

BOMBA DE CARBONO MICROBIANA A LO LARGO DEL CICLO HIDROLOGICO DE UNA LAGUNA COSTERA



Valentina AMARAL ACOSTA

Tesis de Maestría en Geociencias
Centro Universitario Regional Este
Universidad de la República

PEDECIBA

Tutor: Dra. Cecilia Alonso (Centro Universitario Regional Este)

Co-tutor: Dr. Danillo Calliari (Facultad de Ciencias)

Rocha, 2015



INSTITUT FOR BIOSCIENCE
AARHUS UNIVERSITET

Página de Aprobación

Nombre Director de Tesis: Dra. Cecilia Alonso

Co- Director de Tesis: Dr. Danilo Calliari

Tribunal: Dra. Claudia Piccini, Dra. Mariana Meerhoff y Dr. Hugo Sarmiento

Fecha: 24/06/2015

Calificación: Aprobado con Mención

Autor: Valentina Amaral

Agradecimientos...

Quiero agradecer a mi tutora, Cecilia, por su dedicación, confianza, buena predisposición y entusiasmo durante mi trabajo de tesis y enseñarme todo lo que sabe sobre el fascinante mundo de la Ecología Microbiana. A mi cotutor, Danilo por sus aportes y apoyo durante este tiempo.

Además, quiero agradecer a mis compañeros de grupo del CURE por su buena predisposición para poder dedicarme a mi tesis. A Florencia por su compañía y ayuda en los muestreos y en el laboratorio durante mi embarazo. A Irene por las catarsis de oficina. A los Guardaparques de la Laguna de Rocha, Héctor y Andrés por su ayuda durante los muestreos. A Martina Díaz, Carolina Lescano y Lorena Rodríguez por los análisis de nutrientes; a Lorena además por compartir datos de la Laguna. A Carolina Crisci y Mathias Bourel por su invaluable ayuda con los análisis estadísticos. A Cristina Romera-Castillo por su ayuda y guía en los comienzos, cuando no teníamos ni idea de los settings para medir fluorescencia y hacer las matrices. A Daniel Graeber por recibirme en Dinamarca en su laboratorio y enseñarme a analizar los datos de fluorescencia. A los uruguayos Nico, Iván, Marce y Cintia (y demás compañeros) por su cálido recibimiento por aquellos lares. A Ron Benner por ayudarme y guiarme con la interpretación de los datos en la caracterización de la materia orgánica disuelta y por sus aportes para mejorar este trabajo.

También quisiera agradecer a quienes me permitieron usar equipos: Luis Aubriot, Sección Limnología, Facultad de Ciencias, al Instituto Pasteur, Montevideo y al Departamento de Química del CURE.

Personalmente quisiera agradecer a mi familia, Gastón y Salvador; por su apoyo, su tiempo dedicado para que yo pueda realizar la tesis y acompañarme siempre. A Gastón, además por ayudarme con los muestreos y acertijos de la Laguna (y con la portada de la tesis!). A mis padres por su apoyo incondicional y a mis hermanos por siempre estar ahí.

Durante esta etapa tuve los apoyos de la ANII, Becas de posgrado Nacionales 3410, CSIC Programa Grupos I+D-1037 Ecología Funcional de Sistemas Acuáticos.

Índice

Resumen	IV
Listado de Siglas	VI
Introducción general	1
Objetivo general y específicos	8
Hipótesis y predicciones	8
Capítulo I: Ciclo hidrológico de Laguna de Rocha y dinámica de la concentración de carbono orgánico disuelto	
I.1. Introducción	11
I.2. Materiales & Métodos	13
I.3. Resultados y Discusión	17
I.4. Conclusiones	36
Capítulo II: Calidad de la materia orgánica disuelta a lo largo del ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha	
II.1. Introducción	38
II.2. Materiales & Métodos	44
II.3. Resultados y Discusión	54
II.4. Conclusiones	73
Capítulo III: Abundancia y producción bacteriana a lo largo del ciclo hidrológico de la laguna de rocha	
III.1. Introducción	76
III.2. Materiales & Métodos	79
III. 3. Resultados y Discusión	83
III.4. Conclusiones	117
Discusión general	118
Perspectivas	126
Bibliografía	128
ANEXO I: Estandarización y Modelado de la materia orgánica	136
ANEXO II: Actividades realizadas durante la Maestría	144
ANEXO III: Publicaciones	147

Resumen

La materia orgánica disuelta (MOD) es la forma más abundante de carbono en estado reducido en los sistemas acuáticos, y uno de los reservorios más grandes de carbono orgánico del planeta. El papel de la MOD en los diferentes procesos ecosistémicos en los cuales participa está condicionado en relación a su origen, concentración y composición, por lo que dilucidar su dinámica temporal y espacial en los diferentes tipos de sistemas acuáticos es clave para entender su importancia a escala local y global.

Las bacterias heterotróficas son los principales consumidores y productores de MOD en los sistemas acuáticos. La bomba de carbono microbiana (BCM), ha sido recientemente propuesto como el mecanismo más importante de almacenamiento de carbono por los océanos. De corroborarse esta hipótesis, ello implica que una parte sustancial del control de la reacción de los sistemas acuáticos al cambio climático, estaría mediada por los microorganismos que los habitan.

El objetivo general de esta tesis fue evaluar la dinámica de la MOD a lo largo de un ciclo hidrológico completo de una laguna costera (Laguna de Rocha) y su relación con la dinámica de los principales grupos bacterianos en los sistemas acuáticos. A su vez, a la luz del reciente descubrimiento de la BCM, exploramos el rol de diferentes grupos microbianos en la degradación y producción de materia orgánica recalcitrante mediante experimentos de biodegradación que incluyen la evaluación de potenciales efectos causados por cambios en su calidad a través de un disparador (ej. adición de compuestos lábiles).

La tesis tuvo 4 objetivos principales estructurada en 3 capítulos:

- i. Determinar los cambios en la concentración del carbono orgánico disuelto (COD) a lo largo del ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha y su relación con distintas variables fisicoquímicas (Capítulo 1)
- ii. Determinar los cambios en la composición de la MOD a lo largo del ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha (Capítulo 2)
- iii. Determinar la dinámica de los principales grupos bacterianos y su relación con la composición de la MOD y las variables fisicoquímicos que caracterizan las distintas fases del ciclo hidrológico (Capítulo 3)
- iv. Conocer el rol de diferentes grupos microbianos en el consumo y producción de MOD de diferente grado de labilidad (Capítulo 3)

Para cumplir con estos objetivos, se determinaron distintas variables ambientales y se realizó una caracterización fisicoquímica exhaustiva de la MOD, mediante el empleo de sus propiedades ópticas (absorbancia y fluorescencia). La abundancia de los principales grupos bacterianos fue evaluada utilizando la técnica molecular hibridación *in situ* con sondas fluorescentes.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que la dinámica de la MOD es altamente variable a lo largo del ciclo hidrológico del sistema. Existe una predominancia en el aporte de MOD de producción *in situ* debido a la actividad microbiana modulado notoriamente por factores tales como la temperatura y la hidrología del sistema. Por último, se observaron distintos patrones en el uso (consumo/producción) y preferencias de la MOD por parte de los principales grupos bacterianos analizados, los cuales además estarían fuertemente controlados por las características de ésta.

Palabras claves: Materia orgánica disuelta, propiedades ópticas, bomba de carbono microbiana, laguna costera.

Listado de Siglas

MOD: Materia orgánica disuelta

CMOD: Materia orgánica disuelta cromofórica

FMOD: Materia orgánica disuelta fluorescente

RMOD: Materia orgánica disuelta recalcitrante

BCM: Bomba de carbono microbiana

COD: Carbono orgánico disuelto

BCOD: COD biodegradable

NOD: Nitrógeno orgánico disuelto

NTD: Nitrógeno total disuelto

PTD: Fósforo total disuelto

SS: Pendientes espectrales

a_{350} : Índice cuantitativo de CMOD

SUVA: Índice de aromaticidad

FI: Índice de fluorescencia

HIX: Índice humificación

BIX: Índice de frescura

PM: Peso molecular

BPM: Bajo peso molecular

APM: Alto peso molecular

CCB: Composición comunidad bacteriana

Introducción General

La materia orgánica disuelta (MOD) es la forma más abundante de carbono en estado reducido en los sistemas acuáticos, y uno de los reservorios más grandes de carbono orgánico del planeta - aproximadamente equivalente al reservorio atmosférico de CO₂- (Hedges et al. 2000), teniendo una importancia crucial en el ciclo de este elemento a escala global.

Además de su rol clave en el ciclo global del C, la MOD tiene una gran importancia en el control de diversos procesos ecosistémicos, como por ejemplo en la regulación de la penetración de la luz (Wetzel, 2001), el pH (García-Gil et al. 2004), reacciones fotoquímicas (Stubbins et al. 2008), interacción con metales pesados (Yamashita & Jaffe 2008) y otros contaminantes orgánicos (Chin, 2003) y como sustrato fundamental para el desarrollo de las comunidades microbianas (Hood et al. 2009, Tranvik, 1998). Para una exhaustiva revisión de los roles de la MOD en sistemas acuáticos ver Coble et al. 2014.

El papel de la MOD en los diferentes procesos ecosistémicos está condicionado en relación a su origen, concentración y composición (Benner, 2003), por lo que dilucidar su dinámica temporal y espacial, abordando aspectos cuanti y cualitativos, es clave para entender su importancia a escala local y global. En este contexto, el carbono orgánico disuelto (COD) es usualmente empleado como un parámetro cuantitativo de MOD. Además, la caracterización de la MOD debería estar incluida en la mayoría de los estudios biogeoquímicos (Jaffe et al. 2008) ya que se observa una falta de trabajos a largo plazo en este tema así como la comparación entre distintos sistemas que evalúen específicamente la composición de la MOD (Dittman et al. 2007).

Las bacterias heterotróficas son los principales consumidores de MOD en los sistemas acuáticos, y su consiguiente metabolismo ha sido históricamente considerado como uno de los sumideros de COD más grandes del planeta (Ducklow et al. 1986, Sherr et al. 1987). Un rol menos reconocido es el hecho de que estas comunidades microbianas puedan también actuar como fuente de MOD en los sistemas acuáticos (Ogawa et al. 2001, Jiao et al. 2010, Guillemete & Del Giorgio, 2012). Uno de los procesos de producción de MOD es la transformación microbiana de materia orgánica lábil (de fácil degradación) en materia orgánica recalcitrante (RMOD, de difícil degradación). Esta transformación ha sido ampliamente reportada, tanto en sistemas de comunidades acuáticas naturales (Brophy & Carlson 1989, Tranvik, 1993, Heissenberger & Herndl 1994, Ogawa et al. 2001), como en sistemas experimentales utilizando cultivos mono-específicos (Gruber et al. 2006). Dicho proceso se ha denominado bomba de carbono microbiana (BCM), en analogía a la bomba biológica y a la bomba de solubilidad, y ha sido recientemente propuesto como el mecanismo más importante de almacenamiento de carbono por los océanos (Jiao et al. 2010). De corroborarse esta hipótesis, ello implica que una parte sustancial del control de la reacción de los sistemas acuáticos al cambio climático estaría mediada por los microorganismos que lo habitan (Ogawa et al. 2001, Jiao et al. 2010).

Dentro del marco teórico de la BCM, una línea de particular interés es comprender el rol de los distintos grupos bacterianos en el ciclado de distintos componentes de la MOD. Existe considerable evidencia de campo y laboratorio de que los principales grupos bacterianos difieren en la utilización de distintas fracciones de la MOD. Estas diferencias se han observado tanto en lo que respecta a la calidad -como por ejemplo preferencia por componentes de alto o bajo peso molecular- (Cottrell & Kirchman, 2000, Alonso & Pernthaler 2006a), como a la concentración de determinados componentes de la MOD (Alonso & Pernthaler 2006b). A su

vez, estos patrones están influidos por diferencias en el rango de plasticidad metabólica que tienen distintos organismos (Giovannoni et al. 2005) y por factores ambientales, observados por ejemplo a lo largo de ciclos estacionales (Alonso-Saez & Gasol 2007, Vila-Costa et al. 2007), o gradientes fisicoquímicos (Alonso-Sáez et al. 2007, Alonso et al. 2009).

La importancia relativa de los distintos procesos que determinan la producción/destrucción de la RMOD en ambientes acuáticos (fotólisis, floculación, metabolismo microbiano) depende en gran medida de condiciones ambientales como salinidad, penetración de la luz (Tranvik & Bertilsson, 2001), concentración de nutrientes (Jiao et al. 2011), así también como del origen y composición de la materia orgánica sometida a las transformaciones (ej. alóctona/autóctona) (Obernosterer & Benner 2004, Jiao et al. 2010).

En este sentido, los sistemas costeros son particularmente interesantes como modelo de estudio, ya que dentro de un mismo cuerpo de agua es posible encontrar marcados gradientes fisicoquímicos, especialmente de salinidad, penetración de la luz y disponibilidad de nutrientes (Hauenstein & Ramírez, 1986). En estos ambientes la hidrología determina en gran parte las características ecosistémicas (Mann, 2000). Además son áreas destacadas por su biodiversidad y por proveer importantes servicios ecosistémicos (Rodríguez-Gallego et al. 2010), contribuyendo en gran medida al bienestar de los habitantes y visitantes de su área de influencia. Son cuerpos de agua someros que se caracterizan por ser sitio de conjunción entre dos flujos hidrológicos: la descarga de agua continental proveniente de los tributarios y las intrusiones marinas (Kjerfve, 1994).

En aguas estuarinas la bomba biológica, que se basa en el hundimiento de carbono, sería ineficiente debido a la poca profundidad, el fuerte proceso de mezcla y la intensa resuspensión de las partículas,

característicos de estos sistemas (Conde et al. 2000); por el contrario, la BCM, que se basa en el COD, no está influenciada por las condiciones físicas sino por las condiciones químicas del lugar (Jiao et al. 2011). Además, en los sistemas de transición terrestre-marina, la concentración y calidad de la MOD son el resultado de una combinación entre los aportes desde la cuenca, (MOD alóctona) y la producción *in situ*, (MOD autóctona) (Hudson et al. 2007). Debido a la variabilidad temporal y espacial de estos procesos, en estos sistemas la composición de la MOD es altamente variable (Stedmon et al. 2003 , Sachse et al. 2005). Además son sistemas muy vulnerables y se ven cada vez más sometidos a fuertes presiones antropogénicas, pasibles de causar efectos irreversibles en su funcionamiento (Scheffer, 2009).

En Uruguay se encuentra una extensa área de lagunas costeras, las cuales se conectan con el Océano Atlántico. Sobre sus cuencas se asientan ciudades y poblados pesqueros donde se realizan actividades productivas de distinta índole (i.e. agricultura, forestación, ganadería). Esto genera el aumento en la carga de nutrientes exportados desde la cuenca (Huisman et al. 2005, Paerl & Huisman 2009) los cuales estarían asociados a la intensificación de la producción bacteriana y por ende causando aumento en la descomposición de la MOD (Reche et al. 1998).

El presente trabajo procura realizar por primera vez un estudio exhaustivo de caracterización de la MOD en una laguna costera (Laguna de Rocha) en relación a los principales grupos bacterianos a lo largo de un ciclo hidrológico completo. A su vez, a la luz del reciente descubrimiento de la BCM, nos interesa explorar el rol de estos grupos en la degradación y producción de la RMOD mediante experimentos de biodegradación que incluyen la evaluación de potenciales efectos causados por cambios en su calidad a través de un disparador (ej. adición de compuestos lábiles).

Área de estudio: Laguna de Rocha

La Laguna de Rocha es una laguna costera, somera, situada al este del Uruguay en el Departamento de Rocha (Fig.1). El sistema está física y ecológicamente estructurado por la apertura de una barra de arena que separa la laguna del Océano Atlántico. La barra de arena se abre naturalmente varias veces al año, lo que permite la intrusión de las aguas costeras. La interacción de las masas de agua de origen continental con agua de mar provoca varios procesos que regulan el comportamiento general del sistema, produciendo gradientes fisicoquímicos y permitiendo el funcionamiento natural de esta laguna y sus humedales litorales asociados (Conde et al. 1999, 2000). Según Conde et al. 2000, este sistema exhibiría un ciclo hidrológico que consta de tres fases donde los gradientes fisicoquímicos y biológicos se establecen y destruyen rápidamente, incluyendo a la concentración y calidad de la MOD.

Por otro lado, estudios previos han mostrado que en la Laguna de Rocha, la comunidad microbiana muestra una alta abundancia, productividad y diversidad, observándose cambios estacionales (Piccini et al. 2006) en estas características, y también en relación a los gradientes dados por la hidrología del sistema (Alonso et al. 2013). Por ejemplo, la salinidad juega un papel clave en la distribución de los distintos grupos bacterianos encontrando a las *Betaproteobacteria* a baja conductividad y a las *Alfaproteobacteria* en condiciones más salobres (Piccini et al. 2006).

En lo referido a la relación comunidad bacteriana-MOD, Alonso et al. 2013 mostraron evidencia de que: i) la comunidad bacteriana en la laguna sufriría limitación de carbono, ii) diferentes grupos bacterianos presentan diferentes estrategias para lidiar con esta limitación, y iii) el ciclo hidrológico de la laguna juega un papel fundamental en modular dicha limitación. En dicho trabajo se propuso un modelo de la dinámica de la

comunidad microbiana centrado en el procesamiento de carbono a lo largo del ciclo (Fig. 2), como hipótesis de partida para estudios siguientes. En particular, queda sin dilucidar si la limitación por carbono sugerida se debería a la cantidad o a la calidad de la MOD disponible.



Fig. 1. Mapa del sistema de estudio, Laguna de Rocha, indicando tributarios y puntos de muestreo (N: Norte, C: Centro y S: Sur). www.googlemap.com.

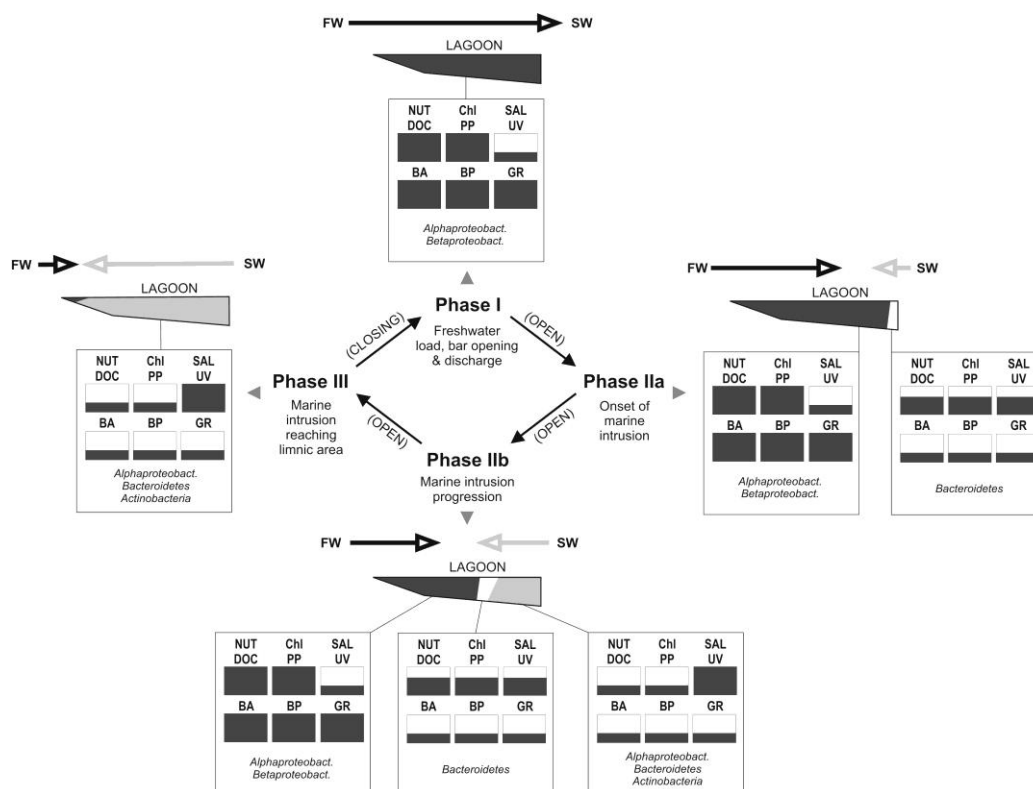


Fig.2. Modelo Ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha propuesto por Alonso et al. 2013 indicando los cambios en las variables abióticas claves y sus consecuencias sobre la comunidad bacteriana. Las variables abióticas y microbianas se indican como de bajo, medio o alto valor (un tercio, dos tercios o el cuadrado entero en negro, respectivamente). Se indican los principales procesos hidrológicos para cada fase. Las flechas indican la magnitud y dirección del movimiento del agua (FW: Entrada de agua dulce de la cuenca; SW: intrusión de agua de mar de la zona costera; Nut: nutrientes (N y P); DOC: carbono orgánico disuelto; Sal: salinidad; UV: radiación UV, BA: abundancia bacteriana; BP: producción bacteriana; GR: pastoreo sobre las bacterias). En cada condición representada se indican los principales grupos de bacterias que componen la comunidad bacteriana en términos de abundancia y producción de carbono (tomado de Alonso et al. 2013).

Dentro de este marco teórico se proponen los siguientes objetivos, hipótesis y predicciones.

Objetivos generales y específicos.

Objetivo general:

Evaluar la dinámica de materia orgánica disuelta a lo largo del ciclo hidrológico de una laguna costera (Laguna de Rocha) y su relación con la dinámica de la comunidad bacteriana.

Los objetivos específicos incluyen:

- i) Determinar los cambios en la concentración de COD a lo largo del ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha y su relación con distintas variables fisicoquímicas (Capítulo 1)
- ii) Determinar los cambios en la composición de la MOD a lo largo del ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha (Capítulo 2)
- iii) Evaluar la dinámica de los principales grupos bacterianos y su relación con la composición de la MOD y las variables fisicoquímicos que caracterizan las distintas fases del ciclo hidrológico (Capítulo 3)
- iv) Conocer el rol de diferentes grupos microbianos en el consumo y producción de MOD de diferente grado de labilidad (Capítulo 3)

Hipótesis y Predicciones:

Hipótesis 1:

El ciclo hidrológico es un factor clave en la regulación de la composición y concentración de la MOD en la Laguna de Rocha.

Predicciones:

- i) La concentración de COD varía con la fases del ciclo siendo mayor durante la fase I y en la zona Norte que en la Sur.
- ii) Durante la Fase II (Zonada) la MOD en la zona Norte sería más recalcitrante (origen terrestre), mientras que en el Sur estaría más biodisponible (producción autóctona).

Hipótesis 2:

El metabolismo bacteriano es uno de los factores con mayor influencia en la determinación de la composición y concentración de la MOD en el sistema, la cual actúa consumiendo y produciendo MOD en distintas fracciones del *pool* de MOD.

Predicciones:

- i. los diferentes grupos bacterianos se relacionan con distintos componentes de la MOD.
- ii. de existir limitación por carbono en la comunidad bacteriana, estaría dada por la composición de la MOD y no por la concentración.

Esta tesis se encuentra estructurada en tres capítulos. En el capítulo 1 se detalla el ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha, con énfasis en la concentración COD, en el capítulo 2 se describe la dinámica de la composición de la MOD empleando sus propiedades ópticas, tales como absorbancia y fluorescencia, y el capítulo 3 detalla la dinámica de los

principales grupos bacterianos en el sistema, así como su relación con la composición de la MOD y el resto de las variables fisicoquímicas.

Capítulo 1: Ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha y dinámica de la concentración de carbono orgánico disuelto.

I.1. Introducción

En este trabajo, el sistema de estudio es una laguna costera, Laguna de Rocha, localizada al Este del Uruguay (Fig. 1). Debido a su alta productividad, los sistemas costeros son particularmente relevantes para el ciclo global del carbono, contribuyendo desproporcionadamente al mismo en relación a su tamaño y uniendo las fases terrestres y marinas de los ciclos biogeoquímicos (Schlesinger, 1997).

La Laguna de Rocha exhibiría un ciclo hidrológico que consta de tres fases donde los gradientes fisicoquímicos y biológicos se establecen y destruyen rápidamente según lo descrito por Conde et al. 2000 y Alonso et al. 2013. En la denominada fase I del ciclo, caracterizada por la descarga de agua dulce desde los tributarios, la laguna presentaría características fisicoquímicas homogéneas, dadas por altas cargas de componentes orgánicos e inorgánicos disueltos y particulados, altos valores de clorofila *a* (*chl a*) y producción primaria, con una conductividad entre 3 y 8 ms cm⁻¹ (oligohalina, según el Sistema de Venecia). Esta fase duraría entre 3 semanas y 3 meses, hasta que el aumento del nivel del agua conduce a la apertura de la barra de arena, y en consecuencia, a la descarga del agua del Océano Atlántico. En la fase II, luego de la intrusión de agua marina bajo la influencia de los vientos del Suroeste, se desarrollaría progresivamente un gradiente de salinidad. En esta fase, la zona Sur cambia a una condición meso-polihalina (10 a 45 ms cm⁻¹, Sistema Venecia) y se caracteriza por un bajo contenido de nutrientes, *chl a* y producción primaria, y alta penetración de rayos UV. Mientras que la zona Norte permanecería oligohalina (3 a 8 ms cm⁻¹). Esta fase duraría de

1 a 2 semanas hasta 4 meses, habiéndose postulado como el estado más frecuente de la laguna. La fase III se iniciaría cuando los vientos del Suroeste mueven las masas de aguas salinas más al Norte provocando una condición meso- polihalina en toda la laguna. Esta fase no sería muy frecuente y por lo general tendría una duración de 1 a 3 semanas (Conde et al. 2000).

En lo referido a la concentración de COD, sería relativamente elevada y altamente variable (150 (barra abierta) a 458 μM (barra cerrada) en la zona Sur vs 442 (barra cerrada) a 683 (barra abierta) μM en la zona Norte) (Conde et al. 2000) debido al aporte de diversas fuentes como por ejemplo: descarga de los ríos y conexión al océano (Fig.1), producción *in situ*, humedales asociados (Conde & Sommaruga, 1999), fotodegradación (Piccini et al. 2009, 2013), escorrentía. En este sentido, la hidrología sería un factor clave en el control de la entrada de COD al sistema.

En base a estos datos, la zona Norte se caracterizaría por una mayor producción primaria, por lo que habría más COD disponible en esta zona, aunque de una calidad más refractaria, debido a los componentes de origen terrestre, que en su mayoría no llegaría a la parte Sur de la Laguna (Conde et al. 2000). Cabe destacar, que los últimos datos de COD medidos en el sistema son escasos y datan de más de 15 años atrás (1997-1999, Conde et al. 2000, 2002).

En este capítulo se analizan los cambios en la concentración del COD a lo largo del ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha. Para ello se procuró cubrir un ciclo hidrológico anual del sistema y determinar la relación de la dinámica del COD con distintas variables, como por ejemplo, la salinidad, temperatura, y nutrientes, como el amonio (NH_4), nitrato (NO_3), nitrito (NO_2) y fosfato (PO_4).

I.2. Materiales y Métodos

I.2.1. Área de estudio: Laguna de Rocha

La Laguna de Rocha (34° 33' S, 54° 22' O) es un sistema somero con un área de 72 km² y una profundidad media de 0,6 m, cuya cuenca abarca 1.312 km². Está incluida en la Reserva de Biósfera “Bañados del Este” (MaB-UNESCO) y es un sitio Ramsar. Pertenece al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) y cuenta con un Plan de Manejo (Rodríguez-Gallego et al. 2008).

El uso del suelo predominante en la cuenca al 2011 es la ganadería sobre pastizales, seguido por forestación y agricultura (Nin, 2013). El uso urbano, incluye a la capital departamental con ca. 25.500 habitantes (INE 2011). Además, este sistema cuenta con numerosos estudios en relación a aspectos biológicos, ecológicos y sociales que permitieron construir una Base de Datos de calidad de agua con registros de más de 20 años (Sección Limnología y la Sección Oceanografía de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, sin publicar).

I.2.2. Muestreos y mediciones de campo

Se realizaron nueve muestreos en los meses de Febrero, Marzo, Abril, Mayo, Junio, Noviembre y Diciembre del 2013 y Enero y Abril 2014, con el fin de maximizar las posibilidades de cubrir el ciclo hidrológico de la laguna, es decir de encontrar el sistema en las tres fases mencionadas anteriormente (Conde et al. 2000, Alonso et al. 2013). Los muestreos se realizaron con una embarcación de tipo Zodiaco y se tomaron muestras de agua superficial en 3 estaciones (Norte, Centro y Sur, Fig. 1) *a priori* representativas de las diferentes zonas de la laguna. Se colectaron 5 litros de agua por zona, manteniéndose las muestras frescas y en oscuridad

hasta su procesamiento en el laboratorio, que ocurrió como máximo dos horas más tarde.

In situ se determinaron las siguientes variables: conductividad (K, mS cm^{-1}), temperatura (T, $^{\circ}\text{C}$), pH y concentración de oxígeno (OD, mgL^{-1}), empleando un multi parámetro Horiba.

I.2.3. Trabajo de laboratorio

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron filtradas por gravedad en material de vidrio, a través de filtros GF/F. Los filtros y todo el material de vidrio empleado fueron previamente quemados a 450°C durante 4 horas. A partir de este filtrado se guardaron diferentes alícuotas para los análisis subsiguientes. Para la determinación de NH_4 , NO_3 , NO_2 , PO_4 , fósforo y nitrógeno total disuelto (PTD y NTD, respectivamente) se conservaron congelados 500 ml de cada muestra a -20°C . Para el análisis de COD se tomaron alícuotas de 20 ml de muestra previamente acidificada con 150 μl de HCl al 10% hasta alcanzar $\text{pH} < 2$. Dichas alícuotas fueron también mantenidas a -20°C .

I.2.4. Análisis de nutrientes

Las determinaciones de nutrientes se realizaron siguiendo los protocolos estándares de métodos colorimétricos, en base a reacciones químicas de desarrollo de color, evaluadas a través de mediciones en espectrofotómetro. Se realizó el procedimiento de Murphy & Riley (1962) para el PO_4 , de Mackereth et al. 1978 para NO_3 , de Koroleff (1970) para NH_4 , Strickland & Parsons (1972) para NO_2 y Arocena & Conde 1999 para el NTD y PTD. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 ubicado en el CURE-Rocha.

El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) se calculó como la suma de las formas inorgánicas (NH_4 , NO_3 y NO_2) y el nitrógeno orgánico disuelto (NOD) como la resta entre el NTD y el NID (Vázquez et al. 2011).

Para la determinación de COD, las muestras se analizaron según Benner et al. 1993 con un analizador de carbono y nitrógeno total (TOC/TN, Serie L, Shimadzu) ubicado en el CURE-Rocha. Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente previo al análisis, se realizaron 3 inyecciones por muestra donde se calculó el promedio con un coeficiente de variación menor al 1.5%. Como blanco se empleó agua Milli Q con una concentración de COD menor a 0.07 mg C L^{-1} y para construir la curva de calibración se utilizó ftalato de potasio. El COD se midió como el carbono orgánico no purgable (NPOC). Esto es, en la muestra acidificada todo el carbono inorgánico es convertido en CO_2 y eliminado (purgado), luego el carbono medido corresponde al carbono no purgable, es decir el COD.

I.2.5. Análisis estadísticos

Para evaluar la relación entre las distintas variables fisicoquímicas y la concentración de COD se empleó un enfoque de tipo correlativo. El tipo de correlación empleada fue el test de correlación no paramétrico de Spearman (r) el cual se definió en función de la estructura de los datos. Para determinar diferencias temporales y entre zonas de muestreo así como diferencias entre las fases del ciclo hidrológico para las variables analizadas, se aplicó el análisis paramétrico de una vía ANOVA (Factores= Zona ($n=3$) y Meses ($n=9$) y el test post hoc de Tukey. Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, incluso empleando transformaciones sencillas, se empleó un análisis no paramétrico, Kruskal Wallis (KW). El análisis estadístico se realizó en el programa R (versión 3.1.2, R Development Core Team, 2014).

I.3. Resultados y Discusión

I.3.1. Condiciones fisicoquímicas

Los valores de conductividad (K) se encontraron entre 5.27 y 38 mS cm⁻¹, equivalentes a un rango de salinidad de 3.3 y 27.7 (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition, 1999) (Fig. 1.3). No se observaron diferencias entre zonas (ANOVA, F=0.271 p>0.05). La K promedio observada fue de 17.18 ± 6.41 mS cm⁻¹ para la zona Norte, 16.88 ± 8.06 Centro y 19.47 ± 9.66 mS cm⁻¹ para la Sur (Tabla 1). Sin embargo, se observaron diferencias temporales: en el mes de Abril 2014 y Diciembre 2013 la conductividad fue superior al resto de los meses (ANOVA, F= 8.158 p<<0.001, Tukey test, Fig.1.3). Estas diferencias no se asociaron a la apertura-cierre de la barra (ANOVA, F=2.937 p>0.05) lo cual se refleja en los valores promedios de salinidad similares durante ambas condiciones de la barra (cerrada: 11, abierta: 13).

Los valores más bajos de K se registraron en la Zona Centro en los meses de Abril 2013 y Noviembre 2013 y en la Norte en el mes de Enero 2014 (entre 5 y 8 mS cm⁻¹), siendo éstos los únicos valores de conductividad oligohalinos (< 8 mS cm⁻¹) encontrados.

La T promedio fue de 17.9 ± 4.5 °C para la zona Norte y Centro, y 18.1 ± 4.4 °C, para la zona Sur (Fig. 1.3) no encontrándose diferencias entre las zonas (ANOVA, F=0.005 p>0.05). Las mayores temperaturas se registraron durante el período de barra abierta (Fig. 2, ANOVA, F=48.64 p<<0.001), la cual se encontró abierta sobre todo en los meses estivales.

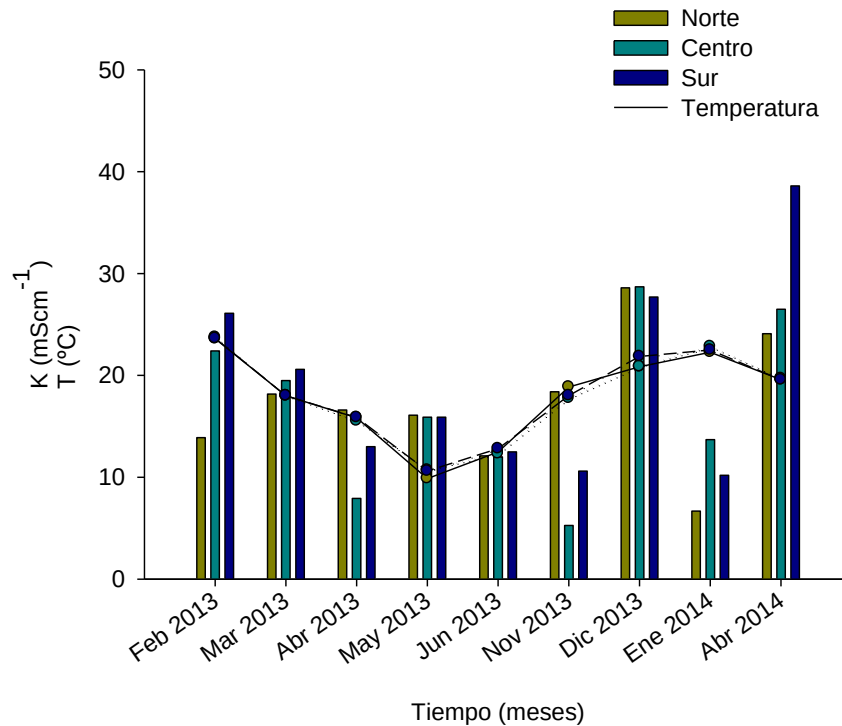


Fig. 1.3. Se muestra la conductividad (K) y temperatura (T) para cada zona a lo largo del periodo de muestreo. Código de colores se aplica para ambas variables.

El pH experimentó un alto rango de variación entre 5.8 y 9.2 y el OD promedio fue de 14.3 ± 4.9 , 14.5 ± 4.7 y 15.5 ± 4.6 mg/l para la zona Norte, Centro y Sur, respectivamente. Para el pH no se observaron diferencias entre zonas (ANOVA, $F=0.052$ $p>0.05$) aunque se observaron diferencias temporales (ANOVA, $F=5.927$ $p<0.005$), debido principalmente a los altos valores registrados en el mes de Diciembre 2013 en comparación con los registrados en Marzo 2013 (Tabla 1.1, Tukey test $p<0.001$). Para el OD no se observaron diferencias entre zonas ni temporales (KW, $p>0.05$). No se observó una relación con la apertura-cierre de la barra para estas variables (KW, $p>0.05$).

Según el ciclo hidrológico propuesto por Conde et al. 2000 en nuestro estudio se registró la fase I en una sola oportunidad (Tabla 1.1, Enero

2014). La fase II se registró con algunas variantes a lo propuesto anteriormente (Conde et al. 2000, Alonso et al. 2013). Por ejemplo, para el mes de Noviembre de 2013 se observó lo que podría denominarse, fase II invertida, o sea, la zona Norte con mucho mayor K que la Sur, un fenómeno hasta ahora no reportado. Lo mismo sucedió en Abril 2013, aunque las diferencias no fueron tan marcadas. Esto puede ser debido al empuje de las masas de agua más salobres por vientos del SW hacia la zona Norte (Conde et al. 2000), y podría ser un período intermedio o de transición entre fases II y III. Otra de las variantes, sería la fase II salobre (Tabla 1.1), ya que si bien se observa una zonación donde la zona Norte tiene valores menores de conductividad que la Sur (Conde et al. 2000, Alonso et al. 2013), estos se encuentran en el rango meso a polihalino ($> 14 \text{ mS cm}^{-1}$). La salinidad fue superior durante la fase II salobre y la fase III (ANOVA, $F=6.6$, $p<0.005$) y se registraron mayores T durante la fase I (ANOVA, $F= 6.5$, $p< 0.005$).

Por otro lado, a diferencia de lo propuesto por Conde et al. 2000, donde la fase II sería la predominante y la III la menos frecuente, durante el período estudiado se observó un predominio de la fase III (Tabla 1.1). Esta fase se caracteriza por valores de conductividad homogéneos en el rango meso a euhalino.

Las divergencias observadas entre el esquema propuesto por Conde et al. 2000 y las condiciones observadas en el presente trabajo podrían deberse a diferencias entre las tasas de evaporación y precipitación históricas y aquellas ocurridas durante los años 2013 – 2014, además de diferencias en el tiempo de residencia, procesos claves en la regulación de la salinidad (Sumner & Belaine 2005, Milbrandt et al. 2010, Maie et al. 2012, Cawley et al. 2012). Otro factor involucrado podría ser un aumento en la frecuencia y duración en la apertura de la barra de arena, ya sea natural o artificialmente. La apertura-cierre de la barra de estos sistemas

con conexión oceánica es uno de los factores más importantes en la dinámica del ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha (Bonilla et al. 2006). En este sentido, cabe destacar que si bien nuestro período de estudio abarca cuatro condiciones de barra cerrada de los nueve muestreos, en dos oportunidades la barra se había cerrado sólo dos días antes y hubo intrusión marina por encima de la barra debido a los fuertes vientos días atrás (com. Pers. Guardaparque, Marzo 2013 y Mayo 2013, respectivamente). Esto podría explicar el hecho de que la fase I solo haya sido registrada en una oportunidad, que no se haya detectado la fase II propuesta por Conde et al. (2000), y que no se hayan encontrado diferencias significativas en la salinidad entre el periodo de barra abierta y cerrada.

En consecuencia, la “salinización” observada en este set de datos podría deberse al aumento en la frecuencia de la apertura de la barra durante el período estudiado, sea natural o artificialmente, y/o al aumento del tiempo en que la barra permaneció abierta en este período de tiempo en particular. En ese sentido, un análisis comparativo con la base de datos generada para la Laguna de Rocha (Sección Limnología y la Sección Oceanografía de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, sin publicar) que cubre el período 1987- 2006, muestra que la K media fue de 18.9 mS cm^{-1} para la zona Sur y 6.24 mS cm^{-1} para la Norte, tal como lo esperado en la fase II del modelo. Sin embargo, a partir del año 2005 se observa que la mayoría de las observaciones corresponden con una estructura de fase II, con la conductividad dentro del rango meso a polihalino (entre 19.1 y 30.1 mS cm^{-1}). Por otra parte, cabe destacar que la estación de muestreo de la zona Norte de este estudio (Fig.1) no se corresponde con la denominada zona Norte en la base de datos histórica (que se encuentra en el Arroyo Rocha) lo que podría acentuar las diferencias encontradas.

I.3.2. Condiciones biogeoquímicas

No se encontraron diferencias entre las distintas zonas para ninguno de los nutrientes analizados (NTD y PTD, KW, $p > 0.05$, NH_4 $F=1.448$, NO_3 $F=0.524$, NO_2 $F=0.561$, PO_4 $F=0.464$, $p > 0.05$).

El NTD varió entre < 10 y $171.96 \mu\text{M}$ (Fig. 1.4). En promedio fue menor en la zona Norte que en la Sur (23.15 ± 13.07 y $33.32 \pm 36.77 \mu\text{M}$, respectivamente). En la zona Norte se registró un máximo de $41.22 \mu\text{M}$, en la zona Centro el promedio fue de $37.43 \pm 54.98 \mu\text{M}$, con un máximo de $171.96 \mu\text{M}$, mientras que para la zona Sur el máximo fue de $123 \mu\text{M}$, en el mes de Noviembre 2013. Se observaron diferencias temporales (KW, $p < 0.05$) debido principalmente a las diferencias entre los valores máximos registrados en Noviembre 2013 y los mínimos en Marzo 2013 (Fig. 1.4)

El PTD varió entre 0.08 y $7.3 \mu\text{M}$ (Fig. 1.4). En promedio fue de $1.14 \pm 0.38 \mu\text{M}$ para la zona Norte, $1.79 \pm 2.0 \mu\text{M}$ para la Centro y $1.76 \pm 2.26 \mu\text{M}$ para la Sur. Se observa un máximo en el mes de Noviembre 2013 de 7.30 y $6.59 \mu\text{M}$ para la zona Sur y Centro, mientras que para la zona Norte el máximo fue de $1.68 \mu\text{M}$. No se observaron diferencias significativas temporales (KW, $p > 0.05$).

Si bien, generalmente las zonas de mayor influencia marina presentan concentraciones menores de nitrógeno y fósforo (Conde et al. 1999, Bonilla et al. 2006), en este caso no siempre fue así. Por ejemplo, los máximos registrados en ambos casos se observaron en la zona Sur, en el mes de Noviembre 2013. Sin embargo, en este mes se registró una fase inusual, como se mencionó anteriormente, donde la zona Norte se encontraba con una mayor K que la zona Sur. Lo mismo ocurrió en Abril 2013 (NTD y PTD mayor en Sur, Fig. 1.4) con una K mayor en la zona

Norte (Fig. 1.3). Sin embargo, en ningún caso se observó una correlación con la salinidad.

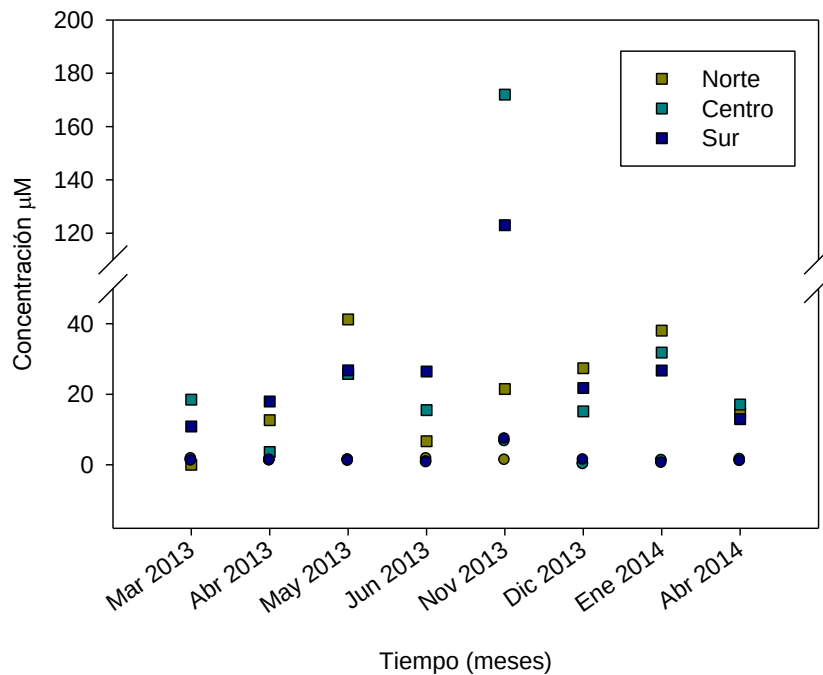


Fig. 1.4. Se muestra la Concentración en µM de Nitrógeno (NTD, cuadrados) y Fósforo total disuelto (PTD, círculos) para cada zona durante el periodo de muestreo.

