

*Relaciones diversidad  
función de la comunidad bacteriana  
en el Río de la Plata*

---

*Florencia Bertoglio Baqué*

**Orientador: Dra. Cecilia Alonso**  
**(Centro Universitario Regional Este)**  
**Rocha, Agosto 2016**

Maestría en Biología del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas  
(PEDECIBA)

Opción Ecología y Evolución

Universidad de la República

**Relaciones diversidad función de la comunidad bacteriana en el  
Río de la Plata**

Autor: Florencia Bertoglio Baqué (fbertoglio@cure.edu.uy)

Directora de tesis: Dra. Cecilia Alonso (calonso@cure.edu.uy)

Co-Directora: Dra. Gissell Lacerot (glacerot@cure.edu.uy)

Tribunal

Dra. Claudia Piccini

Dr. Danilo Calliari

Dr. Fernando Unrein

## **Agradecimientos**

A mi orientadora de tesis Cecilia Alonso por transmitirme sus enseñanzas con dedicación, ganas, paciencia y positivismo.

A Gissell Lacerot por su interés y disposición durante la elaboración de la tesis.

Al tribunal de tesis por sus aportes en la corrección de la tesis, especialmente a Fernando Unrein por haber venido a la defensa desde Argentina y por su dedicación ante mis dudas la semana previa a la defensa.

A Carla Kruk y a los integrantes del Proyecto “Algas”, por darme un lugar en los muestreos gracias al cual pude obtener las muestras del Río de la Plata. También a Claudia Piccini por permitirme procesar las muestras en el laboratorio de Microbiología del IIBCE (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable).

A los rescatistas de la Asociación Honoraria de Salvamentos Marítimos y Fluviales (ADES), que posibilitaron embarcarnos en sus lanchas y siempre nos recibieron con ganas.

A Jakob Pernthaler y Jörg Villiger de la Universidad de Zurich en Suiza, por realizar el análisis bioinformático de los datos de secuenciación.

A Gaby por su compañía en el procesamiento de las muestras en el IIBCE y por sus charlas frecuentes de estadística.

A mi familia, a Carlos y a mis amigos por bancarme y apoyarme en todo lo que me propongo. A Germán Trindade por ayudarme con la carátula.

Agradezco a la ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) que me otorgó la beca de posgrado y a CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) por financiarme un proyecto de Iniciación a la Investigación, gracias al cual pude financiar la secuenciación de las muestras.

## Resumen

Dilucidar las relaciones entre la diversidad biológica y las funciones ecosistémicas es un objetivo central en Ecología. En ecología microbiana establecer estas relaciones resulta un desafío, a causa de las dificultades en definir un nivel adecuado de resolución para el análisis de la diversidad y la fisiología bacterianas.

El objetivo general de esta tesis fue establecer la relación entre la diversidad bacteriana y la producción bacteriana (PB), así como entre la diversidad bacteriana y la transferencia de biomasa hacia niveles tróficos superiores (tasa de depredación bacteriana: G), en el estuario Río de la Plata. Se llevaron a cabo cinco muestreos entre Marzo de 2013 y Marzo de 2014, en tres zonas representativas del gradiente ambiental del estuario: Colonia, Montevideo y Punta del Este. La diversidad bacteriana fue estimada a partir del ADN codificante del ARN ribosomal 16s mediante secuenciación masiva, con la técnica Illumina. La producción bacteriana se estimó mediante la incorporación de leucina y la tasa de depredación bacteriana mediante la tasa de desaparición de bacterias marcadas fluorescentemente (FLBs). La secuenciación fue realizada con un software específicamente diseñado, obteniéndose un total de 828 OTUs (unidades taxonómicas operacionales).

Se estimaron índices de diversidad, y los OTUs fueron agrupados en clados, los cuales comprendieron en su mayoría los niveles de clasificación taxonómica género, familia y orden. Mediante análisis de clasificación y ordenación, los clados fueron incluidos en seis grupos con preferencias ambientales similares, denominados grupos ecofisiológicamente coherentes (GEFC). La salinidad y la temperatura fueron las variables que tuvieron más peso en dicha agrupación. Mediante modelos de regresiones múltiples, la diversidad bacteriana fue relacionada con la PB y con G, considerando también el efecto de las variables ambientales.

La PB se relacionó significativamente y positivamente con la riqueza y la equitatividad, mientras que G no mostró relación significativa ni con la riqueza ni con la equitatividad. Los seis GEFC mostraron una relación significativa y positiva con la PB, sin embargo dos de ellos (los grupos 3 y 4) mostraron una relación más estrecha con la PB. Estos dos grupos incluyeron clados con una importante contribución a la producción de biomasa bacteriana en los sistemas acuáticos, por ejemplo: *Roseobacter*, OSC116, *Rhodobacter*, SAR86 y OM1. A pesar de que G no mostró relación con los índices de diversidad, todos los grupos menos el 3

se relacionaron significativamente y negativamente con G. Esto podría estar indicando una depredación selectiva hacia dichos grupos.

La positiva relación encontrada entre la diversidad bacteriana y la función producción bacteriana, aporta evidencia a la teoría de la diversificación del nicho ecológico, la cual sostiene que la coexistencia entre las especies es gracias al uso complementario de los recursos y que dicha diversificación genera una mayor eficiencia en la explotación de los recursos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que esta relación sea resultado del mecanismo denominado “efecto de muestreo”, que explica esas relaciones a causa de una mayor probabilidad de que las especies más productivas estén presentes en las comunidades con mayor riqueza.

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
Relaciones diversidad- funciones ecosistémicas	1
Coherencia ecológica en comunidades bacterianas	4
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	<b>7</b>
<b>PREDICCIONES</b>	<b>7</b>
<b>METODOLOGÍA Y ÁREA DE ESTUDIO</b>	<b>7</b>
Área de estudio: Río de la Plata	7
Muestreo y diseño experimental	8
Figura 1. Mapa del estuario Río de la Plata	8
Tabla 1. Código de las muestras por mes, zona y distancia a la costa	9
Trabajo de laboratorio	10
i) Extracción de ADN	10
ii) Producción bacteriana	10
iii) Tasa de depredación bacteriana	11
Clorofila a y nutrientes	13
Análisis de datos	14
i) Diversidad bacteriana	14
ii) Producción bacteriana	16
iii) Tasa de depredación bacteriana	16
Análisis estadístico	17
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
Variables ambientales	19
Tabla 2. Variables ambientales: temperatura (Temp), salinidad, turbidez, oxígeno disuelto (O <sub>2</sub> D), Clorofila a (Chl <i>a</i> ), nitrógeno total (NT), fósforo total (PT)	20
Figura 3: Salinidad (A), Clorofila a (B), Nitrógeno total (C) y turbidez (D) en función de las zonas	21
Figura 4. Variación del fósforo total (PT) (A) y de la temperatura (B) de acuerdo a los meses.	22
Variaciones en la diversidad bacteriana a lo largo del gradiente ambiental y temporal a nivel de OTUs	22
Figura 5. Representación de los OTUs totales, exclusivas y compartidas para las distintas zonas evaluadas.	23
Figura 6. Clasificación jerárquica de muestras por distancias de Bray Curtis basando en las abundancias de los OTUs	24

Figura 7. Clasificación jerárquica de muestras por distancias de Bray Curtis basado en las abundancias de los OTUs por meses	25
Figura 8. Representación de los OTUs totales, exclusivas y compartidas para costa y aguas abiertas.	26
<b>Riqueza observada y estimada, índices de diversidad</b>	<b>26</b>
Figura 9. Riqueza observada ( $S_{obs}$ ): (A) por zona y distancia a la costa, (B) por mes	27
Figura 10. Riqueza estimada por el índice no paramétrico Chao: (A) por zona y distancia a la costa, (B) por mes.	27
Figura 12. Composición de la comunidad bacteriana para los clados más abundantes, A y B: Colonia, C y D: Montevideo, E y F: Punta del Este	31
<b>Determinación de grupos eco-fisiológicamente coherentes (GEFC)</b>	<b>31</b>
Figura 13. Análisis de redundancia (RDA) para los clados aguas abiertas con abundancias $\geq 0.5\%$	32
Tabla 3. Agrupación de los clados según los <i>scores</i> de los ejes 1 y 2 del RDA.	33
Figura 14. Análisis de redundancia (RDA) para los clados aguas abiertas con abundancias $\geq 0.5\%$ sin LD12 y SAR11.	35
Figura 15. Clasificación jerárquica de muestras aguas abiertas por distancias de Bray Curtis, basado en las proporciones de los clados más abundantes (abundancias $\geq 0.5\%$ por muestra)	36
Tabla 4. Análisis de <i>k-means</i> final, definiendo 6 grupos.	37
Tabla 5. Clasificación en seis GEFC consistente con los tres análisis de agrupación: RDA, análisis de <i>k-means</i> y análisis de <i>cluster</i>	38
Figura 16. Distribución de los seis GEFC (Grupos Ecofisiológicamente Coherentes) por zona	40
<b>Variaciones espaciales y temporales en la producción bacteriana</b>	<b>40</b>
Figura 17. Producción bacteriana para las tres zonas (A) y para los cinco meses (B)	41
Figura 18. Dinámica global de la producción bacteriana en las tres zonas evaluadas	42
<b>Tasa de depredación bacteriana a lo largo del gradiente ambiental y temporal</b>	<b>42</b>
Figura 19. Tasa de depredación bacteriana por día (G) en función de las tres zonas (A) y de los cinco meses (B).	43
<b>Relación entre diversidad bacteriana y producción bacteriana</b>	<b>43</b>
<b>Relación entre diversidad bacteriana y tasa de depredación bacteriana</b>	<b>44</b>
<b>Relación entre los GEFC con la producción bacteriana y la tasa de depredación bacteriana</b>	<b>44</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>VARIABLES AMBIENTALES Y BIOLÓGICAS</b>	<b>45</b>
<b>Diversidad de la comunidad bacteriana: variaciones espaciales y temporales</b>	<b>45</b>
<b>Producción bacteriana</b>	<b>47</b>
<b>Tasa de depredación bacteriana</b>	<b>48</b>
<b>Relaciones diversidad-función</b>	<b>49</b>
<b>Relaciones entre los GEFC, producción bacteriana y tasa de depredación bacteriana</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>

<b>ANEXO 1: INCORPORACIÓN DE LEUCINA PARA DISTINTAS CONCENTRACIONES EN EL RÍO DE LA PLATA</b>	<b>57</b>
<b>Figura A.1. Incorporación de leucina en función de la concentración añadida</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO 2: RELACIÓN ENTRE GEFC Y RIQUEZA</b>	<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>61</b>

## **Introducción y antecedentes**

### Relaciones diversidad- funciones ecosistémicas

Las funciones ecosistémicas (ej. producción primaria y secundaria, respiración, re-mineralización), son procesos llevados a cabo por los organismos y sostienen la integridad de una unidad biológica o ecosistémica (Calow 1987). Por lo tanto, dependen de los rasgos funcionales de los organismos que las llevan a cabo, entendiéndose por rasgo funcional a cualquier característica fisiológica, morfológica o genética que afecta a la adecuación biológica (*fitness*) y al desempeño del organismo (Violle et al., 2007). Los rasgos funcionales dependen de la función de interés y pueden definirse a distintos niveles de organización (Violle et al., 2007). Tradicionalmente, la especie ha sido la unidad de organización biológica más considerada, existiendo evidencia que indica una relación entre la variación en el número de especies y las funciones ecosistémicas, por ejemplo, entre la riqueza de especies vegetales con la producción de biomasa, la captación de nitrógeno por planta y la captación de la luz (Tilman et al., 1997).

Diversos estudios se han centrado en investigar de qué forma la diversidad se relaciona con las funciones, en particular con la producción de biomasa. En este contexto, la diversidad ha sido típicamente analizada como variable de respuesta, controlada por la producción de biomasa (Chapin et al., 2000, Hooper et al., 2005). Los patrones más aceptados, indican un aumento monótonico en la diversidad con la producción o una respuesta unimodal, donde la diversidad es máxima a niveles intermedios de producción (Tilman & Pacala 1993, Huston 1994, Roy et al. 1998). Durante las últimas décadas sin embargo, la relación entre diversidad y producción viene siendo analizada desde otra perspectiva, en el sentido de que se comenzó a ver a la diversidad como factor de control sobre la producción de biomasa, en lugar de exclusivamente responder a cambios en la producción (Cardinale et al., 2009). De esta forma, diversos trabajos han evidenciado un control por parte de las especies sobre dicha función. Por ejemplo, en pastizales se ha demostrado una reducción en la eficiencia del uso de nutrientes del suelo, y una disminución en la biomasa de las plantas, al disminuir la riqueza de especies (Tilman et al., 1996, Hector et al., 1999).

La hipótesis más reciente propuesta para explicar las relaciones entre diversidad y producción, postula la actuación conjunta de efectos directos e indirectos: (1) directamente el suministro de recursos condiciona a la producción de biomasa (2) la riqueza de las especies que compiten localmente por los recursos directamente controla la producción de biomasa (3)

el suministro de recursos indirectamente controla a la producción de biomasa mediante el control que ejerce sobre el *pool* de especies que pueden coexistir (Cardinale et al 2009).

Uno de los mecanismos propuestos para explicar las relaciones entre diversidad y función ecosistémica se basa en la teoría de la diversificación del nicho ecológico, la cual sostiene que la coexistencia entre las especies es gracias al uso complementario de los recursos y que dicha diversificación genera una mayor eficiencia en la explotación de los recursos, resultando por ejemplo en una mayor producción total de la comunidad (Loreau 2000). Existe evidencia empírica de casos en los cuales se logró identificar el mecanismo de diversificación de nicho como responsable de la relación positiva entre diversidad y función (Cardinale et al., 2011). Sin embargo, este mecanismo ha sido también cuestionado por evidencia experimental en dónde no se observaron diferencias entre la biomasa ni en el consumo de los recursos, entre los experimentos con mayor diversidad respecto a aquellos experimentos constituidos por pocas especies pero siendo estas las más productivas (Cardinale et al., 2006). De esta forma, la mayor producción asociada a comunidades más diversas podría deberse al denominado “efecto de muestreo”, a causa de una mayor probabilidad de que las especies más productivas estén presentes en la comunidad con mayor riqueza (Cardinale et al., 2006, Cardinale et al 2009).

En el caso de las comunidades microbianas acuáticas, numerosos trabajos indican que diferentes grupos del bacterioplancton tienen una participación diferencial en procesos biogeoquímicos de interés, ej. ciclo de los elementos, en especial C, N, P y S (González et al., 1999, Hagström et al., 2001, Schmid et al., 2005, Alonso & Pernthaler, 2006a), por lo que la diversidad de una comunidad determinada impacta en diferentes procesos de relevancia ecosistémica. Esto se ha demostrado por ejemplo, en trabajos donde cambios en la composición de la comunidad bacteriana, se relacionaron con variaciones en diferentes funciones relacionadas con el ciclo del carbono (como producción primaria y respiración) (Alonso- Sáez et al., 2007). Del mismo modo, diferentes grupos bacterianos se encuentran abocados a diferentes procesos metabólicos (producción de biomasa, uso de distintas moléculas como recurso) en diversos ambientes (Cottrell & Kirchman, 2000, Salcher et al., 2008, Alonso et al., 2009), y los reajustes metabólicos son muy rápidos, especialmente en sistemas caracterizados por fuertes gradientes (Alonso et al., 2009).

Sin embargo, pocos estudios han abordado directamente la relación entre diversidad de las comunidades bacterianas acuáticas y funciones medidas a nivel comunitario, tales como producción de biomasa bacteriana y tasa de depredación sobre las bacterias.

Si bien se ha observado que los grupos principales del bacterioplancton difieren sustancialmente en su contribución a la producción de biomasa bacteriana en distintos sistemas acuáticos (Cottrell & Kirchman, 2003, Alonso & Pernthaler, 2006b, Alonso- Sáez & Gasol, 2007), los trabajos enfocados en revelar las relaciones entre diversidad y producción de biomasa no son muy comunes y los resultados obtenidos no reflejan un patrón coherente. Mientras en un trabajo llevado a cabo en el Mar del Norte se encontró una relación negativa entre la riqueza y la producción bacteriana específica por célula (Reinthaler et al., 2005), en otro estudio en las plumas del Río Orinoco y Amazonas, los autores detectaron una relación positiva entre la producción bacteriana, la riqueza y la equitatividad (Hewson & Fuhrman, 2006). Sin embargo este último trabajo consideró a la diversidad como respuesta al incremento en la producción bacteriana, consistente con el enfoque histórico de esta relación mencionado previamente.

La depredación bacteriana, efectuada principalmente por los protistas, es una función ecosistémica clave ya que media la transferencia de biomasa bacteriana hacia niveles tróficos superiores, constituyendo una vía de transferencia de biomasa alternativa a la vía “clásica” (Azam et al., 1983). Experimentalmente, se ha demostrado que la depredación induce cambios en la composición de las comunidades bacterianas, debido a que los depredadores son selectivos hacia rasgos exhibidos por sus presas (ej. tamaño) (Pernthaler et al., 2001, Šimek et al., 2002). A su vez, diferentes grupos bacterianos exhiben diferentes estrategias para evitar la depredación, como por ejemplo la formación de filamentos por parte de *Bacteroidetes* (Pernthaler et al., 2004), el desarrollo de flóculos bacterianos por parte de *Pseudomonas* así como una alta movilidad para escapar a los depredadores (Hahn & Höfle, 1999, Matz & Jurgens, 2005), tamaños celulares muy reducidos como en el grupo *Polynucleobacter* (Boenik et al., 2004), y la formación de toxinas por parte de cepas específicas de *Betaproteobacteria* (Matz et al., 2004). De hecho existe literatura que demuestra que la depredación afecta a la riqueza y a la equitatividad de las comunidades bacterianas (Hahn & Höfle 1999, Boenigk et al., 2004). Contrariamente, también se ha visto que si bien la depredación bacteriana afecta a su abundancia y actividad, no incide sobre la composición de su comunidad (Baltar et al., 2016).

Análogamente a lo que ocurre con la función producción, escasean trabajos enfocados a evaluar el efecto de la diversidad bacteriana sobre las tasas de depredación.

### Coherencia ecológica en comunidades bacterianas

Un tema ampliamente discutido en ecología microbiana, es si la distribución de sus comunidades, se ajusta a patrones biogeográficos como los que explican la distribución de las comunidades macroscópicas. Dados ciertos atributos fisiológicos y morfológicos de las bacterias, como su gran capacidad de dispersión, capacidad de colonizar una gran variedad de ambientes y sus altas tasas de evolución, algunos autores sugieren que no poseen biogeografía y que su distribución estaría condicionada únicamente por el filtro ambiental (Fenchel & Finlay, 2004).

En los ecosistemas acuáticos por ejemplo, está bien documentado que existen diferencias en la composición de las comunidades bacterianas a nivel de clase, entre sistemas de agua dulce y marinos, por ejemplo la clase *Betaproteobacteria* es típica de agua dulce, mientras que la clase *Flavobacteria* predomina en sistemas marinos (Glockner et al., 1999, Barberan & Casamayor, 2010). En estuarios, se han visto diferencias en la dominancia de ciertas clases según la zona del estuario, por ejemplo las *Alfaproteobacteria* dominan la zona externa y de mayor salinidad, las *Betaproteobacteria* la zona interna y más dulce del estuario, en tanto que miembros de *Flavobacteria* se han visto asociadas a las zonas de máxima turbidez (Bouvier et al., 2002, Alonso et al., 2010).

Además de patrones espaciales, se han reportado patrones temporales como resultado de eventos de sucesión temporal. En un estudio llevado a cabo en el Mar Báltico, se registraron cambios en la composición de la comunidad bacteriana coincidentes con cambios estacionales. La clase *Flavobacteria* dominó a la comunidad bacteriana en primavera, mientras que las *Alfaproteobacteria* lo hicieron durante el verano (Pinhassi & Hagström, 2000). Asimismo en la costa del sur de California, mediante un exhaustivo trabajo de cuatro años y medio, se reportó recurrencia anual en la composición taxonómica para las comunidades del bacterioplancton (Fuhrman et al., 2006). Finalmente, se ha demostrado coherencia funcional a nivel de clases, por ejemplo en la utilización de determinados componentes de la materia orgánica disuelta (Alonso- Sáez et al., 2012, Amaral et al., 2016).

Estos ejemplos evidencian coherencia ecológica bacteriana a niveles taxonómicos superior al de especie. Sin embargo, cabe destacar que el nivel taxonómico definido en estos trabajos,

está estrechamente ligado al nivel de resolución alcanzado por las técnicas empleadas para analizar la diversidad. En particular, se destaca que muchos trabajos han empleado métodos con los cuales se recobra sólo una pequeña porción de la misma, enfocada sólo a los taxa más abundantes (ej. TRFLP en Chin et al., 1999, SSCP en Ghiglione et al., 2007, DGGE en Alonso-Saéz et al., 2008), o CARD-FISH con resolución a nivel de clases, por lo que se hace necesario el empleo de técnicas que permitan realizar una caracterización más exhaustiva de las comunidades microbianas en términos de diversidad (Palacios et al., 2006).

Durante los últimos 10 años, el incremento en el empleo de técnicas de secuenciación masiva, ha sido fundamental en la investigación en ecología microbiana posibilitando explorar con mayor precisión la riqueza de especies, la abundancia y el total de la diversidad para una amplia variedad de ecosistemas (Sogin et al., 2006, Galand et al., 2009, Youssef et al., 2010, Herlemann et al., 2011, Fortunato et al., 2012, Logue et al., 2012, Alonso- Sáez et al., 2015, Ruiz- Gonzáles et al., 2015), incluyendo el acceso a los miembros de la comunidad presentes en tan baja abundancia que no son detectados por ninguna otra técnica. Este factor es clave ya que frecuentemente organismos muy poco abundantes son los principales responsables de procesos centrales en los ciclos del carbono y nitrógeno en los sistemas acuáticos (Boetius et al., 2000, Alonso & Pernthaler, 2006a, Strous et al., 2006, Musat et al., 2008).

La disponibilidad de estos métodos abre la posibilidad de conocer exhaustivamente la diversidad bacteriana para poder relacionarla con funciones ecosistémicas, y establecer el nivel de organización que presente coherencia respecto a un rasgo funcional, el cual puede ser un rasgo fisiológico o ecológico. Por ejemplo, cada vez resulta más frecuente en ecología agrupar especies según sus requerimientos ecológicos, evaluando sus respuestas frente a cambios ambientales, lo que simplifica la tarea de describir a cada especie individualmente (Legendre & Legendre, 1998).

En otro sentido, las diferencias sustanciales en la diversidad y metabolismo bacterianos entre distintos sistemas -ej. sistemas marinos vs sistemas continentales- (del Giorgio & Cole, 1998, Barberan & Casamayor 2010) apuntan a la importancia de llevar a cabo este tipo de estudios en diferentes ambientes acuáticos. En particular, los estuarios son sistemas en los cuales se observan cambios en la diversidad y en las funciones en escalas geográficas y temporales muy acotadas. Dichas características los hace ideales para estudiar la relación entre la composición y la producción de las comunidades planctónicas, que constituyen la base de la trama trófica acuática. Diferentes estudios realizados en estos sistemas han demostrado que así como varía

la estructura comunitaria a lo largo del gradiente, también lo hace la producción bacteriana (Cottrell & Kirchman, 2003, Crump et al., 2004, Zhang et al., 2006).

Si bien los trabajos que incluyen secuenciación masiva han ido en aumento, no se ha explorado específicamente la relación entre la diversidad bacteriana y funciones ecosistémicas como producción bacteriana o transferencia de biomasa bacteriana a niveles tróficos superiores, o algún otro factor funcional en estuarios. Su empleo ha sido más bien enfocado a analizar cambios en la composición de la comunidad bacteriana asociados a factores físico-químicos como concentración de nutrientes y temperatura (Andersson et al., 2010). Asimismo en un trabajo realizado en el estuario Columbia, identificaron un fuerte efecto espacial sobre la composición de la comunidad bacteriana, principalmente por el efecto de la salinidad y la profundidad, además de hallarse en menor grado un efecto temporal, evidenciado en una sucesión entre una comunidad temprana (de Abril a Julio) y otra tardía (de Agosto a Noviembre) (Fortunato et al., 2012). Finalmente, en un amplio estudio temporal llevado a cabo en un sistema costero del Canal de la Mancha, se detectaron dinámicas temporales de grupos del bacterioplancton muy poco abundantes, los cuales podrían jugar roles claves en el funcionamiento de los ecosistemas marinos (Alonso- Sáez et al., 2015).

