

Universidad Nacional del Comahue  
Centro Regional Universitario Bariloche



*Microcomunidades pelágicas de lagos  
someros andinos con alto contenido de  
materia orgánica: factores relacionados con  
el incremento de la radiación ultravioleta*

**Autor**

**Lic. Marcela Alejandra Bastidas Navarro**

**Director: Dra. Beatriz E. Modenutti**

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Biología

2009

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS .....	1
EL “BUCLE MICROBIANO” .....	2
EL BALANCE AUTOTROFÍA: HETEROTROFÍA .....	3
FOTODEGRADACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA .....	4
LA MIXOTROFÍA .....	5
ANTECEDENTES Y OBJETIVO DE ESTA TESIS .....	6
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>8</b>
<b>BALANCE ENTRE PRODUCCIÓN PRIMARIA Y PRODUCCIÓN BACTERIANA EN TRES LAGOS SOMEROS ANDINO-PATAGÓNICOS</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
OBJETIVOS.....	11
HIPÓTESIS.....	11
PREDICCIÓN.....	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
TRABAJO DE CAMPO .....	12
PARÁMETROS QUÍMICOS .....	14
DETERMINACIÓN DE BIOMASA ALGAL Y BACTERIANA .....	15
DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN PRIMARIA NETA Y PRODUCCIÓN BACTERIANA.....	16
ANÁLISIS DE DATOS .....	17
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>34</b>
<b>CARACTERIZACIÓN Y VARIACIÓN ESTACIONAL DE LOS CONSTITUYENTES DEL BUCLE MICROBIANO EN UN LAGO ANDINO SOMERO CON ALTO CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA DISUELTA</b> .....	<b>34</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>34</b>
OBJETIVOS.....	37
HIPÓTESIS.....	37
PREDICCIÓN.....	37
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTREO .....	38
CARACTERIZACIÓN OPTICA DEL AGUA DEL LAGO ESCONDIDO .....	40
DETERMINACIÓN DE NUTRIENTES .....	40
DETERMINACIÓN DE ABUNDANCIA Y BIOMASA DE LOS COMPONENTES MICROCOMUNITARIOS: BACTERIOPLANCTON, FITOPLANCTON (< y > 2 µM), NANOFLAGELADOS Y CILIADOS. ....	41
IDENTIFICACIÓN DEL ENSAMBLE PROCARIOTA (CARD-FISH) Y DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN BACTERIANA .....	42
ANÁLISIS DE DATOS.....	44
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
LUZ, TEMPERATURA, O <sub>2</sub> Y CONDUCTIVIDAD .....	45

CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS DEL AGUA.....	46
NUTRIENTES.....	50
CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA <i>A</i> DE LAS FRACCIONES AUTOTRÓFICAS MAYOR Y MENOR DE 2 $\mu$ M.....	52
ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE LAS FRACCIONES MAYOR Y MENOR DE 2 $\mu$ M.....	54
ABUNDANCIA, PRODUCCIÓN Y ESTRUCTURA DE PROCARIOTAS HETERÓTROFOS.....	62
LOS DEPREDADORES.....	68
<i>Nanoflagelados</i> .....	68
<i>Ciliados</i> .....	70
RELACIÓN ENTRE VARIABLES ÓPTICAS, QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.....	74
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>82</b>
<b>EFFECTO DE LA RADIACIÓN UV SOBRE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA DE AGUA DE LAGOS SOMEROS Y LIXIVIADOS DE MACRÓFITAS.....</b>	<b>82</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>82</b>
OBJETIVOS.....	86
HIPÓTESIS.....	86
PREDICCIONES.....	86
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	87
<i>A. Procedimiento de lavado del material utilizado.....</i>	<i>87</i>
<i>B. Preparación de lixiviados.....</i>	<i>87</i>
<i>C. Sistema de irradiación de muestras.....</i>	<i>88</i>
<i>D. Parámetros espectrofotométricos.....</i>	<i>90</i>
<i>E. Determinación de P reactivo soluble (PRS).....</i>	<i>91</i>
DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS.....	91
<i>Experimentos 1 y 2. Análisis de variaciones en las características ópticas de agua de lago y lixiviados frente a RUV.....</i>	<i>91</i>
<i>Experimentos 3 y 4. Análisis de liberación de P Reactivo Soluble (PRS) de agua de lago y lixiviados expuestos a diferentes calidades lumínicas.....</i>	<i>92</i>
ANÁLISIS DE DATOS.....	96
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>98</b>
<i>Análisis de variaciones en las características ópticas de la MOD.....</i>	<i>98</i>
<i>Análisis de liberación de P Reactivo Soluble (PRS) de MOD expuesta a diferentes calidades lumínicas.....</i>	<i>107</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>119</b>
<b>EFFECTO DE LA RUV SOBRE AGUA DE LAGO Y LIXIVIADO DE MACRÓFITAS: RESPUESTA BACTERIANA A CAMBIOS EN CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA.....</b>	<b>119</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>119</b>
OBJETIVOS.....	122
HIPÓTESIS.....	122
PREDICCIONES.....	122
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>123</b>
SITIO DE ESTUDIO Y MUESTREO.....	123
TRABAJO DE LABORATORIO.....	123
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	124

DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN, ABUNDANCIA BACTERIANA E IDENTIFICACIÓN DEL ENSAMBLE PROCARIOTA .....	127
ANÁLISIS DE DATOS .....	129
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>130</b>
CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS Y QUÍMICAS DE LOS LAGOS Y LOS EXPERIMENTOS .....	130
ABUNDANCIA BACTERIANA, TASA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN BACTERIANA .....	134
CARACTERIZACIÓN DEL ENSAMBLE PROCARIOTA .....	137
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>140</b>
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>144</b>
<b>EFECTO DE LA RUV EN EL RENDIMIENTO FOTOSINTÉTICO Y EN LA ACTIVIDAD DE BACTERIVORÍA EN NANOFLAGELADOS. ....</b>	<b>144</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>144</b>
OBJETIVOS .....	148
HIPÓTESIS .....	148
PREDICCIONES .....	148
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>149</b>
EXPERIMENTOS DE EXPOSICIÓN: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CALIDAD LUMÍNICA EN EL RENDIMIENTO FOTOSINTÉTICO DE LA COMUNIDAD ALGAL DEL LAGO ESCONDIDO .....	149
<i>Medición de parámetros fotosintéticos</i> .....	149
<i>Diseño experimental</i> .....	152
EXPERIMENTOS DE BACTERIVORÍA: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CONDICION LUMÍNICA EN LA TASA DE INGESTA DE PRESAS MARCADAS POR PARTE DE NANOFLAGELADOS MIXÓTROFOS Y HETERÓTROFOS .....	154
ANÁLISIS DE DATOS .....	155
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>157</b>
LA FOTOSÍNTESIS A LO LARGO DE LA COLUMNA DE AGUA .....	157
LA FOTOSÍNTESIS EN EL EXPERIMENTO DE EXPOSICIÓN .....	159
ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES LUMÍNICAS SOBRE LA BACTERIVORÍA .....	161
BALANCE ENTRE AUTOTROFÍA Y HETEROTROFÍA EN NANOFLAGELADOS MIXÓTROFOS .....	169
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>170</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>174</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>175</b>

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que me han acompañado de alguna u otra manera a lo largo de este tiempo de formación. El apoyo, principalmente afectivo, de cada uno de ellos ha sido vital y se hace especialmente evidente en esta última etapa.

A mi Directora Beatriz, gracias por su tiempo, paciencia, dedicación infinita y por su deseo constante de formarme como investigadora. Gracias por transmitirme, sin escatimar, su experiencia y conocimiento, y porque su amor por la ciencia me inspiró a lo largo de todo este tiempo y lo sigue haciendo.

A Esteban, infinitas gracias por sus consejos y sugerencias, por su interés y ayuda desinteresada. El aporte de su experiencia a lo largo de este trabajo fue trascendental, lo mismo que su ayuda en la edición de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Vero, Ceci, Sol, Ricky, Caro, Mariana y Leo por su interés y compañerismo. Por ofrecerme un cálido ambiente de trabajo y por los lazos de amistad creados.

A Pablo, por su acompañamiento incondicional durante parte importante de este trabajo, por su escucha amorosa y paciencia infinita. Gracias por compartir conmigo el amor por la ciencia, por su ayuda vital en los muestreos de campo y en el trabajo de laboratorio. Toda carga se hizo liviana con su compañía.

A mis queridos Padres y hermana, agradezco su amor y paciencia. Gracias por el apoyo constante, por los consejos recibidos, por compartir conmigo los buenos y malos momentos, pero principalmente por creer en mis capacidades.

A Ricardo, mi querido amigo, por su apoyo e interés constante, por la fe puesta en mí, y porque su cariño me acompañó durante todos estos años.

A Roberto Bertoni, por su interés en este trabajo y por su ayuda en el procesamiento de las muestras de carbono.

A Andrés Venturino, por facilitarme las instalaciones del laboratorio para las mediciones de isótopos

A la Universidad Nacional del Comahue, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Licenciatura y Doctorado de manera libre y gratuita. Gracias a todos los profesores que a lo largo de mi carrera han aportado en mi formación académica.

Este trabajo fue realizado con una beca doctoral de CONICET, y financiado por los siguientes proyectos: FONCyT 01-13395, CONICET PIP 6507, UNC B119 y B141.

## RESUMEN

En esta tesis se analizó la dinámica de las microcomunidades pelágicas de lagos someros andino-patagónicos con alta concentración de Materia Orgánica Disuelta (MOD) en relación con el efecto de factores de cambio global, particularmente el incremento de la Radiación UV (RUV). El estudio se realizó a través de muestreos de campo y de experimentación, *in situ* y en el laboratorio.

El objetivo del Capítulo I fue estudiar el balance entre producción primaria (PP) y bacteriana (PB) en los lagos Escondido, Morenito y El Trébol, en un muestreo de verano. La contribución del picofitoplancton ( $< 2 \mu\text{m}$ ) a la PP excedió 50 % de la producción total. Asimismo, esta fracción fue fotosintéticamente más eficiente que la fracción autotrófica de mayor tamaño. La PP disminuyó en los niveles superficiales debido a la alta irradiancia solar, mientras que la PB no se vio afectada. Además, se observaron cambios en la relación PP:BP en relación al contenido de MOD y al efecto de la luz. El contenido de MOD controlaría el balance entre PP y PB y la radiación solar debería ser incluida como un importante factor, ya que la relación PP:PB se modifica debido a la disminución de la PP por fotoinhibición.

En el Capítulo II se estudió al Lago Escondido que presenta un mayor contenido de MOD, por lo cual fue elegido para analizar la dinámica del bucle microbiano. Se estudió la estructura y dinámica de los diferentes componentes microcomunitarios, y se determinaron características ópticas de la MOD (color y tamaño molecular relativo), a través de muestreos estacionales. El color del agua disminuyó desde verano de 2006 hasta verano de 2008, con un incremento en los últimos dos muestreos. La abundancia bacteriana aumentó cuando la MOD presentó un bajo peso molecular, mientras que la PB estuvo influida por la temperatura de incubación y la calidad de la MOD. La composición del ensamble procariota, estudiada mediante la técnica de CARD-FISH, mostró al dominio *Bacteria* como grupo dominante a lo largo del ciclo anual estudiado, mientras que las *Archaea* parecen adquirir importancia con la presencia de MOD más refractaria. Los flagelados mixótrofos dominaron el nivel trófico siguiente: las clases Haptophyceae, Cryptophyceae y Dinophyceae, constituyeron más del 80 % en términos de abundancia celular total.

En el Capítulo III, se estudió el efecto de la RUV en las características ópticas de la MOD y en la liberación de P de los lagos Escondido, Morenito y El Trébol y de lixiviados de las macrófitas *Schoenoplectus californicus* y *Potamogeton linguatus*. La MOD de los

lagos y de los lixiviados se fotodegradó en 5 h de exposición. Las diferencias observadas entre los lagos pueden asociarse con una mayor contribución de MOD autóctona en los lagos Morenito y El Trébol. Durante exposiciones a UVR, se observó una liberación de fósforo reactivo soluble en los tres lagos estudiados y en los lixiviados de las dos macrófitas. Finalmente, la exposición a RUV como factor de cambio global, afecta la calidad de MOD aportada por las macrófitas.

En el Capítulo IV se analizó la respuesta bacteriana a los diferentes tipos de MOD: agua de lago expuesta o no a RUV, y lixiviados expuestos o no a RUV. La exposición a RUV produjo una alta actividad bacteriana en los tratamientos de agua natural de lago. Por el contrario, la PB en el tratamiento de lixiviado irradiado se redujo. El grado de aromaticidad en los lixiviados se vio incrementado, lo cual pudo contribuir con carbono orgánico disuelto menos disponible para la actividad bacteriana. Las bacterias del grupo  *$\beta$ -Proteobacteria* desplazaron competitivamente a otros grupos en los tratamientos con lixiviados, siendo más eficientes en la utilización de MOD de alto peso molecular. Estos resultados señalan la importancia de la interacción entre la RUV y la fuente de MOD en la respuesta bacteriana en los lagos someros.

Por último en el Capítulo V se analizó el efecto de las RUV sobre la bacterivoría de los nanoflagelados mixótrofos y heterótrofos presentes en el Lago Escondido. Para el caso de los nanoflagelados mixótrofos, se analizó conjuntamente la respuesta fotosintética y la fagotrofia. Se observó que la ingesta de presas por parte de los mixótrofos en el Lago Escondido, estaría relacionada con la disponibilidad y calidad de luz, ya que las mayores tasas de bacterivoría se observaron en verano con mayor radiación fotosintéticamente activa. Por otro lado, los nanoflagelados heterótrofos presentaron mayores tasas de bacterivoría en oscuridad. Los resultados obtenidos permiten concluir que en la mixotrofia existe un balance entre la fijación de C por fotosíntesis y la ingesta de partículas que es modulado por la luz. En nuestros experimentos, la exposición a RUV generó un desbalance de estos modos de alimentación hacia la heterotrofia en verano y hacia la autotrofia en otoño.



**ABSTRACT**

This Doctoral Thesis analyzed the dynamic of pelagic microcommunities from shallow Andean-patagonic lakes with high dissolved organic matter (DOM) concentration, in relation to global change factors, particularly, the increase of UV Radiation (UVR). The different aspects of the study were carried out combining field sampling and *in situ* and laboratory experiments.

In Chapter I, we aimed to study the balance between primary (PP) and bacterial (BP) production in three shallow Andean lakes, in a summer sampling. The contribution of picophytoplankton to total PP was, in general, very high exceeding 50 %. This fraction was photosynthetically more efficient than the large autotrophs. We observed a decrease in PP at surface levels due the high solar irradiances, while BP was not affected. Changes in the PP:BP ratios were observed in relation to DOM content and light effect. The amount of available DOM could drive the balance between PP and BP, and solar radiation should be included as an important factor since PP:BP ratio may decrease because of PP photoinhibition.

In Chapter II we analyzed the dynamic of microbial loop of Lake Escondido. The different biological components and optical characteristics of DOM (color and mean molecular size) were analyzed through seasonal samplings. Water color decreased from summer 2006 to summer 2008, followed by an increase in the last two samplings. Heterotrophic bacteria abundance increased when DOM showed low molecular weight. BP was related with both, incubation temperature and DOM quality. The prokaryotic assemblage composition, analyzed with CARD-FISH method, showed *Bacteria* as the dominant group all through the studied annual cycle, whereas *Archaea* abundance seemed to be related with the presence of more refractory DOM. Mixotrophic nanoflagellates were dominant in the higher trophic level. Classes Haptophyceae, Cryptophyceae and Dinophyceae, contribute with more than 80 % in total cellular abundance terms.

In Chapter III, we studied the effect of UVR on DOM optical features, and P release from lakes Escondido, Morenito and El Trébol and of leachates from the emergent macrophyte *Schoenoplectus californicus* and the submersed species *Potamogeton linguatus*. The DOM from lakes and leachates resulted photobleached after 5 h of UVR exposure. Water from lakes Morenito and El Trébol showed more abrupt changes suggesting a higher contribution of autochthonous DOM. A significant release of soluble

reactive phosphorous was observed in the water of the three lakes and leachates from the two macrophytes. Finally, the exposition to UVR affected the macrophyte MOD quality.

In Chapter IV we analyzed bacterial response to different DOM types. The aim of this study was to identify bacterial responses in two shallow lakes from Patagonia to UV-irradiated DOM from different sources: lake water exposed and not exposed, and leachates exposed and not exposed. After UVR exposure, a high bacterial activity was observed in lake water treatments. On the contrary, carbon uptake by bacteria was reduced in the irradiated leachate treatment. The degree of aromatization in the leachate treatments increased after irradiation and thus may contribute to a dissolved carbon less available for bacterial activity. Regarding the bacteria assemblage (CARD-FISH method) we observed that  *$\beta$ -Proteobacteria* outcompete the other groups in the leachate treatments, being more efficient utilizing the high molecular weight DOM.

Finally, in Chapter V we analyzed the effect of UVR on mixotrophic and heterotrophic nanoflagellates from Lake Escondido. We studied photosynthetic parameters and phagotrophy rates in mixotrophic nanoflagellates. Prey ingestion by mixotrophs was related with light availability and quality, since the highest bacterivory rates were observed in summer, when photosynthetically active radiation was higher. On the other hand, heterotrophic nanoflagellates exhibited higher bacterivory rates in darkness. We concluded that in mixotrophic nanoflagellates the balance between photosynthesis and particle ingestion is modulated by light quality. In addition, our experiments showed that UVR exposure can cause a nutrition imbalance, since the autotrophy-phagotrophy ratio was shifted towards heterotrophy in summer and autotrophy in autumn.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los ecosistemas acuáticos son ambientes particularmente vulnerables a cambios ambientales, transformándose en buenos sensores de cambios tanto a nivel local como global (Williamson et al. 2008). En relación con esto último, se ha señalado que el cambio climático global está transformando a los ecosistemas acuáticos (Poff et al. 2002). Dicha transformación consiste en la modificación de los ciclos biogeoquímicos de los cuerpos de agua a través de varias vías, incluyendo variación en la penetración de las Radiaciones Ultravioletas (RUV). Varios estudios han demostrado la potencialidad del cambio climático global para influir sobre la penetración de la RUV en cuerpos de agua dulce (Williamson et al. 1996; Schindler et al. 1996a; Yan et al. 1996; Schindler 1997; Vincent et al. 1998) y en el océano (Vodacek et al. 1997; Nelson et al. 1998). Tanto el cambio climático como la explotación de tierras del área de drenaje de los cuerpos de agua, afectan el transporte desde el ecosistema terrestre hacia el agua de sustancias orgánicas disueltas y particuladas (Zepp et al. 2003). Tales sustancias, como la materia orgánica disuelta (MOD) y en particular la coloreada, controlan la penetración de las RUV en muchos ambientes acuáticos (Morris et al. 1995; Schindler et al. 1996a; Williamson et al. 1996; Häder et al. 2007). Las sequías, por ejemplo, reducen el ingreso de MOD y de sedimentos a los ambientes acuáticos (Schindler et al. 1996a; Schindler 1997). Por el contrario, un incremento de las precipitaciones pueden reducir la penetración de la RUV favoreciendo la escorrentía y el ingreso de MOD (Rae et al. 2001; Zepp et al. 2003). En estudios comparativos, se ha demostrado que los cambios en el ingreso de MOD terrestre son más importante en el control de la penetración de RUV a los cuerpos de agua, que las fluctuaciones de la RUV en la superficie terrestre causadas por la depresión de la capa de ozono (Schindler et al. 1996b; Yan et al. 1996; Pienitz & Vincent 2000). De esta manera, el conocimiento de la dinámica del carbono orgánico en los ecosistemas acuáticos, es una herramienta clave para entender el efecto del cambio climático en estos ambientes (Williamson et al. 2008).

## LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

En los ecosistemas acuáticos, el Carbono Orgánico Disuelto (COD) es la forma de materia orgánica más abundante (Benner 2003). El COD, operacionalmente se define como el carbono orgánico que pasa a través de un filtro con tamaño de poro de entre 0.2 y 0.7

$\mu\text{m}$ , y éste incluye tanto coloides como moléculas disueltas. Desde el punto de vista biológico, la MOD puede ser clasificada como lábil (MODL) o refractaria (MODR). La MODL está constituida mayormente por compuestos de bajo peso molecular tales como aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas, nucleótidos y esteroides (Amon & Benner 1996; Münster et al. 1999). Parte de esta fracción es producida fotosintéticamente y excretada como carbono orgánico disuelto extracelular (COE), mayormente por el fitoplancton, macrófitas y sus algas epífitas. Debido a que esta fracción de MOD se genera dentro del sistema, se denomina de origen autóctono (Tranvik 1993). La MODR, por su parte, comprende cientos de macromoléculas con una estructura y composición compleja (Münster & Chróst 1990). Las sustancias húmicas (SH) pertenecen a esta categoría; son sustancias orgánicas heterogéneas y biogénicas que pueden ser caracterizadas por ser de color amarillo a negro, de alto peso molecular y refractarias (Aiken et al. 1985; McKnight & Aiken 1998). Debido a que ingresan a los cuerpos de agua a través de los lixiviados provenientes del área de drenaje del sistema acuático, esta MOD es de origen alóctono (Sachse et al. 2001). Estas sustancias alcanzan cerca del 50 % del total de COD en la mayoría de las aguas superficiales, sin embargo, en aguas altamente coloreadas, características de los lagos húmicos, las SH pueden alcanzar tanto como el 90 % del COD (Kronberg 1999).

Como consecuencia de la elevada concentración de COD, existen varias características comunes entre los lagos húmicos: agua de color marrón, baja penetración de la luz con predominancia de la fracción roja del espectro, baja conductividad y baja concentración de nutrientes inorgánicos (Keskitalo & Eloranta 1999). Todas estas características tienen consecuencias ecológicas que pueden modificar la estructura y funcionamiento de la cadena trófica pelágica en los lagos húmicos (Arvola et al. 1999) y, en general, se ha observado que la composición de la comunidad planctónica es diferente de la presente en lagos de aguas claras (Bergström & Jansson 2000).

## EL “BUCLE MICROBIANO”

Hasta hace pocas décadas, el concepto de cadena trófica se entendía exclusivamente como un sistema simple en el que la producción primaria fitoplanctónica era transferida, a través de niveles tróficos discretos, desde metazoos hasta peces (Odum 1972). Las bacterias heterotróficas se encontraban también presentes como “mineralizadores” de materia orgánica excretada o muerta. Sin embargo, actualmente el concepto de cadena

trófica planctónica ha cambiado de manera importante, al focalizar la atención en el rol de las bacterias y los protistas. Estos organismos forman colectivamente el denominado “Bucle microbiano” o “Cadena microbiana” (Azam et al. 1983). Este concepto fue propuesto por investigadores de ambientes marinos, quienes postularon que la cadena microbiana constituía un nexo energético con los metazoos, reciclando la producción primaria “perdida” por el fitoplancton marino, vía excreción de productos de la fotosíntesis o muerte celular (Pomeroy & Wiebe 1988). En los lagos oligotróficos de aguas claras como en los océanos, una parte sustancial de la MOD es de origen autóctono (Morris et al. 1995). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en los lagos húmicos la mayor parte de la MOD es alóctona; de manera que en estos lagos la principal función de la cadena microbiana es transferir energía desde estos aportes hasta los metazoos (Benner 2003; Vincent & Belzile 2002). En estos lagos, las sustancias coloreadas no solo promueven el crecimiento bacteriano sino que restringen la producción primaria fitoplanctónica al competir por la luz (Jansson et al. 2000). La alta producción bacteriana y baja producción fitoplanctónica en los lagos húmicos muestran que gran parte de la producción pelágica secundaria se basa en la movilización de la energía química, y no en la fotosíntesis fitoplanctónica (Jansson et al. 2000). La energía movilizada por las bacterias es transferida a los niveles tróficos superiores via los nanoflagelados (mixótrofos y heterótrofos) (Kankaala 1988; Jansson et al. 1999).

#### EL BALANCE AUTOTROFÍA: HETEROTROFÍA

La evidencia sugiere que los lagos húmicos son sistemas netamente heterotróficos, no solo en el sentido de ser fuentes de CO<sub>2</sub> (Salonen et al. 1992; del Giorgio & Peters 1994; Kankaala et al. 1996; del Giorgio et al. 1997), sino también en el sentido de que la producción pelágica bacteriana neta es mayor que la correspondiente producción primaria (Arvola et al. 1999). Considerando que los lagos oligotróficos de aguas claras son sistemas netamente autotróficos (Ochs et al. 1995), una hipótesis razonable sería que existe un gradiente autotrofía/heterotrofía en lagos con baja producción primaria, que refleja una transición entre ser un sistema netamente autotrófico o heterotrófico. El cálculo de la relación producción bacteriana (PB): producción primaria (PP) es de gran interés en el estudio del balance entre heterotrofía y autotrofía en un cuerpo de agua. Cuando PP:PB es menor que uno, la PB provee más carbono particulado que el fitoplancton para ser incorporado por niveles tróficos superiores, y la base de la cadena es heterotrófica (Jansson

et al. 2000). Dicho balance claramente se ve determinado por el suministro y la concentración de MOD autóctona en los lagos. De esta manera, variaciones naturales en el contenido de la MOD puede generar cambios en la relación PB:PP, con subsiguientes desbalances en la importancia relativa de los flujos de energía en los sistemas. Asimismo, cambios climáticos de larga duración con alteración en el suministro de MOD pueden cambiar significativamente la bioestructura y productividad de los lagos de baja productividad (Jansson et al. 1999, 2000).

#### FOTODEGRADACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA

Durante los últimos 20 años, los niveles de incidencia de la radiación UV se han visto incrementados sobre la superficie de la Tierra y los ecosistemas acuáticos, como resultado de la degradación del ozono estratosférico (Crutzen 1992; Karentz et al. 1994; Häder et al. 2007). El agua por sí misma, es relativamente transparente a la RUV (Litjens et al. 1999); sin embargo, como se mencionó anteriormente, la atenuación de la RUV en los cuerpos de agua es afectada principalmente por el contenido de MOD, a menudo medida como COD, cuya concentración varía de manera importante entre los lagos (Rae et al. 2001). Por ejemplo, Morris et al. (1995) mostró que aproximadamente el 90 % de la variación de la atenuación de la RUV en un amplio rango de lagos puede ser explicada por variaciones en la concentración de COD. La energía absorbida por la MOD puede resultar en una variedad de procesos fotoquímicos, entre los que se incluye la fotodegradación de la materia orgánica (Granéli et al. 1996; Reche et al. 2000; Brinkman et al. 2003; Twardowski et al. 2004). La fotodegradación consiste en la pérdida de color causada por la absorción de la radiación solar (Molot & Dillon 1997; Morris & Hargreaves 1997; Reche et al. 1999; Osburn et al. 2001; Zagarese et al. 2001), y las variaciones en este proceso dependen tanto de la composición química del COD, como de la condición química y trófica del agua en la cual ocurre la fotodegradación (Reche et al. 2000). Por otro lado, cambios en la penetración de la RUV en el agua tienen la capacidad de impactar directamente sobre la composición específica de la biota acuática en cada nivel trófico (Vincent & Belzile 2002). Asimismo, pueden generar efectos en cascada hacia la cadena trófica béntica (p. ej. Bothwell et al. 1994) o pelágica (p. ej. Mostajir et al. 1999). De esta manera, el estudio de la calidad de MOD de un lago, resulta de vital importancia para interpretar los efectos de la RUV en las cadenas tróficas.

La alteración fotoquímica de la MOD, causada por las radiaciones solares de onda corta, es un factor de importancia en la regulación de la biodisponibilidad de COD para la utilización microbiana (p. ej. Lindell et al. 1995; Bano et al. 1998; Bertilsson & Tranvik 1998). La radiación UV puede incrementar la disponibilidad de COD para las bacterias heterotróficas (Lindell et al. 1995; Wetzel et al. 1995; Moran & Zepp 1997) debido a la ruptura de las macromoléculas refractarias produciendo compuestos de menor peso molecular (Bertilsson & Tranvik 1998; Moran & Zepp 1997, 2000). Por otro lado, algunos estudios han registrado un aumento en la refractancia de la MOD después de la exposición lumínica (Naganuma et al. 1996; Pausz & Herndl 1999), lo cual genera un efecto negativo en el crecimiento bacteriano (Benner & Biddanda 1998; Obernosterer et al. 1999). Tranvik y Bertilsson (2001) demostraron que el efecto neto de las radiaciones sobre la biodisponibilidad de COD depende de las características químicas del COD: el COD de origen algal producido recientemente es convertido a componentes de baja calidad como sustrato microbiano, mientras que la materia orgánica húmica genera un incremento en el crecimiento bacteriano después de la exposición a RUV. Un caso de particular importancia, es el de la MOD de los lixiviados de las macrófitas presentes en la zona litoral de los lagos. Dichos lixiviados son considerados una fuente sustancial de MOD en muchos cuerpos de agua (Wetzel 1992), sin embargo pocos estudios han investigado el efecto de la radiación solar UV sobre los mismos. Anesio et al. (2000) observaron que el efecto de la exposición a RUV sobre la biodisponibilidad de MOD varió sustancialmente entre los lixiviados de diferentes macrófitas. Asimismo, observaron un incremento en la utilización bacteriana del carbono, en presencia de lixiviados expuestos previamente a RUV.

## LA MIXOTROFÍA

Por definición, un organismo mixótrofo es aquel que utiliza tanto el proceso de fotosíntesis como la fagotrofia para la obtención de energía (Sanders 1991). Estos organismos constituyen un tipo funcional presente en lagos oligotróficos y húmicos (Jansson et al. 2000), y en altas latitudes (Eloranta 1989, 1995; Lepistö & Rosenström 1998). Asimismo, son componentes dominantes de la comunidad fitoplanctónica de lagos de alta montaña (Carrillo et al. 2002; De Hoyos et al. 1998; Straškrabová et al. 1999), ecosistemas de agua dulce y marinos (Sanders et al. 2000; Sherr & Sherr 2002). Por otra parte, en los lagos andinos se ha observado que estos organismos son dominantes (Modenutti et al. 2000; Modenutti & Balseiro 2002; Modenutti et al. 2005). La naturaleza

dual del metabolismo de los mixótrofos, ofrece una ventaja en ecosistemas donde la luz o los nutrientes minerales son factores limitantes, ya que la habilidad fagotrófica permite el suplemento del crecimiento autotrófico con C y nutrientes extra provenientes de sus presas (Jones 1997, 2000; Raven 1997). Asimismo, se ha demostrado recientemente que la mixotrofia es una estrategia adaptativa tanto en condiciones de luz o nutrientes deficientes como en condiciones que inducen exceso de stress (Medina Sanchez et al. 2004; Carrillo et al. 2006) siendo uno de los principales factores ambientales estresantes las radiaciones UV. Si bien son muy numerosos los estudios que han analizado el efecto de las RUV sobre la producción primaria fitoplanctónica (en nuestro país, p. ej. Helbling et al. 2001a; Villafañe et al. 2004, 2008; Modenutti et al. 2004; Ferrero et al. 2006; Roy et al. 2006; Torremorell et al. 2009, entre muchos otros), pocos se han focalizado en el efecto de las RUV sobre la actividad de fagotrofia (Modenutti et al. 2008). Los estudios más significativos sobre el efecto de RUV sobre la ingesta de partículas por parte de organismos mixótrofos, se han centrado en comunidades de lagos oligotróficos de altura (Carrillo et al. 2002; Medina Sanchez et al. 2002, 2004, 2006). Algo similar sucede con el estudio de la respuesta de los nanoflagelados heterotróficos frente a condiciones estresantes causadas por RUV. Se ha observado que uno de los principales efectos observados ha sido la pérdida de movilidad y un consecuente descenso de la bacterivoría (Sommaruga et al. 1996; Ochs 1997; Ochs & Eddie 1998; Sommaruga & Buma 2000). Sin embargo, estos estudios se han realizados con especies aisladas de cultivos, existiendo muy pocos trabajos con la comunidad completa nanoflagelados heterótrofos (Wickham & Carstens 1998).