El NH_4 varió entre 1.14 y 9.36 µM (Fig. 1.5). El promedio en la zona Norte fue de 4.07 ± 2.36 µM, en la zona Centro 4.16 ± 2.51 y Sur 3.41 ± 1.40 µM. No se observaron diferencias entre zonas o temporales (ANOVA, $F=0.275/1.876$, respectivamente, $p > 0.05$). En la zona Norte el máximo registrado fue de 9.36, mientras que en la zona Centro y Sur el máximo registrado fue de 7.55 y 5.64 µM, respectivamente. En la zona Norte los valores de NH_4 observados son mayores a los máximos registrados en estudios previos (Piccini et al. 2006: 0.15-5 µM NH_4 , Alonso et al. 2013: 0.62 µM NH_4 en la zona Norte). Además el promedio registrado para la

zona Norte y Sur es de casi el doble que el promedio encontrado entre los años 1996-2006 (Tabla 1.2). Este aumento podría deberse al alto aporte de nutrientes de origen continental al sistema (Bonilla et al. 2006), sumado al incremento en las precipitaciones y escorrentía en la región (Bates, 2008) que podrían estar aumentando la exportación de nutrientes desde la cuenca. Además la agricultura en la zona aumentó un 49% (pasando de 7463 ha a 11100 ha) en el período 1997-2011 (Rodríguez-Gallego et al. 2010, Nin 2013), implicando un mayor uso de fertilizantes nitrogenados.

En el caso del NO_3 los valores estuvieron entre < 0.16 y $3.07 \mu\text{M}$ (Fig. 1.5). El promedio fue de 0.84 ± 0.85 , 0.59 ± 0.05 y $0.60 \pm 1.02 \mu\text{M}$ para la zona Norte, Centro y Sur, respectivamente. Se observaron diferencias temporales (ANOVA, $F=25.62$ $p<<0.001$), debido a las altas concentraciones registradas en el mes de Noviembre 2013 en comparación con las encontradas en Diciembre 2013 y Enero 2014 (Tukey test, $p<<0.001$). Sin embargo, se observa una disminución de los valores promedios si comparamos con el promedio entre los años 1996-2006 (Tabla 1.2). El NO_3 fue el único caso en el cual se observaron diferencias entre las distintas fases del ciclo hidrológico (ANOVA, $F=7.001$ $p<0.005$). Éste fue mayor durante la fase II invertida. No se observó una correlación con la salinidad, sin embargo, se correlacionó negativamente con la T ($r=-0.59$, $p<0.005$).

El NO_2 se encontró entre < 0.02 y $0.31 \mu\text{M}$ (Fig. 1.5). El promedio para la zona Norte y Centro fue de $0.05 \pm 0.04 \mu\text{M}$ y de $0.09 \pm 0.1 \mu\text{M}$ para la Sur. El valor máximo registrado en el mes de Mayo 2013 en la zona Sur ($0.31\mu\text{M}$) fue significativamente superior a los encontrados en el resto del período de estudio (ANOVA, $F=7.463$, $p<0.005$). Los valores promedios son similares a los encontrados entre 1996-2006 (Tabla 1.2). Además, se

observó una correlación negativa con la salinidad ($r = -0.46$, $p < 0.05$), y con la T ($r = -0.67$, $p < 0.001$).

Los valores de NID estuvieron entre 1.2 y 9.41 μM . El NID promedio fue mayor en la zona Norte que en la Centro y Sur (5.49 ± 2.88 , 4.81 ± 2.79 y 4.11 ± 2.14 μM , respectivamente, lo que concuerda con la tendencia de encontrar mayores cantidades de nutrientes nitrogenados en zonas de agua dulce (Proença et al. 1988). Estos valores son mayores a los registrados en 1996-2006 (Tabla 1.2).

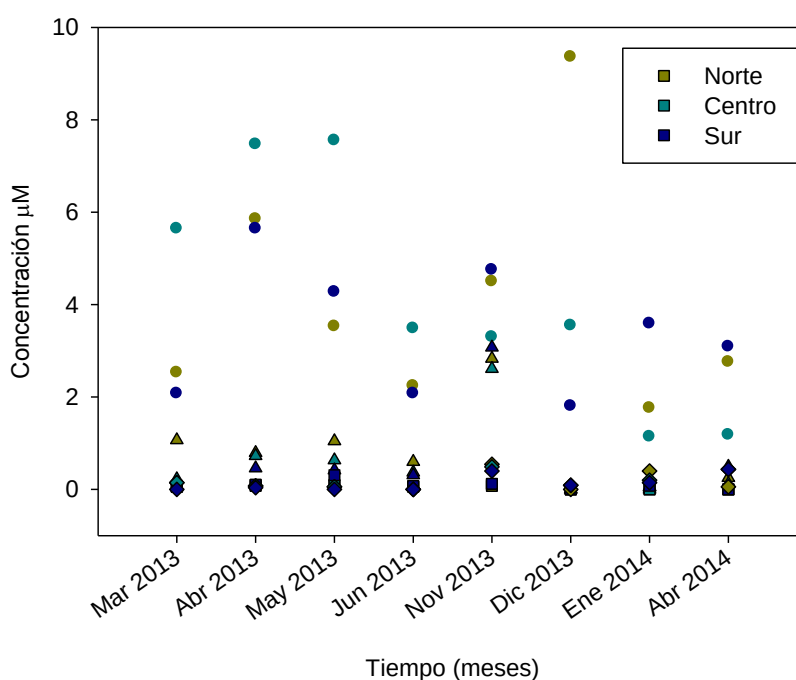


Fig. 1.5. Se muestra la concentración de Fosfato (PO_4 , rombo), Amonio (NH_4 , círculo), Nitrato (NO_3 , triángulo) y Nitrito (NO_2 , cuadrado) en μM para cada zona durante el periodo de muestreo.

Los valores de NH_4 son mayores a los registrados en otros sistemas costeros en climas templados (Lonboard & Sondergaard 2009, NH_4 entre 1 y 3,5 μM aprox.) y en estuarios de la región como en el Río de la Plata donde se encontró por debajo del límite de detección (Alonso et al. 2010), sin embargo, son similares a los registrados en la Laguna de los Patos, Brasil (Niencheski et al. 1994). En el caso del NO_3 y NO_2 los valores son similares o incluso más bajos al promedio histórico 1996-2006 (Tabla 1.2).

El PO_4 se encontró entre $<0.11 \mu\text{M}$ y $0.54 \mu\text{M}$, máximo registrado en la zona Norte en el mes de Noviembre 2013 (Fig. 1.5). Se observaron diferencias temporales (KW, $p<0.05$), debido principalmente a los altos valores registrados en el mes de Noviembre 2013, además se observó una correlación positiva con la T ($r= 0.53$ $p<0.005$). El PO_4 promedio fue mayor en la zona Norte que en Sur (0.16 ± 0.19 , $0.14 \pm 0.18 \mu\text{M}$, respectivamente), esto puede deberse a la descarga de los tributarios en la zona Norte con alto contenido de PO_4 . En un muestreo puntual realizado en el mes de Agosto 2014 se registraron entre 37 y 124 μM de PO_4 en los Arroyo Rocha, La Palma y Las Conchas. Durante este período de estudio no se observa un aumento del PO_4 en comparación con la base de datos generada entre 1996-2006 (Tabla 1.2), ni se observa la tendencia en el aumento de PO_4 propuesta por Aubriot et al. 2005. Esto puede estar asociado a patrones fluctuantes en la entrada de fósforo, reflejado en períodos de alta y baja carga del nutriente en el sistema. Por ejemplo, los valores encontrados en este estudio son casi del doble de los registrados en estudios anteriores en el año 2006 (Bonilla et al. 2006, Piccini et al 2006). De todas formas, se encontraron valores que podrían promover el desarrollo de floraciones algales (Cabrera, 2014) ya registrados anteriormente en este sistema (Bonilla et al. 2006, Conde et al. 2009, Cabrera et al. 2013). De acuerdo a los resultados del modelo de calidad de agua desarrollado por Cabrera (2014) para laguna de Rocha, una concentración entre 0.26 y 0.47 μM de PO_4 en el agua podría

promover el crecimiento de cianobacterias. Además, en un estudio reciente se asociaron diferentes eventos de proliferación de plantas sumergidas al nivel de nutrientes en la laguna (Rodríguez-Gallego et al. 2014). En este estudio Rodríguez-Gallego y colaboradores postulan que la Laguna de Rocha podría encontrarse en una etapa temprana de eutrofización (Rodríguez-Gallego et al. 2014).

Los valores de PO_4 son similares a los encontrados en otras lagunas costeras de la región (MacCord et al. 2013, Abreu et al. 2009) y el mundo (Lonborg & Sonergaard 2009). Sin embargo, los valores de PTD encontrados son mayores a los encontrados en otras lagunas costeras con características similares (ej. Amado et al. 2007, Laguna Imboassica, $0.8 \mu\text{M}$ PTD y $63.43 \mu\text{M}$ NTD) mientras que el NTD es casi 3 veces menor que al registrado en los mismos sistemas (Amado et al. 2007).

Según el ciclo hidrológico muestreado en esta tesis, el NO_3 fue mayor durante la fase II invertida (ANOVA, $F=7.001$ $p<0.005$), mientras que para PO_4 se registraron los valores más bajos durante la fase III (KW, $p<0.05$). Para el resto de los nutrientes no se observaron diferencias significativas entre las distintas fases. Por otro lado, sólo en el caso del PO_4 se observaron diferencias entre las distintas condiciones de la barra (KW, $p<0.005$).

El COD fue altamente variable (entre 547 y 4230 μM) (Fig. 1.6 A). No se encontraron diferencias entre zonas ni temporales (ANOVA, $F=1.343/2.593$, $p>0.05$), ni relación con la apertura-cierre de la barra (ANOVA, $F=0.654$ $p>0.05$). El COD promedio fue de $1036.1 \pm 528.09 \mu\text{M}$, 1541.7 ± 790.35 y 1787.4 ± 1315.06 en la zona Norte, Centro y Sur. Estos valores son superiores a los observados en estudios anteriores donde los valores se encontraron entre 416.67 y 916 μM para la zona Sur y Norte, respectivamente (Conde et al. 2000, 2002). Para la zona Norte y

Centro los valores estuvieron entre 500.83 - 2324 μM y 546.92 - 2650 μM , y para la Sur fueron entre 670.58 - 4230 μM . Los máximos observados corresponden a la fase II salobre (Abril 2014) siendo significativamente superiores a lo registrado en las otras fases del ciclo hidrológico (ANOVA, $F= 3.722$ $p>0.05$).

El NOD se encontró entre 3.8 y 165 μM (Fig. 1.6 B). En la zona Norte el promedio fue de 15.76 ± 13.07 , en la Centro 32.62 ± 54.73 y en la Sur 29.21 ± 35.2 . Los máximos registrados fueron de 36.55 en Mayo 2013, 165.9 y 115.05 μM en el mes de Noviembre 2013, para las distintas zonas respectivamente.

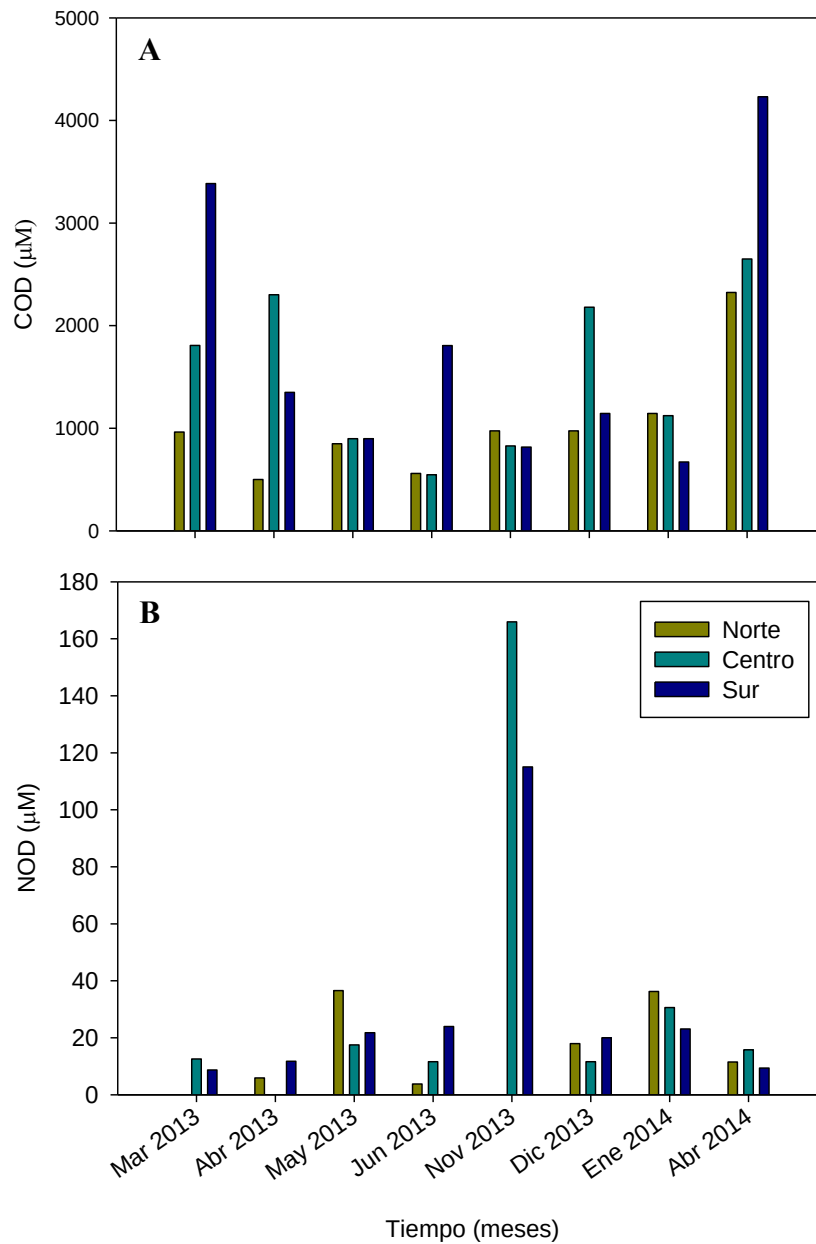


Fig. 1.6. Se muestran las concentraciones de Carbono (A: COD) y Nitrógeno orgánico disuelto (B: NOD) en μM durante el periodo de muestreo.

La relación COD: NOD fue altamente variable, especialmente en la zona Sur, en donde la cantidad de COD llegó a ser entre 7 y 400 veces mayor que el NOD. Si bien no se observan diferencias entre zonas para este

índice (ANOVA, $F=0.073$ $p>0.05$), se observan diferencias temporales (ANOVA, $F=13.7$ $p<<0.001$) debido principalmente a los altos valores de COD registrados en el mes de Marzo 2013 y Abril 2014 en comparación con el resto de los meses, como por ejemplo Noviembre 2013 (Tabal 1.1, Tukey test $p < 0.0001$). No se observa ninguna tendencia que pueda explicar esta variación, y coincide con lo encontrado en sistemas similares donde esta variación se explica debido a los ciclos de inundación que experimentan los sistemas (Vázquez et al. 2011).

La relación molar promedio entre carbono, nitrógeno y fósforo disuelto, 114:15:1, colectada durante muchos años para este sistema (Conde et al. 2000, 2002, Bonilla et al. 2005) sugiere limitación por carbono por la comunidad microbiana (Alonso et al. 2013). Si bien con dicha relación molar se estaría por encima de lo encontrado en la estequiometría de la biomasa bacteriana, 50:10:1 (Fagerbakke, 1996), en experimentos de remoción de limitantes nutricionales, sólo se encontró un efecto positivo en el crecimiento bacteriano al agregar una fuente de C externa, no así al agregar N o P (Alonso et al. 2013).

En este estudio la relación molar promedio C: N:P fue de 931:20:1 muy por encima a lo reportado en Alonso et al. 2013, lo que refleja el aumento del COD que ha sufrido la laguna desde el año 2000. Por lo que de existir limitación de C en el crecimiento bacteriano esta no se debería a la concentración del COD. Por lo tanto, restaría analizar la biodisponibilidad de éste ya que gran parte del mismo en los sistemas acuáticos es refractario a la degradación bacteriana (del Giorgio & Davis, 2002) y depende de la composición de la MOD (Biddanda & Benner 1997).

Las concentraciones de COD registradas son similares a las encontradas en humedales (Yamashita et al. 2010, Everglades entre 333 y 3833 μM de COD) y en otras lagunas costeras de la costa Atlántica (Farjalla et al.

2001, 2006, Amado et al. 2007). Por ejemplo, en las lagunas costeras de la región (Brasil) se han llegado a registrar valores hasta 3 veces mayores (13333 μ MC, Suhett et al. 2004, Farjalla et al. 2001, 14 lagunas tropicales costeras rango COD 1050-7460 μ M) que el máximo registrado en nuestro estudio. Sin embargo, están muy por encima de lo registrado en otros sistemas estuarinos templados (Lonborg & Sonergaard 2009, Yamashita et al. 2011, Hernes & Benner 2003), reflejando mayor productividad en las zonas subtropicales y tropicales.

El aumento en la cantidad de COD en el sistema con respecto a lo encontrado en estudios previos (Conde et al. 2000, 2002) podrían deberse a un aumento en la producción primaria y a la entrada de material orgánico terrestre. En este sentido, Rodríguez-Gallego et al. 2014 postulan que la carga de nutrientes potenciaría el incremento y proliferación en la biomasa de la vegetación acuática en este sistema, promoviendo la sucesión de productores primarios (Rodríguez-Gallego et al. 2014). Además, el aumento en la agricultura en la zona (Nin, 2013) podría haber generado una mayor exportación de COD al sistema en estos últimos años, tal como lo observado en otras zonas agrícolas (Graeber et al. 2012).

La alta variabilidad en la concentración de COD, tanto espacial como temporal, estaría indicando que hay más de un proceso involucrado en la dinámica de éste en el sistema, como por ejemplo, fotodegradación (Piccini et al. 2009), escorrentía y resuspensión sedimentos (Conde et al. 2000), aporte autóctono/alóctono, sumado a la variabilidad de estos sistemas costeros donde los cambios van de escalas diarias a escalas anuales (Bonilla et al. 2006). Por ejemplo, Graeber et al. 2015 observaron una alta variabilidad en el COD en arroyos del Uruguay en comparación con arroyos de clima templado, asociado a mayores precipitaciones y

mayor variabilidad en la composición de la MOD en Uruguay (Graeber et al. 2015).

Por otro lado, en promedio se registraron mayores valores de COD en la zona Sur, contrariamente a lo observado por Conde et al. 2000 y a lo esperado, ya que zonas cercanas al océano se caracterizarían por bajas concentraciones de COD (Cauwet, 2002). Esto podría deberse a una mayor producción primaria y bacteriana en esta zona. En este sentido el contenido del NOD también fue mayor en la zona Sur, al igual que el PTD y el NTD (Tabla 1.2).

Además, se observó una correlación positiva del COD con la salinidad ($r=0.48$, $p<0.05$), siendo mayor durante la fase II salobre (ANOVA, $F=3.722$ $p<0.05$, Tukey test $p<0.05$). Dicha relación no concuerda con lo observado en otros sistemas, donde se observa una disminución en la cantidad de C al aumentar la salinidad, indicando como fuente dominante COD de origen terrestre (Huguet et al. 2009, Yamashita et al. 2011, estuario, COD y salinidad comportamiento espejo, Stedmon et al. 2007). Estas diferencias pueden ser debido a las diferencias en los rangos de salinidad y carbono de los distintos estudios, como ocurre con otras variables (Del Velcchio & Blough 2004a). Por ejemplo, Fichot & Benner 2010 encontraron una pobre correlación entre COD y salinidades menores a 20 ($r=0.18$) así como diferencias significativas estacionales en esta correlación indicando la presencia de múltiples fuentes de MOD con propiedades distintas (Fichot & Benner 2010), así como la variación de la misma debido al comportamiento de mezcla del COD en su transporte dentro del sistema (Guo et al. 1998). Cabe destacar que durante nuestro período de estudio en la mayoría de los casos la salinidad se encontró por debajo de los 20 y no se observó una relación entre la apertura de la barra y la cantidad de COD (ANOVA, $F=0.654$ $p>0.05$). Además, los valores registrados están por encima de los estimados por simple mezcla

entre el aporte marino y el de la descarga de los ríos (896 μM), indicando la importancia de los procesos *in situ* de producción de MOD.

Tabla 1.1. Se muestran los valores de conductividad (K, mS cm⁻¹), Temperatura (T, C), oxígeno disuelto (OD, mg/l), pH, nitrógeno y fósforo total disuelto (NTD, PTD), amonio (NH₄), nitrito (NO₂), nitrato (NO₃), fosfato (PO₄), nitrógeno orgánico disuelto (NOD) y carbono orgánico disuelto (COD). Todos los nutrientes están en µM, para cada zona (N: Norte, C: Centro, S: Sur) y mes de muestreo. Se indica condición de la barra y fase del ciclo hidrológico.

Zona y Mes	Barra	Fase	K	T	DO	pH	NTD	NTP	NH ₄	NO ₂	NO ₃	PO ₄	NOD	COD
N, Feb 2013	Abierta desde 20/1/2013	II salobre	13.90	23.60	25.39	5.81	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
C, Feb 2013	Abierta desde 20/1/2013	II salobre	22.40	23.74	13.47	7.89	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
S, Feb 2013	Abierta desde 20/1/2013	II salobre	26.10	23.63	17.37	7.87	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
N, Marzo 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	18.17	18.00	NA	6.94	0.00	1.33	2.53	0.06	1.07	0.15	-3.66	963.3
C, Marzo 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	19.5	18.00	NA	6.92	18.50	1.68	5.64	0.08	0.22	0.15	12.55	1807.5
S, Marzo 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	20.6	18.00	NA	6.87	10.89	1.09	2.07	0.05	0.05	0.00	8.71	3385
N, Abril 2013	Cerrada desde (17/3/13)	II inv	16.6	15.84	13.09	8.15	12.66	1.15	5.85	0.10	0.79	0.07	5.91	500.8
C, Abril 2013	Cerrada desde (17/3/13)	II inv	7.92	15.54	24.27	8.23	3.61	1.21	7.47	0.08	0.73	0.07	-4.66	2301.7
S, Abril 2013	Cerrada desde (17/3/13)	II inv	13.0	15.87	22.95	8.34	17.95	1.27	5.64	0.10	0.46	0.04	11.75	1350
N, Mayo 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	16.10	9.87	15.40	8.68	41.22	1.33	3.53	0.09	1.05	0.06	36.55	848.3
C, Mayo 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	15.9	10.70	12.80	8.67	25.78	1.33	7.55	0.09	0.64	0.06	17.50	898.3
S, Mayo 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	15.9	10.60	14.40	8.73	26.77	1.03	4.27	0.31	0.42	0.00	21.77	898.3
N, Junio 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	12.10	12.48	12.84	9.20	6.70	1.68	2.24	0.06	0.60	0.00	3.80	559.6
C, Junio 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	12.00	12.32	12.04	6.62	15.52	0.79	3.49	0.07	0.37	0.00	11.60	546.9
S, Junio 2013	Cerrada desde (17/3/13)	III	12.50	12.81	12.54	7.60	26.44	0.61	2.07	0.08	0.31	0.00	23.98	1805
N, Nov 2013	Abierta desde (17/9/13)	II inv	18.40	18.86	11.44	8.34	21.48	1.27	4.5	0.08	2.83	0.54	14.07	974.2
C, Nov 2013	Abierta desde (17/9/13)	II inv	5.27	17.76	14.46	7.94	171.96	6.59	3.30	0.11	2.61	0.49	165.94	827.3
S, Nov 2013	Abierta desde (17/9/13)	II inv	10.60	18.02	13.01	8.07	123.00	7.30	4.75	0.12	3.07	0.40	115.05	815.8

N, Dic 2013	Abierta desde (17/9/13)	III	28.6	20.8 5	10.00	9.25	27.40	0.26	9.36	0.00	0.05	0.00	17.98	974.2
C, Dic 2013	Abierta desde (17/9/13)	III	28.7	20.8 7	10.08	9.31	15.16	0.08	3.55	0.00	0.00	0.09	11.61	2179. 2
S, Dic20 13	Abierta desde (17/9/13)	III	27.7	21.8 5	21.16	9.17	21.78	1.35	1.81	0.00	0.00	0.09	19.98	1144. 2
N, Enero 2014	Abierta desde 3/1/14	I	6.68	22.2 8	16.63	8.29	38.07	1.05	1.76	0.00	0.05	0.40	36.26	1144. 2
C, Enero 2014	Abierta desde 3/1/14	I	13.7	22.8 3	18.45	9.96	31.81	1.17	1.14	0.00	0.06	0.20	30.61	1122. 5
S, Enero 2014	Abierta desde 3/1/14	I	10.2	22.4 9	11.9	8.78	26.75	0.44	3.59	0.08	0.00	0.15	23.08	670.6
N, Abril 2014	Abierta desde 3/1/14	II salobre	24.1	19.5 8	10.76	7.87	14.52	1.05	2.76	0.00	0.25	0.06	11.50	2324. 2
C, Abril 2014	Abierta desde 3/1/14	II salobre	26.5	19.6 9	10.67	7.98	17.09	1.48	1.18	0.00	0.12	0.44	15.79	2650
S, Abril 2014	Abierta desde 3/1/14	II salobre	38.6	19.5 7	10.08	8.09	12.95	0.99	3.09	0.00	0.49	0.44	9.37	4230

Tabla 1.2. Se muestran los valores promedio de fosfato (PO_4), amonio (NH_4), nitrato (NO_3) y nitrito (NO_2) con su desvío estándar para los períodos 1996-2006 ($n \sim 40$) y 2013-2014 ($n=9$) (esta tesis). Todos los valores están en μM . (Máximo –Mínimo). Los nutrientes están en μM .

Año	PO_4		NH_4		NO_3		NO_2	
	Norte	Sur	Norte	Sur	Norte	Sur	Norte	Sur
1996-2006	0.29 ± 0.36 (0.11-2.87)	0.24 ± 0.27 (<0.11-2.12)	2.54 ± 3.60 (<0.5-20.38)	2.37 ± 3.03 (<0.5-13.22)	1.55 ± 2.29 (<0.16-10.4)	0.62 ± 0.95 (<0.16-5.81)	0.07 ± 0.07 (<0.02 0.26)	0.04 ± 0.05 (< 0.02-0.19)
2013-2014	0.16 ± 0.19 (<0.11-0.54)	0.14 ± 0.18 (<0.11-0.44)	4.07 ± 2.36 (1.14-9.36)	3.41 ± 1.40 (1.81-7.55)	0.84 ± 0.85 (< 0.16-2.83)	0.60 ± 1.02 (<0.16-3.07)	0.05 ± 0.04 (< 0.02 -0.1)	0.09 ± 0.1 (< 0.02-0.31)

I.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el ciclo hidrológico anual cubierto en este trabajo es altamente variable en relación a lo esperable en base a modelos propuestos anteriormente (Conde et al. 2000, Alonso et al. 2013, Cabrera, 2014).

El ciclo hidrológico de la laguna sería un factor clave en la regulación de los nutrientes inorgánicos, tal como se ha observado en otros estudios (Conde et al. 2000, Bonilla et al. 2005, Aubriot et al. 2005, Bonilla et al. 2006, Cabrera, 2014), si bien en algunos casos los resultados indican que varios procesos estarían contribuyendo a la liberación y remoción de estos (ej. NH_4 , PTD).

Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con lo encontrado recientemente por Rodríguez et al. 2014 en donde un estado combinado de alta salinidad, debido al aumento en la frecuencia y duración de la apertura de la barra (ya sea natural o artificial) y aumento en la carga de nutrientes sería el futuro escenario para la Laguna de Rocha.

En ese sentido, se observa una tendencia al aumento en el NH_4 , mientras que el resto de los nutrientes nitrogenados se mantienen similares al comparar con la base de datos 1996-2006. Sin embargo, no se observa una tendencia a la disminución del NID, tal como lo propuesto por Aubriot et al. (2005).

Asimismo, a diferencia de lo propuesto por Aubriot & col. no se observa un aumento en el PO_4 para el período de estudio que abarca esta tesis.

En cuanto al COD, se observó un gran aumento en comparación a estudios previos (Conde et al. 2000, 2002) que podría estar sugiriendo un aumento tanto en la producción del sistema (Rodríguez-Gallego et al. 2014, Cabrera et al. 2013) como en la exportación hacia el mismo. Este ascenso también se refleja en el aumento en la relación molar C: N: P lo largo de este último tiempo (Conde et al. 2000, Alonso et al. 2013).

Se observó una relación entre la concentración del COD y el ciclo hidrológico descrito en éste trabajo. Sin embargo, contrario a nuestra predicción, los valores promedios de COD fueron superiores en la zona Sur que en la zona Norte y durante la fase II salobre. De las variables ambientales medidas, el COD se relacionó significativamente solo con la salinidad, y en sentido opuesto a lo esperado. Dado que la concentración de COD depende también de su composición (Benner et al. 2003), es necesario incluir descriptores cualitativos de la MOD en la cual se encuentra contenido el COD para poder elaborar sobre las posibles razones de este hallazgo.

Capítulo 2: Calidad de la materia orgánica disuelta a lo largo del ciclo hidrológico de la Laguna de Rocha

II.1 Introducción

La materia orgánica disuelta (MOD) es una mezcla compleja, heterogénea, con compuestos de bajo a alto peso molecular (PM) que exhiben distintas solubilidades, reactividad y propiedades ópticas según su estructura molecular. A pesar de su importancia para el ciclo del carbono a escalas locales y globales (Battin et al. 2009), sus transformaciones permanecen como un componente aún poco comprendido de los modelos climáticos globales (Kowalczyk et al. 2010).

La medida en la cual el carbono orgánico disuelto (COD) es procesado en los distintos sistemas acuáticos depende en gran parte de la composición biogeoquímica de la MOD en el cual se encuentra contenido (Benner, 2003). Por lo que se ha enfatizado que la caracterización de la MOD en los distintos sistemas debería ser un componente esencial de los estudios biogeoquímicos (Jaffe et al. 2008).

Con el fin de caracterizar y trazar la MOD en los ambientes acuáticos se han desarrollado diversas técnicas y aproximaciones. Algunas metodologías fisicoquímicas incluyen: el empleo de la relación C: N (Vázquez et al. 2011), el análisis de isótopos estables del C y el N (Hood et al. 2007), métodos analíticos como la determinación de componentes específicos, como aminoácidos, carbohidratos y lignina (McDowell & Likens 1988). Sin embargo, si bien de estos métodos se obtiene información importante en cuanto a la fuente, composición y función de la MOD, son muy tediosos, y es necesario el manejo de técnicas analíticas que no permiten el análisis de grandes volúmenes de muestra, las cuales

además conllevan un importante pre-procesamiento y en consecuencia tienen grandes costos.

Otra de las aproximaciones usadas para caracterizar el origen de la MOD ha sido la relación del COD con la salinidad. Por ejemplo, la concentración de COD ha sido relacionada negativamente con la salinidad (Cauwet, 2002), indicando que la combinación de ambas podría ser útil para monitorear el transporte de la MOD en estuarios. Sin embargo, el COD en ambientes costeros es una mezcla de MOD de componentes alóctonos y autóctonos (Yamashita et al. 2008), por lo que los componentes terrestres de la MOD no pueden ser fácilmente separados sólo según la relación COD-Salinidad (Yamashita et al. 2013). Además, en estos complejos sistemas costeros la evaporación es un factor importante en el control de la salinidad, y el tiempo de residencia puede enmascarar el efecto de la salinidad (Milbrandt et al. 2010, Maie et al. 2012, Cawley et al. 2012), por lo que se requieren otras técnicas de monitoreo para evaluar la distribución de la MOD.

Si bien existen técnicas de alta resolución como por ejemplo, la resonancia magnética nuclear (NMR) o la recientemente desarrollada “*Fourier transform ion cyclotron resonance-mass spectrometry*” (FTICR-MS) que permite llegar hasta la formula elemental (*i.e.* $C_nH_nO_nN_nS_n$) (Hertkorn et al. 2013), éstas son de difícil acceso, no sólo por su elevado costo sino porque requieren equipos especializados y técnicos que lo manejen y tienen como fuerte limitante la posibilidad de evaluación de un número muy bajo de muestras.

Frente a este contexto, ha sido de suma importancia el desarrollo de técnicas de aplicación relativamente sencilla, pasibles de ser aplicadas a gran escala, y a relativamente bajo costo, a fin de avanzar en el entendimiento de la dinámica de la MOD en los sistemas acuáticos.

En ese sentido, las propiedades ópticas de la MOD (absorbancia y fluorescencia) han demostrado ser muy útiles para su caracterización (Vazquez et al. 2011, Coble et al. 1990, McKnight et al. 2001, Stedmon et al. 2003). A partir de dichas propiedades es posible analizar la materia orgánica disuelta cromofórica (CMOD), definida en base a la absorción en el rango de luz UV-visible, a la vez que la fracción de CMOD que emite fluorescencia al ser excitada, conocida como FMOD (Coble, 1996).

La absorción en el rango UV- luz visible involucra la excitación de un electrón a un nivel mayor de energía, proceso que depende de la estructura química de la molécula (Silverstein et al. 1974). La fluorescencia ocurre cuando una molécula absorbe energía causando la excitación de un electrón a un nivel más alto que al retornar a su estado fundamental esta energía ganada es perdida como luz o fluorescencia, o sea, una molécula con la capacidad de absorber y emitir luz. Entonces, la longitud de onda de excitación y emisión a la cual ocurre la fluorescencia es característica de las estructuras específicas de dicha molécula. Los compuestos que absorben energía se denominan cromóforos y los que re-emiten luz fluoróforos (Mopper et al. 1996).

La fracción ópticamente activa de la MOD (CMOD y FMOD) puede emplearse para trazar cambios en la composición ya que las características bioquímicas de la MOD suelen relacionarse con sus propiedades ópticas (Stedmon et al. 2003, Hernes et al. 2009). El uso de espectroscopía tiene un claro potencial para dilucidar el papel de la MOD en los sistemas acuáticos (Fellman et al. 2010).

La caracterización de la MOD empleando espectroscopía proporciona información confiable, en cuanto a la fuente, estado redox y reactividad biológica de la MOD (Miller et al. 2009, Mladenov et al. 2010). Por lo que, además de ser una técnica rápida, precisa y accesible, posibilita abordar

estudios de cambios temporales y espaciales al permitir el análisis de grandes números de muestras, necesarios para comprender la dinámica de la MOD en los sistemas acuáticos.

Ejemplos de indicadores cualitativos obtenidos a través de medidas de absorbancia, ampliamente usados en biogeoquímica, incluyen tanto la absorbancia a diferentes longitudes de onda específicas en el UV, como $SUVA_{254}$ (Weishaar et al. 2003) y el coeficiente de absorción a 350 nm, a_{350} (Coble, 2007, Fichot & Benner 2012) así como los coeficientes espectrales obtenidos al determinar la absorbancia en un rango de longitudes de onda (Helms et al. 2008, Fichot & Benner 2010, 2012).

Estos coeficientes, además de proporcionar información en cuanto a la composición, también se utilizan como *proxy* para estimar la concentración de CMOD (Del Vecchio & Blough 2004a, Yamashita et al. 2010a). Por ejemplo, el índice SUVA ($\text{mg C L}^{-1} \text{ m}^{-1}$), relacionado con el porcentaje de la aromaticidad de la MOD (Weishaar et al. 2003), es buen parámetro como indicador de contenido de C aromático, mientras que los coeficientes espectrales (SR , $S_{275-295}$, $S_{350-400}$, a_{350}) son indicadores del PM, indicadores fotoquímicos (Helms et al. 2008) así como origen y concentración de la CMOD (Yamashita et al. 2010a, Fichot & Benner 2012).

En cuanto a las técnicas de fluorescencia, Coble et al. (1990) introdujeron el uso de las matrices de excitación-emisión (EEMs) para el estudio de la FDOM y desarrollaron la técnica "*peak picking*" (Coble et al. 1990, 1996) para su análisis, tanto para sistemas marinos como continentales. Esto es la clasificación de los picos de fluorescencia encontrados en distintos componentes, por ejemplo, pico húmico terrestre, marino o de origen proteico (Coble, 1996). Sin embargo, desde el desarrollo de análisis de técnicas multivariantes, específicamente el *parallel factor analysis*

(PARAFAC, Bro, 1997, Stedmon et al. 2003) la clasificación propuesta por Coble, 1996 ha evolucionado hacia el modelado de la MOD presente en cada set de muestras mediante la descomposición de la señal de fluorescencia en sus componentes individuales, los fluoróforos. Este análisis se ha revelado como una herramienta muy útil para caracterizar y cuantificar los cambios en la MOD, permitiendo el rastreo de diferentes fracciones de ésta en el ambiente (Cory & McKnight 2005, Stedmon & Markager 2005 a, b). Este tipo de análisis viene siendo exitosamente aplicado en el análisis de fluorescencia natural de la MOD, permitiendo la identificación de componentes del COD terrestre, marino y antropogénico en una variedad de sistemas acuáticos (Coble, 1996, Stedmon et al. 2003, Cory & McKnight 2005). A modo de ejemplo del impacto de esta aproximación, en 2011-2012, 334 revistas indexadas por *Scopus* publicaron con la palabra clave “PARAFAC”, de las cuales el 70 % pertenecían al análisis de EEMs (Murphy et al. 2013).

Recientemente, un estudio combinando el análisis EEM/PARAFAC con FTICR-MS encontró una correlación entre los componentes PARAFAC y distintas familias moleculares, esto es el detalle molecular para componentes clásicos del tipo húmico al proteico (Stubbins et al. 2014). Por lo tanto, las medidas de fluorescencia ofrecen información sobre el ciclado biogeoquímico de una gran proporción del pool de MOD, incluyendo una amplia gama de moléculas no fluorescentes que aparentemente siguen el mismo gradiente que FDOM en el medio ambiente (Stubbins et al. 2014). En ese sentido, este estudio brinda aún más respaldo a esta aproximación para el análisis cualitativo de la MOD.

En este trabajo se procura realizar una caracterización exhaustiva de la calidad de la MOD a los largo del ciclo hidrológico de Laguna de Rocha, mediante el uso de diversos indicadores biogeoquímicos basados en las propiedades ópticas de la MOD, además del modelado de ésta en dicho

sistema usando el análisis multivariado PARAFAC. Asimismo, pretende identificar los indicadores más adecuados a la hora de estudiar la composición de la MOD en estos sistemas altamente variables (Bonilla et al. 2006), en donde la identificación de los procesos implicados en la composición MOD es particularmente compleja (Conde et al. 2000).

II.1.2. Área de estudio

Las características fisicoquímicas de la Laguna de Rocha fueron descritas en el capítulo 1. La MOD en Laguna de Rocha deriva de múltiples fuentes como por ejemplo producción autóctona (planctónica, bentónica y por macrófitas) y de origen terrestre, lo cual dificulta su análisis (Conde et al. 2000). Estudios previos muestran que la apertura y cierre de la barra de arena ejercería una gran influencia en la atenuación de la luz UV y concomitantemente en la concentración de COD (Conde et al. 2000), cuya acción sobre la MOD derivada de macrófitas de la laguna induce el desarrollo de poblaciones bacterianas específicas (Piccini et al. 2013). Los datos hasta ahora obtenidos sugieren una predominancia de MOD de origen terrestre. Conde et al (2000) encontraron una fuerte correlación entre el COD y la absorbancia a 254 nm ($r = 0.948$ y 0.980 , barra abierta y cerrada, respectivamente; $p < 0.001$), lo que indica un aumento del contenido de C aromático (Weishaar et al. 2003), asociado a material de origen terrestre (McKnight et al. 2001), al aumentar el COD. Por otro lado, el coeficiente de absorción a_{340} , empleado como indicador de CMOD, se encontró entre $0.29\text{-}2.91\text{ m}^{-1}$ (barra abierta) y $1.58\text{-}2.36\text{ m}^{-1}$ (barra cerrada), el cual estuvo altamente correlacionado con el COD ($r = 0.982$ y 0.923 , barra abierta y cerrada, respectivamente $p < 0.001$). Estos resultados indican mayor contenido de CDOM durante el período de barra cerrada y reforzaría la idea del COD proveniente de origen terrestre en el sistema, además de revelar cambios en la composición de la CMOD asociados a la dinámica de la barra (Conde et al. 2000). Los datos

encontrados para las pendientes espectrales van de 0.015 a 0.020 nm⁻¹, el cual refleja cambios en el PM de los compuestos (Helms et al. 2008), asociado por los autores a un efecto de fotodegradación (Conde et al. 2000).

En base a estos antecedentes, se hipotetiza que la zona Norte de la laguna se caracterizará por una mayor importancia de la MOD de origen terrestre, siendo de una calidad más refractaria, es decir de menor accesibilidad para la comunidad microbiana.

II.2. Materiales y Métodos

Las muestras se tomaron según lo indicado en el capítulo anterior. Al llegar al laboratorio, las muestras fueron filtradas por gravedad en material de vidrio, a través de filtros GF/F. El material de vidrio empleado fue previamente lavado con HCl al 10%, enjuagado con agua MiliQ y quemado a 450°C durante 4 horas junto con los filtros GF/F. A partir de este filtrado se guardaron alícuotas de 20 ml de muestra para la caracterización espectral (absorbancia y fluorescencia), que fueron mantenidas a 4°C hasta su análisis, realizado en un lapso no mayor a 14 días (Hudson et al. 2009) desde la toma de muestra. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente previo al análisis.

La absorbancia se midió en un rango de 250 a 800 nm en un espectrofotómetro Thermo Evolution (Facultad de Ciencias, Sección Limnología). La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro de barrido (Varian Eclipse, Instituto Pasteur) en cubeta de cuarzo de 1 cm.

II.2.1. Caracterización de la MOD

Para la caracterización de la MOD se utilizaron 10 descriptores cualitativos, ampliamente usados en biogeoquímica (Helms et al. 2008, Fellman et al. 2010, Vázquez et al. 2011, Fichot & Benner 2012): los coeficientes espectrales $S_{275-295}$, $S_{350-400}$, S_R , el índice $SUVA_{254}$, el coeficiente de absorción a 350 nm (a_{350}), el índice de Fluorescencia (FI), el índice de humificación (HIX), el índice de frescura (BIX), las Matrices de Excitación/Emisión (EEM) y el COD biodegradable (BCOD). En la Tabla 2.3 se detalla el cálculo e interpretación de los descriptores cualitativos mencionados.

Tabla 2.3. Indicadores cualitativos empleados para la caracterización de la MOD.

Descriptor	Definición	Interpretación	Referencia
$S_{275-295} (nm^{-1})$	Relación entre los coeficientes de la pendiente de absorción a las longitudes de onda 275 nm y 295 nm ^a	Inversamente relacionado con el PM de la CMOD. A mayor $S_{275-295}$ menor PM. b) Indicador del carbono orgánico disuelto de origen terrestre, inversamente relacionado con la cantidad de lignina	Helms et al. 2008, Fichot & Benner 2010, 2012
$S_{350-400} (nm^{-1})$	Relación entre los coeficientes de la	Relacionado inversamente con la	Helms et al. 2008

	pendiente de absorción a las longitudes de onda 350 y 400 nm.	de irradiación y con el PM de la MOD	
S_R (nm ⁻¹)	Relación entre el coeficiente espectral $S_{275-295}$ y $S_{350-400}$.	Inversamente relacionado con el PM de la CMOD para compuestos menores a 3,000 Da. Sistemas costeros y estuarinos : ~1.1. El índice $S_{350-400} > S_{275-295}$ en muestras enriquecidas en CMOD terrestre, mientras lo opuesto se observa en las muestras marinas	Helms et al. 2008
SUVA ₂₅₄ (mg C L ⁻¹ m ⁻¹).	Coeficiente de absorción 254 nm estandarizada por la concentración de carbono	A mayor índice SUVA ₂₅₄ , mayor aromaticidad, y por ende mayor refractariedad de la MOD.	Weishaar et al. 2003
a_{350} (m ⁻¹)	Coeficiente de absorción a una longitud de onda de	Indicador cuantitativo de la cantidad de CMOD,	Fichot & Benner 2012, Coble, 2007.

