convey, P., Dykyy, I., Trokhymets, V., Milinevsky, G., Tyschenko, O., Inozemtseva, D., Kozeretska, I. (2009). Current status of the Antarctic herb tundra formation in the Central Argentine Islands. *Global Change Biology* 15, 1685-1693. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01906.x>
 - Pearce, D. A. (2003). Bacterioplankton Community Structure in a Maritime Antarctic Oligotrophic Lake during a Period of Holomixis, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Fluorescence in Situ Hybridization (FISH). *Microbial Ecology*, 46, 92–105. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2039-3>

- Peck, L., Convey, P., Barnes, D. (2006). Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: tempos, timings and predictability. *Biological Reviews*, 81, 75-109. doi: 10.1017/S1464793105006871
- Picazo, A., Rochera, C., Villaescusa, J.A., Miralles-Lorenzo, J., Velázquez, D., Quesada, A., Camacho, A. (2019). Bacterioplankton community composition along environmental gradients in lakes from Byers Peninsula (Maritime Antarctica) as determined by next-generation sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- Porter, K. G., Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and oceanography*, 25(5), 943-948.
- Protocolo al Tratado Antártico sobre Protección del Medio Ambiente, ANEXO 3. Recuperado a partir de <https://www.gub.uy/ministerio-defensa-nacional/institucional/normativa/anejo-iii-protocolo-tratado-antartico-sobre-proteccion-del-medio-ambiente>
- Quayle, W.C. (2002). Extreme Responses to Climate Change in Antarctic Lakes. *Science* 295, 645–645. doi: 10.1126/science.1064074
- Roberts, E. C., Laybourn-Parry, J., McKnight, D. M. y Novarino, G. (1999). Stratification and dynamics of microbial loop communities in Lake Fryxell. *Freshwater Biology*, 44, 649-661.
- Rochera, C. Justel, E. Fernández-Valiente, M. Bañón, M Rico, E. Toro, M Camacho A., Quesada. A. (2010). Interannual meteorological variability and its effects on a lake from maritime Antarctica. *Polar Biology*, 33, 1615–1628.
- Rochera, C., Villaescusa, J., Díazmacip, M., Gil-Delgado, J., Toro, M., Rico, E., Velázquez, D., Quesada, A., Camacho, A. (2010). Interacciones bióticas en lagos Antárticos. Investigaciones derivadas del proyecto LIMNOPOLAR en la Península Byers (Antártida marítima): . *Ecosistemas*, 20(1). Recuperado a partir de <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/10>

- Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K., Ridgway, H.F. (1992). Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 1801–1808
- Rosselló-Mora, R., Bo, T., Schäfer, H., Weller, R., Amann, R. (1999). The Response of the Microbial Community of Marine Sediments to Organic Carbon Input under Anaerobic Conditions., 22(2), 237–248. [10.1016/s0723-2020\(99\)80071-x](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(99)80071-x)
- Schiaffino, R. M., Unerein, F., Gasol, J.M., Massana, R., Balagué, V., Izaguirre, I. (2011). Bacterial community structure in a latitudinal gradient of lakes: the roles of spatial versus environmental factors. *Freshwater Biology*, 56, 1973-1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02628.x>
- Schiffer, M.B. (2013). Scientific Expeditions to Antarctica. In: *The Archaeology of Science. Manuals in Archaeological Method, Theory and Techniques*. Springer, 9. https://doi.org/10.1007/978-3-319-00077-0_10
- Schmidt, R., Mausbacher, R., Müller, J., (1990). Holocene diatom flora and stratigraphy from sediment cores of two Antarctic lakes (King George Island). *J. Paleolimnol.* 3, 55–74.
- Serrano Cañadas, E. (2001). Espacios protegidos y política territorial en las islas Shetland del Sur (Antártida). *Boletín De La Asociación De Geógrafos Españoles*. Recuperado a partir de <https://bage.age-geografia.es/ojs/index.php/bage/article/view/385>
- Sherr, B.F., Del Giorgio, P.A., Sherr, E.B. (1999). Estimating abundance and single cell characteristics of actively respiring bacteria via the redox dye, CTC. *Aquatic Microbiology Ecology* 18, 117-131.
- Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B., Ploug, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbiology Ecology*, 28, 175–211.