El presente trabajo se llevó a cabo en el Estuario Río de la Plata, donde trabajos previos han revelado importantes diferencias en cuanto a la abundancia y a la composición de las comunidades bacterianas a lo largo del gradiente de salinidad, habiéndose encontrado la mayor diversidad microbiana en la zona frontal (Alonso et al., 2010), así como la mayor producción bacteriana (Alonso et al. sin publicar). En los sistemas estuarinos sin embargo, se especula que la estructura físico-química y la diversidad biológica tenderían a afectar las funciones ecosistémicas en sentidos opuestos, ya que en las regiones frontales se darían picos de productividad, a la vez que una baja riqueza biológica debido al estrés ambiental (LeFevre 1986). Por lo tanto para las comunidades bacterianas, podría no cumplirse necesariamente dicho patrón, haciéndose necesario una mayor indagación en el tema.

Finalmente, mediante una serie de experimentos de depredación bacteriana, se registró también en la zona frontal del estuario Río de la Plata, los mayores efectos de la depredación sobre la abundancia, composición y producción de la comunidad bacteriana (Bertoglio 2012, tesina de licenciatura).

## **Objetivos e hipótesis**

El objetivo del presente trabajo, es evaluar la relación entre la diversidad bacteriana y la producción bacteriana, así como entre la diversidad bacteriana y la transferencia de biomasa hacia niveles tróficos superiores (tasa de depredación bacteriana), a lo largo del gradiente ambiental del estuario Río de la Plata.

La hipótesis de trabajo planteada es que la complementariedad de nicho en el uso de los recursos, es el mecanismo que explica la magnitud de la transferencia de carbono mediado por la comunidad bacteriana.

## **Predicciones**

A mayor diversidad bacteriana se incrementará la complementariedad ecológica en el uso de los recursos. Esto se reflejará en un incremento general en la transferencia de carbono mediado por la comunidad bacteriana, evidenciado tanto en la producción bacteriana como en las presiones de depredación sufridas por ésta, al incrementarse la diversidad bacteriana. Se espera por lo tanto que a mayor diversidad bacteriana, la producción bacteriana sea mayor lo que reflejará asimismo un incremento en la depredación bacteriana.

## **Metodología y área de estudio**

### Área de estudio: Río de la Plata

El estuario Río de la Plata está ubicado en la costa este de Sudamérica, cubre un área de 38.800 km<sup>2</sup>, una longitud de 200 km y drena la segunda cuenca más grande de América del Sur, en la cual el principal aporte de agua está dado por la confluencia de los ríos Paraná y Uruguay. Además, el Río de la Plata constituye la principal fuente de agua dulce en el Océano Atlántico Sur.

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

## Muestreo y diseño experimental

Se llevaron a cabo cinco muestreos en los meses de Marzo, Junio, Octubre, Diciembre de 2013 y Marzo de 2014, en tres zonas del estuario Río de la Plata. Además cada zona incluyó dos puntos de muestreo: una estación costera (denominada costa), y otra situada entre 5.9 y 7.7 km de la costa (denominada aguas abiertas). Las estaciones elegidas para el muestreo se basaron en características hidrológicas del sistema (temperatura y salinidad), incluyendo tres estaciones representativas del gradiente ambiental: Colonia, Montevideo y Punta del Este. Colonia se trata de la zona interna del estuario y está mayoritariamente influenciada por agua dulce, dado que es la porción más cercana a la desembocadura del Río Uruguay. Montevideo se corresponde con el frente estuarino, en tanto que Punta del Este pertenece a la región externa, la cual posee una mayor salinidad debido a que es la porción más cercana al Océano Atlántico (Fig. 1).

Las fechas del muestreo pretendieron cubrir las diferentes estaciones del año: otoño (Marzo), invierno (Junio), primavera (Octubre) y verano (Diciembre), además se tomó una muestra al año siguiente del primer muestreo (Marzo 2014), posibilitando analizar la recurrencia de patrones anuales en la composición de la comunidad bacteriana. En la Tabla 1 se muestran los códigos de las muestras tomadas.



**Figura 1.** Mapa del estuario Río de la Plata, se representan las tres zonas de muestreo: Colonia (CO), Montevideo (MO) y Punta del Este (PE).

**Tabla 1.** Código de las muestras por mes, zona y distancia a la costa. MAR: Marzo 2013, JUN: Junio 2013, OCT: Octubre 2013, DIC: Diciembre 2013, MAR14: Marzo 2014. CO: Colonia, MO: Montevideo, PE: Punta del Este. CO: Costa, AA: Aguas abiertas

Nombre de muestra	Mes	Zona	Distancia a la Costa
MARCOCO	Marzo 2013 (MAR)	Colonia (CO)	Costa (CO)
MARCOAA	Marzo 2013 (MAR)	Colonia (CO)	Aguas abiertas (AA)
MARMOCO	Marzo 2013 (MAR)	Montevideo (MO)	Costa (CO)
MARMOAA	Marzo 2013 (MAR)	Montevideo (MO)	Aguas abiertas (AA)
MARPECO	Marzo 2013 (MAR)	Punta del Este (PE)	Costa (CO)
MARPEAA	Marzo 2013 (MAR)	Punta del Este (PE)	Aguas abiertas (AA)
JUNCOCO	Junio 2013 (JUN)	Colonia (CO)	Costa (CO)
JUNCOAA	Junio 2013 (JUN)	Colonia (CO)	Aguas abiertas (AA)
JUNMOCO	Junio 2013 (JUN)	Montevideo (MO)	Costa (CO)
JUNMOAA	Junio 2013 (JUN)	Montevideo (MO)	Aguas abiertas (AA)
JUNPECO	Junio 2013 (JUN)	Punta del Este (PE)	Costa (CO)
JUNPEAA	Junio 2013 (JUN)	Punta del Este (PE)	Aguas abiertas (AA)
OCTCOCO	Octubre 2013 (OCT)	Colonia (CO)	Costa (CO)
OCTCOAA	Octubre 2013 (OCT)	Colonia (CO)	Aguas abiertas (AA)
OCTMOCO	Octubre 2013 (OCT)	Montevideo (MO)	Costa (CO)
OCTMOAA	Octubre 2013 (OCT)	Montevideo (MO)	Aguas abiertas (AA)
OCTPECO	Octubre 2013 (OCT)	Punta del Este (PE)	Costa (CO)
OCTPEAA	Octubre 2013 (OCT)	Punta del Este (PE)	Aguas abiertas (AA)
DICCOCO	Diciembre 2013 (DIC)	Colonia (CO)	Costa (CO)
DICCOAA	Diciembre 2013 (DIC)	Colonia (CO)	Aguas abiertas (AA)
DICMOCO	Diciembre 2013 (DIC)	Montevideo (MO)	Costa (CO)
DICMOAA	Diciembre 2013 (DIC)	Montevideo (MO)	Aguas abiertas (AA)
DICPECO	Diciembre 2013 (DIC)	Punta del Este (PE)	Costa (CO)
DICPEAA	Diciembre 2013 (DIC)	Punta del Este (PE)	Aguas abiertas (AA)
MARCOCO 14	Diciembre 2013 (DIC)	Colonia (CO)	Costa (CO)
MARCOAA 14	Marzo 2014 (MAR14)	Colonia (CO)	Aguas abiertas (AA)
MARMOCO 14	Marzo 2014 (MAR14)	Montevideo (MO)	Costa (CO)
MARMOAA 14	Marzo 2014 (MAR14)	Montevideo (MO)	Aguas abiertas (AA)
MARPECO 14	Marzo 2014 (MAR14)	Punta del Este (PE)	Costa (CO)
MARPEAA 14	Marzo 2014 (MAR14)	Punta del Este (PE)	Aguas abiertas (AA)

Por cada estación de muestreo se colectaron 5 litros de agua superficial. Inmediatamente se fijaron 10 ml de muestra con 0.5 ml de PFA-GLU al 20-1 % (paraformaldehído- glutaraldehído), para analizarlas posteriormente por citometría de flujo. El resto de la muestra fue conservada en condiciones frescas hasta su procesamiento en el laboratorio. Por otro lado, *in situ* y mediante un multiparámetro Horiba se determinaron las variables ambientales: temperatura, salinidad, turbidez y concentración de oxígeno disuelto.

## Trabajo de laboratorio

Inmediatamente llegadas al laboratorio, las muestras fueron procesadas con el fin de: i) conservar las muestras para la extracción del ADN para posteriormente analizar la diversidad bacteriana, ii) determinar la producción bacteriana y iii) determinar la tasa de depredación de las bacterias por parte de sus depredadores

### i) Extracción de ADN

La extracción el ADN se realizó para la totalidad de las muestras (costa y aguas abiertas). 1 litro de muestra fue prefiltrada por filtros con un tamaño de poro de 20  $\mu\text{m}$ , luego filtrada en filtros de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ , éstos se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento. La extracción de ADN se realizó a partir de los filtros de acetato de celulosa siguiendo el protocolo modificado de Zhou et al. (1996). Brevemente, consistió en incubar los filtros durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en un buffer de extracción con Proteinasa K. Luego la muestra fue incubada nuevamente durante 2 hrs a  $65^{\circ}\text{C}$  con SDS 20 %. Se centrifugó a 6000 g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se lavó mediante centrifugación con cloroformo /alcohol isoamílico (24:1, v/v) 3 veces a 10000 g. Luego la fase acuosa se precipitó con 0.6 volumen de isopropanol e incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Nuevamente se lavó mediante centrifugación a 20000 g durante 30 minutos y el pellet resultante se lavó con 10 ml de alcohol frío al 70 % en una última centrifugación a 20000 g por 15 minutos. Una vez descartado el sobrenadante, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de agua MQ durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . A la mañana siguiente las muestras fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. La concentración y la calidad del ADN extraído fueron comprobadas mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría de microvolúmenes. Las muestras se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

### ii) Producción bacteriana

La producción bacteriana fue estimada mediante la técnica que emplea leucina marcada con el radioisótopo tritio (leucina-  $^3\text{H}$ ) según el protocolo de Kirchman et al. (1985). Esta técnica se basa en la incorporación de dicho aminoácido en las proteínas de las bacterias heterótrofas. La incorporación de leucina marcada se estima evaluando la radioactividad en las proteínas bacterianas mediante un contador de centelleo. Esto implica un paso previo donde las proteínas son precipitadas con TCA (ácido tricloroacético), asegurándose de medir la incorporación de leucina específicamente en la fracción proteica.

Con el fin de determinar la concentración adecuada de leucina añadida en las incubaciones, se realizaron varios experimentos añadiendo leucina a diferentes concentraciones (ver anexo 1). Dados los resultados de dichos experimentos (indicados en el anexo 1), se optó por estimar la producción bacteriana a partir de la leucina agregada a una concentración de 40 nM.

La producción bacteriana fue estimada únicamente para las muestras aguas abiertas. 1 ml de muestra por duplicado más un control de la muestra muerta con TCA al 5 %, fueron incubadas en eppendorfs, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 1 hora, a distintas concentraciones de leucina (10, 20, 30, 40, 50 y 60 nM). Luego de la incubación, el experimento fue detenido con TCA al 5 %. Las muestras fueron congeladas hasta su posterior procesamiento.

El paso siguiente implicó precipitar a las proteínas bacterianas mediante el método de centrifugación (Smith & Azam 1992). Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 10 minutos. Luego se aspiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío. La muestra fue precipitada con 1 ml de TCA al 5 %, y se centrifugó nuevamente a la misma velocidad, finalmente se volvió a aspirar el sobrenadante y se le agregó 1 ml de coctel de centelleo. Las muestras se preservaron en oscuridad hasta su posterior análisis en un contador de centelleo líquido Beckman LS5000TD, donde se estimó la radioactividad de las muestras en cuentas por minuto (cpm).

### iii) Tasa de depredación bacteriana

Al igual que la producción bacteriana, la depredación bacteriana fue estimada para las muestras aguas abiertas. La tasa de depredación bacteriana (G) se estimó mediante una técnica que emplea bacterias muertas marcadas fluorescentemente (FLB: *Fluorescently Labelled Bacteria*) como trazadores (Vazquez- Dominguez et al., 1999). Conociendo la proporción de FLBs en la comunidad bacteriana total es posible calcular las tasas de consumo de bacterias siguiendo la desaparición de las FLBs en el tiempo.

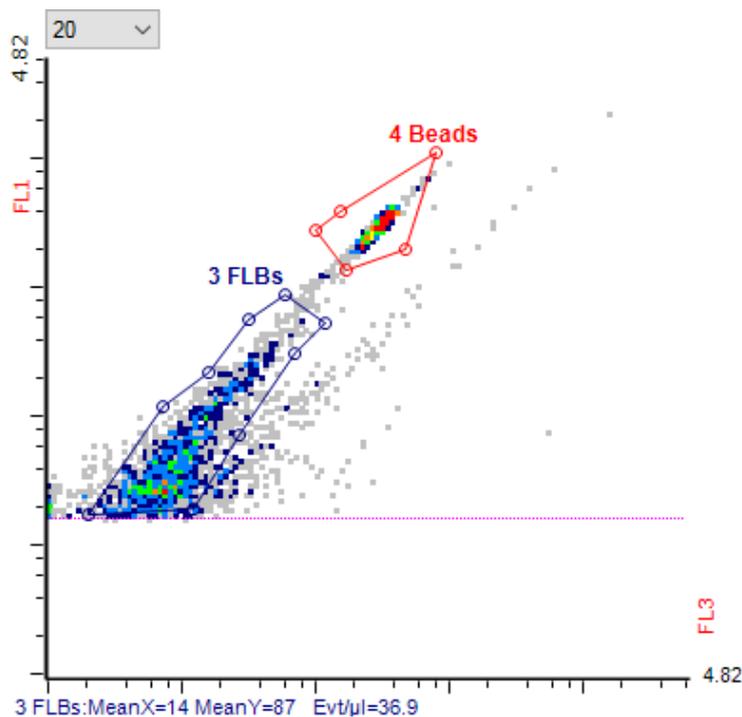
Las FLBs fueron preparadas previamente a partir de la cepa bacteriana *Brevundimonas diminuta*, las cuales fueron cultivadas en medio sólido LB (Luria- Bertrani), durante tres días a 20 °C, luego fueron transferidas a nuevo medio de cultivo durante una semana. Pasado el tiempo en el cultivo, las colonias de bacterias fueron transferidas a diez eppendorfs, cada uno con 1 ml de buffer carbonato- bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ ), para proceder a su tinción

con 100 µg/ ml de DTAF por cada eppendorf. Luego de agregarles el colorante, se incubaron durante 2 horas a 60°C. A continuación las células teñidas fueron lavadas con el mismo buffer, mediante centrifugación, 4 veces durante 10 minutos a 12.000 rpm. Por último los eppendorfs fueron sonicados en baño de ultrasonido durante cinco minutos.

La solución de trabajo con la que fueron incubadas las muestras fue preparada a partir del preparado anterior, diluyéndola con el mismo buffer usado durante su preparación, para lograr la concentración adecuada de incubación. Mediante citometría de flujo se chequeó su abundancia y se verificó mediante microscopía de epifluorescencia que las células no estuviesen agregadas. La abundancia de *B. diminuta*, fue entre el 20 y 30 % de la abundancia natural de bacterias en el sistema de estudio. Esto se correspondió con una abundancia de *B. diminuta* de  $1.0 \times 10^5$  bacterias por ml.

Las incubaciones para determinar la tasa global de depredación se llevaron a cabo por triplicado, más un control (fijado con PFA- GLU al 1- 0.05 %) en botellas conteniendo 1 litro de muestra de agua, a las cuales se les adicionaron las FLBs y fueron mantenidas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 hrs. Se tomaron alícuotas de 1ml al inicio de cada incubación (tiempo 0) y durante diferentes intervalos de tiempo (cada seis horas aproximadamente), las cuales fueron fijadas con PFA- GLU al 1- 0.05 % y almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis con citometría de flujo.

Los cálculos necesarios para estimar la tasa de depredación bacteriana (especificados a continuación en análisis de datos) parten de las abundancias de las FLBs y de las bacterias naturales heterótrofas (BH) en las alícuotas correspondientes a los distintos tiempos del experimento. Estas abundancias se estimaron mediante citometría de flujo (*Equipo A50-Micro Flow Cytometer- Apogee*). Para determinar la abundancia de las FLBs la muestra se pasó sin teñir ya que las células están teñidas con el colorante DTAF, que emite fluorescencia verde al excitarse con el láser azul del citómetro (Fig. 2). Para determinar la abundancia de las BHs, la muestra fue teñida con SYBR Green (1 X), el cual también emite fluorescencia verde al excitarse con el láser azul.



**Figura 2.** Citograma de muestra JUNCOAA sin teñir a las 4 hrs de la incubación con las FLBs. FL1: detector de luz verde, FL3: detector de luz roja. Se observan las Beads (perlas de referencia: región 4 delimitada en rojo) y las FLBs (región 3 delimitada en azul). Abundancia de FLBs:  $3.69 \times 10^4$  cels/mL.

### Clorofila a y nutrientes

Los datos de concentración de clorofila a, nitrógeno y fósforo total, fueron otorgados por Kruk et al (2015) mediante las metodologías indicadas a continuación. La concentración de clorofila fue efectuada filtrando volúmenes entre 50 y 200 mL de agua por filtros de fibra de vidrio de tamaño de poro  $0.7 \mu\text{m}$ . A partir de estos se realizó su extracción en etanol 95% en oscuridad por 24 horas a  $4^\circ\text{C}$ , según Jespersen & Christoffersen (1987).

El nitrógeno total se estimó por combustión y oxidación a dióxido nitroso y posterior detección por quimioluminiscencia, descrito por la norma ISO/TR 11905-2 (*International Organization for Standardization*, 1997). El fósforo total (PT) también se analizó utilizando FIA, según el método del fabricante del equipo *Lachat, QuikChem Method 31-115-01-3-D* (Lachat Instruments, 2009).

## Análisis de datos

### i) Diversidad bacteriana

El ADN extraído fue enviado al centro de secuenciación masiva *Research & Testing* (Lubbock, Texas), donde se llevó a cabo la amplificación de las regiones hipervariables V1-V3 del ARNr 16S empleando los *primers* 28F ‘GAGTTTGATCNTGGCTCAG’ y 519R ‘GTNTTACNGCGGCKGCTG. Los amplicones resultantes (491 pb) fueron secuenciados mediante la técnica de secuenciación masiva Illumina. Por problemas técnicos, la muestra JUNCOCO no fue secuenciada, por lo que se secuenció un total de 29 muestras. Las secuencias de nucleótidos generadas por la secuenciación y sus *scores* de calidad fueron almacenadas en archivos de texto FASTQ.

A partir de dicha información se procedió al análisis bioinformático por parte del equipo de trabajo del Laboratorio de Limnología de la Universidad de Zurich, utilizando un software específicamente diseñado. El análisis de agrupación de las especies se llevó a cabo mediante el algoritmo de esperanza- maximización (EM). Las secuencias fueron clasificadas en OTUs (unidades taxonómicas operacionales) a un nivel de similitud del 97 %. La asignación taxonómica se realizó empelando la base de datos SILVA (<http://www.arb-silva.de>) (Yilmaz et al., 2014). Los resultados obtenidos fueron una matriz compuesta por la riqueza y una proxy de abundancia de los diferentes OTUs bacterianos presentes en cada muestra, denominada *matriz OTUs*.

A partir de dichos datos, se construyeron curvas de rarefacción basadas en individuos (secuencias amplificadas: *reads*), para evitar diferencias en el número de OTUs a causa de diferencias en el número de *reads* por muestra (Gotelli & Colwell, 2001). La diversidad fue estandarizada a un mismo número de *reads* por muestra, el cual se correspondió a 97, debido a que fue el menor valor de *reads* en una de las muestras. Para verificar una buena representatividad de dicho valor, se evaluó la relación entre la riqueza observada para el menor número de *reads* (97) y entre la riqueza máxima estimada por muestra ( $S_{\max,est}$ ). La riqueza máxima estimada se determino ajustando las curvas de rarefacción con el siguiente modelo:

$$S_{\max,est} = S_{\max} * \text{reads} / k + \text{reads}$$

siendo  $S_{\max}$  la máxima riqueza observada en las curvas de rarefacción para cada muestra, *reads* la cantidad de *reads* detectados por cada muestra y  $k$  la cantidad de *reads* para los cuales la riqueza es la mitad de la riqueza máxima ( $S_{\max}$ ).

Luego de estandarizar la diversidad a un mismo número de *reads* por muestra (97), se calcularon diversos índices de diversidad: la riqueza observada ( $S_{\text{obs}}$ ), la riqueza estimada por el índice Chao 1 ( $S_{\text{Chao}}$ ), el índice de equitatividad del inverso de Simpson (E) y el índice de equitatividad de Shannon (J).

Se empleó el software EstimateS Versión 9.1.0 para realizar las curvas de rarefacción y estimar los índices indicados anteriormente para un mismo número de *reads*.

La riqueza observada es el número de OTUs observados, mientras que el índice de riqueza no paramétrico Chao 1 (Chao 1987) se basa en la presencia de los OTUs representados por uno y dos *reads* y se estimó como:

$$S_{\text{Chao}} = S_{\text{obs}} + (n_1^2 / 2n_2)$$

En donde  $S_{\text{obs}}$  es la riqueza observada (el número de OTUs) y  $n_1$  y  $n_2$  es el número de OTUs observados una única vez y dos veces respectivamente.

Los índices de equitatividad de Simpson y de Shannon- Wiener, cuantifican la equitatividad (entre 0 y 1) expresando el inverso del índice de Simpson (D) y el índice de Shannon (H), en relación al valor máximo posible que tomarían asumiendo que los individuos están distribuidos completamente equitativamente. Se estimaron de la siguiente forma:

$$E = D / S_{\text{obs}}$$

$$J = H / \ln(S_{\text{obs}})$$

siendo D el inverso del índice de Simpson, calculado como:

$$D = 1 / (\sum p_i^2)$$

donde  $p_i$  es la proporción del OTU<sub>i</sub>, por lo que  $p_i = n_i / N$ , siendo  $n_i$  el número de *reads* pertenecientes al OTU<sub>i</sub> y  $N$  es el número total de *reads*.

H es el índice de Shannon y se estimó como:

$$H = - \sum p_i \ln p_i$$

## ii) Producción bacteriana

El valor de radioactividad obtenido de la fracción proteica, fue convertido a concentración de leucina incorporada por la comunidad bacteriana, conociendo la actividad específica de la leucina añadida ( $2.2 \times 10^{12}$  Bq/mmol). Luego este valor se pasó a tasa de carbono incorporado, empleando un factor de conversión estándar de 3.25 kg de carbono por mol de leucina. La elección de este factor de conversión, fue en base a la similitud entre el actual sistema de estudio y entre el sistema para el cual se estimó dicho factor, el cual se corresponde a un sistema costero del occidente del mar Mediterráneo (Pedrós- Alió et al. 1999).

## iii) Tasa de depredación bacteriana

El número de bacterias consumidas por unidad de tiempo y volumen de agua (G), se calculó a partir de la tasa de depredación bacteriana (g) y de la tasa neta de crecimiento bacteriano (a), según el modelo de Satal & Marrasé (1994). Donde g se estimó como:

$$g = -1 / t * \ln (FLB_t / FLB_0)$$

siendo t el tiempo de incubación,  $FLB_t$  la abundancia de *B. diminuta* a un tiempo determinado y  $FLB_0$  la abundancia inicial de *B. diminuta*.

Los valores de g fueron corregidos por el control según Unrein et al. (2007), estimando la desaparición de las FLBs en los controles (gc) a causa de su pérdida en fluorescencia (y no de depredación):

$$gc = -1 / t * \ln (cFLB_t / cFLB_0)$$

siendo  $cFLB_t$  la abundancia de FLBs en un tiempo determinado en el control, y  $cFLB_0$  la abundancia de las FLBs en el tiempo inicial en el control.

La tasa neta de crecimiento bacteriano (a) se calculó según:

$$a = 1 / t * \text{Ln} (BH_t / BH_0)$$

siendo  $BH_t$  el número de bacterias heterótrofas naturales a un tiempo determinado, y  $BH_0$  el número inicial de bacterias heterótrofas.

Finalmente el número total de bacterias consumidas por tiempo y por volumen ( $G$ ) se estimó como:

$$G = [(g - gc) / a] * (BH_t - BH_0) / t$$

### Análisis estadístico

Las variaciones espaciales y temporales de las variables ambientales, los índices de diversidad, la producción bacteriana y la tasa de depredación bacteriana, se analizaron mediante el test ANOVA de dos vías considerando a la zona y al mes como factores, y realizando el test post hoc Tukey. Las variaciones se consideraron significativamente diferentes a niveles  $p \leq 0.05$ .

Se realizó un análisis de clasificación de muestras basado en la abundancia de OTUs, a partir de la *matriz OTUs* transformada con  $\log_{10}(x + 1)$ . La construcción de la matriz de disimilitud se realizó en base al índice de disimilitud de Bray- Curtis. La matriz fue representada mediante el análisis de cluster, empleando como método de agrupamiento el UPGMA (método de clasificación jerárquica aglomerativa). Finalmente los resultados fueron visualizados en un dendograma. El análisis de clasificación de meses se realizó de la misma forma, pero partiendo de la agrupación de los OTUs por meses. La validez de la topología de los árboles se calculó a través del coeficiente de correlación cofenética, donde valores mayores a 0.7 se consideran una buena representación de la matriz de disimilitud por parte del dendograma. El coeficiente de correlación cofenética fue de 0.8.