	350 nm	así como de la cantidad de MOD de origen terrestre La relación a_{350}/COD, es un estimador de la contribución de CMOD húmica a la MOD total	
FI	Es la relación de intensidades emitidas a 470 nm y 520 nm obtenida a una longitud de onda de excitación de 370 nm	Este índice permite discriminar el origen de la MOD, es decir si es de origen alóctono o autóctono. Valores entre 1.7 y 2.0 como ácidos fúlvicos derivados de la actividad microbiana con un % de aromaticidad entre 12-17%, mientras que, para los derivados de origen terrestre el FI sería entre 1.3-1.5 con un % entre 20 y 30% (relación inversa entre FI y	McKnight et al. 2001, Cory & McKnight 2005

		aromaticidad).	
HIX ^c	Área bajo los espectros de emisión entre 435-480 nm dividido el área bajo el pico de 300-345 nm + 435-480 nm, a una excitación de 254 nm	Rango: 0 a 1, Valores cercanos a 1 indican mayor grado de humificación de la CMOD.	Parlanti et al. 2000, Ohno et al. 2002
BIX	Es la relación entre la fluorescencia emitida a una intensidad de 380 nm (β) y 420 nm (α) obtenida a una excitación de 310 nm	Indicador de la contribución de la MOD producida recientemente. β/α , donde β es MOD reciente y α MOD más procesada. Valores mayores a 1 representan MOD liberada recientemente por actividad microbiana y valores entre 0.6 y 0.8 representan MOD más vieja	Parlanti et al. 2000; Wilson & Xenopoulos 2009.
% BCOD ^d	Cantidad de carbono consumido	A mayor cantidad de C consumido	Servais et al. 1989

	por un inóculo bacteriano en un ensayo estándar	durante la incubación, más biodegradable se considera la MOD de la muestra.	
EEMs ^e	Las matrices de excitación-emisión (EEM) se obtienen adquiriendo espectros de emisión a lo largo de una serie de longitudes de onda de excitación más largas	A través del modelado PARAFAC se identifica una serie de componentes que constituyen la FMOD en el sistema	Coble et al. 1996, Stedmon et al. 2007, Murphy et al. 2013, 2014

a. El coeficiente de absorción (a_λ) se calculó como:

$$(a_\lambda) = 2,303 A_\lambda / L$$

donde (a_λ) es el coeficiente de absorción en m^{-1} , A_λ es la absorbancia a dicha longitud de onda y L es la longitud de la cubeta en m (0.01 m). Los datos fueron previamente corregidos según se indica en Helms et al. 2008.

b- Los ácidos fulvicos son una fracción importante de la MOD, son una mezcla heterogénea de ácidos orgánicos de color amarillo de PM moderado.

c. Es un indicador del contenido de sustancias húmicas y esta basado en la idea de que los espectros de emisión de las moléculas fluorescentes cambian hacia longitudes de onda mayores debido a la disminución en la relación H:C a medida que se da el proceso de humificación. Se ha observado que este índice se correlaciona negativamente con la biodegradabilidad de la MOD en suelos (Kalbitz et al. 2003).

d. Para cada sitio se filtraron a través de membranas de polycarbonato de 0.2 micras 250 ml de muestra, las cuales fueron inoculadas con 2,5 ml de la misma muestra previamente filtrada por filtro de polycarbonato de 0,8 micras. Las muestras fueron incubadas en oscuridad, a temperatura ambiente durante 28 días. La fracción de BCOD fue determinada comparando el valor inicial y final de COD.

e- Los espectros de emisión obtenidos son entonces concatenados para generar un gráfico en el cual se muestra la fluorescencia como función de las longitudes de onda de excitación y emisión (Kowalczyk et al. 2005). En este caso se realizaron mediciones de fluorescencia en un rango de emisión de 280 a 600 nm, en incrementos de 2 nm, y un rango de excitación de 240-450 nm, en incrementos de 5 nm, según Stedmon et al. 2007.

Los resultados de las EEMs se analizaron utilizando la técnica de modelación multivariable *parallel factor analysis* PARAFAC (MATLAB y la aplicación Nway toolbox for MATLAB/DOMFluor/drEEM, Murphy et al. 2010, 2013), un método de descomposición de tres vías similar al análisis de componentes principales (Stedmon et al. 2003, Andersen and Bro 2003, Murphy et al 2010, Murphy et al 2013). Este análisis permite descomponer la señal de fluorescencia en sus componentes individuales, donde cada componente representa un fluoróforo (Bro, 1997). Además, una vez construidas las matrices, este modelo permite la identificación de

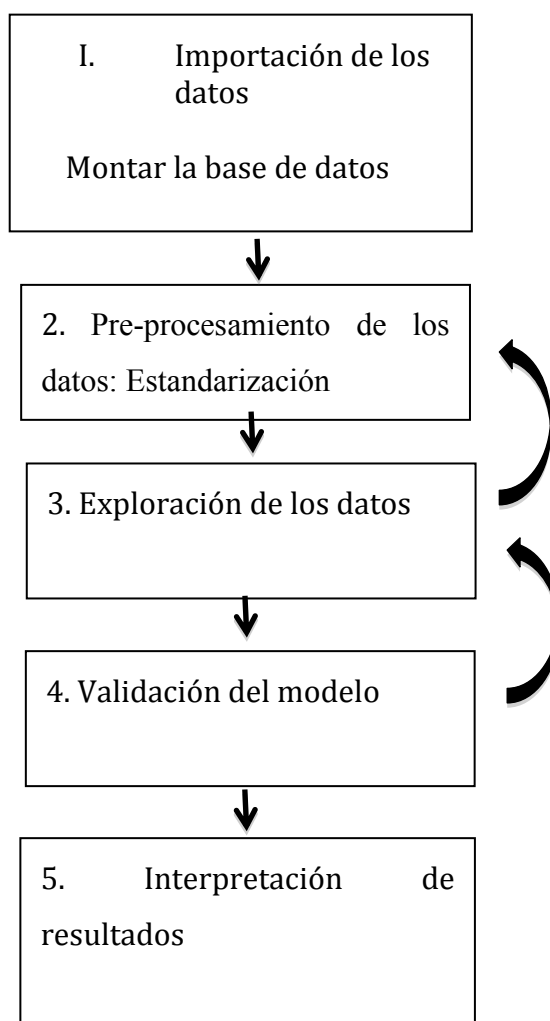
los picos de fluorescencia A, C, M, T, de acuerdo a la clasificación propuesta por Coble, 1996; donde A es el pico de sustancias húmicas terrestres, C el pico de sustancias fúlvicas terrestres, M las sustancias fúlvicas marinas y T el pico proteico (Coble 1996, 2007).

Para el modelado de la MOD en este estudio se analizaron 118 muestras, correspondientes a las muestras *in situ*, los experimentos de biodegradabilidad (BCOD) y de “*priming effect*” (Capítulo 3), además de muestras pertenecientes a un muestreo puntual realizado en Agosto 2014 de los Tributarios del sistema (Arroyo La Palma, Las Conchas, Rocha) y el Océano Atlántico, utilizados como referentes de los aportes que llegan al cuerpo de la Laguna (Fig.1).

II.2.2. Estandarización de los datos y Modelado de la MOD

Para la estandarización de los datos, generar las matrices y el modelado PARAFAC, se empleó la herramienta drEEM 0.2.0 y el tutorial desarrollado por Murphy et al. 2013, una nueva herramienta para MATLAB que incorpora los elementos de las herramientas anteriores DOMFluor y FDOMCorrect (Murphy et al. 2010, Stedmon et al. 2008). Estas son de uso libre y se pueden descargar en www.models.life.ku.dk. En el diagrama de flujo se describen brevemente los pasos seguidos para la generación de las EEMs y su posterior modelado mediante el análisis PARAFAC.

Diagrama de flujo para el modelado de la MOD usando EEMs y PARAFAC. Para mayor detalle ver ANEXO I: Estandarización de los datos y Modelado de la MOD.



1. Para generar las EEMs se utilizó la fluorescencia y absorbancia de la muestra y la fluorescencia de un blanco, en este caso se utilizó MilliQ para normalizar los datos a Unidades Raman.
2. Este paso se realizó con el fin de corregir los datos debido a defectos introducidos por el equipo, por ejemplo, la eficiencia de los

distintos elementos (lámpara, monocromadores, fotomultiplicadores) no es la misma a las distintas longitudes de onda, por lo que esta corrección es importante a la hora de comparar los datos derivados de distintos espectrofluorómetros. Además, es necesario remover las señales no relacionadas a la fluorescencia como por ejemplo el efecto de la absorbancia (inner filter effect, IFE, Lakowicz, 2006) y otros procesos asociados a la dispersión de la luz. Por ejemplo, la muestra y la cubeta absorben luz, la cual disminuye al aumentar la longitud de onda, por lo que la fluorescencia se ve suprimida con distinta intensidad y el IFE es más severo a longitudes de onda más cortas. Esto lleva a distorsionar las EMMs en el sentido en que los espectros de emisión no solo van a depender de los fluoróforos presentes sino de la excitación a la que son medidas. Otras de las señales no relacionadas con la fluorescencia son la dispersión de Raman y Rayleigh. Todas las muestras fueron Raman normalizadas basado en la medida del pico Raman del agua MilliQ a 350 nm y según el proceso usado en la herramienta drEEM. Esto permite la comparación entre equipos y estudios (Lawaetz & Stedmon 2009). Por último, es necesario normalizar los datos, ya que muestras con alta concentración de MOD ejercen mayor fuerza en el modelo y los fluoróforos tienden a covariar no porque sean parte de la misma fracción de la MOD sino por el efecto concentración. Al normalizar los datos, el modelo se enfoca en la variación química y no en la magnitud de la señal, aumentando la chance de que aparezcan picos pequeños. Para mayor detalle ver Anexo I: Estandarización de los datos y Modelado de la MOD.

3. Identificar y remover *outliers* y comenzar a desarrollar modelos preliminares que nos den una idea de cuántos componentes podríamos llegar a identificar, a través del análisis de los residuales, fuerza de cada muestra en el modelo y covariación de

los posibles componentes. Para mayor detalle ver Anexo I: Estandarización de los datos y Modelado de la MOD.

4. En este paso se determinaron el número de componentes, o sea, fluoróforos, encontrados en la MOD de la Laguna de Rocha, se evaluó el ajuste del modelo y la sensibilidad del mismo mediante la investigación de los residuales y suma de cuadrados, además de *split-half validation* (Para mayor detalle ver Anexo I: Estandarización de los datos y Modelado de la MOD).
5. Por último, se realizó la interpretación de los resultados. Para ello se utilizó la base de datos online openfluor (www.openfluor.com, Murphy et al. 2014). Esta base de datos permite la comparación entre espectros de fluorescencia de distintos estudios, facilitando la identificación de los fluoróforos encontrados. Además, se comparó con lo encontrado en la literatura y con la clasificación de Coble, 1996 descripta anteriormente.

II.3. Resultados y Discusión

II.3.1. Propiedades ópticas de la MOD: Absorbancia

II.3.1.1. Pendientes espectrales:

Los valores de $S_{275-295}$ se encontraron entre 0.014 y 0.020 nm⁻¹ (Fig. 2.7 A), coincidiendo con el rango reportado para este sistema (Conde et al. 2000) y otros sistemas estuarinos (Helms et al. 2008, Fichot & Benner 2012).

No se observaron diferencias significativas entre zonas (ANOVA, $F=0.059$ $p>0.05$). Sin embargo, se observaron diferencias significativas temporales en este indicador (ANOVA, $F=32.66$ $p<<0.001$) debido

principalmente a una disminución en Enero 2014 y Abril 2014 (barra abierta, 0.014 nm^{-1}) y aumento en Mayo 2013 y Junio 2013 (barra cerrada, 0.020 nm^{-1}). Además, durante la fase II sobre los valores de $S_{275-295}$ fueron significativamente inferiores al resto (ANOVA, $F=6.384$ $p < 0.005$, Tukey test $p < 0.05$).

Dada la relación inversa de las pendientes espectrales (SS) con el PM de la MOD (Helms et al. 2008), estos resultados indican un aumento en el PM durante el período de barra abierta y fase II sobre del ciclo hidrológico, contrario a los encontrados por Conde et al. 2000, donde los autores observaron una disminución en el PM durante la apertura de la barra.

Además, se encontró una fuerte correlación negativa entre $S_{275-295}$ con la temperatura (T) ($r=-0.81$, $p < 0.001$) indicando que al aumentar la T, aumentaría la MOD de alto PM. Esto se ve reflejado en los valores significativamente inferiores de $S_{275-295}$ en el mes de Enero 2014 ($T=22,5^{\circ}\text{C}$) con respecto a los de Junio 2013 ($T= 12,5^{\circ}\text{C}$).

Por otro lado, se observa una correlación negativa marginalmente significativa con la concentración de carbono (COD) ($r= -0.39$, $p = 0.07$), lo que sugiere compuestos de mayor PM al aumentar la concentración de COD, como se ha observado en otros estudios (Yamashita et al. 2010a).

A diferencia de otros estudios (Helms et al. 2008, Fichot & Benner 2012) donde se observa mayor contenido de compuestos de alto PM en agua dulce derivado de origen terrestre, en este trabajo no se observó una correlación significativa entre $S_{275-295}$ y la salinidad. Esto podría deberse a que dicha relación se ha observado para salinidades mayores a 30 y entre 8 y 12 con el COD en un rango de $100\text{-}600 \mu\text{M}$ y $833.3\text{-}1666.6 \mu\text{M}$ COD (Fichot & Benner 2012, Helms et al. 2008, respectivamente). Mientras que en nuestro estudio el rango de salinidad fue entre 3 y 22 y el COD entre

547 y 4230 μM .

El $S_{350-400}$ se encontró entre 0.010 y 0.018 nm^{-1} (Fig. 2.7 A), no se observaron diferencias significativas entre zonas (ANOVA, $F=0.074$ $p>0.05$), sin embargo se observaron diferencias significativas temporales (ANOVA, $F=24.53$, $p<<0.001$), debido principalmente a una disminución en los meses de Abril 2014 (Tukey test $p<<0.001$) y Diciembre 2013, Enero 2014 (Tukey test $p<0.001$). Estos resultados concuerdan con los indicados por $S_{275-295}$, que sugieren un aumento del PM de la MOD en estos meses durante el periodo de barra abierta (ANOVA, $F=47.63$ $p<<0.001$). Además se observa una fuerte correlación negativa con la T ($r=-0.68$, $p<0.001$) y con el COD ($r=-0.53$, $p<0.05$), reforzando el resultado anterior de que a mayor T y COD, mayor PM en la MOD.

El S_R se encontró en el rango 1.07 y 1.25 (Fig. 2.7 B), estos valores coinciden con los encontrados en sistemas como Chesapeake Bay Bridge (Helms et al. 2008). El S_R fue mayor en la zona Sur que en la Norte, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre zonas (ANOVA, $F=0.95$, $p>0.05$) ni temporales (ANOVA, $F=2.23$, $p>0.05$). Tampoco se observa una correlación significativa ni fuerte con COD, K/Salinidad o T ($p>0.05$).

Interesantemente, se observa una mayor variabilidad de este coeficiente en la zona Sur indicando mayores cambios en cuanto a las características del PM de la MOD en esta zona.

Los cambios observados en los SS, relacionados con cambios en el PM de la MOD, dependen de procesos de fotodegradación (fotobleaching, Helms, 2006), de mezcla, y de actividad microbiana (Helms et al. 2008, Piccini et al. 2009, 2013). Los valores observados para los SS indican una combinación de estos procesos en la composición y transformación de la

MOD en el sistema. Por ejemplo, los valores observados difieren de los predichos por simple mezcla de los tributarios (Océano Atlántico, Arroyos) indicando que la calidad de la MOD en la Laguna es la resultante de un extenso procesamiento *in situ*. Dicho procesamiento evidencia además tener diferentes componentes, cuya relevancia es modulada tanto en escalas espaciales (ej. mayor importancia de los procesos fotoquímicos en la zona Sur) como temporales (relación del PM con la temperatura). Además, se observa un cambio en el PM de la MOD con la apertura-cierre de la barra.

II.3.1.2. Coeficientes a longitudes de onda específica:

El SUVA se encontró entre 0.19 y 3.08 mg C L⁻¹ m⁻¹ (Fig. 2.7 C), este rango corresponde a un contenido de C aromático aprox. entre 7.3-24.4 % según el modelo lineal desarrollado por Weishaar et al. 2003. El promedio fue mayor en la zona Norte, indicativo de mayor contenido de lignina en la MOD, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre zonas, temporales ni entre las distintas fases del ciclo hidrológico (ANOVA, F= 1.84/1.29/ 2.22, respectivamente, p>0.05).

El máximo registrado en la zona Sur es de 2.33 mg C L⁻¹ m⁻¹ (Enero 2014), durante el periodo de barra abierta, mientras que en la zona Centro y Norte los máximos fueron de 2.84 (Junio 2013) y 3.08 mg C L⁻¹ m⁻¹ (Abril 2013), durante el período de barra cerrada. Como se puede observar, los máximos en las distintas zonas se registraron bajo condiciones hidrológicas distintas, sugiriendo una divergencia entre las fuentes de MOD en cada zona; esto es que los cambios en la refractariedad de la MOD en las distintas zonas estarían sujetos a distintos procesos.

Además, se observó una correlación negativa con la salinidad ($r = -0.47$, $p < 0.05$), indicando mayor contenido de C aromático al disminuir la

salinidad. Estos resultados concuerdan con los observados en otros sistemas estuarinos (Vázquez et al. 2011). Sin embargo, muestran una mayor variabilidad, sugiriendo una mezcla de sustancias aromáticas con otros compuestos (Weishaar et al. 2003, Maie et al. 2006).

Por otro lado, no se observa una correlación entre el coeficiente de absorción $a_{254\text{ nm}}$ (empleada sin normalizar con el propósito de comparar con Conde et al. 2000) y el COD tal como los autores encontraron para este sistema anteriormente (Conde et al. 2000). De hecho, la tendencia encontrada en este trabajo ($r = -0.19$, $p > 0.05$) es contraria a la registrada por Conde et al. (2000). En nuestros resultados, al aumentar la cantidad de COD disminuye el contenido de C aromático (el cual generalmente es asociado a compuestos de CMOD de origen terrestre (McKnight et al. 1994, 2001), indicando que contrariamente a lo observado por Conde & col., las mayores concentraciones de carbono no se asocian a componentes aromáticos.

El coeficiente a_{350} se encontró entre 4.49 y 13.28 m^{-1} (Fig. 2.7 D), muy por encima a lo registrado anteriormente (Conde et al. 2000). Cabe destacar que si bien Conde et al. 2000 utilizó el coeficiente de absorción $a_{340\text{ nm}}$, éste fue empleado como indicador de CMOD, siendo ambos indicadores equivalentes (Coble, 2007)

No se observaron diferencias significativas entre zonas para este coeficiente (ANOVA, $F = 0.491$, $p > 0.05$). Sin embargo, el promedio fue mayor en la zona Norte que en la Sur (7.3 y 6.8 m^{-1} , respectivamente), indicando mayor contenido de MOD de origen terrestre en la Norte, coincidiendo con los resultados obtenidos tanto para $S_{275-295}$ como para el SUVA. En ese sentido, la relación a_{350}/COD fue mayor en la zona Norte que en la Sur, indicando mayor contribución de COD de origen terrestre en la MOD de la zona Norte.

Por otro lado, este coeficiente fue significativamente superior durante la fase I y el período de barra abierta (ANOVA, $F=3.49/4.055$, $p<0.05$, Tukey test $p<0.05$, respectivamente). Esto último es contrario a lo registrado por Conde et al 2000, lo que podría explicarse por la existencia de 2 picos máximos en el mes de Enero 2014 (barra abierta) para las zonas Centro y Sur (13.2 y 9.7 m^{-1} , respectivamente) (Fig.8 B). En este mes se registraron fuertes lluvias, o lluvias inusuales ($\sim 300 \text{ mm}$, datos INUMET y Rodriguez-Gallego, el doble a lo registrado en el periodo de estudio de Conde et al. 2000 en el cual la acumulada de 2 meses era de 150 mm) que podrían haber aumentado la escorrentía, generando la llegada de mayor MOD de origen terrestre a la laguna a estas zonas. Sin embargo, no se encontró una correlación (ni fuerte ni significativa) entre este coeficiente y las precipitaciones durante el periodo de estudio de este trabajo que avale esta hipótesis. Otra alternativa podría ser la producción autóctona microbiana de MOD húmica-marina durante la degradación de la MOD, la cual ha sido reportada tanto en experimentos (Parlanti et al. 2000, Nieto-Cid et al. 2006) como *in situ* (Yamashita et al. 2008), sumado a procesos de fotodegradación (Moran et al. 2000), potenciados por las mayores T registradas en ese mes.

Por último, el a_{350} registrado se encontró por encima a lo observado en sistemas estuarinos similares (Stedmon et al. 2007, Yamashita et al. 2011). Estos resultados indican gran contenido de CMOD en nuestro sistema, similar a lo encontrado en humedales (Yamashita et al. 2010b, Everglades), sin embargo, no se encontró una correlación con el COD ($r=-0.11$, $p>0.05$) que indique que esta sea la fuente dominante de C al *pool* de MOD (Yamashita et al. 2010b, 2011). Tampoco se observa una relación con la salinidad ($r=0.01$, $p>0.05$), lo que evidencia la complejidad al querer diferenciar tanto las fuentes como los sumideros de MOD en el sistema. La relación entre la salinidad y este índice puede variar

geográfica y estacionalmente (Blough & Del Vecchio, 2002), especialmente en estos sistemas costeros altamente variables y dinámicos donde el COD proviene de una mezcla de fuentes como estarían indicando los resultados encontrados en este trabajo.

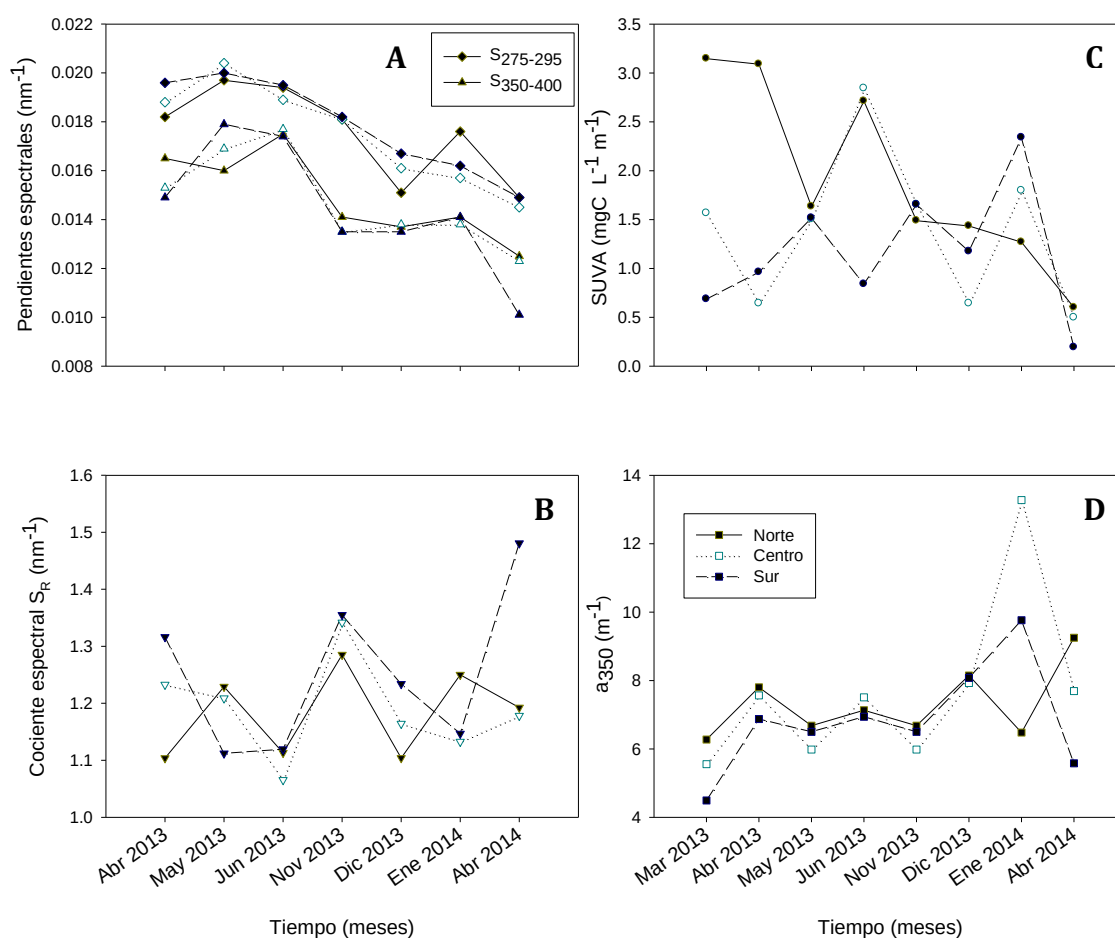


Fig. 2.7. Se indican las pendientes espectrales $S_{275-295}$ y $S_{350-400}$ (A), S_R (B), el índice SUVA (C) y el coeficiente de absorción a_{350} (D) para cada zona durante el periodo de muestreo.

II.3.2. Propiedades ópticas de la MOD: Fluorescencia

II.3.2.1. Índices

El índice de Fluorescencia (FI) se encontró entre 1.65 y 1.77 (Fig. 2.8 A), el promedio se encontró en torno a los 1.7 para las 3 zonas. No se observaron diferencias entre zonas o temporales (ANOVA, $F=0.021/0.575$, respectivamente, $p>0.05$). Los valores registrados son intermedios entre los FI de ácidos fúlvicos de origen microbiano y terrestres (McKnight et al. 2001, Cory & McKnight, 2005) y estarían indicando ácidos fúlvicos más bien de origen microbiano donde el porcentaje de C aromático estaría entre 12 a 17 % (McKnight et al. 2001). Estos resultados coinciden en rango con el encontrado según el modelo diseñado para el SUVA (Weishaar et al. 2003). Además, este valor promedio es similar con el reportado para otros sistemas para los cuales se esperaban valores intermedios entre los sistemas dominados por MOD de origen terrestre vs microbiana, explicándose por existencia e importancia de más de una fuente de ácidos fúlvicos (McKnight et al. 2001).

Si bien, no se observan grandes diferencias entre los valores encontrados, cambios de al menos 0.1 en el FI, ya estarían indicando distintas fuentes de ácidos fúlvicos (McKnight et al. 2001). Teniendo en cuenta esto, podríamos decir que se observan cambios en las fuentes de MOD entre zonas y temporales (Enero 2014, mayor en zona Sur y Norte, Abril 2013, Mayo 2013 mayor al resto del período de muestreo). Esto estaría asociado a un aumento en los precursores de MOD de origen microbiano.

Por otro lado, se observó una mayor variabilidad en el FI en la zona Sur, tal como se encontró en otros índices (S_R , COD) que estaría reflejando mayor variación en las distintas fuentes de MOD en esta zona.

El índice de humificación se encontró entre 0.44 y 0.94 (Fig. 2.8 B). Si bien no se observaron diferencias significativas entre zonas (KW, $p > 0.05$) se observaron valores sustancialmente menores en el mes de Diciembre 2013 en la zona Norte y Centro (KW, $p > 0.05$, 0.44 y 0.48, respectivamente), indicando menor grado de humificación de la MOD para este mes, el cual además coincide con el período de barra abierta (KW, $p < 0.05$). Exceptuando estos dos mínimos registrados, nuestros resultados sugieren que en general el COD está altamente humificado. Se observó una correlación negativa con la T ($r = -0.59$, $p < 0.01$), salinidad ($r = -0.66$, $p < 0.01$) y COD ($r = -0.46$, $p < 0.05$), que indica MOD con menor grado de humificación a mayores T, salinidades y concentración de COD.

Si bien un aumento en el HIX estaría asociado a MOD más bien de origen terrestre (William et al. 2010), otros estudios demostraron que el procesamiento microbiano de la MOD resultó en un aumento en el HIX o en el grado de humificación durante incubaciones de laboratorio (Wickland et al. 2007).

El BIX se encontró entre 0.56 y 3.46 y siguió un patrón opuesto al HIX (Fig. 2.8 C). Si bien no se observaron diferencias significativas entre zonas (KW, $p > 0.05$), se observaron diferencias significativas temporales, debido a los máximos registrados en el mes de Diciembre 2013 en comparación al resto del año (3.35, 3.13 y 1.01, Norte, Centro y Sur) en donde la barra se encontraba abierta (KW, $p < 0.01$) durante la fase III (KW, $p = 0.06$). El BIX fue mayor a 1 en los meses de Diciembre 2013, Enero 2014 y Abril 2014 (barra abierta), indicando MOD más fresca, asociada a producción microbiana reciente (Wilson & Xenopoulos 2009) mientras que para el resto del tiempo se encontró por debajo de 0.7, indicando una menor producción de MOD o una mayor entrada de MOD

de origen terrestre con menor biodisponibilidad (Wilson & Xenopoulos 2009).

Además, se observó una correlación positiva entre BIX y la temperatura ($r= 0.46$, $p>0.05$), lo que podría estar asociado al aumento en la producción de MOD reciente de origen autóctono debido a un aumento en la actividad y abundancia microbiana a mayores T (Bertoglio et. unpub). Además, se observó una correlación positiva entre el BIX y el COD ($r= 0.45$, $p<0.05$) y el BIX y la salinidad ($r=0.66$, $p<0.001$) lo cual indica mayor COD durante producción de MOD más fresca y a mayores salinidades. Estos resultados coinciden con lo mencionado anteriormente, en donde la producción microbiana sería una de las principales fuentes de COD al sistema.

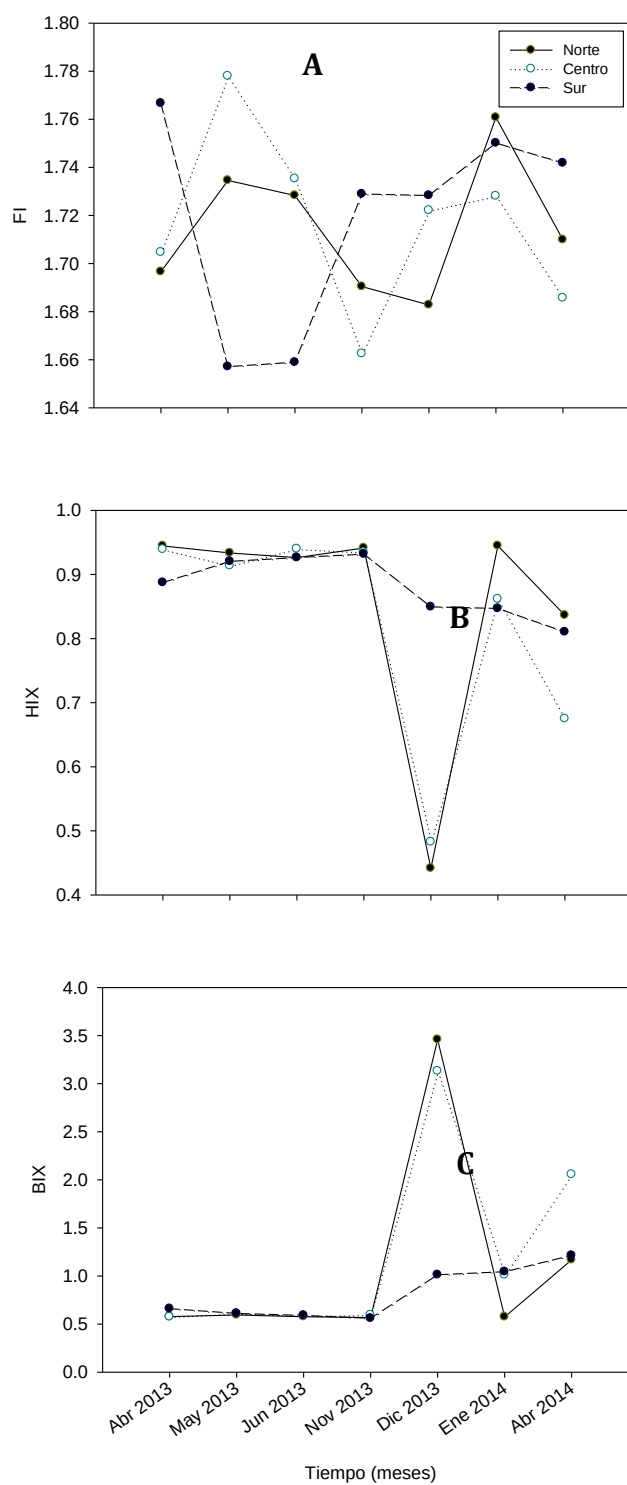


Fig. 2.8. Índices de fluorescencia FI (A), HIX (B) y BIX (C) para cada zona durante el periodo de muestreo.

II.3.3. Identificación de los principales componentes de la FDOM

El modelado PARAFAC generado a partir de las 118 EEMs producidas permitió identificar y validar 3 componentes fluorescentes PARAFAC en el set de datos analizados (Fig. Supl. 5 y 6 ANEXO I, Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Se muestran los picos de emisión y excitación de los componentes PARAFAC (2do pico), identificación y descripción según los matching encontrados empleando la base de datos OpenFluor (Murphy et al. 2014).

Componente	Pico Excitación	Pico Emisión	Tipo
C1	< 250 (310)	414	Húmico terrestre, del tipo fúlvico (Mcknight et al. 2001, Yamashita et al. 2011, Yamashita et al. 2010 b), Stedmon et al. 2011, pico C (Coble, 2007)
C2	260 (360)	350 (486)	Ampliamente distribuido, terrestre (Kowalczyk et al. 2013, Stedmon et al. 2003, Shutova et al. 2014)
C3	< 250 (300)	340 (354)	Tipo proteína: triptófano, Microbiano. Pico T Coble 1996.

El componente C1 ha sido caracterizado como húmico terrestre (Stedmon et al. 2011, Graeber et al. 2012) y podría ser una mezcla de los picos A y C húmicos terrestres según la caracterización de Coble et al. 1996, 2007, Yamashita et al. 2011. No obstante, este fluoróforo estaría enriquecido en ácidos fúlvicos en comparación con los húmicos (Ohno & Bro 2006, Santín et al. 2009, Yamashita et al. 2010b, 2011). Además, se corresponde con el C3 de Stedmon & Markager 2005 (UV-C húmico-terrestre) encontrado en grandes concentraciones en zonas de bosques y humedales y con el C1 de Stedmon et al. 2011 (0.986) encontrado en una planta de potabilización de agua (Stedmon et al. 2011). Según la clasificación de Coble 1996, 2007, la fluorescencia en esta región suele

ser denominado como el pico C de tipo húmico terrestre, antropogénico y asociado a la agricultura, encontrado en la mayoría de los sistemas acuáticos (Coble, 1996, 2007, Baker, 2001, Jørgensen et al. 2011). Mientras que el pico A sería terrestre del tipo fúlvico (Coble, 2007).

En adición, este componente se correlacionó negativamente con la salinidad ($r = -0.53$, $p < 0.05$) por lo que podría ser usado como un marcador de MOD de origen terrestre (Stedmon et al. 2011). Además, observó una correlación positiva con el índice SUVA ($r = 0.52$, $p < 0.05$), el índice HIX ($r = 0.61$, $p < 0.01$) y negativa con BIX ($r = -0.61$, $p < 0.05$), reafirmando su postulada naturaleza terrestre (Yamashita et al. 2010b, 2011, Stedmon et al. 2011).

Sin embargo, la correlación con el COD ($r = -0.45$, $p < 0.05$) es opuesta a lo encontrado para este componente en otros estudios en donde la fuente predominante de COD al *pool* de MOD es de origen terrestre (Yamashita et al. 2010b, 2011, Stedmon et al. 2011). Además los autores también observan una correlación con el a_{350} , lo que refuerza la idea de COD de origen terrestre, a diferencia de nuestro trabajo donde la correlación con a_{350} es casi nula ($r = 0.09$). Estos resultados estarían sugiriendo que la fuente de COD terrestre no es dominante/predominante en nuestro sistema sino que se trata de una mezcla. Cabe destacar que las relaciones observadas entre éste componente y el COD dependen del sistema en el cual se encuentre, y por ende, de los procesos locales a los cuales están sujetos.

Como se puede observar en la Figura 2.9 el C1 predominó en las 3 zonas, contribuyendo en más del 50 % en la mayoría de las muestras.

Se observaron diferencias marginalmente significativas entre zonas y temporales (KW, $p = 0.057 / 0.094$, respectivamente). Éste fue mayor en la

zona Norte, mientras que en los meses de Diciembre 2013, Enero 2014 y Abril 2014 se registraron los valores más bajos de contribución al *pool* de MOD llegando incluso a el 8-10 % en la zona Norte y Sur respectivamente (Fig. 2.9).

El componente C2 se encuentra ampliamente distribuido en los ambientes acuáticos, (C2 0.98 Kowalczyk et al. 2013 y C1 Shutova et al. 2014, C3 Walker et al. 2013, Murphy et al. 2006, Stedmon et al. 2003). Ha sido reportado como del tipo húmico terrestre y su producción dependería de la presencia y cantidad de otros componentes húmicos (Walker et al. 2013). Esto podría explicar la fuerte correlación encontrada con el C1 ($r=0.79$, $p<0.001$).

La contribución de este componente en las distintas muestras se encontró entre el 20 y el 30% (Fig. 2.9). No se observaron diferencias significativas entre zonas (KW, $p>0.05$) y el porcentaje de contribución promedio fue de 25% para la zona Sur y Centro y 21 % para la Norte. Se observaron diferencias temporales marginalmente significativas (KW, $p = 0.068$); en los meses Diciembre 2013, Enero 2014 y Abril 2014 se observó un marcado descenso en este componente igual al registrado en el C1, en las zonas Norte y Sur alcanzando el 4 %.

La relación del C2 con la salinidad fue negativa ($r= -0.53$, $p<0.05$), lo que coincide con lo encontrado para este componente en otros sistemas (C2 Kowalczyk et al. 2013, Atlántico) además se correlacionó positivamente con el HIX ($r= 0.53$, $p<0.05$). Sin embargo, al igual que el C1 no se correlacionó con el COD o con el a_{350} ($r=0.25/0.1$, respectivamente, $p>0.05$). Por último, fue el único componente en el cual se encontró una correlación con las precipitaciones ($r= 0.58$, $p<0.01$).

Este componente representa fluoróforos que tienen la banda de excitación

más amplia (2 picos de excitación a 260 y 360 nm, Tabla 4), así como longitud de onda de emisión más larga (486 nm) asociado con una amplia banda de emisión. Estas características están asociadas a aporte de MOD de origen terrestre de alto PM y contenido aromático (McKnight et al. 2001, Stedmon et al. 2003). Sin embargo, la producción de componentes del tipo húmico también ha sido reportado para actividad microbiana (Yamashita & Tanoue, 2004, Yamashita et al. 2010a, Jørgensen et al. 2011). Experimentos recientes, basados en la producción de fluorescencia, evidencian que C2 (similar al pico C de Coble), podría ser un producto de la re mineralización microbiana de exudados de fitoplancton marino (Romera-Castillo et al. 2011).

El componente C3 ha sido identificado como del tipo-proteína, con una fluorescencia asociada a la del aminoácido triptófano, asociado a producción autóctona, derivado del plancton (C4 0.99 Stedmon et al. 2007, 2011) y al pico T de Coble 1996 (Osburn et al. 2012, C5).

No se observaron diferencias significativas entre zonas (KW, $p > 0.05$), donde en promedio su contribución estuvo entre el 20 y 30 % (Fig. 2.9). Para este componente se observó un pico máximo en los meses de Diciembre 2013 y Enero 2014, alcanzando el 87 %, y fue significativamente superior durante el periodo de barra abierta (KW, $p < 0.05$), presentando una correlación positiva con la T ($r = 0.55$, $p < 0.05$). Además, se observó una correlación positiva con la salinidad ($r = 0.56$, $p < 0.001$), lo que estaría indicando una mayor presencia de este componente y por ende mayor producción microbiana en la zona Sur, que generalmente tuvo una mayor salinidad. Además, a diferencia de los componentes húmicos C1 y C2, se observó una correlación positiva con el COD ($r = 0.43$, $p < 0.05$) y el a_{350} ($r = 0.48$, $p < 0.05$), indicando que gran parte del COD en el pool de MOD del sistema sería de origen microbiano. En ese sentido, este componente, está asociado a producción biológica reciente, lo cual se refleja en la

fuerte correlación con el BIX ($r= 0.88$, $p<<0.001$) y la correlación negativa con HIX ($r=-0.8$, $p<<0.001$), indicando una mayor producción de MOD reciente y con menor grado de humificación asociado a compuestos alifáticos (Parlanti et al. 2000, Ohno et al. 2002).

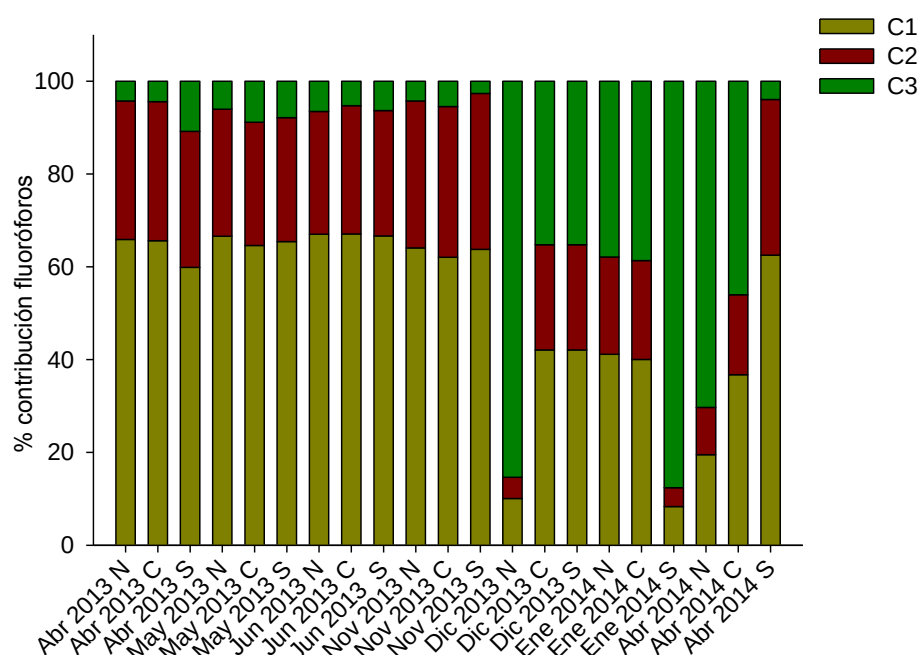


Fig. 2.9. Se muestra el % de contribución de los distintos componentes de la FMOD (C1, C2 y C3) identificados en el modelado en las distintas zonas (N: Norte, C: Centro y S: Sur) durante el periodo de muestreo.

En un estudio reciente se acopló el uso de PARAFAC/EEMs con el análisis FTICR-MS con el fin de asociar la señal de fluorescencia del componente PARAFAC con la familia molecular a la cual pertenecería (Stubbins et al. 2014). Los autores utilizan los componentes PARAFAC descritos en Lapierre et al. 2014, que también utiliza la clasificación de Coble, 1996 explicada anteriormente. En ese sentido, el C1 y el C3 identificados en este estudio se corresponden con los componentes P3

(asociado a la mezcla entre el pico C y A de Coble 1996, Yamashita et al. 2010b, 2011) y P6 (asociado al pico T de Coble, 1996) (Lapierre et al. 2014, Stubbins et al. 2014). Teniendo en cuenta esto, los compuestos que conforman el C1 tendrían un PM promedio de 445 Da, mientras que el del C3 sería de 282 Da, lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos a partir de los SS que indican compuestos de menor PM en el C3 y viceversa.

Según dicho estudio, el C3 tendría mayor contenido de compuestos alifáticos en comparación con los aromáticos, como se observa en este trabajo. Además, los autores concuerdan con que sería el componente más fresco y biodisponible de la FMOD (Lapierre et al. 2014, Stedmon et al. 2005, Jorgensen et al. 2011).

Por otro lado, el C1, presentaría menor diversidad de compuestos, debido a su naturaleza más homogénea, que si bien es del tipo terrestre derivado de lignina y fenoles, serían de baja conjugación y estarían más procesados desde su producción que los compuestos asociados al pico clásico y netamente terrestre (pico A, Stubbins et al. 2014, asociado a *black carbon* y compuestos ultra-biorefractarios). Según Lapierre et al. 2014 este fluoróforo (mezcla de los picos A y C) tendría una biodisponibilidad moderada y una alta foto- labilidad (Lapierre et al. 2014).

Por último, cabe destacar, que si bien el componente PARAFAC C2 encontrado en este sistema no se pudo asociar a ninguno de los descritos en el mencionado estudio (Stubbins et al. 2014), como se mencionó anteriormente se encontró fuertemente correlacionado con el C1. En este sentido, diversos procesos podrían estar causando esta co- variación entre las moléculas que lo componen, como compartir los mismos mecanismos de transporte desde los sistemas terrestres a los acuáticos, o compartir el proceso de ciclado. Incluso, C2 podría ser

producto de la foto degradación o procesamiento microbiano de C1, tal como se ha registrado previamente (Romera Castillo et al. 2011).

II.3.3.4 Experimentos de biodegradabilidad (BCOD)

No se observaron diferencias temporales ni entre zonas (ANOVA, $F=1.50/0.34$, respectivamente, $p>0.05$). Cabe destacar que habría que tener en cuenta el poco número de observaciones como para encontrar resultados robustos estadísticamente ($n=8$).

El % de BCOD se encontró entre el 17 y el 90 %, en donde, salvo en el mes de Abril 2013, donde el BCOD en la zona Norte fue del 90 %, fue mayor en la zona Sur. El mínimo se registró en la zona Centro en el mes de Mayo 2013 (17 %).