## ANTECEDENTES Y OBJETIVO DE ESTA TESIS

Considerando todas estas evidencias esta Tesis Doctoral planteó analizar los efectos del cambio global (particularmente el incremento de radiaciones UV) sobre microcomunidades de ambientes lacustres andino-patagónicos con alto MOD. La región lacustre denominada por Thomasson (1963) como “Región Araucana” o de los “Lagos Araucanos” posee un relieve montañoso con valles glaciares transversales, lagos y torrentes. Los lagos de esta región son de superficie y profundidad variable, hallándose lagos grandes y profundos (superficie mayor a los 5 km<sup>2</sup> y profundidad mayor a los 100 m), como también lagos pequeños y someros (superficie menor a los 5 km<sup>2</sup> y profundidad menor a los 12 m) (Modenutti et al. 1998). Estos últimos lagos presentan un contenido de materia orgánica disuelta relativamente mayor a la de los lagos profundos de la región



(Morris et al. 1995; Tabla 1.1 de esta tesis); por lo que constituyen ambientes propicios para el estudio de las variaciones en sus microcomunidades debidas a modificaciones en la MOD por un factor de stress como la RUV. En tal sentido, es importante mencionar dos contribuciones sobre el particular, una que estudia la fotodegradación en campo de la MOD en un lago somero andino (Zagarese et al. 2001) y otra sobre fotoinhibición fotosintética en dos lagos someros andinos (Villafañe et al. 2004). La estructura y la dinámica de las comunidades fitoplanctónicas y zooplanctónicas de los ambientes someros han sido extensamente estudiadas (p. ej. Balseiro & Modenutti 1990; Díaz & Pedrozo 1993; Modenutti & Dieguez 1996; Balseiro et al. 1997; Modenutti & Pérez 2001; Bastidas Navarro & Díaz Villanueva 2004; Bastidas Navarro & Modenutti 2007). Los estudios relativos a la estructura de las comunidades microbianas son escasos en estos lagos someros, más aún si los comparamos con aquéllos sobre lagos profundos de la región andina nord-patagónica en relación con la RUV (Corno et al. 2009; Modenutti & Balseiro 2002; Modenutti et al. 1998, 2004, 2005, 2008). El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue analizar la dinámica de las microcomunidades acuáticas de ambientes con alta concentración de materia orgánica en relación con el efecto de factores relacionados con el incremento de la RUV. El trabajo se presenta en cinco capítulos donde se desarrollaron trabajos de campo y de experimentación *in situ* y de laboratorio. Los objetivos generales y parciales así como las hipótesis planteadas se consignan en cada uno de los capítulos que integran esta tesis.



## CAPÍTULO I

### BALANCE ENTRE PRODUCCIÓN PRIMARIA Y PRODUCCIÓN BACTERIANA EN TRES LAGOS SOMEROS ANDINO-PATAGÓNICOS



#### INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas acuáticos el flujo de energía es mantenido principalmente por los organismos autótrofos, los cuales utilizan como fuente de energía a la luz solar, y por las bacterias heterótrofas que utilizan materia orgánica autóctona y alóctona para sus requerimientos metabólicos (Moran & Hodson 1990; Jones 1992). Elevadas tasas de producción primaria proveen a las bacterias epilimnéticas de una importante fuente de carbono (Lovell & Konopka 1985) y en sistemas con altos contenidos de sustancias húmicas, el bacterioplankton puede incluso dominar el flujo total de energía (Hessen 1998; Jansson et al. 2000). Sin embargo, las bacterias compiten eficientemente por los mismos nutrientes inorgánicos que limitan el crecimiento fitoplanctónico (Currie & Kalff 1984). En general, las bacterias muestran mayor afinidad por el fósforo que el fitoplancton y, por lo tanto, son a menudo mejores competidoras a bajas concentraciones de fósforo (Gurung et al. 1999). La mayor afinidad que presentan las bacterias por los nutrientes ha sido relacionada con la mayor superficie-volumen que presentan estos organismos, causando una eficiente toma de nutrientes, por lo cual se ven favorecidas frente a los autótrofos de mayor tamaño cuando los nutrientes son escasos (Hessen et al. 1994; Jansson et al. 1996). Por otro lado, si analizamos la composición fitoplanctónica, las diferencias de tamaño tienen una significancia fisiológica y ecológica importante. Tanto la flotación, como la sedimentación, la toma de nutrientes y el pastoreo son procesos que se ven influenciados



por el tamaño algal (Uehlinger & Bloesch 1989). Por ejemplo, la fracción fitoplanctónica de menor tamaño, denominada picofitoplancton (0.2-2  $\mu\text{m}$ ), es mejor competidora en ambientes pobres en recursos que la fracción de mayor tamaño (Fitoplancton  $> 2 \mu\text{m}$ ) (Callieri 2008). Esto se da básicamente por la misma razón (alta relación superficie-volumen) en la eficiencia de toma de nutrientes por parte de las células pequeñas como lo mencionamos anteriormente para las bacterias. De esta forma, el picofitoplancton es la fracción que a menudo domina la producción estival en lagos oligotróficos (Stockner 1991; Callieri et al. 2007).

Considerando el tamaño celular, tanto el bacterioplancton como el fitoplancton pueden competir eficientemente por nutrientes, sin embargo la luz es un factor que puede influir sobre el resultado de la competencia. En ambientes con elevada transparencia, el agua y sus características ópticas son el mayor componente en la absorción de las radiaciones solares, mientras que en aguas con menor transparencia, el contenido de materia orgánica disuelta coloreada es el mayor factor responsable de la absorción de, al menos, las longitudes de onda cortas del espectro solar (Radiaciones UV) (Kirk 1980; Osburn et al. 2001). La absorción de la luz por parte de dichos compuestos disueltos, mayormente sustancias húmicas, puede causar una competencia directa con el fitoplancton en la captura de energía lumínica disponible (Kirk 1980). De esta manera, una alta disponibilidad de materia orgánica disuelta coloreada constituye una importante fuente de sustrato para las bacterias, pero a su vez afectan la disponibilidad lumínica para la fotosíntesis (Bergström & Jansson 2000). En relación con esto, la absorbancia en las longitudes de onda verde y azul de estos compuestos, reducen la calidad lumínica que es recibida por los organismos autótrofos (Pick & Agbeti 1991; Pérez et al. 2002; Stomp et al. 2007). Por lo tanto, la producción de los organismos fotoautótrofos podría verse limitada en lagos húmicos, debido a la atenuación lumínica causada por una elevada absorción de determinadas longitudes de onda (Carpenter et al. 1998). De esta manera, el resultado de la competencia entre el picoplancton autotrófico y el heterotrófico y el fitoplancton de mayor tamaño, se vería afectado por ingresos de carbono orgánico disuelto al cuerpo de agua (Drakare et al. 2002). La relación entre la producción primaria (PP) y la producción bacteriana (PB) puede ser usada como una estimación del balance Autotrofia: Heterotrofia (Jansson et al. 2000). Un valor de  $PP: PB < 1.0$  indica que la producción bacteriana provee más carbono particulado que la producción fitoplanctónica, por lo tanto, la base de la cadena alimentaria para los pastoreadores es principalmente heterotrófica (Jansson et al. 2000).



Los lagos andinos del norte de la Patagonia (41° S) comprenden grandes lagos profundos y pequeños lagos someros de origen glaciario. Los lagos someros (con una profundidad < 12 m) han mostrado mayores valores de coeficientes de extinción, con mayor concentración de sustancias disueltas coloreadas, lo cual causa importantes diferencias en la calidad espectral de la luz solar que penetra en el cuerpo de agua (Pérez et al. 2002). El alto contenido de materia orgánica disuelta en estos lagos puede asociarse a la presencia en la zona litoral de macrófitas con (Bastidas Navarro et al. 2009). De esta forma, los ambientes estudiados resultan interesantes para la evaluación de la producción autotrófica y heterotrófica bajo un escenario de alta exposición a la radiación ultravioleta en sistemas con alta concentración de materia orgánica disuelta. Se diseñó una investigación en tres lagos someros andinos nord-patagónicos, midiéndose el clima óptico a través de la columna de agua y evaluándose experimentalmente la producción bacteriana y fotosintética, y la eficiencia de dos fracciones de tamaño fitoplanctónicas: picofitoplancton y fitoplancton > 2 µm.



## OBJETIVOS

1. Determinar los espectros de absorbancia de cada lago, relacionándolos con el contenido de materia orgánica disuelta.
2. Analizar la biomasa y la composición algal de dos fracciones fitoplanctónicas: el picofitoplancton (0.2- 2  $\mu\text{m}$ ) y la fracción  $> 2 \mu\text{m}$ .
3. Analizar la distribución en la columna de agua de los pigmentos predominantes del picofitoplancton en cada lago en función del clima óptico de cada lago.
4. Estudiar la contribución del bacterioplancton y el fitoplancton a la producción total, analizando el índice PP:PB en la columna de agua.

## HIPÓTESIS

1. El balance entre producción primaria y bacteriana se ve influenciado por el contenido de materia orgánica disuelta del lago, afectando al bacterioplancton y al fitoplancton.

## PREDICCIÓN

Un mayor contenido de MOD favorecerá al bacterioplancton, disminuyendo el índice PP:PB.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### TRABAJO DE CAMPO

Durante enero de 2006, se estudiaron tres lagos someros incluidos en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina, situados alrededor de los 41°S y 71°O: Escondido, Morenito y El Trébol. Dichos ambientes son lagos someros ( $Z_{\max} \sim 12$  m) y pequeños (Área  $\sim 1$  km<sup>2</sup>) (Fig. 1.1; Tabla 1.1). La zona litoral de los lagos se encuentra colonizada por dos macrófitas: la emergente *Schoenoplectus californicus* (Meyer) Soják y la sumergida *Potamogeton linguatus* Hangstrom. El estudio fue realizado durante el verano a fin de estimar la producción primaria de la comunidad fitoplanctónica expuesta a la mayor irradiancia solar. Asimismo, se consideró apropiado el estudio de la producción autotrófica en el momento de mayor abundancia algal en estos ambientes.

El estudio consistió en trabajo de campo y la realización de experimentos en el lago. Los muestreos y las experiencias se realizaron una vez en cada lago, durante enero de 2006, en un punto de muestreo situado en la parte más profunda de cada lago. Los tres lagos fueron muestreados en días consecutivos para evitar variaciones temporales cortas en la composición del fitoplancton y del bacterioplancton. En cada ocasión de muestreo se llevaron a cabo perfiles verticales de temperatura, de bandas de Radiación Ultravioleta (UV-B 305 y UV-A 340 nm) y Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA, 400-700 nm) con un radiómetro sumergible PUV 500B (Biospherical Instruments). También se midió la concentración de oxígeno disuelto, conductividad y pH en cada ocasión de muestreo utilizando un oxímetro, un conductímetro y un peachímetro, respectivamente (YSI Model 85).

En cada ocasión de muestreo se tomaron muestras de agua con una botella Van Dorn a 0 m, 3 m y 6 m en el Lago Escondido, y a 0 m, 4 m y 8 m en los lagos Morenito y El Trébol. El agua fue distribuida en contenedores lavados previamente con ácido clorhídrico, para su posterior análisis en el laboratorio.

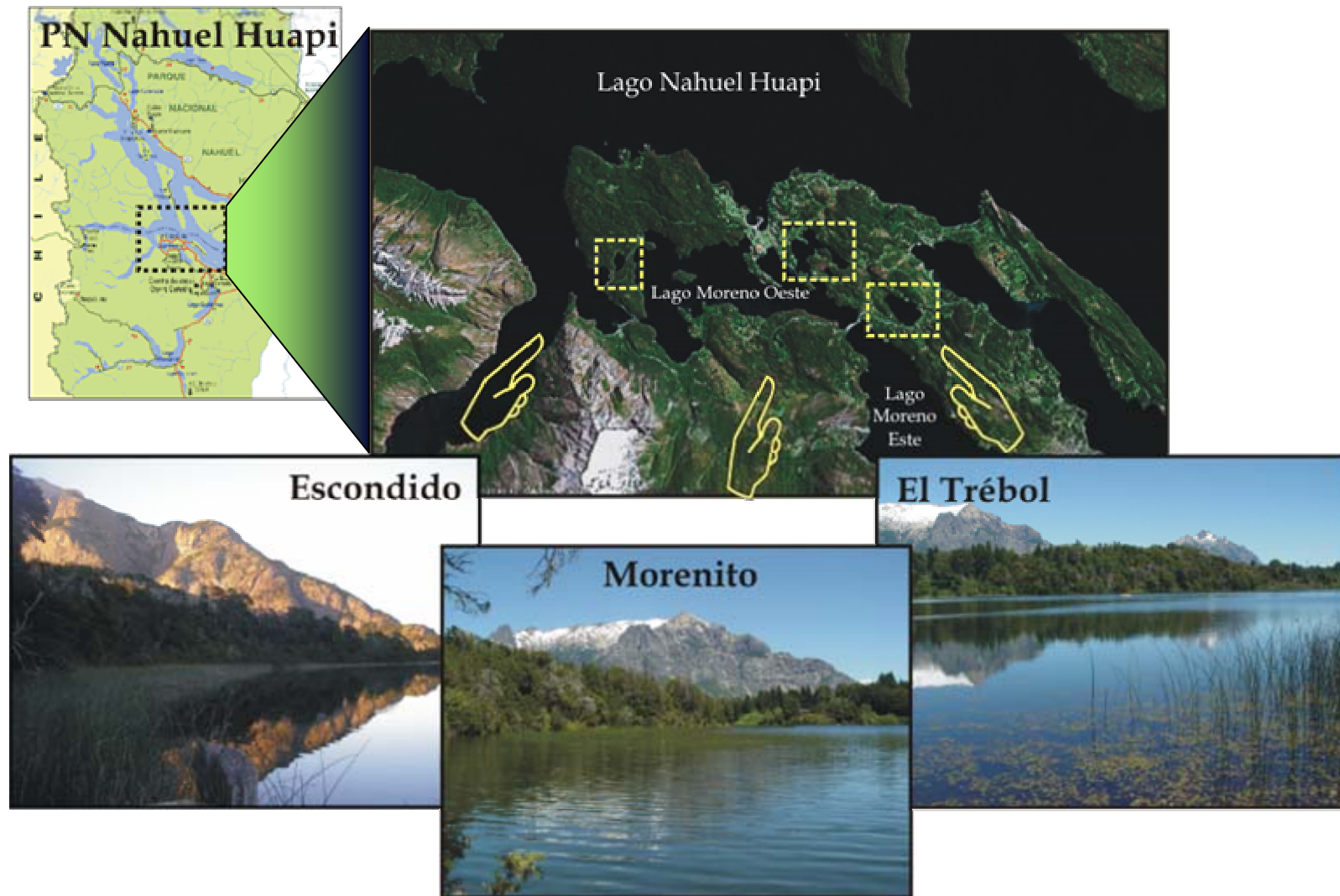


Figura 1.1. Mapa de Parque Nacional Nahuel Huapi, fotografía satelital de la zona donde se encuentran los lagos estudiados y fotografía de los lagos Escondido, Morenito y El Trébol.



## PARÁMETROS QUÍMICOS

Las muestras fueron llevadas inmediatamente al laboratorio en oscuridad y aisladas térmicamente. Para la determinación de Fósforo Disuelto Total (PDT) y Nitrógeno Inorgánico Disuelto (NID) se utilizó agua de lago filtrada a través de filtro GF/F. La concentración de Fósforo Total (PT) fue determinada directamente en agua de lago sin filtrar. Para las determinaciones de PT y PDT, las muestras fueron digeridas con persulfato a 125°C a 1.5 atm durante 1 h. Las concentraciones correspondientes se obtuvieron a través del método de reducción con ácido ascórbico, mientras que la determinación de amonio se realizó con el método de azul de indofenol (APHA 1992).

La concentración de Carbono Orgánico Disuelto (COD) fue medida en 50 mL de agua de lago filtrada a través de filtro Millipore de 0.2 µm, con un Analizador de Carbono Shimadzu (TOC 5000A). Además, se llevaron a cabo escaneos espectrofotométricos desde los 250 a 790 nm, en la misma agua de lago filtrada en cubetas de cuarzo de 10 cm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV2450 de doble haz con el objetivo de obtener las curvas de absorbancia de la Materia Orgánica Disuelta (MOD). Las unidades de absorbancia fueron convertidas a coeficiente de absorción a través de la siguiente fórmula:

$$a_d = 2.303A / l$$

donde  $a_d$  es el coeficiente de absorción ( $m^{-1}$ ),  $A$  corresponde a la absorbancia y  $l$  es la longitud de paso en metros.

De la misma manera, se calculó la siguiente relación:

$$a_{250}:a_{365}$$

donde  $a_{250}$  es el coeficiente de absorción a los 250 nm y  $a_{365}$  a los 365 nm. Esta relación se utiliza para estimar cambios en las características de la MOD (Pérez & Sommaruga 2007). La absorbancia a longitudes de onda corta representa a las moléculas de menor peso molecular, mientras que las moléculas de mayor tamaño se ven representadas por la absorbancia a longitudes de onda larga. De esta manera, el valor de la relación  $a_{250}:a_{365}$  aumenta cuando predominan los compuesto de alto bajo molecular y viceversa. También se estimó el contenido de materia orgánica disuelta coloreada a través de la determinación de la fluorescencia con un fluorómetro 10-AU (Turner Design).

En este trabajo se ha preferido usar a COD y a MOD como términos diferentes aunque lógicamente presentan una relación directa. Se utiliza el término COD cuando el valor surge de una determinación analítica mediante un analizador de carbono. Por otra parte, el término MOD se utiliza para las estimaciones surgidas a partir de escaneos





espectrofotométricos, y que representan a la materia orgánica como un conjunto más heterogéneo de moléculas.

## DETERMINACIÓN DE BIOMASA ALGAL Y BACTERIANA

La biomasa autotrófica se estimó a través de la concentración de clorofila *a*, la cual fue analizada discriminando entre picofitoplancton (fracción  $< 2 \mu\text{m}$ ) y el fitoplancton  $> 2 \mu\text{m}$ . Para la obtención de la fracción  $> 2 \mu\text{m}$ , se filtraron 100 mL de agua a través de filtros de policarbonato de  $2.0 \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Nuclepore). A continuación, el filtrado resultante fue filtrado nuevamente a través de filtro de policarbonato de  $0.2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Como control, se determinó también la concentración total de clorofila *a* filtrando 100 mL de muestra a través de filtro de policarbonato de  $0.2 \mu\text{m}$  tamaño de poro. La concentración de clorofila *a* se midió por extracción con etanol 90 % siguiendo a Nusch (1980) y se utilizó un fluorómetro 10-AU (Turner Design). El fluorómetro fue previamente calibrado con mediciones espectrofotométricas.

Para el recuento de bacterias y picofitoplancton se fijaron 60 mL de muestra con formaldehído filtrado (a través de  $0.2 \mu\text{m}$ , con una concentración final de 2 % v/v). Las células fueron teñidas con 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI, a una concentración final de 0.2 % w/v según Porter & Feig (1980). El recuento se llevó a cabo filtrando un volumen variable entre 2 a 5 mL en filtros de membrana negros de  $0.2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Poretics), a un aumento de 1250x con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50. Se utilizó luz UV (filtro U-MWU) para bacterias, y luz azul (filtro U-MWB filter) y luz verde (filtro U-MWG) para el picofitoplancton. Aquellas células que fluorescen en rojo, al ser iluminadas con luz azul, son consideradas células ricas en Ficocianina (FC), mientras que aquellas que fluorescen en anaranjado son células ricas en Ficoeritrina (FE) (Stomp et al. 2007). Con los valores de abundancia correspondientes a las células picofitoplanctónicas ricas en FE y FC, se calculó la relación FE:FC para cada profundidad en cada lago. Por otro lado, un volumen de 250 mL de agua de lago fue inmediatamente fijado con solución de Lugol ácido para el recuento y determinación de la fracción fitoplanctónica  $> 2 \mu\text{m}$ . Las muestras fueron contadas en cámaras de 50-mL Utermöhl en un microscopio invertido Olympus IX70. Las células de todas las fracciones microcomunitarias fueron medidas con un sistema de análisis de imágenes (Image ProPlus). Se calculó el biovolumen celular de cada fracción de acuerdo a Fry (1988), para



las bacterias heterotróficas, y según Sun & Liu (2003) para el fitoplancton ( $< y > 2 \mu\text{m}$ ), y se transformó a contenido de carbono con los factores de conversión correspondientes (Bacterias heterotróficas: Fry 1988; Picocianobacterias: Weisse 1993; Dinoflagelados, Diatomeas y otras algas: Menden-Deuer & Lessard 2000).

#### DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN PRIMARIA NETA Y PRODUCCIÓN BACTERIANA

Se midió la Producción Primaria Neta (PPN) en cada lago como toma de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  *in situ* (Steeman Nielsen 1951, 1952) considerando las dos fracciones fitoplanctónicas. Las mediciones correspondientes a la botella oscura fueron sustituidas por las mediciones de  $^{14}\text{C}$  orgánico en el “tiempo 0”, agregando el isótopo a la botella oscura y filtrando inmediatamente para su análisis (Fahnenstiel et al. 1994). Con una botella de van Dorn se tomaron muestras de agua de los diferentes niveles de profundidad (0 m, 3 m y 6 m en el Lago Escondido, y a los 0 m, 4 m y 8 m, en los lagos Morenito y Trébol). La incubación fue llevada a cabo en tubos de cuarzo de 14 mL, a los cuales se les adicionó una solución de bicarbonato de sodio conteniendo  $^{14}\text{C}$  (Amersham,  $2.22 \text{ KBq NaH}^{14}\text{CO}_3 \text{ mL}^{-1}$ ). Los tubos fueron colocados en soportes y puestos a incubar en las diferentes profundidades (de acuerdo al lago) en tres réplicas durante 4 horas alrededor del mediodía (hora de mayor irradiancia en el día).

Una vez finalizado el tiempo incubación, se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  para analizar la actividad total. Con el objetivo de discriminar entre la producción primaria producida por el picofitoplancton y la fracción  $> 2 \mu\text{m}$ , se filtraron las muestras utilizando jeringas descartables y soportes para filtros de 25 mm de diámetro. La fracción autotrófica  $> 2 \mu\text{m}$  fue obtenida filtrando a través de filtros de policarbonato de (Osmonics<sup>TM</sup>) de 2  $\mu\text{m}$ . El filtrado resultante fue concentrado en filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro (Millipore<sup>TM</sup>). Los filtros fueron colocados en frascos de centelleo de 20 mL y acidificados con 200  $\mu\text{L}$  de HCl 1 N durante 60 minutos. A continuación, se adicionaron 10 mL de líquido de centelleo a cada frasco y se procedió con el conteo en un contador de centelleo Beckman LS3801. Se calculó la asimilación de carbono fotosintético en base a la proporción entre la toma de  $^{14}\text{C}$  y la disponibilidad de carbono inorgánico total (Steeman Nielsen 1951, 1952). La disponibilidad de carbono inorgánico total fue determinada a partir de las mediciones de pH y alcalinidad registradas en el agua de lago (Wetzel & Likens 1991), a través de la siguiente fórmula:



$$C \text{ inorgánico disuelto total} = \text{Alcalinidad total} \times pH \text{ Factor}$$

El factor para la conversión de la alcalinidad total a miligramos de C por litro, se obtuvo a partir de una tabla de referencia publicada por Saunders et al. (1962),

Por otro lado, inmediatamente finalizado el muestreo, se determinó la producción bacteriana (PB) a través de la medición de la incorporación de [<sup>14</sup>C]-L-leucina (Simon & Azam 1989) en oscuridad a la temperatura del lago durante 2 horas. Una vez arribadas al laboratorio las muestras de agua, se incubaron en microtubos 1.4 mL de agua de lago, por triplicado, y un control con 15 µL de <sup>14</sup>C-Leucina (actividad específica: Leucina 11.3 GBq mmol<sup>-1</sup>, Amersham, UK) a 90 nM concentración final. El control fue fijado con 75 µL de ácido tricloroacético (TCA) 100 %. Transcurrido el tiempo de incubación, se fijaron las muestras con TCA de la misma manera que el control. A continuación, se mantuvieron las muestras durante 30 min a la temperatura de incubación, y luego se centrifugaron durante 10 min a 12000 rpm. Se procedió a la remoción del sobrenadante y luego se agregaron 1.4 mL de TCA 5 % a cada microtubo y se centrifugaron nuevamente. Este procedimiento fue llevado a cabo dos veces; luego se enjuagó con etanol y se centrifugó nuevamente. Se retiró el sobrenadante de cada microtubo, se agregó 1 mL de líquido centelleante y se colocaron en un contador de centelleo Beckman LS 3801 TA. Estas mediciones se realizaron en el LIBIQUIMA (Universidad Nacional del Comahue, Neuquén). Se obtuvo la producción bacteriana específica celular, calculando el cociente entre la producción bacteriana neta y la abundancia celular.

Con el objetivo de estimar el balance autotrofia: heterotrofia, se calculó la relación entre la producción primaria (PP) y la producción bacteriana (PB) para cada profundidad muestreada en cada lago. Los valores de producción (primaria y bacteriana) utilizados para calcular el cociente corresponden a los valores de producción total, expresados en µg C L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

## ANÁLISIS DE DATOS

Las diferencias en la fluorescencia dada por sustancias coloreadas, la concentración de COD, la relación  $a_{250}:a_{365}$ , el pH, la alcalinidad, y la concentración de nutrientes entre los lagos fue analizada a través de un ANOVA de una vía. También se aplicó un ANOVA de una vía para analizar las diferencias en la relación FE:FC entre las profundidades dentro de cada lago. Para el análisis de la biomasa fitoplanctónica, la producción primaria y



bacteriana y la relación PP:PB, se aplicó un análisis de variancia factorial de 3 x 3 (ANOVA de dos vías), con los diferentes lagos y profundidades como factores. Previo al análisis se verificó normalidad y homocedasticidad, y se aplicó una transformación logarítmica cuando fue necesario. Las comparaciones *a posteriori* se llevaron a cabo con un Test de Tukey con un nivel de significancia de  $P = 0.05$ . Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los paquetes SigmaPlot 11.0 o Statistica 6.0.



## RESULTADOS

Durante nuestro estudio, el Lago El Trébol mostró una temperatura constante de 16 °C a lo largo de toda la columna de agua, mientras que los lagos Escondido y Morenito mostraron un gradiente térmico desde 18 °C en la superficie a 11 °C (Escondido) y a 14 °C (Morenito). La concentración de oxígeno disuelto presentó siempre un 100 % de saturación y la conductividad se mantuvo constante entre los lagos y en las diferentes profundidades de cada lago, con valores cercanos a los 60  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . La zona eufótica de los tres lagos se extendió aproximadamente hasta la profundidad máxima de cada lago (Tabla 1.1). La irradiancia recibida en la superficie de los lagos durante el período estudiado fue alta tanto para la fracción de RFA ( $\sim 2000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y RUV ( $\sim 1.8 \mu\text{W cm}^{-2} \text{nm}^{-1}$  en la banda 305 nm). Considerando la radiación ultravioleta, el Lago Escondido fue menos transparente que Morenito y El Trébol, mostrando valores de  $K_d$  casi tres veces más altos (a 305 y 340 nm) (Tabla 1.1, Fig. 1.1). Asimismo, los mayores valores de fluorescencia del Lago Escondido, seguido por el Lago Morenito y finalmente por el Lago El Trébol, mostraron un gradiente descendente en el contenido de materia orgánica disuelta coloreada en el agua (Tabla 1.1). La concentración de COD varió entre los lagos (ANOVA de una vía,  $P < 0.001$ ) observándose los mayores valores en el Lago Escondido (Tabla 1.1). La concentración de COD mostró una relación directa con el  $K_d$  correspondiente a cada longitud de onda; estos datos entran en los límites de confianza del 95 % de los modelos de Morris et al. (1995).



Tabla 1.1. Localización, morfometría, parámetros lumínicos y características químicas de los tres lagos estudiados durante enero de 2006. Las características químicas están expresadas como la media de las tres profundidades  $\pm$  el error standard.

	Escondido	Morenito	El Trébol
Localización	41° 3'S 71° 34'O	41° 3'S 71° 30'O	41° 2'S 71° 4'O
Superficie (km <sup>2</sup> )	0.08	0.83	0.3
Z <sub>max</sub> (m)	8	12	12
K <sub>d</sub> (PAR)	0.586	0.430	0.505
K <sub>d</sub> (305nm)	8.85	3.44	3.33
K <sub>d</sub> (340nm)	7.6	2.67	2.9
Z <sub>1%</sub> (PAR)	7.8	10.7	9.1
I <sub>0</sub> (μmol fotones m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	2118	1768	2225
RFA% <sub>a 3 o 4 m</sub>	17.2	13.3	17.9
RFA% <sub>a 6 o 8 m</sub>	2.9	1.8	3.2
Fluorescencia (MODC)	35 $\pm$ 0.6	12.85 $\pm$ 0.36	10.08 $\pm$ 0.26
COD (mg L <sup>-1</sup> )	2.96 $\pm$ 0.09	1.80 $\pm$ 0.003	2.27 $\pm$ 0.09
a <sub>250</sub> : a <sub>365</sub>	5.17 $\pm$ 0.05	5.95 $\pm$ 0.46	7.31 $\pm$ 0.21
pH	7.1 $\pm$ 0.06	7.0 $\pm$ 0.15	7.0 $\pm$ 0.17
Alcalinidad (meq L <sup>-1</sup> )	0.59 $\pm$ 0.01	0.71 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.02
PDT (μg L <sup>-1</sup> )	4.05 $\pm$ 0.29	5.70 $\pm$ 0.69	5.26 $\pm$ 0.33
PT (μg L <sup>-1</sup> )	6.24 $\pm$ 0.09	11.96 $\pm$ 2.01	11.78 $\pm$ 1.62
NID (μg L <sup>-1</sup> )	55.42 $\pm$ 19.82	20.75 $\pm$ 1.15	32.32 $\pm$ 15.6

Referencias: K<sub>d</sub> = coeficiente de extinción; Z<sub>1%</sub> = profundidad a la que se registra el 1% de irradiancia superficial; RFA= Radiación Fotosintéticamente Activa; 305 nm (UV-B) y 340 nm (UV-A); I<sub>0</sub> es la irradiación RFA en la superficie; MODC: Materia Orgánica disuelta coloreada; COD: Carbono Orgánico Disuelto; PDT: Fósforo Disuelto Total; PT: Fósforo Total; NID: Nitrógeno Disuelto Inorgánico.

Las curvas espectrofotométricas de la materia orgánica disuelta del agua de cada lago mostraron una tendencia similar en los tres lagos. Sin embargo, el Lago Escondido exhibió valores mayores de absorbancia en los rangos de UV-B y UV-A (Fig. 1.1). Con respecto a los valores de a<sub>250</sub>: a<sub>365</sub>, utilizados para estimar el tamaño relativo de la DOM, se



registraron las menores relaciones en el Lago Escondido, sugiriendo un tamaño molecular relativo mayor (*a posteriori* Tukey test; Escondido vs Morenito,  $P = 0.015$ ; Escondido vs El Trébol,  $P < 0.001$ , El Trébol vs Morenito,  $P = 0.013$ ).