Para los siguientes análisis se trabajó con la matriz OTUs en porcentajes, respecto a la totalidad de las secuencias determinadas (76240 secuencias), y los OTUs fueron agrupados en clados. Además, para los posteriores análisis que permitieron definir grupos ecofisiológicamente coherentes (GEFC), se consideró únicamente a los clados de las muestras aguas abiertas, ya que una vez definidos los grupos, se relacionaron con la producción bacteriana y la tasa de depredación bacteriana, variables estimadas únicamente en las muestras aguas abiertas. Finalmente, los clados incluidos fueron aquellos con abundancias  $\geq 0.5\%$  en al menos una muestra, esta matriz fue denominada *matriz clados*.

Se realizó un análisis de redundancia (RDA) para analizar la relación de los clados con las principales variables ambientales, y definir en una primera instancia cuatro grupos de clados según los scores de los ejes RDA1 y RDA2. La elección de este análisis de ordenación se basó en que la respuesta de los datos biológicos fue lineal. Esto se demostró mediante un análisis de Correspondencias Destendenciados (DCA), el cual estima el largo del gradiente ambiental y en base a este valor fue posible determinar el método adecuado a emplear: largo  $\geq 4$  corresponde a una respuesta unimodal y largo  $\leq 3$  indica una respuesta lineal (Leps & Smilauer, 1999). El valor de longitud del gradiente ambiental fue de 2.9. El RDA se llevó a cabo calculando la matriz de distancia de Bray- Curtis, a partir de la *matriz clados*. Se realizó una matriz con las variables ambientales centradas y estandarizadas, la cual fue insertada en la ordenación de las muestras. Los criterios para elegir las variables ambientales fueron el AIC y la significancia de los parámetros estimados para las variables.

Posteriormente, los clados fueron clasificados mediante un análisis de *cluster* con las distancias de Bray- Curtis estimada a partir de la *matriz clados* transformada con  $\sqrt{x}$ . El coeficiente de correlación cofenética fue de 0.8.

Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa R versión 3.2.2. Las librerías empleadas fueron *ade4*, *vegan*, *gclus*, *cluster*, *stats* y *MASS*.

En base a los resultados obtenidos con el RDA y el análisis de *cluster* para la *matriz clados*, se llevó a cabo un análisis de *k-means* en seis grupos a partir de la *matriz clados* transformada con  $\sqrt{x}$ . Este análisis de clasificación identifica grupos de casos relativamente homogéneos utilizando un algoritmo que requiere que el usuario especifique el número de clústeres, por lo tanto se realizó luego de conocer la agrupación sugerida por el RDA y por el análisis de *cluster*. A continuación se trabajó con el grupo más grande resultante de este primer análisis de *k-means* (constituido por un mayor número de clados) y se le realizó un segundo análisis de *k-means* en dos grupos. Finalmente los tres grupos resultantes del primer análisis de *k-means* fueron reducidos mediante un último análisis de *k-means* en dos grupos.

Los análisis de *k-means* fueron llevados a cabo con el programa PAST versión 3.11.

A partir de la agrupación obtenida mediante los mencionados análisis de *k-means*, el análisis de redundancia (RDA) y el análisis de *cluster* para la *matriz clados*, se llegó a un consenso de agrupación de los clados, en seis grupos ecofisiológicamente coherentes (GEFC).

La relación entre las funciones ecosistémicas producción bacteriana y tasa de depredación bacteriana, con los índices de diversidad y con las variables ambientales, se llevaron a cabo mediante modelos lineales generalizados (GLM), considerando la función de distribución adecuada de la variable de respuesta con su correspondiente función de conexión.

La variable de respuesta producción bacteriana (PB) siguió una distribución gamma, por lo que la función de conexión del GLM fue la función *log*, en tanto que la variable de respuesta tasa de depredación bacteriana (G) siguió una distribución normal al transformar su distribución por *log* ( $\log G$ ), por lo que la función de conexión fue la función *identidad*.

Se comenzó por el desarrollo de los modelos más complejos, los cuales consideraron los efectos aditivos de la riqueza observada, la equitativita y las variables ambientales, como variables explicativas.

Finalmente, se relacionó la producción bacteriana y la tasa de depredación bacteriana con las proporciones de los seis GEFC. El primer modelo consideró el efecto aditivo de los seis grupos, luego se corrió un modelo por grupo, considerando el efecto de cada grupo por sí solo.

Los criterios para elegir las variables explicativas de todos los modelos resultantes, fueron en base al AIC y a la significancia de los parámetros estimados para las variables.

Se chequearon los residuales de los modelos corridos para verificar el cumplimiento de los supuestos de cada modelo.

Todos los análisis de regresión se realizaron con el programa R versión 3.2.2.

## **Resultados**

### Variables ambientales

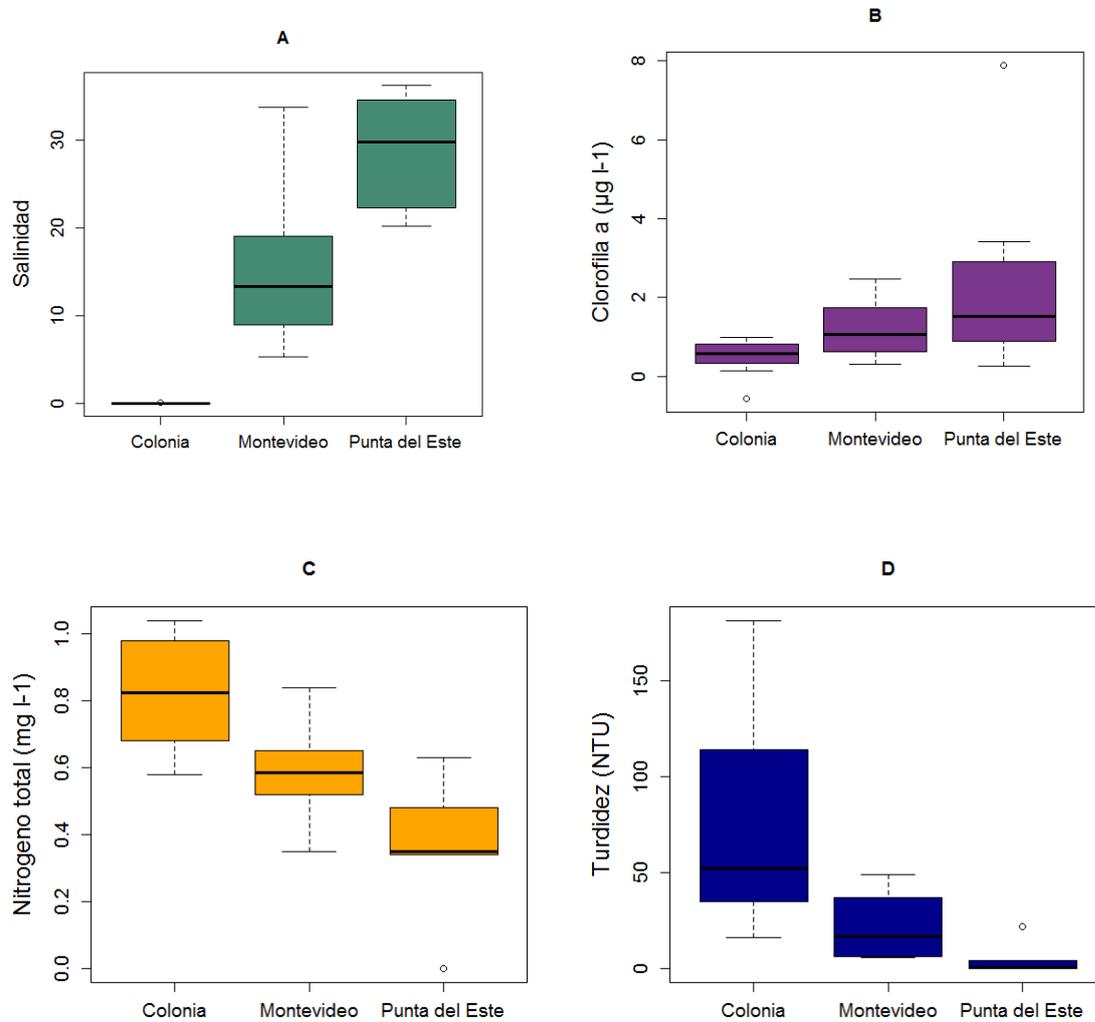
En la tabla 1 se presentan los resultados de las variables ambientales medidas: temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), salinidad, turbidez (NTU), oxígeno disuelto ( $\text{mg l}^{-1}$ ), clorofila a ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ), nitrógeno total ( $\text{mg l}^{-1}$ ) y fósforo total ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ).

**Tabla 2.** Variables ambientales: temperatura (Temp), salinidad, turbidez, oxígeno disuelto (O<sub>2</sub>D), Clorofila a (Chl *a*), nitrógeno total (NT), fósforo total (PT)

Mes	Zona	Distancia costa	Temp (°C)	Salinidad	Turbidez (NTU)	O <sub>2</sub> D (mg l-1)	Chl <i>a</i> (µg l <sup>-1</sup> )	NT (mg l-1)	PT (µg l-1)
Marzo 2013	Colonia	aguas abiertas	19.85	0	131	11.02	NA	1.01	75.0
		costa	19.19	0	114	10.84	NA	0.74	68.3
	Montevideo	aguas abiertas	18.79	5.3	6.04	10.83	1.730	0.56	104
		costa	19.30	5.3	6	10.07	0.732	0.59	60.1
	Punta del Este	aguas abiertas	20.52	22.4	21.70	11.30	0.946	0.55	93.1
		costa	19.6	22.3	21.60	10.79	2.900	0.63	61.1
Junio 2013	Colonia	aguas abiertas	12.83	0	76.7	12.32	0.135	0.73	34
		costa	10.97	0	42.2	12.87	0.527	0.68	40
	Montevideo	aguas abiertas	11.02	9.5	7.1	11.46	2.46	0.84	57
		costa	11.99	16	49	8.43	0.302	0.58	44
	Punta del Este	aguas abiertas	11.08	20.2	0.5	13.19	7.886	0.48	36
		costa	11.16	20.7	0	12.16	2.463	0.47	31
Octubre 2013	Colonia	aguas abiertas	15.21	0	21.2	12.11	0.564	1.04	38.1
		costa	15.55	0	16.2	11.51	NA	0.91	73.9
	Montevideo	aguas abiertas	13.62	33.5	17.6	10.18	0.866	0.64	70.3
		costa	14.84	33.8	15.4	9.3	0.49	0.52	59.4
	Punta del Este	aguas abiertas	12.24	36.1	0	10.09	1.762	0.34	25
		costa	12.19	36.3	0	9.26	0.258	0.34	21.2
Diciembre 2013	Colonia	aguas abiertas	23.6	0	61.5	10.32	0.94	0.92	50
		costa	23.43	0	38.3	10.33	0.99	0.98	81
	Montevideo	aguas abiertas	18.62	17.1	5.6	9.13	0.619	0.66	18
		costa	19.46	19.1	41.4	7.73	1.244	0.65	24
	Punta del Este	aguas abiertas	19.28	28.3	0	10.01	0.896	0.36	16
		costa	18.99	31.3	4	7.66	0.827	0.34	37
Marzo 2014	Colonia	aguas abiertas	21.87	0.1	181	10.84	-0.561	0.58	64.3
		costa	22.9	0	34.8	9.45	0.691	0.6	78.3
	Montevideo	aguas abiertas	18.19	9	34	11.18	1.573	0.37	134.0
		costa	18.52	10.7	36.6	9.59	1.783	0.35	122.0
	Punta del Este	aguas abiertas	19.92	33.8	2.8	8.71	3.429	0	60.6
		costa	19.99	34.6	0.1	9.70	1.285	0	79.6

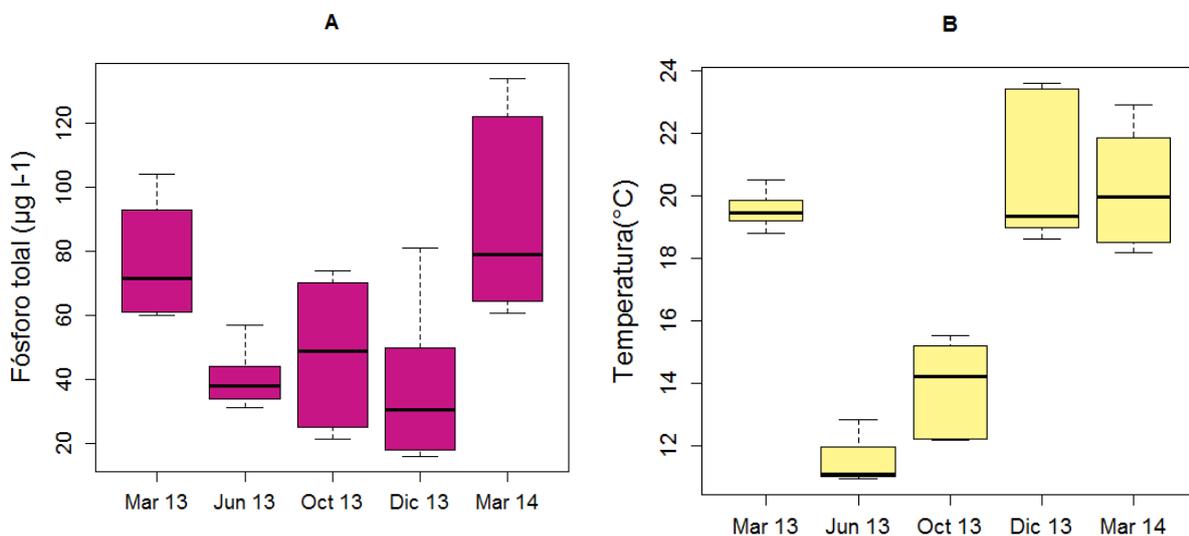
Las variables ambientales que mostraron mayores diferencias entre las zonas evaluadas, fueron la salinidad, la clorofila a, el nitrógeno total y la turbidez (Fig. 3). Esto se reflejó en un gradiente donde la salinidad aumentó significativamente (ANOVA  $F=40.17$   $p \ll 0.001$ ) de Colonia a Punta del Este (Fig. 3A). La clorofila a siguió el mismo patrón aunque la diferencia fue significativa únicamente entre Colonia y Punta del Este (Tukey test  $p < 0.05$ ) (Fig. 3B). A diferencia de esto, el nitrógeno total siguió un patrón opuesto, ya que disminuyó

significativamente de Colonia a Punta del Este (ANOVA  $F=17.47$   $p < 0.05$ ) (Fig. 3C), junto a la turbidez la cual fue significativamente mayor en Colonia respecto a las demás zonas (Tukey test  $p \leq 0.05$ ) (Fig. 3D).



**Figura 3:** Salinidad (A), Clorofila a (B), Nitrógeno total (C) y turbidez (D) en función de las zonas (Colonia, Montevideo y Punta del Este).

Por otro lado, las variables que presentaron mayores diferencias entre los cinco meses evaluados fueron el fósforo total (PT) y la temperatura (Fig. 4). El PT se destacó por ser mayor en los meses de Marzo (2013 y 2014) siendo significativamente mayor en Marzo de 2014 (Tukey test  $p < 0.05$ ), respecto al resto de los meses menos a Marzo de 2013, en tanto que en Marzo de 2013 fue significativamente mayor respecto a Diciembre de 2013 (Tukey test  $p < 0.05$ ) (Fig. 4A). Por último, la temperatura disminuyó significativamente en Junio y en Octubre de 2013 en relación al resto de los meses (Tukey test  $p < 0.05$ ), los cuales presentaron mayores temperaturas pero no variaron significativamente entre sí (Fig. 4B).



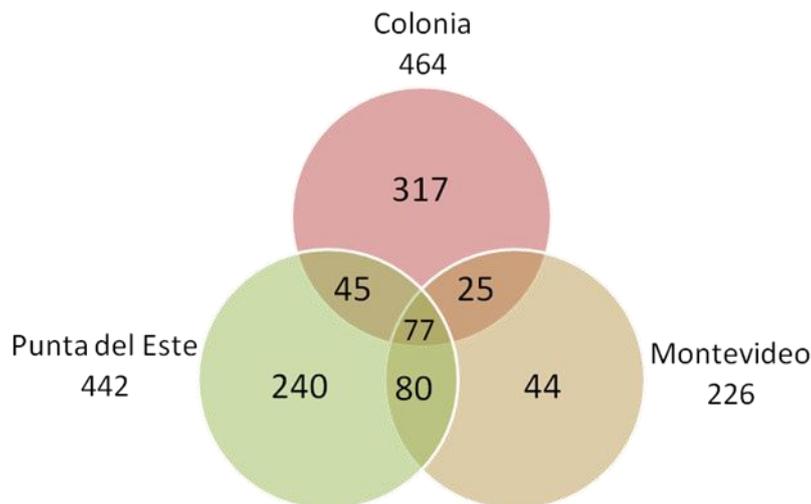
**Figura 4.** Variación del fósforo total (PT) (A) y de la temperatura (B) de acuerdo a los meses.

#### Variaciones en la diversidad bacteriana a lo largo del gradiente ambiental y temporal a nivel de OTUs

El análisis bioinformático aplicado a los resultados de la técnica de secuenciación masiva empleada detectó un total de 828 OTUs de bacterias en el Río de la Plata.

El número de OTUs detectadas en Colonia y en Punta del Este fue similar (464 y 442), representando respectivamente el 56 y 53 % respecto a la totalidad de OTUs. En Montevideo en cambio se halló el menor número de OTUs (226), representando el 27 % de los OTUs. Además, Colonia fue la zona con mayor número de OTUs exclusivos (317), lo que corresponde a un 38 % del total de los OTUs, luego le siguió Punta del Este (240 OTUs) representando el 29 % de la totalidad de los OTUs y Montevideo fue la zona con menor

número de OTUs exclusivas (44), representando tan solo un 5 % del total de los OTUs (Fig. 5).

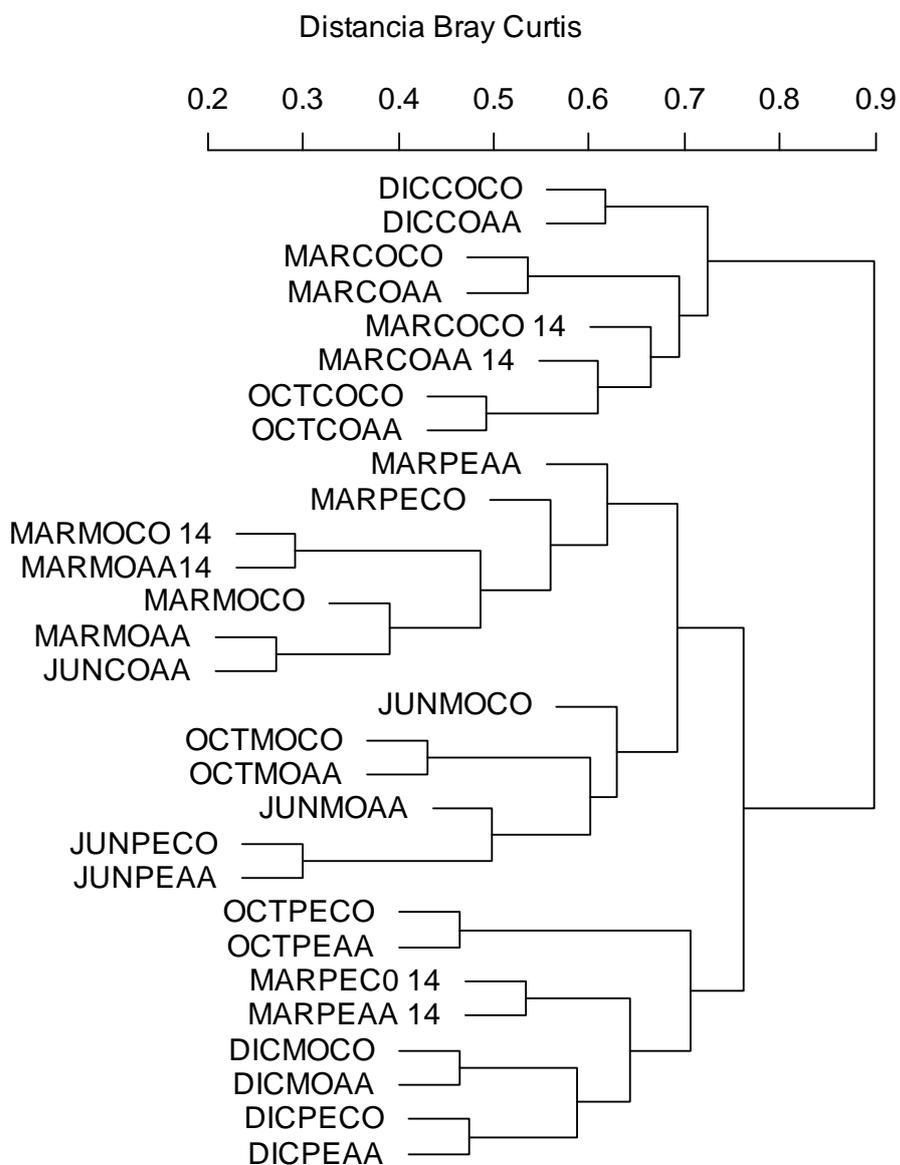


**Figura 5.** Representación de los OTUs totales, exclusivas y compartidas (números en la intersección) para las distintas zonas evaluadas.

El análisis de clasificación jerárquico de las muestras basado en la cantidad e identidad de OTUs hallados en el Río de la Plata, condujo a una separación en dos grandes grupos (Fig. 6). Uno de estos grupos estuvo compuesto únicamente por las muestras de Colonia, a excepción de la muestra de junio de Colonia aguas abiertas (JUNCOAA), la cual quedó por fuera de dicho *cluster*. El segundo grupo estuvo compuesto por las muestras de Montevideo y de Punta del Este.

En promedio, las muestras de Montevideo y Punta del Este presentaron el mayor índice de similitud de Bray Curtis (0.26) en tanto que las muestras de Colonia y Punta del Este presentaron un índice de similitud de Bray Curtis de 0.12, y las de Colonia y Montevideo de 0.16.

Además, en el análisis de *cluster* se observan mayores similitudes entre las muestras de una misma zona y de un mismo mes, tomadas a diferente distancia respecto a la costa (costa y aguas abiertas) (Fig. 6).

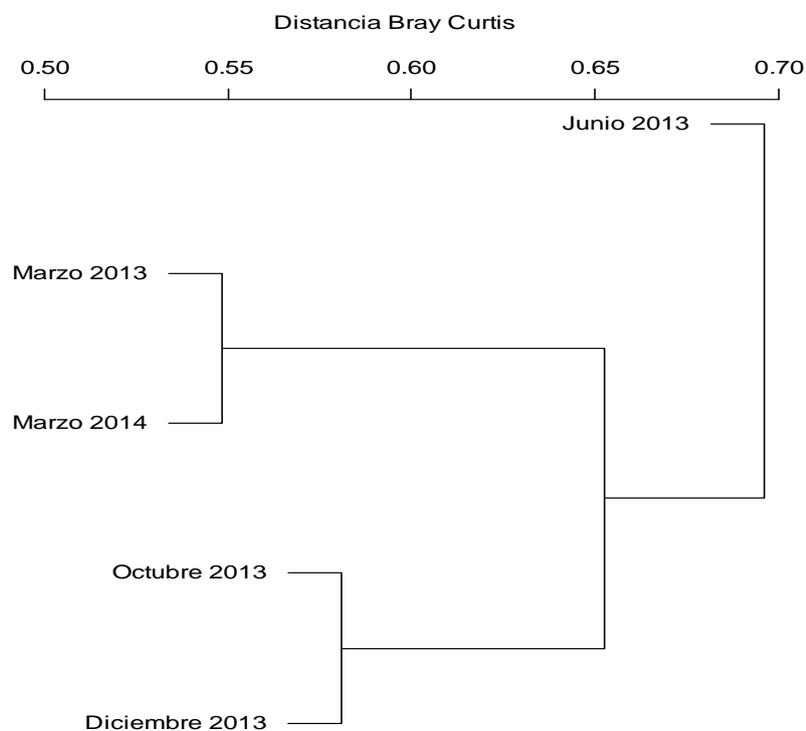


**Figura 6.** Clasificación jerárquica de muestras por distancias de Bray Curtis basando en las abundancias de los OTUs. Notar que la muestra JUNCOCO no fue incluida en este análisis, ya que no fue posible secuenciarla.