Estos porcentajes están por encima de lo encontrado en otros sistemas estuarinos de zonas templadas (Lønborg & Søndergaard 2009). Además se observa una alta variabilidad en el % de BDOC, lo que coincide con lo propuesto por Graeber et al. 2015, en donde postulan que en los sistemas uruguayos la variabilidad tanto en la concentración como en la composición es mayor a lo observada en sistemas similares de otras zonas climáticas debido a una mayor variabilidad en las precipitaciones y descargas de ríos (Graeber et al. 2015). Los autores sugieren que la MOD de origen terrestre que es almacenada en la primera capa de suelo y ha sido degradada durante largo tiempo durante periodos de escasa precipitación podría ser luego lavada durante eventos de alta descarga hacia el sistema. De esta manera la MOD de origen microbiana dominaría durante eventos de baja descarga y la MOD terrestre durante eventos de alta descarga (Graeber et al. 2015).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la medida de la biodisponibilidad es tiempo dependiente, por lo tanto, los altos valores

encontrados en comparación a otros sistemas estuarinos podría deberse a un mayor tiempo de incubación.

Con los resultados obtenidos, podríamos inferir en general una mayor biodisponibilidad de la MOD en la zona Sur que en la Norte. En ese sentido, Fellman et al. 2008 encontraron un % de BCOD entre 23–42% (para concentraciones de COD entre 827– 2650 μM) en diferentes tipos de suelos (humedales y forestales), que indicaría menor biodisponibilidad de la MOD de origen terrestre. Sin embargo, estudios recientes sugieren que COD importado de las zonas terrestres puede ser rápidamente degradado en lagos y ríos, incluso si no es de producción reciente (McCallister & del Giorgio, 2012, Kleber et al. 2011), sugiriendo que la edad y el origen podrían no ser los mejores predictores de la biodegradabilidad de la MOD en zonas costeras y marinas.

Para agregar complejidad, hay que tener en cuenta que el *pool* de carbono considerado recalcitrante basado sólo en sus propiedades moleculares, podría ser biológicamente lábil bajo las condiciones ambientales óptimas. Esto se ha observado tanto en suelos (Schmidt et al. 2011) como en sistemas acuáticos (Marín-Spiotta et al. 2014). Por lo que a la hora de caracterizar la MOD es muy importante tener en cuenta la importancia de los procesos a escalas locales en comparación a los regionales (Vázquez et al. 2011).

Además, cabe destacar que el protocolo empleado en los experimentos de biodegradabilidad (Servais et al. 1989) fue propuesto para sistemas oligotróficos y para COD entre 250 y 1122 μM , por lo que los resultados de este ensayo en particular deben tomarse con precaución.

II.4 Conclusiones

De los descriptores biogeoquímicos empleados en este estudio, podríamos decir que salvo el BCOD, el resto fueron exitosamente aplicados y los resultados obtenidos nos permitieron cumplir con el objetivo planteado de caracterizar la MOD. Además, las EEMs y los índices de fluorescencia permitieron profundizar e identificar distintas fracciones de la MOD hasta ahora no reportadas, así como la comparación con otros sistemas.

Si bien solo se encontraron diferencias significativas entre zonas en el componente húmico C1, el cual fue mayor en la zona Norte; para el resto de los descriptores también existen indicios de que potencialmente en esta zona la MOD tiene mayor contenido de C aromático, y componentes del tipo húmico, asociados a compuestos con un mayor grado de recalcitrancia, lo que confirma parte de la hipótesis planteada en esta tesis en cuanto a una menor biodisponibilidad de la MOD en esta zona. Cabe destacar que estas características están sujetas a cambios temporales y locales y a la predominancia de alguna de las fuentes y/o procesos implicados en los cambios en la composición de la MOD a lo largo del ciclo hidrológico del sistema. Además, se observa cambios en la composición de la MOD en las distintas fases del ciclo hidrológico propuestas en esta tesis, reflejado en los cambios significativos en varios de los indicadores empleados (PM, a_{350} , BIX).

Por otro lado, los resultados encontrados refuerzan la idea de la variabilidad del ciclo hidrológico del sistema, lo cual se refleja en las diferencias encontradas en varios de los indicadores (ej. de PM, cantidad de CMOD, aromaticidad) en comparación con lo reportado anteriormente (Conde et al. 2000) así como la influencia de la dinámica de la barra en la composición de la MOD. Por ejemplo, mientras que en este trabajo se

observaron compuestos de mayor PM, mayor cantidad de CMOD y menor contenido de C aromático al aumentar la cantidad de COD durante el período de barra abierta, Conde & col observaron lo opuesto (Conde et al. 2000). Sin embargo, estos resultados concuerdan con lo sugerido por Conde & col. Los autores sugieren una menor entrada de CMOD de origen terrestre al sistema para el 2010s, debido a una menor descarga de los tributarios (Genta et al. 1998), asociado a un aumento en el periodo de sequía debido a la dinámica del ENSO (Nobre et al. 1991). Este patrón ha sido observado en una laguna costera de la región, Laguna de los Patos-Brasil, donde la reducción en la descarga de los tributarios fue asociado a una disminución en la entrada de COD alóctono y aumento en la biomasa microbiana (Knoppers, 1996), aunque dicho estudio no incluye un evaluación de la calidad de la MOD. De todas maneras, esto escapa al trabajo de esta tesis y sería necesario un estudio más detallado sobre caudales a lo largo del tiempo, y un histórico de la caracterización de la MOD (cuali y cuantitativos).

Los resultados aquí obtenidos, señalan que existe un equilibrio entre el aporte de MOD de tipo terrestre, producción *in situ* debido a la actividad microbiana y fotodegradación de la MOD modulado notoriamente por factores tales como la temperatura y la hidrología del sistema. En particular se evidencia que mientras que la escorrentía y, por ende las precipitaciones, estarían influenciando el aporte de componentes húmicos como el C2 en los meses de verano, durante el período de barra abierta y aumento de la temperatura habría un aumento de la actividad microbiana, reflejado en el aumento del fluoróforo del tipo proteína (C3) y disminución de los del tipo húmico (C1, C2).

Cabe destacar que la cantidad de CMOD en el sistema se ha incrementado considerablemente en comparación con las estimaciones anteriores (a_{350} , hasta 6 veces mayor), lo cual coincide con el gran

aumento observado en el COD en es sistema desde entonces (Capítulo 1).

Este aumento estaría asociado a una mayor producción microbiana en el sistema ya que a_{350} se relacionó con el componente de origen microbiano (C3) y no con los componentes húmicos (C1, C2). Además, no se observó una relación con la salinidad como sucede con los sistemas donde la mayor parte de la MOD es de origen terrestre (Yamashita et al. 2010b, 2011, Kowalczuck et al. 2013). Estos resultados concuerdan además con los encontrados para el S_r el cual nunca fue < 1 ; según Helms et al. 2008 valores de $S_R < 1$ serían característicos de sistemas donde la entrada terrestre es predominante (Helms et al. 2008, Yamashita et al. 2010b), lo que indica una transformación de la MOD en el sistema, ya sea por procesos de fotodegradación o degradación microbiana. En ese sentido, los altos valores encontrados en el FI (> 1.7), puede ser atribuido a fluoróforos producidos por bacterias (Mcknight et al. 2001).

Por lo que estos resultados estarían indicando una predominancia en el aporte de MOD de origen microbiano.

Capítulo 3: Dinámica de la comunidad bacteriana y su relación con las propiedades de la MOD

III.1. Introducción

Las interacciones entre la comunidad bacteriana y la MOD es clave en los ciclos biogeoquímicos, desempeñando funciones claves en el reciclaje de los elementos y en su transferencia dentro de redes tróficas complejas (Azam, 1998). En ese sentido, es fundamental dilucidar la relación entre la composición de la comunidad bacteriana (CCB) y de la MOD con el fin de entender el rol y respuesta de los sistemas acuáticos en los ciclos biogeoquímicos globales.

El enlace entre la CCB y la MOD ha sido ampliamente explorada centrándose desde la evaluación de la CCB durante la incubación con componentes de la MOD de diversas fuentes (Pinhassi et al. 1999, Kirchman et al. 2004, Pérez & Sommaruga 2006, Judd et al. 2006, McCarren et al. 2010), análisis genómico de bacterias cultivadas y no cultivadas (Bauer et al. 2006, Lauro et al. 2009, Teeling et al. 2012) hasta incorporación *in situ* de un sustrato específico (Cottrell & Kirchman 2000, Buck et al. 2009). Existe evidencia de utilización generalista de fracciones específicas de la MOD (Mou et al. 2008) hasta especialistas en diversos compuestos (Poretsky et al. 2010), consumo dominante sobre compuestos específicos por algunos miembros de la comunidad (Alonso & Pernthaler 2006) incluso cambios estacionales en la dominancia (Vila-Costa et al. 2007). Por otro lado, se han observado algunas características a determinado nivel taxonómico (ej. Preferencia de monómeros por las *Alfaproteobacteria*) (Cottrell & Kirchman 2000) y al mismo tiempo especies hermanas han mostrado patrones distintos en la utilización de sustratos *in situ* (Alonso et al. 2009). De esta manera es

necesario encontrar un nivel de resolución adecuado para modelar uso de la MOD por parte de la comunidad bacteriana. En ese sentido, es importante trabajar a distintos niveles de resolución tanto en la CCB como en la MOD.

Análogamente, la composición de la MOD en los sistemas acuáticos aún no es incluida como análisis de rutina en los estudios biogeoquímicos (Jaffe et al. 2008). Además, los pocos estudios que combinan análisis de alta resolución como el FTICR-MS no han encontrado un patrón significativo que permita dilucidar las relaciones CCB-MOD (Herlemann, et al. 2014). Si bien existe un gran avance en dilucidar las interacciones CCB-MOD, hasta el momento no hay ejemplos publicados sobre relaciones estadísticamente significativas entre la abundancia de grupos bacterianos específicos y la composición de la MOD en un sistema natural.

Por otro lado, en el marco de la BCM, el grado de transformación de la MOD lábil a compuestos refractarios es clave en el proceso de almacenamiento de carbono en formas no bio-disponibles (Kowalczyk et al. 2010). La composición y biodisponibilidad del COD está en gran parte determinada por sus fuentes y transformaciones sufridas en los ecosistemas acuáticos, como se mencionó en los capítulos anteriores. Por ejemplo, el COD autóctono está compuesto principalmente por exudados algales y estaría más biodisponible que el alóctono (Battin et al. 1999). Este último deriva, por lo general, de detritus de plantas vasculares y del suelo por lo que tiende a estar menos biodisponible (McKnight et al. 2001).

Estudios de biodegradación realizados en ecosistemas terrestres han identificado un fenómeno denominado “*priming effect*” como proceso clave en el ciclado de carbono (Bingemann et al. 1953, Bianchi et al.

2011). Este fenómeno se basa en que la adición de carbono orgánico fresco y lábil, aumentaría la velocidad de descomposición de la MOD recalcitrante debido al aumento global de la actividad microbiana dado por la mayor disponibilidad de energía liberada a partir de la descomposición de la materia orgánica fresca (Kuzyakov, 2000, Fontaine et al. 2003, Bianchi et al. 2011). Si bien estudios previos han documentado la presencia de un “*priming effect*” impartida por adiciones de nutrientes y carbono biodisponible para sistemas acuáticos (van Nugteren et al. 2009, Guenet et al. 2010), este fenómeno permanece básicamente inexplorado para la mayoría de los sistemas acuáticos (Danger et al. 2013).

En este capítulo se detalla la dinámica de los principales grupos bacterianos en el sistema, su relación con la composición de la MOD (Capítulo 2), y el resto de las variables fisicoquímicas, trabajando a un nivel de resolución intermedio, tanto para la CCB como para la MOD. Además se emplearon experimentos de biodegradabilidad con el fin de identificar patrones en el uso de la MOD del sistema y experimentos de *priming effect* para conocer el rol de los distintos grupos bacterianos analizados en el consumo y producción de la MOD de diferente grado de labilidad.

III.1.1. Área de estudio: Laguna de Rocha

Para el sistema de estudio, Alonso et al. 2013 proponen un modelo de la dinámica de la comunidad microbiana que se centra en los cambios en el procesamiento de carbono a lo largo del ciclo (Fig. 2) descrito por Conde et al. 2000. Para la primera fase, sugieren una alta abundancia y producción bacteriana, y una fuerte presión por pastoreo; donde se espera que la comunidad microbiana este dominada por *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. En la segunda fase continuaría la dominancia por estos grupos, aunque tendrían una importancia creciente

en la zona Sur grupos como *Cytofaga-Flavobacteria* y posiblemente *Actinobacteria*. Finalmente, en la tercera fase todo el sistema desarrollaría las características de la zona Sur en la segunda fase (menor abundancia y producción de carbono bacteriana, así como menor transferencia de carbono a niveles tróficos superiores).

En dicho trabajo se hipotetiza que la comunidad bacteriana de la Laguna de Rocha experimentaría limitación por carbono en durante la fase II en el Sur y en la laguna entera durante la fase III. Sin embargo, los datos existentes hasta ese momento no permitían aventurar si, en caso de existir dicha limitación, esta se debiera principalmente a la concentración o a la calidad del carbono en la Laguna. Por otra parte, si bien estudios anteriores indicaban la importancia del COD alóctono como factor de control para diferentes grupos bacterianos en la laguna (Alonso et al. 2013, Piccini et al. 2013), los antecedentes existentes se basaban en una baja cantidad de datos *in situ* y experimentos, y no contemplaban una exhaustiva caracterización de la MOD *in situ* en cuanto a concentración y calidad.

III.2. Materiales & Métodos

Las muestras corresponden al mismo set de muestras empleadas en el Capítulo 1 y 2.

Se determinó la abundancia de los principales grupos bacterianos presentes en los sistemas acuáticos, y en particular en la Laguna de Rocha, a lo largo del ciclo hidrológico aquí analizado. Para ello se utilizó la técnica de CARD-FISH (Pernthaler et al. 2002), tal como previamente empleada en este sistema (Piccini et al. 2006, Alonso et al. 2013). Brevemente, las muestras de agua fueron fijadas y filtradas en filtros de 0.2 micras, para retener la comunidad microbiana y luego hibridadas con

una serie de oligonucleótidos conjugados a una enzima, que hacen blanco en distintos grupos bacterianos. Luego de la hibridación, la misma se evidenció mediante la adición de un sustrato fluorescente que, al ser procesado por la enzima, se conjuga con las proteínas celulares, marcando de esta forma a las células diana de cada sonda. Finalmente, las muestras se tiñeron con un colorante general de la comunidad microbiana el di-amino-fenil-indol (DAPI, $1 \mu\text{g ml}^{-1}$). La abundancia relativa de las bacterias pertenecientes a los distintos grupos filogenéticos se determinó en un microscopio de fluorescencia con el que se visualizan todas las bacterias teñidas con DAPI y las de cada grupo específico, que aparecen además teñidas con el sustrato fluorescente, en este caso fluoresceína-5-isotiocianato FITC, de color verde. Se contaron 1000 DAPI por muestra. En este trabajo se utilizaron las sondas ALF968 (Neef 1997), BET42a (Manz, et al. 1992), GAM42a (Manz, et al. 1992) and CF319a (Manz, et al. 1996), para identificar los grupos bacterianos predominantes en agua dulce (*Betaproteobacteria*) y marina (*Alfaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Cytofaga-Flavobacteria*, respectivamente).

Los datos de producción bacteriana fueron proporcionados por la Lic. Florencia Bertoglio. Se utilizó el método descrito en Simon & Azam 1989.

III.2.1. Experimentos de biodegradación (BCOD)

Los experimentos de biodegradación se presentaron en el capítulo 2, en el contexto de la determinación de BCOD. Aquí se analizan además los cambios en la composición de la MOD y su relación con los principales grupos bacterianos. Brevemente, estos experimentos consistieron en que, a partir del muestreo de Abril 2013, para cada sitio se filtraron a través de membranas de policarbonato de 0.2 micras 250 ml de muestra, las cuales fueron inoculadas con 2,5 ml de la misma muestra previamente filtrada por filtro de policarbonato de 0,8 micras. Las muestras fueron incubadas

en oscuridad, a temperatura ambiente durante 28 días. Al inicio y al final de los experimentos se tomaron muestras para su caracterización óptica (absorbancia y fluorescencia).

III.2.2. Experimentos de evaluación de las transformaciones de la MOD de distinto grado de labilidad (*Priming effect*)

Se realizaron 3 experimentos para evaluar el efecto a corto plazo de la adición de fuentes de carbono que difieren en el grado de labilidad - concentrado de macrófitas y exudados algales en la transformación de la MOD. Dichos experimentos se llevaron a cabo en Mayo 2013, Noviembre 2013 y Abril 2014. Brevemente, se trabajó con muestras de la zona Sur, las cuales se filtraron 250 ml a través de filtros de polycarbonato de 0.2 micras y se les agregaron 2.5 ml de muestra filtrada por 0.8 micras como inóculo bacteriano. Las muestras fueron subsiguientemente divididas en 3 grupos ("Macrófitas", "Rodomonas" y Control). Al grupo Macrófitas se le agregó concentrado de macrófitas (ver abajo detalle de preparación), al grupo Rodomonas se le agregó concentrado de cultivo de Rodomonas, al grupo control no se le adicionó ningún sustrato. Ambos sustratos se agregaron en la misma concentración final (0.5 mg/l, 41.6 μ M de C). Los tratamientos se realizaron por triplicado y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 28 días. Se tomaron muestras al inicio y al final de los experimentos con el fin de caracterizar la MOD, empleando los descriptores ópticos detallados en el capítulo 2. Además, se tomaron muestras para determinar la abundancia de los grupos bacterianos principales.

III.2.2.1.Preparación de sustratos

Macrófitas: Se colectaron 5 piezas de *S. californicus* de la Laguna de Rocha de entre 15 y 20 cm, las cuales fueron "licuadas" en 500 ml de

agua MiliQ previamente esterilizada en autoclave. Luego éste preparado se prefiltró por malla de 50 μm y por 0.2 μm . El material empleado fue previamente lavado con HCl al 10% y enjuagado con agua MiliQ

Cultivo de algas (*Rodomonas*): Se “licuaron” 500 ml de cultivo de *Rodomonas* (proporcionado por la Dra. Laura Rodríguez) y se siguió el mismo procedimiento antes detallado para el sustrato *Macrófitas*.

III.2.3. Análisis estadístico

Para determinar diferencias entre zonas, temporales, así como entre las distintas fases del ciclo y apertura-cierre de la barra, en la abundancia total, producción bacteriana y abundancia de cada grupo, así como las relaciones con las distintas variables analizadas se realizaron los análisis estadísticos antes mencionados en el Capítulo 1 y 2 (análisis ANOVA, Kruskal Wallis y Correlación de Spearman).

Se empleó además el análisis de regresión lineal múltiple (RLM) para modelar funcionalmente la abundancia de cada grupo bacteriano en relación a las variables ambientales (*in situ* y nutrientes) cantidad (COD) y composición de la MOD analizada (descriptores biogeoquímicos de CMOD y FMOD).

Como paso previo, se empleó el análisis de componentes principales (ACP) con todas las variables analizadas con el fin de reducir y seleccionar el número de variables explicativas a emplear en cada modelo.

Una vez definido el conjunto de las variables a utilizar, se empleó la selección para atrás (*backward*) con el fin de obtener el modelo más parsimonioso (Legendre & Legendre, 2012), esto es, se comienza con todas las variables explicativas y se retira la variable con mayor p-valor;

se vuelve ajustar el modelo y se retira nuevamente la variable con mayor p-valor, y así sucesivamente hasta que todas las variables tengan un $p < 0.05$.

Para la selección del mejor modelo se utilizó el índice Akaike (AIC) para (Borcard et al. 2011), chequeó de los residuales (ej. Normalidad) y *outliers* con el fin de maximizar el coeficiente de determinación R^2 , además, se realizó el análisis ANOVA entre modelos con el fin de confirmar que no se perdía información al excluir x variable.

Se realizó el Test de correlación de Spearman (r) con el fin de explorar la relación entre variables relacionadas a la composición de la MOD excluidas del modelo y la abundancia de los distintos grupos.

Por último, se empleó el análisis de componentes principales (ACP) con las variaciones de las variables a_{254} , a_{350} , HIX, FI, C_1 y C_3 estandarizadas en los experimentos de BCOD para identificar distintos grupos en las transformaciones de la MOD y en base a esto definir distintos patrones. Además, se realizó el análisis ANOVA con las variables ambientales *insitu* con el fin de asociar los patrones identificado en el ACP con distintas condiciones ambientales.

Todos los análisis se realizaron en el programa R (Core Development, versión R 3.1.2).

III.3. Resultados y Discusión

III.3.1. Abundancia y producción bacteriana a lo largo del ciclo hidrológico de la laguna de rocha

En promedio la abundancia bacteriana para todo el período analizado se situó en $6.55\text{E}+06 \pm 1.53\text{E}+06$ células/ml. El valor máximo se registró en la zona Norte en el mes de Febrero 2013 con un pico de $1.04\text{E}+07$ células/ml, mientras que el mínimo se observó en la zona Sur en el mes de Abril 2013 ($3.42\text{E}+06$ células/ml) (Fig. 3.10 A).

El pico máximo registrado es similar a lo observado por Piccini et al. 2006, donde se registraron 2 picos en los meses estivales de Marzo y Diciembre 2003 ($1.8 \text{E}+07 \pm 0.7 \text{E}+07$ células/ml y $1.3 \text{E}+07 \pm 0.3 \text{E}+07$ células/ml, respectivamente) asociados a un *bloom* de cianobacterias, las cuales fueron luego identificadas como *bloom* mono específicos de miembros de *Alfaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, respectivamente. En ese sentido en Febrero 2013 se detectó la presencia de colonias de la cianobacteria *Microcystis* (Calliari, D. com per).

En la zona Norte se observó tanto un aumento en tanto en la abundancia promedio como en su rango de variación (Fig. 3.10 A) en comparación con estudios previos (Piccini et al. 2006), donde los autores encontraron abundancias entre $2.1\text{E}+06$ a $6.9 \text{E}+06$ células/ml y (Alonso et al. 2013 $\sim 5.2 \text{E}+06$). Como se puede observar, el mínimo registrado en este estudio está un poco por encima de lo encontrado previamente.

Se observó mayor variabilidad en la abundancia en la zona Sur que en la Norte, mientras que la más estable fue la zona Centro: las abundancias se encontraron entre $3.4\text{E}+06 \pm 9.1\text{E}+06$, $5.2\text{E}+06 \pm 1.04\text{E}+07$ y $5.1\text{E}+06 \pm 8.1\text{E}+06$ células/ml, respectivamente (Fig. 3.10 A). La mayor variabilidad observada en la zona Sur coincide con una mayor variabilidad en algunos descriptores de la MOD (Capítulos 1 y 2), por ejemplo, ocurrió una mayor variación en la concentración de COD, NTD, PTD, índice de PM, SR y FI.

No se observaron diferencias significativas entre zonas (Fig. 3.12 A, ANOVA, $F=0.253$ $p > 0.05$), a diferencia de lo observado en estudios

anteriores donde la abundancia en el Sur fue significativamente mayor que en el Norte (Piccini et al. 2006). Tampoco se observaron diferencias entre fases o dinámica de la barra (ANOVA, $F=1.07/1.82$, $p > 0.05$)

Sin embargo, se observaron diferencias significativas estacionales (ANOVA, $F=10.26$ $p < 0.001$), principalmente debido a las mayores abundancias registradas en los meses de Febrero 2013 y Marzo 2013 en comparación con Abril 2013, Mayo 2013 y Abril 2014 (Fig. 3.10 A). De todas maneras, las abundancias más bajas registradas en este estudio siguen siendo mayores a las encontradas en estudios anteriores (Piccini et al. 2006, Alonso et al. 2013).

Además, se observó una correlación positiva entre la abundancia total y la T ($r= 0.47$, $p < 0.05$) y una correlación negativa con el pH ($r= - 0.43$, $p < 0.05$). Para el resto de las variables no se observó una correlación significativa (K, Salinidad, O, COD, nutrientes).

Estos resultados estarían indicando que la abundancia bacteriana tendría una mayor variación temporal que entre zonas.

En cuanto a la producción bacteriana no se observaron diferencias significativas entre zonas (Fig. 3. 10 B, ANOVA, $F= 0.168$, $p > 0.05$), lo cual concuerda con estudios anteriores (Piccini et al. 2006, Alonso et al. 2013). Sin embargo, se observa un aumento de la producción bacteriana promedio desde la zona Norte hacia la Sur ($7.8E+03 \pm 1.6E+04$ Norte, $6.2E+03 \pm 1.1E+04$ Centro, $1.1E+04 \pm 2.2E+04$ Sur $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Al igual a lo observado anteriormente por Piccini et al. 2006, la actividad bacteriana fue menor en los meses de invierno y mayor en los de verano. Como se puede observar en la Fig. 3. 10 (A y B) la abundancia y la producción tuvieron un comportamiento espejo en sus variaciones

temporales: Por ejemplo, los máximos tanto de abundancia como de producción bacteriana se detectaron en los meses de Febrero 2013, Marzo 2013 y Enero 2014, mientras que los mínimos se registraron en Abril 2013 y Mayo 2013 (Fig. 3.10). Sin embargo, es de destacar que dichos cambios tuvieron magnitudes muy diferentes, siendo mucho más dramáticos para la producción que para la abundancia (Fig. 3.10, producción escala log).

Se encontraron diferencias significativas temporales en la producción bacteriana entre los máximos y mínimos registrados, la cual fue significativamente superior durante el período de barra abierta y fase II salobre (Fig. 3.10 B, ANOVA, $F = 194.2/9.045/ 6.4$, $p < 0.01$, Tukey test $p < 0.01$).

Por otra parte, si bien no hubo diferencias significativas entre zonas ni para abundancia ni para producción, es interesante que si bien se observó una mayor abundancia en general en la zona Norte, la producción fue mayor en la zona Sur en más de la mitad de los muestreos (5) (Fig. 3.10 A y B).

Los valores encontrados en el mes de Febrero 2013 son entre 30, 20, y casi 50 % mayores al pico máximo de producción registrado por Piccini et al. 2006 en las zonas Norte, Centro, y Sur, respectivamente. Inclusive sin considerar los picos máximos reportados por Piccini et al. 2006, de todas maneras para el resto de nuestro período de estudio los valores encontrados son entre un 15 y 20 % mayores en el mes de Marzo 2013 y Enero 2014 por ejemplo, y entre un 2 y 8 % para el resto del período. Incluso en los meses donde se registraron las producciones más bajas éstas son mayores a las registradas por Piccini et al. 2006 y Alonso et al. 2013.

Estos resultados estarían indicando un aumento sustancial en la producción bacteriana en el sistema a lo largo del tiempo, especialmente en la zona Sur.

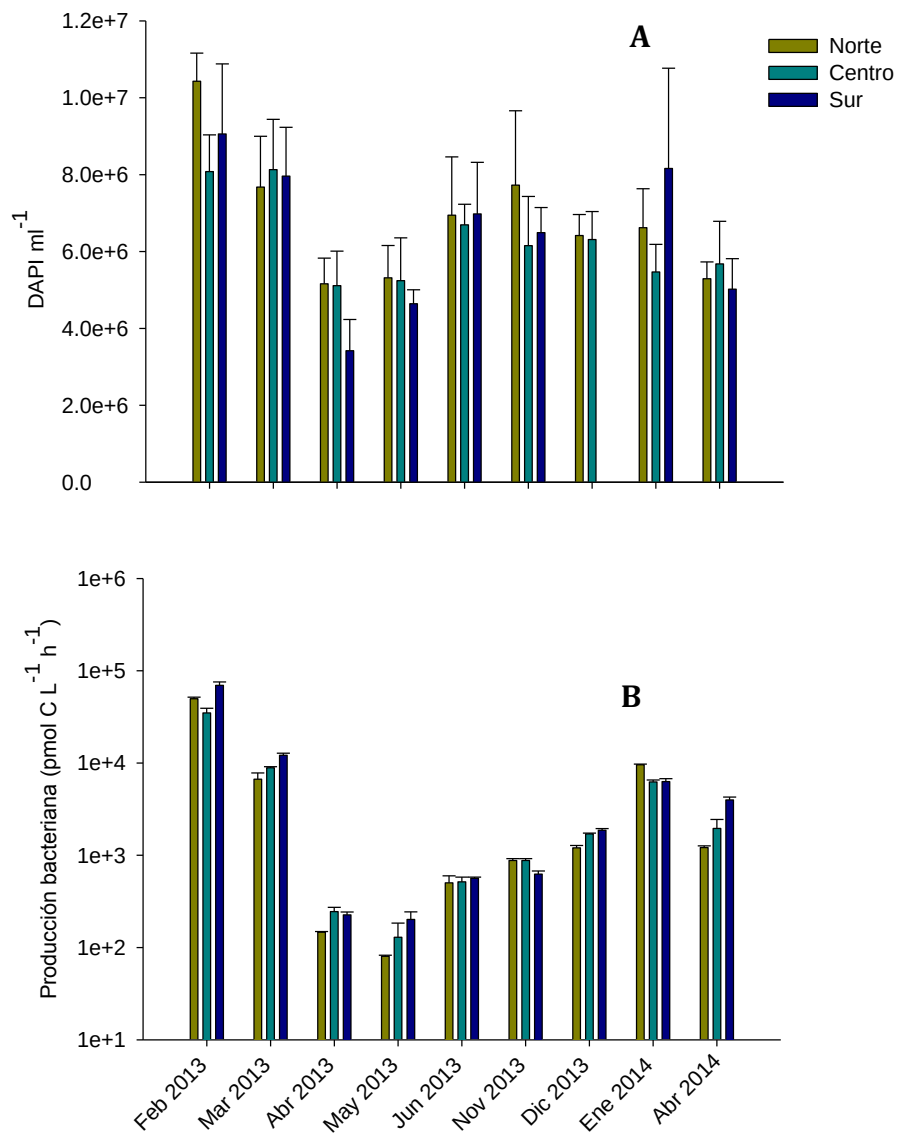


Fig. 3.10. Se muestra la Abundancia total (A) y Producción bacteriana (B) para cada zona durante el periodo de muestreo. Los datos de producción bacteriana fueron proporcionados por la Lic. Florencia Bertoglio.

En referencia a la hipótesis propuesta por Alonso et al. 2013 en cuanto a la dinámica bacteriana a lo largo del ciclo hidrológico (Fig. 2) los resultados encontrados en este estudio para abundancia total y producción bacteriana en las distintas fases coinciden parcialmente. Por ejemplo, si bien en el mes de Enero 2014 cuando el sistema se encontraba en la fase I la abundancia y producción fue considerablemente alta en comparación al resto, no fue la máxima, sino que los valores de producción y abundancia máxima se registraron durante los meses de Febrero 2013 y Marzo 2013, donde la laguna se encontraba en fase II salobre y fase III.

III.3.2. Dinámica de los principales grupos bacterianos a lo largo del ciclo hidrológico

En cuanto a la abundancia de los grupos bacterianos analizados (*Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gamaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria*), no se observaron diferencias significativas entre zonas para ninguno de ellos (Fig. 3.11, ANOVA, $F=0.049/0.848/0.093/0.148$ $p>0.05$, respectivamente).

Para el grupo *Alfaproteobacteria* no se observaron diferencias temporales (Fig. 3.11 A, ANOVA, $F=0.922$ $p<0.05$), siendo el grupo dominante a lo largo del muestreo, en coincidencia con lo encontrado en Piccini et al. 2006 para este sistema y para otros sistemas estuarinos, como el Río de la Plata (Alonso et al. 2010).

En contraste, sí se observaron diferencias temporales en los grupos *Betaproteobacteria* (Fig. 3.11 B, ANOVA, $F=3.362$ $p<0.05$), debido a las mayores abundancias registradas en el mes de Marzo 2013 en comparación con Junio 2013 y Abril 2014 (Tukey test <0.05), *Gammaproteobacteria* (Fig. 3.11 C, ANOVA, $F=3.803$ $p<0.01$) debido a

las mayores abundancias registradas en el mes de Enero 2014 con respecto a Junio 2013 y Abril 2014 (Tukey test < 0.05), y *Cytofaga-Flavobacteria* (Fig. 3.11 D, ANOVA, $F=4.772$ $p<0.01$), en donde las abundancias encontradas en el mes de Febrero 2013 fueron superiores a las encontradas en el Abril 2013 y Noviembre 2013 (Tukey test < 0.005). En todos los casos las mayores abundancias registradas coinciden con los meses de verano, en los cuales hubo cambios significativos para diferentes variables (Capítulo 1) además de cambios en el COD y en la composición de la MOD (Capítulo 2).

Interesantemente, si bien estas diferencias temporales podrían estar asociadas a los cambios en la salinidad, ya que es uno de los factores señalados como más importantes en los cambios en la composición filogenética y metabólica de las poblaciones bacterianas en estos sistemas (del Giorgio & Bouvier, 2002, Alonso et al. 2010), no se observó una correlación significativa ni fuerte para ninguno de los grupos con la salinidad (Spearman, $p > 0.05$). Además, como se mencionó en el capítulo 1 tampoco se observaron diferencias significativas temporales en cuanto a la salinidad en la Laguna; de hecho ésta se encontró en condición poli a mesohalina no registrándose valores extremos tanto de agua dulce como salada que pudieran reflejar estas preferencias antes mencionadas. Esto también podría explicar el hecho de que no se hayan observado diferencias significativas entre zonas.

Por otro lado, para los grupos *Gammaproteobacteria* y *Cytofaga-Flavobacteria* se encontraron diferencias en su abundancia entre la apertura-cierre de la barra (ANOVA, $F= 2.95$, $p=0.09$, $F=9.343$ $p<0.005$, respectivamente) en ambos casos fue superior durante la barra abierta. Cabe destacar que el grupo *Cytofaga-Flavobacteria* fue el único en el cual se observaron diferencias marginalmente significativas entre fases (ANOVA, $F=3.038$ $p=0.0506$), siendo mayor durante la fase II salobre en

comparación a la II invertida (Tukey test, $p=0.056$). En ese sentido, se encontró una fuerte correlación positiva entre la producción bacteriana y este grupo ($r=0.62$, $p<0.001$), mientras que para los grupos *Alfaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* la correlación observada fue más leve y marginalmente significativa ($r=0.40/0.34$, $p=0.08$).

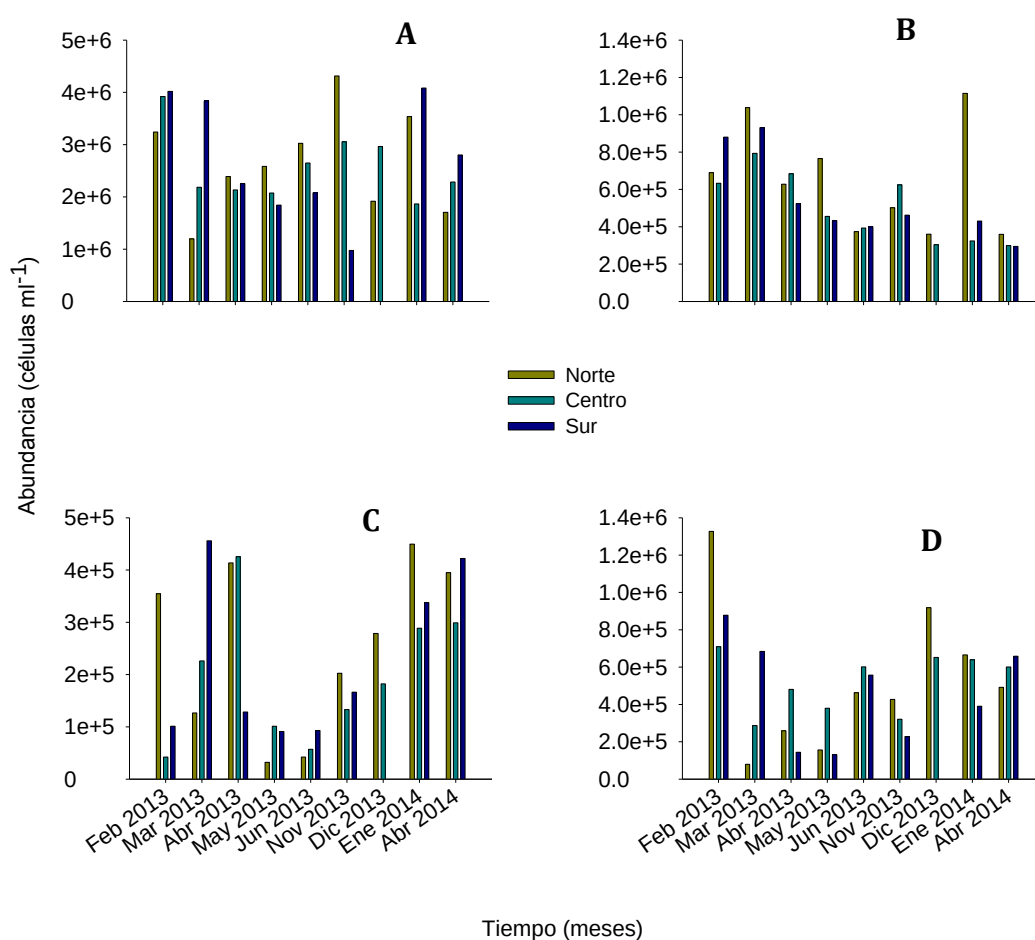


Fig. 3. 11. Se muestra la Abundancia de los principales grupos bacterianos. A: *Alfaproteobacteria*, B: *Betaproteobacteria*, C: *Gammaproteobacteria* y D: *Cytofaga-Flavobacteria*, para cada zona durante el periodo de muestreo.

En cuanto a los factores que explicarían los cambios en la abundancia de los diferentes grupos, según el modelo de regresión lineal múltiple (RLM) las variables que mejor explican los cambios observados en la abundancia del grupo *Alfaproteobacteria* serían la T, el a₃₅₀, el C1 (p < 0.0001), la concentración de NH₄ y NTD, el C2 (p < 0.001), el COD y el Sr (p < 0.05). Este modelo explica el 94 % de la variación encontrada en este grupo, la ecuación sería $y = -11080000 + 212400 \cdot T + -3468 \cdot \text{NH}_4 + -928 \cdot \text{NTD} + -256200 \cdot a_{350} + 3580000 \cdot S_R + 6809000 \cdot C1 + -10320000 \cdot C2 + -332 \cdot \text{COD}$, donde y es la abundancia de *Alfaproteobacteria*.

Para el caso de las *Betaproteobacteria* el RLM elegido explica el 75 % de la variabilidad observada y la abundancia se explicaría con las variables PO₄, el NO₃, el C3, BIX (p < 0.0001), y el HIX (p < 0.001). Este grupo tendría referencias por altas concentraciones de PO₄ y bajas de NO₃, por MOD de origen microbiano, no humificado pero de producción tardía, o procesado. La ecuación sería $y = 7847467 + -4744 \cdot \text{NO}_3 + 10810 \cdot \text{PO}_4 + 711094 \cdot C3 + -4375028 \cdot \text{HIX} + -3151777 \cdot \text{BIX}$, donde y es la abundancia de las *Betaproteobacterias*.

Para el grupo *Gamaproteobacteria* las variables que explican los cambios encontrados en las abundancias son la temperatura (p < 0.0001), el COD, (p < 0.001) y el índice BIX (p < 0.05). El modelo explica el 73 % de la variabilidad encontrada, que indica una preferencia por mayores temperaturas y concentraciones de COD, aunque no de producción reciente, sino más bien procesado. La ecuación sería $y = -787400 + 35570 \cdot T + 113 \cdot \text{COD} + -80840 \cdot \text{BIX}$, donde y es la abundancia de las *Gamaproteobacteria*.

Para el grupo *Cytofaga-Flavobacteria* el modelo elegido explica el 67 % de la variabilidad observada. Las variables que sirven para explicar la abundancia de este grupo son la T, el NO₂ y los componentes C1 y C2 (p

< 0.05). Este grupo tendría preferencia por mayores temperaturas y menores cargas de NO₂, así como preferencia por el C1 del tipo húmico terrestre, rico en ácidos fúlvicos, no así por el C2 de origen terrestre. La ecuación sería $y = -186547 + 33744 * T + -27513 * NO_2 + 1057898 * C1 + -2042402 * C2$, donde y es la abundancia de los *Cytofaga-Flavobacteria*

Tabla 3.5. Modelo de RLM con las variables que explican la abundancia en cada grupo.
Códigos Significativos.: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05'.

	<i>Alfaproteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Cytopaga- Flavobacteria</i>
Variables insitu				
T	***		***	*
Nutrientes				
NH ₄	**			
NO ₃		***		
NO ₂				*
NTD	**			
PO ₄		***		
COD	*		**	
Composición MOD				
C1	***			*
C2	**			*
C3		***		
SR	*			
a ₃₅₀	***			
BIX		***	*	
HIX		**		

Los resultados obtenidos indican que las variables empleadas sirven para explicar en buena medida la abundancia de los distintos grupos en el sistema. El grupo *Alfaproteobacteria* sería el que estaría más controlado por las características fisicoquímicas del ambiente*, lo que concuerda con lo propuesto para este grupo en cuanto a una predominancia de control *bottom up* en el sistema (Alonso et al. 2013, citas) a diferencia de las *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* para quienes el control *top down* tiene mayor relevancia, tanto en este sistema (Alonso et al. 2013) como en otros ambientes acuáticos (Simeket et al. 2001, Beardsley et al. 2003). La importancia del control *top down* para estos grupos puede explicar el menor porcentaje de explicación obtenido, debido a la ausencia de las variables relacionadas a la predación en el modelo.

En cuanto al grupo *Cytofaga-Flavobacteria* si bien se obtuvo un porcentaje relativamente alto, este fue menor al resto, lo que podría estar implicando la importancia de variables mas complejas (además de la predación) en el control de la abundancia de este grupo. Es de destacar que a diferencia de los grupo *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* que están generalmente dominados por muy pocas poblaciones, por ejemplo, en la Laguna de Rocha dominaría SAR11 (Thompson et al. 2011) y en un sistema de similares características la mitad de las *Betaproteobacteria* pertenecerían a sólo tres poblaciones (Alonso et al. 2009), las *Cytofaga-Flavobacteria* en los ambientes acuáticos se caracterizan por presentar un elevado número de poblaciones diferentes, que pueden por ende diferir en sus factores de control (Gómez et al. 2010, Diez-Vives et al. 2013).

III.3.3 Relaciones entre la composición y concentración de la MOD y los grupos bacterianos principales

Según lo observado en el modelo de RLM para el grupo *Alfaproteobacteria*, la concentración y composición de la MOD serían factores claves en el control de este grupo ya que se observa la presencia de varias de estas variables en el modelo que explica la abundancia en el sistema (Tabla 3.5). El perfil indicado para este grupo de acuerdo con el modelo RLM es que tendría preferencias por bajas concentraciones de COD y compuestos de la fracción del tipo húmico (C1, Capítulo 2), enriquecido con ácidos fúlvicos, además el índice Sr indica preferencia por compuestos de bajo peso molecular (BPM). Esto concuerda con la relación observada con el a_{350} , que indica una preferencia por compuestos con bajo contenido de lignina, como se ha observado en otros estudios donde se encontró preferencia por derivados algales y no de plantas vasculares (Poretsky et al. 2010), sumado además a la relación negativa observada con el C2, componente húmico de origen terrestre, que podría ser producto de la degradación del C1 (Romera-

Castillo et al. 2011), que además como se mencionó en el Capítulo 2, está asociado a MOD compuesta por compuestos de alto peso molecular (APM) y gran contenido de C aromático (McKnight et al. 2001, Stedmon et al. 2003).

Los resultados encontrados para las *Alfaproteobacteria* concuerdan con lo observado en otros estudios. Preferencia por bajas concentraciones de COD (Alonso et al. 2006a) y compuestos de BPM, tanto el grupo dominante en agua marina SAR11 (Alonso-Saez et al. 2007, Malmstrom et al. 2004) como su contraparte de agua dulce LD12 (Salcher et al. 2011), asociados a condiciones oligotróficas, postulado para los miembros más abundantes de este grupo (SAR11), delineado a partir de diferentes aproximaciones (ej. Lauro et al. 2009).

Interesantemente, no se encontró una relación con el componente del tipo proteína-triptófano, esto podría esperarse en base a la reportada preferencia de este grupo por monómeros (Malmstrom et al. 2004, Alonso & Pernthaler 2006b, Alonso-Saez et al. 2007). Además, este componente sería el más fresco y biodisponible de la FMOD (Lapierre et al. 2014, Stedmon et al. 2005, Jorgensen et al. 2011). Por el contrario, se observa una preferencia por el componente del tipo húmico, asociado a derivados de origen terrestre, enriquecido en ácidos fúlvicos, con compuestos de baja conjugación pero de biodisponibilidad moderada (Lapierre et al. 2014). Esto coincide con lo reportado por Lauro et al. 2009: en un detallado análisis del genoma de un representante del grupo *Alfaproteobacteria* (*S. alaskensis*), se encontraron sobrerrepresentados genes ligados a la degradación de compuestos aromáticos, además de un número importante de genes asociados a reacciones de desintoxicación, degradación de xenobióticos, así como asociados al catabolismo de compuestos recalcitrantes (Lauro et al. 2009).

En suma, los resultados son coherentes teniendo en cuenta que las *Alfaproteobacteria* son las que dominan la comunidad a lo largo de todo el ciclo hidrológico del sistema y el C1 fue la fracción de la MOD más abundante en la mayoría del período.