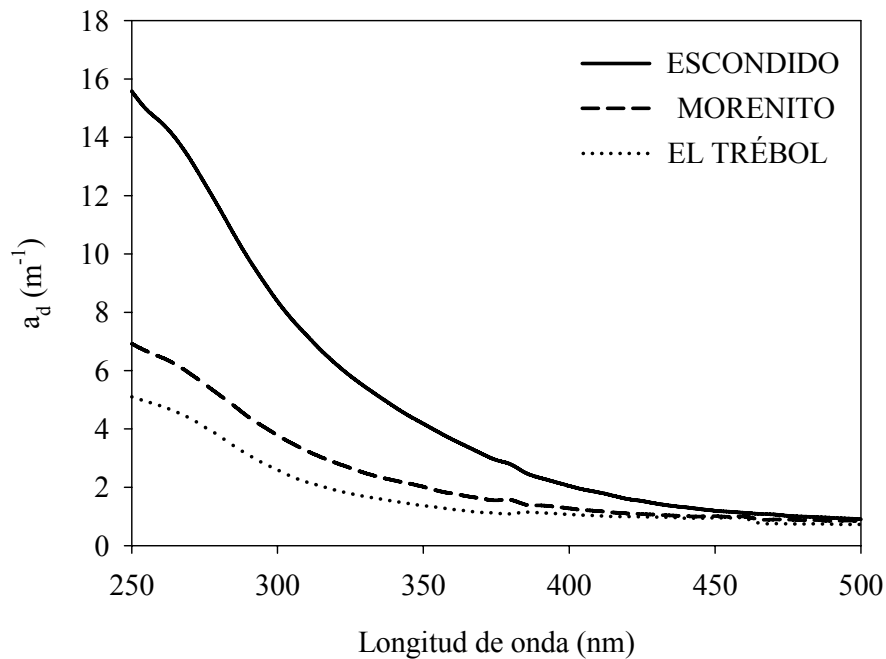


Figura 1.1. Curvas de absorbancia espectrofotométrica de los lagos estudiados.

En los tres lagos, la concentración de nutrientes (PT, PDT, and DIN) mostró valores bajos, característicos de los lagos oligotróficos (Tabla 1.1), sin registrarse variación entre los lagos (ANOVA de una vía entre lagos, PT:  $P = 0.844$ ; PDT:  $P = 0.109$ ; NID:  $P = 0.681$ ). La concentración de clorofila  $a$  fue  $< 3 \mu m$  en los lagos Escondido y Morenito, confirmando su estado oligotrófico; mientras que en el lago El Trébol, las concentraciones registradas fueron  $> 3 \mu m$ , caracterizándolo como un ambiente oligo-mesotrófico durante el período estudiado (Tabla 1.2) La biomasa de la fracción fitoplanctónica de menor tamaño varió entre los lagos, pero no en su distribución vertical en la columna de agua (ANOVA de dos vías entre lagos,  $P = 0.010$  y entre profundidades en cada lago,  $P = 0.356$ ), siendo el Lago El Trébol el único diferente (Test *a posteriori* de Tukey: Escondido vs El Trébol,  $P = 0.024$ ; El Trébol vs Morenito,  $P = 0.011$ ; Escondido vs. Morenito,  $P = 0.538$ ) (Tabla 1.2). El fitoplancton  $> 2 \mu m$  difirió entre lagos y también a lo largo de la columna de agua (ANOVA de dos vías entre lagos,  $P = 0.004$  y en la columna de agua,  $P = 0.019$ ). Particularmente, la biomasa del Lago El Trébol fue significativamente diferente de



la de los lagos Morenito y Escondido (Test *a posteriori* de Tukey, El Trébol vs Escondido,  $P = 0.004$ ; El Trébol vs Morenito,  $P = 0.024$ ; Escondido vs Morenito,  $P = 0.070$ ). Considerando la distribución de la biomasa a lo largo de la columna de agua, la capa superficial presentó los menores valores difiriendo significativamente de las otras profundidades (Test *a posteriori* de Tukey, 0 m vs 6-8 m,  $P = 0.020$ ; 0 m vs 3-4 m,  $P = 0.038$ ; 3-4 m vs 6-8 m,  $P = 0.715$ ).

Tabla 1.2. Concentración de clorofila *a* (Cl *a*), Producción Primaria específica (PP) y Contenido de Carbono (C) correspondiente a las diferentes fracciones de tamaño en los tres lagos estudiados durante enero de 2006. La PP se expresa como la media  $\pm$  error standard.

Lago	Prof.	Cl <i>a</i> < 2 $\mu$ m ( $\mu$ g L <sup>-1</sup> )	Cl <i>a</i> > 2 $\mu$ m ( $\mu$ g L <sup>-1</sup> )	PP < 2 $\mu$ m ( $\mu$ g C L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PP > 2 $\mu$ m ( $\mu$ g C L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	C < 2 $\mu$ m (pg C L <sup>-1</sup> )	C > 2 $\mu$ m (pg C L <sup>-1</sup> )
Escondido	0 m	0.72	0.42	0.43 $\pm$ 0.043	0.14 $\pm$ 0.005	1.61	26.82
	3 m	1.23	1.15	0.54 $\pm$ 0.043	0.40 $\pm$ 0.029	2.11	52.10
	6 m	1.28	1.59	0.25 $\pm$ 0.013	0.16 $\pm$ 0.009	4.53	53.84
Morenito	0 m	0.36	0.64	0.96 $\pm$ 0.053	0.41 $\pm$ 0.029	2.62	34.02
	4 m	0.22	2.87	3.16 $\pm$ 0.073	2.83 $\pm$ 0.096	5.62	134.31
	8 m	0.13	3.48	0.84 $\pm$ 0.116	0.50 $\pm$ 0.104	4.83	134.69
El Trébol	0 m	2.61	3.01	0.32 $\pm$ 0.029	1.23 $\pm$ 0.183	2.62	199.91
	4 m	5.78	4.73	0.24 $\pm$ 0.002	3.87 $\pm$ 0.087	5.62	380.49
	8 m	4.65	4.66	0.28 $\pm$ 0.009	0.43 $\pm$ 0.029	4.83	279.02

Los lagos Escondido y Morenito presentaron una composición algal (fracción > 2  $\mu$ m) similar, con una dominancia en abundancia y en biovolumen de taxa pertenecientes a las clases Haptophyceae, Cryptophyceae y Dinophyceae (Fig. 1.2). En particular, *Chrysochromulina parva* Lackey, *Rhodomonas lacustris* (Pascher & Ruttner) Javornicky, *Ochromonas* sp, *Cryptomonas* sp y *Gymnodinium varians* Maskell fueron las especies dominantes. Por otra parte, el fitoplancton del Lago El Trébol se vio dominado por la clase Bacillariophyceae, tanto en abundancia como en biovolumen (Fig. 1.2), con *Cyclotella meneghiniana* Kütz., *Rhizosolenia longiseta* Zach., y *Aulacoseira granulata* (Ehr) Simonsen como especies dominantes. Además, en la capa superficial se observó la presencia de cianobacterias (*Chroococcus* sp). Los mayores valores de abundancia de la





fracción fitoplanctónica de mayor tamaño fueron registrados en el Lago El Trébol ( $\sim 6474$  cél mL<sup>-1</sup>), lo cual concuerda con las mayores concentraciones de clorofila *a* registradas en este lago. Por el contrario, el Lago Escondido mostró los menores valores de abundancia ( $\sim 1500$  cél mL<sup>-1</sup>). Por otro lado, los dinoflagelados representaron el mayor aporte en contenido de carbono en los lagos Escondido y Morenito, seguido por Haptophyceae, Chrysophyceae y Cryptophyceae. En el Lago El Trébol, las diatomeas aportaron la mayor proporción de contenido de carbono, seguidas por los dinoflagelados.

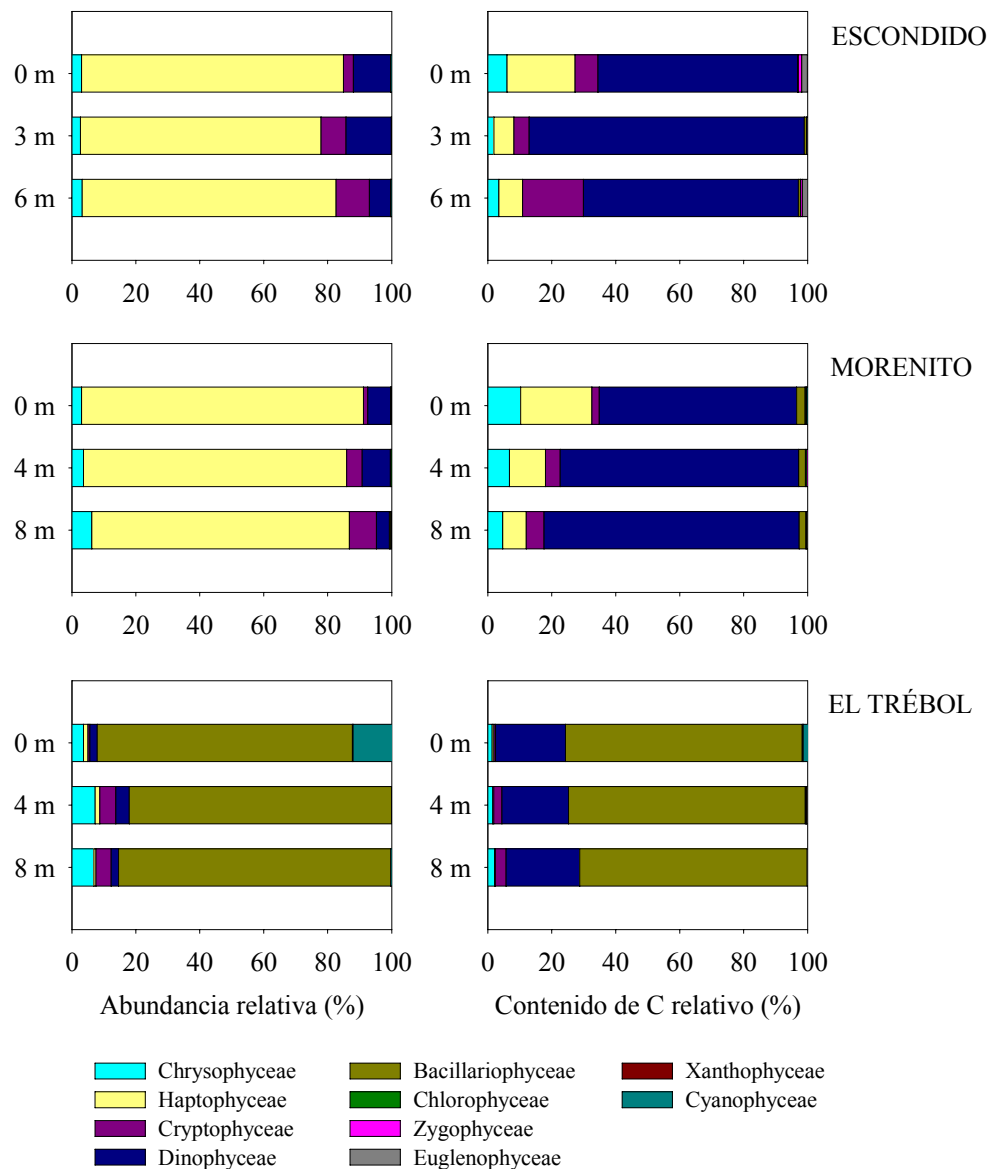


Figura 1.2. Abundancia y contenido de carbono relativos de las diferentes clases algales en los tres lagos estudiados.



Con respecto al picofitoplancton, la distribución de la abundancia celular no mostró importantes diferencias entre lagos (Fig. 1.3). Esta fracción se vio constituida por cocos procariotas (*Synechococcus* spp) dominados por células ricas en ficoeritrina. Este grupo de células incrementaron su abundancia hacia el fondo en los lagos Escondido y Morenito, mientras que en el lago El Trébol se mantuvieron constantes a los 4 y 8 m de profundidad. Las células ricas en ficocianina se mantuvieron constantes a lo largo de la columna de agua en los lagos Morenito y Trébol, sin embargo se observó un incremento de células ricas en ficocianina hacia el fondo el Lago Escondido. En este lago, se observó un decrecimiento de la relación FE:FC con la profundidad (Fig. 1.3).

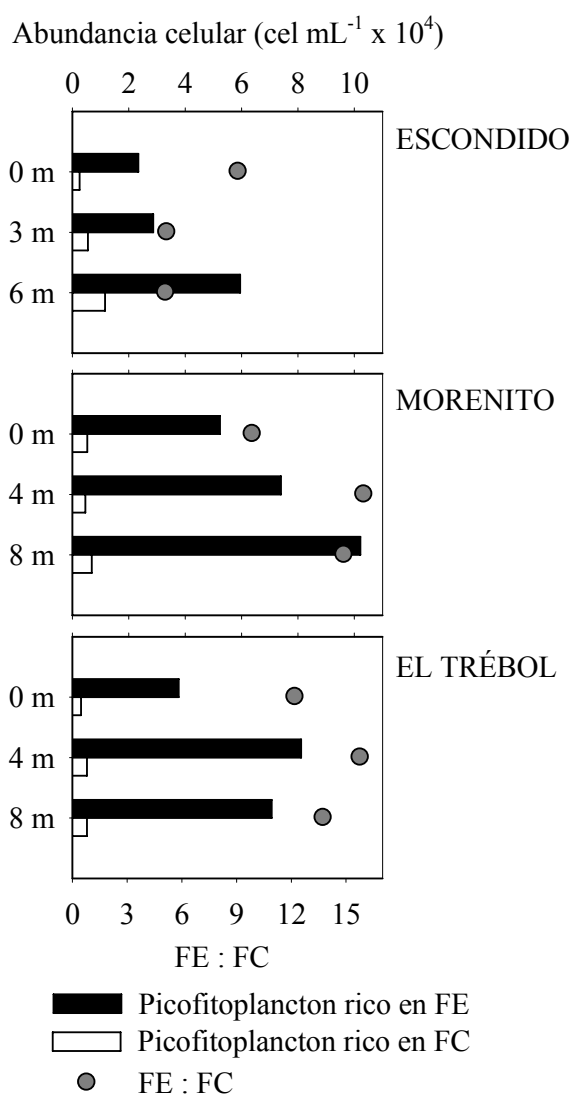


Figura 1.3. Abundancia del picofitoplancton y relación de células ricas en Ficoeritrina (FE) y Ficocianina (FC) en los diferentes lagos estudiados.



La producción primaria de las dos fracciones autotróficas varió entre los lagos (ANOVA de dos vías,  $P < 0.0001$ ) (Tabla 1.2). En los lagos Escondido y Morenito el picofitoplancton mostró una alta contribución relativa a la producción primaria total. Por otro lado, en el Lago El Trébol la PP estuvo dominada por el fitoplancton  $> 2 \mu\text{m}$  (Test *a posteriori* de Tukey: El Trébol vs Escondido o Morenito  $P < 0.0001$ ) (Tabla 1.2). En el nivel intermedio (3 m o 4 m) de los tres lagos la importancia relativa de la fracción  $> 2 \mu\text{m}$  se vio incrementada (Test *a posteriori* de Tukey: 3-4 m vs 0 o 6-8 m,  $P < 0.002$ ). Sin embargo, en los lagos Escondido y Morenito la contribución del picofitoplancton a la PP total fue siempre  $> 50 \%$ . En el Lago El Trébol, la producción clorofila-específica fue dominada claramente por la fracción de mayor tamaño, mientras que en los lagos Escondido y Morenito ambas fracciones mostraron valores similares (Fig. 1.4).

La eficiencia fotosintética de las fracciones fitoplanctónicas fue analizada a partir de la producción clorofila-específica por moles de fotones recibidos en la columna de agua ( $\mu\text{g C (mgCl a)}^{-1}/\text{mol fotón m}^{-2}$ ) (Fig. 1.5). Los datos obtenidos muestran que el picofitoplancton resultó más eficiente en la producción de carbono que los autótrofos de mayor tamaño. Se observó además una disminución de la eficiencia en el nivel superficial de cada lago, sitio de mayor irradiancia recibida (Fig. 1.5).

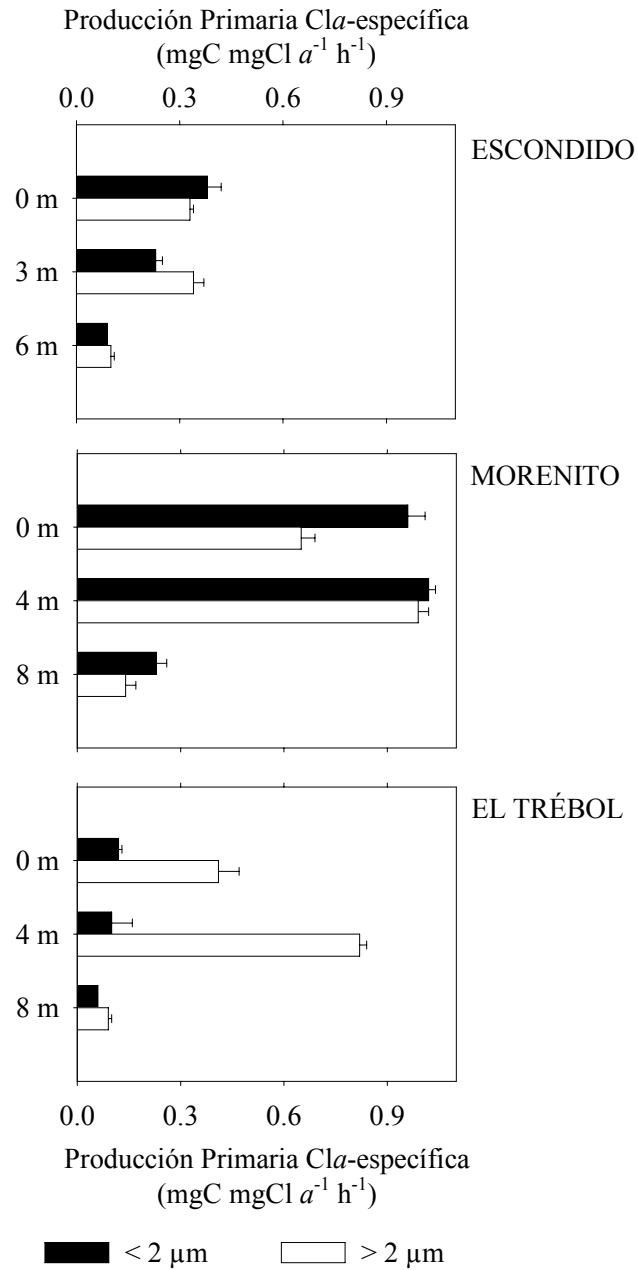


Figura 1.4. Producción primaria específica por miligramo de clorofila *a* correspondiente al picofitoplancton y al fitoplancton > 2  $\mu$ m a las diferentes profundidades en los lagos estudiados.

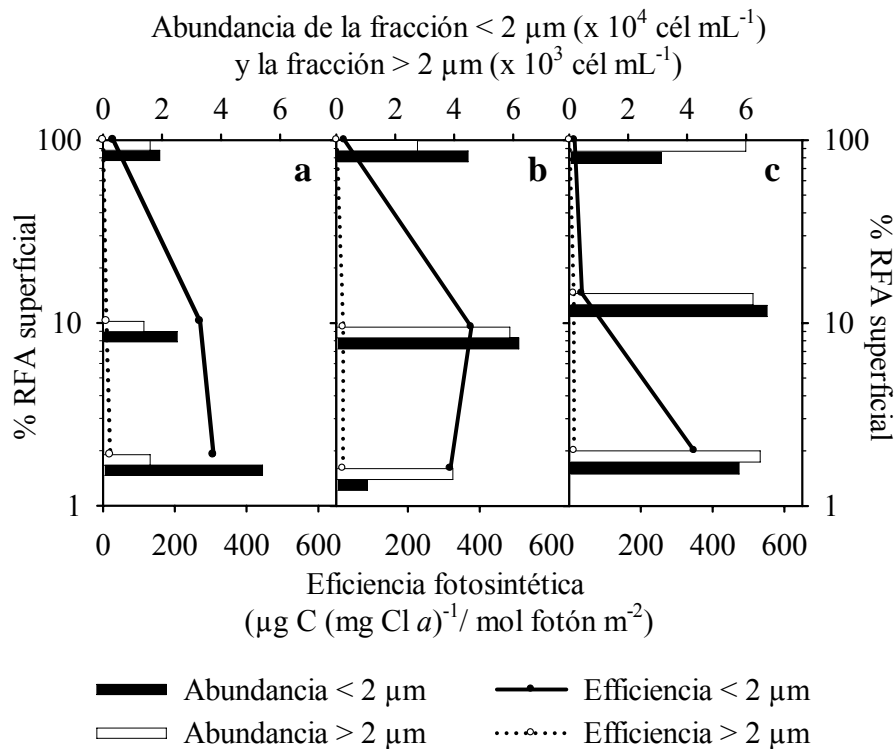


Figura 1.5. Perfiles verticales de eficiencia fotosintética y abundancias celulares de las fracciones  $< 2 \mu\text{m}$  y  $> 2 \mu\text{m}$  en los tres lagos estudiados. a: Lago Escondido, b: Lago Morenito, c: Lago El Trébol.

La abundancia bacteriana varió entre  $1.6$  y  $4.6 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ . Los mayores valores se observaron a los  $4 \text{ m}$  en Morenito y los menores a los  $3 \text{ m}$  en Lago Escondido (Tabla 1.3). La producción bacteriana y la producción bacteriana celular-específica fue menor en el Lago El Trébol, mientras que en los lagos Escondido y Morenito se observaron actividades similares, con los mayores registros en el nivel superficial (Tabla 1.3). Con respecto al nivel superficial, las diferencias entre los lagos fueron significativas (ANOVA de dos vías,  $P < 0.05$ ), con los mayores valores de producción bacteriana específica en el Lago Morenito (Test *a posteriori* de Tukey, todos los pares  $P < 0.001$ ).



Tabla 1.3. Producción bacteriana y abundancia celular a las diferentes profundidades de los tres lagos estudiados.

Lago	Prof.	Producción bacteriana ( $\mu\text{g C L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	Producción bacteriana específica celular ( $\text{pmol } 10^6 \text{ cél}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	Abundancia bacteriana ( $10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ )
Escondido	0 m	$0.83 \pm 0.089$	$0.10 \pm 0.011$	2.54
	3 m	$0.57 \pm 0.052$	$0.11 \pm 0.010$	1.56
	6 m	$0.63 \pm 0.068$	$0.08 \pm 0.009$	2.30
Morenito	0 m	$1.05 \pm 0.063$	$0.14 \pm 0.008$	2.30
	4 m	$1.00 \pm 0.006$	$0.07 \pm 0.004$	4.63
	8 m	$0.45 \pm 0.019$	$0.07 \pm 0.002$	2.03
El Trébol	0 m	$0.54 \pm 0.089$	$0.05 \pm 0.009$	3.08
	4 m	$0.69 \pm 0.043$	$0.09 \pm 0.005$	2.41
	8 m	$0.61 \pm 0.025$	$0.06 \pm 0.002$	3.08

Los valores de la relación PP:PB mostraron diferencias significativas entre los tres lagos (ANOVA de dos vías,  $P < 0.05$ ). En los lagos Morenito y El Trébol la relación PP:PB fue mayor que 1.0 en todos los niveles de profundidad, con los mayores valores correspondientes a los 4 m y los mínimos en el nivel superficial (Fig. 1.6). Asimismo, se observaron diferencias entre los niveles de profundidad dentro de cada lago (Test *a posteriori* de Tukey: 0 m vs 4 m,  $P < 0.001$ ; 0 m vs 8 m,  $P = 0.004$  y 4 m vs 8 m,  $P = 0.008$ ). Por lo tanto, en estos lagos, la producción primaria parece conducir la fijación de carbono. Por el contrario, el Lago Escondido mostró relaciones menores a 1.0 en la superficie y a los 6 m y no se observaron diferencias significativas entre las profundidades (Test *a posteriori* de Tukey,  $P > 0.05$ ). Estos resultados indican que la producción del lago podría basarse mayormente en la movilización bacteriana de la energía química.

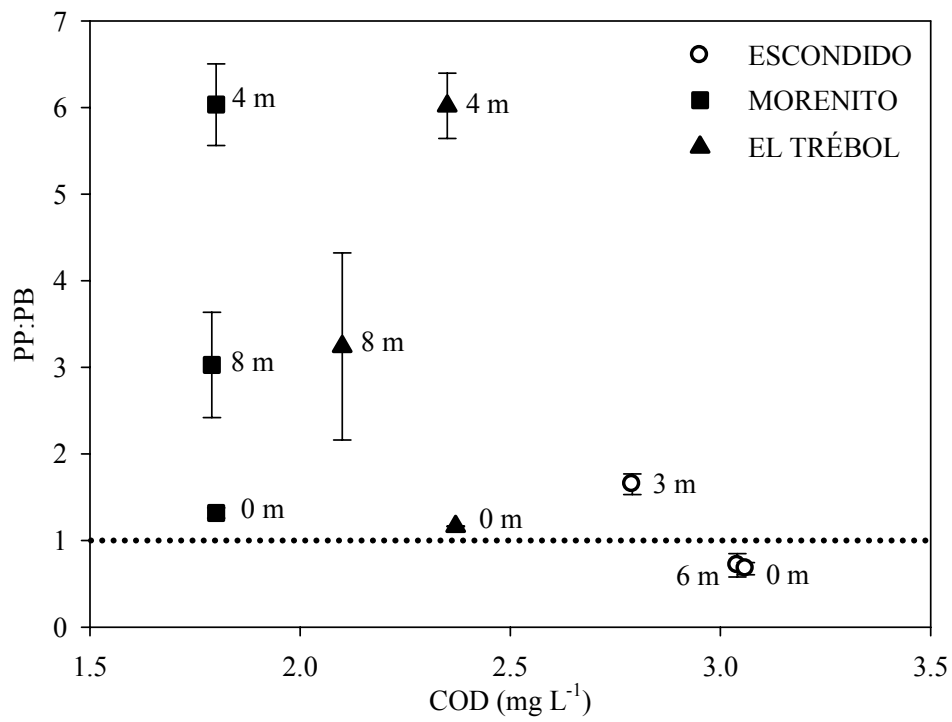


Figura 1.6. Relación entre Producción primaria total y Producción bacteriana (PP:PB) en relación a la concentración de COD en las diferentes profundidades de los tres lagos estudiados.



## DISCUSIÓN

Los lagos someros pueden recibir una alta cantidad de materia orgánica disuelta alóctona proveniente del drenaje de detritus terrestre húmico presente en los suelos ricos en materia orgánica (Wetzel 2001). Existe una importante relación entre la atenuación de la RUV y el contenido de materia orgánica disuelta (MOD) (Morris et al. 1995; Morris & Hargreaves 1997), por lo tanto, en un lago somero la composición espectral y la intensidad de la luz puede cambiar de manera significativa a lo largo de la columna de agua. Nuestros datos de la relación  $COD-K_d$  ajustaron a los modelos generales publicados para lagos de Alaska a Patagonia (Morris et al. 1995), indicando que estos lagos someros se ajustan a la tendencia general. En los lagos someros la absorción de la radiación solar en el rango violeta-azul del espectro es elevada (Pérez et al. 2002). La intensidad de la luz que penetra en el agua y las características del espectro han sido consideradas como factores importantes para la diferenciación de nichos en la comunidad del fitoplancton (Huisman et al. 2004). En particular, esta observación ha sido descrita para picocianobacterias en trabajos previos (Pick 1991) y recientemente ha sido resaltada (Stomp et al. 2007). Estos procariotas fotosintetizadores se encuentran bien adaptados a niveles de irradiación de RFA del 1% (Gervais et al. 1997; Callieri et al. 2007) y se ha demostrado una clara relación entre el tipo de picocianobacteria (con células ricas en ficoeritrina o ficocianina) y el coeficiente de extinción de la luz roja, verde y azul (Callieri et al. 1996). En relación con esto, las células ricas en ficoeritrina (FE) se encuentran presentes en lagos oligotróficos claros, mientras que en lagos eutróficos someros con altos coeficientes de atenuación dominan las células ricas en ficocianina (FC) (Vörös et al. 1998; Katano et al. 2005; Stomp et al. 2007). El decrecimiento de la relación FE:FC observada en el Lago Escondido puede indicar que la MOD cambia el espectro de luz que ingresa al agua y consecuentemente la composición de pigmentos de las picocianobacterias, actuando como filtro de absorción.

Los lagos andinos profundos, ultraoligotróficos y transparentes son ambientes muy adecuados para el crecimiento y desarrollo de picofitoplancton (Callieri et al. 2007). De la misma manera, se observó en los lagos someros del área una alta contribución del picofitoplancton, tanto en abundancia como en producción. Los experimentos de producción primaria realizados en este estudio indican que la RFA que penetra en el cuerpo de agua en verano es adecuada para permitir el proceso de fotosíntesis a cualquier





profundidad, incluso casi hasta el fondo de los lagos estudiados. Sin embargo, se observó un descenso de la eficiencia fotosintética en las incubaciones realizadas en superficie, probablemente como consecuencia de las altas irradiancias, tanto del rango de RFA como de RUV. El efecto inhibitorio de la radiación solar sobre la producción primaria en organismos planctónicos de ambientes agua dulce ha sido extensamente documentado (p. ej. Karentz et al. 1994; Villafañe et al. 1999, 2004, 2008, 2007; Neale et al. 2001, Helbling et al. 2001b, 2004; Barbieri et al. 2002; Modenutti et al. 2004). Por otra parte, también se ha registrado efecto inhibitorio de la fotosíntesis en el picofitoplancton (Callieri et al. 2001, 2007). En este estudio de tres lagos someros se observó que el efecto inhibitorio afectaría a ambas fracciones fitoplanctónicas aunque su importancia varía en cada lago. En el Lago Escondido resultó más afectado el picofitoplancton, mientras que en los lagos Morenito y El Trébol la fracción de mayor tamaño.

La MOD autóctona y alóctona constituye una fuente de carbono y energía para el crecimiento bacteriano (Jones 1992). En relación con esto, una de las conclusiones más importantes ha sido el hecho de que la MOD de alto peso molecular puede ser fotodegradada a moléculas biológicamente más lábiles para ser luego asimiladas por el bacterioplancton (Moran & Covert 2003; Bastidas Navarro et al. 2009; Capítulo IV de esta tesis). De esta manera, en los lagos Escondido y Morenito, donde predomina la MOD de alto peso molecular como fuente de carbono, la acción de las radiaciones UV sobre dichas sustancias podría estimular la actividad del bacterioplancton. Las diferentes fuentes de MOD pueden ser analizadas en base a la relación  $a_{250} : a_{365}$ , debido a que ésta indica el tamaño relativo de la material orgánica disuelta. En este estudio, el Lago El Trébol mostró el mayor valor de esta relación, indicando que la MOD presente en este lago es de pequeño tamaño molecular relativo; por lo tanto, el principal origen de la MOD en este ambiente sería la producción primaria. En relación con esto, en el Lago El Trébol se registró la mayor biomasa fitoplanctónica, siendo Bacillariophyceae el grupo con mayor abundancia. La menor abundancia de diatomeas registrada en los dos lagos restantes no puede ser atribuida a una limitación por sílice, debido a que en los lagos andinos domina el sílice disuelto (Pedrozo et al. 1993), y los datos de concentración de nutrientes (N y P) fueron muy similares en los tres lagos estudiados. Por el contrario, los lagos Morenito y Escondido mostraron MOD de mayor tamaño molecular relativo. La elevada abundancia y producción bacteriana registrada en estos lagos puede estar relacionada con esta característica del stock de MOD presente. En el Lago Örräsket, un gran lago húmico sueco, la producción bacteriana en el verano mostró ser casi completamente dependiente de



la utilización de MOD alóctona (Jansson et al. 1999; Jonsson et al. 2001). Los lagos someros estudiados, aunque con menor contenido de COD, mostraron una producción bacteriana comparativamente similar a la de lagos de Suecia (Jansson et al. 1996).