- Simmons, G. M., Vestal, J. R. y Wharton, R. A. (1993). Environmental regulators of microbial activity in continental Antarctic lakes. *Antarctic Microbiology*, 491-541.
- Smith, R. (1990). Signy Island as a paradigm of biological and environmental change in Antarctic terrestrial ecosystems. In: *Antarctic Ecosystems. Ecological Change and Conservatio*. Springer, 32–50.
- Smith, R. (1994). Vascular plants as bioindicators of regional warming in Antarctica. *Oecologia* 99, 322–328. <https://doi.org/10.1007/BF00627745>
- Smith, R. (2003). The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica. *Antarctic Biology in a Global Context* Backhuys, Leiden, 234–239.
- Stocker, R., Seymour, J.R., Samadani, A., Hunt, D.F., and Polz, M. (2008). Rapid chemotactic response enables marine bacteria to exploit ephemeral microscale nutrient patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 4209-4214.
- Toro, M., Camacho, A., Rochera, C., Rico, E., Bañón, M., Fernández-Valiente, E. Marco, E., Avendaño, C., Ariosa, Y., Quesada, A. (2007). Limnological characteristics of the freshwater ecosystems of Byers Peninsula, Livingston Island, in maritime Antarctica. *Polar Biology*, 30, 635-649. doi: 10.1007/s00300-006-0223-5
- Tort, L., Iglesias, K., Bueno, C., Lizasoain, A., Salvo, M., Cristina, J., Kandratavicius, N., Pérez, L., Figueira, R., Bicego, M.C., Taniguchi, S., Venturini, N., Brugnoli, E., Colina, R., Victoria, M. (2017). Wastewater contamination in Antarctic melt-water streams evidenced by virological and organic molecular markers. *Science* 609, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.127>.
- Tranvik, L. J. y Hansson, L. A. (1997). Predator regulation of aquatic microbial abundance in simple food webs of Subantarctic lakes. *Oikos*, 79, 347-356.

- Turner, J., Colwell, S. R., and Harangozo, S. (1997). Variability of precipitation over the coastal western Antarctic Peninsula from synoptic observations, *Journal of Geophysical Research* 102(D12), 149-168, 10.1029/96JD03359.
- Vega, S., Sánchez. L., Prieto, O. (2021). Molecular and isotopic biogeochemistry on recently-formed soils on King George Island (Maritime Antarctica) after glacier retreat upon warming climate. *Science Total Environment*, 755 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142662>.
- Villaescusa, J. A., Rochera, Velázquez, D. Rico, E., Quesada, A., Camacho, A. (2013). Bacterioplankton summer dynamics in a maritime Antarctic lake Limnetica Volumen 32, 253- 268.
- Vincent, W. F., Hobbie, J. E., Laybourn-Parry, J. (2008). Introduction to the limnology of high latitude lake and river ecosystems. *Polar lakes and rivers: limnology of Arctic and Antarctic aquatic ecosystems*, 1-24.
- Watcham, E.P., Bentley, M.J., Hodgson, D.A., Roberts, S.J., Fretwell, P.T., Lloyd, J.M., Larter, R.D., Whitehouse, P.L., Leng, M.J., Monien, P., et al. (2011). A new Holocene relative sea level curve for the South Shetland Islands, Antarctica. *Quaternary Science Reviews* 30, 3152–3170.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial Evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 51, 221-271.
- Yawata, Y., Cordero, OX., Menolascina, F., Hehemann, JH., Polz, MF., Stocker, R. (2014). Competition-dispersal tradeoff ecologically differentiates recently speciated marine bacterioplankton populations. 5622–5627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318943111>