En el caso de las *Betaproteobacteria* los resultados encontrados en el RLM indican que un aumento en el componente del tipo proteico-triptófano así como una disminución en el grado de humificación de los compuestos estarían favoreciendo el crecimiento de este grupo. Sin embargo, los resultados también indican una afinidad por MOD de origen terrestre y más procesada, ya que se observó una correlación positiva significativa entre las *Betaproteobacteria* con el C1 ($r= 0.46$, $p<0.05$), asociado a compuestos derivados de origen terrestre (Capítulo 2).

En un estudio realizado en una laguna costera de la región, donde se analizaron los patrones de incorporación de sustratos en distintas poblaciones de *Betaproteobacteria*, se observó la preferencia por compuestos húmicos en *Polynucleobacter* (PnecC) mientras que en el cluster R-BT se observó una mayor flexibilidad en cuanto al uso de diversos sustratos, siendo capaz de adaptarse a un rango más amplio de condiciones fisicoquímicas (Alonso et al. 2009). Los autores proponen que *Polynucleobacter* estaría controlado por otras variables, además del pH y la T (Wu & Hahn, 2006), como por ejemplo el contenido de sustancias húmicas y que tendría un estilo especialista mientras que R-BT se comportaría como generalista (Alonso et al. 2009). En adición, Burkert et al. 2003 encontraron que algunos miembros pertenecientes a *Polynucleobacter* dominaban en zonas con mayor aporte de MOD de origen alóctono en un lago, los autores postulan que éstas estarían especializadas en responder a las fluctuaciones en el aporte de MOD de origen alóctono (Burkert et al. 2003). Mientras que, para R-BT se ha observado la preferencia por sustratos simples como aminoácidos, así

como sustratos que provienen de la descomposición de macromoléculas (Pérez et al. 2014). Nuestros resultados podrían estar asociados a la presencia de estas poblaciones en el sistema con abundancias similares observándose un patrón mixto en la utilización de la MOD.

En cuanto al grupo *Gammaproteobacteria*, los resultados obtenidos en el RLM indican preferencias por altas concentraciones de COD y por compuestos más bien derivados de origen terrestre. Como se observa en el RLM este grupo estaría fuertemente controlado por la temperatura y por el COD. Estos resultados concuerdan con lo hasta ahora encontrado para representantes de este grupo, con un estilo de vida copiótrofo, esto es preferencias por altas concentraciones de COD (Lauro et al. 2009), como por ejemplo en medios de cultivo (Mou et al. 2008), floraciones algales (Piccini et al. 2006). Además, el grupo ha sido descrito como generalista en cuanto al uso de distintos compuestos de la MOD (Mou et al. 2008, Poretsky et al. 2010). Por ejemplo, Mou et al. 2008, encontraron que este grupo dominaba tanto en cultivos donde se agregó una fuente de COD de origen microbiano (exudado fitoplancton) como COD de origen terrestre (derivado de la lignina). Esto podría explicar sus preferencias por compuestos derivados de origen terrestre encontrado en este estudio, sumado a la correlación negativa observada con los índices espectrales $S_{275-295}$ y $S_{350-400}$ ($r=-0.64/-0.59$, respectivamente, $p<0.05$, Spearman) que indican una mayor abundancia en presencia de compuestos de APM. Esto concuerda con lo encontrado en cultivos donde se adicionó una fuente de COD de APM considerada semilábil y la comunidad se encontró dominada por tres familias del grupo Gama, las cuales correspondían a una pequeña fracción al inicio del experimento (Mc Carren et al. 2010).

Para las *Cytofaga-Flavobacteria*, según los resultados del modelo de RLM, tendrían preferencia por el C1 de tipo húmico, mientras se observa una relación negativa con el C2 del tipo terrestre, al igual que las

Alfaproteobacteria. Si bien estos grupos tendrían preferencias similares en cuanto los componentes fluorescentes de la MOD, se observan preferencias opuestas en cuanto a la concentración y al PM de estos compuestos ya que se observó una correlación positiva entre las *Cytofaga-Flavobacteria* y el COD ($r = 0.47$, $p < 0.05$, Spearman) y negativa con el $S_{275-295}$ ($r = -0.64$, $p < 0.005$, Spearman). Esto estaría indicando una mayor abundancia de este grupo a mayores concentraciones de COD y en presencia de compuestos de APM, opuesto a lo observado en las *Alfaproteobacteria*. Algunas poblaciones microbianas que compiten por el mismo sustrato difieren en las preferencias en cuanto a la concentración del mismo, y en particular miembros de las *Cytofaga-Flavobacteria* han demostrado activarse en presencia de concentraciones relativamente altas de sustrato, en clara contraposición a lo observado para miembros de las *Alfaproteobacteria* que suelen preferir concentraciones más bajas (Alonso et al. 2006).

En relación a la preferencia por compuestos de APM, estos resultados coinciden con los encontrados en varios estudios (Alonso-Saez et al. 2007, Sacher et al. 2011, Cottrell & Kircham 2000). Por ejemplo, en los experimentos desarrollados por Cottrell & Kircham 2000 basados en la incorporación de distintos sustratos marcados, los autores encontraron preferencia por compuestos de APM en el grupo *Cytofaga-Flavobacteria*. Además, se ha observado que este grupo sería favorecido por cambios fuertes en las condiciones ambientales (Alonso et al. 2013) y ha sido encontrado en zonas de mezcla (Bouvier & del Giorgio, 2002; Alonso et al. 2010)

III.4.1 Conclusiones

Nuestros resultados indican un aumento sustancial tanto en la abundancia como en la producción bacteriana en el sistema en comparación con estudios previos (Piccini et al. 2006, Alonso et al. 2013). La producción y abundancia tendrían dinámica más bien temporal que espacial, reflejada en el aumento de estas en los meses de verano. Sin embargo, se observa un cambio en los patrones, en cuanto a la abundancia y productividad en la zona Sur, con respecto a lo observado anteriormente (Piccini et al. 2006 y Alonso et al. 2013). Esto podría estar asociado al aumento de nutrientes en esta zona (mayor COD, NTD y PTD, Capítulo 1) así como a una mayor biodisponibilidad de los compuestos de la MOD y al origen de ésta, en concordancia con la hipótesis planteada en esta tesis sobre compuestos más refractarios en la MOD de la zona Norte (como se detalló en el Capítulo 2).

Los factores que controlan la abundancia bacteriana de cada grupo en el sistema son distintos, siendo de gran relevancia las características de la MOD, tanto su concentración como su composición. Además, se observaron distintas preferencias en el uso de las fracciones de la MOD por los grupos analizados, tal como lo propuesto en la hipótesis II.

En cuanto a la influencia de la dinámica de la barra se observa un efecto en la producción bacteria (mayor con barra abierta y fase II salobre), y un efecto diferencial sobre los distintos grupos bacterianos, no así en la abundancia bacteriana total.

III.3.4 Experimentos de biodegradabilidad (BCOD)

Durante los experimentos de biodegradación se observaron importantes cambios en las características espectrales de la MOD debido a las transformaciones bacterianas (Fig. 12, 13).

Si bien en ninguno de los casos estas diferencias fueron significativas, en la mayoría de los experimentos se observa un aumento de los índices espectrales (Fig. 3.12 A y B), o sea, disminución del PM de los compuestos, que estaría indicando un consumo por parte de la comunidad microbiana de compuestos más pesados y/o la producción de compuestos de BPM, ya que se ha demostrado que los componentes de la MOD pueden representar tanto sustratos para la comunidad bacteriana como productos de su metabolismo (Jiao et al. 2010, Guillemete & del Giorgio 2012).

Además, también se observó un descenso en la aromaticidad (SUVA) y color (a_{350}) en la mayoría de las incubaciones sin embargo, en algunos casos se observó un aumento (Fig. 3.12 C y D, Ej. Abril 2013 Norte y Centro y Enero 2014).

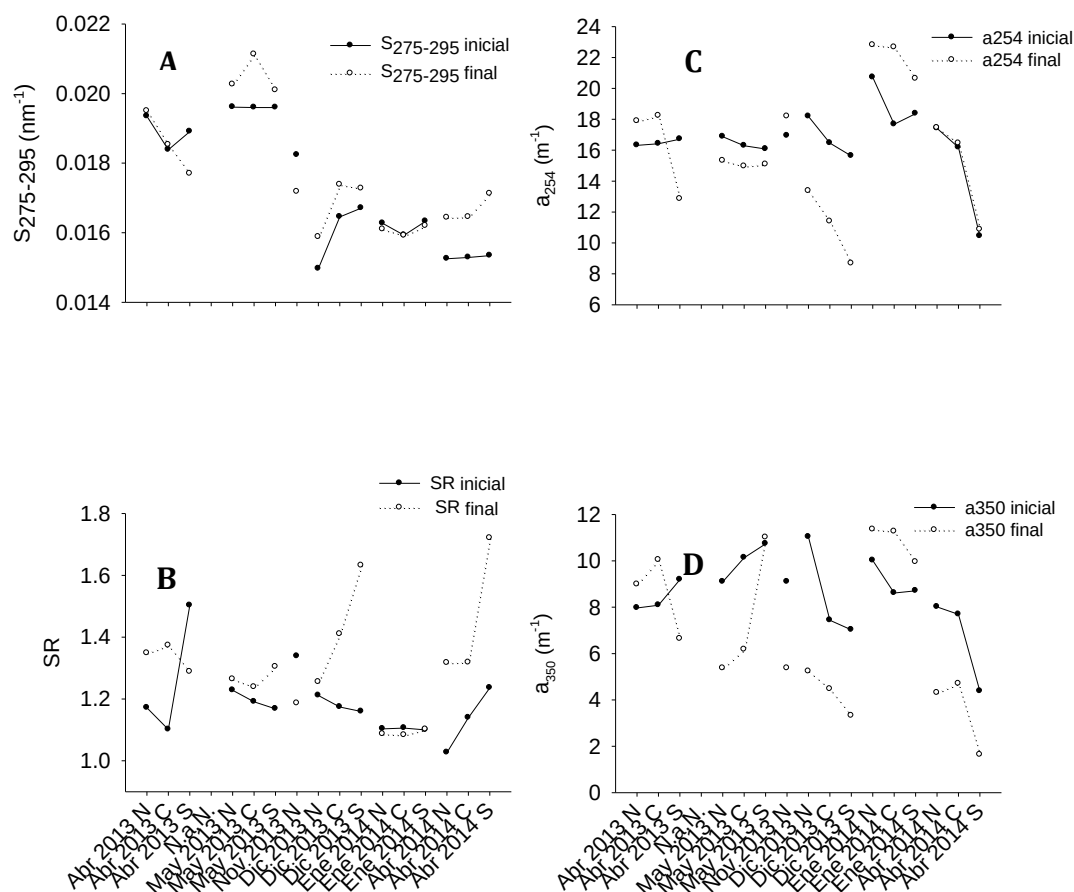


Fig. 3.12. Se indica la variación en la pendiente espectral $S_{275-295}$ (A), S_R (B), coeficiente de absorción a_{254} (C) y coeficiente de absorción a_{350} (D) en los experimentos de BCOD.

En cuanto a los índices de fluorescencia no se observa una tendencia clara (Fig. 3.13), por ejemplo, el FI aumentó en algunos casos (Abril 2014), mientras que en otros disminuyó (Fig. 3.13 A, Mayo 2013), el HIX y BIX se mantuvo bastante constante, salvo en Abril 2014 en la zona Centro y Sur, donde se registró un aumento del HIX y disminución del BIX (Fig. 3.13 B y C, respectivamente).

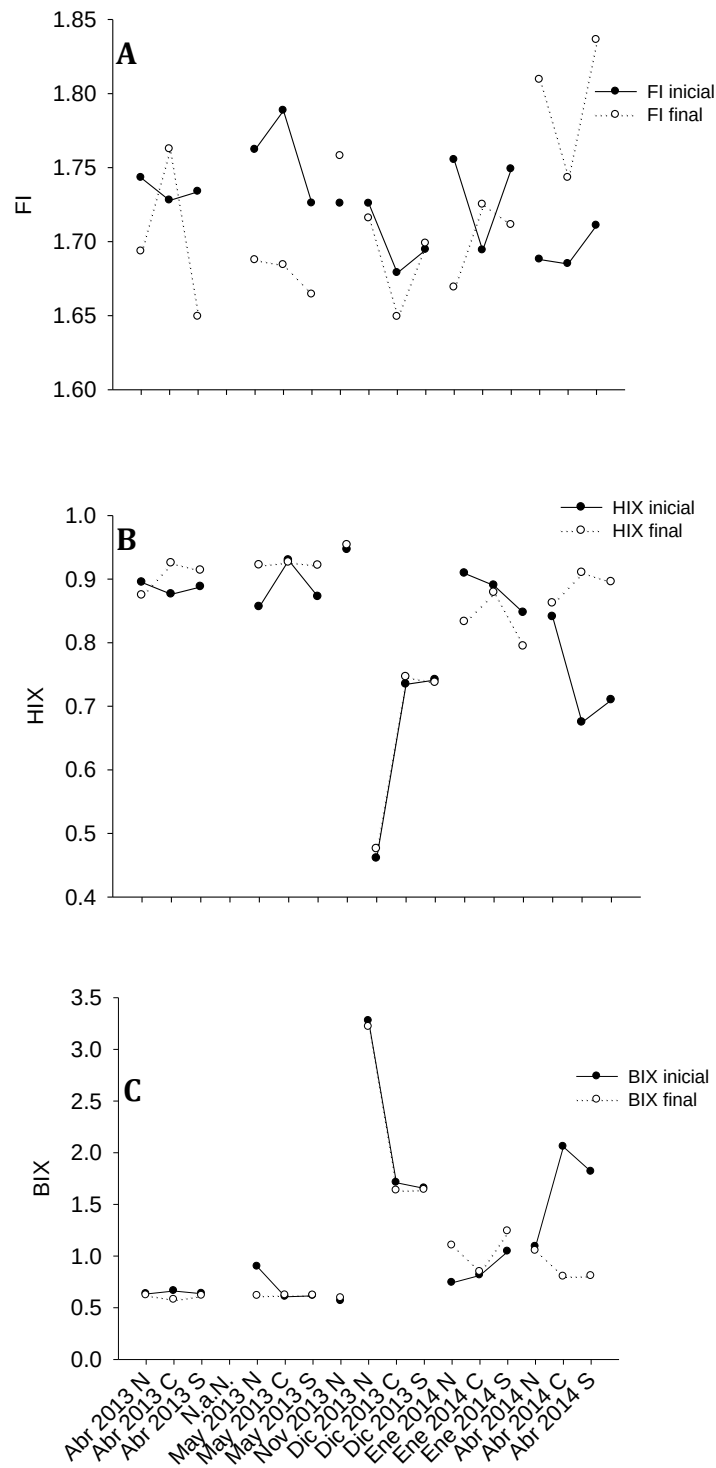


Fig. 3.13. Se indica la variación en los índices de fluorescencia FI (A), HIX (B) y BIX (C) en los experimentos de BCOD.

Se observaron cambios en la composición de la FMOD produciendo o consumiendo los fluoróforos húmicos y proteico (Fig. 3. 14). Por ejemplo, el consumo-producción de los componentes húmicos C1 y C2 en comparación con el original se encontró entre -42 y 33 % y -50 y 100%. En contraste el componente proteico C3 fue mayormente consumido y se encontró entre -87 y 119%. Este resultado es esperable ya que estudios anteriores en experimentos similares a los nuestros en suelos, humedales (Fellman et al. 2008) y sistemas acuáticos (Guillemete & del Giorgio 2012), han reportado una fuerte correlación positiva entre el componente PARAFAC proteico y la biodegradabilidad de la MOD. Además, nuestros resultados concuerdan con los encontrados por Guillemete & del Giorgio 2012, donde los autores encontraron tanto consumo como producción de los distintos componentes que conforman la FMOD por parte de la comunidad microbiana, indicando uso diferencial de las distintas fracciones de FMOD.

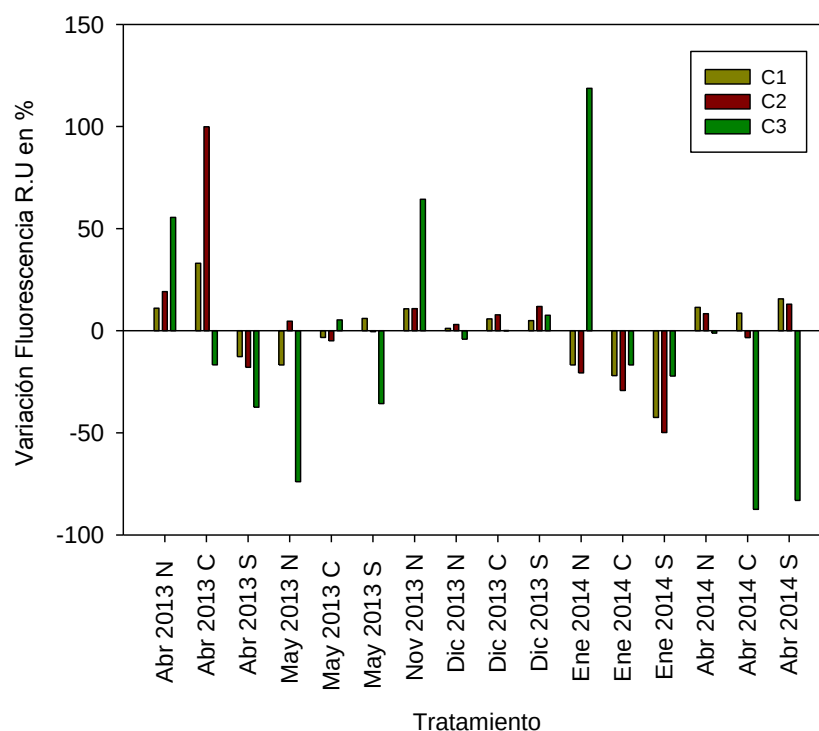


Fig. 3.14. Se indica la variación en el % de variación, calculado a partir de la fluorescencia en R.U. de cada componentes, C1, C2 y C3, en los experimentos de BCOD para cada tratamiento (N: Norte, C: Centro y S: Sur).

El ACP permitió identificar distintos patrones en el uso/preferencia de la MOD en los experimentos de BCOD según la variación de los distintos indicadores biogeoquímicos (SS, índices de fluorescencia y componentes FMOD). Los dos primeros ejes contribuyen a explicar una varianza total de 43.15 (eje 1) y 24.3 % (eje 2). Las variables que contribuyeron a explicar la formación del eje 1 fueron los índices HIX y C3, mientras que la formación del eje 2 estuvo compuesta por el coeficiente de absorción a_{254} .

Se obtuvieron 4 patrones (Fig. 3.15):

Patrón 1 (incubaciones Abril 2013 Centro y Abril 2014 Norte, Centro y

Sur): se caracterizó por la presencia de compuestos de BPM, aumento del grado de humificación y contenido de C aromático, así como consumo del componente proteico y producción del húmico.

Patrón 2 (incubaciones Diciembre 2013 Norte, Centro y Sur): se caracterizó por la presencia de compuestos de BPM, aumento del grado de humificación y descenso del contenido de C aromático y color, así como producción del componente húmico.

Patrón 3 (incubaciones Abril 2013 Sur, Mayo 2013 Norte y Centro) se caracterizó por la presencia de compuestos de BPM, descenso del grado de humificación, aumento del contenido de C aromático y color así como consumo de ambos tipos de componentes

Patrón 4 (Incubaciones Enero 2014 Norte, Centro y Sur) se caracterizó por compuestos de APM, aumento grado de humificación, descenso del contenido de C aromático y color, y consumo de ambos tipos de componentes. Sin embargo, en una de las incubaciones se observó una gran producción del componente tipo proteico.

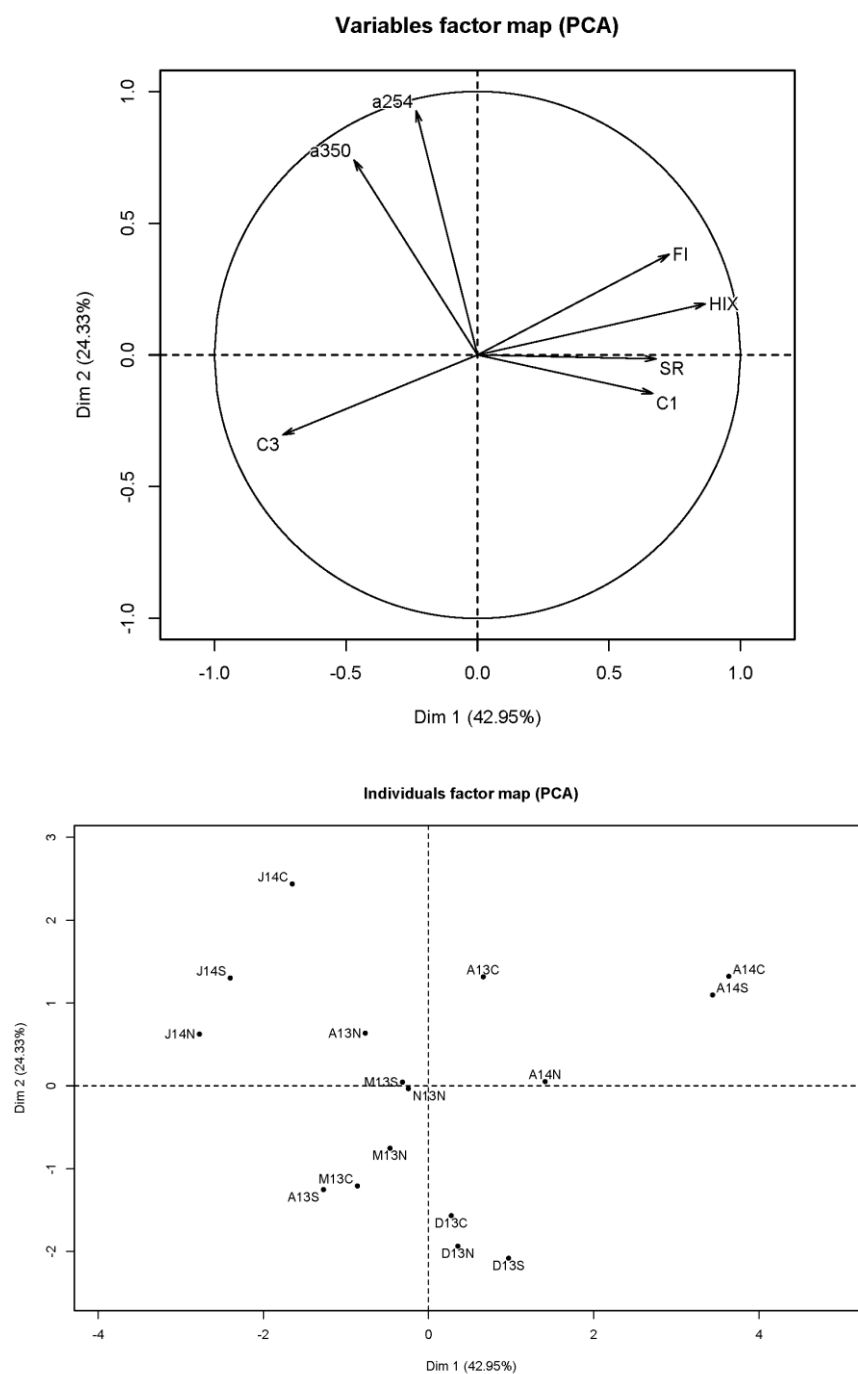


Fig. 3. 15. Diagrama del análisis de componentes principales donde se muestran las variables (arriba) e incubaciones (abajo) (n=16). Cada incubación esta identificada con un código, donde la primera letra es el mes, seguida del año y zona (por ej. A13C es la incubación correspondiente del mes de Abril 2013 de la zona Centro)

Asimismo, estos patrones ocurren bajo condiciones ambientales significativamente distintas (Fig. 3.16). Por ejemplo, el patrón 1 se asoció a altas T, amplio rango de K, bajo pH y NTD y concentraciones de NO_3 moderadas. En términos de MOD, este patrón se asoció a altas concentraciones de COD, bajo índice SUVA, $S_{275-295}$, FI y BIX. Además, se observó una mayor abundancia de los grupos *Gammaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria*.

El patrón 2 se asoció a T y K relativamente altas, pH y NTD moderados y baja concentración de NO_3 . Además, se asoció a concentraciones relativamente bajas de COD, amplio rango del índice SUVA, bajos valores de $S_{275-295}$, FI y C2, así como abundancias relativamente altas de *Cytophaga-Flavobacteria*.

El patrón 3 se asoció a bajas T y K, amplio rango de pH y NTD, y altas concentraciones de NO_3 . Además, se asoció a bajas concentraciones de COD, SUVA moderado, altos valores de $S_{275-295}$, FI y bajo BIX así como presencia moderada de C2. Asimismo, se observaron bajas abundancias de *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria*.

El patrón 4 ocurrió durante altas T y bajas K y pH, así como alto contenido de NTD y bajo de NO_3 . Además en términos de MOD, se asoció a bajas concentraciones de COD, alto SUVA, bajo $S_{275-295}$, valores moderados de FI y BIX y alto C2. Además, ocurrió durante abundancias relativamente altas de los grupos *Gammaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria*.

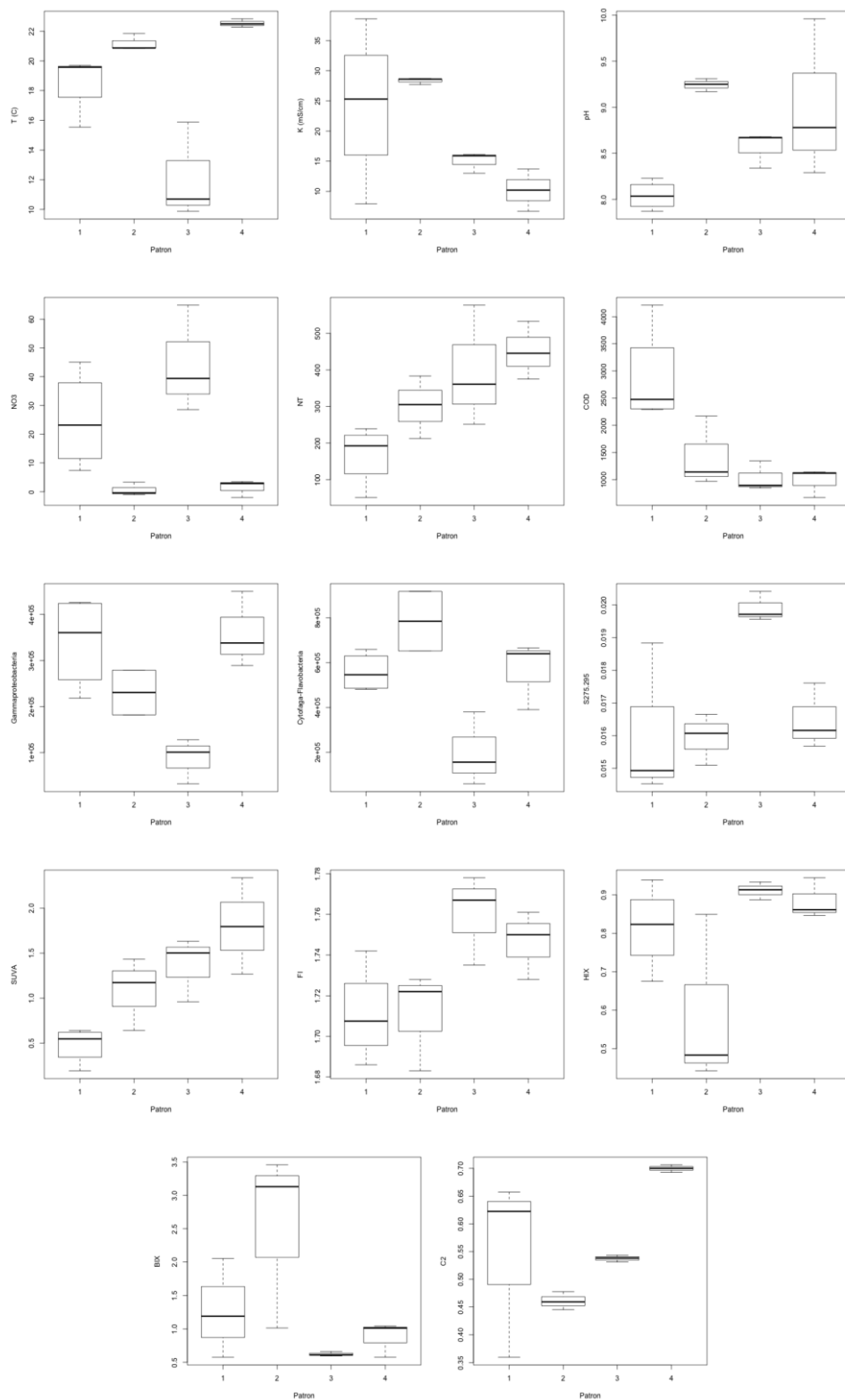


Fig. 3.16. Se muestran los boxplot para cada variable ambiental en las cuales se encontraron diferencias significativas entre los patrones identificados mediante análisis ACP en los experimentos de BCOD. De izquierda a derecha: Temperatura (T), Conductividad (K), pH, Nitrito (NO_3 , μM), Nitrógeno total disuelto (NTD, μM), Carbono orgánico disuelto (COD, μM), Abundancia *Gamma*proteobacteria y *Cytofaga-Flavobacteria* (células/ml), Pendiente espectral $S_{275-295}$ (nm^{-1}), índice SUVA ($\text{mg C L}^{-1} \text{m}^{-1}$), índices de fluorescencia (FI), de humificación (HIX) y de frescura (BIX) y el componente de la FMOD (C2, R.U).

III.3.5 Experimentos de *priming effect*: Agregado de sustrato con distinto grado de labilidad

En la Tabla 3.6 se muestran las distintas características espectrales de los sustratos agregados; como se puede observar estos potencialmente tenían distinto grado de labilidad. El sustrato con Macrófitas tiene un mayor % de contribución del C3 del tipo proteico mientras que el de Rodomonas tiene mayor % de los componentes del tipo húmico C1 y C2, en particular, es notoria la diferencia en el C2. Además, los índices de fluorescencia indican compuestos más humificados y levemente más procesados en el sustrato Rodomonas con compuesto de menor PM y cantidad de C aromático. Lo que estaría indicando un mayor grado de labilidad en los compuestos presentes en el sustrato Macrófitas, que en el de Rodomonas.

Tabla 3. 6. Características de la MOD de los sustratos utilizados en los experimentos

Sustrato	% C1	% C2	% C3	FI	HIX	BIX	$S_{275-295}$	$S_{350-400}$	S_R	a_{254}
Macrófitas	33	25	42	1.7	0.6	0.5	0.012	0.01	1.2	1.2
Rodomonas	39.3	45.3	15.4	2.6	0.9	0.6	0.019	0.007	2.7	2.7

III.3.5.1 Cambios en la composición de la MOD

III.3.5.1.1 Diferencias entre tratamientos iniciales y finales

En la Tabla 3.7 se muestran las variables en donde se observaron diferencias significativas entre los tratamientos iniciales y finales para cada sustrato.

En el experimento de Mayo 2013, en el tratamiento con Rodomonas, se observó una disminución significativa del componente del tipo proteico C3 (ANOVA, $F= 8.986$ $p<0.05$, Tukey test $p<0.05$) acompañado de un aumento del HIX (Fig. 3.18, KW, $p<0.05$). Además, se observó la mayor variación en la contribución de los distintos componentes de la FMOD entre los tratamientos iniciales y finales. El % del C3 *in situ* era muy bajo (Fig. 2.10) por lo que la adición de esta fuente de C pudo haber potenciado el consumo de compuestos más lábiles por parte de la comunidad bacteriana generando compuestos con mayor grado de humificación.

Mientras que para los experimentos de Noviembre 2013 y Abril 2014 se observaron diferencias significativas en los índices espectrales en ambos tratamientos y en el control (Tabla 3.7). En todos los casos se observa una disminución del PM al final de las incubaciones (Fig. 3.17). Además se observó un aumento significativo en el coeficiente a_{254} en el Control de Abril 2014 (ANOVA, $F=9.639$ $p<0.005$, Tukey test $p<0.005$).

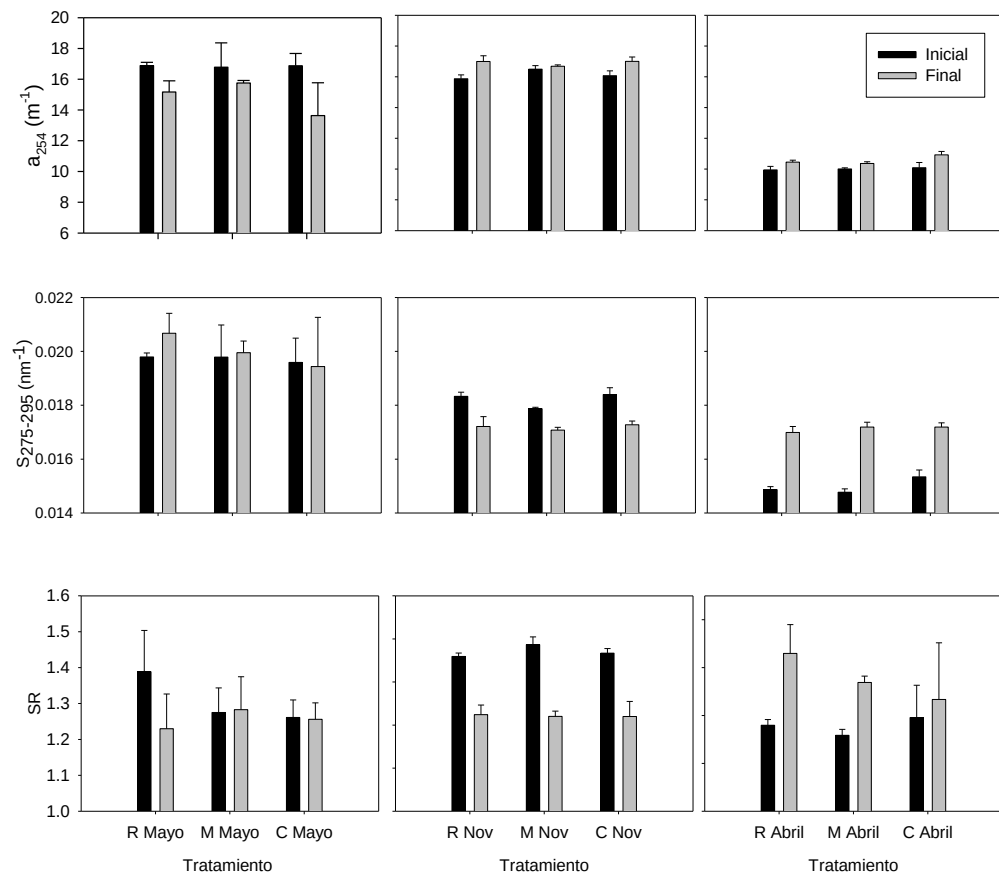


Fig. 3.17. Se muestran los cambios en el coeficiente de absorción a_{254} y en las pendientes espectrales $S_{275-295}$ y S_R iniciales y finales en cada tratamiento de *priming effect* (R: Rodomonas, M: Macrófitas y C: Control)

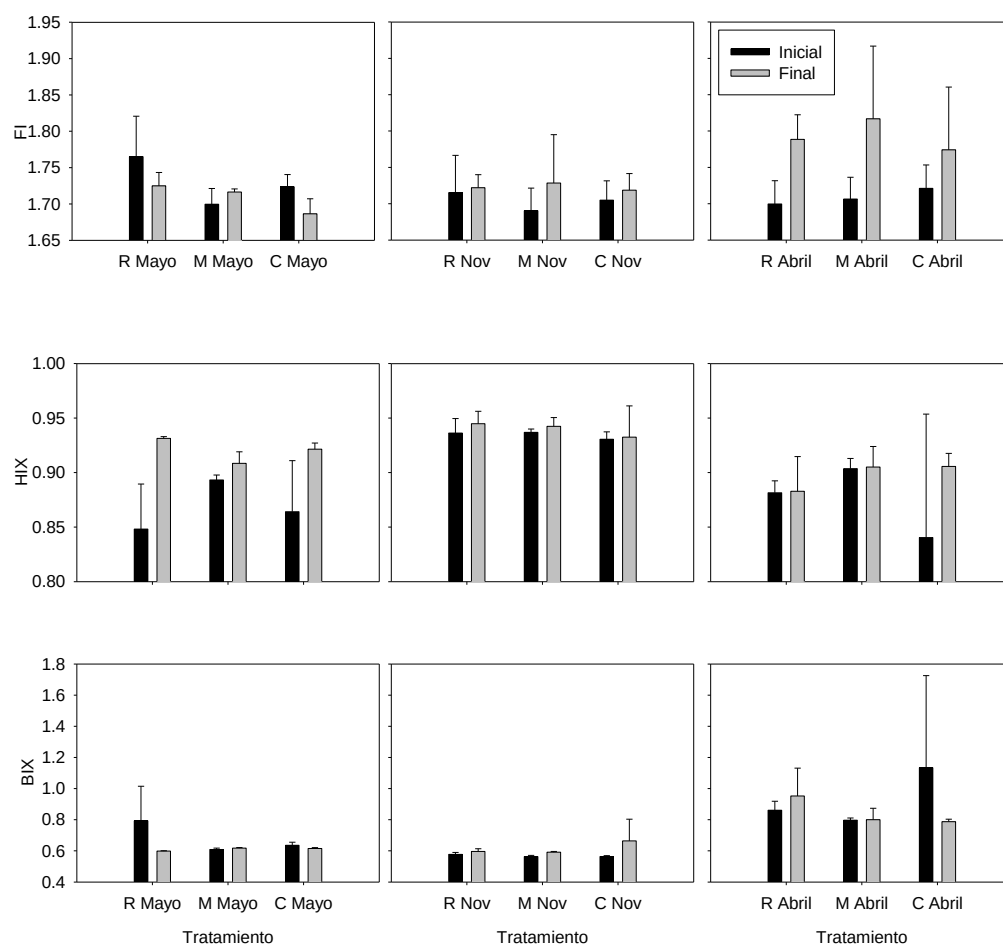


Fig. 3.18. Se muestran los cambios en los índices de fluorescencia FI, HIX y BIX iniciales y finales en cada tratamiento de *priming effect* (R: Rodomonas, M: Macrófitas y C: Control)

III. 3.5.1.2. Diferencias entre tratamientos con distinto sustrato Macrófitas vs Rodomonas

No se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas entre los tratamientos Rodomonas y Macrófitas al finalizar las incubaciones. Tampoco se observaron diferencias con respecto al control (Tukey test, $p > 0.05$). Estos resultados estarían indicando que el agregado de sustratos con distinto grado de labilidad no tuvo un efecto relevante en las características espectrales de la MOD.

En la Tabla 3.8 se muestra el % de variación de los componentes de la FMOD en los distintos meses en los cuales se realizaron los experimentos de *priming effect*. Por ejemplo, en los experimentos correspondientes al mes de Noviembre 2013 y Abril 2014 en ambos sustratos hubo producción de los 3 componentes, excepto en el control de Abril 2014 donde se observa consumo del C3 (Tabla 3.8). Mientras que en las incubaciones correspondientes al mes de Mayo 2013 se registró consumo de los 3 componentes (Tabla 3.8). Cabe destacar, la alta variabilidad entre replicas, lo que podría deberse a la manipulación a la hora de realizar este tipo de experimentos.

Tabla 3.7. Se muestran las variables en donde se observaron diferencias significativas entre los tratamientos iniciales y finales con distinto sustrato para cada experimento.

Diferencias entre tratamiento inicial y final			
Sustrato/Mes	Mayo 2013	Noviembre 2103	Abril 2014
Macrófitas		Sr	S _{275.295}
Rodomonas	C3*, HIX	S _{275.295}	Sr S _{275.295}
Control		S _{275.295}	S _{275.295} , a ₂₅₄

Tabla 3.8. Se indica el promedio de las replicas y su desvío estándar del % de variación (R.U) de cada componente en comparación con lo que se encontraba al inicio de las incubaciones.

Mayo2013	C1	C2	C3
Macrófitas	-2 ± 2	-1±3	-23±9
Rodomonas	-12±12	-10±12	-71±17
Control	1±5	-7±6	-38±19
Noviembre2013			
Macrófitas	4±5	9±6	27±40
Rodomonas	7±2	10±9	13±131
Control	6±2	4±0	318±488
Abril2014			
Macrófitas	17±11	1±11	6±27
Rodomonas	8±1	2±10	37±74
Control	5±15	1±14	-33±43

III.3.5.1.3.Respuesta de los grupos bacterianos a la adición de sustratos con distinto grado de labilidad

En ambos experimentos, Mayo 2103 y Abril 2014, en el tratamiento con Macrófitas la mayor tasa de crecimiento se registró para el grupo *Gammaproteobacteria*, seguido por las *Alfaproteobacterias* y *Cytofaga-Flavobacteria* (Fig. 3.20). Esto concuerda con lo observado en otros trabajos donde *Gammaproteobacteria* pasa a dominar la comunidad durante incubaciones en experiencias previas en la laguna (Piccini et al. 2009, Alonso et al. 2013) como en otras incubaciones usando macrófitas como sustrato agregado (Herlemann et al. 2014).

En el tratamiento con Rodomonas, la mayor tasa de crecimiento se observó en el grupo *Alfaproteobacteria*, seguido del grupo *Cytofaga-*

Flavobacteria (Abril 2014) (Fig. 3. 19). Sin embargo, en ambos meses en este tratamiento, no se observó un crecimiento de los grupos con respecto al control, por lo que el crecimiento observado en estos grupos no podría ser atribuido al agregado de éste sustrato. Hay dos alternativas posibles: el tiempo de incubación no permitió registrar el crecimiento bacteriano, y la toma de muestra se realizó después que se registró el pico de abundancia. La otra alternativa es la naturaleza más recalcitrante o menos biodisponible de los compuestos presentes en la MOD de este sustrato (Tabla 3.6), lo que concuerda con un mayor crecimiento en los grupos *Alfaproteobacteria* y *Cytofaga-Falvobacteria*, en los cuales se encontró preferencia por el C1 como se mencionó anteriormente.

A diferencia del tratamiento con *Rodomonas*, se observa una mayor tasa de crecimiento bacteriana en el tratamiento con Macrófitas respecto al control sobre todo en el experimento de Mayo 2013, indicando que este sustrato potenció el crecimiento bacteriano, al igual que lo anteriormente observado por Alonso et al. 2013 en un experimento similar. Estos resultados sugieren que la comunidad bacteriana podría encontrarse limitada por la biodisponibilidad de la MOD y su crecimiento se potenció debido al agregado de compuestos con mayor grado de labilidad presentes en el componente C3 (Tabla 3.6).

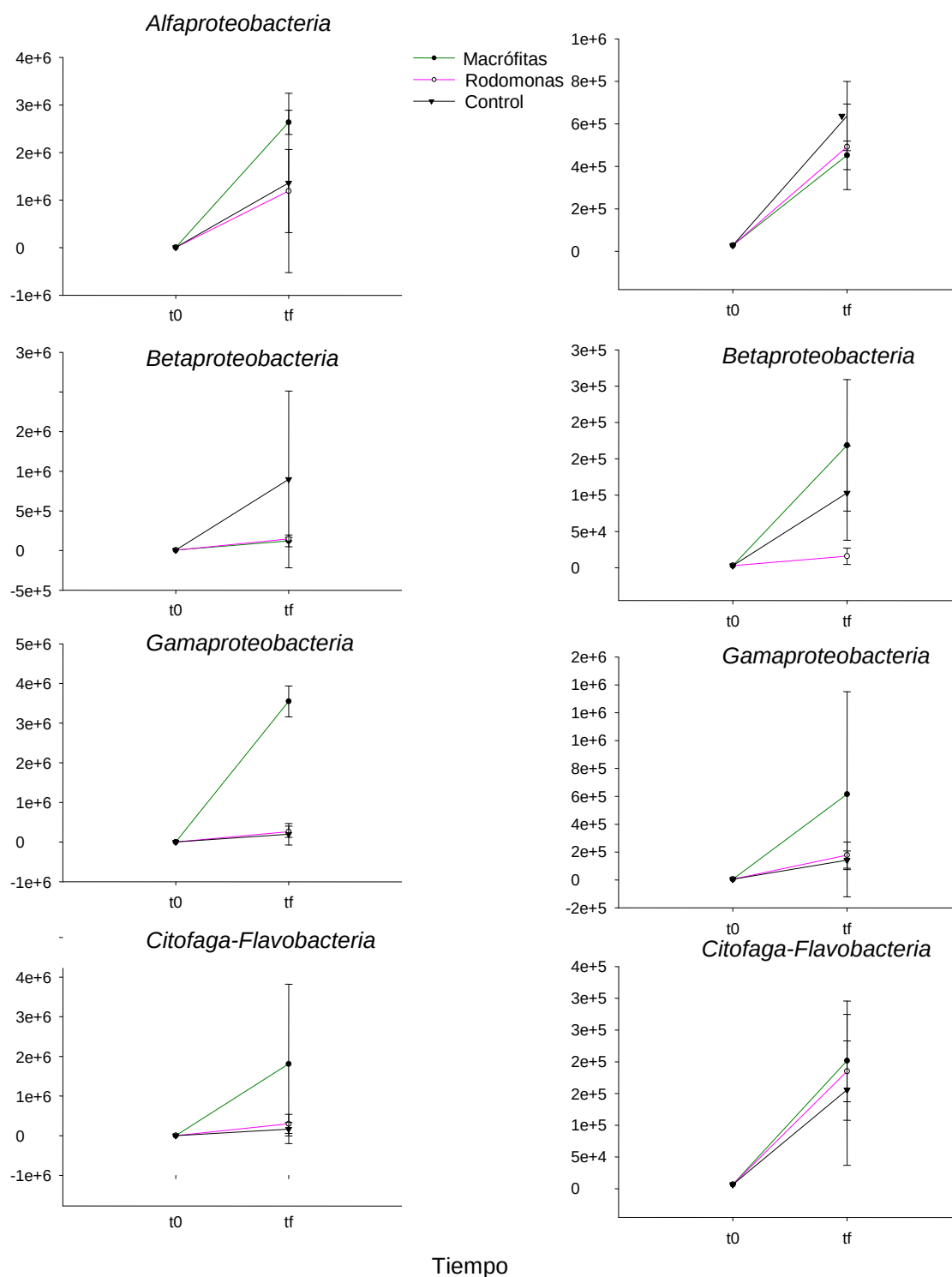


Fig. 3. 19. Tasas de crecimiento de los principales grupos bacterianos (células/ml) en los experimentos de priming effect para los meses de Mayo 2013 (izquierda) y Abril 2011 (derecha).