En los ecosistemas donde la comunidad planctónica se encuentra dominada por bacterias, los organismos mixótrofos se ven favorecidos en comparación con los autótrofos obligados (Jansson et al. 1999; Bergström et al. 2003). La dominancia de mixótrofos (Haptophyceae y Cryptophyceae) en los lagos Escondido y Morenito puede relacionarse con la alta producción bacteriana específica registrada en estos lagos. De hecho, las bacterias pueden incluso dominar en ambientes con un alto ingreso de COD alóctono, debido a la alta disponibilidad de una fuente de carbono y energía, y a su habilidad para desplazar competitivamente a autótrofos obligados cuando los nutrientes inorgánicos son limitantes (Jansson et al. 2000; Karlsson et al. 2001).

En lagos poco productivos, la relación entre la producción primaria y la producción bacteriana parece estar relacionada con la concentración de COD, observándose un cambio de  $PP:PB > 1.0$  a  $PP:PB < 1.0$  cuando el ingreso de COD alóctono incrementa por encima de los  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (Jansson et al. 2000). La relación  $PP:PB (> 1.0)$  obtenida en este estudio muestra que la producción autotrófica en los lagos Morenito y El Trébol (4 y 8 m) sería suficiente para sostener el crecimiento bacteriano durante el verano. Por otro lado, en el Lago Escondido, la relación  $< 1.0$  indicaría que, aunque la concentración de COD se encuentra muy por debajo de los  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , podría existir un cambio en la importancia de la autotrofia hacia la heterotrofia. El Lago Escondido presentó una mayor concentración de MOD constituida por moléculas de mayor tamaño, sugiriendo una predominancia de MOD alóctona derivada del área de drenaje; este lago se encuentra ubicado en una pequeña depresión del terreno, rodeado por un bosque mixto denso que podría aportar esta MOD. Asimismo, los valores de  $PP:PB$  en la superficie de los tres lagos son cercanas a 1.0, indicando que la PB es afectada en menor grado que la PP por la irradiación solar superficial como se muestra en las Tablas 1.2 y 1.3. En estos lagos someros andinos, cambios en la relación  $PP:PB$  ocurrirían a bajas concentraciones de COD debido a la baja disponibilidad de nutrientes, por lo tanto, cambios mínimos en el suministro de COD podrían ser particularmente importantes, modificando la estructura comunitaria y la productividad de estos ambientes.

En conclusión, los datos presentados apoyan la hipótesis inicial, la cual afirma que la cantidad de MOD disponible afecta al balance entre PP y PB. Por otra parte, la radiación solar debería incluirse como un factor importante en dicho balance debido a que la relación

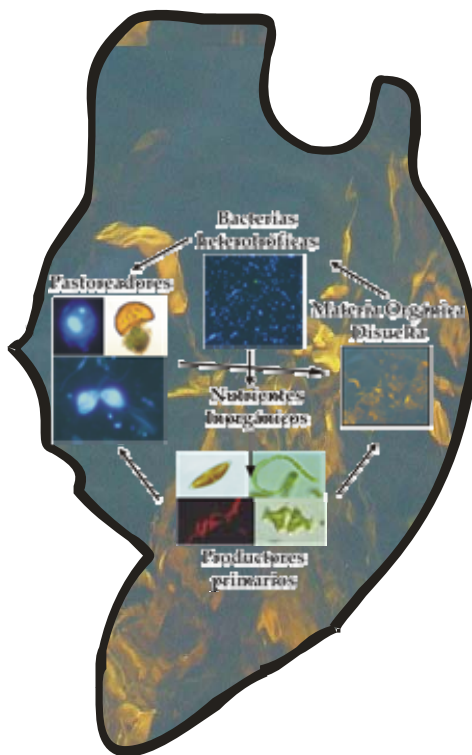


PP:PB puede verse disminuida por la fotoinhibición de la PP, independientemente de la concentración de MOD.



## CAPÍTULO II

### CARACTERIZACIÓN Y VARIACIÓN ESTACIONAL DE LOS CONSTITUYENTES DEL BUCLE MICROBIANO EN UN LAGO ANDINO SOMERO CON ALTO CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA DISUELTA



## INTRODUCCIÓN

Un lago somero es un cuerpo de agua permanente y con suficiente baja profundidad como para que la penetración lumínica llegue hasta los sedimentos del fondo, permitiendo el proceso de fotosíntesis de macrófitas en toda la cubeta (Wetzel 2001). El patrón de colonización de las macrófitas es bastante variable, encontrándose macrófitas emergentes restringidas a profundidades menores a 1 m, mientras que las macrófitas sumergidas se limitan, en general, a profundidades menores a los 3 m (Wetzel 2001), aunque por supuesto estos límites pueden diferir fuertemente. Las macrófitas sumergidas son un componente dominante de los lagos someros e influyen de manera importante sobre la estructura comunitaria de estos lagos. Entre los factores que afectan al desarrollo de macrófitas sumergidas se encuentran las condiciones geomorfológicas de los lagos; además, la presencia de colinas o árboles rodeando al cuerpo de agua, minimiza los vientos, la acción



de las olas y la resuspensión de sedimentos, favoreciendo el asentamiento de las macrófitas (Wetzel 2001). Al encontrarse en áreas relativamente bajas, los lagos someros tienden a acumular materia orgánica disuelta (MOD) de origen terrestre, proveniente del área de drenaje. La producción de materia orgánica *in situ* es generalmente dominada por macrófitas de la zona litoral, que pueden presentar mayores tasas de producción que el fitoplancton (Wetzel 2001).

Como se señaló en la Introducción general de esta tesis, la MOD en los cuerpos de agua se encuentra, en general, dominada por sustancias húmicas, constituyendo ~ 90 % en aguas altamente coloreadas como los lagos húmicos (Kronberg 1999; Jones 1992). Si bien se considera que su origen es mayoritariamente terrestre, las sustancias húmicas pueden ser generadas dentro de los lagos, particularmente por las macrófitas presentes en la zona litoral (Steinberg & Muenster 1985).

Los lagos húmicos presentan características físicas y químicas propias que influyen en los organismos planctónicos (Bergström & Jansson 2000). Las sustancias húmicas poseen marcados efectos en la atenuación de la luz de los lagos (Morris et al. 1995; Osburn et al. 2001) y se ha señalado que pueden competir con el fitoplancton por los fotones disponibles y, por lo tanto, restringen la producción primaria (Kirk 1980). Además, se ha demostrado que altas concentraciones de sustancias húmicas pueden causar inhibición del crecimiento del fitoplancton debido a la formación de un complejo MOD-Fe-P que conduce a la reducción de la disponibilidad de Fe y P. Por otra parte, las sustancias húmicas constituyen una fuente de carbono y energía para el bacterioplancton favoreciendo la producción microbiana. Por lo tanto, las sustancias húmicas pueden afectar a la cadena alimentaria planctónica influyendo sobre la producción primaria y bacteriana (Jones 1992).

Como se mencionó en la Introducción General de esta tesis, a pesar de que la mayoría de los lagos del distrito lacustre andino nord-patagónico son grandes y profundos con concentraciones de COD muy bajas (Morris et al. 1995), existen pequeños lagos someros con zonas litorales desarrolladas y mayores contenidos de materia orgánica disuelta (Morris et al. 1995; Modenutti et al. 1998). Como se mostró en el Capítulo I (Tabla 1.1), uno de los lagos con mayor concentración de COD de la región es el Lago Escondido, un pequeño lago somero situado en las cercanías de la ciudad de Bariloche. Este ambiente ha sido estudiado extensamente en cuanto al zooplancton (Balseiro & Modenutti 1990; Modenutti & Diéguez 1996; Bastidas Navarro & Modenutti 2007), fitoplancton (Díaz & Pedrozo 1993, 1996; Bastidas Navarro & Díaz Villanueva 2004), comunidad bentónica (Añón Suarez 1991, 1997, 2002), estructura comunitaria de parásitos de peces (Semenas



1999) y el efecto peces en el reciclado de nutrientes (Reissig et al. 2003). También se caracterizó el clima óptico de este lago aunque sólo en un muestreo de verano (Pérez et al. 2002). Sin embargo, no existen estudios previos relacionados con los diferentes componentes de la cadena microbiana en el Lago Escondido. Dado que este ambiente se señala como el lago con mayor contenido de sustancias húmicas del área, resulta interesante el estudio de la estructura y dinámica de los diferentes componentes microcomunitarios; especialmente en el marco actual de un clima cambiante en el que el ingreso de MOD a los ambientes y la variación de su calidad podría generar importantes cambios en los ambientes y sus comunidades. En este capítulo se analizaron las variaciones estacionales en la abundancia y composición del bacterioplancton, el picofitoplancton (fracción fitoplanctónica  $< 2 \mu\text{m}$ ), la fracción fitoplanctónica  $> 2 \mu\text{m}$  y los ciliados del Lago Escondido. Este análisis se relacionó con las características ópticas de la MOD, en la zona litoral y la zona pelágica del lago.



## OBJETIVOS

1. Determinar variaciones estacionales en los espectros de absorbancia, en el tamaño molecular relativo de la MOD y color del agua del Lago Escondido.
2. Analizar la estructura y dinámica de los diferentes niveles de la cadena microbiana (bacterioplancton, picofitoplancton, fitoplancton > 2  $\mu\text{m}$  y ciliados).
3. Determinar diferencias en las microcomunidades de la zona litoral y la pelágica.

## HIPÓTESIS

1. El tamaño molecular relativo de la MOD y el color del agua en el Lago Escondido variará en relación con la estación de año.
2. El bacterioplancton se verá afectado por variaciones en las características ópticas de la MOD (recurso).

## PREDICCIÓN

1. Debido a una mayor exposición lumínica, durante el verano se observarán los menores valores de peso molecular de la MOD.
2. Las mayores abundancias bacterianas se registrarán en verano, cuando el tamaño molecular promedio de la MOD es menor.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO Y MUESTREO

La localización, parámetros morfológicos y lumínicos, y características químicas del Lago Escondido, fueron presentados en detalle en el Capítulo I (Tabla 1.1). El clima de esta región es templado frío con una temperatura media anual de 8.7°C, y una precipitación anual media de 1500 mm (Paruelo et al. 1998). La vegetación circundante se encuentra constituida por un bosque mixto de *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Blume y *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Florin et Boutleje.

Como se describió en el Capítulo I, el lago presenta una zona litoral colonizada por dos macrófitas: la emergente *Schoenoplectus californicus* (Meyer) Soják y la sumergida *Potamogeton linguatus* Hangstrom. La primera se dispone desde la línea de costa hasta los 2 m de profundidad aproximadamente y, debido a la marcada pendiente de la cubeta, se encuentra casi ausente en la zona noroeste del lago. La zona norte del lago es la que se encuentra mayormente colonizada por dicha macrófita, ya que ocupa una extensión de 90 m aproximadamente desde la línea de costa. La sumergida *Potamogeton linguatus* se ubica en forma continua entre los 2 m y los 5 m de profundidad aproximadamente, dependiendo su extensión de la pendiente de la cubeta. Debido a que la luz llega hasta el fondo del cuerpo de agua, se observa el crecimiento de la carácea *Nitella* sp en el fondo de la cubeta.

Se realizaron muestreos estacionales desde verano de 2006 hasta primavera de 2008. En cada ocasión de muestreo se registraron perfiles lumínicos y térmicos con un radiómetro sumergible PUV 500B (Biospherical Instruments). También se tomaron perfiles de oxígeno disuelto y de conductividad, con un oxímetro y un conductímetro respectivamente. Se tomaron muestras de agua con una botella de Van Dorn en la zona pelágica, a 0 m, 3 m y 6 m, y en la zona litoral, específicamente en la superficie de la área colonizada por *P. linguatus*.



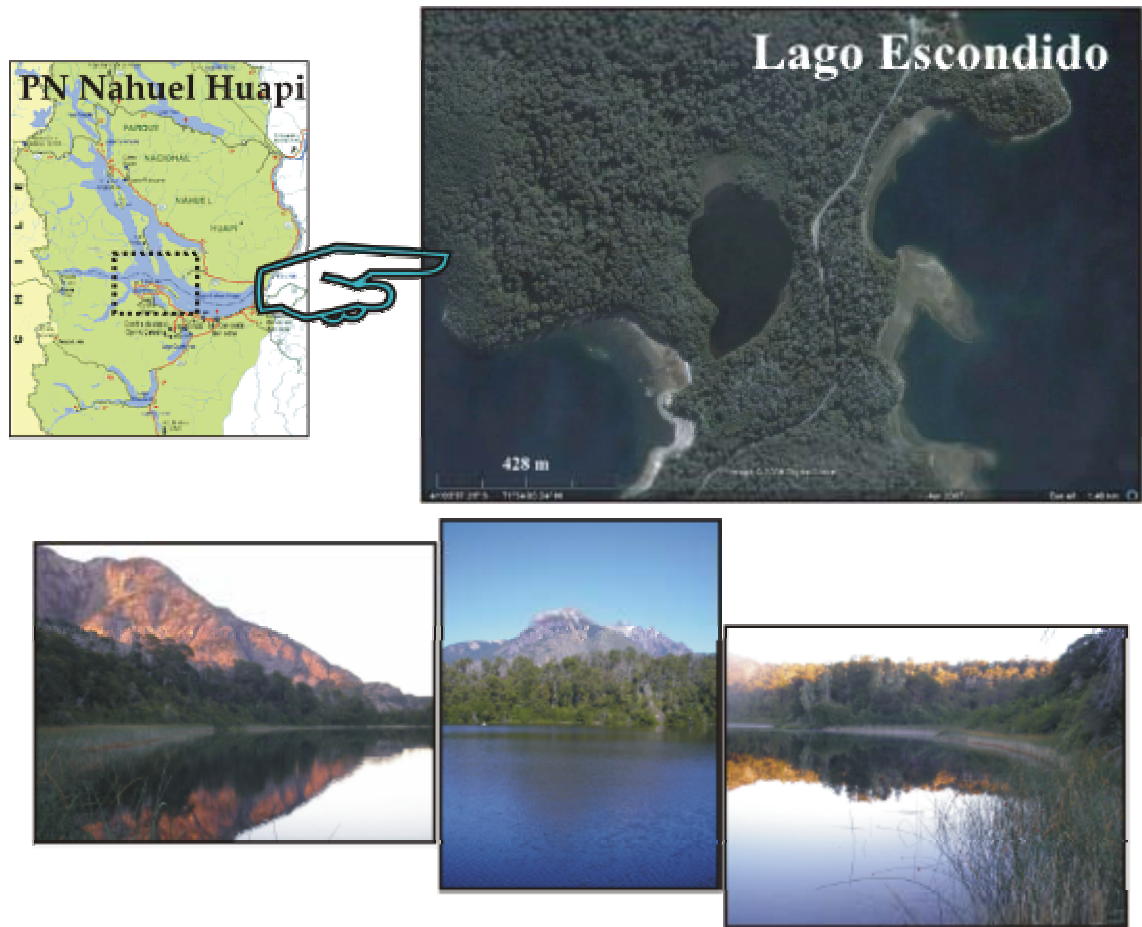


Figura 1.1. Mapa de Parque Nacional Nahuel Huapi, fotografía satelital del lago Escondido y fotografías.



## CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DEL AGUA DEL LAGO ESCONDIDO

Con el objetivo de obtener las curvas de absorbancia de la materia orgánica disuelta, se llevaron a cabo escaneos espectrofotométricos entre los 250 y 700 nm en agua de lago filtrada (GF/F). Los escaneos fueron realizados en cubetas de cuarzo de 10 cm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV2450 de doble haz. Las unidades de absorbancia fueron convertidas a coeficientes de absorción como se señaló en el Capítulo I. Los datos registrados fueron ajustados a la regresión de Morris et al. (1995), para obtener así la concentración de carbono orgánico disuelto (COD).

En el análisis de la MOD coloreada, se utiliza a menudo el ajuste de una pendiente a intervalos específicos de longitudes de onda, o la relación entre los mismos. Cambios en dichas pendientes han sido asociados con diferencias en la composición o en la fuente de la MOD coloreada (de Haan & de Boer 1987; Helms et al. 2008; Loiselle et al. 2009).

Se graficó el espectro de cada fecha de muestreo como  $\ln(a_d)$  vs Longitud de onda y se determinó la pendiente espectral para una banda de longitud de onda corta, que va desde 275 a 295 nm, y para una de onda larga, desde 350–400 nm. Las dos pendientes calculadas se denominan  $S_{275-295}$  y  $S_{350-400}$ , respectivamente, y la relación entre ambas es  $S_R$  ( $S_{275-295} : S_{350-400}$ ). Esta relación se focaliza en los valores de absorbancia que cambian de manera importante frente a alteraciones de la materia orgánica disuelta coloreada, particularmente variaciones en el peso molecular (Helms et al. 2008). El aumento de  $S_{275-295}$  y  $S_R$  se relaciona con un descenso del peso molecular (Helms et al. 2008).

Por otro lado, se estimó el tamaño relativo promedio de la MOD presente en las muestras a través del cociente  $a_{250}:a_{365}$  (Pérez & Sommaruga 2007). Además se utilizó el coeficiente  $a_{350}$  como indicador de contenido de materia orgánica disuelta coloreada (Moran et al. 2000).

## DETERMINACIÓN DE NUTRIENTES

Para la determinación de fósforo disuelto total (PDT) y amonio se utilizó agua de cada lago filtrada a través de filtro GF/F. La concentración de fósforo total (PT) fue determinada directamente en agua de lago sin filtrar. Las determinaciones químicas se realizaron como se describe en el Capítulo I (APHA 1992).



## DETERMINACIÓN DE ABUNDANCIA Y BIOMASA DE LOS COMPONENTES MICROCOMUNITARIOS: BACTERIOPLANCTON, FITOPLANCTON ( $< Y > 2 \mu\text{m}$ ), NANOFLAGELADOS Y CILIADOS.

Para el recuento de bacterias, picofitoplancton y nanoflagelados se procedió como se explicó en el Capítulo I. El recuento de nanoflagelados se llevó a cabo en filtros de membrana negros de  $1 \mu\text{m}$  de tamaño de poro, filtrando un volumen aproximado de 30 mL. En este caso, los recuentos se realizaron en microscopio de epifluorescencia, utilizando los filtros de luz UV y azul para diferenciar los nanoflagelados heterotróficos (HNF). Las células de nanoflagelados que fluorecían en color rojo, al ser iluminadas con luz azul, fueron observadas cuidadosamente y comparadas sus características con bibliografía, en conjunto estas células fueron consideradas como nanoflagelados mixótrofos (MixNF).

Por otra parte, un volumen de 250 mL de agua de lago fue inmediatamente fijada con solución de ácido Lugol para el recuento de la fracción fitoplanctónica mayor a  $2 \mu\text{m}$  y de los ciliados. Las muestras fueron contadas en cámaras de 50-mL Utermöhl en un microscopio invertido Olympus IX70. Estas muestras también ayudaron para la identificación de los nanoflagelados mixótrofos.

Las células fueron medidas con un sistema de análisis de imágenes (Image ProPlus)

Las células de todas las fracciones microcomunitarias fueron medidas con un sistema de análisis de imágenes (Image ProPlus) para el cálculo del biovolumen y su transformación a contenido de carbono. Estos valores fueron calculados con las fórmulas y factores de conversión correspondientes, como se describe en el Capítulo I.

La biomasa autotrófica (organismos mixótrofos más autotróficos) se estimó a través de la determinación de la concentración de clorofila *a*, la cual fue analizada discriminando entre picofitoplancton, la fracción  $< 2 \mu\text{m}$ , y el fitoplancton  $> 2 \mu\text{m}$ . Para la fracción  $> 2 \mu\text{m}$ , se filtraron 100 mL de agua a través de filtros de policarbonato de  $2.0 \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Nuclepore). A continuación, el filtrado resultante fue filtrado nuevamente a través de filtro de policarbonato de  $0.2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Como control, se determinó también la concentración total de clorofila *a* filtrando 100 mL de muestra a través de filtro de policarbonato de  $0.2 \mu\text{m}$  tamaño de poro. La concentración de clorofila *a* se midió por extracción con etanol 90 % siguiendo la metodología de Nusch (1980), y utilizando un fluorómetro 10-AU (Turner Design). El fluorómetro fue previamente calibrado con mediciones espectrofotométricas.



## IDENTIFICACIÓN DEL ENSAMBLE PROCARIOTA (CARD-FISH) Y DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN BACTERIANA

Para el estudio de la composición taxonómica del ensamble procariota, se filtró un volumen de 10 mL de muestra (fijada con formol filtrado) a través de filtros de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  (Nuclepore). El método utilizado fue la técnica de CARD FISH (*Fluorescence in situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition*), la cual se lleva a cabo utilizando sondas marcadas con peroxidasa de rábano, que se unen a genes específicos del ADN ribosomal procariota, y una señal tiramida de amplificación. El protocolo utilizado ha sido descrito por varios autores (Schönhuber et al. 1997; DeLong et al. 1999; Pernthaler et al. 2002; Sekar et al. 2003), y consta de las siguientes fases.

### a. Embebido de los filtros

Los filtros fueron embebidos en agarosa de baja densidad y colocados boca abajo sobre una placa de vidrio cubierta con parafilm. Se dejaron secar a temperatura ambiente y luego fueron removidos de la superficie enjuagando los filtros con etanol (96 %), retirando cuidadosamente. Una vez secos, los filtros fueron almacenados en freezer hasta su procesamiento.

### b. Permeabilización de las membranas celulares e inactivación de las peroxidasas endógenas

A continuación se cortaron los filtros en pequeñas porciones, las cuales fueron permeabilizadas con lisozima y acromopeptidasa de acuerdo a Sekar et al. (2003). La inactivación de las enzimas peroxidasas endógenas se llevó a cabo colocando los filtros en HCl 0.01M y luego lavándolos en etanol (96 %).

### c. Hibridización en cámara húmeda

La hibridización con sondas de oligonucleótidos marcados con 5'-horseradish peroxidasa (HRP), se llevó a cabo de acuerdo con Pernthaler et al. (2002) en frascos de reacción de 0.5 mL con 300  $\mu\text{L}$  de buffer de hibridización y las sondas marcadas con 5'-HRP a una concentración final de 0.5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Para la caracterización del ensamble procariota del lago Escondido se utilizaron seis sondas de oligonucleótidos específicos (Thermo-Hybrid, Germany): EUB338 para el dominio *Bacteria*, ARCH915 para el dominio *Archaea*, ALF1b para la subclase  *$\alpha$ -Proteobacteria*, BET42a para la subclase  *$\beta$ -Proteobacteria*, CF319 para el grupo de *Cytophaga-Flavobacterium*, y HGC69 para la



clase *Actinobacteria*. Se utilizó la sonda NON338 como control. La proporción de formamida en el buffer de hibridización fue siempre del 55 %, excepto para las sonda ARCH915 (40 %) y HGC69a, para las cuales se utilizó un 35 %. Las células se hibridizaron a 35°C durante al menos 2 horas y hasta un tiempo máximo de 4 horas.

#### d. Lavado de filtros

Después de la hibridización, las secciones de filtros se lavaron en buffer de lavado a 37°C durante 15 minutos con una apropiada cantidad de cloruro de sodio, dependiendo de la proporción de formamida en el buffer de hibridización (Sekar et al. 2003).

#### e. Amplificación de la señal (CARD)

A continuación, se cubrieron los filtros con 1 mL de buffer de amplificación, 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 2.5 µL de tiramida fluorescente marcada con Alexa 488. Los filtros fueron incubados a 46°C durante 15 min en oscuridad y luego se removió el líquido excedente. Luego se incubaron los filtros en PBS Triton, agitando levemente y en oscuridad. Finalmente los filtros se secaron a temperatura ambiente.

Por último, los filtros se tiñeron con DAPI (1 mg: 100 mL) y se analizaron bajo microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50 con un aumento de 1250X. Se contaron al menos 10 campos al azar para enumerar las bacterias teñidas con DAPI y con la sonda específica utilizada. Posteriormente, se calculó el valor porcentual de cada grupo bacteriano.

La producción bacteriana se determinó a través de la medición de la incorporación de [<sup>14</sup>C]-L-leucina (Simon & Azam 1989) en oscuridad a la temperatura del lago durante 2 horas. En invierno de 2006 se realizó un experimento adicional, con el objetivo de analizar el efecto del aumento de temperatura en la producción bacteriana. De esta manera, además de realizar una incubación a la temperatura del lago, se llevó a cabo una incubación adicional de las muestras con un incremento térmico de 13°C.

Una vez arribadas al laboratorio las muestras de agua, se procedió como se describe en el Capítulo I. Básicamente, se incubaron en microtubos con muestra de agua de lago, por triplicado, y un control con 15 µL de <sup>14</sup>C-Leucina. El control fue fijado con 75 µL de ácido tricloroacético (TCA) 100 %, y transcurrido el tiempo de incubación, se procedió de la misma manera con las muestras. Al cabo de 30 min de incubación, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12000 rpm. Se procedió a la remoción del sobrenadante y luego se agregaron 1.4 mL de TCA 5 % a cada microtubo y se centrifugaron nuevamente. Una vez retirado el sobrenadante de cada microtubo, se agregó 1 mL de líquido centelleante y se



colocaron en un contador de centelleo Beckman LS 3801 TA. Estas mediciones se realizaron en el LIBIQUIMA (Universidad Nacional del Comahue, Neuquén).

Se obtuvo la producción bacteriana específica celular, calculando el cociente entre la producción bacteriana neta y la abundancia celular.

## ANÁLISIS DE DATOS

Para analizar las variaciones en la concentración de PDT, PT y amonio, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de doble vía, en el que los factores fueron: “Estación del año” y “Profundidad”. Este análisis fue también llevado a cabo para la comparación de las abundancias relativas de los diferentes grupos bacterianos, utilizando como factores: “Profundidad” y “Sonda”. Por otro lado, se analizó la variación en la relación  $a_{250}:a_{365}$  y el coeficiente  $a_{350}$  a través del tiempo muestreado, utilizando un ANOVA de una vía. Asimismo, se utilizó este análisis para comparar la producción bacteriana entre las diferentes profundidades muestreadas.

Se estudió la relación entre diferentes variables ópticas, químicas y biológicas a través de un análisis de correlación. Las variables analizadas fueron: la concentración de COD, la relación  $a_{250}:a_{365}$ , el coeficiente  $a_{350}$ , la concentración de PDT, PT,  $\text{NH}_4$ , la abundancia de bacterias, picofitoplancton, nanoflagelados heterótrofos, no heterótrofos, fitoplancton  $> 2 \mu\text{m}$ , ciliados prostomatidos y oligotriquidos, y la relación abundancia bacteriana: abundancia de nanoflagelados totales. Esta última relación se calculó como un estimador del número de células disponible para bacterivoría (Fenchel 1986) si este número es menor a 1000 indicaría que las bacterias están fuertemente afectadas por la depredación (Fenchel 1986). Para las diferentes correlaciones se analizó previamente la distribución de los datos a través de un Test de Normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y luego se procedió al cálculo del coeficiente de Pearson ( $r$ ), para las variables paramétricas, y el coeficiente de Spearman ( $\rho$ ) para las variables no paramétricas.



## RESULTADOS

### LUZ, TEMPERATURA, O<sub>2</sub> Y CONDUCTIVIDAD

Los perfiles lumínicos obtenidos para el Lago Escondido permitieron realizar el cálculo de los coeficientes de atenuación ( $K_d$ ) y la profundidad 1 % ( $Z_{1\%}$ ) para los diferentes longitudes de onda (RUV y RFA). Los valores de  $K_d$  obtenidos en este estudio se compararon con los valores registrados por Morris et al. (1995). Por otro lado, el  $Z_{1\%}$  obtenido para la radiación fotosintéticamente activa alcanzó el fondo a lo largo de todo el muestreo. La radiación ultravioleta B se extinguió entre los 0.3 m y los 0.9 m de profundidad a lo largo del período muestreado, mientras que la fracción A se extinguió entre los 0.5 m y 1.5 m (Tabla 2.2).

Tabla 2.1. Coeficientes de atenuación ( $K_d$ ) y profundidad 1 % ( $Z_{1\%}$ ) para el rango de Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA), rango UV-B (305 y 320 nm) y rango UV-A (340 y 380 nm), registrados para el Lago Escondido en el presente estudio y valores registrados por Morris et al. (1995).

	Presente estudio	Morris et al. (1995)
$K_d$ (RFA)	$0.58 \pm 0.15$	0.46
$K_d$ (305 nm)	$9.74 \pm 3.41$	8.88
$K_d$ (320 nm)	$7.70 \pm 2.79$	7.68
$K_d$ (340 nm)	$6.77 \pm 2.01$	5.80
$K_d$ (380 nm)	$4.49 \pm 1.43$	3.03
$Z_{1\%}$ (RFA) (m)	$7.52 \pm 1.54$	-
$Z_{1\%}$ (305 nm) (m)	$0.52 \pm 0.23$	-
$Z_{1\%}$ (320 nm) (m)	$0.66 \pm 0.27$	-
$Z_{1\%}$ (340 nm) (m)	$0.71 \pm 0.21$	-
$Z_{1\%}$ (380 nm) (m)	$1.11 \pm 0.43$	-

En verano se registraron las mayores variaciones de temperatura a lo largo de la columna de agua, mostrando estratificaciones incipientes (Tabla 2.2). Durante los muestreos de otoño, invierno y primavera, el lago se encontró en período de mezcla completa (Tabla 2.2). Se observaron valores cercanos a la saturación o sobresaturación de



oxígeno disuelto el período muestreado, con muy poca variación a través de la columna de agua (Tabla 2.2). La conductividad también fue constante a lo largo de la columna de agua en cada estación del año muestreada; sin embargo, se observaron mayores valores en otoño e invierno (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Valores de temperatura, conductividad, oxígeno disuelto y saturación de oxígeno disuelto, registrados durante el período de estudio. Los valores corresponden a la media de las muestras tomadas (0 m, 3 m, 6 m y 0 m de zona litoral)  $\pm$  desviación standard.

	Temperatura (°C)	Conductividad ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Oxígeno disuelto ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Saturación de Oxígeno disuelto (%)
Verano	$16.25 \pm 2.18$	$49.75 \pm 0.23$	$9.16 \pm 1.56$	$100.8 \pm 0.06$
Otoño	$9.47 \pm 0.32$	$54.475 \pm 0.56$	$8.31 \pm 0.41$	$76.6 \pm 0.09$
Invierno	$8.34 \pm 0.27$	$55.7 \pm 0.21$	$10.82 \pm 0.45$	$97.6 \pm 0.01$
Primavera	$15.12 \pm 0.20$	$51.96 \pm 0.25$	$8.28 \pm 0.25$	$82.1 \pm 0.07$

## CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS DEL AGUA

El análisis de los espectros de absorción registrados en la columna de agua, mostró resultados muy similares para todas las profundidades muestreadas. Por esta razón, sólo se presentarán los datos correspondientes al nivel superficial de la zona pelágica y de la zona litoral para cada una de las fechas de muestreo.