La distribución de los OTUs también varió respecto a los meses. El mayor número de OTUs fue en Octubre, correspondiéndose con un 51 % del total de los OTUs (422 OTUs). Luego le siguió diciembre con un 43% (355 OTUs), Marzo de 2014 con un 39% (327 OTUs), Marzo de 2013 con un 35% (295 OTUs) y Junio presentó el menor número de OTUs representando un 15 % (127 OTUs). Asimismo, Octubre fue el mes con mayor número de OTUs exclusivos

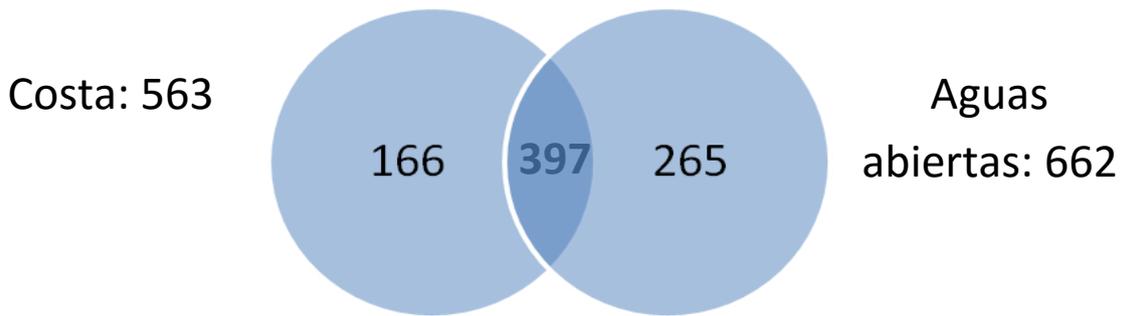
(171), lo que representó un 21% del total de los OTUs, mientras que Junio presentó 9 OTUs exclusivas, lo que representó tan solo un 1 % del total de los OTUs. Finalmente, Marzo de 2014 (105 OTUs), Diciembre (94 OTUs) y Marzo de 2013 (84 OTUs), presentaron especies exclusivas que representaron un 13, 11 y 10 % respectivamente respecto a la totalidad de los OTUs.

Las muestras de Marzo de los distintos años, fueron las más similares con un índice de similitud de Bray Curtis de 0.46, en tanto que las muestras de Junio y Octubre fueron las más disimiles, con un índice de similitud de Bray Curtis de 0.12 (Fig. 7).



**Figura 7.** Clasificación jerárquica de muestras por distancias de Bray Curtis basado en las abundancias de los OTUs por meses.

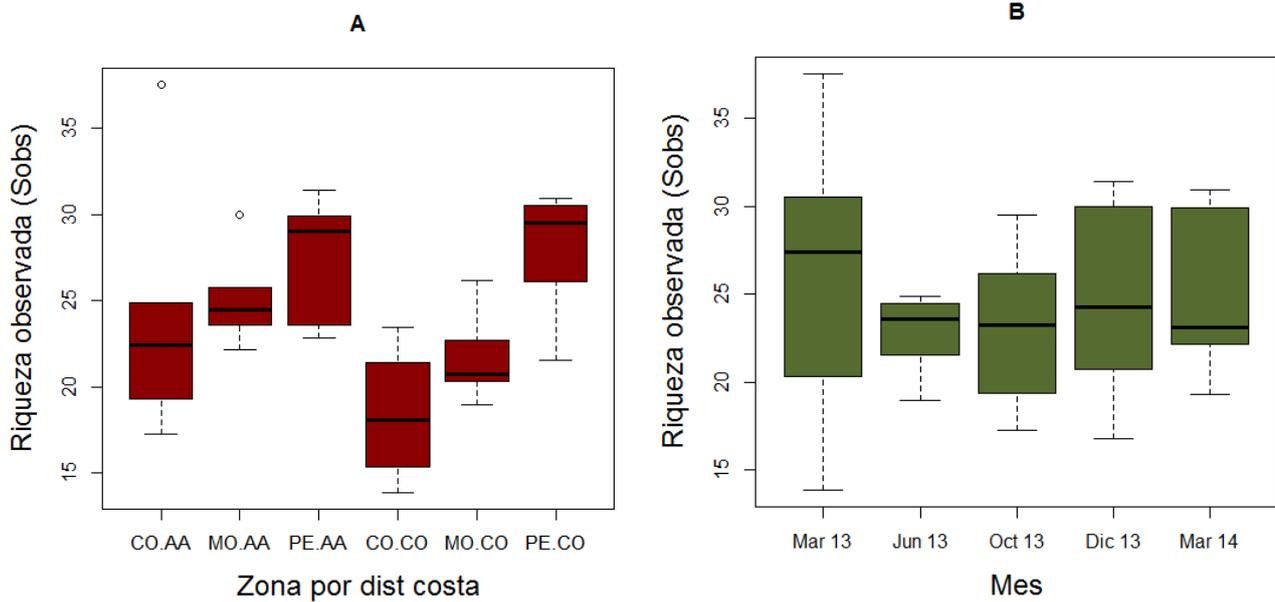
Por último, se aprecian diferencias en el número de OTUs según la distancia a la costa debido a un mayor número de OTUs detectado en aguas abiertas (662), respecto a la costa (563). Asimismo, aguas abiertas presentó un mayor número de OTUs exclusivos (265) en relación a la costa (166) (Fig. 8).



**Figura 8.** Representación de los OTUs totales, exclusivas y compartidas (números en la intersección) para costa y aguas abiertas.

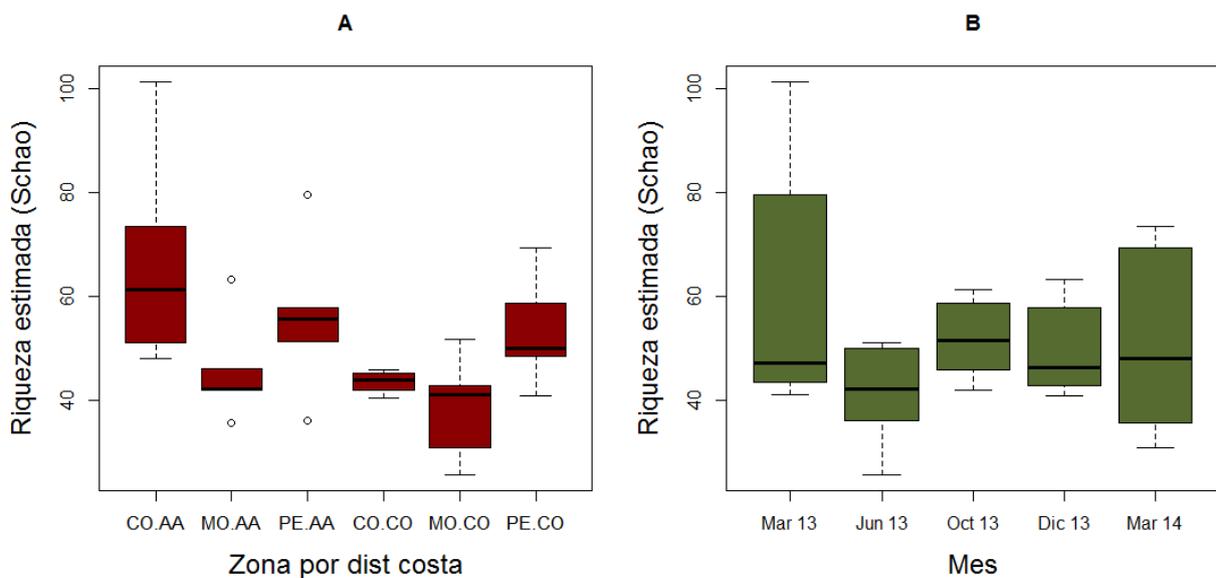
Riqueza observada y estimada, índices de diversidad

La riqueza observada ( $S_{obs}$ ) para los datos normalizados a un mismo número de secuencias (97), entre zonas, meses y entre las muestras de costa y de aguas abiertas, varió entre 14 y 37 OTUs. Las mayores diferencias se dieron entre las zonas, incrementando de Colonia a Punta de Este. Este patrón fue similar tanto para costa como para aguas abiertas, siendo significativamente mayor en Punta del Este respecto a Colonia para las muestras de costa (Tukey test  $p < 0.05$ ) (Fig. 9A). Por otro lado, entre los meses no se detectaron diferencias significativas (Fig. 9B).



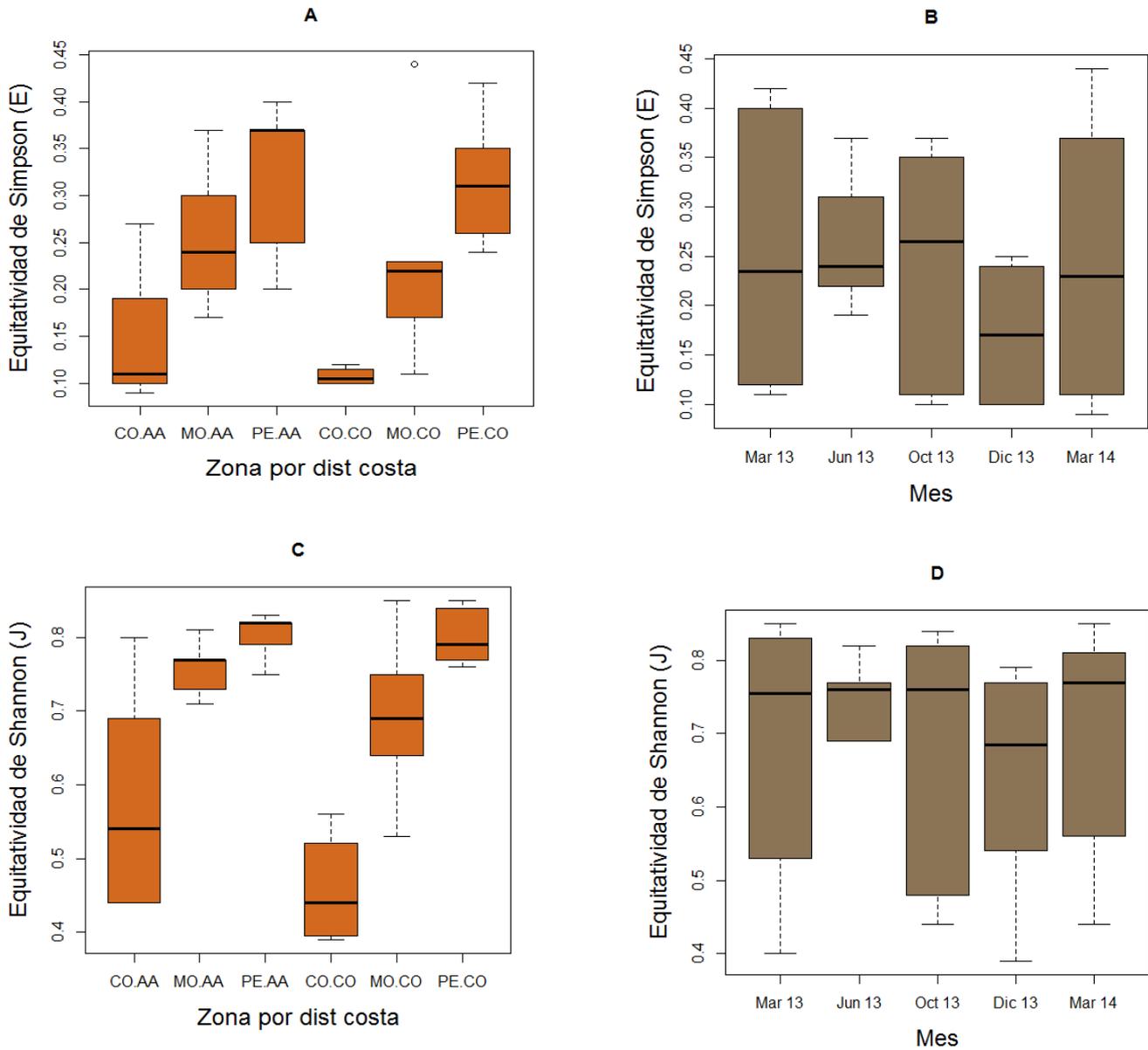
**Figura 9.** Riqueza observada ( $S_{obs}$ ): (A) por zona y distancia a la costa, (B) por mes

La riqueza estimada por el índice no paramétrico Chao ( $S_{Chao}$ ), fue menor en Montevideo en relación al resto de las zonas, sin embargo no presentó diferencias significativas entre las zonas ni para costa ni para aguas abiertas (Fig. 10A). Al igual que para la riqueza observada, no se detectan diferencias significativas entre los meses (Fig. 10B).



**Figura 10.** Riqueza estimada por el índice no paramétrico Chao: (A) por zona y distancia a la costa, (B) por mes.

Por otro lado, tanto la equitatividad de Simpson (E) y la de Shannon (J) incrementaron de Colonia a Punta del Este, siguiendo el mismo patrón para costa que para aguas abiertas. La equitatividad de Simpson fue significativamente mayor en Punta del Este respecto a Colonia, mientras que la de Shannon fue significativamente mayor en Montevideo y en Punta del Este respecto a Colonia (Tukey test  $p < 0.01$ ) (Fig. 11A y C). Por último, ningún índice de equitatividad mostró diferencias significativas entre los meses (Fig. 11B y D).



**Figura 11.** Equitatividad de Simpson (E) y de Shannon (J): por zona y por distancia a la costa (A y C) y por mes (B y D).

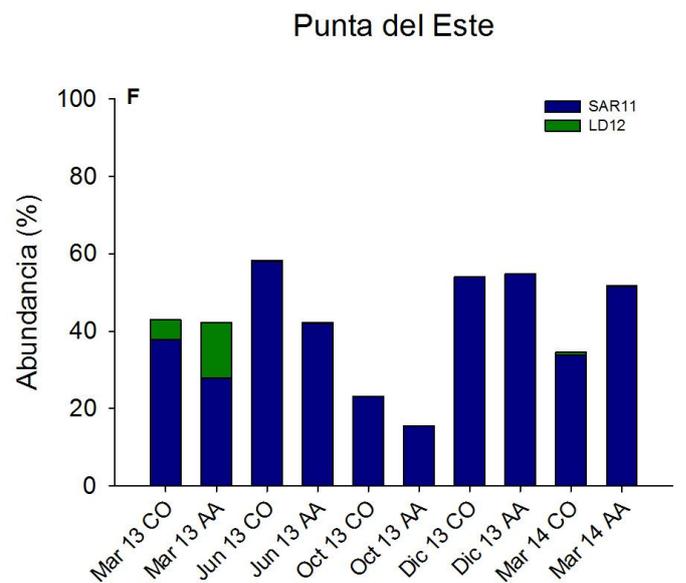
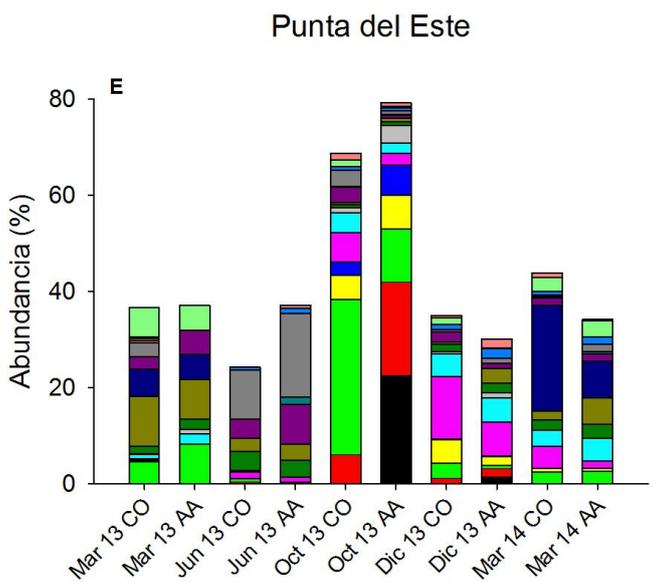
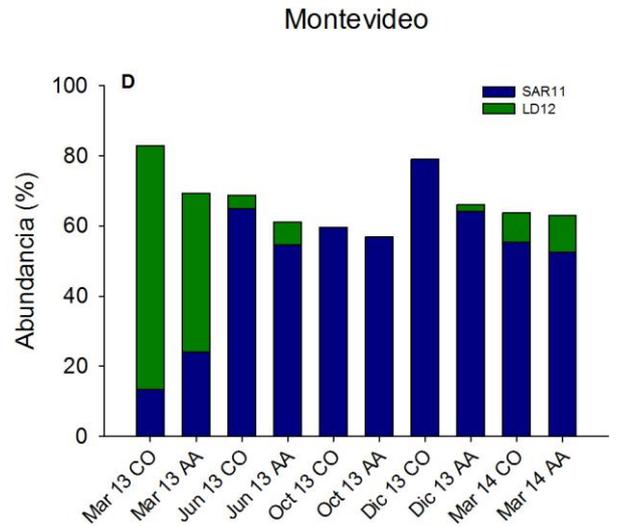
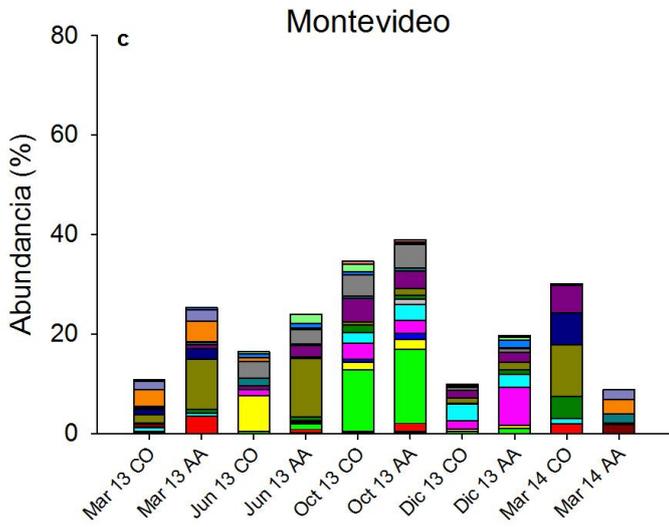
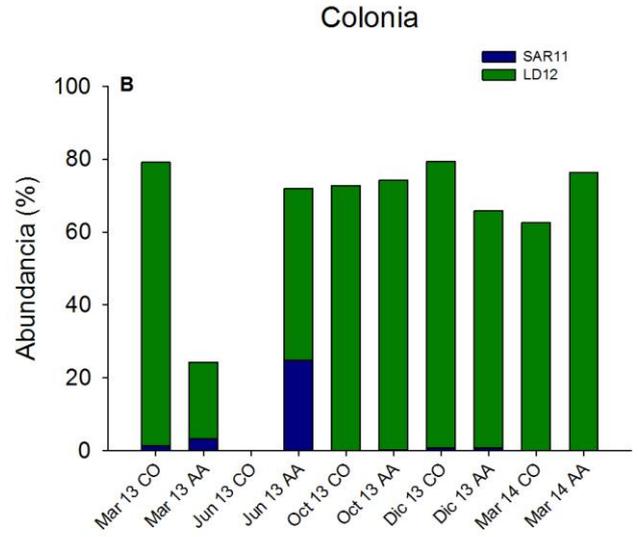
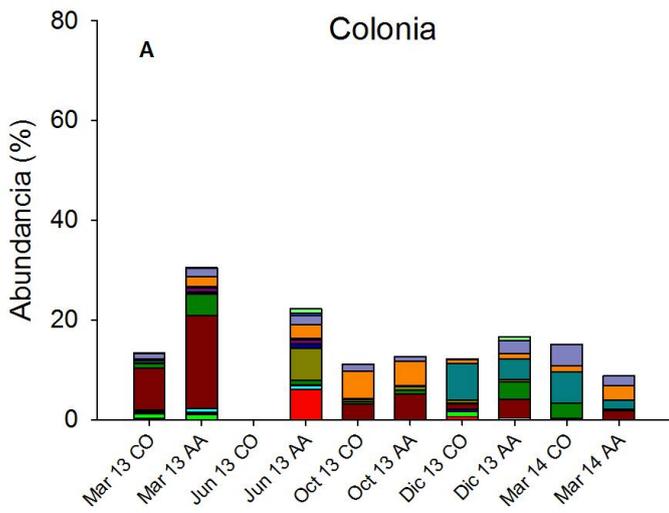
## Variabilidad en la composición de la comunidad bacteriana en el gradiente ambiental y temporal

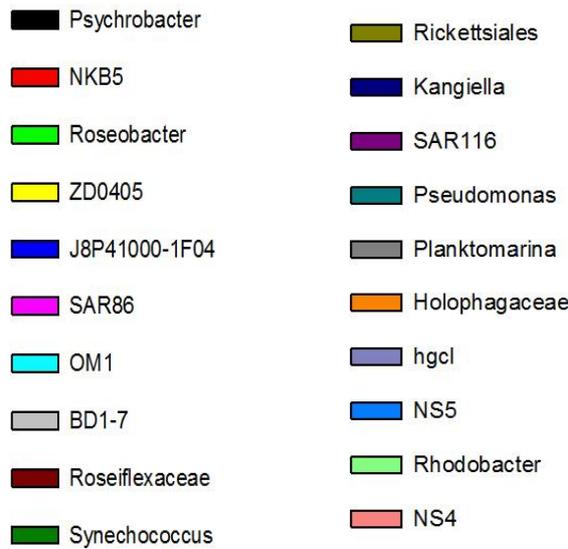
La agrupación de las especies en clados se dio mayormente a nivel de Géneros (44 %), Familias (25 %) y Órdenes (20 %), aunque también estuvieron representados Clases (6 %) y Fila (5 %).

Se obtuvo un total de 285 clados, de los cuales 22 estuvieron representados por al menos el 1 % de las secuencias obtenidas, y fueron considerados los más abundantes. Estos clados representaron desde el 55 al 95 % de la abundancia total por muestra. Los clados LD12 y SAR11 (ambos de la clase *Alfaproteobacteria*), dominaron la comunidad bacteriana total del sistema (Fig. 12B D y F). LD12 dominó en las muestras de Colonia mientras que SAR11 dominó en Punta del Este (Fig. 12B y F). Asimismo, en Montevideo SAR11 fue el clado más representativo, aunque LD12 también se hizo presente (Fig. 12D).

La composición de la comunidad bacteriana mostró diferencias según la zona y en algunos casos según el mes, variando las proporciones de los clados, como se aprecia en las Figura 12 para los clados más abundantes.

Las comunidades de Montevideo y de Punta de Este, fueron las más similares, debido a que ambas zonas estuvieron mayoritariamente representadas por los clados *Rickettsiales*, *Roseobacter*, ZDO405, SAR86, SAR116, *Planktomarina*, *Kangiella*, *Rhodobacter* y NS4. Por otro lado, en Colonia se aprecia la presencia de ciertos clados en mayores proporciones respecto a Montevideo y a Punta del Este, como *Roseiflexaceae* y hgcl, y una mayor similitud con Montevideo respecto a Punta del Este, por ejemplo a causa de una mayor proporción de *Holophagaceae* y *Pseudomonas* en ambas zonas. En general, se observa que Colonia fue la zona donde la dominancia de los clados LD12 y SAR11 fue mayor respecto al resto de los 20 clados más abundantes. Luego le siguió Montevideo, mientras que en Punta del Este la proporción de la comunidad representada por estos dos clados fue menor como consecuencia de una mayor presencia del resto de los clados, lo que hizo que esta zona sea la más equitativa.





**Figura 12.** Composición de la comunidad bacteriana para los clados más abundantes, A y B: Colonia, C y D: Montevideo, E y F: Punta del Este

Los meses que mostraron mayores diferencias en la composición de la comunidad bacteriana fueron Junio y Octubre de 2013 (Fig.12). Esto se reflejó en una mayor proporción de ciertos clados, por ejemplo, NKB5 presentó un pico en Junio en Colonia y en Octubre en Punta del Este (tanto en costa como en aguas abiertas), *Rickettsiales* presentó una mayor proporción en la comunidad de Colonia en Junio; *Roseobacter* también fue mayor en Octubre de 2013 tanto en Colonia como en Punta del Este (para costa y para aguas abiertas), ZDO405 presentó un pico en Junio en Montevideo y en Octubre y en Diciembre en Punta del Este (en las muestras de costa y de aguas abiertas) y *Planktomarina* fue mayor en Octubre en Montevideo y en Junio en Punta del Este (también para costa y para aguas abiertas). Por último, *Kangiella* se destacó por ser casi exclusivo en Montevideo y en Punta del Este, siendo más abundante en Marzo de 2013 y de 2014 (tanto para costa como para aguas abiertas) (Fig. 12).