III.4. 2 Conclusiones

Los resultados encontrados en los experimentos de biodegradación y *priming effect* estarían indicando distintos patrones en la transformación de la MOD por parte de la comunidad bacteriana.

La producción de los componentes húmicos considerados menos biodisponibles que el componente proteico (Capítulo 2), el menor PM y mayor contenido de C aromático y por ende refractariedad (Weishaar et al. 2003) encontrado en la mayoría de las incubaciones de los patrones 1, 2 y 3, podría inferir producción RMOD por parte de la comunidad microbiana. En ese sentido, la composición química y reactividad de la MOD modificada durante la utilización y procesamiento microbiano, resulta en pequeñas moléculas que son muy resistentes a una posterior transformación y consumo microbiano (Ogawa et al. 2001).

En cuanto a los experimentos de *priming effect*, se observó un efecto positivo en el crecimiento bacteriano al adicionar Macrófitas.

Un estudio reciente encontró que el agregado de Macrófitas (previamente fotoalteradas) en este sistema potenciaría cambios significativos en la comunidad bacteriana, especialmente crecimiento de taxas oportunistas (Piccini et al. 2013), indicando que tanto la fotodegradación como la presencia de Macrófitas en el sistema es una fuente importante de CMOD y un factor clave en la regulación de la comunidad bacteriana (Piccini et al. 2009, 2013). Esto además podría explicarse por el alto contenido del componente proteico C3 (observado en el extracto de Macrófitas (*S. californicus*))

Discusión general

En esta tesis se determinó la composición de la MOD y la dinámica de los principales grupos bacterianos a lo largo de un ciclo anual de la Laguna de Rocha y su relación con las distintas variables ambientales así como la relación entre ambas dinámicas.

Nuestros resultados indican una variación de la concentración de carbono orgánico disuelto asociada las distintas fases del ciclo hidrológico registradas en este estudio. Sin embargo, contrario a lo planteado en la hipótesis 1, y a lo observado anteriormente en este sistema (Conde et al. 2000, 2002), las mayores concentraciones de COD se encontraron en la Zona Sur.

Por otra parte, si bien no se observaron diferencias significativas (salvo en C1 que fue marginalmente mayor en la zona Norte, $p=0.057$) los indicadores biogeoquímicos (ej. SUVA, SS, C1 y C2, relación a_{350}/COD) sugieren que los compuestos que conforman la MOD en la zona Norte estarían menos biodisponibles que los encontrados en la zona Sur, tal como se planteó en la hipótesis 1.

De esta forma la primera hipótesis de este trabajo fue sólo parcialmente confirmada. Las razones para ello radicarían en la variabilidad del sistema. A diferencia de otros sitios en que la mezcla sería el factor más importante en el control de la distribución de la CMOD y de su comportamiento conservativo espacial (esto da lugar a una relación inversa entre CMOD y la salinidad, Coble, 2007), los resultados aquí obtenidos indican la predominancia o control por parte de otros procesos en la distribución de la CMOD, o sea, un comportamiento no conservativo. Concordantemente, otros autores han reportado que las relaciones entre

la salinidad y las propiedades ópticas de la MOD pueden variar significativamente, y sugerido que no sólo dependen de la salinidad, sino que están muy influenciadas por el origen de la MOD (Vodacek et al. 1997, Yamashita et al. 2013), esperándose encontrar una correlación positiva entre CMOD y COD en sistemas donde el carbono es predominantemente de origen terrestre (Coble, 2007, Yamashita et al. 2013).

En este sentido, los diversos índices espectroscópicos utilizados evidencian que la MOD en la laguna proviene de diversas fuentes (terrestre / producción *in situ*), a las cuales se suman los efectos de la luz sobre la MOD, no analizados aquí, pero relevantes en el sistema (Conde et al. 2000, 2002, Piccini et al. 2009, 2013). A su vez, los fluoróforos encontrados en la modelación de la FMOD indican la presencia de una alta variedad de compuestos que van desde los húmicos a los proteicos, reafirmando la idea de mezcla entre aporte de MOD de diversas fuentes.

En el balance entre el aporte de diversas fuentes, la producción *in situ* sería la de mayor predominancia en Laguna de Rocha. Por ejemplo, en el período de muestreo que abarca esta tesis, gran parte del COD de la MOD es de origen autóctono, derivado de la actividad microbiana del sistema. Esto se deduce de que: 1) el índice de Fluorescencia se encuentra en rangos de valores indicativos de mezcla de fuentes, pero más cercano a producción *in situ*, ii) la ausencia de correlación entre la concentración de COD y el α_{350} (que es un indicador de CMOD de origen terrestre) y iii) El componente C3 (proteico) fue el único de los 3 identificados que se correlacionó significativamente con la concentración de COD, en tanto que C1 y C2 (húmicos) no se correlacionaron con el COD. Esto último coincide con lo encontrado por Stedmon et al. 2007, donde los componentes del tipo proteína se correlacionan con la concentración de COD, mientras que los del tipo húmicos no,

atribuyéndose este hallazgo a una mayor influencia en la MOD derivada de la producción autóctona que de la de origen terrestre (Stedmon et al. 2007).

En este trabajo, el metabolismo bacteriano aparece como un factor clave en la determinación de la composición y concentración de la MOD, la cuál además también estaría sujeta a los cambios en la apertura-cierre de la barra, así como a las distintas fases del ciclo hidrológico. Esto se ve reflejado en los resultados encontrados para los distintos indicadores biogeoquímicos empleados en esta tesis. Por ejemplo, durante el periodo de barra abierta, la MOD tiene mayor PM (fase II salobre), menor grado de humificación y de producción reciente (fase III), asociado además a un aumento de la CMOD (fase I) y contenido del fluoróforo proteico del tipo triptófano C3, relacionado además a un aumento en la T. Estos resultados son contrarios a los reportados anteriormente para este sistema en donde predominaba MOD de origen terrestre (Conde et al. 2000). Así, la importancia de la producción de MOD *in situ* aparece claramente en la segunda fase del estudio, evidenciada por la transición en la composición de la FMOD (donde el C3 pasó a tener mayor importancia), concomitantemente con un aumento en el índice de frescura, disminución en el índice de humificación, y aumento del PM de la MOD.

A priori, un aumento del componente proteico en los meses estivales podría asociarse al efecto de la fotodegradación (seguramente incrementado en esa fase del muestreo), ya que ésta se asocia a una pérdida en la absorción y fluorescencia de los compuestos húmicos (Moran et al. 2000, Nieto-Cid et al., 2006). Sin embargo, como se indicó arriba, esta transición estuvo acompañada de un aumento en el PM. Helms et al. 2008 observaron que los cambios en los espectros de emisión causados por la actividad microbiana son significativamente diferentes a los observados por degradación fotoquímica (Helms et al.

2008); los procesos microbianos disminuyen los SS, o sea conllevan a un aumento del PM, mientras que los fotoquímicos disminuyen el PM (Helms et al. 2008, Moran et al. 2000, Vähätalo & Wetzel 2004). El aumento en el PM debido a la degradación microbiana puede deberse a la producción o preservación selectiva de compuestos que absorben a altas longitudes de onda, asociados como compuestos de APM (Helms et al. 2008). Por otra parte, la acumulación del componente proteico (pico T) en meses estivales debido a la fotodegradación se ha registrado para sistemas con deficiencia de P o N, en donde la comunidad bacteriana no puede hacer uso de ese carbono debido a la limitación por P y N (Romera-Castillo en prep.). Sin embargo, en nuestro estudio el aumento estival en el componente proteico se registró en coincidencia con un marcado aumento de la producción bacteriana (Bertoglio et al. unpub), reforzando los indicios de origen microbiano.

En cuanto al modelo propuesto en Alonso et al. 2013 para la composición de la comunidad microbiana a lo largo del ciclo hidrológico de la laguna (Fig. 1.2), nuestros resultados concuerdan con lo propuesto por los autores, donde el grupo *Alfaproteobacteria* dominaría en el sistema con una mayor abundancia y producción bacteriana durante la fase II. Esto se observó en el mes de Febrero 2013 donde la laguna se encontraba en lo que denominamos fase II salobre (Capítulo 1), lo que podría explicar el aumento *Cytofaga-Flavobacteria*. Además los autores postulan, menor abundancia y producción durante la fase III, lo que ocurrió en los meses de Mayo y Junio 2013, donde el sistema se encontraba en fase III. Además durante la fase I, Enero 2014, se observó un pico de *Betaproteobacteria* y la dominancia del grupo *Alfaproteobacteria* tal como lo propuesto por los autores (Alonso et al. 2013). Cabe destacar, como se mencionó en el Capítulo 1, que el ciclo hidrológico registrado en nuestro estudio difiere de lo propuesto por Conde et al. 2000, donde postula la fase II como la más frecuente y la III como la menos, mientras que en

nuestro estudió la fase III dominó y se registraron variantes de la fase II (salobre e invertida). Además la fase I se registró solo en el mes de Enero2014, sin embargo, coincide con un máximo de *Betaproteobacteria* en la zona Norte, las cuales tienen preferencia por condiciones de menor salinidad.

Por otro lado, la producción bacteriana fue mayor durante el período de barra abierta, en la fase II salobre del ciclo hidrológico propuesto en este trabajo y se correlacionó con un aumento en los grupos (en orden de importancia): *Cytofaga-Flavobacteria*, *Alfaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*. Una de las preguntas asociadas a esta tesis era dilucidar si la previamente reportada limitación bacteriana por carbono se debía a su concentración o calidad. El análisis de los patrones de producción bacteriana indica que de existir limitación por carbono en la comunidad bacteriana del sistema, ésta no sería por la concentración sino por la composición de la MOD, ya que los picos de producción se relacionan con cambios en los componentes hacia formas más utilizables, en tanto picos de concentración de COD que no fueron acompañados por cambios en la composición de la MOD, no se asociaron a picos en la producción bacteriana. Este patrón *in situ* se refuerza con los resultados de los experimentos de *priming effect*, en donde a misma concentración de carbono, se obtuvieron mayores tasas de crecimiento al emplear un sustrato con mayor proporción de C3 (macrófitas).

En este trabajo fue posible encontrar una relación significativa entre la composición y concentración de la MOD con los principales grupos bacterianos del sistema. A pesar del extenso trabajo que se ha realizado en las interacciones MOD-bacteria a diferentes escalas, las propiedades de la MOD raramente han sido tenidas en cuenta a la hora de explicar los patrones de distribución de los grupos bacterianos en los sistemas acuáticos (Teeling et al. 2012), mientras que el foco se ha puesto

principalmente en la salinidad como factor regulador (Glöckner et al. 1999, Casamayor & Barberán, 2010). Casamayor & Barberán (2010) observaron que por ejemplo, para el caso de las *Alfaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* el factor relevante era la composición y no la concentración de la salinidad (Casamayor & Barberán, 2010). En este trabajo, presuntamente debido a las condición meso-halina durante el periodo de estudio se pudo remover el efecto salinidad, permitiendo encontrar que la abundancia de los principales grupos bacterianos en el sistema están controlados por al menos dos variables relacionados a la MOD (RLM, eq. 1 a 4).

Esto constituye uno de los aportes de mayor alcance de la tesis, ya que hasta el momento no existen ejemplos publicados que reporten una relación significativa entre las propiedades de la MOD y la abundancia de los principales grupos bacterianos acuáticos. Por otra parte, la combinación de factores que controlan la abundancia en este sistema fueron específicas para cada grupo bacteriano, indicando que éstos se comportarían como unidades coherentes, aportando así a la discusión acerca de cómo delinear grupos funcionales en el bacterioplancton.

Además, los resultados encontrados concuerdan con la evidencia hasta ahora publicada sobre las interacciones MOD-bacteria, principalmente observadas utilizando un enfoque del tipo incorporación directa de sustratos a nivel celular, que ha mostrado patrones coherente en el uso de la MOD a ese nivel de resolución (Cottrell and Kirchman 2000) (Alonso-Sáez, et al. 2012), (Alonso, et al. 2012). Por el contrario, estudios recientes sobre biodegradación empleando mayor nivel de resolución en la composición de la comunidad bacteriana (secuenciación de alto rendimiento) han fallado en encontrar patrones que se correlacionen con la composición de la comunidad y la utilización de diferentes componentes de la MOD (Mou, et al. 2008) o concentración de COD

biodisponible (Dinasquet, et al. 2013). Incluso con componentes de la MOD identificados usando análisis de alta resolución (FT-ICR-MS) (Herlemann, et al. 2014).

En este trabajo, se encontraron correlaciones significativamente fuertes entre la composición de la comunidad bacteriana y de la MOD trabajando, en ambos casos, a un nivel de resolución intermedio. Sin dejar de lado la enorme diversidad dentro de cada grupo, concluimos que aún así podrían actuar como grupos funcionales en un contexto de modelización biogeoquímica de las transformaciones de los diferentes componentes de la MOD.

El último aspecto a tratar refiere a cómo las condiciones ambientales, en particular las características de la MOD, influyen su procesamiento por parte de la comunidad microbiana. Para ello resultó muy útil el análisis de patrones en la biodegradación, que fueron significativamente asociados a determinadas condiciones ambientales.

De las variables ambientales, la T, el pH y NO_3 fueron los factores que más se diferenciaron en los distintos patrones encontrados, mientras que en cuanto a las características de la MOD, la concentración de COD, aromaticidad, el PM y los índices FI y BIX fueron factores claves que marcaron la diferencia entre patrones. Por último, las abundancias de los grupos *Gammaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria* estuvieron significativamente asociados a los distintos patrones de biodegradación

Estos resultados proporcionan útiles indicadores de los principales variables que modulan la transformación microbiana de MOD. Sin embargo, es necesario más esfuerzo con el fin de concluir acerca de la solidez y generalidad de estos patrones en los distintos tipos de sistemas acuáticos.

En la mayoría de los casos las transformaciones microbianas de la MOD resultaron en la reducción del PM, aumento del grado de humificación y del contenido de C aromáticos, así como la producción de los componentes de la FMOD, C1 y C2, lo que estaría indicando que el procesamiento microbiano condujo a MOD más recalcitrante. Esta evidencia, junto con la dominancia *in situ* de los compuestos del tipo húmico (C1 y C2) y el alto índice FI, indicativo de la importancia de la contribución microbiana en la MOD en el sistema, sugieren que el metabolismo bacteriano en este sistema costero transforma en gran medida la entrada de MOD fresca y biodisponible en compuestos más refractarios que probablemente resulte en el secuestro de carbono a través de la bomba microbiana de carbono (Jiao, et al. 2010).

Por lo general, los sistemas costeros actúan como fuentes de carbono al océano adyacentes y en última instancia a la atmósfera (Jiao et al. 2011). Sin embargo se ha postulado teóricamente que una baja cantidad de nutrientes (N, P) puede dirigir a tales sistemas a actuar como sumideros de carbono (Jiao et al. 2011). En ese sentido, nuestros resultados proporcionan evidencia de campo directa que apoyan esta última hipótesis.

Perspectivas

Para determinar cuando el sistema estaría emitiendo o capturando C, y por ende, actuando como sumidero o fuente de C, habría que acoplar estos resultados a mediciones de CO₂. Además, experimentos de BCOD con la comunidad bacteriana marina permitirían ampliar la hipótesis sobre producción de RMOD en la Laguna de Rocha y dilucidar si la MOD producida en la laguna por la comunidad bacteriana (o las transformaciones que sufre al ingresar al sistema) es refractaria para la comunidad bacteriana marina.

Complementariamente, sería necesario identificar miembros de la comunidad en experimentos de biodegradación, para establecer mejor roles en generación/consumo de RMOD. Por otro lado, sería importante aumentar el número de experimentos BCOD con el fin de definir patrones más robustos o marcados en cuanto al uso/transformaciones de la MOD por parte de la comunidad bacteriana. Asimismo podría acoplarse con experimentos de foto degradación y así ver el efecto conjunto de estos dos procesos claves en el procesamiento de la MOD en el sistema.

Pese a la baja resolución filogenética del análisis de los principales grupos bacterianos así como de la MOD, se observaron distintos patrones en el uso y preferencias de la MOD que podrían perderse al aumentar la resolución (Herlemann et al. 2014). Sin embargo, técnicas con mayor poder de resolución como el análisis del ARN 16s podrían revelar los cambios ocurridos en la composición de cada grupo analizado a lo largo del período de muestreo con el fin de ampliar la información hasta ahora obtenida. Comparaciones con los patrones en el uso y preferencias de la MOD observados en este trabajo nos permitirían avanzar en dilucidar a que nivel de resolución es necesario trabajar según el problema planteado

y de esta forma avanzar en definir grupos funcionales en un contexto biogeoquímico. A su vez, esto serviría para inferir las razones de algunas de las correlaciones observadas en este trabajo (ej. si el comportamiento como unidad a nivel de clase se debe que las diferentes poblaciones tienen una ecofisiología homogénea o si el patrón observado es el reflejo de las preferencias de la población más abundante

Bibliografía

- Abreu, P. C., Bergesch, M., Proença, L. A., Garcia, C. A., & Odebrecht, C. (2010). Short-and long-term chlorophyll a variability in the shallow microtidal Patos Lagoon estuary, southern Brazil. *Estuaries and Coasts*, 33(2), 554-569.
- Alberts, J. J., Takács, M., & Schalles, J. (2004). Ultraviolet-visible and fluorescence spectral evidence of natural organic matter (NOM) changes along an estuarine salinity gradient. *Estuaries*, 27(2), 296-310.
- Alonso-Sáez, L., Arístegui, J., Pinhassi, J., Gómez-Consarnau, L., González, J.M., Vaqué, D. (2007). Bacterial assemblage structure and carbon metabolism along a productivity gradient in the NE Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, 46: 43-53.
- Alonso-Saez, L., & Gasol, J.M. (2007). Seasonal Variations in the Contributions of Different Bacterial Groups to the Uptake of Low-Molecular-Weight Compounds in Northwestern Mediterranean Coastal Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3528-3535.
- Alonso, C., & Pernthaler, J. (2006a). Concentration-dependent patterns of leucine incorporation in coastal picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2141-2147.
- Alonso, C., & Pernthaler, J. (2006b). Roseobacter and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology*, 8: 2022-2030.
- Alonso, C., Zeder, M., Piccini, C., Conde, D., & Pernthaler, J. (2009). Ecophysiological differences of betaproteobacterial populations in two hydrochemically distinct compartments of a subtropical lagoon. *Environmental microbiology*, 11(4), 867-876.
- Alonso, C., Gómez-Pereira, P., Ramette, A., Ortega, L., Fuchs, B. M., & Amann, R. (2010). Multilevel analysis of the bacterial diversity along the environmental gradient Rio de la Plata-South Atlantic Ocean. *Aquatic microbial ecology*, 61(1), 57-72.
- Alonso, C., Piccini, C., Unrein, F., Bertoglio, F., Conde, D., & Pernthaler, J. (2013). Environmental dynamics as a structuring factor for microbial carbon utilization in a subtropical coastal lagoon. *Front. in Microbiology* 4
- Amado, A. M., Cotner, J. B., Suhett, A. L., Esteves, F. D. A., Bozelli, R. L., & Farjalla, V. F. (2007). Contrasting interactions mediate dissolved organic matter decomposition in tropical aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, 49(1), 25-34.
- Andersen, C. M., & Bro, R. (2003). Practical aspects of PARAFAC modeling of fluorescence excitation-emission data. *J. of Chemometr.* 17: 200-215.
- Arocena, R., & Conde, D. (1999). Métodos en Ecología Acuática Continental. Con ejemplos en Limnología en Uruguay, 233pp. Facultad de Ciencias, Montevideo.
- Aubriot, L., Conde, D., Bonilla, S., Hein, V., & Britos, A. (2005). Vulnerabilidad de una laguna costera en una Reserva de Biosfera: indicios recientes de eutrofización. *Eutrofización de Lagos y Embalses. CYTED XVIII*, Chile, 65-85.
- Azam, F. (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*. 280: 694-696.
- Baker, A., & Spencer, R. G. (2004). Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of the Total Environment*, 333(1), 217-232.
- Casamayor, E. O., & Barberán, A. (2010). Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology*, 59, 1-10.
- Bates, B.C., Kundzewicz, Z.W. Wu, S. & Palutikof, J.P. (2008). *Climate Change and Water*. Geneva: IPCC Secretariat.
- Battin, T.J., Butturini, A., Sabater, F. (1999). Immobilization and metabolism of dissolved organic carbon by natural sediment biofilms in a Mediterranean and temperate stream. *Aquat. Microl.Ecol.* 19: 297-305.
- Battin, T. J., Luyssaert, S., Kaplan, L. A., Aufdenkampe, A. K., Richter, A., & Tranvik, L. J. (2009). The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience*, 2(9), 598-600.
- Bauer, M., Kube, M., Teeling, H., Richter, M., Lombardot, T., Allers, E., & Glöckner, F. O. (2006). Whole genome analysis of the marine Bacteroidetes 'Gramella forsetii' reveals adaptations to degradation of polymeric organic matter. *Environmental Microbiology*, 8(12), 2201-2213.
- Beardsley, C., Pernthaler, J., Wosniok, W., & Amann, R. (2003). Are readily culturable bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and environmental microbiology*, 69(5), 2624-2630.
- Benner, R., Pakulski, J. D., McCarthy, M., Hedges, J. I., & Hatcher, P. G. (1992). Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science*, 255 (5051), 1561-1564.
- Benner, R., & Strom, M. (1993). A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation. *Marine Chemistry*, 41(1), 153-160.
- Benner, R. (2003). Molecular indicators of the bioavailability of dissolved organic matter (pp. 121-137). *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter*. Academic Press.
- Bianchi, T.S. (2011). The role of terrestrially derived organic carbon in the coastal ocean: a changing paradigm and the priming effect. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 108: 19473-19481.
- Biddanda, B., & Benner, R. (1997). Carbon, nitrogen, and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 42(3), 506-518.
- Bingermann, C.W., Varner, J.E., Martin, W.P. (1953). The effect of the addition of organic materials on the decomposition of an organic soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 17: 34-38.
- Blough, N. V., & Del Vecchio, R. (2002). Chromophoric DOM in the coastal environment. *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, 509-546.

- Bonilla S., 2002. Estructura y productividad de la comunidad de microalgas del ambiente pelágico en la Laguna de Rocha. Tesis de Doctorado, PEDECIBA-Biología, Facultad de Ciencias, Montevideo. 156.
- Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L., & del Carmen 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(6), 884-895.
- Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L., Rodríguez-Gallego, L., Piccini, C., Meerhoff, E., & Britos, A. (2006). Procesos estructuradores de las comunidades biológicas en lagunas costeras de Uruguay. Bases para la conservación y el manejo de la costa Uruguay, 611-630. Brophy, J.E., & Carlson, D.J. (1989). Production of biologically refractory dissolved organic carbon by natural seawater microbial populations. *Deep-Sea Res.* 36: 497-507.
- Borcard, D., Gillet, F., & Legendre, P. (2011). Numerical ecology with R. Springer Science & Business Media.
- Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometr. Intell. Lab.* 38: 149-171.
- Buck, U., Grossart, H. P., Amann, R., & Pernthaler, J. (2009). Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake. *Environmental microbiology*, 11(7), 1854-1865.
- Burkert, U., Warnecke, F., Babenzien, D., Zwiernmann, E., & Pernthaler, J. (2003). Members of a readily enriched β -proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6550-6559.
- Cabrera C., Rodríguez-Gallego L., Kruk C. (2013). Efecto de la salinidad y la concentración de nutrientes en las floraciones de cianobacterias de una laguna costera de Uruguay, en *El agua en la producción agropecuaria*. Fernández A., Volpedo A., Pérez Carrera A (eds). UBA, CONICET, Buenos Aires, Argentina.
- Cabrera, C (2014). Optimización de usos del suelo para prevenir floraciones nocivas de fitoplancton en la laguna de Rocha, Uruguay. Tesis de Maestría, PEDECIBA, Geociencias.
- Calliari, D., Britos, A., & Conde, D. (2009). Testing the relationship between primary production and *Acartia tonsa* grazing pressure in an estuarine lagoon. *Journal Plant Physiology*. 31: 1041-1058. 46.
- Cauwet, G. 2002. DOM in the coastal zone. In: Hansell, D., Carlson, C.A. (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, pp.579–609
- Cawley, K.M., Ding, Y., Fourqurean, J., Jaffé, R. 2012. Characterising the sources and fate of dissolved organic matter in Shark Bay, Australia: a preliminary study using optical properties and stable carbon isotopes. *Marine and Freshwater Research*, 63, 1098–1107.
- Chin, Y. P. (2003). The Speciation of Hydrophobic Organic Compounds by Dissolved Organic Matter. In S.G.E Findlay and R. L. Sinsabaugh (Eds.), *Aquatic Systems: Interactivity of Dissolved Organic Matter* (pp. 343-362). San Diego, CA: Academic Press.
- Coble, P. G., Green, S. A., Blough, N. V., & Gagosian, R. B. (1990). Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy.
- Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine chemistry*, 51(4), 325-346.
- Coble, P., Lead, J., Baker, A., Reynolds, D., & Spencer, R. G. (Eds.). (2014). *Aquatic Organic Matter Fluorescence*. Cambridge University Press.
- Conde, D., S. Bonilla, L. Aubriot, R. De León, and W. Pintos. (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., & Sommaruga, R. (2000). Changes in UV penetration associated with marine intrusions and freshwater discharge in a shallow coastal lagoon of the Southern Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 207: 19-31.
- Conde, D., Aubriot, L., Bonilla, S. & Sommaruga, R. (2002) Marine intrusions in a coastal lagoon enhances the effects of UV radiation on the phytoplankton photosynthetic rate. *Marine Ecology Progress Series* 240: 57-70
- Conde D. & Rodríguez-Gallego L. (2002). Problemática ambiental y gestión de las lagunas costeras atlánticas de Uruguay en: Domínguez y Prieto (eds) *Perfil ambiental del Uruguay* Pp. 149-166. Nordan-Comunidad Montevideo.
- Cory, R. M., & McKnight, D. M. (2005). Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. *Environmental Science technology* 39: 8142-8149.
- Cottrell, M.T., & Kirchman, D.L. (2000). Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 1692-1697.
- Danger, M., Cornut, J., Chauvet, E., Chavez, P., Elger, A., & Lecerf, A. (2013). Benthic algae stimulate leaf litter decomposition in detritus-based headwater streams: a case of aquatic priming effect? *Ecology*. in press. DOI: 10.1890/12-0606.1
- De la Lanza-Espino, G., Flores-Verdugo, F. J., Hernandez-Pulido, S., & Penié-Rodríguez, I. (2011). Concentration of nutrients and C: N: P ratios in surface sediments of a tropical coastal lagoon complex affected by agricultural runoff. *Universidad y Ciencia*, 27(2), 145-155.
- Del Giorgio, P. A., & Bouvier, T. C. (2002). Linking the physiologic and phylogenetic successions in free- living bacterial communities along an estuarine salinity gradient. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 471-486.
- Del Giorgio, P. A., & Davis, J. (2002). Patterns in dissolved organic matter lability and consumption across aquatic ecosystems. *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter*. Academic Press, San Diego, CA, 399-424.
- Del Vecchio, R., and N. V. Blough (2002), Photobleaching of chromophoric dissolved organic matter in natural waters: kinetics and modeling, *Marine Chemistry*, 78(4), 231–253.
- Del Vecchio, R., & Blough, N. V. (2004). Spatial and seasonal distribution of chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in the Middle Atlantic Bight. *Marine Chemistry*, 89(1), 169-187.
- Díez-Vives, C., Gasol, J. M., & Acinas, S. G. (2014). Spatial and temporal variability among marine Bacteroidetes populations in the NW Mediterranean Sea. *Systematic and applied microbiology*, 37(1), 68-78.

- Dittman, J. A., Driscoll, C. T., Groffman, P. M., & Fahey, T. J. (2007). Dynamics of nitrogen and dissolved organic carbon at the Hubbard Brook Experimental Forest. *Ecology*, 88(5), 1153-1166.
- Ducklow, H.W., Purdie, D.A., Williams, P.J., and Davies, J.M (1986) Bacterioplankton: a sink for carbon in a coastal marine plankton community. *Science* 232: 865–867.
- Fagerbakke, K., Heldal, M., and Norland, S. (1996). Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 10: 15-27.
- Farjalla VF, Anesio AM, Bertilsson S., Granéli W. (2001). Photochemical reactivity of aquatic macrophyte leachates: abiotic transformations and bacterial response. *Aquat. Microb. Ecol.* 24:187-195.
- Farjalla, V.F., Enrich-Prast, A., Esteves, F.A., & Cimleris, A.C. (2006). Bacterial growth and DOC consumption in a tropical coastal lagoon. *Brazilian Journal of Biology*, 66, 383–392.
- Fellman, J. B., D'Amore, D. V., Hood, E., & Boone, R. D. (2008). Fluorescence characteristics and biodegradability of dissolved organic matter in forest and wetland soils from coastal temperate watersheds in southeast Alaska. *Biogeochemistry*, 88(2), 169-184.
- Fellman, J. B., Hood, E., & Spencer, R. G. (2010). Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnology and Oceanography*, 55(6), 2452-2462.
- Fichot, C. G., & Benner, R. (2011). A novel method to estimate DOC concentrations from CDOM absorption coefficients in coastal waters. *Geophysical research letters*, 38(3).
- Fichot, C. G., & Benner, R. (2012). The spectral slope coefficient of chromophoric dissolved organic matter (S_{275–295}) as a tracer of terrigenous dissolved organic carbon in river- influenced ocean margins. *Limnology and Oceanography*, 57(5), 1453-1466.
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L. (2003). The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology Biochemistry*, 35: 837–843.
- García-Gil, J. C., Ceppi, S. B., Velasco, M. I., Polo, A., & Senesi, N. (2004). Long-term effects of amendment with municipal solid waste compost on the elemental and acidic functional group composition and pH-buffer capacity of soil humic acids. *Geoderma*, 121(1), 135-142.
- Gardner, G. B., Chen, R. F., & Berry, A. (2005). High-resolution measurements of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Neponset River Estuary, Boston Harbor, MA. *Marine Chemistry*, 96(1), 137-154.
- Genta, J., Perez-Iribarren, G., & Mechoso, C. R. (1998). A recent increasing trend in the streamflow of rivers in southeastern South America. *Journal of Climate*, 11(11), 2858-2862.
- Giovannoni, S.J., Tripp, H.J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K.L., Baptista, D. (2005). Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science*. 309: 1242-1245.
- Gómez-Pereira, P. R., Fuchs, B. M., Alonso, C., Oliver, M. J., van Beusekom, J. E., & Amann, R. (2010). Distinct flavobacterial communities in contrasting water masses of the North Atlantic Ocean. *The ISME journal*, 4(4), 472-487.
- Glöckner, F. O., Fuchs, B. M., & Amann, R. (1999). Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3721-3726.
- Guenet, B., Danger, M., Abbadie, L., Lacroix, G. (2010) Priming effect: bridging the gap between terrestrial and aquatic ecology. *Ecology*, 91 :2850–2861
- Guillemette, F., & del Giorgio, P. A. (2012). Simultaneous consumption and production of fluorescent dissolved organic matter by lake bacterioplankton. *Environmental microbiology*, 14(6), 1432-1443.
- Graeber, D., Gelbrecht, J., Pusch, M. T., Anlanger, C., & von Schiller, D. (2012). Agriculture has changed the amount and composition of dissolved organic matter in Central European headwater streams. *Science of the Total Environment*, 438, 435-446.
- Graeber, D., Goyenola, G., Meerhoff, M., Zwirnmann, E., Ovesen, N. B., Glendell, M., & Kronvang, B. (2015). Interacting effects of climate and agriculture on fluvial DOM in temperate and subtropical catchments. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, 12(1), 135-175.
- Gruber, D.F., Simjouw, J.-P., Seitzinger, S.P., & Taghon, G.L. (2006). Dynamics and Characterization of Refractory Dissolved Organic Produced by a Pure Bacterial Culture in an Experimental Predator-Prey System. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 4184-4191.
- Guo, L., Santschi, P. H., & Bianchi, T. S. (1999). Dissolved organic matter in estuaries of the Gulf of Mexico. *Biogeochemistry of Gulf of Mexico estuaries*. Wiley, 222-240.
- Hauenstein E., Ramírez C. (1986). The influence of salinity on the distribution of *Egeriadsena* in the Valdivian river basin Chile. *Arch. Hydrobiology* 1074, 511–519
- Hedges, J.I., Eglinton, G., Hatcher, P.G., Kirchman, D.L., Arnosti, C., Derenne, S., Evershed, R.P., Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Litke, R., Michaelis, W., & Rulkötter, J. (2000). The molecularly- uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. *Organic Geochemistry*, 31: 945-958.
- Heissenberger, A., & Herndl, G.J. (1994). Formation of high molecular weight material by free-living marine bacteria. *Mar. Ecology Progress Series*, 111: 129-135.
- Helms, J. R. (2006). Spectral shape as an indicator of molecular weight in chromophoric dissolved organic matter (Doctoral dissertation, Old Dominion University).
- Helms, J. R., Stubbins, A., Ritchie, J. D., Minor, E. C., Kieber, D. J., & Mopper, K. (2008). Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 53: 955.
- Herlemann, D. P., Manecki, M., Meeske, C., Pollehne, F., Labrenz, M., Schulz-Bull, D., & Jürgens, K. (2014). Uncoupling of bacterial and terrigenous dissolved organic matter dynamics in decomposition experiments. *PloS one*, 9(4), e93945.

- Hernes, P.J., Benner, R., 2003. Photochemical and microbial degradation of dissolved lignin phenols: implications for the fate of terrigenous dissolved organic matter in marine environments. *Journal of Geophysical Research-Oceans* 108 (C9).
- Hood-Nowotny, R., & Knols, B. G. (2007). Stable isotope methods in biological and ecological studies of arthropods. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 124(1), 3-16.
- Hood, E., Fellman, J., Spencer, R. G., Hernes, P. J., Edwards, R., D'Amore, D., & Scott, D. (2009). Glaciers as a source of ancient and labile organic matter to the marine environment. *Nature*, 462(7276), 1044-1047.
- Hudson, N., Baker, A., & Reynolds, D. (2007). Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters—a review. *River Research and Applications*, 23(6), 631-649.
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J. M., & Parlanti, E. (2009). Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry*, 40(6), 706-719.
- Huisman J., Matthijs H.C.P., Visser P.M. 2005. Harmful Cyanobacteria. Springer, Dordrecht.
- Jaffé, R., McKnight, D., Maie, N., Cory, R., McDowell, W. H., & Campbell, J. L. (2008). Spatial and temporal variations in DOM composition in ecosystems: The importance of long-term monitoring of optical properties. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012), 113(G4).
- Jiao, N., Herndl, G.J., Hansell, D.A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S.W. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nature* 8: 593-599.
- Jiao, N., Tang, K., Cai, H., & Mao, Y. (2011). Increasing the microbial carbon sink in the sea by reducing chemical fertilization on the land. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 75-75.
- Jørgensen, L., Stedmon, C. A., Kragh, T., Markager, S., Middelboe, M., & Søndergaard, M. (2011). Global trends in the fluorescence characteristics and distribution of marine dissolved organic matter. *Marine Chemistry*, 126(1), 139-148.
- Judd, K. E., Crump, B. C., & Kling, G. W. (2006). Variation in dissolved organic matter controls bacterial production and community composition. *Ecology*, 87(8), 2068-2079.
- Kalbitz, K., Schmerwitz, J., Schwesig, D., & Matzner, E. (2003). Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma*, 113(3), 273-291.
- Kirchman, D. L., Dittel, A. I., Findlay, S. E., & Fischer, D. (2004). Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquatic Microbial Ecology*, 35(3), 243-257.
- Kjerfve, B. (1994) Coastal lagoons process. Elsevier Oceanography series, 60, Elsevier Science Publishers.
- Kleber, M., Nico, P. S., Plante, A., Filley, T., Kramer, M., Swanston, C., & Sollins, P. (2011). Old and stable soil organic matter is not necessarily chemically recalcitrant: implications for modeling concepts and temperature sensitivity. *Global Change Biology*, 17(2), 1097-1107.
- Knoppers B (1996) Aquatic primary production in coastal lagoons. In: Kjerfve (ed) Coastal lagoons processes. Elsevier, Amsterdam, p 243–286
- Koroleff, F. (1970). Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Int. Con. Explor. Sea information on techniques and methods for sea water analysis. Interlab.* 3: 19-22.
- Kowalczyk, P., Ston-Egiert, J., Cooper, W.J., Whitehead, R.F., & Durako, M.J. (2005). Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, 96: 273- 292.
- Kowalczyk, P., Zabłocka, M., Sagan, S., & Kuliński, K. (2010). Fluorescence measured in situ as a proxy of CDOM absorption and DOC concentration in the Baltic Sea. *Oceanologia* 52 431-471.
- Kowalczyk, P., Tilstone, G. H., Zabłocka, M., Röttgers, R., & Thomas, R. (2013). Composition of dissolved organic matter along an Atlantic Meridional Transect from fluorescence spectroscopy and Parallel Factor Analysis. *Marine Chemistry*, 157, 170-184.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K. (2000). Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology Biochemistry*, 32: 1485-1498.
- Lakowicz, J. R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed.; Plenum Press: New York.
- Lapierre, J. F., Guillemette, F., Berggren, M., & Del Giorgio, P. A. (2013). Increases in terrestrially derived carbon stimulate organic carbon processing and CO₂ emissions in boreal aquatic ecosystems. *Nature communications*, 4.
- Lapierre, J. F., & del Giorgio, P. A. (2014). Partial coupling and differential regulation of biologically and photochemically labile dissolved organic carbon across boreal aquatic networks. *Biogeosciences*, 11(20), 5969-5985.
- Lauro, F. M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T. J., Egan, S., Rice, S. & Cavicchioli, R. (2009). The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15527-15533.
- Lawaetz, A. J., & Stedmon, C. A. (2009). Fluorescence intensity calibration using the Raman scatter peak of water. *Applied spectroscopy*, 63(8), 936-940.
- Legendre, P., & Legendre, L. F. (2012). Numerical ecology (Vol. 24). Elsevier.
- Lønborg, C., & Søndergaard, M. (2009). Microbial availability and degradation of dissolved organic carbon and nitrogen in two coastal areas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 81(4), 513-520.
- Malmstrom, R. R., Kiene, R. P., Cottrell, M. T., & Kirchman, D. L. (2004). Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic Ocean. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4129-4135.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., & 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(5), 1097-1106.

- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K. H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and applied microbiology*, 15(4), 593-600.
- McCallister, S. L., & del Giorgio, P. A. (2012). Evidence for the respiration of ancient terrestrial organic C in northern temperate lakes and streams. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), 16963-16968.
- McCarren, J., Becker, J. W., Repeta, D. J., Shi, Y., Young, C. R., Malmstrom, R. R. & DeLong, E. F. (2010). Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16420-16427.
- MacCord, F., Azevedo, F. D. A., Esteves, F. D. A., & Farjalla, V. F. (2013). Regulation of bacterioplankton density and biomass in tropical shallow coastal lagoons. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 25(3), 224-234.
- Mackereth, F. J. H., Heron, J., & Talling, J. F. (1978). *Water analysis: some revised methods for limnologists* (Vol. 36). Ambleside: Freshwater Biological Association.
- McDowell, W. H., & Likens, G. E. (1988). Origin, composition, and flux of dissolved organic carbon in the Hubbard Brook Valley. *Ecological monographs*, 177-195.
- Maie, N., Parish, K. J., Watanabe, A., Knicker, H., Benner, R., Abe, T. & Jaffé, R. (2006). Chemical characteristics of dissolved organic nitrogen in an oligotrophic subtropical coastal ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17), 4491-4506.
- Maie, N., Yamashita, Y., Cory, R.M., Boyer, J.N., Jaffé, R., 2012. Application of Excitation emission matrix fluorescence monitoring in the assessment of spatial and seasonal drivers of dissolved organic matter composition: sources and physical disturbance controls. *Applied Geochemistry* 27, 917–929.
- Mann K. H. (2000). *Ecology of Coastal Waters: Implications for Management*. Oxford: Blackwell Science Margalef R. 1983. *Limnología*. Omega, Barcelona
- Marín-Spiotta, E., Gruley, K. E., Crawford, J., Atkinson, E. E., Miesel, J. R., Greene, S. & Spencer, R. G. M. (2014). Paradigm shifts in soil organic matter research affect interpretations of aquatic carbon cycling: transcending disciplinary and ecosystem boundaries. *Biogeochemistry*, 117(2-3), 279-297.
- McKnight, D. M., Andrews, E. D., Spaulding, S. A., & Aiken, G. R. (1994). Aquatic fulvic acids in algal- rich Antarctic ponds. *Limnology and Oceanography*, 39(8), 1972-1979.
- McKnight, D., Boyer, B., Westerhof, P., and al, e. (2001). Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* 46: 38-48.
- Meyers PA (2003) Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: A summary of examples from the Laurentian Great Lakes. *Organic Geochemistry* 34: 261-289.
- Milbrandt, E.C., Coble, P.G., Conmy, R.N., Martignette, A.J., Siwicke, J.J. (2010). Evidence for the production of marine fluorescence dissolved organic matter in coastal environments and a possible mechanism for formation and dispersion. *Limnology and Oceanography* 55, 2037–2051.
- Moran, M. A., Sheldon, W. M., & Zepp, R. G. (2000). Carbon loss and optical property changes during long- term photochemical and biological degradation of estuarine dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 45(6), 1254-1264.
- Mou, X., Sun, S., Edwards, R. A., Hodson, R. E., & Moran, M. A. (2008). Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature*, 451(7179), 708-711.
- Müller, R. A., Futter, M. N., Sobek, S., Nisell, J., Bishop, K., & Weyhenmeyer, G. A. (2013). Water renewal along the aquatic continuum offsets cumulative retention by lakes: implications for the character of organic carbon in boreal lakes. *Aquatic sciences*, 75(4), 535-545.
- Murphy, J. & Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*.
- Murphy, K. R., Ruiz, G. M., Dunsmuir, W. T., & Waite, T. D. (2006). Optimized parameters for fluorescence-based verification of ballast water exchange by ships. *Environmental science & technology*, 40(7), 2357-2362.
- Murphy, K. R., Butler, K. D., Spencer, R. G., Stedmon, C. A., Boehme, J. R., & Aiken, G. R. (2010). Measurement of dissolved organic matter fluorescence in aquatic environments: an interlaboratory comparison. *Environmental science & technology*, 44(24), 9405-9412.
- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Graeber, D., & Bro, R. (2013). Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. *PARAFAC. Analytical Methods*, 5(23), 6557-6566.
- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Wenig, P., & Bro, R. (2014). OpenFluor—an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. *Analytical Methods*, 6(3), 658-661.
- Neef, A. (1997). *Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen*. Ph.D. thesis, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technical University, Munich, Germany.
- Nelson, N. B., Siegel, D. A., & Michaels, A. F. (1998). Seasonal dynamics of colored dissolved material in the Sargasso Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 45(6), 931-957.
- Nelson, N. B., & Siegel, D. A. (2002). Chromophoric DOM in the open ocean. *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, 547-578.
- Nieto-Cid, M., Álvarez-Salgado, X. A., & Pérez, F. F. (2006). Microbial and photochemical reactivity of fluorescent dissolved organic matter in a coastal upwelling system. *Limnology and Oceanography*, 51(3), 1391-1400.
- Nin M. 2013. Mapeo de servicios ecosistémicos en la cuenca de la Laguna de Rocha: cambios temporales y prioridades territoriales para su conservación. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, UdelAR. 101 pp.
- Niencheski, L. F., & Windom, H. L. (1994). Nutrient flux and budget in Patos Lagoon estuary. *Science of the total environment*, 149(1), 53-60.
- Nobre, C. A., Sellers, P. J., & Shukla, J. (1991). Amazonian deforestation and regional climate change. *Journal of Climate*, 4(10), 957-988.