Los espectros de absorción registrados para las diferentes fechas de muestreo tanto en la zona litoral como en la pelágica mostraron también patrones similares, con mayores valores del coeficiente  $a_d$  hacia la banda UV del espectro (Fig. 2.2). Tampoco se observaron diferencias en los espectros de absorbancia, o la linearización de los mismos, entre las dos zonas del lago (Fig. 2.2). Sin embargo, fue posible observar una disminución de la absorbancia en las muestras a medida que transcurrió el período muestreado, desde verano de 2006 a otoño de 2008, con un nuevo aumento en primavera del último año. La transformación logarítmica de los valores de  $a_d$ , mostró el mismo gradiente observado para los espectros de absorbancia (Fig. 2.2).





Los valores de  $S_{275-295}$ ,  $S_{350-400}$  y  $S_R$  calculados para cada muestra superficial, variaron a través del período muestreado, revelando variaciones en la calidad de la materia orgánica disuelta (Tabla 2.3). Se observó un claro aumento de  $S_{275-295}$  tanto para la zona pelágica como para la litoral. Este gradiente se correspondió con un descenso de la pendiente  $S_{350-400}$ . A lo largo de todo el tiempo estudiado,  $S_{275-295} > S_{350-400}$ , con valores de  $S_R$  siempre  $> 1$ . El incremento de  $S_R$ , indicó una disminución del peso molecular de la materia orgánica en el lago, con una probable disminución del contenido relativo de MOD de origen terrestre, representado por la pendiente  $S_{350-400}$ . En esta tendencia general de disminución del tamaño molecular de la MOD, cabe destacar la disminución de  $S_R$  registrada en la última fecha de muestreo, en ambas zonas de lago. No se observó una tendencia general clara entre los valores registrados para las muestras de las zonas litoral y pelágica (Tabla 2.3). Sin embargo, se observaron menores valores de  $S_R$  en la zona litoral durante los años 2006 y 2007, y mayores durante el año 2008. De esta manera, la zona litoral del lago Escondido mostró menor peso molecular de la materia orgánica disuelta hacia los últimos muestreos realizados.

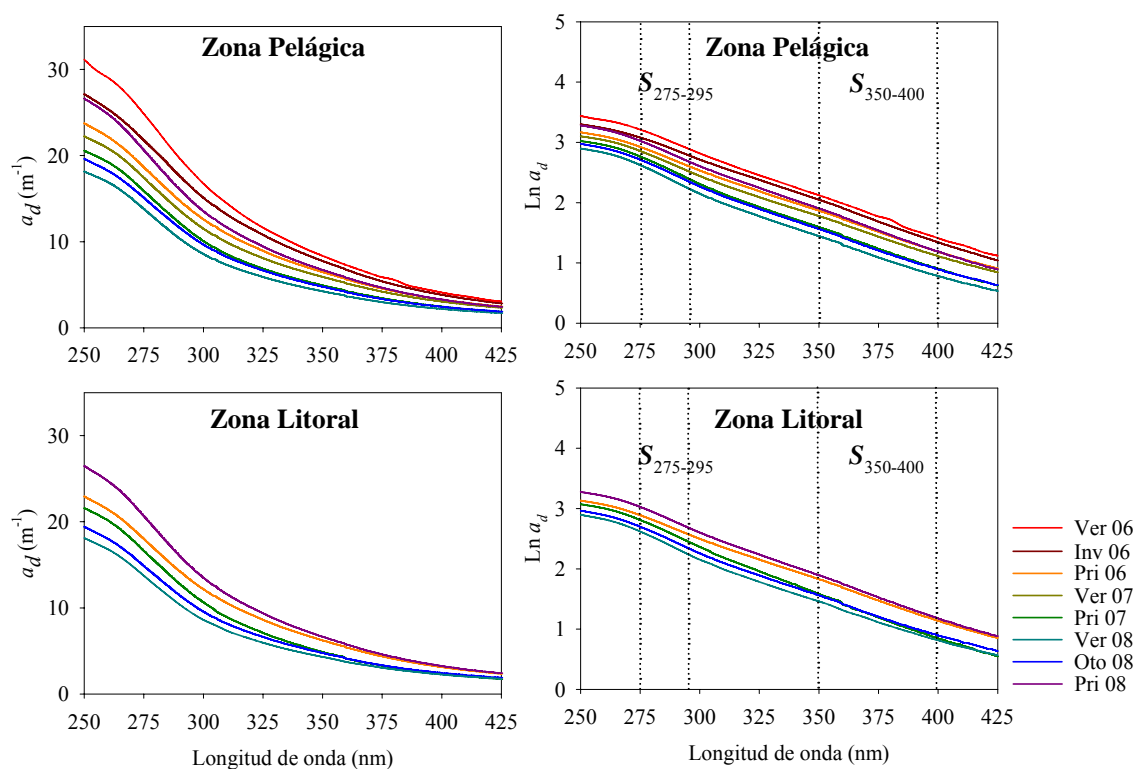


Figura 2.2. Espectros de absorbancia ( $a_d$ ) y espectros logaritmizados ( $\ln a_d$ ) registrados en la superficie de la zona pelágica y de la zona litoral del lago Escondido. Se



señalan los intervalos para los cuales se calculó el valor de la pendiente ( $S_{275-295}$  y  $S_{350-400}$ ).

Tabla 2.3. Valores de las pendientes  $S_{275-295}$  y  $S_{350-400}$  y de su relación ( $S_R$ ), para las muestras superficiales de las zonas litoral y pelágica.

	Zona Litoral			Zona pelágica		
	$S_{275-295}$	$S_{350-400}$	$S_R$	$S_{275-295}$	$S_{350-400}$	$S_R$
Verano 06	s.d	s.d	s.d	0.0158	0.0145	1.0896
Invierno 06	s.d	s.d	s.d	0.0146	0.0143	1.0209
Primavera 06	0.0158	0.0140	1.1286	0.0158	0.0138	1.1449
Verano 06	s.d	s.d	s.d	0.0166	0.0135	1.2296
Primavera 06	0.0179	0.0148	1.2094	0.0182	0.0140	1.3000
Verano 08	0.0189	0.0130	1.4538	0.0194	0.0134	1.4477
Otoño 08	0.0177	0.0135	1.3111	0.0178	0.0136	1.3088
Primavera 08	0.0172	0.0145	1.1862	0.0170	0.0145	1.1724

La relación  $a_{250}:a_{365}$  y el coeficiente  $a_{350}$  mostraron variaciones significativas a lo largo del tiempo muestreado (ANOVA de una vía,  $P < 0.001$  para ambos parámetros). Los menores valores de  $a_{250}:a_{365}$  se observaron en la primer parte del muestreo, hasta verano de 2007 (Fig. 2.3). A partir de primavera de 2007 y hasta otoño de 2008, se observó un descenso significativo del tamaño molecular de la materia orgánica (Test *a posteriori* de Tukey, Verano 07 vs Primavera 07,  $P < 0.001$ ). La mayor dispersión entre los valores de las muestras tomadas (0 m, 3 m, 6 m y 0m de zona litoral) se registró en la primavera de los tres años muestreados y en verano de 2008 (Fig. 2.3). Por otro lado, el coeficiente  $a_{350}$ , calculado como estimador de materia orgánica disuelta coloreada, mostró descenso hasta verano de 2008 (Fig. 2.3). Se observó un aumento en el color del agua en otoño y primavera de 2008. En este último muestreo se observó la mayor dispersión entre las diferentes profundidades y la muestra correspondiente a la zona litoral del lago (Fig. 2.3).

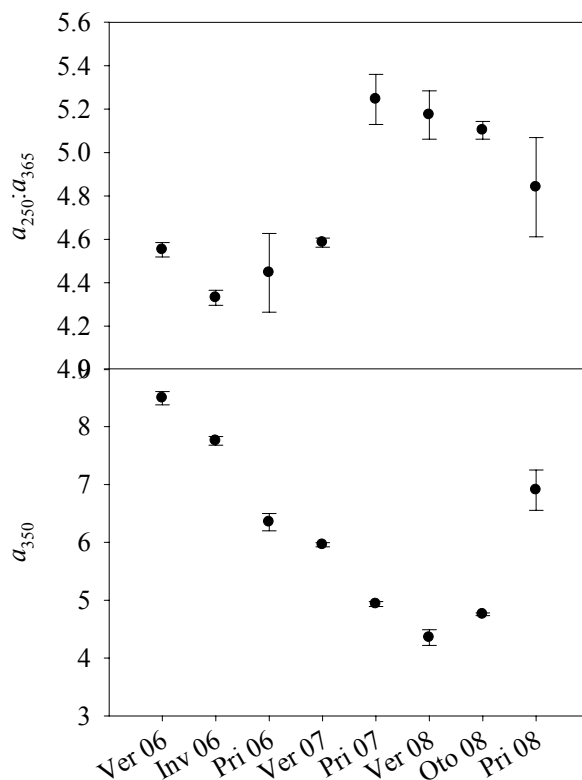


Figura 2.3. Valores de  $a_{250}:a_{365}$  y de  $a_{350}$  para cada fecha de muestreo. Los puntos corresponden a la media de las muestras tomadas (0 m, 3 m, 6 m y 0 m de zona litoral)  $\pm$  desviación standard.

Al analizar la relación entre los valores de concentración de COD, del cociente  $a_{250}:a_{365}$  y del coeficiente  $a_{350}$  se observó una clara relación entre las variables (Fig. 2.4). El análisis estadístico de las relaciones entre los pares de variables reveló una correlación significativa entre las mismas. Se observó una correlación negativa entre  $a_{250}:a_{365}$  y los demás parámetros ( $a_{250}:a_{365}$  vs COD,  $\rho = -0.802$ ;  $a_{250}:a_{365}$  vs  $a_{350}$ ,  $\rho = -0.772$ ;  $P < 0.001$  en ambos casos), y una correlación positiva entre la concentración de COD y  $a_{350}$  ( $\rho = 0.982$ ,  $P < 0.001$ ). De esta manera, las mayores concentraciones de COD estarían asociadas a altos contenidos de sustancias coloreadas (estimadas a través de color de  $a_{350}$ ), un tamaño molecular promedio alto de la materia orgánica disuelta presente en la muestras de agua.

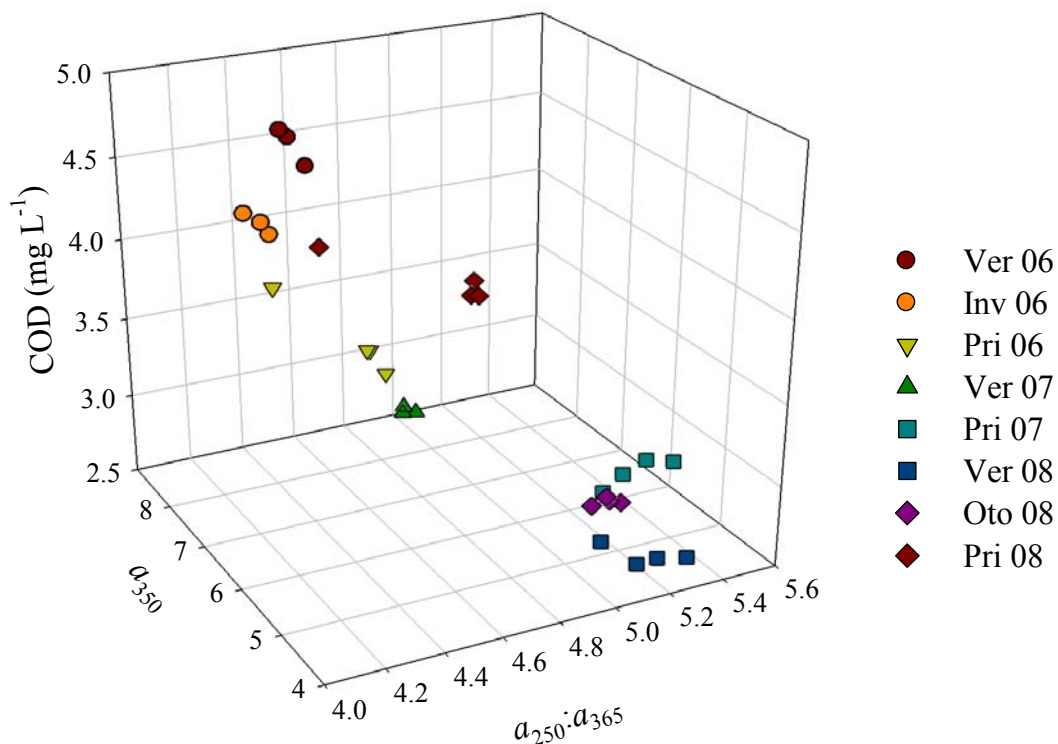


Figura 2.4. Relación entre valores del cociente  $a_{250}:a_{365}$ , el coeficiente  $a_{350}$  y los valores de COD (estimados por espectrofotometría), correspondientes al período muestreado.

## NUTRIENTES

Las concentraciones de los nutrientes analizados mostraron variación a lo largo del período muestreado (ANOVA de dos vías,  $P < 0.05$  para el factor “Estación del año”). La concentración de P disuelto total mostró los mayores valores de concentración en invierno de 2006 y primavera de 2007 (Fig. 2.5). Durante el 2008, la concentración de PDT se mantuvo constante, sin observarse diferencias significativas entre las zona litoral y pelágica, ni entre los niveles de profundidad muestreados en la zona pelágica (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$  en todos los muestreos). Con respecto al PT, las concentraciones fueron bastante similares entre los diferentes muestreos, registrándose la mayor concentración a los 6 m en primavera de 2007. Sin embargo, se observó variación entre los niveles muestreados en la zona pelágica (Fig. 2.5). En superficie se registró siempre menor concentración de PT que a los 3 m de profundidad (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$  en todos los muestreos, excepto en primavera de 2008), mientras que a los



6 m de profundidad la concentración relativa de PT varió entre los muestreos (Fig. 2.2). Además, no se registraron diferencias significativas entre la zona litoral y la superficie de la zona pelágica (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$  en todos los muestreos). Por otro lado, la concentración de amonio mostró las mayores concentraciones durante los muestreos de 2006, a los 6 m en invierno y a los 3 m en primavera. Se observaron diferencias significativas entre las profundidades en todos los muestreos (ANOVA de dos vías,  $P < 0.05$ ). Los valores registrados en la superficie fueron siempre menores que los registrados a los 3 m (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$  en todos los muestreos), excepto en primavera de 2008. Contrariamente a lo observado para la fracción disuelta de P y para el P total, el amonio presentó mayores valores de concentración en la zona litoral que en la zona pelágica (Fig. 2.2).

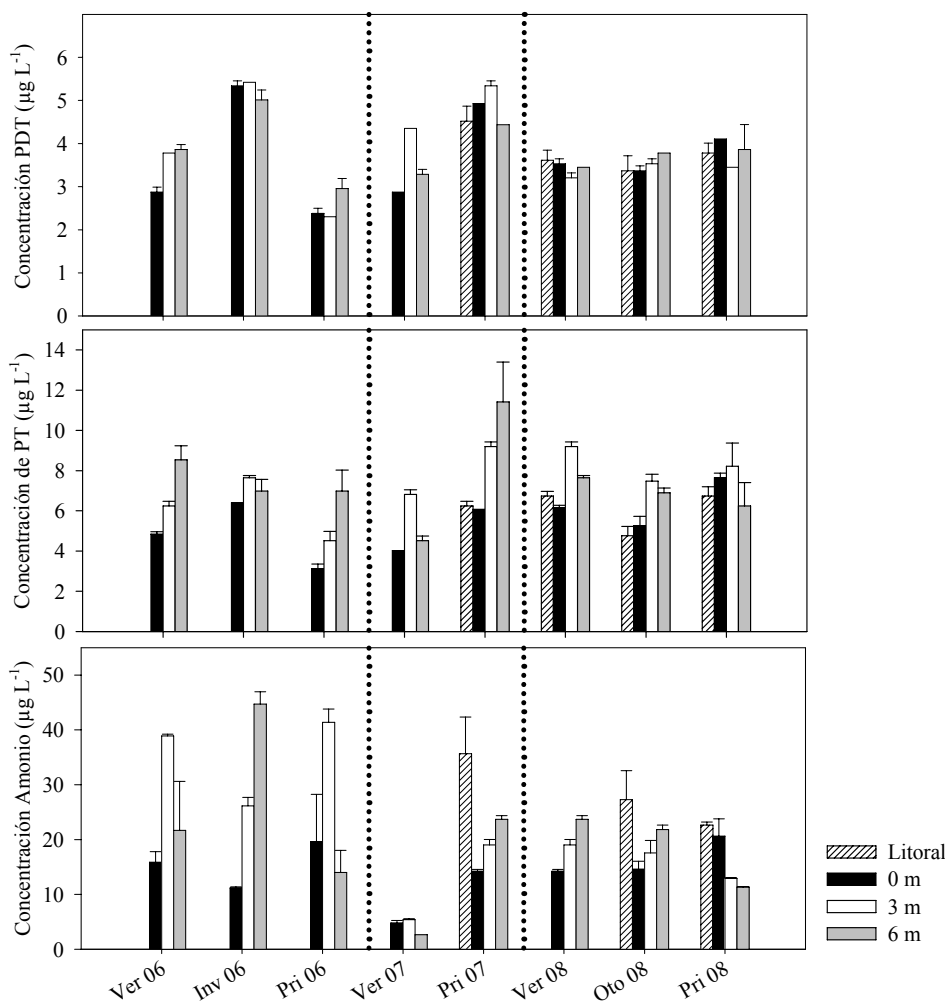


Figura 2.5. Concentración de PT, PDT y amonio en la columna de agua y zona litoral durante el período estudiado.



## CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA *a* DE LAS FRACCIONES AUTOTRÓFICAS MAYOR Y MENOR DE 2 $\mu\text{m}$

Las concentraciones de clorofila *a* registradas para ambas fracciones fitoplanctónicas mostraron valores bajos a lo largo de todo el muestreo realizado, alcanzándose un máximo de  $2.67 \mu\text{g L}^{-1}$  de clorofila total en invierno de 2006 a los 6 m y un mínimo de  $0.55 \mu\text{g L}^{-1}$  en primavera de 2006 en superficie (Fig. 2.6). Ambas fracciones mostraron un patrón similar para cada una de las profundidades muestreadas. Las menores concentraciones de clorofila *a* se registraron en la superficie del lago a lo largo de todo el muestreo, tanto para el picofitoplancton como para la fracción  $> 2 \mu\text{m}$ . El picofitoplancton osciló alrededor de los  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , mientras que el fitoplancton  $> 2 \mu\text{m}$  se mantuvo alrededor de los  $0.41 \mu\text{g L}^{-1}$ . Con respecto a las concentraciones registradas a los 3 m y 6 m, para el picofitoplancton se observó una tendencia similar a la presentada en superficie, con los mayores valores registrados a los 6 m con un máximo en invierno de 2006. Por otro lado, el fitoplancton  $> 2 \mu\text{m}$  no mostró un patrón evidente en su distribución (Fig. 2.6).

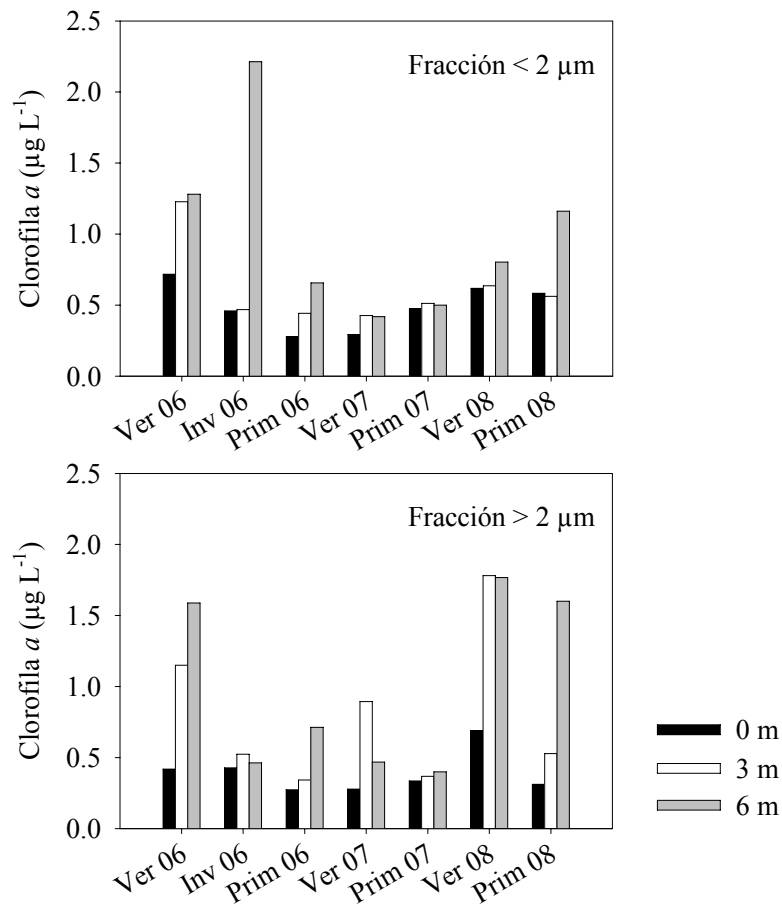


Figura 2.6. Variaciones en la concentración de clorofila *a* correspondiente a las diferentes fracciones fitoplanctónicas (< y > 2 µm), durante el período muestreado.

Con respecto a la contribución porcentual de las diferentes fracciones fitoplanctónicas a la concentración total de clorofila *a*, se observaron variaciones a lo largo del período estudiado y a través de la columna de agua (Tabla 2.4). Excepto en verano de 2008, donde se observó un aumento en la importancia del fitoplancton > 2 µm, el picofitoplancton contribuyó mayormente en la superficie del lago a lo largo de todo el muestreo (Tabla 2.4). Asimismo, a los 3 m de profundidad, la relación entre ambas fracciones fue > 1 en gran parte del muestreo (Tabla 2.4). A los 6 m de profundidad el fitoplancton > 2 µm fue la fracción dominante en todo el período muestreado, variando su porcentaje de distribución ~ 57.23 %.



Tabla 2.4. Contribución porcentual de las fracciones fitoplanctónicas (&lt; y &gt; 2 µm) a la biomasa autotrófica total del Lago Escondido durante el período muestreado.

Fecha	Profundidad	% < 2 µm	% > 2 µm	< 2µm : > 2µm
Verano 06	0 m	63.11	36.89	1.71
	3 m	51.63	48.37	1.06
	6 m	44.63	55.37	0.81
Invierno 06	0 m	51.81	48.19	1.07
	3 m	47.20	52.80	0.89
	6 m	43.54	56.46	0.77
Primavera 06	0 m	50.26	49.74	1.01
	3 m	56.47	43.53	1.29
	6 m	47.94	52.06	0.92
Verano 07	0 m	51.21	48.79	1.05
	3 m	32.28	67.72	0.48
	6 m	47.23	52.77	0.89
Primavera 07	0 m	58.56	41.44	1.41
	3 m	58.18	41.82	1.39
	6 m	s.d	s.d	s.d
Verano 08	0 m	47.21	52.79	0.89
	3 m	26.34	73.66	0.35
	6 m	31.24	68.76	0.45
Primavera 08	0 m	65.17	34.83	1.87
	3 m	51.53	48.47	1.06
	6 m	42.04	57.96	0.72

#### ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE LAS FRACCIONES MAYOR Y MENOR DE 2 µM

La fracción picofitoplanctónica estuvo constituida exclusivamente por picocianobacterias con dominancia de células ricas en ficoeritrina (Fig. 2.7). Dentro de las formas observadas puede mencionarse a células elongadas de una longitud de media de  $20.4 \pm 3.3 \mu\text{m}$  y un diámetro de  $2.07 \pm 0.31 \mu\text{m}$ , generalmente formando agregados de varias células (Fig. 2.7a). Este grupo se observó de manera muy ocasional. Una segunda forma consistió en agregados de número variable de pequeños cocos de un diámetro promedio de  $0.91 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (Fig.2.7b). Por último, los bacilos cortos de  $1.82 \pm 0.32 \mu\text{m}$  de largo promedio y  $0.95 \pm 0.3 \mu\text{m}$  de diámetro fueron la forma dominante (Fig. 2.7c). Para





las células de este grupo se calculó un biovolumen promedio de  $1.04 \pm 0.3 \mu\text{m}^3$  y un contenido de carbono de  $207.49 \pm 89.48$  fg por célula.

Se observaron variaciones en la abundancia de las picocianobacterias a lo largo de las estaciones del año y también entre las zonas del lago (Fig. 2.8). Las menores abundancias fueron observadas durante el invierno y verano de los tres años estudiados, mientras que en primavera y otoño se alcanzaron las mayores abundancias (Fig. 2.8). En general, las mayores abundancias se observaron a los 3 o 6 m de profundidad. Por otro lado, la zona litoral evidenció mayores abundancias que la zona pelágica con la mayor abundancia de picofitoplancton en primavera de 2008 (Fig. 2.8).

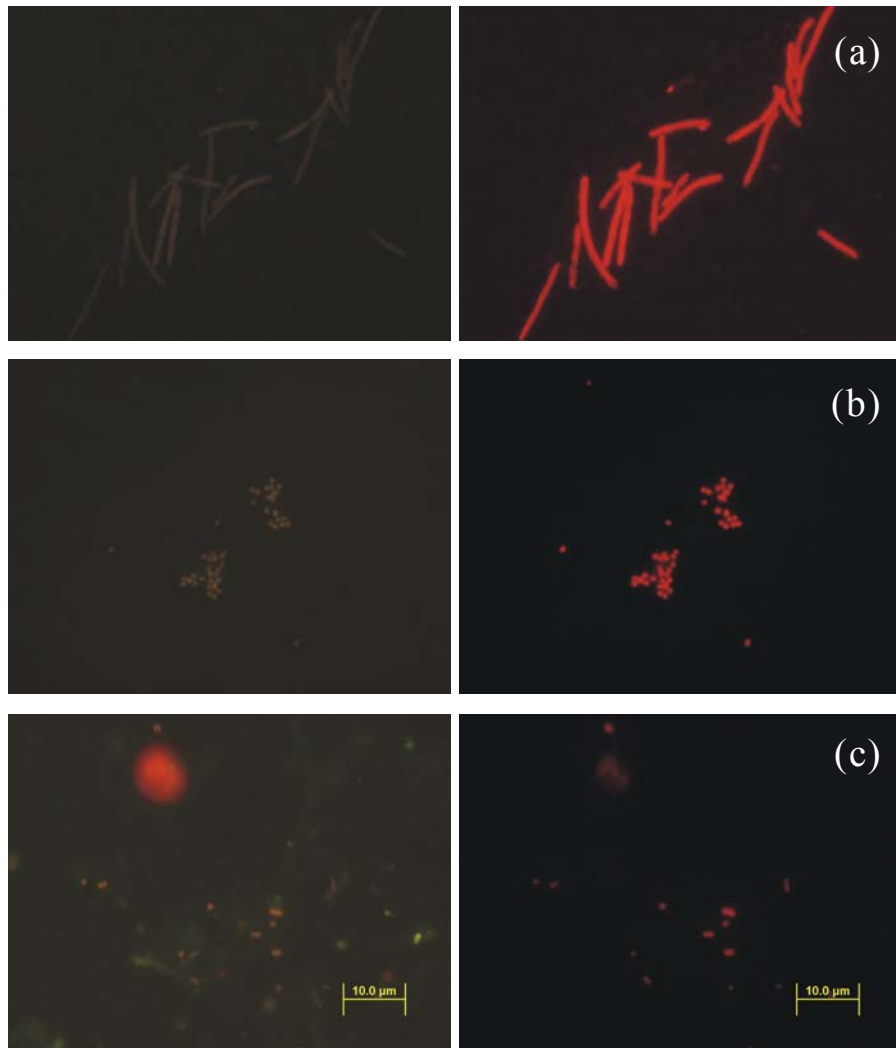


Figura 2.7. Fotografía de las picocianobacterias observadas en el Lago Escondido. (Microscopio de epifluorescencia con filtro azul (izquierda) y verde (derecha). (a) forma elongada, (b) agregados y (c) bacilos.

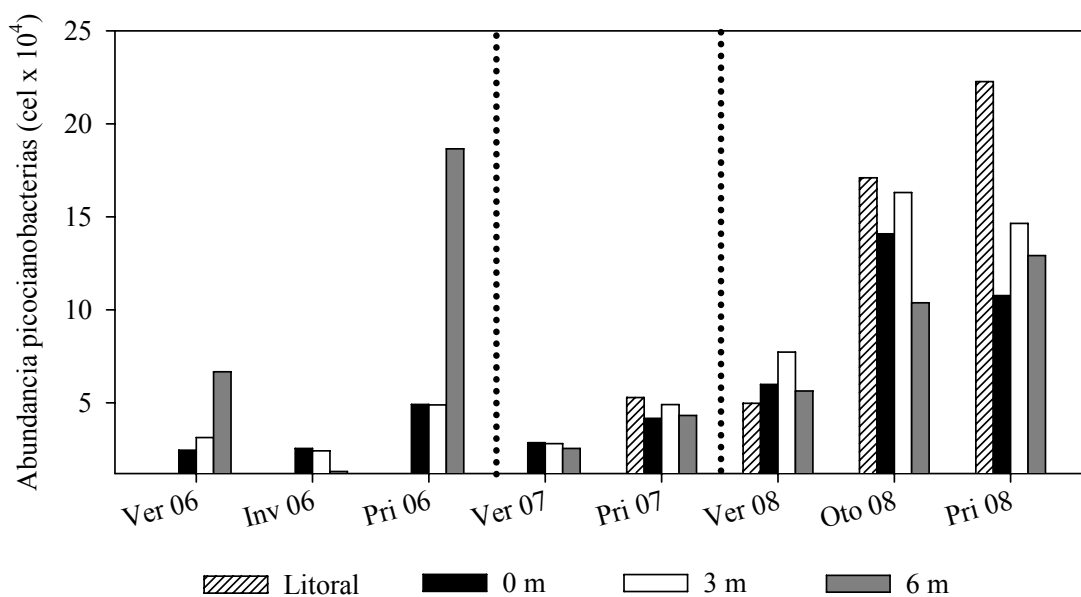


Figura 2.8. Abundancia de picocianobacterias en las zonas litoral y pelágica del Lago Escondido, durante el período muestreado.

La fracción fitoplanctónica > 2  $\mu\text{m}$  estuvo constituida por 82 especies distribuidas en 10 clases algales (Tabla 2.5). La clase con mayor número de especies fue Zygothyceae, con 23 especies, seguida por Bacillariophyceae con 20 especies. Por otro lado, las clases que presentaron especies con mayor abundancia celular fueron Cyanophyceae, Cryptophyceae, Chrysophyceae, Haptophyceae y Dinophyceae (Tabla 2.5).



Tabla 2.5. Lista de especies de algas presentes en el Lago Escondido, durante el período de estudio.