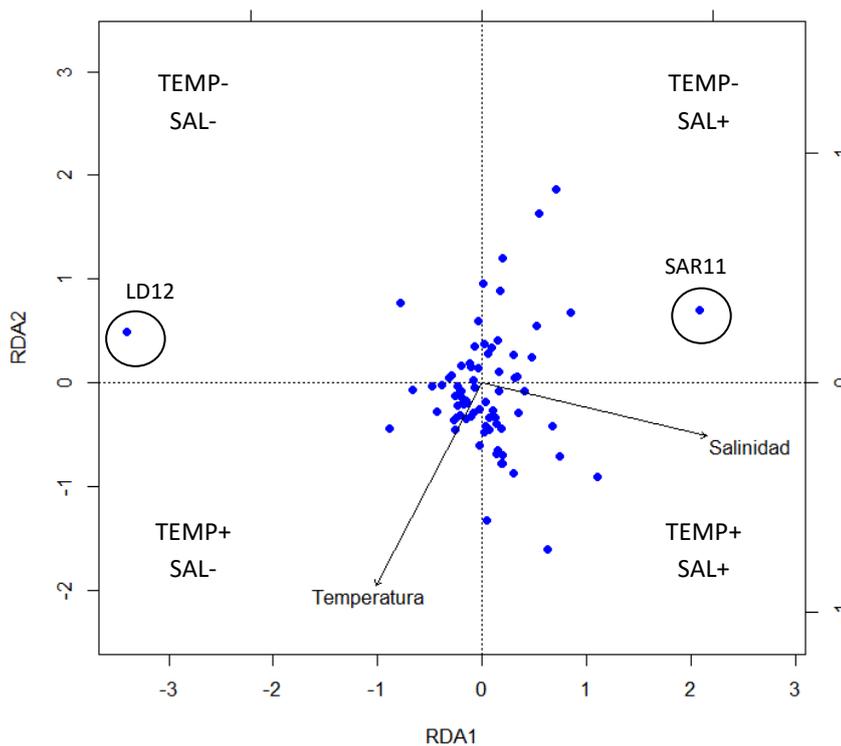
#### Determinación de grupos eco-fisiológicamente coherentes (GEFC)

De las muestras aguas abiertas, 76 clados presentaron abundancias mayores o iguales al 0.5 %, lo que representó entre el 91 y el 100 % de la abundancia total por muestra. A partir de estos clados se aplicaron los diferentes métodos de ordenación, aglomeración y partición para definir los GEFC de acuerdo a su distribución ambiental.

El análisis de redundancia (RDA) reveló un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la temperatura y la salinidad en la ordenación de las muestras y de los clados (Fig. 13). Asimismo, se observa

una correlación negativa de la temperatura con el eje RDA 2 ( $r^2 = -0.88$ ), en tanto que la salinidad se correlacionó positivamente con el eje RDA 1 ( $r^2 = 0.90$ ) (Fig. 12). El eje 1 del RDA (RDA1) fue el que más explicó la varianza total de los datos, contribuyendo en un 43% a la varianza total.

A partir de la ordenación de los clados en el espacio del RDA (mediante sus *scores* respecto a los ejes RDA1 y RDA2), se definieron cuatro grupos, los cuales resumen la relación de los clados con las variables temperatura y salinidad: TEMP- SAL+ constituido por los clados con *scores* positivos para ambos ejes; TEMP+ SAL+ constituido por los clados con *scores* positivos para el eje RDA1 y negativos para el eje RDA2, TEMP+ SAL- constituido por los clados con *scores* negativos para ambos ejes; TEMP- SAL- representado por los clados con *scores* negativos para el eje 1 y positivos para el eje 2 (Fig. 13, Tabla 3).



**Figura 13.** Análisis de redundancia (RDA). Ordenación de los clados aguas abiertas con abundancias  $\geq 0.5$  % (representadas en círculos azules), según sus *scores* con los ejes RDA1 y RDA2.

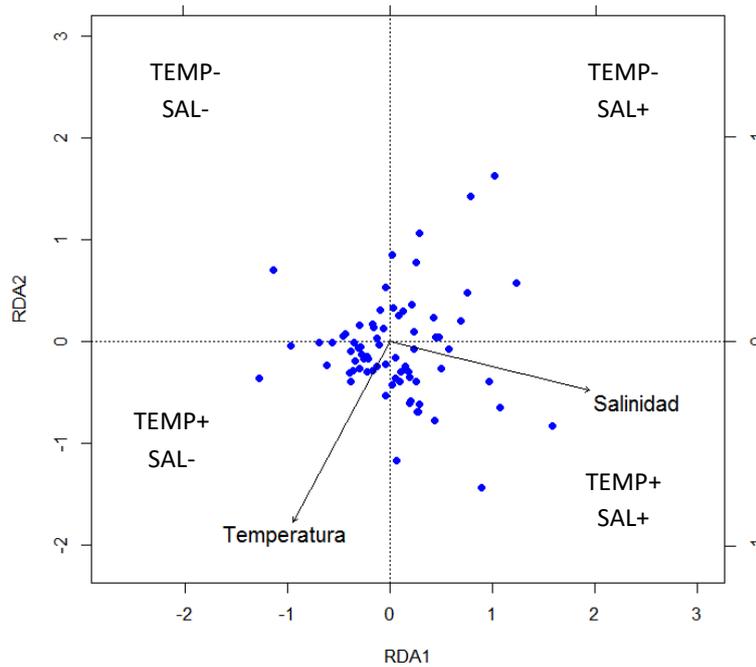
**Tabla 3.** Agrupación de los clados según los *scores* de los ejes 1 y 2 del RDA.

TEMP- SAL +	RDA1	RDA2	TEMP+ SAL +	RDA1	RDA2
OCS116	0.19	0.05	OM1	0.41	-0.3
Arcobacter	0.01	0.07	AEGEAN-169	0.07	-0.05
BAL58	0.01	0.18	BD1-7	0.26	-0.01
Halanaerobium	0.04	0.05	Caedibacter	0.01	-0.09
J8P41000-1F04	0.31	0.04	Flavobacteriaceae	0.13	-0.13
Lentibacter	0.11	0.02	Formosa	0.12	-0.01
NKB5	0.35	0.30	Kangiella	0.03	-0.24
NS5	0.20	0.01	Litorimicrobium	0.02	-0.07
OM43	0.06	0.06	Marinicella	0.10	-0.13
Owenweeksia	0.22	0.01	Marinomonas	0.20	-0.16
Piscirickettsiaceae	0.01	0.07	MB11C04	0.10	-0.10
Planktomarina	0.46	0.34	NOR5	0.08	-0.06
Psychrobacter	0.55	0.12	NS4	0.23	-0.06
Rickettsia	0.13	0.22	NS9	0.44	-0.08
Rickettsiales	0.12	0.16	OM75	0.02	-0.03
SAR11	1.36	0.13	Rhodobacter	0.13	-0.14
SAR116	0.34	0.10	Roseobacter	0.72	-0.17
			SAR324	0.12	-0.14
			SAR86	0.49	-0.13
			SUP05	0.04	-0.08
			Unc.Donghicola	0.05	-0.06
			Unc. Endosymbiont	0.11	-0.01
			ZD0405	0.44	-0.08

**Tabla 3 continuación.** Agrupación de los clados según los *scores* de los ejes 1 y 2 del RDA.

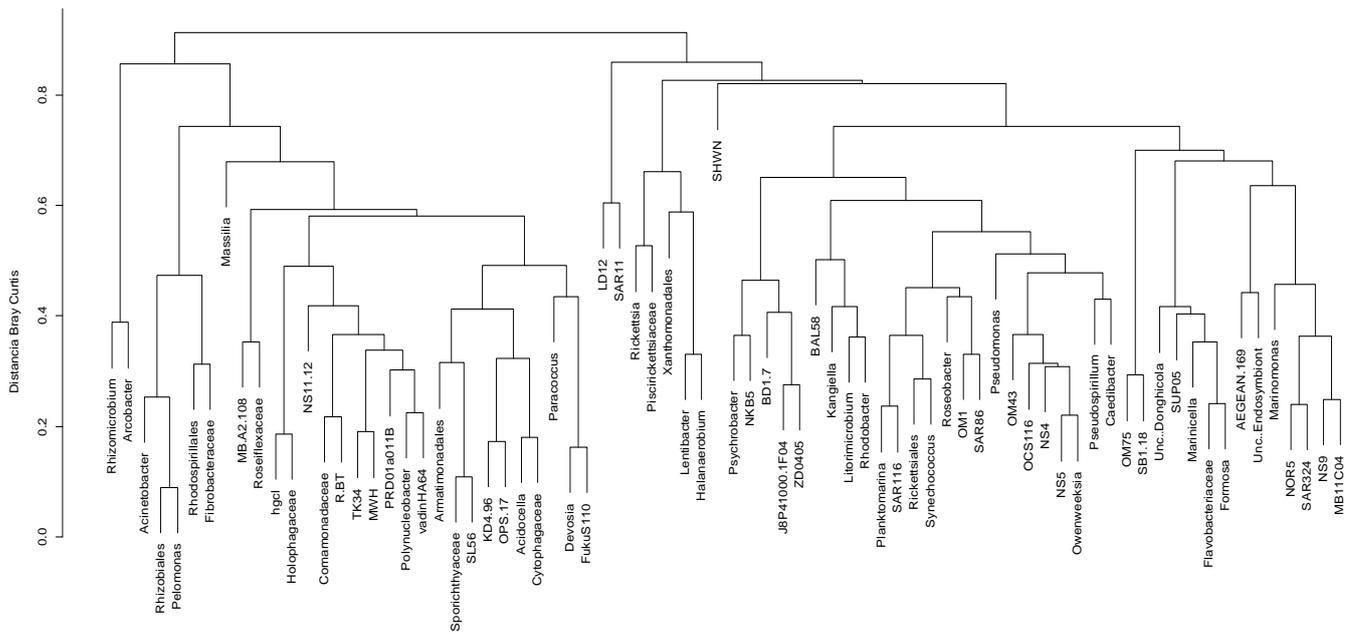
TEMP+ SAL -	RDA1	RDA2	TEMP- SAL -	RDA1	RDA2
Acidocella	-0.15	-0.04	Devosia	-0.05	0.01
Acinetobacter	-0.1	-0.03	Holophagaceae	-0.51	0.14
Armatimonadales	-0.17	-0.08	LD12	-2.23	0.09
Comamonadaceae	-0.13	-0.01	MWH	-0.19	0.01
Cytophagaceae	-0.15	-0.01	NS11-12	-0.21	0.00
Fibrobacteraceae	-0.13	-0.06	Paracoccus	-0.07	0.03
FukuS110	-0.04	-0.01	Pseudospirillum	0.02	0.02
hgcl	-0.43	-0.01	Rhizomicrobium	-0.04	0.06
KD4-96	-0.11	-0.04	SHWN	-0.07	0.03
Massilia	-0.1	-0.06	TK34	-0.13	0.03
MB-A2-108	-0.28	-0.05	Xanthomonadales	-0.02	0.11
OPS 17	-0.09	-0.04			
Pelomonas	-0.06	-0.05			
Polynucleobacter	-0.17	-0.02			
PRD01a011B	-0.31	-0.01			
Pseudomonas	-0.11	-0.04			
R-BT	-0.14	-0.01			
Rhizobiales	-0.07	-0.06			
Rhodospirillales	-0.02	-0.03			
Roseiflexaceae	-0.58	-0.08			
SB1-18	-0.02	-0.05			
SL56	-0.17	-0.07			
Sporichthyaceae	-0.16	-0.06			
Synechococcus	-0.02	-0.11			
vadinHA64	-0.25	-0.01			

En el RDA se destaca además la distribución de los clados LD12 y SAR11, los cuales mostraron una ordenación opuesta en el espacio y presentaron los mayores valores absolutos en sus *scores* RDA1 (-2.23 para LD12 y 1.36 para SAR11). A continuación se observa el resultado del mismo análisis pero sin considerar a ambos clados para observar si la distribución de los demás clados al no estar influenciada por la distribución extrema de LD12 y SAR11 queda mejor representada (Fig. 14). El resultado de este nuevo RDA presentó los mismos *scores* respecto a la relación de los clados con los ejes.



**Figura 14.** Análisis de redundancia (RDA). Ordenación de los clados aguas abiertas con abundancias  $\geq 0.5\%$  (representadas en círculos azules) sin LD12 y SAR11.

El análisis de *cluster* sugirió una primera agrupación en dos grandes grupos (Fig. 15). Esto concuerda con los resultados del RDA, debido a que los clados SAL+ quedaron separados de los otros clados (los SAL- en el RDA). Sin embargo, en el análisis de *cluster* es posible visualizar más de cuatro grupos, además de la agrupación de SAR11 y LD12 en un único cluster, indicando disimilitud respecto al resto de los clados y una mayor similitud entre sí (Fig. 15).



**Figura 15.** Clasificación jerárquica de muestras aguas abiertas por distancias de Bray Curtis, basado en las proporciones de los clados más abundantes (abundancias  $\geq 0.5$  % por muestra).

Por lo tanto, debido a que el análisis de *cluster* sugirió más de cuatro grupos y a que LD12 y SAR11 mostraron una agrupación particular en ambos análisis, el análisis de *k-means* fue realizado para seis grupos. Los resultados de este primer análisis de *k-means* resultaron en dos grupos constituidos cada uno exclusivamente por LD12 y SAR11, un tercer grupo representados mayoritariamente por clados SAL- según la agrupación del RDA, un cuarto y quinto grupo representados exclusivamente por clados SAL+ según el RDA y un sexto grupo conformado en su mayoría por clados SAL+.

A los tres grupos de agua salada resultantes del primer análisis de *k-means*, se los redujo a dos grupos. Para esto, a la totalidad de los clados que integraron dichos grupos se les realizó un análisis de *k-means* en dos grupos. Los resultados de esta separación no fueron consistentes con el RDA ya que no se logró visualizar con claridad una separación según la temperatura. Sin embargo, sí se observa una separación más consistente con el análisis de *cluster*, quedando finalmente un grupo constituido por clados TEMP+ SAL+ (denominado grupo 3: cálido y salado) y otro por clados SAL+ (denominado grupo 4: salado) de ambas temperaturas (Tabla 4).

Por otro lado, al grupo de los clados SAL- resultante del primer análisis de *k-means* se lo evaluó más detalladamente y se lo subdividió en dos grupos mediante un segundo análisis de *k-means*. Los dos nuevos grupos resultantes de este segundo análisis de *k-means* fueron consistentes con el análisis de *cluster*, además uno de ellos estuvo dominado por clados TEMP+ SAL- según el RDA. Estos grupos fueron denominados cálido y dulce, y dulce (Tabla 4).

**Tabla 4.** Análisis de *k-means* final, definiendo 6 grupos.

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3 (cálido y salado)</b>	<b>Grupo 4 (salado)</b>	<b>Grupo 5 (cálido y dulce)</b>	<b>Grupo 6 (dulce)</b>
LD12	SAR11	BD1-7 Flavobacteriaceae Formosa J8P41000-1F04 Marinicella NKB5 OCS116 Owenweeksia Piscirickettsiaceae Psychrobacter Rickettsia SUP05 Unc.Donghicola ZD0405	BAL58 Kangiella Litorimicrobium NS5 OM1 OM43 Planktomarina Rhodobacter Rickettsiales Roseobacter SAR116 SAR86 Synechococcus	Acidocella Armatimonadales Comamonadaceae Cytophagaceae hgcl Holophagaceae KD4-96 MB-A2-108 MWH NS11-12 Polynucleobacter PRD01a011B R-BT Roseiflexaceae SL56 Sporichthyaceae vadinHA64	Acinetobacter AEGEAN-169 Arcobacter Caedibacter Devosia Fibrobacteraceae FukuS110 Halanaerobium Lentibacter Marinomonas Massilia MB11C04 NOR5 NS4 NS9 OM75 OPS 17 Paracoccus Pelomonas Pseudomonas Pseudospirillum Rhizobiales Rhizomicrobium Rhodospirillales SAR324 SB1-18 SHWN TK34 Unc. Endosymbiont Xanthomonadales

De esta forma, con el objetivo de hallar una clasificación lo más consistente entre los tres análisis de clasificación empelados, la clasificación final fue en los seis grupos visualizados

en la Tabla 5: LD12. SAR11, cálido y salado, salado, cálido y dulce y dulce. Estos grupos fueron denominados grupos eco-fisiológicamente coherentes (GEFC)

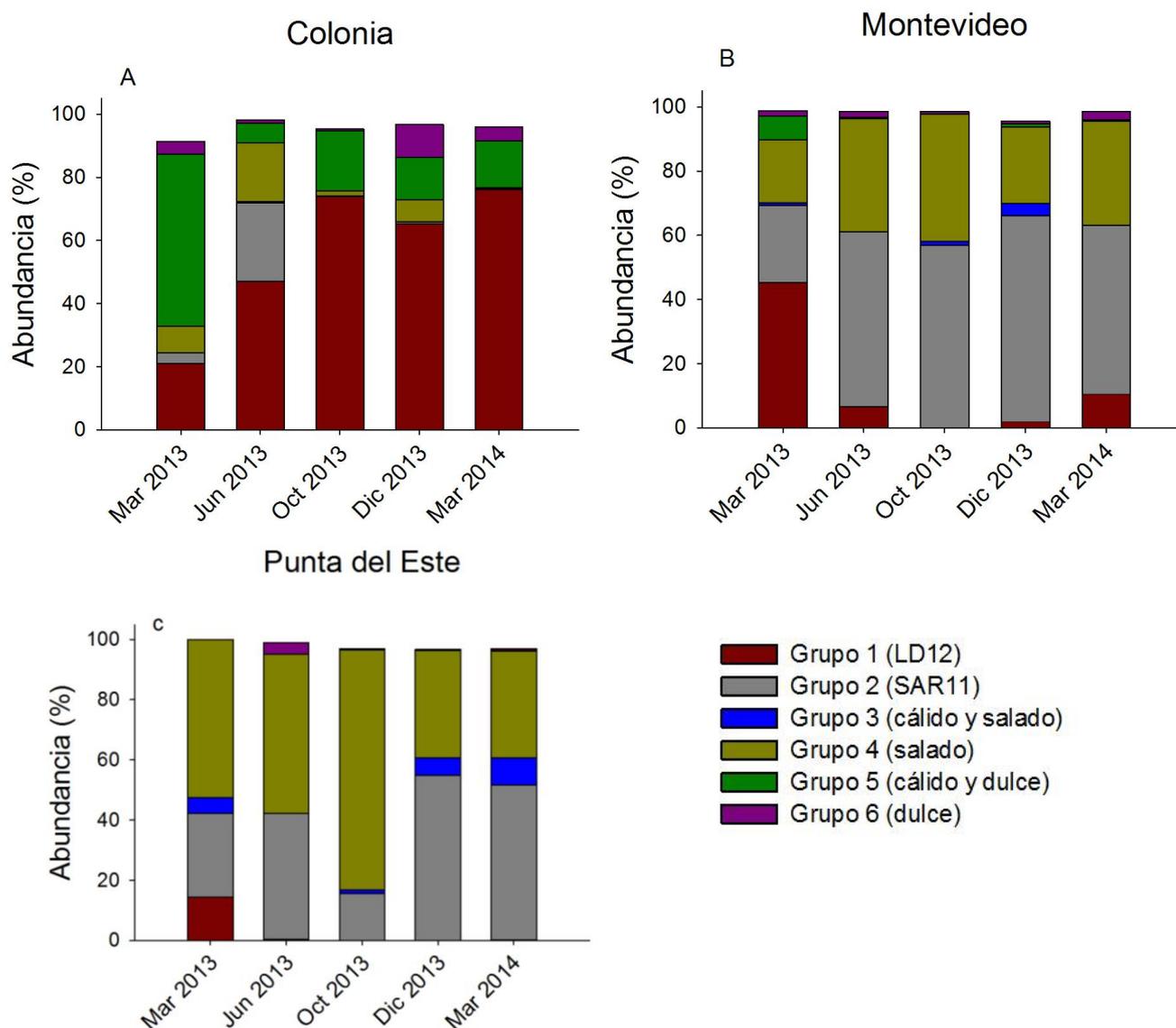
**Tabla 5.** Clasificación en seis GEFC consistente con los tres análisis de agrupación: RDA, análisis de *k-means* y análisis de *cluster*

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3 (cálido y salado)	Grupo 4 (salado)	Grupo 5 (cálido y dulce)	Grupo 6 (dulce)
LD12	SAR11	AEGEAN.169 Flavobacteriaceae Formosa Marinicella Marinomonas MB11C04 NOR5 NS9 OM75 SAR324 SB1.18 SUP05 Unc. Donghucola Unc. endosymbiont	BAL58 BD1.7 Caedibacter Halanaerobium J8P41000.1F04 Kangiella Litorimicrobium NKB5 NS4 NS5 OCS116 OM1 OM43 Owenweeksia Piscirickettsiaceae Planktomarina Psychrobacter Rhodobacter Rickettsia Rickettsiales Roseobacter SAR116 SAR86 Synechococcus ZD0405	Acidocella Armatimonadales Comamonadaceae Cytophagaceae hgcl Holophagaceae KD4-96 MB-A2-108 MWH-UniP1 NS11-12 Polynucleobacter PRD01a011B R-BT Roseiflexaceae SL56 Sporichthyaceae vadinHA64 TK34-Unc.	Acinetobacter Arcobacter Devosia Fibrobacteraceae FukuS110 Lentibacter Massilia OPS 17 Paracoccus Pelomonas Pseudomonas Pseudospirillum Rhizobiales Rhizomicrobium Rhodospirillales SHWN Xanthomonadales

En la Figura 16 se observa la distribución de los seis GEFC para las tres zonas y para los cinco meses. Además de la mencionada dominancia de LD12 y SAR11, el grupo 5 (cálido y dulce) fue de los más representativos en Colonia, alcanzando una máxima proporción en la comunidad de un 54 % en Marzo de 2013 (Fig. 16A), luego en Montevideo su máxima proporción fue también en Marzo de 2013, pero decayó a un 7 % (Fig. 16B), y en Punta del Este estuvo ausente (Fig. 16C). El grupo 6 (también de agua dulce), igualmente fue más representativo en Colonia, pero su máxima proporción fue de un 10 % en Diciembre de 2013

(Fig. 16A), mientras que en Montevideo representó entre un 1 y un 3 % en todos los meses (Fig. 16B) y en Punta del Este sólo estuvo presente únicamente en Junio de 2013 con una proporción del 4 % (Fig. 16C).

Los dos grupos de agua salada siguieron un patrón inverso a los de agua dulce, proliferando en Punta del Este y disminuyendo en Colonia. El grupo 3 (cálido y salado), estuvo representado por proporciones entre un 1 y un 9 % en Punta del Este en todos los meses menos en Junio de 2013 que estuvo ausentes (Fig. 16C), luego en Montevideo se halló en Marzo, Octubre y Diciembre de 2013 con proporciones del 1 y 4 % (Fig.16B), y en Colonia no se detectó. El grupo 4 (salado), aunque fue muy poco representativo en Colonia, estuvo presente en las tres zonas. En Punta del Este dominó a la comunidad bacteriana con proporciones de entre un 35 y hasta un 80 % (en Octubre de 2013) (Fig. 16C), en Montevideo también fue relativamente de los grupos más representativos, con proporciones entre el 20 y el 40 % (en Octubre de 2013), en tanto que en Colonia decayó, detectándose un máximo en Junio de 2013 con una proporción del 19 % (Fig. 16A).

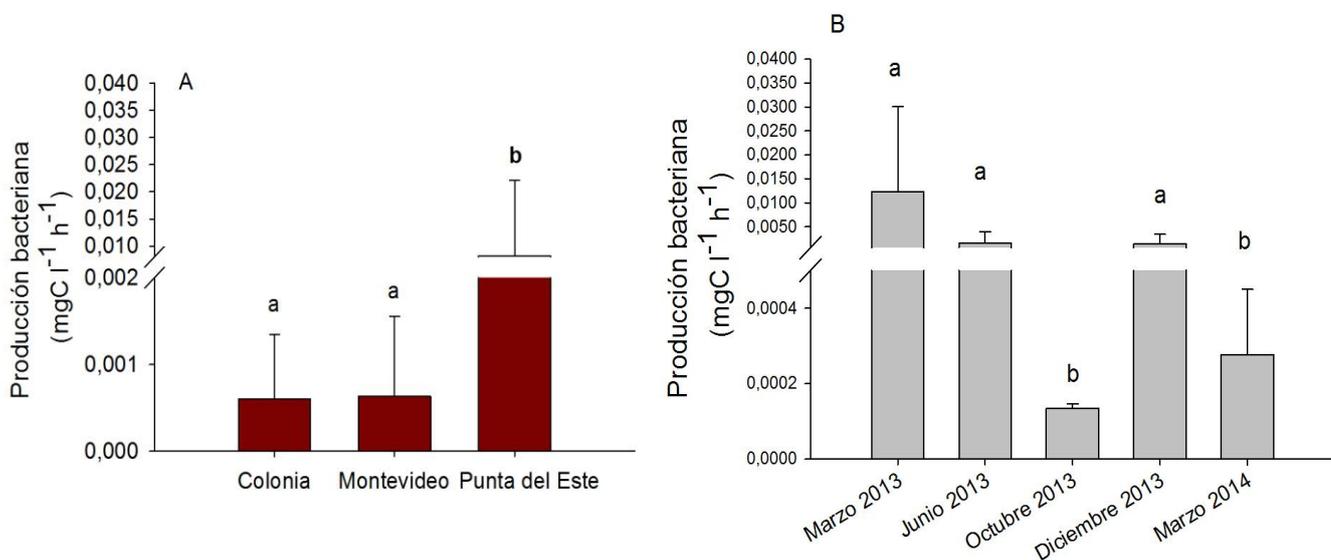


**Figura 16.** Distribución de los seis GEFC (Grupos Ecofisiológicamente Coherentes) en A) Colonia B) Montevideo y C) Punta del Este

### Variaciones espaciales y temporales en la producción bacteriana

La producción bacteriana fue estimada a partir de la leucina añadida (como sustrato de incorporación marcado radioactivamente), a una concentración de 40 nM. En el anexo 1 se presentan los resultados de los experimentos realizados con el fin de determinar la concentración adecuada de leucina añadida, para las posteriores estimaciones de producción bacteriana en el presente sistema de estudio.