- Obernosterer, I., & Benner, R. (2004). Competition between biological and photochemical processes in the mineralization of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, 49(1), 117-124.
- Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K., & Benner, R. (2001). Production of refractory dissolved organic matter by bacteria. *Science*, 292(5518), 917-920.
- Ohno, T. (2002). Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. *Environmental science & technology*, 36(4), 742-746.
- Ohno, T., & Bro, R. (2006). Dissolved organic matter characterization using multiway spectral decomposition of fluorescence landscapes. *Soil Science Society of America Journal*, 70(6), 2028-2037.
- Osburn, C. L., Handsel, L. T., Mikan, M. P., Paerl, H. W., & Montgomery, M. T. (2012). Fluorescence tracking of dissolved and particulate organic matter quality in a river-dominated estuary. *Environmental science & technology*, 46(16), 8628-8636.
- Paerl H.W. & Huisman J. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*. 1(1), 27–37.
- Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., & Lamotte, M. (2000). Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*, 31(12), 1765-1781.
- Pedrés- Alió, C., Calderón- Paz, J. I., MacLean, M. H., Medina, G., Marrasé, C., Gasol, J. M., & Guixa- Boixereu, N. (2000). The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(2), 143-155.
- Pérez, M. T., & Sommaruga, R. (2006). Differential effect of algal- and soil- derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnology and Oceanography*, 51(6), 2527-2537.
- Pérez, M. T., Rofner, C., & Sommaruga, R. (2015). Dissolved organic monomer partitioning among bacterial groups in two oligotrophic lakes. *Environmental microbiology reports*.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2002). Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3094-3101.
- Piccini, C., Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R., & Pernthaler, J. (2006). Blooms of Single Bacterial Species in a Coastal Lagoon of the Southwestern Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6560-6568.
- Piccini, C., Conde, D., Pernthaler, J., & 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.
- Piccini, C., Conde, D., Pernthaler, J., & Sommaruga, R. (2013). Photoalteration of macrophyte-derived chromophoric dissolved organic matter induces growth of single bacterial populations in a coastal lagoon. *Journal of Limnology*, 72(3), 49.
- Pinhassi, J., Azam, F., Hemphälä, J., Long, R. A., Martinez, J., Zweifel, U. L., & Hagström, Å. (1999). Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology*, 17, 13.
- Poretsky, R. S., Sun, S., Mou, X., & Moran, M. A. (2010). Transporter genes expressed by coastal bacterioplankton in response to dissolved organic carbon. *Environmental microbiology*, 12(3), 616-627.
- Proença, L., Abreu, P., & Odebrecht, C. (1988) Nutrientes inorgânicos em água doce meso-oligohalina e mixo-poli-euhalina no canal de acesso a Lagoa dos Patos, RS, Brasil. *Acta Limnol. Brasil*, 2, 57-77.
- Reche, I., Pace, M. L., & Cole, J. J. (1998). Interactions of photobleaching and inorganic nutrients in determining bacterial growth on colored dissolved organic carbon. *Microbial Ecology*, 36(3-4), 270-280.
- Redfield, A., Ketchum, B., & Richards E. A. (1963). The influence of organisms on the composition of seawater, p. 26- 77. Zn M. N. Hill red., The sea. V 2. Interscience
- Rodríguez- Gallego L., Santos C., Amado S., Gorfinkel D., Gonzalez M.N., Gómez J., Neme C., Tommasino H., Conde D. 2008. (a). Proyecto PDT 36-09: Costos y beneficiossocioeconómicos y ambientales del uso actual de la Laguna de Rocha y sucesión: Insumos para la Gestión Integrada de un Área Protegida Costera. Universidad de la República.
- Rodríguez- Gallego L. 2010. Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay: impacto y optimización de los usos del suelo. Tesis de Doctorado, PEDECIBA, Facultad de Ciencias, Montevideo.
- Rodríguez-Gallego L., Achkar M., Conde D. 2012. Land Suitability Assessment in the Catchment Area of Four Southwestern Atlantic Coastal Lagoons: Multicriteria and Optimization Modeling. *Environmental management*. DOI 10.1007/s00267-012-9843-4.
- Rodríguez-Gallego L., Sabaj V., Masciadri S., Kruk C., Arocena R., Conde D. 2014. Salinity as a Major Driver for Submerged Aquatic Vegetation in Coastal Lagoons: a Multi-Year Analysis in the Subtropical Laguna de Rocha. *Estuaries and Coasts*. 1-15.
- Romera-Castillo, C., Sarmiento, H., Álvarez-Salgado, X. A., Gasol, J. M., & Marrasé, C. (2011). Net production and consumption of fluorescent colored dissolved organic matter by natural bacterial assemblages growing on marine phytoplankton exudates. *Applied and environmental microbiology*, 77(21), 7490-7498.
- Sachse, A., Henrion, R., Gelbrecht, J., & Steinberg, C. E. W. (2005). Classification of dissolved organic carbon (DOC) in river systems: influence of catchment characteristics and autochthonous processes. *Organic Geochemistry*, 36(6), 923-935.
- Salcher, M. M., Pernthaler, J., & Posch, T. (2011). Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria 'that rule the waves' (LD12). *The ISME journal*, 5(8), 1242-1252.
- Santin, C., Yamashita, Y., Otero, X. L., Alvarez, M. A., & Jaffé, R. (2009). Characterizing humic substances from estuarine soils and sediments by excitation-emission matrix spectroscopy and parallel factor analysis. *Biogeochemistry*, 96(1-3), 131-147.
- Schlesinger, W.H. (1997) *Biogeochemistry: an Analysis of Global Change*. New York: Academic Press.
- Scheffer, M. (2009). *Critical transitions in nature and society*. Princeton University Press.

- Servais, P., Anzil, A., & Ventresque, C. (1989). Simple method for determination of biodegradable dissolved organic carbon in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2732-2734.
- Šimek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M. G., Hornák, K., Dolan, J. R., Nedoma, J., ... & Amann, R. (2001). Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2723-2733.
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., and Albright, L.J. (1987) Bacteria: link or sink? *Science* 235: 88–89.
- Shutova, Y., Baker, A., Bridgeman, J., & Henderson, R. K. (2014). Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: from PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths. *Water research*, 54, 159-169.
- Søndergaard, M., Borch, N.H., Riemann, B., 2000. Dynamics of biodegradable DOC produced by freshwater plankton communities. *Aquat. Microb. Ecol.* 23, 73– 83.
- Stedmon, C. A., Markager, S., & Bro, R. (2003). Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* 82: 239-254.
- Stedmon, C. A. & Markager, S. (2005a). Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis. *Limnol. and Oceanogr.* 50: 1415.
- Stedmon, C. A. & Markager, S. (2005b). Resolving the variability in dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis. *Limnol. and Oceanogr.* 50: 686-697.
- Stedmon, C. A., Markager, S., Tranvik, L., Kronberg, L., Slätis, T., & Martinsen, W. (2007). Photochemical production of ammonium and transformation of dissolved organic matter in the Baltic Sea. *Mar. Chem.* 104: 227-240.
- Stedmon, C. A., Markager, S., Tranvik, L., Kronberg, L., Slätis, T., & Martinsen, W. (2007). Photochemical production of ammonium and transformation of dissolved organic matter in the Baltic Sea. *Mar. Chem.* 104: 227-240.
- Stedmon, C. A., & Bro, R. (2008). Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6(11), 572-579.
- Stedmon, C. A., Seredyńska-Sobecka, B., Boe-Hansen, R., Le Tallec, N., Waul, C. K., & Arvin, E. (2011). A potential approach for monitoring drinking water quality from groundwater systems using organic matter fluorescence as an early warning for contamination events. *water research*, 45(18), 6030-6038.
- Strickland, J.D.H. & Parsons, T.R. (1972). A practical handbook of sea-water analysis. *J. Fish. Res. Bd. Canada*. 167: 311.
- Stubbins, A., Hubbard, V., Uher, G., Law, C. S., Upstill-Goddard, R. C., Aiken, G. R., & Mopper, K. (2008). Relating carbon monoxide photoproduction to dissolved organic matter functionality. *Environmental science & technology*, 42(9), 3271-3276.
- Stubbins, A., Lapierre, J. F., Berggren, M., Prairie, Y. T., Dittmar, T., & Del Giorgio, P. A. (2014). What's in an EEM? Molecular Signatures Associated with Dissolved Organic Fluorescence in Boreal Canada. *Environmental science & technology*, 48(18), 10598-10606.
- Suhett, A. L., MacCord, F., Amado, A. M., Farjalla, V. F., & Esteves, F. A. (2004). Photodegradation of dissolved organic carbon in humic coastal lagoons (RJ, Brazil). *Humic Substances and Soil and Water Environment*, 61-63.
- Sumner, D. M., & Belaine, G. (2005). Evaporation, precipitation, and associated salinity changes at a humid, subtropical estuary. *Estuaries*, 28(6), 844-855.
- Teeling, H., Fuchs, B. M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bönke, C. M. & Amann, R. (2012). Substrate-controlled succession of marine bacterioplankton populations induced by a phytoplankton bloom. *Science*, 336(6081), 608-611.
- Thompson, F. L., Bruce, T., Gonzalez, A., Cardoso, A., Clementino, M., Costagliola, M., ... & Artigas, L. F. (2011). Coastal bacterioplankton community diversity along a latitudinal gradient in Latin America by means of V6 tag pyrosequencing. *Archives of microbiology*, 193(2), 105-114.
- Tranvik, L.J. (1993). Microbial transformation of labile dissolved organic matter into humic-like matter in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12: 177-183.
- Tranvik, L. J. (1998). Degradation of dissolved organic matter in humic waters by bacteria. In *Aquatic humic substances* (pp. 259-283). Springer Berlin Heidelberg.
- Tranvik, L. J., & Bertilsson, S. (2001). Contrasting effects of solar UV radiation on dissolved organic sources for bacterial growth. *Ecology Letters*, 4(5), 458-463.
- Vähätalo, A. V., & Wetzel, R. G. (2004). Photochemical and microbial decomposition of chromophoric dissolved organic matter during long (months–years) exposures. *Marine Chemistry*, 89(1), 313-326.
- Vazquez, E., Amalfitano, S., Fazi, S., & Butturini, A. (2011). Dissolved organic matter composition in a fragmented Mediterranean fluvial system under severe drought conditions. *Biogeochemistry* 102: 59-72.
- van Nugteren, P., Moodley, L., Brummer, G. J., Heip, C. H., Herman, P. M., & Middelburg, J. J. (2009). Seafloor ecosystem functioning: the importance of organic matter priming. *Mar. Biol.* 156: 2277-2287.
- Vila-Costa, M., Pinhassi, J., Alonso, C., Pernthaler, J., Sim, & Rafel (2007). An annual cycle of dimethylsulfoniopropionate-sulfur and leucine assimilating bacterioplankton in the coastal NW Mediterranean. *Environ. Microbiol.* 9: 2451-2463.
- Vodacek, A., Blough, N. V., DeGrandpre, M. D., & Nelson, R. K. (1997). Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: Terrestrial inputs and photooxidation. *Limnology and Oceanography*, 42(4), 674-686.
- Walker, S. A., Amon, R. M., & Stedmon, C. A. (2013). Variations in high- latitude riverine fluorescent dissolved organic matter: A comparison of large Arctic rivers. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 118(4), 1689-1702.

- Weishaar, J. L., Aiken, G. R., Bergamaschi, B. A., Fram, M. S., Fujii, R., & Mopper, K. (2003). Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental Science & Technology*, 37(20), 4702-4708.
- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. Gulf Professional Publishing.
- Wickland, K. P., Neff, J. C., & Aiken, G. R. (2007). Dissolved organic carbon in Alaskan boreal forest: Sources, chemical characteristics, and biodegradability. *Ecosystems*, 10(8), 1323-1340.
- Wilson, H. F., & Xenopoulos, M. A. (2009). Effects of agricultural land use on the composition of fluvial dissolved organic matter. *Nature Geoscience*, 2(1), 37-41.
- Wu, Q. L., & Hahn, M. W. (2006). Differences in structure and dynamics of Polynucleobacter communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. *FEMS microbiology ecology*, 57(1), 67-79.
- Yamashita, Y., & Tanoue, E. (2004). In situ production of chromophoric dissolved organic matter in coastal environments. *Geophysical Research Letters*, 31(14).
- Yamashita, Y., & Jaffé, R. (2008). Characterizing the interactions between trace metals and dissolved organic matter using excitation– emission matrix and parallel factor analysis. *Environmental Science & Technology*, 42(19), 7374-7379.
- Yamashita, Y., Maie, N., Briceño, H., & Jaffé, R. (2010a). Optical characterization of dissolved organic matter in tropical rivers of the Guayana Shield, Venezuela. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012), 115(G1).
- Yamashita, Y., Scinto, L. J., Maie, N., & Jaffé, R. (2010b). Dissolved organic matter characteristics across a subtropical wetland's landscape: application of optical properties in the assessment of environmental dynamics. *Ecosystems*, 13(7), 1006-1019.
- Yamashita, Y., Panton, A., Mahaffey, C., & Jaffé, R. (2011). Assessing the spatial and temporal variability of dissolved organic matter in Liverpool Bay using excitation–emission matrix fluorescence and parallel factor analysis. *Ocean Dynamics*, 61(5), 569-579.
- Yamashita, Y., Boyer, J. N., & Jaffe, R. (2013). Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy. *Continental shelf research*, 66, 136-144.

ANEXO I: Estandarización de los datos y Modelado de la MOD

La técnica de modelación multivariable *parallel factor analysis* PARAFAC es un método de descomposición de tres vías: muestras * excitación* emisión, similar al análisis de componentes principales (Stedmon et al. 2003, Andersen & Bro 2003, Murphy et al. 2010, Murphy et al. 2013). Es usado en química para descomponer arreglos de datos trilineal facilitando la identificación y cuantificación de señales independientes, denominados componentes. Es decir, permite descomponer la señal de fluorescencia en sus componentes individuales, donde cada componente representa un fluoróforo (Bro, 1997). La fórmula empleada para el modelado es la siguiente:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}$$

donde, x_{ijk} es x representa la muestra, i la intensidad de fluorescencia a una emisión j y excitación k . e_{ijk} representa la señal no explicada (residuales que contienen ruido y variación no modelada). a , b y c son los parámetros de salida del modelo. Idealmente representan la concentración, emisión y excitación, respectivamente de cada fluoróforo.

Para remover el inner filter effect (IFE) el método empleado en la herramienta drEEM usa el espectro de absorbancia de la muestra para calcular una matriz con factores de corrección correspondientes a cada par de longitud de onda de la EEM (Lakowicz, 2006), mediante la formula:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} * 10^{(A_{\text{exc}} + A_{\text{em}}) * 0.5}$$

donde F_{corr} es la matriz de fluorescencia corregida, F_{obs} es la observada, A_{exc} y A_{em} es la absorbancia a cada excitación y emisión medida y 0.5 es el promedio del pasaje de luz en una cubeta de 1 cm. Esta corrección basada en la absorbancia de la muestra es adecuada para absorbancia por debajo de los 2.0 medidas en cubetas de 1cm, de lo contrario la muestra debe ser diluida (Gu & Kenny, 2009).

Otras de las señales no relacionadas con la fluorescencia son la dispersión de Raman y Rayleigh, que causan la presencia de picos de dispersión diagonal a la misma longitud de onda pero de una magnitud mayor que la fluorescencia. El tratamiento para corregir estos picos de dispersión es eliminar la parte de datos afectada por este fenómeno y remplazarla por ceros o intrapolando con los datos obtenidos a cada lado de la banda de dispersión (Zepp et al. 2004). La dispersión de Rayleigh ocurre en una región donde no hay señal química por lo que se empleó la sustitución por ceros mientras que para la dispersión de Raman se interpoló sobre la región de datos afectada, empleando la función *smootheem* en la herramienta *drEEM* que permite trabajar con las bandas de dispersión de Raman y Rayleigh independientemente (Fig. Supl.1, Murphy et al. 2013).

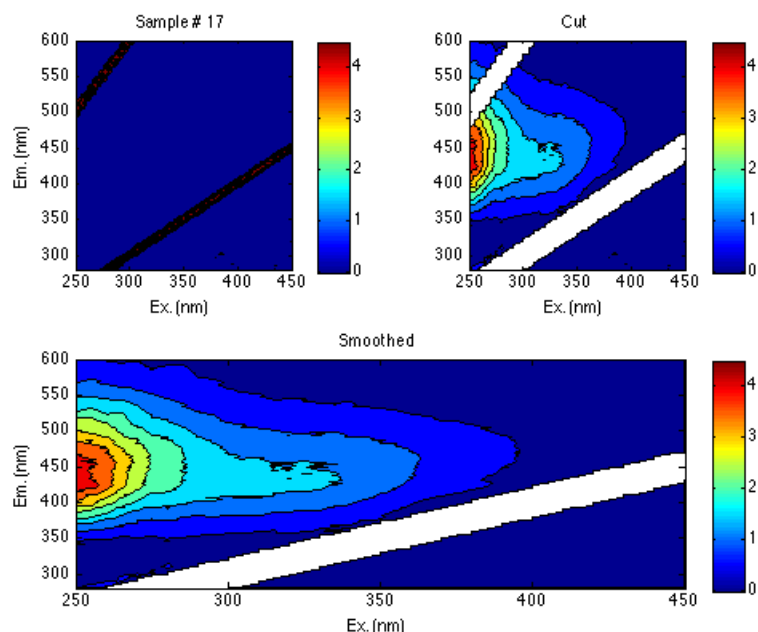


Fig. Supl. 1. Se muestra ejemplo de una EEM, Arriba izq. Muestra #17 sin corregir dispersión diagonal Raman y Rayleigh. Arriba derecha: Dispersión Raman y Rayleigh eliminada y abajo EEM corregida.

Además, la fluorescencia fue convertida a Raman Units (R.U). Para ello se empleó la fluorescencia de una muestra de agua Miliq medida junto con las muestras y se calculó el área bajo la gráfica (Arp) a una excitación de 350 nm y emisión entre 371 – 428 nm (Lawaetz & Stedmon, 2007, Murphy et al. 2010). La fluorescencia de la muestra en cada punto fue dividida por Arp , dando como resultado una nueva unidad comparable entre equipos y con otros estudios. Además compensa las fluctuaciones en la intensidad de la lámpara ocurridas durante el periodo de análisis.

Luego de estos pasos se generó un set de datos corregidos listos para el modelado PARAFAC mediante el uso de la herramienta drEEM y Nway.

En la fase exploratoria se generaron modelos preliminares con 3 a 7

componentes (Fig. Supl. 2), con el fin de explorar la cantidad de componentes que podría llegar a tener nuestro modelo en base a los espectros obtenidos para cada uno. Por ejemplo, se descartan componentes con espectros atípicos como cambios espectrales abruptos o los espectros de emisión y excitación deben superponerse ligeramente (Murphy et al. 2013)

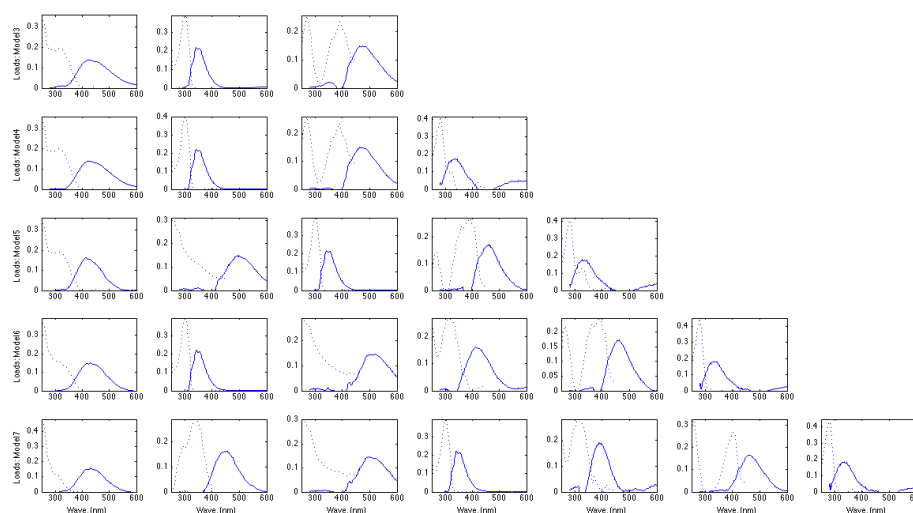


Fig. Supl. 2. Modelos preliminares con 3-7 componentes (de arriba hacia abajo). Se observa el espectro de excitación y emisión de cada componente.

Luego se comenzó con la remoción de la dispersión que generaba ruido a través de la visualización de los modelos preliminares y las EEMs generadas para cada muestra para mejorar los modelos obtenidos. Para cada modelo preliminar se chequearon muestras outlier que tenían un leverage (0-1) mayor al promedio y que por ende ejercían una mayor influencia en el modelado, lo mismo con longitudes de onda para la excitación y emisión. En la Fig. Supl. 3 se muestra un ejemplo para el

modelo de 3 componentes, en donde la muestra 21 fue eliminada ya que su leverage era cercano a 1 y se alejaba del promedio. Luego se volvieron a generar los modelos preliminares sin los outlier observados en cada caso. Asimismo, se chequearon los residuales para cada muestra en cada modelo preliminar, los cuales no debían presentar información importante que no estuviera siendo modelada, es decir, no deben observarse patrones sistemáticos y deben caracterizarse por ruido que contenga poca estructura (Fig. Supl. 4, Stedmon et al. 2008, Murphy et al. 2013). En caso contrario, el número de componentes no sería el adecuado para modelar el set de datos.

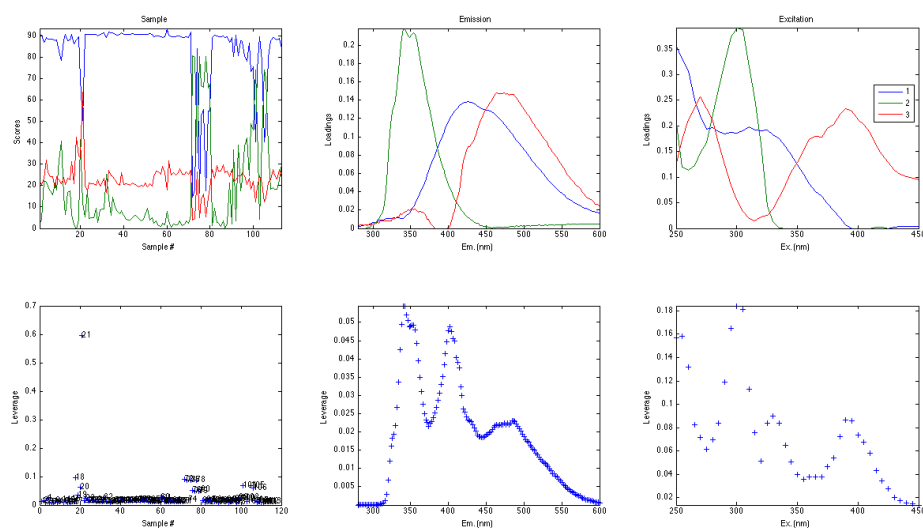


Fig. Supl. 3. Modelo 3 componentes: Arriba de izquierda a derecha: se observa el puntaje de cada muestra en cada componente, los espectros de emisión y excitación de cada componente. Debajo de izquierda a derecha: el leverage (peso) que tiene cada muestra, longitud de onda para la emisión y excitación en el modelo.

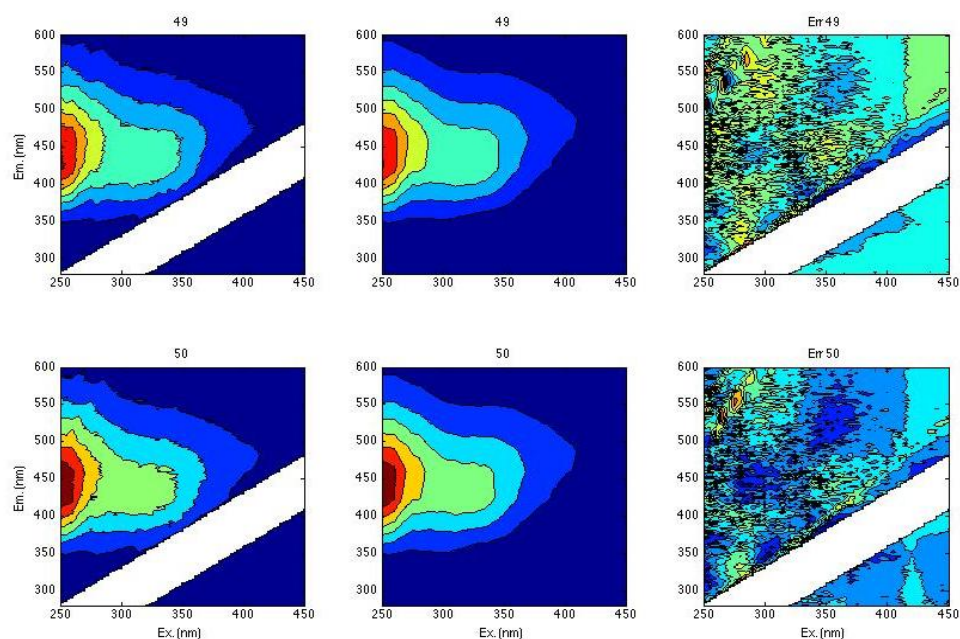


Fig. Supl. 4. Ejemplo de EEMs con sus residuales. En el ejemplo de arriba se observan picos que podría sugerir que el modelo no es apropiado, en el de abajo se observa ruido sin picos claros.

Para el modelado se realizaron 2 test, con y sin la restricción del uso de datos negativos (*nonnegativity* y *unconstrained*, respectivamente) y se eligió el más adecuado. En este caso los modelos se obtuvieron con la restricción *nonnegativity* y se chequearon las correlaciones entre los componentes obtenidos para cada modelo. Cuando el puntaje de dos componentes PARAFAC están altamente correlacionados, es muy difícil resolver posteriormente el espectro de emisión y excitación de cada uno, por lo que es necesario normalizar el set de datos, lo que reduce el efecto concentración dándole la oportunidad a las muestras con baja concentración de entrar en el modelo. La normalización de los datos se realizó mediante la división de cada punto por la suma del cuadrado de todos los valores. Luego de ajustado y validado el modelo y adquiridos los espectro de emisión y excitación de cada componente esto fue revertido para obtener los valores reales.

Con el set de datos normalizados se realizó nuevamente los pasos de la fase exploratoria, los test de restricción y se compararon los resultados de los nuevos componentes PARAFAC con los viejos y se procedió a la validación del modelo que mejor se ajustaba a los datos, en este caso el modelo validado fue el de 3 componentes PARAFAC (Fig. Supl. 5) con un 97% de variación explicada. La validación se realizó mediante el análisis *Split half*, esto es, el set de datos es dividido al azar en varias fracciones para ver si se obtiene el mismo modelo cuando se modelan distintos grupos de muestras. Esto implica división alternante, empezando por la primera muestra del set de datos cada una es asignada a 1 de los 4 split, los cuales van a contener $\frac{1}{4}$ del set de datos y luego son combinados en 6 formas diferentes para generar nuevas mitades del set de datos. Por ejemplo, divisiones-4, combinaciones-6, pruebas-3 (Stedmon & Bro, 2008, Murphy et al. 2013). Se obtuvieron 3 componentes PARAFAC (Fig. Supl. 6)

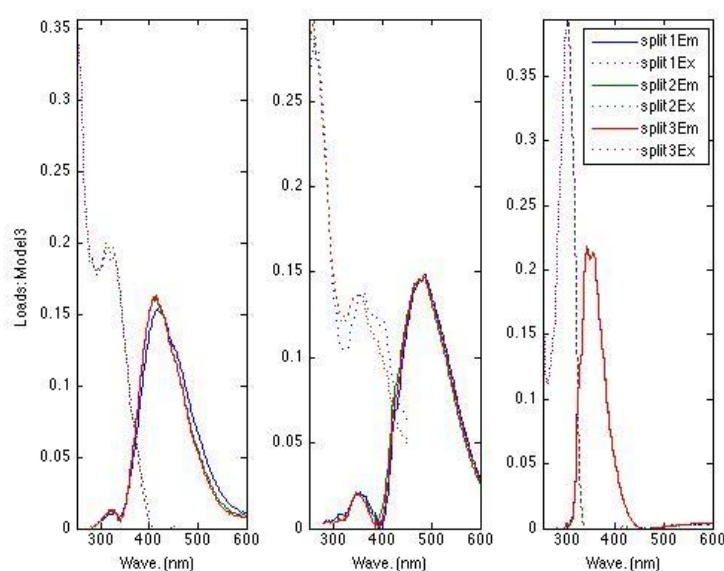


Fig. Supl. 5. Validación del modelo de 3 componentes mediante el análisis *Split half*.

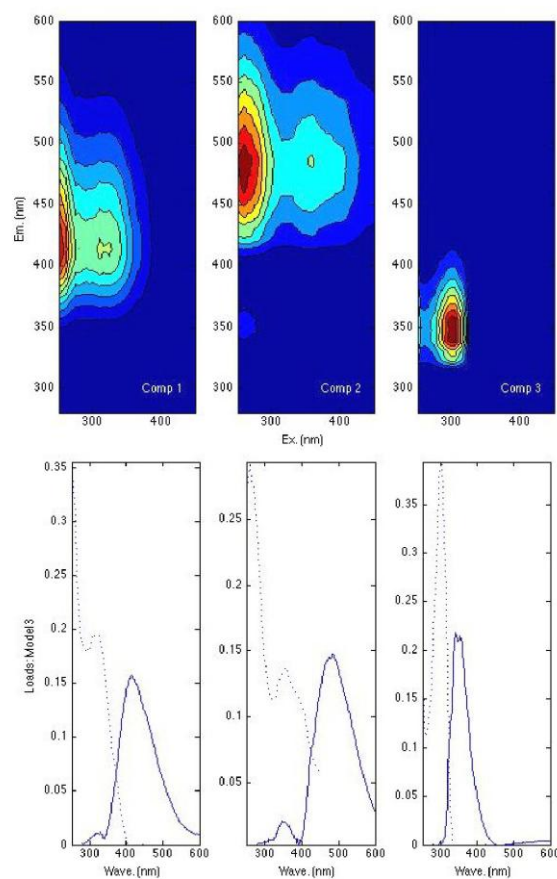


Fig. Supl. 6. Fingerprinting con los 3 componentes PARAFAC validados, C1, C2 y C3 (arriba) con sus respectivos espectros de excitación- emisión (abajo).

ANEXO II: Actividades realizadas durante la Maestría

Trabajos presentados en congresos y jornadas

Amaral, V., Calliari, D., Alonso, C. 2012 Dinámica de la materia orgánica disuelta en una laguna costera . III Jornadas en Geociencias, PEDECIBA. Montevideo, Uruguay. Exposición Oral

Amaral, V., Bertoglio, F., Calliari, D. & Alonso, C. 2013 Validación de un modelo de interacción hidrología-comunidad bacteriana para la Laguna de Rocha. IV Jornadas en Geociencias, PEDECIBA. Montevideo, Uruguay. Póster.

Amaral, V., Calliari, D., Alonso, C. 2013. Bomba de carbono microbiana en una laguna costera. XV Congreso Latinoamericano de las Ciencias del Mar (COLACMAR). Punta del Este, Uruguay. Póster

Amaral, V., Graeber, D., Calliari, D., Alonso, C. 2014. Matrices de Emisión-Excitación y análisis PARAFAC como herramienta para la caracterización de la materia orgánica disuelta. V Jornadas en Geociencias, PEDECIBA. Montevideo, Uruguay. Póster.

Santana, R., **Amaral., V.,** Alonso, C. 2014. Caracterización de la materia orgánica disuelta en la cuenca de la Laguna de Rocha. V Jornadas en Geociencias, PEDECIBA. Montevideo, Uruguay. Póster. Trabajo de Iniciación a la Investigación PEDECIBA Geociencias.

Amaral, V., Graeber, D., Calliari, D., Alonso, C. 2014. Major groups of aquatic bacteria respond to different DOM components in a subtropical estuary. American Society of Limnology and Oceanography (ASLO). Granada, España. Exposición Oral.

Pasantías

Julio 2012. Técnicas Moleculares: “Estudio de la estructura de la comunidad bacteriana en muestras de agua oceánica”. Instituto de Investigaciones Clemente, a cargo de la MSc. Natalia Bajsa, Técnico preparador. Investigadora asociada Grado 2. Montevideo, Uruguay.

Setiembre-Octubre 2014. Fluorescence measurements of dissolved organic matter and their evaluation by parallel factor analysis (PARAFAC). Aarhus University, Bioscience Institute, a cargo del Dr. Daniel Graeber, co desarrollador de la herramienta drEMM. Silkeborg, Dinamarca.

Presentación proyectos de investigación

Producción de materia orgánica recalcitrante por comunidades microbianas estuarinas. Financiado. Agencia Nacional de Investigación e Iniciación (ANII). Becas Nacionales de Posgrado 2012.

Producción de materia orgánica recalcitrante por comunidades microbianas estuarinas.

Presentado a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) Iniciación a la investigación 2011. Resultado: El proyecto fue bien evaluado pero no fue financiado.

Bomba de carbono microbiana a lo largo del ciclo hidrológico de una laguna costera. Presentado a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) Iniciación a la investigación 2013. Resultado: El proyecto fue bien evaluado pero no fue financiado.

Producción de materia orgánica recalcitrante por comunidades microbianas estuarinas. Presentado Agencia Nacional de Innovación e

investigación (ANII). Fondo Clemente Estable 2013, Modalidad III.
Resultado: El proyecto fue bien evaluado pero no fue financiado.

ANEXO III: Publicaciones

Strong links between DOM optical properties and main groups of aquatic bacteria

Valentina Amaral^{1,4}, Daniel Graeber², Ron Benner³, Danilo Calliari⁴, Cecilia Alonso^{1,4*}

¹Microbial Ecology of Aquatic Transitional Systems Research Group, Department of Coastal Studies, Centro Universitario Región Este, Universidad de la República, Rocha, Uruguay.

²Department of Bioscience, Aarhus University, Silkeborg, Denmark.

³Marine Science Program, University of South Carolina, Columbia, South Carolina 29208, USA.

⁴Functional Ecology of Aquatic Systems Research Group, Department of Coastal Studies, Centro Universitario Región Este, Universidad de la República, Rocha, Uruguay.

Abstract

Despite considerable work exists on the link between DOM and bacteria, it is not yet clear how the abundance of the main aquatic clades relates to DOM composition in a natural aquatic system. The present work evaluates this relation in a subtropical coastal lagoon, using PARAFAC modelling of excitation–emission fluorescence spectroscopy, and spectroscopic indexes to characterize DOM composition, and fluorescence in-situ hybridization (CARD-FISH) to quantify the major aquatic bacterial groups. DOM in the system exhibited marked variations in terms of concentration, molecular weight, aromaticity, colour, degree of humification and freshness, as well in the proportion of the 3 different FDOM components identified. All major bacterial clades (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria*) were significantly linked to DOM concentration and/or composition, being those crucial factors for modelling their abundance in this system. The combination and significance of the factors included in the respective models was specific for each of the targeted bacterial groups, strongly indicating that they do behave as coherent and distinctive units. *Cytophaga-Flavobacteria* and *Betaproteobacteria* were the groups which correlated with more DOM properties, while *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* abundances were significantly explained by either low or high DOC concentrations, respectively. The significant relationships between DOM properties and the main bacterial groups delineated a profile of each group regarding DOM preferences/dislikes, which strongly agree with evidence derived from very different approaches, from genome analysis to single-cell substrate uptake. In addition, different patterns of microbial DOM processing could be associated to specific *in situ* environmental variables, including the groups abundances. These results highlight the specificities of the main bacterial clades, providing support for a functional classification of the bacterioplankton regarding DOM processing at the level of bacterial classes.

Introduction

Bacteria-dissolved organic matter (DOM) interactions are central in biogeochemical cycles. Elucidating the connections between bacterial community composition (BCC) and DOM composition is fundamental to understand the role and response of aquatic systems to global change. The liaison between BCC and DOM composition has been explored mainly focusing on the evolution of BCC during experimental incubations with varied DOM sources (Judd, et al. 2006; Kirchman, et al. 2004; McCarren, et al. 2010; Pérez and Sommaruga 2006; Pinhassi, et al. 1999), through genome analysis of cultured and uncultured bacteria (Bauer, et al. 2006; Lauro, et al. 2009; Teeling, et al. 2012), and looking at specific substrate *in situ* uptake by bacterial cells ranging from whole communities (Ouverney and Fuhrman 1999), to main classes (Cottrell and Kirchman 2000), down to individual species (Buck, et al. 2009).

Once this traditionally called “black box” was opened, it rapidly turned into a “Pandora’s box” for biogeochemical modelling, as casted evidence from both, generalist utilization of DOM (Mou, et al. 2008) and specialization in the usage of certain compounds (Poretsky, et al. 2010). It appears that, despite the utilization of environmentally relevant substrates can be quite widespread among different bacterial groups, they still show preferences linked to DOM structure (Cottrell and Kirchman 2000), and/or concentration (Alonso and Pernthaler 2006a). Furthermore, at a given location and time, few members of the bacterial assemblage might dominate the consumption of specific DOM components (Alonso and Pernthaler 2006b; Malmstrom, et al. 2004), even switching dominance through seasons (Alonso-Saez and Gasol 2007; Vila-Costa, et al. 2007). While some features have been proven to hold at a comparably broad taxonomic level (e.g. *Alphaproteobacteria* preference for monomers) (Cottrell and Kirchman 2000), at the same time sister species have been shown to exhibit *in situ* dissimilar patterns of substrate utilization (Alonso, et al. 2009), thus, finding an adequate level of resolution for modelling bacterial utilization of DOM remains a challenge.

Analogously, characterizing DOM composition of natural aquatic systems has been particularly difficult and is still not routinely included in many biogeochemical studies (Jaffé, et al. 2008). Recently, the application of ultrahigh resolution Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry (FTICR-MS) has greatly improved our comprehension of DOM complexity (Hertkorn, et al. 2006), including the finding of significant correlations between spectral properties and molecular composition of DOM (Stubbins, et al. 2014). However, the still scarce published studies combining FTICR-MS with BCC analysis have

failed in finding significant correlation patterns between them (Herlemann, et al. 2014).

As a consequence, despite the considerable advances in disentangling bacterial-DOM interactions, so far there are no published examples of statistically significant relations between the abundance of specific bacterial groups and DOM composition in a natural aquatic system.

The aim of this work was to quantify and characterize DOM using a suite of spectral properties in a subtropical estuary, and test whether the main clades of aquatic bacteria were significantly correlated to those properties. We hypothesized that the abundance of the major bacterial clades (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria*) should be significantly linked to DOM concentration and/or composition, and that they would exhibit different patterns in these linkages.

Materials and Methods

Study site, sampling scheme and work *in situ*.

Laguna de Rocha is a large shallow coastal lagoon (72 km², $z_{\text{mean}}=0.6$ m), located in the eastern coast of Uruguay (34° 33' S, 54° 22'W), belonging to a natural protected area, RAMSAR site, and MaB/UNESCO Biosphere Reserve. It is separated from the Atlantic Ocean by a sand bar, which periodically opens, allowing for the interaction of both water masses (Conde, et al. 2000).

The sampling was conducted in 2 phases: In the first phase, four samplings were done - from March 2013 to June 2013- when the lagoon was physically separated from the ocean by the sand bar, whereas in the second phase, from November 2013 to April 2014, four samplings were performed when the lagoon was connected to the ocean.

Samples were taken at three different stations: North (N), Centre (C) and South (S), where N is the station most influenced by freshwater discharge and S the station most influenced by the adjacent ocean (Suppl. Fig. 1). Conductivity (K), temperature (T), dissolved oxygen (DO) and pH were measured *in situ* using a multi-parameter probe (HORIBA). At each station, five-litre surface water samples were collected and kept fresh in the dark until laboratory processing, conducted within 1-2 hours after collection.

Nutrient Analysis

Nutrient analysis was performed in duplicates, following standard colorimetric protocols for ammonium (Koroleff 1976), nitrate (Müller and Weidemann 1955), nitrite (Strickland and Parsons 1972), phosphate (Murphy and Riley 1962), and total dissolved nitrogen, and phosphorus (Valderrama 1981). Colour development was measured using a Lambda 35 spectrophotometer (Perkin Elmer). DON was calculated as the difference between TDN and the sum of ammonium, nitrite and nitrate.

Dissolved organic carbon

Samples for DOC analysis were gravity filtered using pre-combusted GF/F filters (0.7- μ m pore size), acidified to pH < 2 with HCl and stored frozen (-20°C) in pre-combusted glass ampoules. DOC concentrations were determined by high temperature catalytic oxidation using a Shimadzu TOC-L analyzer. For each sample 3 injections with a CV < 1.5% were taken into account for estimating the DOC concentration. MilliQ water was used as blank (DOC below 0.07 mg C L⁻¹), and measured after every 7th sample. Potassium phthalate was used as standard for constructing the calibrations curves. 4 curves were used (0 - 2 mg L⁻¹, 2 - 10 mg L⁻¹, 10 - 20 mg L⁻¹, 20 - 40 mg L⁻¹), with 5 points each.

DOM Spectral Characterization

Samples were gravity filtered using pre-combusted GF/F filters and stored immediately at 4°C in pre-combusted glass vials. Absorbance and fluorescence measurements were conducted at room temperature.

Absorbance spectra (240 to 800 nm) were measured in a Perkin Elmer Lambda 35 spectrophotometer, using a 1 cm quartz cuvette and pure MilliQ water as blank. First a baseline was run with MilliQ, then, the absorbance of the blank was automatically subtracted from the absorbance of the samples. Before calculating the absorbance indexes the mean absorbance between 700-800 nm was subtracted from the spectrum to correct for offsets due to instrument performance (Helms, et al. 2008).

Fluorescence properties of DOM were measured on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer at room temperature. Excitation-emission matrices (EEMs) were obtained for emission wavelengths from 280 to 600 nm with 2 nm increments and excitation wavelengths from 240 to 450 nm, with 5 nm increments. The drEEM toolbox was used to analyze the EEMs (Murphy, et al. 2013). Briefly, the spectra were corrected by using the instrument correction factors; inner-filter correction was based on absorbance measurements; data were standardized and normalized to Raman units (R.U.; nm⁻¹) based on measurements of Raman peak at 350 nm. The resulting Raman units are then comparable between instruments and studies (Lawaetz and Stedmon 2009).

Spectroscopic indices and PARAFAC modelling.

Three indexes were calculated from the absorbance spectra: $SUVA_{254}$ ($L\ mg^{-1}\ m^{-1}$), which is a surrogate for DOM aromaticity (Weishaar et al., 2003), spectral slopes (nm^{-1}) for 275–295 nm ($S_{275-295}$) 350–400 nm ($S_{350-400}$) and S_R ($S_{275-295}/S_{350-400}$), used as proxies to DOM average molecular size (Helms, et al. 2008), and the absorption coefficient at 350nm (a_{350}) (m^{-1}) which is indicative of CDOM content (Fichot and Benner 2012).

Another three indexes were derived from the EEMs: a) humification index (Ohno 2002), which ranges from 0 to 1, with higher values indicating a higher degree of humification, b) fluorescence index (McKnight, et al. 2001), for which values ~ 1.3 suggest a dominant terrestrial, higher-plant DOM source and values ~ 1.8 suggest a predominant microbial DOM source (McKnight, et al. 2001), and c) freshness index (Parlanti, et al. 2000), for which values >1 correspond to freshly released DOM, whereas values ~ 0.6 – 0.7 correspond to lower DOM *in situ* production and higher input of terrestrial origin (Wilson and Xenopoulos 2009).

A data set of 118 EEMs including *in situ* and bioassays samples was compiled and characterized by parallel factor analysis (PARAFAC) employing the drEEMtoolbox (Murphy, et al. 2013) for MATLAB (R2014b version, MathWorks, Central and South America). Three independent components (hereafter referred to as fluorophores C1 to C3) were validated by split-half validation, random-initialization analysis and by a thorough examination of the model's residuals as described in Murphy et al (2013). We further identified each PARAFAC component by comparison to published and reported components using the OpenFluor database .

Abundance of main clades of aquatic bacteria.

3 ml of PFA-fixed sample were filtered onto white 0.2 μm pore size polycarbonate filters. The filters were rinsed with 1x phosphate buffered saline (PBS) and with MQ water and stored at $-20\ ^\circ C$ until further processing. CARD-FISH was performed as described previously (Pernthaler, et al. 2002) with the following probes: ALF968 (Neef 1997), BET42a (Manz, et al. 1992), GAM42a and CF319a (Manz, et al. 1996). After hybridization, samples were counterstained with DAPI ($1\ \mu g\ mL^{-1}$). The relative abundance of each targeted group was determined by epi-fluorescence microscopy, counting at least 1000 DAPI-stained objects per evaluation.

Biodegradation assays

Biodegradation assays were conducted to evaluate the quality of the DOM consumed/produced by bacterial metabolism, at each sampling time and site. Incubations consisted in 250 ml of water sample pre-filtered through 0.2 microns to which 2.5 ml of the water sample pre-filtered through 0.8 microns were added as grazer-free bacterial inoculum. Incubations were conducted in triplicates for 28 days, at room temperature and in the dark, to avoid photochemical processing of the DOM. A spectral characterization (absorbance and fluorescence) of the DOM in the incubations was performed at the beginning and at the end of the biodegradation assays, as detailed above.