---

Dominio BACTERIA

División Cyanobacteria

Clase Cyanophyceae

*Anabaena* sp  
*Chroococcus* sp  
*Chroococcus planctonicus* Bethge.  
*Coelosphaerium kuetzingianum* Nag.  
*Gloeocapsa* sp  
*Gomphosphaeria lacustris* Chod.  
*Merismopedia* sp  
*Microcystis* sp  
*Oscillatoria* sp  
*Pseudoanabaena* sp

Dominio EUCARYA

Phylum Chlorophyta

Clase Chlorophyceae

*Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs.  
*Ankistrodesmus spiralis* (Turner) Lemm.  
*Binuclearia eriensis* var. *Major* Tiff.  
*Fusola viridis* Snow  
*Kirchneriella* sp  
*Monoraphidium setiforme* (Nyg.) Kom.-Legn.  
*Micractinium pussilum* Fres.  
*Pediastrum boryanum* (Turf.) Bréb.  
*Scenedesmus ecornis* (Ralfs) Chod.  
*Scenedesmus brevispina* (Smith) Chod.  
*Oedogonium* sp  
*Ulothrix* sp

Clase Zygothryx

*Bambusina* sp  
*Closterium gracile* Bréb.  
*Closterium abruptum* West  
*Cosmarium depressum* (Nag.) Lund.  
*Cosmarium subtumidum* Nordst.  
*Euastrum* sp  
*Gonatozygon pillosum* Wolle  
*Micrasterias abrupta* West & West  
*Mougeotia* sp  
*Netrium digitus* (Ehr.) Itzigs et Rothe.  
*Pleurotaenium ehrenbergii* (Ralfs) Del.  
*Staurodesmus patens* (Nordst.) Croasal.  
*Staurodesmus* spp (4 especies)  
*Staurastrum* spp (5 especies)  
*Xanthidium* sp  
*Zygnema* sp

Phylum Euglenophyta

Clase Euglenophyceae

*Euglena* spp (2 especies)  
*Trachelomonas hispida* (Perty) Stein



Phylum Cryptophyta

Clase Cryptophyceae

*Cryptomonas marssonii* Skuja

*Cryptomonas erosa* Ehr.

*Rhodomonas lacustris* (Pascher & Ruttner) Javornicky

Phylum Xanthophyta

Clase Xanthophyceae

*Tribonema* sp

Phylum Chrysophyta

Clase Chrysophyceae

*Dinobryon divergens* Imh.

*Dinobryon sertularia* Ehr.

Phylum Haptophyta

Clase Haptophyceae

*Chrysochromulina parva* Lackey

Phylum Bacillariophyta

Clase Bacillariophyceae

*Achnanthes* spp (2 especies)

*Amphipleura pellucida* (Kütz) Kütz.

*Aulacoseira alpigena* (Grun.) Lange-Bert.

*Cyclotella stelligera* Cl. & Grun.

*Cymbella* spp (3 especies)

*Epithemia adnata* (Kütz.) Bréb.

*Fragilaria bicapitata* Mayer

*Gomphonema gracile* Ehr.

*Navicula* spp (4 especies)

*Nitzschia sigmoidea* (Nitz.) W. Sm.

*Rhopalodia gibba* (Ehr.) Müller

*Synedra* sp

*Synedra ulna* (Nitz.) Ehr.

*Tabellaria flocculosa* (Roth.) Kütz.

Phylum Dinophyta

Clase Dinophyceae

*Gymnodinium varians* Maskell

*Gymnodinium paradoxum* Schill.

*Gymnodinium uberrimum* (Allman) Kofoid & Swezy

*Gymnodinium fuscum* (Ehr.) Stein

*Peridinium* sp 1

*Peridinium* spp (2 especies)

---

Se observaron variaciones en la contribución de las diferentes clases algales a lo largo del tiempo de muestreo (Fig. 2.9). Por otro lado, entre las zonas litoral y pelágica se observaron diferencias tanto en los valores de abundancia como en el número de clases algales, siendo ambos parámetros mayores en la zona litoral (Fig. 2.9). Las clases con mayor abundancia a lo largo de todo el año, tanto en la zona litoral como en la pelágica,



fueron Cryptophyceae, Haptophyceae y Dinophyceae. La clase Cryptophyceae mostró menores abundancias en la superficie de la columna de agua, con máximos entre los 3 m y 6 m, dependiendo de la fecha de muestreo. En el litoral se registraron abundancias elevadas en Primavera de 2006, Verano de 2007 y de 2008 (Fig. 2.9). Por otro lado, en primavera de 2007 y verano de 2008 se observó un importante incremento del grupo de las cianofitas tanto en la zona litoral como en la pelágica (Fig. 2.9). Sin embargo, su abundancia se mantuvo bastante constante en la columna de agua y la zona litoral ( $\sim 349$  cel  $\text{mL}^{-1}$  en primavera y  $\sim 1168$  cel  $\text{mL}^{-1}$  en verano).

El contenido de carbono calculado para cada grupo algal reveló que la clase con mayor aporte fue la de los dinoflagelados. Este grupo presentó su máximo porcentaje de contribución en primavera de 2008 alcanzando 87.4 % a los 6 m (Fig. 2.9). Los valores de contenido de carbono revelaron una marcada diferencia entre las zonas pelágica y litoral. En esta última, las clases Zygothryxaceae, Bacillariophyceae, Chlorophyceae y Xanthophyceae, adquirieron particular importancia en cuanto a su contribución a la biomasa fitoplanctónica total (Fig. 2.9). La clase Zygothryxaceae fue la que alcanzó mayores registros, en primavera de 2006 (44.7 %), verano de 2007 (69.4 %) y verano de 2008 (61.1 %).

Las especies responsables de la mayor abundancia de las clases Cryptophyceae, Haptophyceae y Dinophyceae fueron *Rhodomonas lacustris*, *Chrysochromulina parva* y *Gymnodinium varians* (Tabla 2.4). La abundancia de la criptofita *R. lacustris* varió entre 28 a 460 cel  $\text{mL}^{-1}$  (Fig. 2.10). La especie *C. parva* también mostró amplias variaciones, presentando una abundancia mínima de 269 cel  $\text{mL}^{-1}$  en superficie en invierno de 2006, y la máxima de 1846 cel  $\text{mL}^{-1}$  a los 6 m en otoño de 2008 (Fig. 2.10). El dinoflagelado *G. varians* varió entre 6 y 294 cel  $\text{mL}^{-1}$  con un máximo en primavera de 2008 (Fig. 2.10).

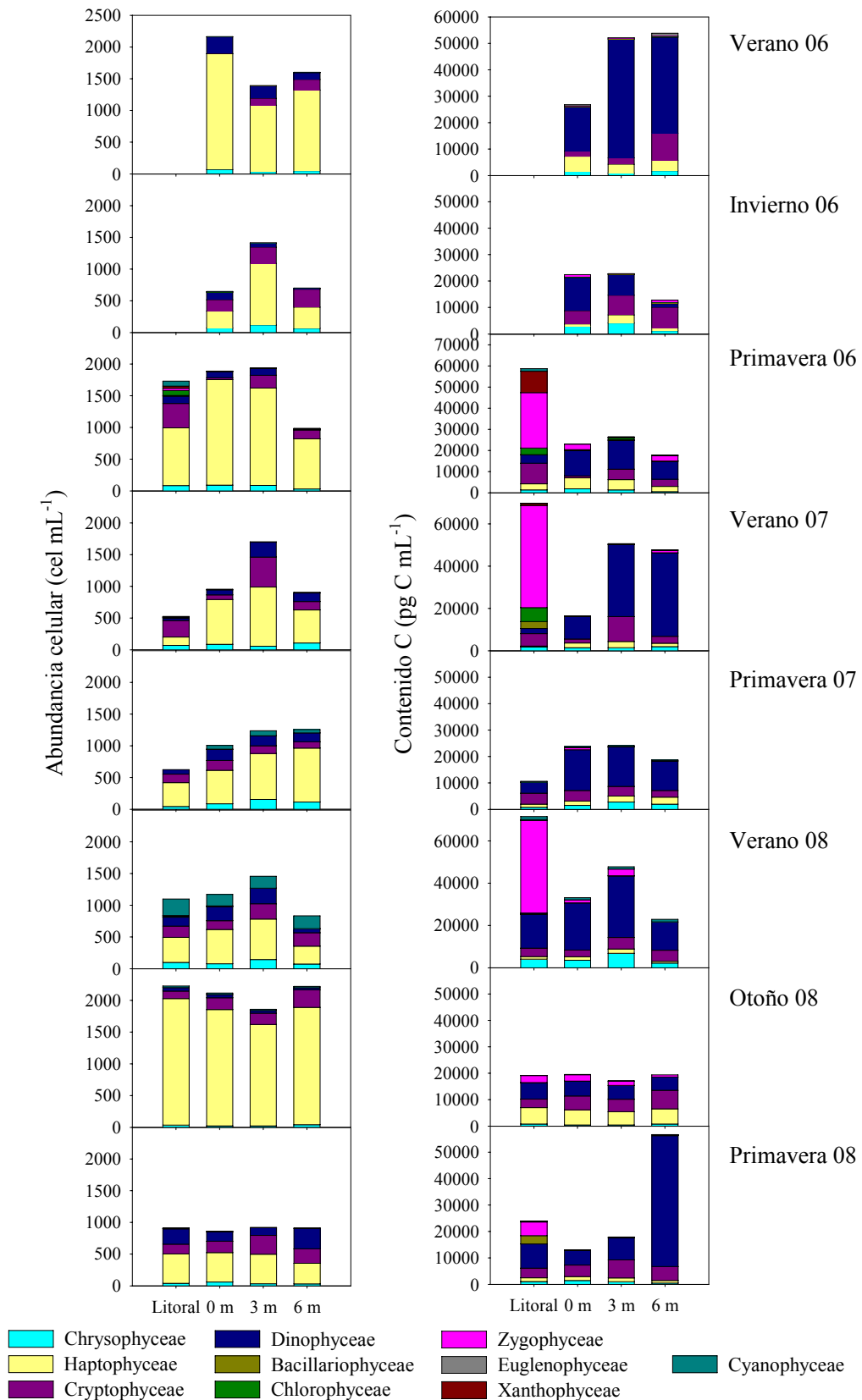


Figura 2.9. Variación de la abundancia y el contenido de carbono de las diferentes clases algales del Lago Escondido, en el período estudiado.

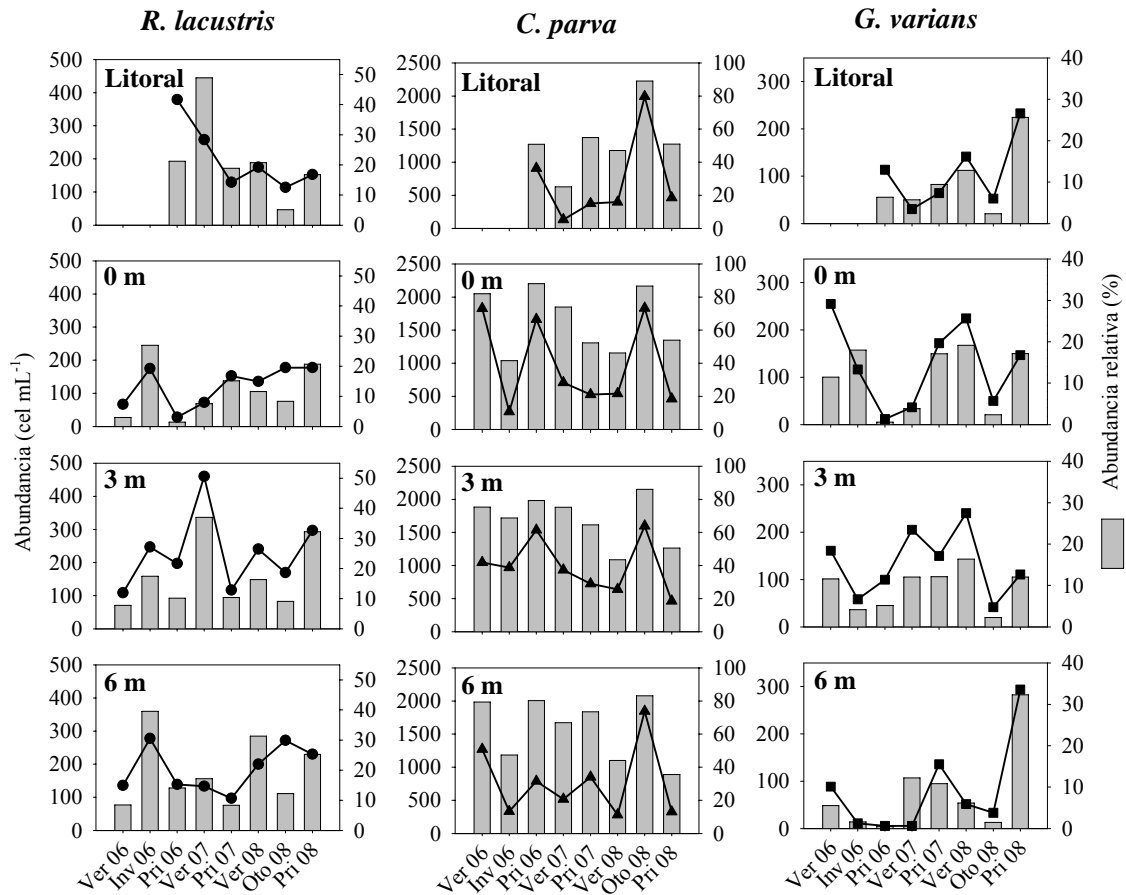


Figura 2.10. Abundancia absoluta y relativa de las especies fitoplanctónicas más abundantes en el Lago Escondido, en las diferentes profundidades y en la zona litoral, en el período estudiado.

#### ABUNDANCIA, PRODUCCIÓN Y ESTRUCTURA DE PROCARIOTAS HETERÓTROFOS

Los procariotas heterótrofos se vieron dominados por formas de cocos, bacilos cortos y bacilos en forma de C (Fig. 2.11). Se observó con mayor frecuencia a células menores a 1  $\mu\text{m}$  de largo equivalentes a 2.85 fg de C por célula. También se observó la presencia, en mucha menor frecuencia relativa de formas filamentosas (Fig. 2.11). En este caso, el largo promedio de los filamentos fue de 7.03  $\mu\text{m}$  y el contenido de C de estas formas se calculó en 1589.09 fg por célula.



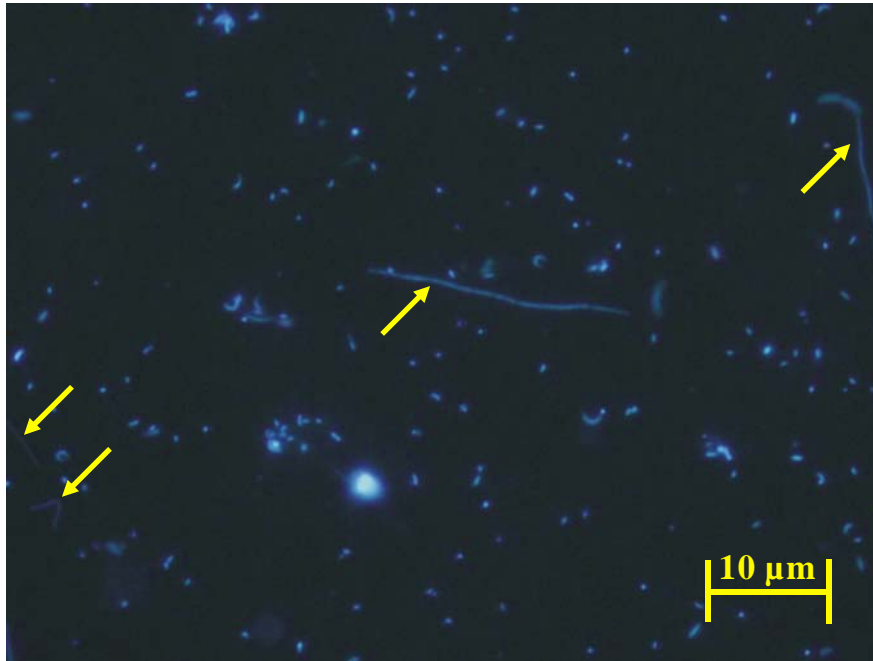


Figura 2.11. Bacterias teñidas con DAPI sobre filtros de policarbonato negro, bajo microscopio de epifluorescencia (Filtro UV). Las flechas señalan bacterias filamentosas.

La abundancia bacteriana varió entre un mínimo de  $1.5183 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> en la superficie en invierno de 2006 y el máximo de  $4.4724 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> en primavera de 2007. Los valores de abundancia a lo largo de la columna de agua y la zona litoral variaron a través del período de muestreo (Fig. 2.12).

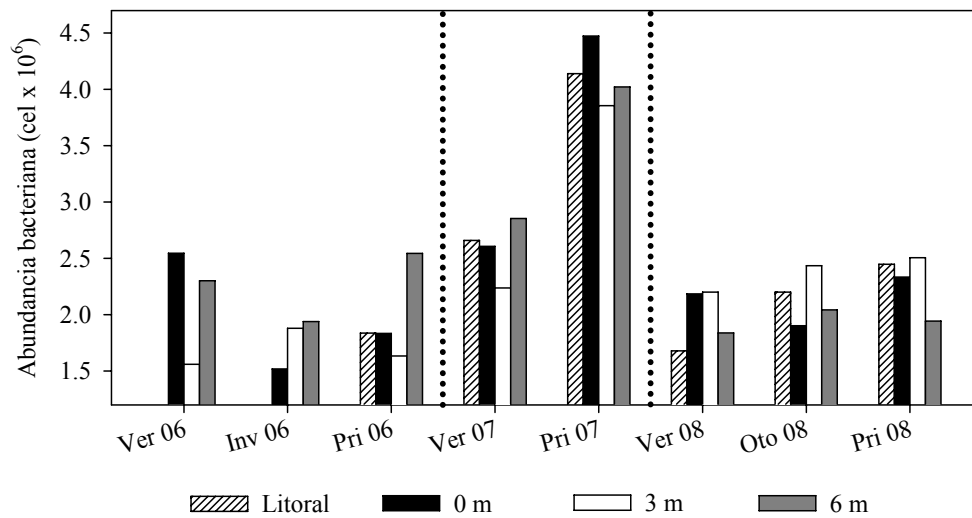


Figura 2.12. Abundancia bacteriana registrada en las zonas litoral y pelágica del Lago Escondido, durante el período muestreado.

La técnica de CARD-FISH permitió la visualización de una buena señal fluorescente de las células hibridadas con las diferentes sondas de oligonucleótidos utilizadas (Fig. 2.13). Se observó un porcentaje de hibridización mayor al 52 % para todas las muestras analizadas, excepto para una muestra del verano de 2007, donde se observó un porcentaje menor (Fig. 2.14). Durante todo el muestreo se registró una dominancia de los miembros del dominio *Bacteria* (EUB338) por sobre los del dominio *Archaea* (ARCH915).

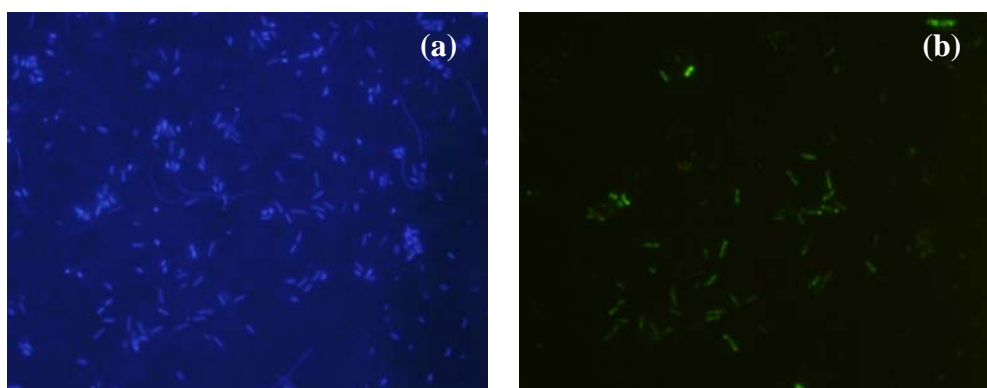


Figura 2.13. Bacterias identificadas con la técnica de CARD-FISH con la sonda BET42a para  *$\beta$ -Proteobacteria*, bajo microscopio de epifluorescencia: Filtro UV (a) y Filtro azul (b).



En verano de 2006 se observaron diferencias en la abundancia relativa del dominio *Bacteria* entre las diferentes profundidades (ANOVA de dos vías,  $P < 0.001$ ). A los 6 m se registró una mayor abundancia de *Bacteria* (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.001$ ), la cual se vio principalmente representada por un alto porcentaje de *Actinobacteria* (~ 28 %) y *Cytophaga-Flavobacterium* (~ 30.5 %). El grupo de  $\beta$ -*Proteobacteria* presentó su máxima abundancia en superficie (~ 38.6 %), mientras que  $\alpha$ -*Proteobacteria* presentó baja abundancia relativa, tanto en superficie (~ 3.2 %) como a los 6 m (5 %). En invierno también se observaron bajas abundancias relativas de  $\alpha$ -*Proteobacteria*, mientras que los demás grupos oscilaron en un rango de abundancia entre 7 y 23 % (Fig. 2.14). En este muestreo no se observaron diferencias significativas entre las diferentes profundidades muestreadas (ANOVA de dos vías, Factor “Profundidad”,  $P = 0.096$ ). Durante los muestreos de primavera de 2006 y verano de 2007, se observó una dominancia casi completa del dominio *Bacteria*, con porcentajes muy bajos del grupo de las *Archaea* (1.2 - 5 %). En ambos muestreos, el grupo bacteriano con mayor contribución relativa fue el de las  $\beta$ -*Proteobacteria*, seguido por las *Actinobacteria* y finalmente por *Cytophaga-Flavobacterium*, cuyas abundancias oscilaron entre el 1 y el 11 % (Fig. 2.14). En primavera, las  $\beta$ -*Proteobacteria* alcanzaron su máxima representatividad en el nivel superficial de la columna de agua, y en la zona litoral con valores ~ 46.5 %. Las *Actinobacteria* incrementaron su abundancia hacia el fondo (Fig. 2.14). Por su parte, *Cytophaga-Flavobacterium* no mostró diferencias significativas entre las zonas muestreadas (Test *a posteriori* de Tukey,  $P > 0.05$  en todos los casos). Durante verano de 2007, las  $\beta$ -*Proteobacteria* se vieron disminuidas hacia el fondo (Fig. 2.14). Por otro lado, *Actinobacteria* y *Cytophaga-Flavobacterium* mostraron sus máximas abundancias a los 3 m de profundidad (Fig. 2.14).

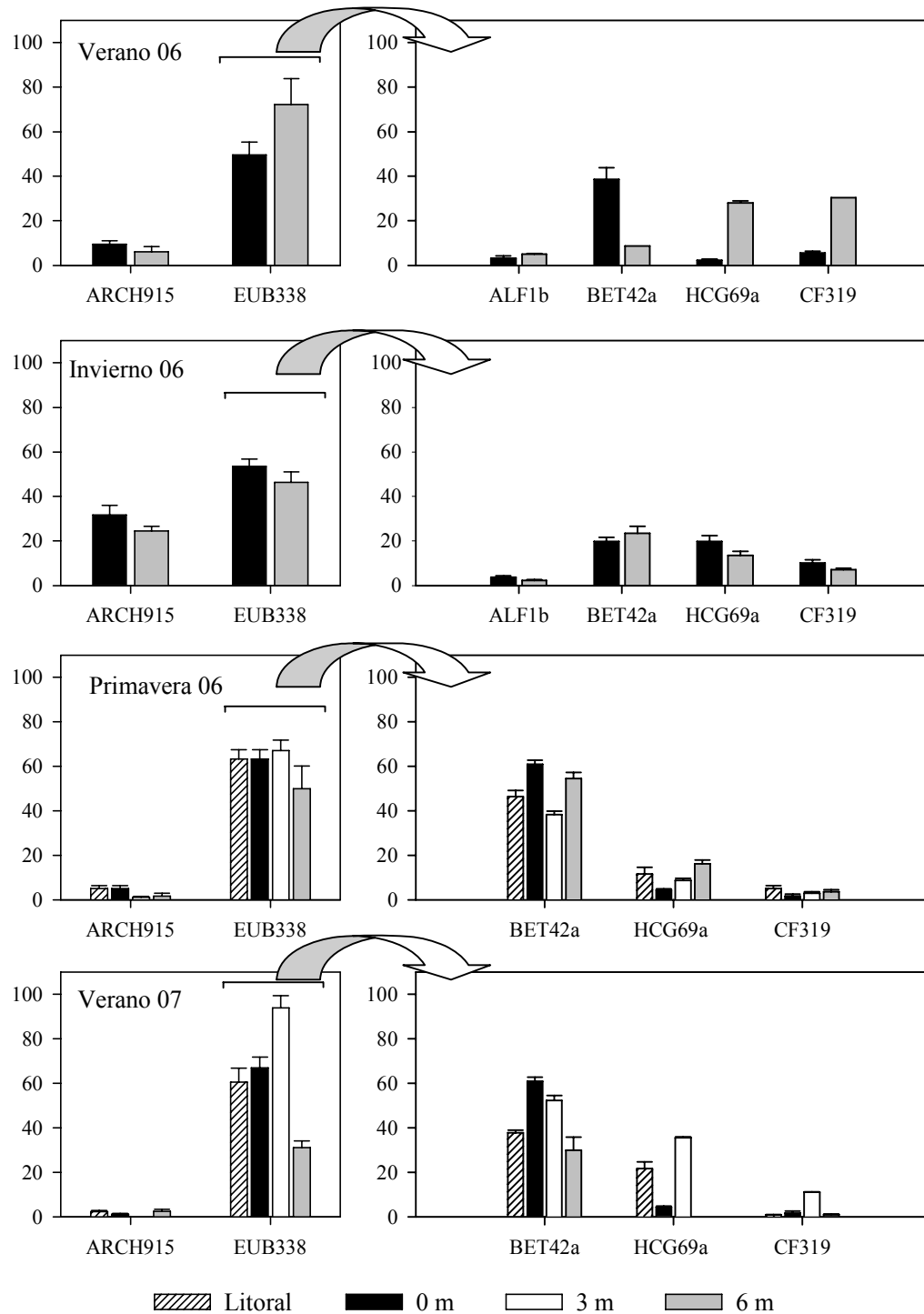


Figura 2.14. Abundancia relativa de los grupos bacterianos estudiados con la técnica de CARD-FISH en el Lago Escondido durante el período muestreado: Dominios *Archaea* (ARCH915) y *Bacteria* (EUB338), y dentro de este último  $\alpha$ -*Proteobacteria* (ALF1b),  $\beta$ -*Proteobacteria* (BET42a), *Actinobacteria* (HCG69a) y *Cytophaga-Flavobacterium* (CF319).



La producción bacteriana específica por célula fue mayor en verano de 2006 y 2007 (valores  $\sim 0.104 \text{ pmol } 10^{-6} \text{ cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y  $0.005 \text{ pmol } 10^{-6} \text{ cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente), mientras que las muestras tomadas en invierno mostraron los menores valores de producción ( $\sim 0.0013 \text{ pmol } 10^{-6} \text{ cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (Fig. 2.15). En ninguno de estos muestreos se observaron diferencias significativas entre las profundidades muestreadas (ANOVA de una vía, Verano 2006,  $P = 0.212$ ; Invierno 2006,  $P = 0.361$ ; Verano 2007,  $P = 0.173$ ).

Al comparar la producción bacteriana específica registrada en la zona litoral, se observaron diferencias significativas con respecto a la zona pelágica en el muestreo correspondiente a primavera (ANOVA de una vía,  $P = 0.001$ ; Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.001$  en todos los casos). Sin embargo, en verano de 2007 no se observaron diferencias significativas entre la zona litoral y la zona pelágica (ANOVA de una vía,  $P = 0.173$ ).

El experimento realizado con muestras de invierno, mostró un efecto significativo del aumento de la temperatura (de  $5^{\circ}\text{C}$  a  $18^{\circ}\text{C}$ ) en la producción bacteriana específica (ANOVA de doble vía, Factor “Temperatura”,  $P = 0.039$ ). Al aumentar  $13^{\circ}\text{C}$  la temperatura de incubación, con respecto a la temperatura del lago, se observó un aumento en la producción bacteriana en todos los niveles de profundidad (Fig. 2.15); se registró un incremento de  $\sim 0.002 \text{ pmol } 10^{-6} \text{ cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para las muestras del nivel superficial,  $\sim 0.005 \text{ pmol } 10^{-6} \text{ cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a los 3 m, y  $\sim 0.008 \text{ pmol } 10^{-6} \text{ cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a los 6 m.

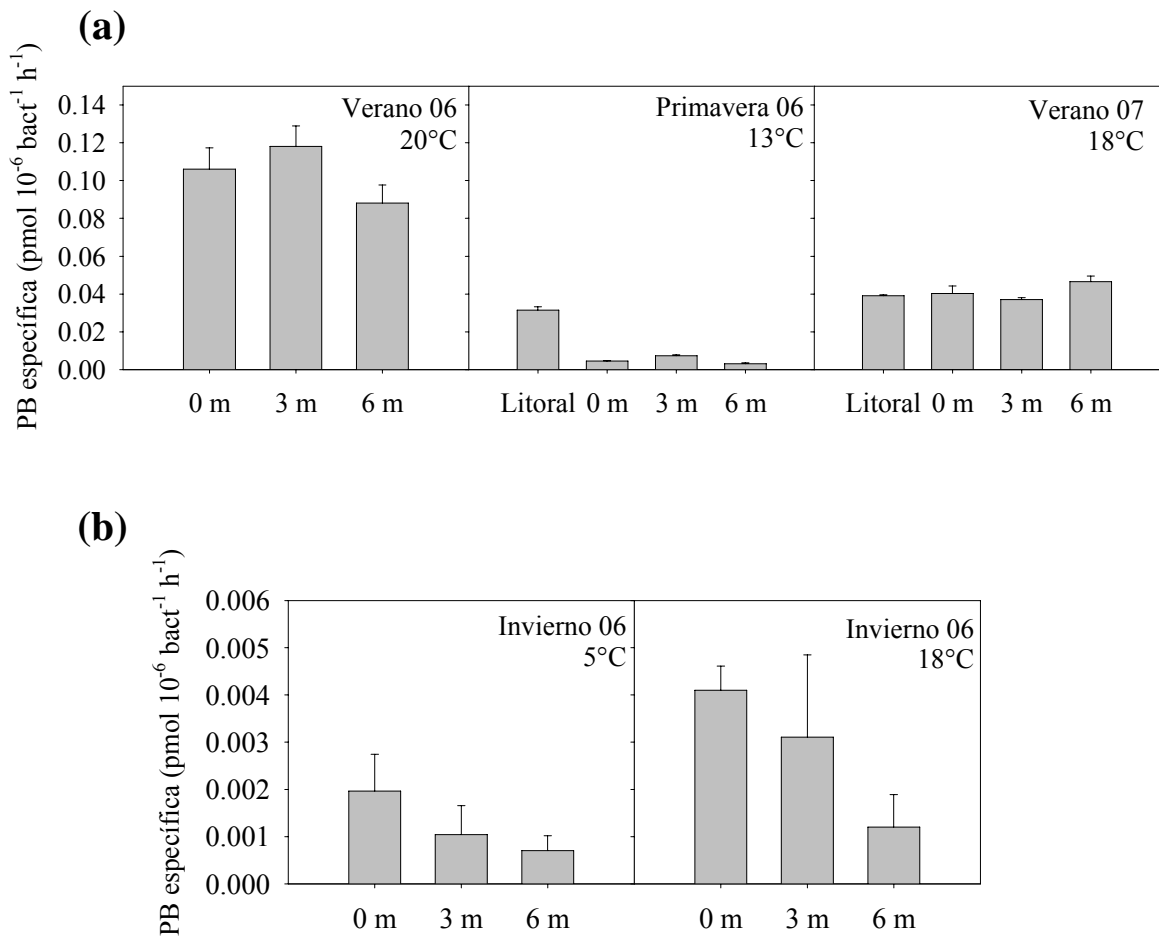


Figura 2.15. Producción bacteriana específica registrada: (a) durante un año en las zonas litoral y pelágica del Lago Escondido, y (b) en el experimento realizado en invierno con un incremento térmico. Se señala la temperatura de incubación en cada caso. Las barras corresponden al valor promedio  $\pm$  desviación standard. Notar variación en la escala entre las figuras.