Los valores de producción bacteriana estimados para las 15 muestras de aguas abiertas, presentaron valores entre  $1.27 \times 10^{-04}$  y  $3.28 \times 10^{-02}$  mg C l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. La producción bacteriana fue significativamente mayor en Punta del Este (Tukey test  $p < 0.05$ ), mientras que Colonia y Montevideo no presentaron diferencias significativas (Fig. 17A). Asimismo, la producción bacteriana varió entre los distintos meses evaluados. En Marzo de 2013 se observa la mayor producción, la cual varió significativamente respecto a Octubre y a Marzo de 2014 (Tukey test  $p < 0.001$ ), meses donde los valores de producción fueron menores. Por último en Junio y en Diciembre, la producción presentó valores intermedios y similares entre sí (Fig. 17B).

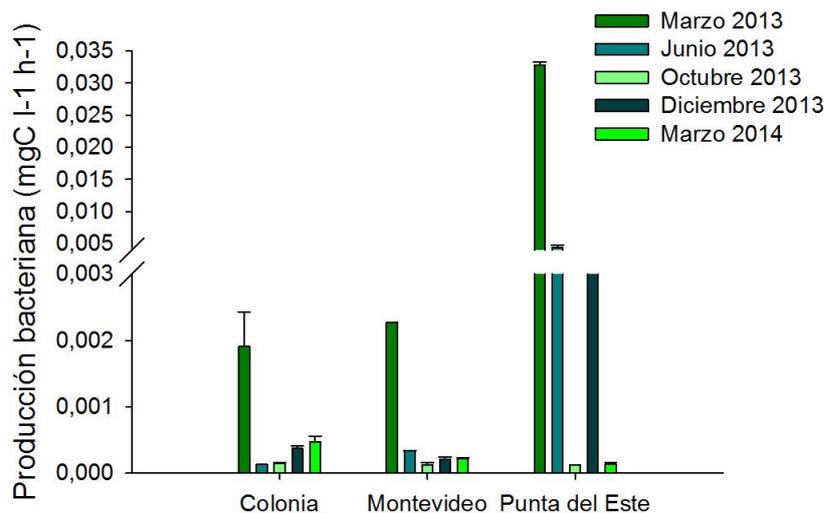


**Figura 17.** Producción bacteriana (mg C l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) para las tres zonas evaluadas (A) y entre los cinco meses (B)

El elevado valor de producción bacteriana observado en Marzo de 2013 se dio en las tres zonas, aunque en Punta del Este fue 16 veces mayor respecto a Colonia y a Montevideo (Fig. 18). Además de destacarse por dicho pico de producción en Marzo de 2013, en Punta del Este la producción fue significativamente mayor (Tukey test  $p < 0.05$ ) en Junio de 2013 y en Octubre de 2013 respecto a las demás zonas. Estos altos valores de producción encontrados en Punta de Este, fueron comparables con los altos valores que se dieron en Marzo de 2013 para Montevideo y Colonia.

Por otro lado, independientemente al pico de producción encontrado en Marzo de 2013 en Colonia, en Diciembre de 2013 y Marzo de 2014 la producción fue significativamente mayor

respecto a Junio de 2013 y Octubre de 2013 (Tukey test  $p \leq 0.001$ ), meses que se corresponden con los menores valores de producción bacteriana para Colonia, sin encontrarse diferencias significativas entre sí (Fig. 18). En Montevideo, también independientemente al alto valor de producción determinado en Marzo de 2013, la producción fue significativamente mayor en Junio de 2013 respecto a Octubre (Tukey test  $p \leq 0.001$ ), mes donde la producción fue menor (Fig. 19).



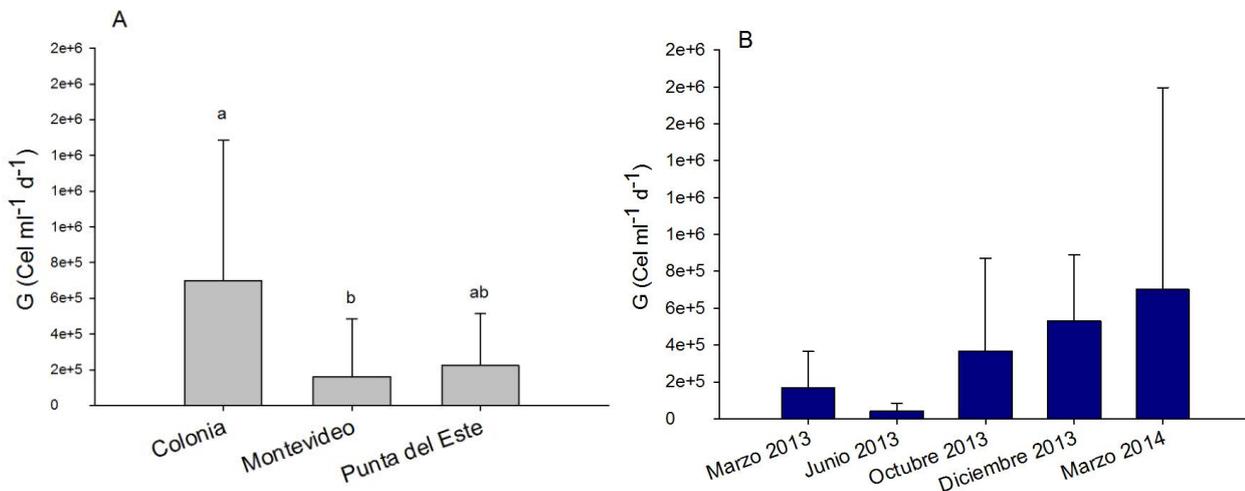
**Figura 18.** Dinámica global de la producción bacteriana en las tres zonas evaluadas.

#### Tasa de depredación bacteriana a lo largo del gradiente ambiental y temporal

Al igual que para las estimaciones de producción bacteriana, la tasa de depredación bacteriana fue estimada para las 15 muestras aguas abiertas, como G: cantidad de células bacterianas consumidas por volumen (ml) y por tiempo (día). G varió desde  $6.68 \times 10^2$  a  $1.96 \times 10^6$  bacterias removidas por ml y por día.

Al observar las variaciones en la tasa de depredación para las distintas zonas evaluadas, se concluye una mayor depredación en Colonia siendo marginalmente significativamente respecto a Montevideo (Tukey test  $p = 0.05$ ), zona donde la depredación fue menor (Fig. 19A).

Por otro lado, la tasa de depredación bacteriana fue menor en Marzo y en Junio de 2013, respecto al resto de los meses, mientras que el mayor valor se observó en Marzo de 2014, aunque dichas diferencias no fueron significativas (Fig. 19B).



**Figura 19.** Tasa de depredación bacteriana (G) por día en función de las tres zonas evaluadas (A) y de los cinco meses (B).

### Relación entre diversidad bacteriana y producción bacteriana

El modelo que relacionó a la producción bacteriana con la diversidad y las variables ambientales y que presentó un mayor porcentaje en la devianza explicada (75 %), consideró un efecto marginalmente significativo y positivo dado por la riqueza observada ( $S_{obs}$ ) ( $p = 0.05$ ), al igual que para la equitatividad de Simpson (E) aunque su efecto fue significativo ( $p < 0.05$ ). Asimismo, el modelo consideró un efecto significativo y positivo dado por las variables ambientales temperatura (Temp) ( $p < 0.01$ ), clorofila a (Cloa) y nitrógeno total (NT) ( $p < 0.05$ ) sobre la producción bacteriana. La ecuación (1) describe dicho modelo:

$$(1) \text{ Log PB} = 0.16 S_{obs} + 9.84 E + 0.37 \text{ Temp} + 0.44 \text{ Cloa} + 4.14 \text{ NT} - 23$$

Por otro lado, el modelo que relacionó a la producción bacteriana con la equitatividad de Shannon (J) y que presentó un mayor porcentaje en la devianza explicada (46 %), reflejó un efecto significativo y positivo dado por la equitatividad de Shannon (J) ( $p < 0.05$ ), además de un efecto marginalmente significativo y positivo dado por la temperatura ( $p = 0.08$ ). La ecuación (2) describe dicho modelo:

$$(2) \text{ Log PB} = 9.03 \text{ J} + 0.18 \text{ Temp} - 16.13$$

La riqueza estimada por el índice de Chao ( $S_{\text{Chao}}$ ), no fue retenida en ningún modelo dado que no mostró efecto significativo sobre la producción bacteriana.

Finalmente la producción bacteriana no se relacionó significativamente con la tasa de depredación bacteriana ( $p > 0.05$ ).

#### Relación entre diversidad bacteriana y tasa de depredación bacteriana

La tasa de depredación bacteriana (G) no se relacionó ni con la riqueza ni con la equitatividad. El modelo que presentó un mayor porcentaje en la devianza explicada (55 %), consideró un efecto significativo y positivo dado por la temperatura ( $p < 0.01$ ), y un efecto significativo y negativo dado por el fósforo total (PT) ( $p < 0.05$ ). La ecuación (3) describe dicho modelo:

$$(3) \text{ Log G} = 0.36 \text{ Temp} - 0.03 \text{ PT} + 7.24$$

#### Relación entre los GEFC con la producción bacteriana y la tasa de depredación bacteriana

La producción bacteriana se relacionó significativamente y positivamente con las proporciones de los seis GEFC ( $p < 0.05$ ), mediante el modelo (4) el cual presentó un 65 % en la devianza explicada:

$$(4) \text{ Log PB} = 0.87 \text{ Gr1} + 0.87 \text{ Gr2} + 1.32 \text{ Gr 3} + 0.89 \text{ Gr 4} + 1.01 \text{ Gr 5} + 1.02 \text{ Gr 6} - 94.4$$

Al considerar el efecto de los GEFC por sí solos sobre la producción bacteriana, se observó un efecto significativo y positivo dado por los grupos 3 y 4 (cálido y salado, y salado respectivamente) ( $p < 0.05$ ) mediante los modelos (5) y (6), los cuales presentaron un 28 % y un 30 % en la devianza explicada respectivamente:

$$(5) \text{ Log PB} = 0.39 \text{ Gr 3} - 6.9$$

$$(6) \text{ Log PB} = 0.05 \text{ Gr 4} - 7.8$$

A diferencia de esto, la tasa de depredación bacteriana se relacionó significativamente y negativamente con todos los GEFC menos con el 3 (cálido y salado) ( $p < 0.05$ ), mediante el modelo (7), el cual presentó un 64 % de la devianza explicada:

$$(7) \text{ Log G} = -0.42 \text{ Gr 1} - 0.48 \text{ Gr 2} - 0.45 \text{ Gr 4} - 0.47 \text{ Gr 5} - 0.50 \text{ Gr 6} + 55.24$$

Si bien dichos grupos en el modelo (7) tuvieron un efecto significativo sobre la tasa de depredación bacteriana ( $p < 0.05$ ), la significancia del grupo 6 fue mayor ( $p = 0.006$ ).

## **Discusión**

### Variables ambientales y biológicas

La mayoría de las variables ambientales registradas en el presente trabajo, siguieron un gradiente ambiental desde la parte interna hacia la zona externa del estuario (de Colonia a Punta del Este) (Fig. 3 y 4), al igual que lo registrado en estudios previos en dicho sistema (Nagy et al., 2002, Calliari et al., 2005, Alonso et al., 2010, Kruk et al., 2014). La variable que más difirió respecto a lo encontrado en trabajos previos, fue la clorofila a, ya que se ha reportado una máxima concentración en el frente estuarino (Nagy et al., 2002, Calliari et al., 2009, Kruk et al., 2014), mientras que aquí su concentración fue máxima en la zona externa del estuario (Punta del Este).

### Diversidad de la comunidad bacteriana: variaciones espaciales y temporales

El valor de riqueza reportado en el presente trabajo (828 OTUs), está dentro del rango de lo esperado en relación a otros trabajos en estuarios (Crump et al., 1999, Troussellier et al., 2002, Hewson & Fuhrman 2004, Andersson et al., 2010, Fortunato et al., 2012, Alonso Sáez et al., 2015,). Sin embargo, no es sencillo estimar un valor “estándar” de riqueza bacteriana para sistemas estuarinos ya que los resultados son muy variables debido a diferencias en los sistemas de estudio, los métodos empleados para estimar la diversidad bacteriana, el diseño metodológico y, en los casos que comprenden secuenciación masiva, el análisis bioinformático llevado a cabo.

El hallazgo de una mayor riqueza observada en Colonia (464 OTUs), coincide con un estudio previo en el Río de la plata (Alonso et al., 2010), quienes encontraron una mayor riqueza en la zona de agua dulce (124 OTUs), para las muestras de superficie. Por otro lado, los presentes resultados, revelaron una menor riqueza (226 OTUs) y un menor número de OTUs únicos en el Montevideo (frente estuarino), resultado que concuerda con lo observado por Campbell & Kirchhman (2013), para muestras superficiales en el gradiente ambiental presente en la Bahía Delaware, cuyo rango de salinidad fue similar al reportado aquí y la técnica empleada también fue secuenciación masiva.

Un patrón observado para los macroorganismos en las regiones frontales de los estuarios, indica una baja riqueza biológica, atribuido al estrés metabólico sufrido como consecuencia de los bruscos cambios en la salinidad (Remane 1934, LeFevre 1986). Para bacterias, existe evidencia contradictoria, en el sentido de que varios grupos que dominan los sistemas de agua dulce, no soportan incrementos en la salinidad (Crump et al., 1999, Troussellier et al., 2002, Fortunato 2012), pero se ha visto que un mismo grupo bacteriano puede soportar diferentes salinidades (Giovannoni et al., 1990, Hollibaugh et al., 2000, Morris et al., 2002, Hewson et al., 2004). Por lo tanto, la diversidad bacteriana no necesariamente sería menor en estas regiones de transición y existe evidencia a favor de lo contrario (Herlemann et al., 2011, Wang et al., 2011). Los presentes resultados indicaron una menor riqueza en Montevideo, concluyendo que para la superficie del Río de la Plata, las comunidades bacterianas irían a favor del patrón que indica una menor riqueza en el frente estuarino.

Las tres zonas presentaron una clara diferenciación en términos de la composición de su comunidad bacteriana, sobre todo entre Colonia y las otras 2 zonas. Una de las principales causas de estas diferencias, son las variaciones encontradas en los factores ambientales. En particular, la salinidad y la temperatura fueron los principales factores en estructurar a la comunidad bacteriana, al igual que lo demostrado previamente en el Río de la Plata (Alonso et al., 2010) y como se ha visto en diversos sistemas estuarinos (Glockner et al., 1999, Lozupone & Knight, 2007, Barberán & Casamayor, 2010). La salinidad comprende un fuerte factor en determinar la distribución espacial de las comunidades bacterianas, resultando en importantes variaciones entre las comunidades de agua marina y de agua dulce (Glockner et al. 1999).

Otro factor de control importante sobre la distribución espacial de las bacterias en estuarios, es el tiempo de retención del agua. Se ha demostrado que tiempos cortos de retención del agua, impide la formación de comunidades propias de cada zona (Hewson & Fuhrman 2004). Por ejemplo en la pluma del Río Rhone, donde el tiempo de retención del agua es menor a 6 horas (Troussellier et al., 2002), se ha encontrado una gran homogeneidad entre las poblaciones de agua dulce y marina. Por lo tanto, es posible que un largo tiempo de retención del agua en el Río de la Plata, como se ha reportado de 40 días (Nagy et al., 2002), contribuya a la diferenciación entre las zonas. Esto se ha demostrado por ejemplo en el estuario de Massachusetts, donde la zona estuarina con mayor tiempo de retención del agua (en promedio entre 10 a 11 días) posibilitó la formación de una comunidad propia a salinidades intermedias

(Crump et al., 2004). Asimismo, Herleman et al., (2011) identificó en el Mar Báltico, poblaciones únicas estuarinas, debido a que el tiempo de retención del agua supera a los tres años, permitiendo que dichas poblaciones se establezcan.

Las variaciones temporales detectadas en el presente trabajo, revelan recurrencia temporal, debido a que las comunidades de ambos marzos (2013 y 2014) fueron las más similares (Fig. 7). Este hallazgo concuerda con la repetitividad temporal reportada por Fuhrman et al., (2006), quienes detectaron una distribución altamente predecible para grupos particulares de bacterias en las costas del sur de California durante un muestreo de cuatro años y medio.

A nivel de clados las diferencias en la composición de la comunidad bacteriana entre meses fueron más notorias en Montevideo y en Punta del Este (Fig. 12). A diferencia de esto, Colonia fue la zona con menor variación en la composición de su comunidad bacteriana y la similitud entre los meses fue mayor (Fig. 12). Esto concuerda con trabajos previos donde se vio que las comunidades de sistemas de agua dulce, no mostraban patrones estacionales tan marcados en relación a las de los sistemas marinos (Lindstrom 1998, Yannarell et al., 2003, Kent et al., 2004).

### Producción bacteriana

Los valores de producción bacteriana determinados en el presente trabajo, estuvieron dentro del rango estimado previamente para este sistema y comúnmente reportado en otros estuarios (Kirchman & Hoch 1988, Crump & Baross 1996, Troussellier et al., 2002, Crump et al., 2004). En una campaña realizada en marzo de 2008 en el Río de la Plata, se encontraron mayores valores de producción bacteriana en la zona media del estuario, correspondiéndose a Montevideo (Alonso datos no publicados). A diferencia de esto, los resultados reportados en el presente trabajo señalan una mayor producción en la zona externa del estuario (Punta del Este) (Fig.17). Sin embargo, ambos trabajos presentan diferencias metodológicas y de condiciones ambientales que potencialmente explican las diferencias observadas. En cuanto al aspecto metodológico, una diferencia importante es la concentración a la cual la leucina utilizada como trazador fue añadida. Los resultados previos de producción bacteriana se basan en el empleo de una concentración de leucina de 10 nM, a diferencia de la concentración de 40 nM aquí empleada. Como se ha demostrado en el anexo 1, una concentración de 10 nM no es la ideal para determinar producción bacteriana en el Río de la

Plata, debido a que para ese valor en ninguno de los casos evaluados la incorporación de dicho sustrato fue máxima.

Por otra parte, una de las conclusiones más aceptadas, sugiere que los frentes estuarinos sostienen una mayor producción bacteriana debido a que son las zonas de mayor biomasa fitoplanctónica, la cual se encuentra acoplada con las tasas de producción bacteriana (Kirchman & Hoch 1988, Hoch & Kirchman 1993, Crump & Baross 1996, Crump et al., 2004). Esto se debe a que el fitoplancton constituye una importante fuente de carbono orgánico, empleado por las bacterias heterótrofas en los sistemas acuáticos (Cole et al., 1988, Azam, 1998).

Si bien el estudio previo realizado en el Río de la Plata muestra dicho patrón de máximo de producción asociado a máximo de clorofila en el frente estuarino (Alonso no publicado, Kruk et al., 2014), en el presente trabajo la producción bacteriana también se relacionó positivamente con la clorofila a (modelo 1), pero en la zona externa del estuario. Esto estaría sugiriendo que la materia orgánica derivada del fitoplancton es un soporte importante en la producción bacteriana en el Río de la Plata.

Finalmente, el efecto positivo dado por la temperatura sobre la producción bacteriana (señalado en el modelo 1), es conocido en los sistemas acuáticos (Pomeroy & Deiblet 1986).

#### Tasa de depredación bacteriana

El efecto dado por la depredación bacteriana está relacionado con la productividad del sistema, postulándose que en los sistemas más oligotróficos existe un mayor impacto en la depredación por parte de los flagelados, debido a un mayor acople entre las bacterias y estos, en relación a los sistemas eutróficos (Gasol et al., 2002). Contrariamente, en los sistemas eutróficos la depredación por parte de los metazoos tiene mayor impacto en relación a los protistas (Pace & Cole 1996).

Los presentes resultados indican una mayor depredación bacteriana en la zona más oligotrófica del sistema, dado que Colonia presentó la menor concentración de clorofila a. Asimismo, la tasa de depredación bacteriana se relacionó negativamente con la concentración de fósforo (modelo 3), por lo que dichos resultados sugieren una relación negativa entre la depredación y la productividad. Sin embargo, la aproximación experimental llevada a cabo

en el presente trabajo, contempló a la depredación por parte de todos los depredadores bacterianos, por lo que no es posible concluir una mayor depredación en Colonia a causa del impacto por parte de los protistas.

Por otro lado, la temperatura ejerció un efecto positivo sobre la depredación bacteriana (modelo 3), al igual que lo reportado en otros trabajos (Gonzales et al., 1990, del Giorgio et al., 1996).

### Relaciones diversidad-función

La existencia de una relación positiva entre la diversidad y las funciones ecosistémicas ha sido demostrado principalmente en plantas, mediante la manipulación experimental de la riqueza y la medición de funciones ecosistémicas, como producción de biomasa y el consumo de nutrientes del suelo (Tilman et al., 1996 y 1997, Hector et al., 1999).

Trabajos posteriores, han incluido a varios grupos tróficos (inclusive bacterias) así como diversos ecosistemas (Cardinale et al., 2006). Estos trabajos demostraron un efecto negativo en la biomasa de los grupos focales y un consumo menos eficiente de los recursos al disminuir la riqueza (Cardinale et al., 2006).

Los resultados del presente trabajo, evidencian una relación positiva entre la función ecosistémica producción bacteriana con la diversidad, tanto en sus aspectos de riqueza como de equitatividad. La falta de relación entre el índice de riqueza esperada Chao, y la producción bacteriana, estaría indicando que no son las especies raras las que se relacionan con la producción, ya que dicho índice, incorpora a la riqueza observada, un factor de corrección para las especies raras (únicas y dobles). Estos resultados, junto a la relación positiva observada entre todos los grupos ecofisiológicamente coherentes (GEFC) con la producción, indicaría que no son unas pocas especies muy abundantes las responsables de una mayor producción. Por lo tanto, el mecanismo implicado iría a favor de la coexistencia de las especies gracias a la diversificación del nicho, concluyendo en un uso más eficiente de los recursos y por lo tanto en una mayor producción. Sin embargo, los resultados también evidencian la presencia de grupos cuya abundancia se relaciona más fuertemente con la producción (discutido en la siguiente sección) lo que iría más a favor del “efecto de muestreo”, implicando un aumento en la producción a causa de la presencia de ciertas

especies claves, y no debido al mayor número de especies por sí mismo (Cardinale et al., 2006).

Cabe destacar que la producción bacteriana se relacionó asimismo significativamente y de forma positiva con la clorofila a. Por lo tanto, la productividad del sistema podría estar condicionando una mayor producción bacteriana en Punta del Este. Estos resultados concuerdan con lo postulado por Cardinale et al., 1999 en el sentido de que la función ecosistémica producción, es explicada por la acción conjunta del suministro de recursos y de la riqueza de las especies presentes.

Se ha postulado que la relación diversidad-función para las comunidades microbianas, depende del grado de especificidad de la función en cuestión (Krause et al., 2014). Esto significa que para una función muy específica (por ejemplo la degradación de celulosa o quitina), la relación se daría entre la riqueza de determinados grupos capaces de llevar a cabo dicha función, más que con la riqueza total de la comunidad. Por otro lado, para el caso de funciones más generales como crecimiento, respiración o producción, se relacionarían con la riqueza total (Peter et al., 2011). Este último sería el caso de la producción bacteriana, y de hecho existe evidencia de que varios de los clados aquí identificados y representantes de los seis GEFC, tienen la capacidad de incorporar leucina como sustrato para producir biomasa (Alonso & Pernthaler 2006b, Jin et al., 2011, Sarmiento & Gasol 2012, Pujalte et al., 2014).