Statistical analysis

All analysis were run in R (version 3.1.2; R Development Core Team, 2013).

DOM temporal and spatial differences between samples were analyzed by one way ANOVA, and post hoc Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level. We log-transformed not-normally distributed variables (visually checked with q-q plots and histograms and Shapiro Wilk test). When data failed in normality or equal variance, even after simple transformations Kruskal-Wallis (KW) tests were performed.

Spearman correlations (r) were used to explore i) relationships among environmental variables and variables used to characterized DOM (e.g. absorbance index, fluorescence components and DOC concentration) ii) relationships among bacterial groups and DOM composition and concentration.

Multiple linear regression analysis (MLR) was performed for each bacterial group to find the best functional model relating bacterial abundance to environmental variables (*in situ* and nutrients) and DOM concentration and composition variables (i.e. DOC, DON, spectroscopic Indexes and PARAFAC components). Before MLR, Principal Component Analysis (PCA) with all variables was performed in order to select and reduce the number of explanatory variables (not show). We assessed the importance of each explanatory variable using the backward elimination procedure, to get the most parsimonious explanation of the data (Legendre and Legendre 2012). As selection criteria, at each step the variable that contributed the least was excluded (highest p contribution) until all explanatory variables had a significant p ($p < 0.05$). We used the Akaike Information Criteria (AIC) to select the best models (Borcard, et al. 2011), checked residuals (Normality and variance homogeneity) and outliers to maximize the coefficient of determination (R^2), and performed ANOVA between models in order to confirm that no

information was lost with variables exclusion.

For analyzing the biodegradation assays a PCA using the variation (tf-t0) between spectroscopic indices and PARAFAC components of BDOC experiments was run to identify different patterns of DOM transformation by the bacterial community. We used standardized variables for the PCA, and the weight of a variable on a PCA component was considered significant when its loading was ≥ 0.65 . ANOVAs or KW tests were performed to investigate whether the different patterns identified in the PCA occurred under significantly different environmental conditions.

Results

The sampling period covered an ample range of environmental conditions of this dynamic system (Table 1). In particular, salinity values registered spanned from oligohaline to polyhaline (3.2 to 23.2), and temperature reflected the expected seasonal differences (9.9 - 22.8 °C). Inorganic nutrients also showed high variability as evidenced by the similarity between their respective average and standard deviation values (Table 1).

DOM concentration and quality

DOC concentration was highly variable (583 - 4230 μM) (Fig. 1), and no significant changes were found among sampling sites or dates. A weak but significant positive correlation was found between DOC and salinity ($r = 0.48$, $p < 0.01$).

Spectral slopes $S_{275-295}$ (Fig. 2A) and $S_{350-340}$ (Fig. 2B) exhibited significant temporal differences (ANOVA, $F = 32.66/24.53$ $p < 0.0001$, respectively), due to the lower values found for both spectral slopes from December on. $S_{275-295}$ and $S_{350-400}$ was significantly higher when the sandbar was closed (ANOVA, $F = 36.93/47.62$, $p < 0.0001$). A strong negative correlation with temperature was found for both indicators ($r = -0.81$, $r = -0.68$, $p < 0.0001$, respectively). In addition, $S_{350-340}$ displayed a negative correlation with DOC ($r = -0.53$, $p < 0.05$) suggesting an increase of HMW DOM with increasing carbon concentration. No significant correlations were found between spectral slopes and salinity. The Spectral ratio S_R did not exhibit any significant variation between samplings (data not shown).

SUVA index varied between 0.19 and 3.08 $\text{L mg}^{-1} \text{m}^{-1}$ (Fig. 2C); this range corresponds to aromatic carbon content of 7.3 - 24.4%, according to the linear model developed by (Weishaar, et al. 2003). No spatial or temporal differences were found for this index. A

significant negative correlation with salinity was found ($r = -0.47, p < 0.05$) indicating a higher aromatic content of the DOM with decreasing salinity.

The absorbance coefficient a_{350} varied between 5.57 and 13.28 m^{-1} , and closely followed the dynamic of the SUVA index (Fig. 2D), without significant changes between samplings sites but temporal significant variation (ANOVA, $F = 2.557, p < 0.05$) due to higher values in January 2014. A positive significant correlation was observed with T ($r = 0.50, p < 0.05$).

Fluorescence index showed little variation (1.65 - 1.77) (Fig. 3A), with values in the range expected for DOM of mixed terrestrial and microbial origin, and corresponding to an aromatic content between 12 - 17% (McKnight et al 2001). Despite no significant differences were found among samplings, in the North and South sites this index tended to exhibit opposite trends in its variations (Fig. 3A).

Humification index generally exhibited relatively high values (around 0.9) (Fig. 3B), with exceptions from December 2013 on, when it dropped, especially in the North and Centre sampling sites (KW, $p < 0.05$), and was negatively related to temperature and salinity ($r = -0.63, p < 0.005$ and $r = -0.43, p < 0.05$, respectively). Conversely, the Freshness index followed an opposite pattern (Fig. 3C) being generally low (around 0.6), with exceptions in December 2013, where values above 1 were found, particularly in the North and Centre sites (KW, $p < 0.05$). Moreover, this index was positively correlated to temperature ($r = 0.43, p < 0.05$) and salinity ($r = 0.66, p < 0.005$), indicating the predominance of freshly produced DOM under higher temperatures and salinity values.

Identification of the main components of the FDOM

PARAFAC modelling allowed the identification and validation of 3 fluorescent components (C1, C2 and C3, Table 2, suppl. Fig. 2).

Matching of the components with the Openfluor database (Murphy, et al. 2014) showed that C1 has been described as humic of terrestrial origin (C1 (Stedmon, et al. 2011), C1 y C4 (Graeber, et al. 2012), enriched with fulvic acids (C1, C3 (Yamashita, et al. 2010), C1. This component is a mixture between peaks A and C according to Coble classification (Coble 1996) (Coble 2007) (Yamashita, et al. 2011). Peak A corresponds to terrestrial fulvic components (Coble 2007), and peak C is associated with humic properties, and often linked to anthropogenic activities (*ie.* agriculture) (Coble 1996) (Coble 2007),

(Jorgensen, et al. 2011) and positively related to percentage of wetland in the catchment (Graeber, et al. 2012).

C1 was positively correlated with SUVA ($r = 0.52$ $p < 0.05$) and Humification index ($r = 0.72$, $p < 0.001$) and negatively correlated with salinity ($r = -0.56$, $p < 0.01$) and Freshness index ($r = -0.61$, $p < 0.01$) supporting the assignment as of terrestrial origin.

C2 is a widespread component in aquatic environments (C2 (Kowalczyk, et al. 2013) y C1 (Shutova, et al. 2014), C3 (Walker, et al. 2013), C3 (Murphy, et al. 2006), C3 (Stedmon, et al. 2003), (Stedmon, et al. 2007), C1 (Murphy, et al. 2011) and has been reported as terrestrial humic composed of high molecular weight and aromatic organic compounds (McKnight et al., 2001; Stedmon et al., 2003), but more recently also as product of microbial mineralization of algal exudates (Romera-Castillo, et al. 2011).

Here, C2 was negatively correlated with salinity ($r = -0.63$, $p < 0.01$) and positively correlated with HIX ($r = 0.53$, $p < 0.05$), and very strongly associated to C1 ($r = 0.79$, $p < 0.0001$).

C3· has been identified as protein-like, with tryptophan-derived fluorescence, derived from plankton, thus associated to autochthonous production (C4 Stedmon et al 2007, C1 Stedmon et al 2011b, C4 (Osburn, et al. 2012)), and to peak T in Coble classification (Coble 1996).

C3 exhibited positive correlations with salinity ($r = 0.53$, $p < 0.05$), temperature ($r = 0.55$, $p < 0.05$) and DOC ($r = 0.43$, $p < 0.05$), and accordingly to its putative protein-like nature was very strongly correlated with freshness index ($r = 0.89$, $p < 0.0001$) and negatively with humification ($r = -0.87$, $p < 0.0001$). Besides, it was higher when the sandbar was open (KW, $p > 0.05$).

The divergent patterns of correlations observed for the 3 components were further reflected in their differential contribution to the FDOM along samplings (Fig. 4). In the majority of the samples, C1 dominated the FDOM composition representing around 65% of the FDOM, followed by C2, with only a marginal contribution of C3 (ca. 6%) (Fig.4). However, a marked transition was observed from December 2013 on, where the contribution of C3 notably augmented, to account for as much as 87% of the FDOM at the South site in January 2014.

Dynamics of the main bacterial groups

Alphaproteobacteria was the dominant group, followed by *Betaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* and finally *Gammaproteobacteria* (Fig. 5). None of the groups exhibited significant variations in abundance between sampling sites.

Alphaproteobacteria neither displayed significant temporal differences in abundance (Fig 5A). In contrast, *Betaproteobacteria* (Fig. 5B), *Gammaproteobacteria* (Fig. 5C) and *Cytophaga-Flavobacteria* (Fig. 5D) exhibited significant temporal variations ($F = 3.4$ $p < 0.05$, $F = 3.8$ $p < 0.01$, $F = 4.8$ $p < 0.01$, respectively). In all cases the maximal abundance of each group was found in summer samplings (Fig. 5). In addition, *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria* abundances were higher when the sandbar was open ($F = 4.4$ $p < 0.05$, $F = 5.0$ $p < 0.05$).

The Multiple linear regression (MLR) modelling indicated that the factors best explaining the abundance of *Alphaproteobacteria* in this dataset would be (in order of importance) Temperature, a_{350} , C1 ($p < 0.001$), NH_4 , TN, C2 ($p < 0.005$), DOC and S_R ($p < 0.05$). These factors account for 94% of the variability in *Alphaproteobacteria* abundance, according to the following equation:

$$\text{eq. 1. } \textit{Alphaproteobacteria} \text{ (cells mL}^{-1}\text{)} = -1.1 \times 10^7 + 2.1 \times 10^5 \cdot T - 3.5 \times 10^3 \cdot NH_4 - 9.3 \times 10^2 \cdot TN - 2.6 \times 10^5 \cdot a_{350} + 3.6 \times 10^6 \cdot S_R + 6.8 \times 10^6 \cdot C1 - 1.0 \times 10^7 \cdot C2 - 3.3 \times 10^2 \cdot DOC$$

The MLR model selected for *Betaproteobacteria* explained 75% of their variability. The key factors for this group were PO_4 , NO_3 , C3, Freshness index ($p < 0.0005$) and Humification index ($p < 0.005$), according to the following equation:

$$\text{eq. 2. } \textit{Betaproteobacteria} \text{ (cells mL}^{-1}\text{)} = 7.8 \times 10^6 - 4.7 \times 10^3 \cdot NO_3 + 1.1 \times 10^4 \cdot PO_4 + 7.1 \times 10^5 \cdot C3 - 4.4 \times 10^6 \cdot \text{Humification Index} - 3.2 \times 10^6 \cdot \text{Freshness Index}$$

The MLR model chosen for *Gammaproteobacteria* accounted for 73% of the variability in their abundance, being Temperature ($p < 0.0005$), DOC ($p < 0.005$) and Freshness Index ($p < 0.05$) the key factors arranged in the following equation:

$$\text{eq. 3. } \textit{Gammaproteobacteria} \text{ (cells mL}^{-1}\text{)} = -7.9 \times 10^5 + 3.6 \times 10^4 \cdot T + 1.1 \times 10^2 \cdot DOC - 8.1 \times 10^4 \cdot \text{Freshness Index}$$

The best MLR model for *Cytophaga-Flavobacteria* explained 67% of the observed variability, including as relevant factors T, NO_2 , C1 and C2 ($p < 0.05$).

$$\text{eq. 4. } \textit{Cytophaga-Flavobacteria} \text{ (cells mL}^{-1}\text{)} = -1.9 \times 10^5 + 3.4 \times 10^4 \cdot T - 2.8 \times 10^4 \cdot \text{NO}_2 + 1.1 \times 10^6 \cdot \text{C1} - 2.0 \times 10^6 \cdot \text{C2}$$

In addition, to further delineate the groups preferences/dislikes in terms of DOM properties, direct Spearman correlation analyses were conducted between each bacterial group and DOM properties which were not included in the models. The results of all significant correlations (RLM + Spearman) are presented in Table 3.

Cytophaga-Flavobacteria and *Betaproteobacteria* were the groups which correlated with more DOM properties: *Cytophaga-Flavobacteria* was positively correlated with DOC and C1 and negatively with C2, $S_{275-295}$, SUVA index and humification index (Table 3).

Betaproteobacteria were positively correlated with C1, C3 and $S_{275-295}$, whereas a negative correlation was evidenced with fluorescence index, freshness index and humification index (Table 3).

Alphaproteobacteria correlated positively with C1 and S_R , and negatively with DOC, C2 and a_{350} (Table 3).

Finally, *Gammaproteobacteria* was the group relating to less DOM properties, showing positive correlation with DOC, and negative correlation with $S_{275-295}$ and freshness index (Table 3).

Biodegradation assays

The microbial transformation of the DOM involved changes in the FDOM composition, consuming or producing the 3 fluorophores identified (Fig. 6). C1 was produced in 2/3 of the incubations, and consumed in the rest, experiencing variations compared to the original content between -42 % (while consumed) and 33% (while produced). Analogously, C2 was also produced in the same incubations, and consumed in the rest; its variations compared to the original content were between -50% (consumption) and 100% (production). In contrast, C3 was mostly consumed (also in 2/3 of the incubations) and produced in the rest; varying between -87% and 119% of the original content (Fig. 6).

Molecular weight, aromaticity, colour and degree of humification were also affected, and the direction of the change varied between assays (Fig. 7).

The first 2 axis of the PCA explained most of the variance in the changes in DOM quality after microbial degradation (PC1: 43.15%, PC2: 24.33%). The first axis was positively related to S_R , Fluorescence Index, Humification index, and C1, and negatively to C3, whereas the second axis was positively related to a_{254} and a_{350} .

Along these 2 dimensions, four distinctive patterns of microbial degradation could be identified according to their impacts on DOM quality (Fig. 7):

Pattern 1 including incubations April 2013 C and April 2014 N, C and S was characterized by lowering in MW, increased humification degree, increased aromatic content, consumption of C3 and production of C1.

Pattern 2, including incubations December 2013 N, C, and S was characterized by lowering in MW, increased humification degree, decreased aromatic content, decreased colour, and production of C1.

Pattern 3, including incubations April 2013 S, May 2013 N and C was characterized by lowering in MW, decreased humification degree, increased aromatic content, increased colour, and consumption of C1 and C3.

Pattern 4, including incubations January 2014 N, C and S was characterized by increase in MW, increased humification degree, decreased aromatic content, decreased colour, and consumption of C1 and C3, although one of the incubations exhibited marked production of C3.

The different patterns occurred under significantly different environmental conditions (Suppl. Fig. 3). Thus, pattern 1 was associated to relatively high temperature, an ample range of conductivity, lower pH, low total nitrogen, and moderate nitrate concentrations. In terms of DOM, this pattern was linked to relatively high DOC concentrations, low SUVA index, low $S_{275-295}$ values, low Fluorescence and Freshness indexes, and ample range of C2. In addition, it happened under relatively high abundance of *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria* (Suppl. Fig. 3).

Pattern 2 happened under relatively high temperature and conductivity, moderate pH and total Nitrogen, and low nitrate concentrations. Further, it was linked to relatively low DOC concentrations, ample range of SUVA index, comparably low $S_{275-295}$ values, low Fluorescence index, ample range of Freshness index, and low C2. It happened under relatively high abundance of *Cytophaga-Flavobacteria* (Suppl. Fig. 3).

Pattern 3 was linked to low temperature and conductivity, ample range of pH and total Nitrogen, and high nitrate concentrations. In relation to DOM properties, it was associated to relatively low DOC concentrations, moderate SUVA index, higher $S_{275-295}$ values, high Fluorescence index, low Freshness index, and moderate C2. In addition, it happened under relatively low abundance of *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria* (Suppl. Fig. 3).

Pattern 4 occurred associated to high temperature and low conductivity, and pH, high total Nitrogen, and low nitrate concentrations. In terms of DOM, this pattern was linked to relatively low DOC concentrations, relatively high SUVA index, low $S_{275-295}$ values, moderate Fluorescence and Freshness indexes, and high C2. In addition, it happened under relatively high abundance of *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria* (Suppl. Fig. 3).

Discussion

DOM dynamics

DOC concentrations in Laguna de Rocha were in the range of what have been reported for subtropical wetlands (Yamashita et al 2010b) and tropical Atlantic coastal lagoons (Farjalla, et al. 2006 ; Farjalla, et al. 2001), which are typically higher than those found in temperate estuarine systems (Lonborg and Sondergaard 2009) (Yamashita, et al. 2011) (Hernes and Benner 2003)), reflecting their higher productivity. Nevertheless, the carbon concentrations measured during this study were higher than those previously found for the system (Conde, et al. 2000), (Conde, et al. 2002), evidencing as well an increased C: N: P molar ratio (931:20:1) in comparison to earlier reports (Alonso, et al. 2013), suggesting that the system has been C-enriched in the last decade. The sources of this enrichment are possibly both allochthonous and autochthonous, as an increase in agriculture around the lagoon has been recently evidenced (Nin 2013), and the current bacterial production measurements (Bertoglio et al unpub.) are also increased in comparison to a decade ago (Piccini, et al. 2006).

The high temporal variability observed in DOC and DON might be a feature of ecosystems responding to overlapping factors, as recently reported for fluvial DOM in the same region (Graeber, et al. 2015), and could be due to the numerous processes controlling DOM in the system (e.g. precipitation, evaporation, sediment re-suspension, connection to the sea (Conde, et al. 2000).

Another distinctive feature of this study system was that that DOM could not be certainly traced based only in simple DOC-salinity relations: Although spectral slopes exhibited values typically reported for estuarine systems (Helms, et al. 2008), (Fichot and Benner 2012), contrary to marine waters $S_{275-295}$ did not relate significantly to salinity. Furthermore, DOC concentrations exhibited a significant positive correlation with salinity, in contrast to what observed for other habitats (Stedmon, et al. 2007), (Fichot and Benner 2011), (Yamashita et al. 2011). These findings are strong indications of a particularly high interplay among different DOM sources in this system (Fichot and Benner 2011), (Yamashita et al. 2013).

A clear pattern was evidenced regarding the quality of DOM in the Lagoon. From March to November 2013 the DOM was characterized by a relatively low molecular weight (Fig. 2A and 2B), high degree of humification (Fig. 3B) being relatively old (Fig. 3C) and mainly dominated by terrestrial-humic/fulvic components (Fig. 4) with an estimated aromatic content between 7.3 and 24.4% (Weishaar et al. 2003). All these indicators experienced notorious changes in the second phase of the study (November 2013-April 2014) evidencing a transition towards predominance of freshly produced (Fig. 3C) HMW compounds (Fig. 2A and B), with much lower degree of humification (Fig. 3B), possibly explained by a notorious augment of protein-like components of microbial origin (Fig. 4), with an estimated aromatic content between <7.3 and 17.2% (Weishaar et al. 2003).

At a first glance this transition appears to happen between terrestrially-derived towards microbially-derived DOM. However, a note of caution regarding the origin of the different fluorophores is provided by the BDOC assays, as C1 and C2 were both produced during bacterial processing of DOM, indicating that they can also result from microbial metabolism, as previously reported for C2 (Romera-Castillo et al., 2011), (Kowalczyk et al., 2013).

This can help reconciling the classification as “terrestrial” obtained from the identification of the PARAFAC components and also suggested by SUVA and Humification indexes, and the relatively high Fluorescence index of the DOM observed along the study, indicative of mixed origin between terrestrial and microbial sources. The microbial production observed for C1 and C2 suggests that even if these compounds have an ultimate terrestrial origin, they can be nevertheless the product of microbial metabolism.

The tributary streams sampled showed a dominance of C1 (55-64 %) and C2 (32-44%). Despite the lagoon was also mostly dominated by C1 and C2, the values observed for the

FDOM components were different from those predicted from the mere mixing of freshwater tributaries and ocean water, indicating that the quality of the DOM in the lagoon results from extensive *in situ* processing. Although is out of the scope of this study to evaluate the balance between different processes (e.g. photochemical vs microbial), we can nevertheless conclude that microbial processes consume and produce all FDOM components identified in this study and that a substantial share of the FDOM in the system appears to be of microbial origin.

Strong links between main bacterial groups and DOM properties

A distinctive feature of this work is that it was possible to significantly relate DOM concentration and composition to bacterial community composition (BCC) in a natural environment.

Despite extensive work has been done concerning bacteria-DOM interactions at very different scales, DOM properties have been seldom taken into account when attempting to explain the distribution patterns of particular bacterial groups in natural aquatic systems (Teeling, et al. 2012), while the focus has been mainly put in salinity as obvious main structuring factor (Glöckner, et al. 1999), (Barberán and Casamayor 2010).

Here, presumably due to working in a range within meso-haline condition (Table 1) we could remove the salinity effect, and thus we were able to found that the abundance of all major groups of aquatic bacteria (*Alpha*, *Beta* and *Gamma-proteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria*) in this system was significantly controlled by at least two parameters related to DOM concentration or composition (eq. 1 to 4).

Alphaproteobacteria appeared as the group whose abundance was almost exclusively controlled by resources in the system, in agreement with previous studies (Salcher, et al. 2007), including this system (Alonso, et al. 2013), with DOM concentration and properties among the most important ones (eq. 1). While *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria*, appeared with higher degrees of unexplained variation, presumably due to a stronger top-down control typically experimented by members of these groups here (Alonso, et al. 2013) and elsewhere (Simek, et al. 2001), (Beardsley, et al. 2003).

Interestingly, the combination and significance of the factors controlling the abundance in this system was specific for each of the targeted bacterial groups, indicating that they do behave as coherent units, at least to some extent.

A closer look into the significant relationships between DOM properties and the main bacterial groups made possible to delineate a profile of each group regarding DOM preferences/dislikes, which strongly agree with evidence derived from very different approaches, from genome analysis to single-cell substrate uptake. Thus, based on the MLR and Spearman correlations *Alphaproteobacteria* in this system would prefer low DOC concentrations and terrestrial humic DOM enriched in fulvic acids and characterized by low MW, and low lignin content. This profile agrees with preferences by low substrate concentrations (Alonso and Pernthaler 2006a) and low molecular weight components reported for the main alphaproteobacterial groups in estuarine (Cottrell and Kirchman 2000), marine (Alonso-Saez and Gasol 2007) and freshwater (Salcher, et al. 2011) environments. These results thus concur with the oligotrophic life-style postulated for the most abundant members of this bacterial class and delineated from cultivation (Rappe, et al. 2002) to genomic approaches (Lauro, et al. 2009).

In contrast, *Gammaproteobacteria* appeared as the only group with high DOC concentrations as the main DOM-related factor controlling their abundance in the system. Also, they would prefer compounds of terrestrial origin but characterized by HMW. These results are in agreement with the copiotrophic style proposed for many members of this class (Lauro, et al. 2009), characterized by occasionally achieving high densities in different aquatic systems (Piccini, et al. 2006), (Alonso-Sáez, et al. 2007), (Alonso, et al. 2010), generalists from the point of view of DOM utilization (Mou, et al. 2008), (Poretsky, et al. 2010), being particularly stimulated in incubations amended with lignin-derived (Mou, et al. 2008), plant-derived material (Alonso, et al. 2013), or HMW semi-labile compounds (McCarren, et al. 2010). Also, their negative correlation with the BIX index supports the hypothesis that this group might subsist on recycled and/or allochthonous DOM (Salcher 2014).

Although not directly controlled by DOC concentrations, *Cytophaga-Flavobacteria* members also resulted positively correlated with DOC, and with preference by terrestrial humic DOM enriched in fulvic acids, with HMW, low aromatic content and low degree of humification. Preference by HMW compounds is a hallmark of this group, evidenced by polymer degradation by isolates (Reichenbach 1992), association with organic particles in natural environments (Crump, et al. 1999), *in situ* uptake of polymers (Cottrell and Kirchman 2000), and gene content (Bauer, et al. 2006), (Teeling, et al. 2012). The high number of DOM variables to which this group related (but with comparatively low

significance of each of them), together with the lowest percentage of explanation provided by the RLM model for their abundance, suggests that this group might be somehow less coherent in terms of DOM processing. This might be due to that apparently *Flavobacteria* are typically composed by several more or less equally abundant populations, which might differ in their eco-physiology and controlling factors (Gomez-Pereira, et al. 2010) (Díez-Vives, et al. 2013).

In this sense, also *Betaproteobacteria* displayed a pattern which could derive from the presence of equally abundant populations with different physiologies: this group appeared associated to protein-like DOM and low humification, but also to terrestrial and relatively old DOM. Abundant members of this cluster (*Polynucleobacter* sp.) have shown preferences for allochthonous humic-like DOM (Burkert, et al. 2003), and its photo-oxidation derivatives (Buck, et al. 2009), while others (*Limnohabitans* sp.) appear as specialists for autochthonous LMW fresh-DOM, exhibiting copiotrophic lifestyles (Hornak, et al. 2006), (Pérez and Sommaruga 2006). Both groups often exhibit equivalent abundances in natural environments, particularly in coastal lagoons (Alonso, et al. 2009), so the observed pattern could arise from the particularities of these populations.

Implications for modelling microbial DOM processing

Several significant correlations were observed regarding the occurrence of a given pattern and the environmental properties of the system, including the abundance of the target bacterial groups. From the environmental variables, temperature, pH, and nitrate concentration were the most significant factors differing between patterns, while concerning DOM characteristics, DOC concentration, aromaticity, molecular weight, fluorescence and freshness indexes were the key factors making the difference between patterns. Finally, *Gammaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacteria* were the groups whose abundances could be significantly linked to different biodegradation patterns.

These results provide useful indications of key parameters modulating microbial transformation of DOM. More effort needs to be done in order to conclude about the robustness and generality of these patterns in different types of aquatic systems.

Most frequently, microbial transformation of DOM resulted in the lowering of DOM MW, increased humification degree, increased aromatic content, and production of FDOM components C1 and C2, indicating that the microbial processing led to a more recalcitrant DOM. This evidence, together with the dominance of C1 and C2 *in situ*, and the high FI indicative of the important microbial contribution to the DOM in this system, suggest that the bacterial metabolism at this coastal environment is often transforming inputs of fresh-

available DOM into more refractory compounds presumably resulting in carbon sequestering via the microbial carbon pump (Jiao, et al. 2010a).

Usually coastal systems act as sources of carbon to the adjacent seas and ultimately the atmosphere (Jiao et al 2010b), however it has been theoretically postulated that comparably low nutrients (N, P) may direct such systems into a sink behaviour (Jiao et al 2010b), our results provide direct field evidence to support this hypothesis..

In reference to the adequacy of the level of resolution utilized to analyze the links between bacterial community and DOM, on one hand, recent evidence has been provided indicating that the molecular families identified by application of FTICR-MS are significantly linked to DOM optical properties (Stubbins, et al. 2014), thus supporting their use as adequate DOM descriptors.

On the bacterial side, our results provide strong support to the delineation of functional groups rather concordant with the phylogenetic definition provided by our tool of analysis, roughly corresponding to classes.

In comparison to the published literature, this would agree with the evidence derived from studies on bacterial-DOM interaction, mainly looking at direct substrate uptake by individual cells that have shown coherent patterns of DOM utilization at this level of resolution (Cottrell and Kirchman 2000) (Alonso-Sáez, et al. 2012), (Alonso, et al. 2012). In contrast, recent studies analyzing biodegradation experiments with increased resolution for BCC (high-throughput sequencing) have failed in finding correlation patterns between BCC and utilization of different DOM components (Mou, et al. 2008), or bioavailable DOC concentration (Dinasquet, et al. 2013), or even with DOM components identified in a detailed characterization (FT-ICR-MS) (Herlemann, et al. 2014). These results contradicted our expectations, as higher resolution in one or both characterizations did not put in evidence meaningful patterns, further stirring the issue of which is the adequate level of resolution for describing these relationships. Here, using an intermediate level of resolution for both, bacterial community composition and DOM composition, we could find strong significant correlations. Our conclusion is that, without neglecting the enormous diversity within each clade, they could still act as functional groups in a context of biogeochemical modelling of the transformations of meaningful DOM components.

Acknowledgments

The authors would like to thank the rangers Héctor Calimaris and Andrés Sosa for their help during samplings. Carolina Lescano, Martina Díaz and Lorena Rodríguez are acknowledged for performing the nutrients analysis. Ronald Benner provided special support and guidance for DOC analysis and usage of spectral properties for describing DOM. This work was funded by ANII and CSIC.

Figure Legends

Fig. 1. Dissolved carbon concentration measured at the different sampling sites and times.

Fig. 2 Absorbance descriptors calculated for the *in situ* samples. A) $S_{275-295}$, B) $S_{350-400}$, C) $SUVA_{254}$, and D) a_{350}

Fig. 3. Fluorescence indexes calculated for the *in situ* samples. A) Fluorescence Index (FI), B) Humification index (HIX), and C) Freshness index (BIX).

Fig 4. Contribution to FDOM at the different sampling times. Data are presented as percentage of total FDOM at each sampling date and site.

Fig. 5. *In situ* abundance of main bacterial groups. A) *Alphaproteobacteria*, B) *Betaproteobacteria*, C) *Gammaproteobacteria*, and D) *Cytophaga-Flavobacteria*.

Fig. 6. Changes in the FDOM composition after microbial processing assays. Data are expressed as proportion of change between final and original values, as percentage of the original values.

Fig. 7. Principal component analysis (PCA) of the changes in several spectroscopic indexes and fluorophores after the biodegradation assays. Panel A shows the loadings of the DOM composition indexes and panel B the scores of the individual assays performed at different sampling (n=16). Each assay is identified by a code composed by the first letter of the month, followed by 2 numbers indicating the year and the initial letter of the name of the sampling site. (e.g. A13C corresponds to the assay performed for the sample taken in April 2013, at the Centre site).

Suppl. Fig. 1. Study site and sampling locations.

Suppl. Fig 2 Panel A. Excitation emission spectra (EEMs) for PARAFAC components C1, C2 and C3. Colour indicates fluorescence intensity. Panel B shows the results of split-half validation.

Suppl. Fig.3 Environmental characteristics significantly associated to the different patterns of microbial transformation. The symbols next to the title of each panel graph indicate the significance of the respective factor in differentiating between patterns. Significance. Codes= 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' 0.1

References

1. Alonso-Sáez, Laura, et al. 2007 Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiology Ecology* 60(1):98-112.
2. Alonso-Saez, Laura, and Josep M. Gasol 2007 Seasonal Variations in the Contributions of Different Bacterial Groups to the Uptake of Low-Molecular-Weight Compounds in Northwestern Mediterranean Coastal Waters. *Applied and Environmental Microbiology* 73(11):3528-3535.
3. Alonso-Sáez, Laura, Olga Sánchez, and Josep Maria Gasol 2012 Bacterial uptake of low molecular weight organics in the subtropical Atlantic: Are major phylogenetic groups functionally different. *Limnology and Oceanography* 57(3):798-808.
4. Alonso, C, and J Pernthaler 2006a Concentration-dependent patterns of leucine incorporation in coastal picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2141-2147.
5. Alonso, Cecilia, et al. 2010 Multilevel analysis of the bacterial diversity along the environmental gradient Río de la Plata-South Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 61:57-62.
6. Alonso, Cecilia, et al. 2012 HISH-SIMS analysis of bacterial uptake of algal-derived carbon in the Río de la Plata estuary. *Systematic and Applied Microbiology* 35(8):541-548.
7. Alonso, Cecilia, and Jakob Pernthaler 2006b Roseobacter and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology* 8(11):2022-2030.
8. Alonso, Cecilia, et al. 2013 Environmental dynamics as a structuring factor for microbial carbon utilization in a subtropical coastal lagoon *Frontiers in Microbiology* 4:1-19.
9. Alonso, Cecilia, et al. 2009 Ecophysiological differences of betaproteobacterial populations in two hydrochemically distinct compartments of a subtropical lagoon. *Environmental Microbiology* 11(4):867-876.
10. Barberán, Albert , and Emilio O. Casamayor 2010 Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology* 59:1-10.
11. Bauer, M, et al. 2006 Whole genome analysis of the marine Bacteroidetes "Gramella forsetii" reveals adaptations to degradation of polymeric organic matter. *Environmental Microbiology* 8:2201-2213.
12. Beardsley, C., et al. 2003 Are readily cultured bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality? *Applied and Environmental Microbiology* 69:2624-2630.
13. Borcard, D., F. Gillet, and P Legendre
14. Buck, Ulrike, et al. 2009 Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake. *Environmental Microbiology* 11(1854-1865).
15. Burkert, U., et al. 2003 Members of a readily enriched beta-proteobacterial clade are common in the surface waters of a humic lake. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6550-6559.
16. Coble, Paula G. 1996 Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine chemistry* 51(4):325-346.
17. Coble, Paula G. 2007 Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color. *Chemical reviews* 107(2):402-418.
18. Conde, D., et al. 2002 Marine intrusions in a coastal lagoon enhance the negative effect of solar UV radiation on phytoplankton photosynthetic rates. *Marine Ecology-Progress Series* 240:57-70.
19. Conde, D., L. Aubriot, and R. Sommaruga 2000 Changes in UV penetration associated with marine intrusions and freshwater discharge in a shallow coastal lagoon of the Southern Atlantic Ocean. *Marine Ecology-Progress Series* 207:19-31.
20. Cottrell, M. T., and D. L. Kirchman 2000 Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4):1692-1697.
21. Crump, B. C., E. V. Armbrust, and J. A. Baross 1999 Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 65(7):3192-3204.

22. Díez-Vives, Cristina, Josep M. Gasol, and Silvia G. Acinas2013 Spatial and temporal variability among marine Bacteroidetes populations in the NW Mediterranean Sea. *Systematic and Applied Microbiology* 37(1):68-78.
23. Dinasquet, Julie , et al. 2013 Functional and compositional succession of bacterioplankton in response to a gradient in bioavailable dissolved organic carbon. *Environmental Microbiology* 15(9):2616-2628.
24. Farjalla, V. F., et al. 2006 Bacterial growth and DOC consumption in a tropical coastal lagoon *Brazilian Journal of Biology* 66(2A):383-392.
25. Farjalla, Vinicius F., et al. 2001 Photochemical reactivity of aquatic macrophyte leachates abiotic transformations and bacterial. *Aquat Microb Ecol* 24:187-195.
26. Fichot, Cédric G. , and Ronald Benner2011 A novel method to estimate DOC concentrations from CDOM absorption coefficients in coastal waters. *Geophysical research letters* 38(3).
27. Fichot, Cédric G., and Ronald Benner2012 The spectral slope coefficient of chromophoric dissolved organic matter (S275-295) as a tracer of terrigenous dissolved organic carbon in river- influenced ocean margins *Limnology and Oceanography* 57(5):1453-1466.
28. Glöckner, F. O., B. M. Fuchs, and R. Amann1999 Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 65(8):3721-3726.
29. Gomez-Pereira, P.R, et al. 2010 Distribution patterns and diversity of planktonic Flavobacterial clades in contrasting water masses of the North Atlantic Ocean. *ISME Journal* 4:472-487.
30. Graeber, D., et al. 2015 Interacting effects of climate and agriculture on fluvial DOM in temperate and subtropical catchments. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions* 12(1):135-175.
31. Graeber, Daniel, et al. 2012 Agriculture has changed the amount and composition of dissolved organic matter in Central European headwater streams. *Science of the Total Environment* 438:435-446.
32. Helms, John R., et al. 2008 Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 53(3):955-969.
33. Herlemann, D., et al. 2014 Uncoupling of Bacterial and Terrigenous Dissolved Organic Matter Dynamics in Decomposition Experiments. *PLoS ONE* 9(4).
34. Hernes, Peter J., and Ronald Benner2003 Photochemical and microbial degradation of dissolved lignin phenols: Implications for the fate of terrigenous dissolved organic matter in marine environments. *Journal of Geophysical Research: Oceans* (1978-2012) 108.C9.
35. Hertkorn, Norbert , et al. 2006 Characterization of a major refractory component of marine dissolved organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70:2990-3010.
36. Hornak, K., et al. 2006 Effects of resource availability and bacterivory on leucine incorporation in different groups of freshwater bacterioplankton, assessed using microautoradiography. *Aquatic Microbial Ecology* 45(277-289).
37. Jaffé, R., et al. 2008 Spatial and temporal variations in DOM composition in ecosystems: The importance of long- term monitoring of optical properties. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005-2012) 113(G4).
38. Jiao, N. et al.2010 b Increasing the microbial carbon sink in the sea by reducing chemical fertilization on the land. *Nat. Rev. Microbiol* 9(75).
39. Jiao, Nianzhi, et al. 2010a Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Micro* 8(8):593-599.
40. Jorgensen, L., et al. 2011 Global trends in the fluorescence characteristics and distribution of marine dissolved organic matter. *Marine Chemistry* 126:139-148.
41. Judd, Kristin E. , Byron C. Crump, and George W. Kling2006 Variation in dissolved organic matter controls bacterial production and community composition. *Ecology* 87 (8):2068-2079.
42. Kirchman, D. L., et al. 2004 Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquatic Microbial Ecology* 35(3):243-257.
43. Koroleff, F1976 Determination of ammonia. *In* *Methods of Seawater Analysis*. K. Grasshoff, ed. Pp. 126-133: Verlag Chemie.
44. Kowalczyk, Piotr, et al. 2013 Composition of dissolved organic matter along an Atlantic Meridional Transect from fluorescence spectroscopy and Parallel Factor Analysis. *Marine Chemistry* 157:170-184.
45. Lauro, Federico M., et al. 2009 The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. . *PNAS* 106 (37):15527-15533.
46. Lawaetz, A., and C. Stedmon2009 Fluorescence intensity calibration using the Raman scatter peak of water. *Applied Spectroscopy* 63:936-940.
47. Legendre, P., and L. Legendre2012 *Numerical Ecology*. Amsterdam.: Elsevier Science BV.
48. Lonborg, C., and M. Sondergaard 2009 Microbial availability and degradation of dissolved organic carbon and nitrogen in two coastal areas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 81(4):513-520.
49. Malmstrom, R. R., et al. 2004 Contribution of SAR11 bacteria to dissolved dimethylsulfoniopropionate and amino acid uptake in the North Atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7):4129-4135.

50. Manz, W., et al. 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(Pt 5):1097-1106.
51. Manz, W., et al. 1992 Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: Problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15(4):593-600.
52. McCarren, Jay , et al. 2010 Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *PNAS* 107(38):16420-16427.
53. McKnight, Diane M., et al. 2001 Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography* 46(1):38-48.
54. Mou, Xiaozhen, et al. 2008 Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature* 451(708-711).
55. Müller, R. , and F. Weidemann 1955 Die Bestimmung des Nitrats in Wasser. *In Jahrbuch für Wasserchem. & Wasserreinigungstechn.* Pp. 247-271: Verlag Chemie.
56. Murphy, J, and J. Riley 1962 A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters *Analytica chimica acta* 27:31-36.
57. Murphy, Kathleen R., et al. 2011 Organic matter fluorescence in municipal water recycling schemes: toward a unified PARAFAC model. *Environmental science & technology* 45(7):2909-2916.
58. Murphy, Kathleen R., et al. 2006 Optimized parameters for fluorescence-based verification of ballast water exchange by ships. *Environmental science & technology* 40(7):2357-2362.
59. Murphy, Kathleen R., et al. 2013 Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. *PARAFAC. Analytical Methods* 23(5):6557-6566.
60. Murphy, Kathleen R., et al. 2014 OpenFluor-an online spectral library of auto-fluorescence by organic compounds in the environment. *Anal. Methods* 6(3):658-661.
61. Neef, A., 1997 Anwendung der *in situ*-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Ph.D. thesis, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technical University, Munich, Germany.
62. Nin, Mariana 2013 Mapeo de servicios ecosistémicos en la cuenca de la Laguna de Rocha: cambios temporales y prioridades territoriales para su conservación *Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias*, . 101 pp., Udelar.
63. Ohno, T 2002 Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 36:742-746.
64. Osburn, Christopher L., et al. 2012 Fluorescence tracking of dissolved and particulate organic matter quality in a river-dominated estuary. *Environmental science & technology* 46(16):8628-8636.
65. Ouverney, Cleber C., and Jed A. Fuhrman 1999 Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types *in situ*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(4):1746-1752.
66. Parlanti, E., et al. 2000 Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs,. *Org. Geochem.* 31:1765-1781.
67. Pérez, María Teresa, and Ruben Sommaruga 2006 Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnol Oceanogr.* 51(6):2527-2537.
68. Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann 2002 Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68(6):3094-3101.
69. Piccini, Claudia, et al. 2006 Blooms of Single Bacterial Species in a Coastal Lagoon of the Southwestern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 72(10):6560-6568.
70. Pinhassi, J., et al. 1999 Coupling between bacterioplankton species composition population dynamics, and organic matter degradation. *Aquatic Microbial Ecology* 17(1):13-26.
71. Poretsky, Rachel S., et al. 2010 Transporter genes expressed by coastal bacterioplankton in response to dissolved organic carbon. . *Environmental Microbiology* 12(3):616-627.
72. Rappe, M. S., et al. 2002 Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418(6898):630-633.
73. Reichenbach, H. 1992 The Order Cytophagales. *In The Prokaryotes: A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria.* M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, and H.G. Schlegel, eds. Pp. 3631-3649. Berlin: Springer Verlag.
74. Romera-Castillo, Cristina, et al. 2011 Net production and consumption of fluorescent colored dissolved organic matter by natural bacterial assemblages growing on marine phytoplankton exudates. *Applied and environmental microbiology* 77(21):7490-7498.
75. Salcher, Michaela, et al. 2007 Modulation of microbial predator-prey dynamics by phosphorus availability: Growth patterns and survival strategies of bacterial phylogenetic clades. *FEMS Microbial Ecology* 60:40-50.
76. Salcher, Michaela M , Jakob Pernthaler, and Thomas Posch 2011 Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria 'that rule the waves' (LD12). *ISME J* 5(8):1242-1252.
77. Salcher, Michaela M. 2014 Same same but different: ecological niche partitioning of planktonic freshwater prokaryotes. *Journal of Limnology* 73(s1):74-87.

78. Shutova, Yulia, et al. 2014 Spectroscopic characterisation of dissolved organic matter changes in drinking water treatment: from PARAFAC analysis to online monitoring wavelengths. *Water research* 54:159-169.
79. Simek, K., et al. 2001 Changes in bacterial community composition, dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6):2723-2733.
80. Stedmon, Colin A., Stiig Markager, and Rasmus Bro 2003 Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 82(3):239-254.
81. Stedmon, Colin A., et al. 2011 A potential approach for monitoring drinking water quality from groundwater systems using organic matter fluorescence as an early warning for contamination events. *Water research* 45(18).
82. Stedmon, C. A., D. N. Thomas, et al. (2011b). "Using fluorescence to characterize dissolved organic matter in Antarctic sea ice brines." *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* (2005–2012) 116(G3).
83. Stedmon, Colin A., et al. 2007 Characteristics of dissolved organic matter in Baltic coastal sea ice: allochthonous or autochthonous origins? *Environmental science & technology* 41(21):7273-7279.
84. Strickland, J.D.H. , and T.R. Parsons 1972 A practical handbook of sea-water analysis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 167: 311 pp.
85. Stubbins, A. , et al. 2014 What's in an EEM? Molecular Signatures Associated with Dissolved Organic Fluorescence in Boreal Canada. *Environ. Sci. Technol.* 48:10598–10606.
86. Teeling, Hanno, et al. 2012 Substrate-Controlled Succession of Marine Bacterioplankton Populations Induced by a Phytoplankton Bloom. *Science* 336:608-611.
87. Valderrama, J.C. 1981 The simultaneous analysis of total N and total P in natural waters. *Marine Chemistry* 10:109-122.
88. Vila-Costa, Maria, et al. 2007 An annual cycle of dimethylsulfoniopropionate-sulfur and leucine assimilating bacterioplankton in the coastal NW Mediterranean. *Environmental Microbiology* 9:2451-2463.
89. Walker, Sally A., Rainer MW Amon, and Colin A. Stedmon 2013 Variations in high- latitude riverine fluorescent dissolved organic matter: A comparison of large Arctic rivers. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 118(4):1689-1702.
90. Weishaar, James L., et al. 2003 Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon *Environmental Science & Technology* 37(20):4702-4708.
91. Wilson, H. , and M. Xenopoulos 2009 Effects of agricultural land use on the composition of fluvial dissolved organic matter. *Nat. Geosci.* 2, :37-41.
92. Yamashita, Y., et al. 2010 Dissolved organic matter characteristics across a subtropical wetland's landscape: application of optical properties in the assessment of environmental dynamics. *Ecosystems* 13(7):1006-1019.
93. Yamashita, Youhei, et al. 2011 Assessing the spatial and temporal variability of dissolved organic matter in Liverpool Bay using excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis. *Ocean Dynamics* 61(5):569-579.
94. Yamashita, Y., J. N. Boyer, et al. (2013). "Evaluating the distribution of terrestrial dissolved organic matter in a complex coastal ecosystem using fluorescence spectroscopy." *Continental Shelf Research* 66: 136-144.