## LOS DEPREDADORES

### *Nanoflagelados*

El análisis de los nanoflagelados bajo microscopio de epifluorescencia con filtros azul y UV permitió identificar a nanoflagelados mixótrofos (MixNF) y heterótrofos (HNF) (Fig. 2.16). Las especies mayormente representadas entre los MixNF (confirmando lo ya mencionado para el fitoplancton) fueron *Rhodomonas lacustris*, *Chrysochromulina parva*, durante todos los muestreos, y *Dinobryon divergens* en primavera de 2007 y verano de 2008.

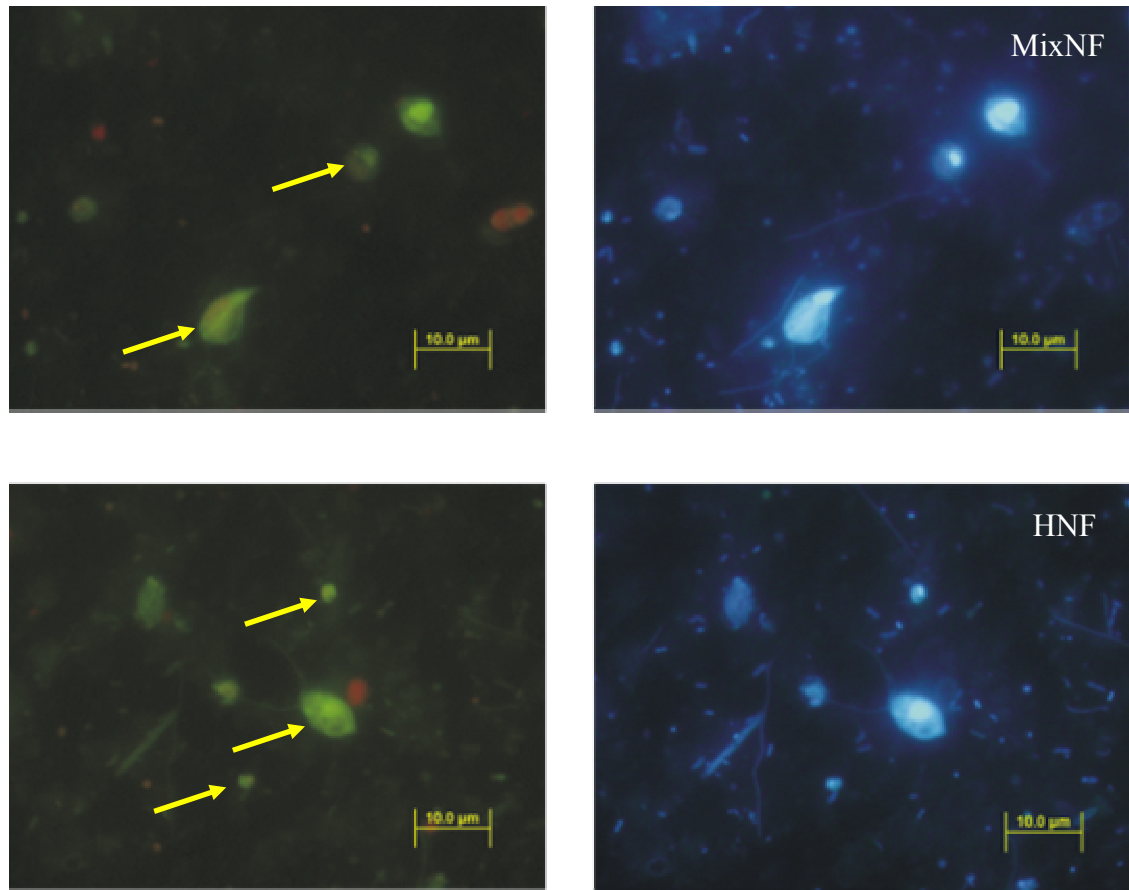


Figura 2.16. Fotografía de nanoflagelados no heterótrofos (MixNF) y heterótofos (HNF) sobre filtros de policarbonato negro teñidos con DAPI, bajo microscopio de epifluorescencia con filtro azul (izquierda) y UV (derecha). Las flechas señalan los MixNF *Rhodomonas lacustris* y *Chrysochromulina parva* y los HNF.

Las abundancias relativas de los dos grupos de nanoflagelados mostraron variaciones a lo largo del tiempo muestreado (Fig. 1.17). Durante la mayor parte del muestreo, los MixNF presentaron abundancias porcentuales superiores al 50 %, siendo el grupo dominante durante el período muestreado. Este grupo alcanzó picos de contribución en invierno y primavera de 2006, y en verano y otoño de 2008. Por otro lado, los HNF alcanzaron sus máximas abundancias en verano de 2006, y en primavera de 2008. También se pudieron observar diferencias en la relación entre MixNF y HNF entre las diferentes zonas del lago (Fig. 2.17). En primavera de 2007 y 2008, la abundancia relativa de los MixNF fue mayor superficie de la zona litoral que en la zona pelágica, mientras que se observó lo contrario en verano y otoño de 2008 (Fig. 2.17).

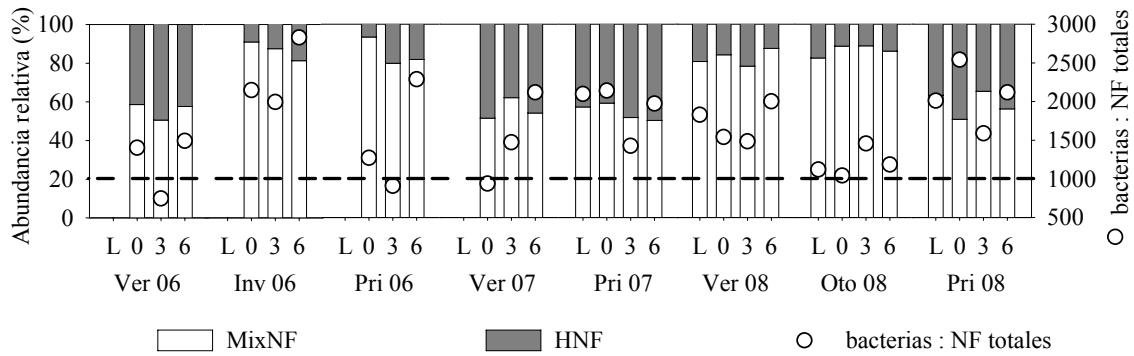


Figura 2.17. Abundancias relativas de nanoflagelados no heterótrofos (MixNF), heterótrofos (HNF), y relación entre abundancia bacteriana y nanoflagelados totales (Relación de Fenchel) en las diferentes zonas y profundidades muestreadas. Referencias: L: Litoral; 0: 0 m; 3: 3 m; 6: 6 m.

El número de células disponible para bacterivoría (Relación de Fenchel, bacterias heterótrofas: nanoflagelados totales), mostró valores altos a lo largo de casi todo el período muestreado (Fig. 2.17). Sólo se observó alta presión de bacterivoría (valores de la relación menores a 1000) a los 3 m en los muestreos realizados en verano y primavera de 2006, y en el nivel superficial en otoño de 2008 (Fig. 2.17).

### *Ciliados*

Los ciliados presentes en la zona pelágica y en la zona litoral fueron 13 especies distribuidas en cinco clases (Tabla 2.6).





Tabla 2.6. Lista de especies de ciliados.

---

**Phylum Ciliophora**

## Clase Gymnostomatea

*Paradileptus elephantinus* (Svec)*Pelagolacrimaria* sp*Actinobolina* sp

## Clase Peritrichia

*Vorticella* sp

## Clase Prostomatida

*Balanion planctonicum* (Foissner, Oleksiv & Müller) Foissner, Berger & Kohmann*Urotricha furcata* Schewiakov*Urotricha pelagica* Kahl

## Clase Oligotrichida

*Limnostrombidium viride* (Stein) Krainer*Pelagohateria viridis* (Fromental) Foissner, Skogstad & Pratt*Rimostrombidium lacustris* (Foissner, Skogstad & Pratt) Petz & Foissner*Rimostrombidium humile* (Penard) Petz & Foissner*Rimostrombidium* sp

## Clase Colpodea

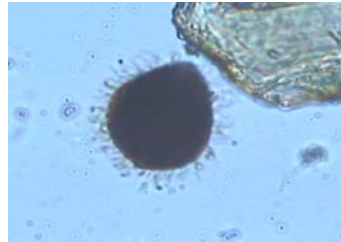
*Cyrtolophosis* sp

---

Alguna de las especies observadas fueron especies ocasionales (Fig. 2.18). Entre estas especies se encuentra *Paradileptus elephantinus*, que alcanzó una abundancia máxima de 133 ind L<sup>-1</sup> en la zona litoral en primavera. Por su parte, *Actinobolina* sp, fue observada sólo en la muestra superficial de verano de 2006, con una abundancia 48 ind L<sup>-1</sup>, *Vorticella* sp en primavera de 2006 en la zona litoral y *Cyrtolophosis* sp fue registrada solo en la zona litoral, alcanzando su máxima abundancia en primavera de 2006 (266 ind L<sup>-1</sup>).



*Paradileptus elephantinus*



*Actinobolina* sp



*Cyrtolophosis* sp

Figura 2.18. Especies ocasionales registradas en el Lago Escondido durante el período estudiado.

Las especies de las clases Prostomatida y Oligotrichida contribuyeron en más del 95 % a la abundancia total de ciliados durante todo el muestreo. Las mayores abundancias de estos grupos fueron registradas en verano y primavera de 2007 y 2008, mientras que las menores abundancias se observaron en primavera de 2006 (Fig. 2.19).

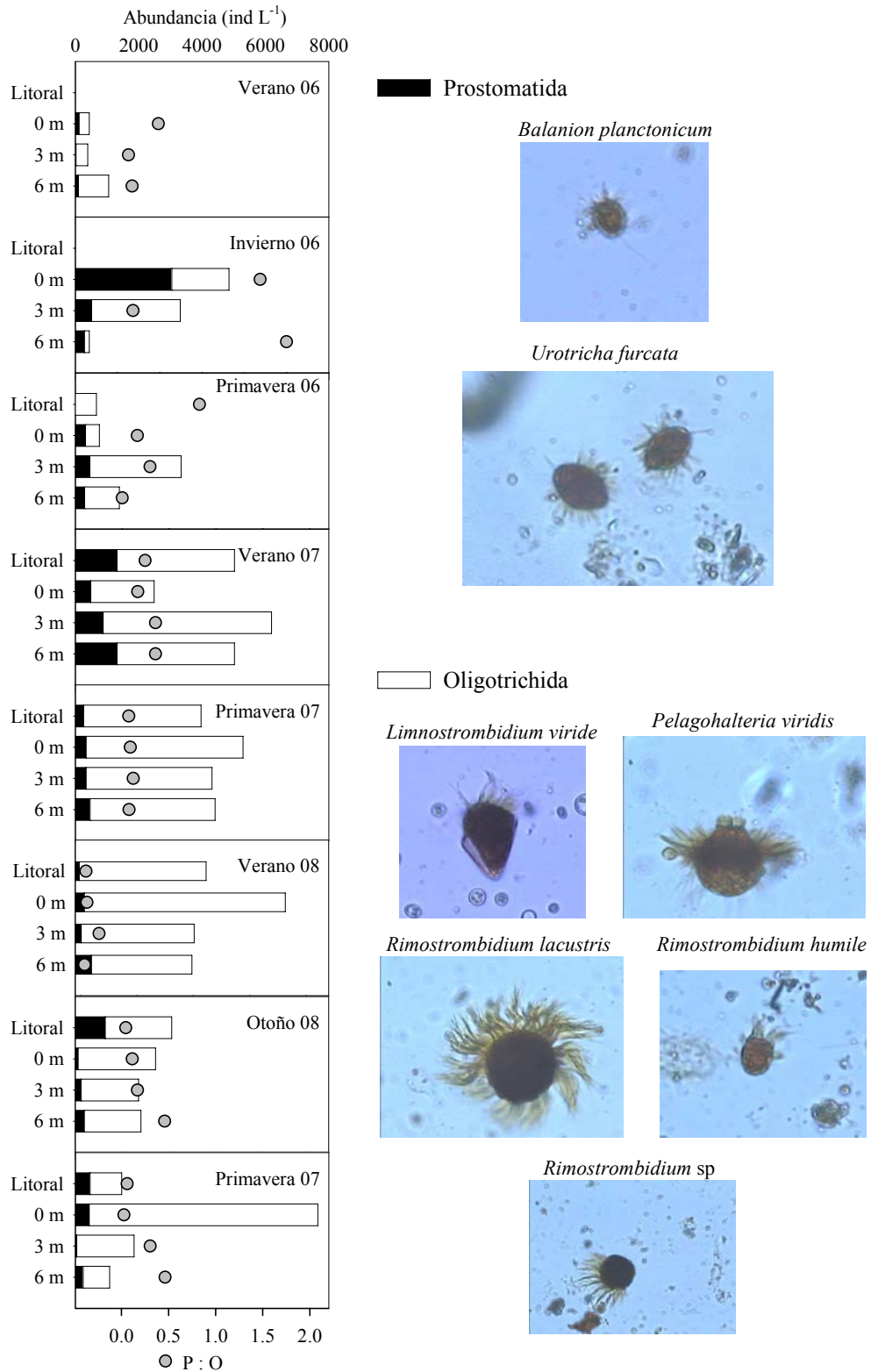


Figura 2.19. Abundancias de los ciliados de las clases Prostomatida (P) y Oligotrichida (O), P : O, y fotografía de las especies más abundantes de cada clase.



## RELACIÓN ENTRE VARIABLES ÓPTICAS, QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

El análisis de correlación evidenció una relación directa entre la abundancia bacteriana registrada durante el período de muestreo y el cociente  $a_{250}:a_{365}$ , indicando un aumento en la abundancia con el descenso del tamaño molecular promedio de la materia orgánica disuelta (Tabla 2.7). La abundancia de bacterias también se vio relacionada positivamente con la abundancia de nanoflagelados heterótrofos y los ciliados de la clase Prostomatida. Asimismo, se observó una relación negativa entre los MixNF y la concentración de carbono orgánico disuelto y el color del agua ( $a_{350}$ ) (Tabla 2.7). El incremento en el número de bacterias disponible para bacterivoría (Abundancia bacteriana: Abundancia de nanoflagelados totales) se vio relacionado con un incremento en la abundancia de ciliados Prostomatidos. Por su parte, los ciliados de la clase Oligotrichida incrementaron con la disminución en la concentración de COD y en el color del agua, y decrecieron al disminuir el tamaño de la MOD (Tabla 2.7).



Tabla 2.7. Tabla de correlación entre diferentes variables ópticas, químicas y biológicas. Para cada par de variables se presenta el valor del coeficiente de correlación (Pearson ( $r$ ), y Spearman ( $\rho$ ) en el caso particular de las correlaciones que incluyeron COD y  $a_{250}:a_{354}$ ), el valor de  $P$  y el número de observaciones.

	$a_{250}:a_{354}$	$a_{350}$	PDT	PT	NH <sub>4</sub>	Ab. Bact	Ab. Pico	Ab. MixNF	Ab. HNF	Relación de Fenchel	Ab. Prost.	Ab. Oligo.
COD	-0.802 <0.001 29	0.982 <0.001 29	0.273 0.160 28	-0.104 0.599 28	0.165 0.440 24	-0.271 0.147 30	-0.217 0.267 28	-0.401 0.034 28	0.025 0.900 28	0.105 0.595 28	-0.106 0.575 30	-0.600 <0.001 30
$a_{250}:a_{354}$		-0.772 <0.001 29	-0.242 0.212 28	0.136 0.487 28	0.037 0.860 24	0.403 0.030 29	0.246 0.205 28	0.389 0.041 28	0.271 0.161 28	-0.210 0.281 28	-0.093 0.628 29	0.503 0.006 29
$a_{350}$			0.425 0.024 28	-0.069 0.727 28	0.106 0.618 24	-0.139 0.467 29	-0.346 0.071 28	-0.439 0.019 28	0.157 0.423 28	0.163 0.403 28	-0.088 0.648 29	-0.496 0.006 29
PDT				0.534 0.003 28	0.031 0.887 24	0.281 0.148 28	-0.408 0.031 28	-0.357 0.062 28	0.159 0.418 28	0.454 0.015 28	0.207 0.291 28	0.154 0.434 28
PT					0.154 0.473 24	0.265 0.172 28	0.091 0.645 28	-0.137 0.487 28	-0.104 0.599 28	0.326 0.090 28	-0.077 0.696 28	0.256 0.189 28
NH <sub>4</sub>						-0.203 0.342 24	0.063 0.769 24	0.162 0.450 24	-0.123 0.569 24	-0.202 0.344 24	-0.443 0.030 24	-0.376 0.069 24
Ab. Bact							0.021 0.912 28	0.079 0.687 28	0.673 <0.001 28	0.297 0.125 28	0.376 0.040 30	0.314 0.091 30
Ab. Pico								0.204 0.298 28	-0.099 0.617 28	-0.077 0.695 28	-0.133 0.501 28	0.108 0.583 28
Ab. MixNF									0.143 0.466 28	-0.739 <0.001 28	-0.169 0.390 28	0.0243 0.902 28
Ab. HNF										-0.226 0.248 28	-0.169 0.391 28	-0.048 0.807 28
Relación de Fenchel											0.375 0.0494 28	0.129 0.513 28
Ab. Prost												0.469 0.021 30



## DISCUSIÓN

La variabilidad del color del agua, asociada al contenido de Materia Orgánica Disuelta (MOD) presente en los lagos, viene dada por procesos internos, y el resultado neto tiene importantes efectos en la transmisión de la luz a lo largo de la columna de agua (Morris et al. 1995; Findlay & Sinsabaugh 2003), en el proceso de fotosíntesis (Jones 1992), en el comportamiento e interacciones entre los organismos (Williamson 1995; Thingstad 2003) y en el ciclado del carbono (Wetzel 1990, 1992; de Haan 1992; del Giorgio & Peters 1994; Dillon & Molot 1997; del Giorgio & Duarte 2002; del Giorgio & Davis 2003). Estas observaciones sugieren la gran importancia que posee el estudio del balance entre la formación y degradación del color en los lagos (Reche et al. 1999). Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron variaciones en el color del agua del Lago Escondido, estimado a través del coeficiente  $a_{350}$ , a lo largo del período muestreado (Verano 2006 – Otoño de 2008). Se observó una disminución en el color del agua desde verano de 2006 hasta verano de 2008, con un posterior incremento del coeficiente  $a_{350}$  en los últimos dos muestreos. Esta variable se vio además correlacionada negativamente con la relación  $a_{250}:a_{365}$ , indicador del tamaño molecular promedio de la MOD. Estos resultados sugerirían que la calidad de la MOD presente en el lago varió a lo largo de los muestreos. La variación en las pendientes espectrales, calculadas para los espectros de absorbancia de la MOD, también apoya esta idea. Debido a que la fotodegradación de la MOD es uno de los procesos que regulan el color de los lagos (Reche et al. 2000), sería esperable que los cambios en el Lago Escondido se vieran asociados a variaciones en la incidencia de la radiación solar a lo largo del año. En tal sentido, si se analizan todas las muestras en conjunto, no se observó un patrón estacional marcado tal como era esperado. Sin embargo, se observó un aumento del color en muestras de otoño y primavera 2008 que podrían ser causados por otros factores como el incremento de precipitaciones y de la escorrentía, la acción de lixiviados de macrófitas, etc.

En un estudio comparativo de la fotodegradación en veinte lagos con condiciones químicas y tróficas diferentes, se concluyó que entre el 27 y el 140 % del color del agua puede perderse durante el verano, mientras que el color permanece relativamente constante durante primavera (Reche et al. 1999). Los perfiles lumínicos realizados para el Lago Escondido revelaron que en el primer metro de profundidad se absorbe en promedio el 99



% de la radiación ultravioleta recibida en superficie. Debido a que la fracción UV del espectro lumínico es la principal causante de la fotodegradación de la MOD, y consiguiente pérdida de color, es probable que en el Lago Escondido se pierda gran parte del color del agua en verano. Sin embargo, es difícil probar esta idea a partir de los datos de estos muestreos estacionales ya que son necesarios muestreos más frecuentes para verificar la posible existencia de variaciones en intervalos más cortos de tiempo. Si bien, no se pudieron verificar variaciones estacionales marcadas en el color del agua, lo cual nos lleva a rechazar la primera hipótesis planteada, se observó una disminución a lo largo del muestreo (2006-2008). Una fuente importante de MOD en los lagos someros son los lixiviados de macrófitas provenientes de la zona litoral (Wetzel 2001). En el Lago Escondido como en otros lagos del área, las macrófitas sumergidas presentes en la zona litoral, aportarían gran cantidad de la MOD coloreada presente habitualmente en el lago (ver capítulos III y IV de esta tesis). La constancia en el color registrada en diferentes lagos por Reche et al. (1999), se debe a que la pérdida de color debe ser balanceada por nuevos ingresos de MOD y a su vez por ingresos hídricos propios de cada sistema. En tal sentido, este balance en el Lago Escondido estaría dado por un lado por la senescencia de las plantas y el posterior ingreso de sus lixiviados. Por otro lado, las precipitaciones de lluvia y nieve en la zona, ocasionan una dilución del agua del lago o ingreso de materia orgánica de la cuenca de drenaje. Todos estos procesos pudieron variar en el período estudiado y el resultado sería la variación en el color observada. Lógicamente se debería contar con estudios de largo tiempo para verificar la existencia de ciclos en la tendencia observada de disminución del color de la MOD.

Los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades ópticas sugirieron variaciones en la calidad de MOD del Lago Escondido debido a cambios en su tamaño molecular. Por otra parte, se observaron cambios en la abundancia bacteriana a lo largo de los muestreos que se relacionaron de manera directa con el tamaño molecular de la MOD. Estas evidencias nos permiten aceptar la segunda hipótesis planteada. La dinámica de la MOD influye sobre la abundancia de los microorganismos responsables de llevar adelante procesos relativos a la transferencia de energía y materia a través de los niveles tróficos (Foreman & Covert 2003). La idea de que las bacterias heterotróficas son un nexo en el flujo de energía y materia, se ha incluido de manera relativamente reciente a la teoría de ecosistémica, y constituye “el bucle microbiano” (Azam et al. 1983). Cambios en la cantidad y calidad de MOD pueden afectar varios aspectos del metabolismo bacteriano,



incluyendo su tasa de crecimiento y producción de biomasa (Findlay 2003), como así también afectar la composición del ensamble bacteriano (Foreman & Covert 2003).

La correlación positiva entre la abundancia bacteriana y el cociente  $a_{250}:a_{365}$ , indicaría que las bacterias se vieron favorecidas cuando los compuestos dominantes de la MOD presente en el lago eran moléculas de bajo peso. Esta observación hace incluir a la dinámica del bacterioplancton del Lago Escondido en el modelo aceptado de biodisponibilidad de MOD, el cual postula que el grado de refractancia para las bacterias se encuentra positivamente correlacionado con el tamaño de las moléculas orgánicas (Saunders 1976). A pesar de que las sustancias húmicas de alto peso molecular son en general sustratos pobres para la utilización microbiana (Drakare et al. 2002), el 15 % de ellas se encuentra disponible para el crecimiento bacteriano (Tranvik 1989; Moran & Hodson 1990) y numerosos estudios han registrado una fuerte correlación positiva entre la biomasa bacteriana y el contenido húmico de los lagos (p. ej. Hessen 1985; Tranvik 1988; Arvola & Kankaala 1989; Jones 1990; Bergström & Jansson 2000). En el lago Escondido, la abundancia bacteriana osciló a lo largo de todo el muestreo, entre  $1.5$  y  $4.5 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y estos valores de abundancia son similares a los observados para lagos húmicos en Suecia (p. ej. Bergström & Jansson 2000; Jansson et al. 2000; Drakare et al. 2002).

La variación estacional de la producción bacteriana (PB) ha sido bien explicada por un modelo que incluye las variables: (1) temperatura, (2) irradiación lumínica diaria, y (3) concentración de COD (Bergström & Jansson 2000). Estas dependencias se basan en que la temperatura y el sustrato son determinantes del crecimiento bacteriano en los sistemas acuáticos (White et al. 1991), y en que la degradación lumínica de los compuestos húmicos es importante, por modificaciones de la materia orgánica a formas rápidamente utilizables (Lindell et al. 1995; Wetzel et al. 1995; Bertilsson & Tranvik 1998; Tranvik & Bertilsson 2001). La producción bacteriana en el Lago Escondido, mostró una dependencia de la temperatura de incubación. Los menores valores se registraron en invierno (valores de PB  $\sim 0.0022$  pmol  $10^{-6}$  bact<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), mientras que los mayores valores de producción fueron registrados en verano de 2006 y 2007, con valores 2 y 1 orden de magnitud mayores que en invierno, respectivamente. En el experimento realizado en invierno, se aumentó la temperatura de incubación a la temperatura de primavera-verano, y se observó un notable aumento en la producción con el incremento térmico. Sin embargo, cabe mencionar que los valores de PB obtenidos luego de incrementar la temperatura no alcanzan la magnitud de los registrados en las incubaciones de verano. Esto podría sugerir, por un lado, que las bacterias se encuentran aclimatadas a las bajas temperaturas y que reaccionan más lentamente





al incremento térmico experimental. Por otra parte, también podría sugerirse que el ensamble bacteriano presente en el invierno es diferente al presente en verano, variación posiblemente asociada a la calidad de MOD en ese momento, por lo cual no pueden alcanzar altos valores de producción, a pesar del incremento térmico. En relación con esta consideración, cabe destacar que la muestra perteneciente a los 6 m fue la que presentó el menor incremento de producción en este experimento, en comparación con el nivel superficial y los 3 m de profundidad. Considerando que los niveles profundos presentan MOD más refractaria (Reche et al. 1999) posiblemente, el conjunto bacteriano presente en esa zona se encuentren adaptado a esa condición y, por lo tanto, un aumento térmico no genere un incremento en la PB, debido a la dificultad de las bacterias en degradar la MOD de la cual disponen.

Considerando los estudios realizados comparando la zona litoral y la pelágica, se observaron diferencias en la producción bacteriana en primavera del año 2006. En la primavera, la producción registrada en la zona litoral fue aproximadamente seis veces mayor que la observada en cualquiera de los niveles muestreados en la zona pelágica. Esto podría asociarse al hecho que en este período la zona litoral presentó una MOD de menor tamaño molecular promedio: en la zona litoral la relación  $a_{250}:a_{365}$  fue de 4.55, mientras que en la zona pelágica en promedio fue de 4.41. Por otra parte, en el verano del 2007 no se observaron diferencias entre la zona litoral y pelágica: la relación  $a_{250}:a_{365}$  y la producción mostraron valores muy similares ( $a_{250}:a_{365} = 4.59$  y  $PB = 0.038 \text{ pmol } 10^{-6} \text{ bact}^{-1}\text{h}^{-1}$  y  $0.033 \text{ pmol } 10^{-6} \text{ bact}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Como ya se ha mencionado, cambios en la calidad de MOD pueden afectar varios aspectos del metabolismo bacteriano, entre los que se incluye la producción bacteriana (Findlay 2003). La comunidad microbiana puede responder a un suministro variable de sustratos tanto a través de una adaptación fisiológica como a través de cambios en la composición comunitaria (Arrieta & Herndl 2002; Eiler et al. 2003; Kirchman et al. 2004). Incluso pequeñas adiciones de sustratos orgánicos pueden generar cambios en la composición del ensamble microbiano y un consecuente cambio en la abundancia relativa de enzimas extracelulares específicas (Pinhassi et al. 1999). Los resultados obtenidos en estos muestreos comparando la zona litoral y pelágica del Lago Escondido, podrían sugerir que efectivamente las macrófitas aportan con MOD fotodegradable (MOD de mayor peso molecular) en la zona litoral durante la primavera que contribuye a un incremento en la producción, y que ese efecto disminuye hacia el verano.

En el Lago Escondido, los procariontes dominantes a lo largo del ciclo anual estudiado fueron *Bacteria*, exhibiendo las *Archaea* mayores abundancias relativas en verano e



invierno de 2006. Esto podría relacionarse con la presencia de MOD más refractaria (agua con mayor color) en estos muestreos, ya que este grupo puede aprovechar MOD refractaria (Tamburini et al. 2009). Dentro del dominio *Bacteria*, el grupo dominante a lo largo del muestreo fue el de las  $\beta$ - *Proteobacteria*. La importancia de este grupo bacteriano en el agua dulce es una observación muy común (Glockner et al. 1999). En el Lago Escondido, la mayor contribución de este grupo ocurrió en los muestreos de primavera de 2006 y verano de 2007 cuando se observó menor color del agua (menor refractancia). En tal sentido, Pérez & Sommaruga (2006) observaron un incremento en la proporción de  $\beta$ - *Proteobacteria* en un tratamiento experimental rico en exudados algales (MOD de bajo peso molecular). Por lo tanto, los bajos pesos moleculares favorecerían a estos rápidos incrementos del grupo  $\beta$ -*Proteobacteria* con elevadas tasas de crecimiento (Pérez & Sommaruga 2006; Burkert et al. 2003). Si bien los miembros de la clase *Actinobacteria* se consideran componentes importantes del bacterioplancton de agua dulce (Glockner et al. 2000; Hahn et al. 2003; Warnecke et al. 2004), parecen ser fácilmente desplazados competitivamente por otros grupos de rápido crecimiento como miembros del grupo  $\beta$ - *Proteobacteria*. De la misma manera, *Cytophaga-Flavobacterium* son miembros habituales tanto en el agua dulce como en ambientes marinos (Kirchman 2002), y también se ven desplazados por  $\beta$ -*Proteobacteria*, debido a su menor tasa de crecimiento (Simek et al. 2001). Este grupo tampoco se vio favorecido por la adición de lisado algal, presumiblemente rico en moléculas lábiles de proteínas y polisacáridos (Pérez & Sommaruga 2006). Todos estos resultados concuerdan con lo observado en el Lago Escondido, ya que la dominancia de  $\beta$ -*Proteobacteria* se vio acompañada por una disminución en la abundancia relativa de *Actinobacteria* y *Cytophaga-Flavobacterium*. Estos dos grupos mostraron mayores abundancias relativas en los muestreos de verano e invierno de 2006 (con MOD más refractaria), debido probablemente a su mayor éxito en el uso de MOD menos lábil.