En cuanto a la tasa de depredación bacteriana, ésta no se relacionó con la diversidad ni en sus aspectos de riqueza ni de equitatividad. Dado que la depredación es selectiva hacia las bacterias más activas (del Giorgio et al., 1996), era de esperar que la depredación se relacionara indirectamente y positivamente con la diversidad a causa del incremento en la producción bacteriana con la diversidad. Por lo tanto, la ausencia de relación entre producción y depredación, podría ser responsable de una falta de relación entre la diversidad y la depredación.

#### Relaciones entre los GEFC, producción bacteriana y tasa de depredación bacteriana

Si bien la especie es la unidad fundamental de organización biológica y su cuantificación medida en términos de riqueza afecta a las funciones ecosistémicas, esta relación no siempre es clara y se ha demostrado una mayor implicancia dada por los rasgos funcionales de los organismos, más que por su identidad (Tilman et al., 1997).

A modo de ejemplo, trabajos llevados a cabo con bacterias donde se relacionó la composición taxonómica estimada a nivel de especies/cepas con las funciones ecosistémicas tales como: producción de biomasa, respiración, tasa de crecimiento y eficiencia de crecimiento bacteriano, encontraron inconsistencia entre los cambios en la composición de la comunidad bacteriana con los cambios en la eficiencia de las funciones ecosistémicas (Langenheder et al., 2005, Lear et al., 2014). Estos autores concluyeron redundancia funcional, fenómeno que supone funciones intercambiables entre distintos taxones. Esto tendría un fuerte impacto a nivel ecosistémico, ya que supone que una pérdida en la diversidad bacteriana y cambios en la composición de la comunidad, no tendrían consecuencias en la función ecosistémica, debido a que diferentes taxones pueden mediar un mismo proceso (Green et al., 2008).

Sin embargo, un gran desafío en ecología microbiana, consiste en establecer el nivel jerárquico taxonómico adecuado, que muestre coherencia en las estrategias de vida o rasgos de los clados que lo constituyen, y si dichos clados comparten rasgos ecológicos únicos (Philippot et al., 2010).

Los trabajos donde se pretende clasificar a los organismos que comparten rasgos similares y relacionados a una determinada función ecosistémica en grupos funcionales, yendo más allá de la taxonomía clásica, han ido en aumento en los últimos años, siendo una aproximación ampliamente usada por ejemplo a nivel de otros componentes del plancton (Reynolds et al., 2002, Kruk et al., 2010, Flynn et al., 2013, Mitra et al., 2016). Sin embargo, son pocos los trabajos dentro de esta emergente área de investigación llevados a cabo con bacterias (Green et al., 2008, Uroz et al., 2009, Fierer et al., 2012), dada la dificultad para cuantificar los rasgos funcionales de las especies que conforman una comunidad, las cuales son enormemente diversas (Bruggeman et al., 2009).

Diversos estudios revelan biogeografía y patrones temporales seguidos por las comunidades bacterianas en sistemas naturales, a nivel de orden, clase e incluso filo, demostrando que dichas comunidades presentan coherencia ecológica a niveles taxonómicos superiores al de especie (Fierer et al., 2007, Philippot et al., 2009, Philippot et al., 2010, Alonso Sáez et al 2012, Amaral et al 2016). Sin embargo, es importante recalcar la limitación en las técnicas empleadas para caracterizar a las comunidades bacterianas en la mayoría de los trabajos, debido a que no logran caracterizar a la totalidad de la diversidad, sino que están sesgados a los grupos bacterianos más abundantes (Philippot et al., 2009). Esto puede generar errores a la hora de definir el nivel taxonómico adecuado en el cual las bacterias son ecológicamente

coherentes, ya que un taxón está representado por pocos grupos muy abundantes y por varios grupos presentes en abundancias muy bajas (Philippot et al., 2010), lo que lleva a que la ecología del taxón se describa únicamente basándose en los grupos más abundantes. Asimismo, aún es muy poco el conocimiento sobre como los rasgos funcionales de los microorganismos, varían a lo largo de gradientes ambientales a nivel de grandes escalas en los ecosistemas naturales (Ruiz Gonzalez et al., 2015).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mediante la técnica de secuenciación masiva Illumina, permitieron agrupar a las especies en clados, los cuales estuvieron fundamentalmente representados por los niveles taxonómicos orden, familia y género. Posteriormente, los clados fueron agrupados en seis grupos coherentes según sus preferencias ambientales, de las cuales la salinidad y la temperatura fueron las que mayor incidencia tuvieron en dicha agrupación. Esta agrupación, asume que los grupos presentan coherencia a nivel de su fisiología relacionada a su interacción con el ambiente (Legendre & Legendre, 1998), por lo que fueron denominados grupos ecofisiológicamente coherentes (GEFC).

En este nivel de análisis, fue posible observar una relación significativa y positiva entre las proporciones de las abundancias de los seis GEFC con la producción bacteriana, indicando una contribución a la producción bacteriana por parte de los seis grupos. Además, se destaca la contribución de los grupos 3 y 4, ya que al relacionarlos por sí solos con la producción bacteriana, se observó un efecto significativo y positivo. Esto último señala una mayor importancia para la función ecosistémica producción bacteriana por parte de los clados que integran a dichos grupos, y apoya a la interpretación de que hay grupos específicos que llevan a cabo primordialmente una función. Estos resultados apuntan al “efecto del muestreo” como mecanismo de relación entre mayor diversidad y mayor función (Cardinale 2006), dado que la proporción del GEFC 3 mostró una correlación significativa y positiva con la riqueza (ver anexo 3), indicando que las muestras con mayor riqueza tienen más abundancia de los clados focales (los más relacionados con la función).

El grupo 4 está constituido por 16 de los 20 clados más abundantes (aquellos con abundancias  $\geq 1\%$ ), sin considerar a SAR11 y LD12, en tanto que el grupo 3 no está constituido por ninguno de estos clados. Esto podría indicar una ausencia de relación entre la abundancia observada de un grupo bacteriano dado y su importancia para una determinada función ecosistémica. En concordancia con esto, también en un sistema estuarino (Estuario

Delaware), se observó correlación parcial entre la abundancia y actividad de diferentes grupos bacterianos (Campbell & Kirchman, 2013).

Por otra parte, existe evidencia que demuestra una gran actividad, generación de biomasa así como una participación clave en los ciclos biogeoquímicos por parte de ciertos clados que componen a los GEFC 3 y 4. Por ejemplo, se ha visto que el clado *Roseobacter* tiene una alta actividad y que pequeños cambios ambientales como el aumento en la concentración de ciertos sustratos estimula a su actividad (Alonso & Pernthaler, 2006a; Alonso & Pernthaler, 2006b, Sarmiento & Gasol 2012). Es importante destacar que miembros de una misma clase pueden tener diferentes estrategias de vida, como en el caso del clado SAR11, perteneciente a la misma clase que *Roseobacter* (clase *Alfaproteobacteria*). Ambos clados tienen preferencia hacia sustratos de bajo peso molecular (Malmstrom et al., 2005). Sin embargo, las proporciones de las poblaciones de SAR11 y *Roseobacter* responsables del consumo de dichos sustratos es típicamente opuesta (SAR11 muy abundante y poco activo vs *Roseobacter* poco abundante y muy activo) (Alonso & Pernthaler, 2006a; Alonso-Sáez & Gasol, 2007), y la importancia relativa de cada grupo en un proceso dado está modulada por factores ambientales (ej sistema costero vs aguas abiertas) (Malmstrom et al., 2004).

Otro integrante del GEFC 4 y también perteneciente a la clase *Alfaproteobacteria*, es el clado OCS116, grupo que podría jugar un rol clave en el ciclo de la materia, ya que su aumento en abundancia concuerda con cambios temporales asociados a incrementos en la disponibilidad de carbono orgánico y de nutrientes inorgánicos (Morris et al., 2005).

También dentro de las *Alfaproteobacteria* y del GEFC 4, está el clado *Rhodobacter*, cuya actividad puede llegar a ser muy importante en la comunidad bacteriana, exhibiendo una preferencia hacia la materia orgánica de alto peso molecular (Weinbauer et al., 2006).

Los clados SAR86 (clase *Gammaproteobacteria*) y Flavobacteriaceae (clase *Flavobacteria*) perteneciente a los GEFC 4 y 3 respectivamente, son grupos para los cuales se ha demostrado su contribución a la producción bacteriana en los sistemas acuáticos, particularmente en condiciones de alta disponibilidad de sustratos (Alonso & Pernthaler, 2006b), lo que explica su dominancia en situaciones de blooms del fitoplancton (González et al., 2000; Alonso & Pernthaler, 2006b).

Otro clado clave integrante del GEFC 4 es el OM1 (clase *Acidimicrobiia* orden *Acidimicrobiales*), para el cual se ha descrito una gran versatilidad metabólica en cuanto a la

adquisición de carbono así como diversas formas de adquirir energía (Mizuno et al., 2015). Por ejemplo, tienen la capacidad de obtener energía a partir del DMSP (dimetil sulfonio propionato), sulfonato y del monóxido de carbono (Mizuno et al., 2015).

En contraste, los GEFC 1 y 2 estuvieron constituidos por los clados más representativos LD12 y SAR11, llegando a representar abundancias máximas del 76 y 64 % por muestra respectivamente, quienes mostraron una relación más débil con la producción bacteriana. En consistencia con esto, se ha demostrado que el clado LD12 tiene una alta preferencia hacia la incorporación de otros aminoácidos respecto a la leucina, como los de la familia del glutamato (Salcher et al., 2011), asimismo, diversas características de SAR11 indican que dicho clado podría tener una baja actividad metabólica (Morris et al., 2002, Mary et al., 2006). Esto indica una vez más que los grupos dominantes de la comunidad bacteriana no necesariamente son los más importantes a nivel de una función determinada, la producción de biomasa bacteriana en este caso.

Finalmente, se analizó la relación entre las proporciones de los seis GEFC y la tasa de depredación bacteriana, encontrándose una relación significativa y negativa con todos los grupos menos con el 3 (cálido y salado). Esto podría ser resultado de una depredación selectiva hacia los clados que integran dichos grupos, asumiendo que un aumento en su abundancia es reflejo de menor depredación. Por lo tanto, el hecho de que la depredación bacteriana no se haya relacionado con la riqueza ni con la equitatividad, pero sí con las proporciones de los GEFC, indica un control sobre la composición de la comunidad bacteriana más que sobre los índices de diversidad estimados.

Los trabajos que han revelado cambios a nivel de composición bacteriana debido a la depredación han empleado mayormente técnicas que detectan diferencias a nivel de clases (Pernthaler et al 1997, Han & Höfle 1999, Jürgens et al., 1999, Langenheder & Jürgens 2001, Šimek et al., 2002). Sin embargo, existe evidencia de que ciertos clados del GEFC 6, grupo que presentó mayor nivel de significancia en el modelo que relacionó a la tasa de depredación con las proporciones de los grupos (modelo 7), son depredados preferentemente, como es el caso de *Pseudomonas* (Matz et al., 2004), *Massilia* (Salcher et al., 2016) y *Acinetobacter* (Schieffer 2012). Dada la evidencia de que grupos bacterianos sometidos a una alta depredación suelen encontrarse en bajas abundancias en el ambiente (Beardsley et al 2003), es posible especular que la relación significativamente negativa entre este grupo y las tasas de

depredación se deba a que su comparativamente alta abundancia refleje condiciones relajadas de depredación.

## **Conclusiones**

El presente trabajo utilizó un enfoque novedoso que logró relacionar diversidad bacteriana con funciones ecosistémicas. La metodología empleada para estimar la diversidad bacteriana permitió identificar un nivel taxonómico adecuado con el cual los linajes bacterianos son coherentes ecológicamente, logrando definir grupos ecofisiológicamente coherentes (GEFC) que se relacionaron significativamente con las funciones ecosistémicas medidas.

Una de las predicciones del trabajo establecía una relación positiva entre la diversidad bacteriana y la producción bacteriana. Este trabajo mostró una relación positiva tanto en los aspectos de riqueza bacteriana como de equitatividad, corroborando la predicción planteada. Sin embargo, el hecho de que la clorofila *a* también se relacionó positivamente con la producción bacteriana, no descarta que la disponibilidad del recurso también explique el incremento en la producción bacteriana.

No fue posible aceptar la hipótesis planteada, debido a que no se concluyó un único mecanismo responsable en explicar dicha relación entre diversidad y función medida como producción. En parte, el aumento en la producción en relación a la riqueza y la equitatividad va a favor de una complementariedad ecológica en los usos de los recursos, de acuerdo al modelo de complementariedad de nicho. Sin embargo, también se encontraron relaciones más estrechas con grupos específicos, lo que podría indicar la presencia de clados relevantes metabólicamente. Esto junto a la relación positiva entre uno de los grupos más relacionados con la producción (el GEFC 3) y la riqueza observada, refleja una mayor probabilidad de encontrar grupos claves al maximizar la riqueza, de acuerdo a lo esperado para el modelo de “efecto de muestreo”.

Si bien es conocido el efecto de la depredación sobre la diversidad bacteriana, no se ha explorado el efecto de la diversidad bacteriana sobre la depredación sobre dicha comunidad. Este trabajo postuló como segunda predicción un incremento en la transferencia de biomasa a niveles tróficos superiores, al incrementarse la diversidad bacteriana, a través de un mecanismo indirecto vía la producción bacteriana. Sin embargo, no se encontró relación entre la diversidad y la tasa de depredación bacteriana, lo que pudo deberse a la igualmente ausencia de relación entre producción y tasa de depredación.

Es necesario explorar más a fondo las relaciones diversidad- función encontradas, por ejemplo mediante enfoques experimentales, donde la diversidad sea manipulada directamente y las variables ambientales como la disponibilidad del recurso puedan controlarse. Ello facilitaría evidenciar los mecanismos implicados, ya que los factores que afectan a la diversidad o a las funciones en ecosistemas naturales son diversos.

## **Anexo 1: Incorporación de leucina para distintas concentraciones en el Río de la Plata**

La incorporación de la leucina añadida marcada con tritio, por parte de las bacterias, responde a una cinética donde la incorporación aumenta a medida que la concentración de leucina es mayor, hasta alcanzar una incorporación máxima. Luego le sigue una fase de saturación, en la cual la incorporación se mantiene constante (Simon & Azam, 1989). El valor de concentración de leucina correspondiente a esta fase de saturación es denominada concentración de saturación. Este valor de saturación, se corresponde a una tasa de crecimiento bacteriano constante durante un corto intervalo de tiempos (aprox. 60 min), como fue demostrado por Simon & Azam (1989).

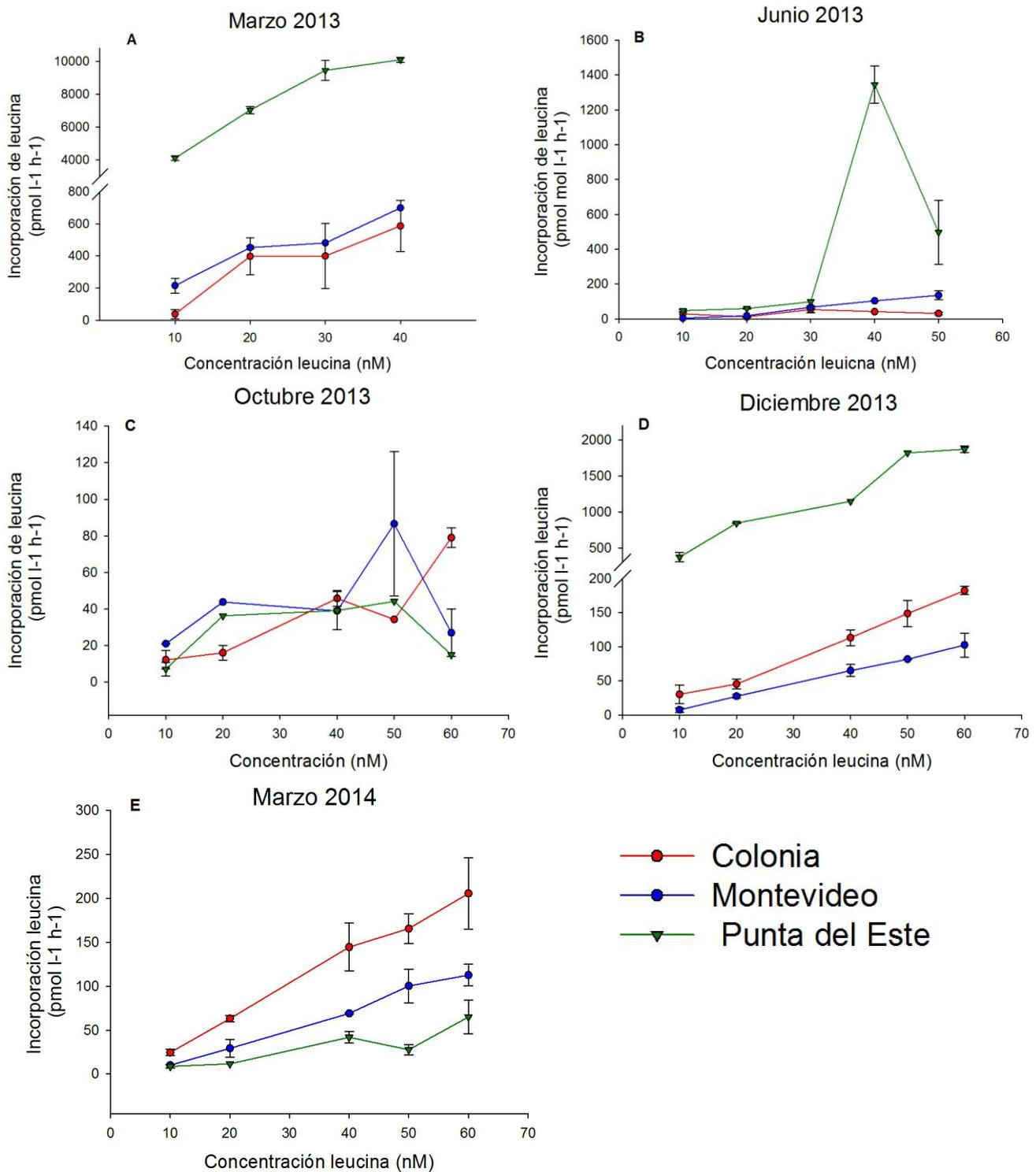
Una consideración fundamental para esta técnica, es por lo tanto, emplear un adecuado valor de concentración de leucina, de manera que los valores de producción bacteriana estimados sean los más reales posibles.

De otro forma, un alto valor de dilución isotópica implicaría subestimar la estimación de la producción, a causa de que la síntesis proteica estuviese siendo mayoritariamente representada por la leucina no marcada natural y no por la leucina marcada añadida. Contrariamente, un valor de concentración muy elevado podría inhibir su captación o no reflejar una traza de un proceso natural. De esta forma, la concentración de leucina añadida debe superar a la concentración de la leucina in situ, pero tampoco excederse al punto de no reflejar su captación verdadera. Debido a esto, en el presente trabajo se realizaron incubaciones añadiendo leucina a distintas concentraciones, en un rango comprendido entre 10- 60 nM, para poder establecer la concentración de saturación, y a partir del valor de incorporación de leucina a dicha concentración estimar la tasa de producción bacteriana.

En la Figura A1 se observan los resultados para los cinco meses y para las tres zonas evaluadas. Los resultados indican diferencias en la captación de leucina por parte de la comunidad bacteriana en los distintos meses evaluados así como en las distintas zonas.

En marzo de 2013, Colonia y Montevideo mostraron un mismo patrón en su cinética de incorporación de leucina, en el cual a 30 nM la incorporación se satura por lo que no hay diferencias en la incorporación entre 20 y 30 nM, aunque se observa un nuevo incremento en

la incorporación a la concentración de 40 nM (Fig. A1 A). En Punta del Este sin embargo, la concentración de saturación fue a 40 nM (Fig. A1 B).



**Figura A.1.** Incorporación de leucina en función de la concentración añadida A) Marzo 2013 B) Junio 2013 C) Octubre 2013 D) Diciembre 2013 E) Marzo 2014.

En junio de 2013, Colonia y Montevideo también mostraron una respuesta similar, alcanzando la saturación de la incorporación a 40 nM, mientras que en Punta del Este, para concentraciones superiores a 30 nM la incorporación de leucina siguió incrementando alcanzando un pico a 50 nM (Fig. A1 B).

En Octubre de 2013, la saturación parecería alcanzarse a 40 nM en las tres zonas, aunque la respuesta fue distinta en las tres zonas para valores de concentraciones superiores (Fig. A1 C). En Colonia y Montevideo luego de la saturación, hay un pico en la incorporación a 60 y a 50 nM respectivamente. Punta del Este en cambio no mostró este pico, sino que a valores superiores de 40 nM la incorporación disminuyó.

En diciembre de 2014, Colonia y Montevideo no muestran una clara saturación en la incorporación de leucina para ninguna concentración, en tanto que Punta del Este a 40 nM alcanza la saturación, pero luego para 50 nM hay un incremento en la incorporación, alcanzando una segunda saturación a 60 nM (Fig. A1 D).

Finalmente en Marzo de 2014, en Colonia la incorporación de leucina no logra saturar para ningún valor. En Montevideo, parecería ser que la saturación se alcanza a los 60 nM, mientras que en Punta del Este a los 50 nM, aunque la incorporación aumentó nuevamente a 60 nM (Fig. A1 E).

En conclusión, en todos los meses menos en marzo de 2014, Colonia y Montevideo siguen una respuesta similar en tanto que punta del Este se diferencia de ambas zonas, y en la mayoría de los meses (marzo, junio y diciembre de 2013) los valores de incorporación de leucina fueron significativamente mayores respecto al resto de las zonas ( $p < 0,05$ ), mientras que Colonia y Montevideo no mostraron diferencias significativas entre sí en ningún mes.

Las respuestas en la cinética de incorporación para los distintos meses fueron muy variadas, no obstante, en todos los meses menos en marzo de 2014, aunque sea en una de las tres zonas la incorporación de la leucina saturó a 40 nM.

Las respuestas observadas en marzo de 2014 fueron las más disímiles en relación al resto de los meses, y la respuesta en el mismo mes de cada año fue distinta, dado que en marzo de 2013 en todas las zonas se llega a la saturación para valores entre 30 y 40 nM, mientras que en marzo del siguiente año en Colonia no se alcanza la saturación, y en el resto de las zonas estaría entre 50 y 60 nM.

Por lo tanto, no hubo un valor claro ni único de concentración de leucina a la cual se alcance la saturación de su incorporación, debido a que este varió en función de la zona y del mes. Sin embargo, en promedio y considerando las distintas zonas y los distintos meses, la saturación se estaría dando a los 40 nM dentro de un rango de valores comprendidos entre 30 y 60 nM.

Se destaca por último para varios casos, un patrón en la cinética de incorporación de leucina que involucró dos etapas, un primer paso donde la incorporación se satura, pero luego vuelve a incrementar alcanzando en algunas ocasiones (por ejemplo en Punta del Este para diciembre de 2013) una segunda fase de saturación. Este tipo de respuesta se ha reportado previamente (Gasol 1999), sin existir respuesta clara respecto a cuál sería la concentración de leucina ideal para estimar producción bacteriana en estos casos.

Finalmente, los valores de saturación alcanzados se relacionan con los observados en sistemas eutróficos, por ejemplo se ha visto para sistemas de agua dulce, concentraciones de saturación mayores a 40 nM (Jørgensen 1992, Pulido & Reche 2003).

## **Anexo 2: Relación entre GEFC y riqueza**

En base a lo discutido sobre el posible “efecto de muestreo” como mecanismo de relación entre una mayor diversidad y una mayor función, se exploró la relación entre las proporciones de los GEFC con la riqueza ( $S_{Obs}$ ). Esto permitió dilucidar si las muestras con mayor riqueza se corresponden con una mayor proporción de los clados “focales” (más relacionados con la función).

Se realizaron seis test de correlación de *Spearman* entre las proporciones de cada grupo con la riqueza observada. El GEFC 3 se correlacionó significativamente y positivamente con la riqueza ( $p < 0.05$ ,  $r_s = 0.5$ ). El resto de los grupos no mostró correlación significativa.

Si bien este resultado indica una relación entre una mayor riqueza con una mayor proporción de uno de los grupos claves (el GEFC 3), el GEFC 4 también fue uno de los grupos más relacionados con la producción bacteriana, sin embargo no mostro correlación con la riqueza.

## Bibliografía

- Amaral, V., Graeber, D., Calliari, D., & Alonso, C. (2016). Strong linkages between DOM optical properties and main clades of aquatic bacteria. *Limnology and Oceanography*.
- Andersson, A. F., Riemann, L., & Bertilsson, S. (2010). Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities. *The ISME Journal*, 4(2), 171-181.
- Alonso, C., and Pernthaler, J. (2006a) Roseobacter and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology* 8: 2022-2030.
- Alonso, C., and Pernthaler, J. (2006b) Concentration-dependent patterns of leucine incorporation in coastal picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2141-2147.
- Alonso, C., Zeder, M., Piccini, C., Conde, D., and Pernthaler, J. (2009) Ecophysiological differences of betaproteobacterial populations in two hydrochemically distinct compartments of a subtropical lagoon. *Environmental Microbiology* 11: 867-876.
- Alonso, C., Gomez-Pereira, P.R., Ramette, A., Ortega, L., Fuchs, B.M., and Amann, R. (2010) Multilevel analysis of the bacterial diversity along the environmental gradient Río de la Plata-South Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 61: 57-62.
- Alonso- Sáez, L. and J. 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.
- Alonso-Sáez, L., Arístegui, J., Pinhassi, J., Gómez-Consarnau, L., González, J.M., Vaqué, D. et al. (2007) Bacterial assemblage structure and carbon metabolism along a productivity gradient in the NE Atlantic Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* 46: 43-53
- Alonso-Saéz, L., Vázquez-Domínguez, E., Cardelús, C., Pinhassi, J., Sala, M.M., Lekunberri, I. et al. (2008) Factors Controlling the Year-Round Variability in Carbon Flux Through Bacteria in a Coastal Marine System. *Ecosystems* 11: 397-409.
- Alonso-Sáez, L., Sánchez, O., & Gasol, J. M. (2012). Bacterial uptake of low molecular weight organics in the subtropical Atlantic: Are major phylogenetic groups functionally different?. *Limnology and Oceanography*, 57(3), 798.
- Alonso-Sáez, L., Díaz-Pérez, L., & Morán, X. A. G. (2015). The hidden seasonality of the rare biosphere in coastal marine bacterioplankton. *Environmental microbiology*, 17(10), 3766-3780.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil, and F. Thingstad 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Azam, F. (1998). Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science*, 280(5364), 694.
- Baltar, F., Palovaara, J., Unrein, F., Catala, P., Horňák, K., Šimek, K., ... & Pinhassi, J. (2015). Marine bacterial community structure resilience to changes in protist predation under phytoplankton bloom conditions. *The ISME journal*.
- Barberan, A., and Casamayor, E.O. 2010. Global phylogenetic community structure and  $\beta$ -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology* 59: 1-10.

- Beardsley, C., J. Pernthaler, et al. (2003). "Are readily cultured bacteria in coastal North Sea waters suppressed by selective grazing mortality?" *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2624-2630.
- Bertoglio, F. (2012) Respuesta de la comunidad bacteriana a alteraciones de la trama trófica planctónica en el Río de la Plata. Presentada en Facultad de Ciencia para la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Montevideo: Universidad de la República, p. 59.
- Boenigk, J., Stadler, P., Wiedroither, A., & Hahn, M. W. (2004). Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the Polynucleobacter cluster. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 5787-5793.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., ... & Pfannkuche, O. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407(6804), 623-626.
- Bouvier, T. C., & del Giorgio, P. A. (2002). Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and oceanography*, 47(2), 453-470.
- Bruggeman, J., Heringa, J., & Brandt, B. W. (2009). PhyloPars: estimation of missing parameter values using phylogeny. *Nucleic acids research*, 37(suppl 2), W179-W184.
- Calliari, D., Gómez, M., & Gómez, N. (2005). Biomass and composition of the phytoplankton in the Río de la Plata: large-scale distribution and relationship with environmental variables during a spring cruise. *Continental Shelf Research*, 25(2), 197-210.
- Calliari, D., Brugnoli, E., Ferrari, G., Vizziano, D., 2009. Phytoplankton distribution and production along a wide environmental gradient in the south-west Atlantic off Uruguay. *Hydrobiologia* 620, 47e61
- Calow, P. (1987). Towards a definition of functional ecology. *Functional Ecology*, 1(1), 57-61.
- Campbell, B. J., & Kirchman, D. L. (2013). Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient. *The ISME journal*, 7(1), 210-220.
- Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Duffy, J. E., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., & Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, 443(7114), 989-992.
- Cardinale, B. J., Bennett, D. M., Nelson, C. E., & Gross, K. (2009). Does productivity drive diversity or vice versa? A test of the multivariate productivity-diversity hypothesis in streams. *Ecology*, 90(5), 1227-1241.
- Cardinale, B. J. (2011). Biodiversity improves water quality through niche partitioning. *Nature*, 472(7341), 86-89.
- Chao, A. 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43, 783-791.
- Chapin, F. S., Zavaleta, E. S., Eviner, V. T., Naylor, R. L., Vitousek, P. M., Reynolds, H. L., ... & Mack, M. C. (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405(6783), 234-242.
- Chin, K.J., Lukow, T., and Conrad, R. (1999). Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2341-2349.
- Cole, J. J., Findlay, S., & Pace, M. L. (1988). Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 43(1), 1-10.

- Cottrell, M.T., and Kirchman, D.L. (2000) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1692-1697.
- Cottrell, M.T., and Kirchman, D.L. (2003) Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnology and Oceanography* 48: 168-178.
- Crump, B. C., & Baross, J. A. (1996). Particle-attached bacteria and heterotrophic plankton associated with the Columbia River estuarine turbidity maxima. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 138(1), 265-273.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3192–3204.
- Crump, B. C., Hopkinson, C. S., Sogin, M. L., & Hobbie, J. E. (2004). Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Applied and environmental microbiology*, 70(3), 1494-1505.
- del Giorgio, P. A., Gasol, J. M., Vaqué, D., Mura, P., Agustí, S., & Duarte, C. M. (1996). Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnology and Oceanography*, 41(6), 1169-1179.
- del Giorgio, P. A. and J. J. Cole (1998). "Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems." *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 503-541.
- Feely, R.A., Sabine, C.L., Takahashi, T., and Wanninkhof, R. 2001. Uptake and Storage of Carbon Dioxide in the Ocean: The Global CO<sub>2</sub> Survey. *Oceanography* 14: 18-32.
- Fenchel T., and Finlay B.J. (2004) The Ubiquity of Small Species: Patterns of Local and Global Diversity. *BioScience*, Vol. 54, No. 8. pp. 777-784
- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364.
- Fierer, N., Leff, J. W., Adams, B. J., Nielsen, U. N., Bates, S. T., Lauber, C. L., ... & Caporaso, J. G. (2012). Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(52), 21390-21395.
- Flynn, K. J., Stoecker, D. K., Mitra, A., Raven, J. A., Glibert, P. M., Hansen, P. J., ... & Burkholder, J. M. (2012). Misuse of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. *Journal of Plankton Research*, fbs062.
- Fortunato, C. S., Herfort, L., Zuber, P., Baptista, A. M., & Crump, B. C. (2012). Spatial variability overwhelms seasonal patterns in bacterioplankton communities across a river to ocean gradient. *The ISME journal*, 6(3), 554-563.
- Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Brown, M.V., and Naeem, S. (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13104–13109.
- Galand, P. E., Casamayor, E. O., Kirchman, D. L., & Lovejoy, C. (2009). Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22427-22432.

- Gasol JM (1999) How to measure bacterial activity and production with the uptake of radiolabeled leucine. Protocol <http://www.cmima.csic.ed/pub/gasol/Manials/ProdBact/Leucine.htm>
- Gasol, J. M., Pedrós-Alió, C., & Vaqué, D. (2002). Regulation of bacterial assemblages in oligotrophic plankton systems: results from experimental and empirical approaches. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 435-452.
- Ghiglione, J.F., Mevel, G., Pujo-Pay, M., Mousseau, L., Lebaron, P., and Goutx, M. (2007) Diel and Seasonal Variations in Abundance, Activity, and Community Structure of Particle-Attached and Free-Living Bacteria in NW Mediterranean Sea. *Microb Ecol* 54: 217-231.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, and K. G. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60–63.
- Glockner, F.O., Fuchs, B.M., and Amann, R. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3721-3726.
- Green, J. L., Bohannan, B. J., & Whitaker, R. J. (2008). Microbial biogeography: from taxonomy to traits. *science*, 320(5879), 1039-1043.
- Gonzalez, J. M., Sherr, E. B., & Sherr, B. F. (1990). Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3), 583-589.
- González, J.M., Kiene, R.P., and Moran, M.A. (1999) Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the alpha-Subclass of the class Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3810-3819.
- González, J. M., Simó, R., Massana, R., Covert, J. S., Casamayor, E. O., Pedrós-Alió, C., & Moran, M. A. (2000). Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate-producing North Atlantic algal bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4237-4246.
- Gotelli NJ, Colwell RK (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol Lett* 4:379–391
- Hagström, A., Pinhassi, J., and Zweifel, U.L. (2001) Marine bacterioplankton show bursts of rapid growth induced by substrate shifts. *Aquatic Microbial Ecology* 24: 109-115
- Hahn, M. W., & Höfle, M. G. (1999). Flagellate predation on a bacterial model community: interplay of size-selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4863-4872.
- Hector, A., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Caldeira, M. C., Diemer, M., Dimitrakopoulos, P. G., ... & Harris, R. (1999). Plant diversity and productivity experiments in European grasslands. *science*, 286(5442), 1123-1127.
- Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME journal*, 5(10), 1571-1579.
- Hewson, I., & Fuhrman, J. A. (2004). Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3425-3433.
- Hoch, M. P., & Kirchman, D. L. (1993). Seasonal and inter-annual variability in bacterial production and biomass in a temperate estuary. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 98(3), 283-295.

- Hollibaugh, J. T., P. S. Wong, and M. C. Murrell. 2000. Similarity of particle-associated and free-living bacterial communities in northern San Francisco Bay, California. *Aquat. Microb. Ecol.* 21:103–109.
- Hooper, D. U., et al. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75:3–35.
- Huston, M. A., & Huston, M. A. (1994). *Biological diversity: the coexistence of species*. Cambridge University Press.
- Illumina.com. (2016). Illumina | Sequencing and array-based solutions for genetic research. [online] Available at: <http://www.illumina.com/> [Accessed 6 May 2016].
- International Organization for Standardization, 2005. ISO 20179: *Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection*. Ginebra: ISO.
- Jespersen, A.-M. y Christoffersen, K., 1987. Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent. En: *Archiv für Hydrobiologie*, 109(3), pp.445-454.
- Jin, H. M., Lee, H. J., Kim, J. M., Park, M. S., Lee, K., & Jeon, C. O. (2011). *Litorimicrobium taeanense* gen. nov., sp. nov., isolated from a sandy beach. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(6), 1392-1396.
- Jørgensen, N. O. (1992). Incorporation of [3H] leucine and [3H] valine into protein of freshwater bacteria: Uptake kinetics and intracellular isotope dilution. *Applied and environmental microbiology*, 58(11), 3638-3646.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., & Amann, R. (1999). Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1241-1250.
- Kent, A. D., Jones, S. E., Yannarell, A. C., Graham, J. M., Lauster, G. H., Kratz, T. K., & Triplett, E. W. (2004). Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. *Microbial Ecology*, 48(4), 550-560.
- Kirchman, D., K'nees, E. L. I. Z. A. B. E. T. H., & Hodson, R. (1985). Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(3), 599-607.
- Kirchman, D. L., & Hoch, M. P. (1988). Bacterial production in the Delaware Bay estuary estimated from thymidine and leucine incorporation rates. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 45(1), 169-178.
- Krause, S., Le Roux, X., Niklaus, P. A., Van Bodegom, P. M., Lennon, J. T., Bertilsson, S., ... & Bodelier, P. L. (2014). Trait-based approaches for understanding microbial biodiversity and ecosystem functioning. *Front Microbiol*, 5, 251.
- Kruk, C., Huszar, V. L., Peeters, E. T., Bonilla, S., Costa, L., LÜRLING, M., ... & Scheffer, M. (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, 55(3), 614-627.
- Kruk, C., Martínez, A., Nogueira, L., Alonso, C., & Calliari, D. (2014). Morphological traits variability reflects light limitation of phytoplankton production in a highly productive subtropical estuary (Río de la Plata, South America). *Marine Biology*, 162(2), 331-341.

- Kruk, C., Piccini, C., Segura, A., Nogueira, L., Carballo, C., Martínez de la Escalera Siri, G., ... & Alcántara, I. (2015). Herramientas para el monitoreo y sistema de alerta de floraciones de cianobacterias nocivas: Río Uruguay y Río de la Plata. *INNOTEC*, (10), 23-39.
- Kurucz Americo, Arianna Masello, Silvia Mendez, Ray Cranston and Peter G. Wells. 1998. Calidad ambiental del Río de la Plata. En P. G. Wells y G. R. Daborn. (Eds)
- Lachat Instruments, 2009. *Determination of total phosphorus in brackish and fresh waters by flow Injection Analysis*. Milwaukee: Lachat Instruments. Method 31-115-01-3-D.
- Langenheder, S., & Jürgens, K. (2001). Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnology and Oceanography*, 46(1), 121-134.
- Langenheder, S., Lindström, E. S., & Tranvik, L. J. (2005). Weak coupling between community composition and functioning of aquatic bacteria. *Limnology and Oceanography*, 50(3), 957-967.
- Lear, G., Bellamy, J., Case, B. S., Lee, J. E., & Buckley, H. L. (2014). Fine-scale spatial patterns in bacterial community composition and function within freshwater ponds. *The ISME journal*, 8(8), 1715-1726.
- LeFevre J 1986. The biology of frontal systems. *Adv Mar Biol* 23: 163-299
- Legendre, P., & Legendre, L. (1998). Numerical ecology: second English edition. *Developments in environmental modelling*, 20.
- Lindström, E. S. (1998). Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(2), 163-174.
- Logue, J. B., Langenheder, S., Andersson, A. F., Bertilsson, S., Drakare, S., Lanzén, A., & Lindström, E. S. (2012). Freshwater bacterioplankton richness in oligotrophic lakes depends on nutrient availability rather than on species–area relationships. *The ISME journal*, 6(6), 1127-1136.
- Loreau, M. (2000). Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos*, 91(1), 3-17.
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11436-11440.
- Magurran, A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, Princeton, N. J.
- Magurran, A. E. 2004. *Measuring biological diversity*. Blackwell.
- Malmstrom, R. R., R. P. Kiene, et al. (2004). "Identification and enumeration of bacteria assimilating dimethylsulfoniopropionate (DMS) in the North Atlantic and Gulf of Mexico." *Limnology and Oceanography* 49: 597-606.
- Malmstrom, R. R., M. T. Cottrell, et al. (2005). "Biomass production and assimilation of dissolved organic matter by SAR11 bacteria in the Northwest Atlantic Ocean." *Applied and Environmental Microbiology* 71(6): 2979-2986
- Marrasé, C., Lim, E. L., & Caron, D. A. (1992). Seasonal and daily changes in bacterivory in a coastal plankton community. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 82(3), 281-289.
- Mary, I., Heywood, J. L., Fuchs, B. M., Amann, R., Tarran, G. A., Burkill, P. H., & Zubkov, M. V. (2006). SAR11 dominance among metabolically active low nucleic acid bacterioplankton in surface waters along an Atlantic meridional transect. *Aquatic microbial ecology*, 45(2), 107-113.

- Massana, R., Unrein, F., Rodríguez-Martínez, R., Forn, I., Lefort, T., Pinhassi, J., & Not, F. (2009). Grazing rates and functional diversity of uncultured heterotrophic flagellates. *The ISME journal*, 3(5), 588-596.
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S., & Jürgens, K. (2004). Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1593-1599.
- Matz, C., & Jürgens, K. (2005). High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 921-929.
- Mitra, A., Flynn, K. J., Tillmann, U., Raven, J. A., Caron, D., Stoecker, D. K., ... & Wilken, S. (2016). Defining planktonic protist functional groups on mechanisms for energy and nutrient acquisition: incorporation of diverse mixotrophic strategies. *Protist*, 167(2), 106-120.
- Mizuno, C. M., Rodriguez-Valera, F., & Ghai, R. (2015). Genomes of planktonic acidimicrobiales: widening horizons for marine actinobacteria by metagenomics. *mBio*, 6(1), e02083-14.
- Morris, R. M., Vergin, K. L., Cho, J. C., Rappé, M. S., Carlson, C. A., & Giovannoni, S. J. (2005). Temporal and spatial response of bacterioplankton lineages to annual convective overturn at the Bermuda Atlantic Time-series Study site. *Limnology and Oceanography*, 50(5), 1687-1696.
- Morris, R. M., M. Rappé, S. A. Connon, K. L. Vergin, W. A. Siebold, C. A. Carlson, and S. J. Giovannoni. 2002. SAR11 clade dominated ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420:806–810.
- Musat, N., Halma, H., Winterholler, B., Hoppe, P., Peduzzi, S., Hillion, F. et al. (2008) A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 17861–17866.
- Nagy, G. J., Martínez, C. M., Caffera, R. M., Pedrosa, G., Forbes, E. A., Perdomo, A. C., & Lopez Laborde J., 1998. Marco hidrológico y climático del Río de la Plata. El Río de la Plata. Una Revisión Ambiental. Un informe de Antecedentes del Proyecto EcoPlata. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canadá, 17-72.
- Nagy, G., Gomez, M., Lopez, C., Perdomo, A., 2002. Distribution patterns of nutrients and symptoms of eutrophication in the Río de la Plata Estuary System. *Hydrobiologia* 475/476, 125–139
- Pace, M. L., & Cole, J. J. (1996). Regulation of bacteria by resources and predation tested in whole-lake experiments. *Limnology and Oceanography*, 41(7), 1448-1460.
- Palacios, C., Olsson, B., Lebaron, P., and Sogin, M.L. (2006) New high-throughput biotechnologies for sampling the microbial ecological diversity of the oceans: the informatics challenge. In *Proceedings 'Ocean Biodiversity Informatics' – International Conference on Marine Biodiversity Data*. Vanden Berghe, E.e.a. (ed). Hamburg, Germany.
- Pedros-Alió, C, J. I. Calderón-Paz, N. Guixa-Boixereu, M. Estrada & J. M. Gasol. 1999. Bacterioplankton and phytoplankton biomass and production during summer stratification in the northwestern Mediterranean Sea. *Deep Sea Res.* 46: 985-1019
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Amann, R., & Psenner, R. (1997). Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 596-601.
- Pernthaler, J. et al. Predator-specific enrichment of actinobacteria from a cosmopolitan freshwater clade in mixed continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2145–2155 (2001).

- Pernthaler, J., Zollner, E., Warnecke, F., and Jurgens, K. 2004. Blooms of filamentous bacteria in a mesotrophic lake: Identity and potential controlling mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6272-6281.
- Pernthaler J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol.* 3:537–546
- Peter, H., Beier, S., Bertilsson, S., Lindström, E. S., Langenheder, S., & Tranvik, L. J. (2011). Function-specific response to depletion of microbial diversity. *The ISME journal*, 5(2), 351-361.
- Philippot, L., Bru, D., Saby, N., Čuhel, J., Arrouays, D., Šimek, M., & Hallin, S. (2009). Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environmental Microbiology*, 11(12), 3096-3104.
- Philippot, L., Andersson, S. G., Battin, T. J., Prosser, J. I., Schimel, J. P., Whitman, W. B., & Hallin, S. (2010). The ecological coherence of high bacterial taxonomic ranks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 523-529.
- Pinhassi, J., and A. Hagstrom. 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21:245–256.
- Pomeroy, L. R., & Deibel, D. (1986). Temperature regulation of bacterial activity during the spring bloom in newfoundland coastal waters. *Science(Washington)*, 233(4761), 359-361.
- Pujalte, M. J., Lucena, T., Ruvira, M. A., Arahál, D. R., & Macián, M. C. (2014). The family Rhodobacteraceae. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 439-512.
- Pulido-Villena, E., & Reche, I. (2003). Exploring bacterioplankton growth and protein synthesis to determine conversion factors across a gradient of dissolved organic matter. *Microbial ecology*, 46(1), 33-42.
- Reinthal, T., Winter, C., & Herndl, G. J. (2005). Relationship between bacterioplankton richness, respiration, and production in the southern North Sea. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), 2260-2266.
- Remane, A., 1934. Die Brackwasserfauna. *Verhandlungen Der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* 36, 34e74
- Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., & Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of plankton research*, 24(5), 417-428.
- Roy, K., Jablonski, D., Valentine, J. W., & Rosenberg, G. (1998). Marine latitudinal diversity gradients: tests of causal hypotheses. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 95(7), 3699-3702.
- Ruiz-González, C., Niño-García, J. P., Lapierre, J. F., & del Giorgio, P. A. (2015). The quality of organic matter shapes the functional biogeography of bacterioplankton across boreal freshwater ecosystems. *Global Ecology and Biogeography*, 24(12), 1487-1498.
- Salat, J.; Marrasé, C. 1994. Exponential and linear estimations of grazing on bacteria: effects on changes in the proportion of marked cells. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 104:205- 209.
- Salcher, M., Pernthaler, J., Zeder, M., Psenner, R., and Posch, T. (2008) Spatio-temporal niche separation of planktonic Betaproteobacteria in an oligomesotrophic lake. *Environmental Microbiology*.
- 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.

- Salcher, M. M., Ewert, C., Šimek, K., Kasalický, V., & Posch, T. (2016). Interspecific competition and protistan grazing affect the coexistence of freshwater betaproteobacterial strains. *FEMS microbiology ecology*, fiv156.
- Sarmiento, H., & Gasol, J. M. (2012). Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. *Environmental microbiology*, 14(9), 2348-2360.
- Schieffer, A. (2012). *Studies on diversity and coexistence in an experimental microbial community* (Doctoral dissertation, Universität zu Köln).
- Schmid, M.C., Maas, B., Dapena, A., de Pas-Schoonen, K.V., de Vossenberg, J.V., Kartal, B. et al. (2005) Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1677-1684.
- Šimek, K., Nedoma, J., Pernthaler, J., Posch, T., & Dolan, J. R. (2002). Altering the balance between bacterial production and protistan bacterivory triggers shifts in freshwater bacterial community composition. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 453-463.
- Simon, M., & Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 51(3), 201-213.
- Smith, D.C. & F. Azam. 1992. A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using 3H-leucine. *Mar. Microb. Food Webs* 6: 107-114.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R. et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 12115-12120.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M. W., ... & Barbe, V. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 440(7085), 790-794.
- Tilman, D., and S. Pacala. 1993. The maintenance of species richness in plant communities. Pages 13–25 in R. E. Ricklefs and D. Schlüter, editors. *Species diversity in ecological communities*.
- Tilman, D., Wedin, D., & Knops, J. (1996). Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature*, 379(6567), 718-720.
- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M., & Siemann, E. (1997). The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science*, 277(5330), 1300-1302.
- Troussellier, M., H. Schafer, N. Batailler, L. Bernard, C. Courties, P. Lebaron, G. Muyzer, P. Servais, and J. Vives-Rego. 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). *Aquat. Microb. Ecol.* 28:13–24.
- Unrein, F., Massana, R., Alonso-Sáez, L., & Gasol, J. M. (2007). Significant year-round effect of small mixotrophic flagellates on bacterioplankton in an oligotrophic coastal system. *Limnology and Oceanography*, 52(1), 456-469.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Sarniguet, A., De Boer, W., Leveau, J. H. J., & Frey-Klett, P. (2009). Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2178-2186.
- Vaqué, D., Gasol, J. M., & Marrasé, C. (1994). Grazing rates on bacteria—the significance of methodology and ecological factors. *Marine Ecology Progress Series*, 109(2-3), 263-274.

- Vazquez-Dominguez E, Peters F, Gasol JM, Vaqué D. (1999). Measuring the grazing losses of picoplankton: methodological improvements in the use of fluorescently tracers combined with flow cytometry. *Aquat*
- Violle, C., Navas, M. L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., & Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional!. *Oikos*, *116*(5), 882-892.
- Wang, J., Yang, D., Zhang, Y., Shen, J., Van Der Gast, C., Hahn, M. W., & Wu, Q. (2011). Do patterns of bacterial diversity along salinity gradients differ from those observed for macroorganisms?. *PLoS One*, *6*(11), e27597.
- Weinbauer, M. G., Christen, R., & Höfle, M. G. (2006). The response of *Vibrio*-and *Rhodobacter*-related populations of the NW Mediterranean Sea to additions of dissolved organic matter, phages, or dilution. *Microbial ecology*, *51*(3), 336-344.
- Xu, H., Warren, A., Al-Rasheid, K. A., Zhu, M., & Song, W. (2010). Planktonic protist communities in semi-enclosed mariculture waters: temporal dynamics of functional groups and their responses to environmental conditions. *Acta Oceanologica Sinica*, *29*(4), 106-115.
- Yannarell, A. C., Kent, A. D., Lauster, G. H., Kratz, T. K., & Triplett, E. W. (2003). Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial ecology*, *46*(4), 391-405.
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO (2014) The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks.
- Zhang, Y., Jiao, N., Cottrell, M.T., and Kirchman, D.L. (2006) Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production along a salinity gradient in the South China Sea. *Aquatic Microbial Ecology* *43*: 233-241.
- Zhou, J., Bruns, M. A., & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and environmental microbiology*, *62*(2), 316-322.