Por último, y atendiendo a toda la cadena microbiana del lago puede señalarse que la estimulación de la productividad del bacterioplancton, generada por altos contenidos de MOD, puede influir fuertemente en la cadena microbiana pelágica por dos mecanismos alternativos (Jones 1992). Esta influencia se hace efectiva: (1) a través de la fagotrofia, proveyendo de una base para el sustento energético y nutricional de los consumidores y (2) deprimiendo la producción primaria a través de la competencia por el incremento de la demanda de nutrientes limitantes (Jones 1992). La fagotrofia en el Lago Escondido parecería encontrarse dominada por nanoflagelados mixótrofos durante todo el período



muestreado. Las especies pertenecientes a clases típicamente mixótrofas, tales como Haptophyceae, Cryptophyceae y Dinophyceae, constituyeron más del 90 % de la abundancia y del biovolumen fitoplanctónico total en cada uno de los muestreos en la zona pelágica. La capacidad fagotrófica de estos organismos les permite ingerir bacterias incorporando carbono y nutrientes, así esta estrategia les permite ser exitosos en ambientes limitados por nutrientes y luz, desplazando competitivamente a los autótrofos obligados (Jones 1997, 2000). El fitoplancton de los lagos andinos se encuentra limitado por nutrientes (Díaz & Pedrozo 1996) y, por lo tanto, la mayor capacidad del bacterioplancton para aprovechar concentraciones bajas de P (Gurung et al. 1999), dejaría muy poco margen de nutrientes disponible para el fitoplancton. En un lago de alto contenido de MOD como el Lago Escondido y con elevada abundancia bacteriana, los organismos mixótrofos se ven claramente beneficiados, con respecto al fitoplancton estrictamente autótrofo.

Por último, considerando el número de células procariotas disponibles para los depredadores (nanoflagelados fundamentalmente) durante este estudio se observó baja presión de depredación. Sin embargo, esta situación varió en determinados momentos (verano y primavera del 2006) y en niveles intermedios (3 m) de la columna de agua. Este resultado sugeriría la existencia de variaciones en el balance fotosíntesis: ingesta de partículas que serán tratados en el Capítulo V de esta tesis.



## CAPÍTULO III

### EFECTO DE LA RADIACIÓN UV SOBRE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA DE AGUA DE LAGOS SOMEROS Y LIXIVIADOS DE MACRÓFITAS



#### INTRODUCCIÓN

La materia orgánica disuelta representa uno de los componentes más importantes en la absorción de la radiación solar en los ecosistemas acuáticos, principalmente en la región ultravioleta del espectro lumínico (290 a 400 nm) (Morris et al. 1995; Schindler & Curtis 1997; Osburn et al. 2001). Esta absorción de energía puede resultar en una variedad de procesos fotoquímicos entre los que se incluye la fotodegradación de la MOD, asociada generalmente a la disminución de su peso molecular promedio (Lindell et al. 1995; Graneli et al. 1996; Miller & Moran 1997; Bertilsson & Tranvik 1998; Farjalla et al. 2001). La fotodegradación es la pérdida de color de la MOD causada directamente por la absorción de la radiación solar, como así también por el efecto indirecto de compuestos oxidantes (p. ej.  $H_2O_2$ , radicales libres, etc.) (Reche et al. 1999). De esta manera, la radiación solar tiene la capacidad de alterar las propiedades espectrales y moleculares de la MOD, promoviendo su degradación (Bertilsson & Tranvik 2000). El incremento de los niveles de RUV registrado en la superficie de la Tierra en la última década, debido a la depresión estratosférica de la capa de ozono, ha generado particular interés en estas reacciones (Reche et al. 1999).

Se han llevado a cabo estudios de la degradación fotoquímica de la MOD en una amplia variedad de sistemas acuáticos entre los que se incluyen océano abierto (Mopper et al. 1991) y humedales productivos (Wetzel et al. 1995), pero poco se conoce acerca de



patrones en la variabilidad de la fotodegradación entre los sistemas. Dicha variabilidad podría depender tanto de la composición química de la materia orgánica como de las características tróficas y químicas del agua en la cual la degradación se lleva a cabo (Reche et al. 1999). La composición química de la MOD, su edad, origen e historia de fotodegradación previa son factores de importancia en el análisis de las variaciones fotoquímicas. Asimismo, la naturaleza de las cuencas y el tipo de suelo son los principales determinantes de la cantidad y calidad de MOD liberada, procesada y transportada a los cuerpos de agua. Tanto la heterogeneidad química de la MOD presente en cada lago, así como la diversidad de las fuentes de carbono que ingresan al cuerpo de agua, torna difícil la identificación de patrones claros y definitivos en el estudio del efecto de las radiaciones en los ambientes. Por ello, Anesio et al. (2000) indica que resulta interesante evaluar el efecto de la radiación solar en fuentes individuales determinadas de MOD (por ejemplo: agua de un lago particular, lixiviados de suelos, macrófitas, etc.).

En sistemas de agua dulce hay una mayor concentración de MOD, en relación con ambientes marinos, y esto es el resultado de una mayor producción primaria, asociada a menudo a la presencia de macrófitas (Wetzel 2001, Osborne et al. 2007). La MOD de estas plantas acuáticas se libera en compuestos producidos en el proceso de fotosíntesis o a través del envejecimiento y descomposición de sus tejidos y subsiguiente lixiviado del material vegetal (Bertilsson & Jones 2003). En relación con esto, se ha demostrado un incremento en la degradación de macrófitas, causada por las radiaciones solares, particularmente por las RUV (Denward & Tranvik 1998, Anesio et al. 1999), lo cual podría generar un aumento en la producción de lixiviados. A pesar de que los lixiviados de macrófitas son una importante fuente de MOD en muchos cuerpos de agua dulce (Wetzel 1992) y existe un incremento de las investigaciones relacionadas con el efecto de las RUV en las transformaciones de la MOD, existen pocos estudios particulares sobre lixiviados de macrófitas. Las investigaciones realizadas al respecto se encuentran enmarcadas en el análisis de la respuesta bacteriana a transformaciones fotoquímicas de lixiviados de *Juncus effusus* y *Typha latifolia* (Wetzel et al. 1995), *Phragmites australis* (Anesio et al. 1999, 2000; Farjalla et al. 2001), *Hydrocharis morsus-ranae* (Farjalla et al. 2001, Anesio et al. 2000) y *Myriophyllum spicatum* (Anesio et al. 2000).

Los lixiviados de macrófitas contribuyen de manera significativa al contenido de MOD, la cual constituye la base de la producción heterotrófica y juega un rol clave en la transferencia de energía en las cadenas tróficas acuáticas (Moran & Hodson 1990; Tranvik



1992). Por otra parte, también se ha señalado su importancia como fuente y sumidero de nutrientes esenciales tales como el nitrógeno y el fósforo (Lewis 2002; Qualls & Richardson, 2003). De esta manera, las características químicas del conjunto de MOD pueden controlar la disponibilidad y labilidad de nutrientes, metales y sustancias tóxicas, en los ecosistemas acuáticos, como así también afectar la química del agua (McKnight et al. 1985; Strober et al. 1995). La mayor parte de la MOD presente en los ambientes acuáticos se encuentra constituida por sustancias húmicas (ácidos fúlvicos y húmicos) (Maranger & Pullin 2003). Estos compuestos son los principales agentes quelantes de Fe y de P (en forma de  $\text{PO}_4^{-3}$ ) en los ecosistemas de agua dulce. Dado que la formación del complejo MOD-Fe-P probablemente no se encuentra disponible directamente para los organismos, existen varios mecanismos conocidos a través de los cuales el Fe y el  $\text{PO}_4^{-3}$  se transforman en biodisponibles (Maranger & Pullin 2003). Dos de los mecanismos son procesos fisico-químicos: (1) fotorreducción mediada por la acción de radiaciones UV, y (2) reducción química, o reducción “oscura”. Estos procesos involucran la reducción del Fe (III) asociado a la MOD, obteniéndose Fe iónico (II) o un complejo Fe(II)-MOD, el cual se considera débil y resulta en la liberación del Fe (II). Dado que el  $\text{PO}_4^{-3}$  se asocia preferentemente con el Fe (III), dichos procesos de transformación generan también la liberación del  $\text{PO}_4^{-3}$  asociado al Fe (Maranger & Pullin 2003). A pesar de que el efecto de las RUV y la oscuridad resultan muy importantes en la disponibilidad de  $\text{PO}_4^{-3}$  en los cuerpos de agua, son pocos los estudios realizados a respecto. Además, muy poca atención se ha dado a la contribución de nutrientes por parte de los lixiviados de macrófitas aunque las plantas acuáticas resulten dominantes en la contribución de MOD en muchos cuerpos de agua.

Como se señaló en el Capítulo I, los lagos someros andinos del norte de la Patagonia ( $41^\circ$  S) son ambientes con mayor contenido de carbono orgánico disuelto en comparación con los lagos profundos de la región (Morris et al. 1995), lo que implica una mayor concentración de materia orgánica disuelta coloreada (MODC) presente en estos lagos. El alto contenido de MODC puede verse asociado a la naturaleza del área de drenaje de los lagos, como así también a las macrófitas presentes en la zona litoral del lago (Wetzel 2001). Debido a que los lagos Escondido, Morenito y El Trébol, presentan una zona litoral con un importante desarrollo de macrófitas, los lixiviados de éstas podrían ser importantes fuentes de materia orgánica disuelta para los lagos, como así también de nutrientes, particularmente en los momentos de senescencia. Esto implicaría que variaciones en la



descomposición de las macrófitas podrían generar cambios en calidad y en la concentración de lixiviados y, en consecuencia, en la disponibilidad de materia orgánica disuelta de los ambientes. Debido a que la región nord-patagónica se encuentra bajo la influencia esporádica del agujero de ozono Antártico (Orce & Helbling 1997), resulta interesante el estudio del efecto de las RUV sobre las características ópticas de dicho lixiviado, como así también sobre su potencial como fuente de nutrientes, tal como el fósforo (P). Este efecto sobre los nutrientes es particularmente importante en ambientes oligotróficos o meso-oligotróficos como lo son los lagos someros de esta región, donde la limitación elemental es muy manifiesta.



## OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto de las radiaciones UV en las características ópticas de muestras de agua de diferentes lagos someros (Escondido, Morenito y El Trébol) y de lixiviados de sus macrófitas *Schoenoplectus californicus* y *Potamogeton linguatus*.
2. Analizar si existen diferencias en las características ópticas a lo largo de la columna de agua en cada lago en el período estudiado.
3. Determinar si las diferentes especies de macrófitas producen lixiviados con características ópticas diferenciales.
4. Determinar el efecto de diferentes calidades lumínicas en la disponibilidad de PRS (Fósforo Reactivo Soluble) a partir de la MOD de agua de lago y de lixiviados.

## HIPÓTESIS

1. La exposición a RUV genera cambios en el tamaño molecular promedio de la materia orgánica de lagos y de lixiviados de macrófitas.
2. La calidad lumínica influye de manera diferencial sobre la liberación de PRS de la MOD.
3. Las características ópticas del lixiviado resultante y su respuesta a diferentes calidades lumínicas se relaciona con la especie de macrófita utilizada.

## PREDICCIONES

1. El tamaño molecular promedio de la MOD se verá disminuida a lo largo del período de incubación en todos los lagos estudiados.
2. La RUV tendrá mayor efecto en la liberación de PRS en el Lago Escondido, cuya MOD presenta mayor peso molecular.
3. La macrófita sumergida *Potamogeton linguatus* producirá lixiviados con MOD de menor peso molecular que los producidos por la palustre *Schoenoplectus californicus*.





## MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de analizar el efecto de las radiaciones UV sobre la materia orgánica disuelta de diferente origen, se realizaron diferentes experimentos de exposición en el laboratorio. En una primera etapa, se analizaron variaciones en las características ópticas de las muestras, a través de escaneos espectrofotométricos y del cálculo de diferentes parámetros ópticos. En una segunda etapa, se estudió la liberación de P reactivo soluble transcurrido el tiempo de irradiación.

Considerando que los lagos de esta región reciben las mayores intensidades de radiación solar durante los meses de verano, los experimentos fueron realizados con muestras de agua de lago tomadas en verano. De esta manera, los ensayos analizarán el efecto de la RUV sobre el stock de MOD presente en el momento de mayor irradiancia.

A continuación se describen los diferentes procedimientos.

### CONDICIONES EXPERIMENTALES

#### *A. Procedimiento de lavado del material utilizado*

Previo al comienzo de cada experimento se acondicionó el material de vidrio y de plástico utilizado. Se procedió a lavar el material con ácido clorhídrico diluido (5-10 %) y luego enjuagado con agua MilliQ. Asimismo, el material de vidrio fue muflado a 450°C durante 1 hora o autoclavado durante 20 minutos a 1.5 atm.

Los filtros GF/F utilizados también fueron muflados a 450°C durante 1 hora. Con respecto a los filtros de 0.2  $\mu\text{m}$ , se analizó previamente su potencial contribución de materia orgánica comparando agua MilliQ filtrada y no filtrada a través de dichos filtros. No se observaron diferencias en los espectros de absorbancia, lo que nos permitió concluir que los filtros utilizados no contribuyeron con materia orgánica.

#### *B. Preparación de lixiviados*

Las hojas de macrófitas utilizadas para los experimentos de exposición de lixiviados fueron recolectadas en estado de senescencia. Fueron lavadas con agua destilada, secadas a temperatura ambiente y almacenadas hasta su utilización. La preparación del lixiviado se llevó a cabo 2 a 3 días previos a su utilización en los experimentos. En cada ocasión se



colocó 1 gramo de planta en 100 mL de agua MilliQ y se dejó en heladera durante 48 horas de acuerdo al protocolo de Anesio et al. (2000). Transcurridas las 48 h, se filtró la materia orgánica a través de filtro GF/F muflado (Osmonics). El lixiviado obtenido fue filtrado a través de filtros estériles de 0.2  $\mu\text{m}$  en material de vidrio previamente esterilizado. El filtrado fue diluido con agua Milli-Q hasta alcanzar una concentración de COD aproximada de 3  $\text{mg L}^{-1}$ .

### *C. Sistema de irradiación de muestras*

La exposición a Radiación UV en cada experimento fue realizada en un incubador con temperatura controlada (20°C). El volumen de muestra se distribuyó en tubos de cuarzo de 14 mL, los cuales fueron colocados horizontalmente en soportes a 30 cm de distancia de la fuente de luz, de acuerdo a Bertilsson & Tranvik (2000). La fuente de luz artificial utilizada consistió en dos tubos fluorescentes UVA-340 (Q-Panel Lab Products, Cleveland, OH, U.S.A.). El espectro de irradiancia de UV de estos tubos es cercano al espectro solar entre los 280 y 350 nm (Fig. 3.4) (Shick et al. 1992). Durante la exposición, las muestras recibieron 35  $\mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  en la banda de 340 nm. Esta irradiancia es equivalente a la recibida en la superficie de los lagos andinos en la estación de verano al mediodía.

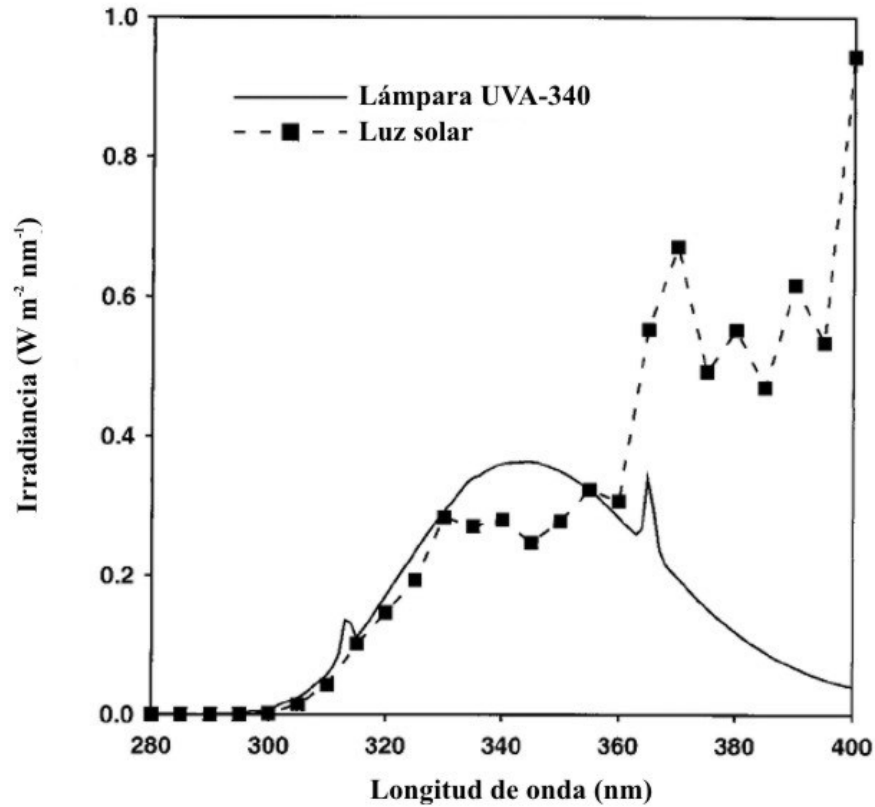


Figura 3.4. Perfiles de irradiancia de luz solar y lámpara UV-A 340 (Q-Panel).

Como fuente de RFA (Radiación Fotosintéticamente Activa) se utilizaron dos tubos fluorescentes de luz día. En los tratamientos expuestos a estas longitudes de onda, la fracción UV del espectro lumínico emitido por las lámparas UVA-340 Q-Panel fue evitada con un filtro de nylon que corta el espectro a los 400 nm (Fig. 3.5).

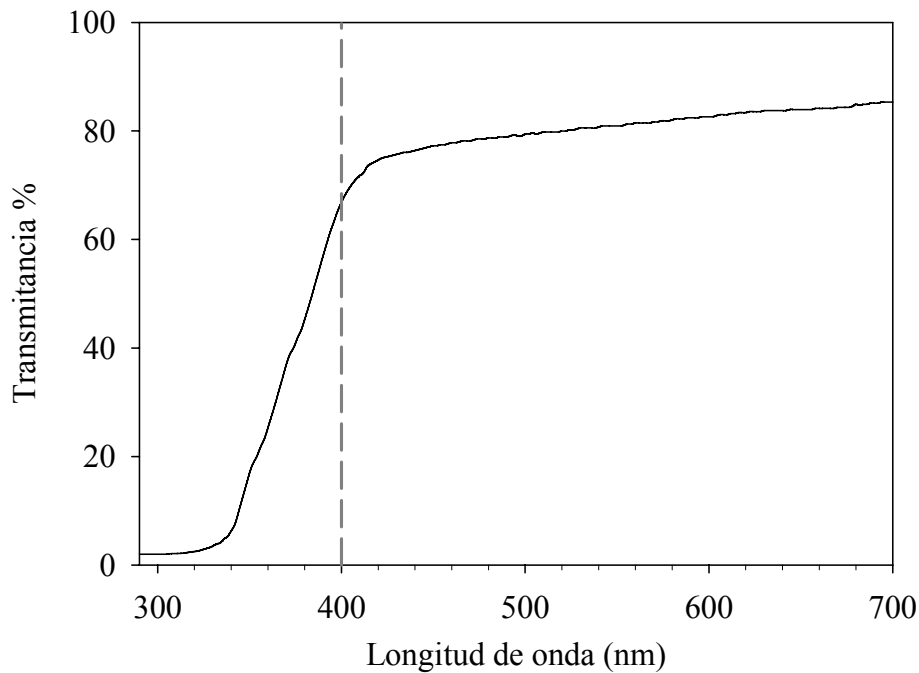


Figura 3.5. Perfil de transmitancia del nylon utilizado como filtro para la RUV en el tratamiento expuesto a Radiación Fotosintéticamente Activa

#### D. Parámetros espectrofotométricos

Se llevaron a cabo escaneos espectrofotométricos para cada muestra, en cada experimento, en cubetas de cuarzo de 10 cm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV2450 de doble haz con el objetivo de obtener las curvas de absorbancia de la Materia Orgánica Disuelta (MOD). Se estimó el tamaño relativo de la MOD a través del cociente  $a_{250}:a_{365}$  (Pérez & Sommaruga 2007). Esta relación fue utilizada para analizar cambios en el tamaño molecular dominante de la materia orgánica después de la exposición a radiación UV.

Se graficó el espectro de cada lago como  $\ln(a_d)$  vs Longitud de Onda y se determinó la pendiente espectral para la banda UV del espectro ( $S_{UV}$ ) a través de una regresión linear standard de los datos entre 290 nm y 400 nm (Green & Blough 1994). La pendiente es una medida de la tasa a la cual disminuye la absorptividad a lo largo de las longitudes de onda, siendo más acentuado el decrecimiento cuanto mayor es la pendiente (Miller 1998). Para el experimento de exposición de lixiviados de macrófitas se determinó la pendiente espectral correspondiente a las secciones lineales de la curva espectral, en las que se observó la mayor variación de absorbancia. Para el caso de *Potamogeton linguatus*, se calcularon las



pendientes en el rango 285 nm – 300 nm, mientras que para *Schoenoplectus californicus*, se utilizó la sección 270 nm – 300 nm del espectro.

#### *E. Determinación de P reactivo soluble (PRS)*

La determinación de Fósforo Reactivo Soluble se realizó utilizando la técnica de reducción con ácido ascórbico (APHA 1992), descripta previamente en el capítulo I.

### DESCRIPCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

*Experimentos 1 y 2. Análisis de variaciones en las características ópticas de agua de lago y lixiviados frente a RUV.*

#### *Experimento 1*

Este experimento consistió en la exposición a radiación UV de muestras de agua de diferentes profundidades de tres lagos someros situados en el parque Municipal de Bariloche. Los lagos estudiados fueron: Lago Escondido, Lago Morenito y Lago El Trébol.

Las muestras de agua de los lagos fueron tomadas en verano de 2006 (Enero), en días consecutivos. En cada ocasión, se realizó el perfil térmico de cada lago y se tomaron 5 L de muestra con una botella Van Dorn, colocados en bidones enjuagados con HCl y transportados inmediatamente al laboratorio en condiciones de oscuridad y de temperatura constante. En el Lago Escondido, se obtuvieron muestras en la superficie, a los 3 m y a los 6 m, mientras que en los lagos Morenito y El Trébol se muestreó en superficie, a los 4 m y a los 8 m de profundidad.

En el laboratorio, se procedió al filtrado de las muestras de agua a través de filtros GF/F muflados y luego, a través de filtros de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$ , obteniéndose un volumen aproximado de 150 mL. A continuación se realizó un escaneo espectrofotométrico, considerando este tiempo como el tiempo 0 (0 h). El volumen obtenido de cada muestra fue distribuido en 2 series de 3 tubos de cuarzo de 14 mL (réplicas), los cuales fueron tapados con tapones de silicona, sin dejar espacio de aire. Todos los tubos y tapones fueron previamente esterilizados como se indicó más arriba. Transcurridas las 5 horas de irradiación, se extrajo una serie de tres tubos, realizándose un escaneo espectrofotométrico. La serie de tubos restante fue procesada transcurridas las 10 horas de exposición (Fig. 3.1).



### *Experimento 2.*

Se realizó la exposición de lixiviados de las macrófitas *Potamogeton linguatus* y *Schoenoplectus californicus* provenientes de los lagos Escondido y El Trébol. Los lixiviados de las dos especies de macrófitas estudiadas fueron preparados como fuera explicado previamente con plantas recolectadas el mismo día de muestreo. Una vez finalizado el tiempo de lixiviación, se realizó el filtrado de cada lixiviado a través de filtros GF/F y de 0.2  $\mu\text{m}$ , obteniéndose un volumen aproximado de 150 mL. En este momento se realizó un escaneo espectrofotométrico, tomándose como tiempo 0 (0 h). El volumen obtenido de cada lixiviado fue distribuido en 3 series de 3 tubos de cuarzo. Transcurridas las 2 horas y media de irradiación se realizó un escaneo espectrofotométrico en los lixiviados de tres tubos de cuarzo. Se procedió de la misma manera transcurridas las 5 y las 10 horas con las dos series de 3 tubos restantes (Fig. 3.1).

*Experimentos 3 y 4. Análisis de liberación de P Reactivo Soluble (PRS) de agua de lago y lixiviados expuestos a diferentes calidades lumínicas.*

### *Experimento 3.*

En este experimento se analizó el efecto de diferentes condiciones lumínicas en la liberación de PRS de muestras de agua de lago del nivel superficial. Se tomaron muestras de los lagos Escondido, Morenito y El Trébol en días consecutivos del verano de 2007 (Enero) (Fig. 3.2). En el laboratorio, se realizó el filtrado de cada muestra de agua a través de filtros GF/F y de 0.2  $\mu\text{m}$ , obteniéndose un volumen aproximado de 150 mL. Este momento fue tomado como condición inicial o tiempo 0 (0 h), registrándose la concentración de PRS y realizándose un escaneo espectrofotométrico. El volumen obtenido de cada muestra fue distribuido en 12 tubos de cuarzo. Seis tubos fueron expuestos directamente a RUV (Tratamiento RUV) y la otra serie de seis tubos fue recubierta con papel de aluminio (Tratamiento OSC). Transcurridas 5 horas de irradiación se midió en tres tubos de los diferentes tratamientos la concentración de PRS resultante. A su vez se realizó un escaneo de la muestra de los 3 tubos restante (Fig. 3.2).

### *Experimento 4.*

En este experimento se estudió el efecto de diferentes condiciones lumínicas en la liberación de PRS de lixiviados de las macrófitas *P. linguatus* y *S. californicus*. Una vez finalizado el tiempo de lixiviación, se realizó el filtrado de cada lixiviado a través de filtros



GF/F y de 0.2  $\mu\text{m}$ , obteniéndose un volumen aproximado de 150 mL. En este momento se realizó un escaneo espectrofotométrico y se registró la concentración de PRS, tomándose como condición inicial o tiempo 0 (0 h). El volumen filtrado para cada lixiviado fue distribuido en 18 tubos de cuarzo. Seis tubos fueron expuestos a RUV y otra serie de seis tubos fue expuesto a Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA), utilizando un filtro de nylon (ver perfil de transmitancia en Sección C). Los seis tubos restantes fueron recubiertos con papel de aluminio y constituyeron el tratamiento oscuridad (OSC) (Fig. 3.3). Transcurridas las 5 horas de exposición lumínica se midió en tres tubos de los diferentes tratamientos la concentración de PRS resultante. A su vez se realizó un escaneo de la muestra de los 3 tubos restante (Fig. 3.2).

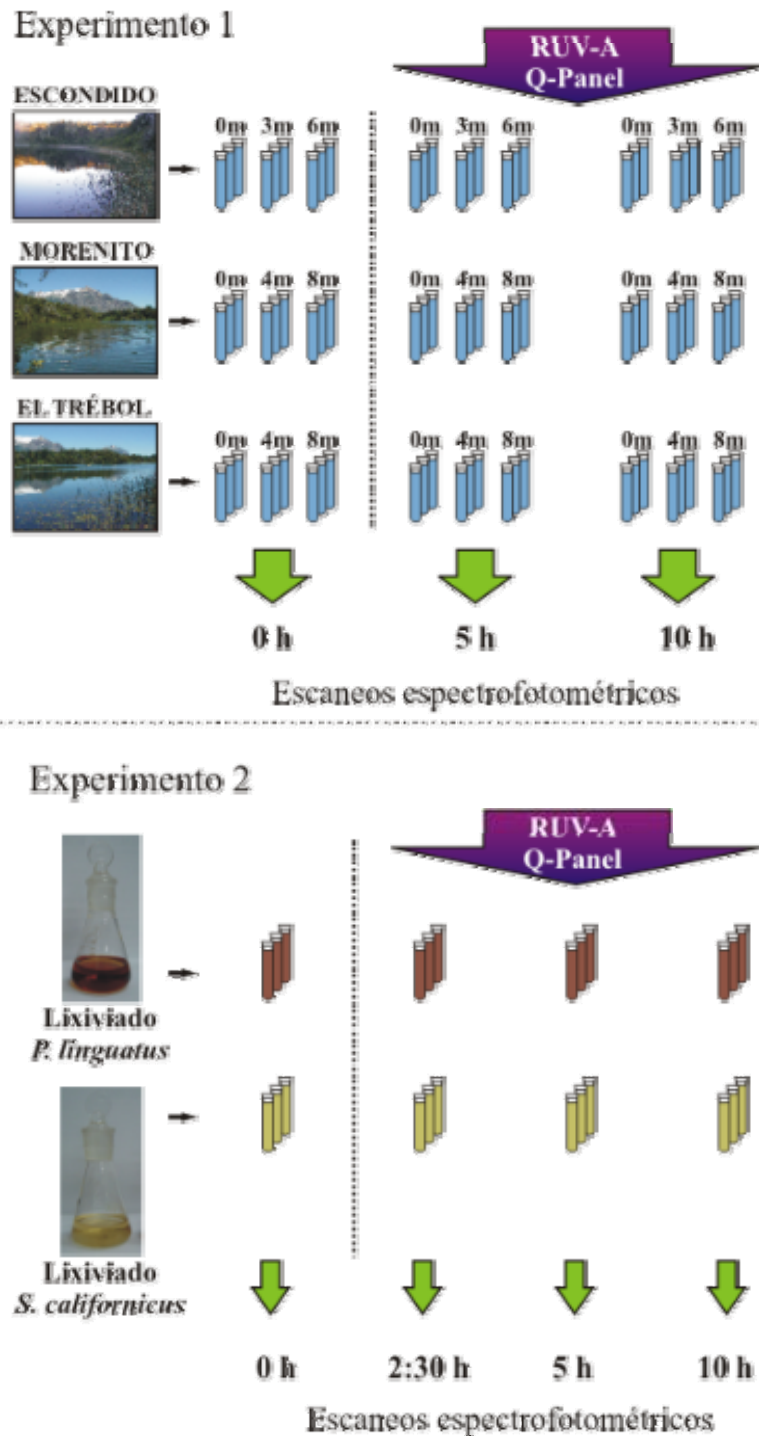
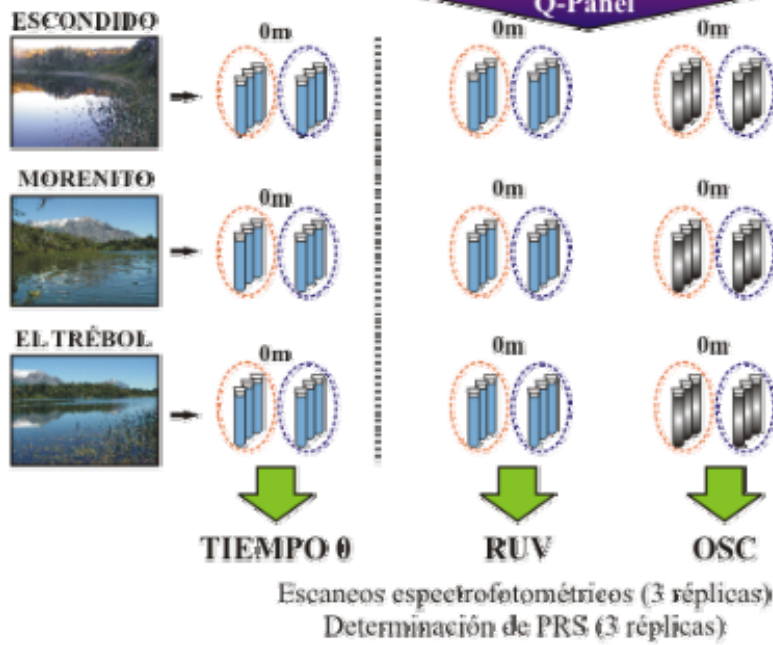


Figura 3.1. Diseño experimental de los Experimentos 1 y 2, en los que se analizaron las variaciones en las características ópticas de agua de lago (Experimento 1) y lixiviados (Experimento 2) frente a RUV. Las flechas verdes indican el tiempo (h) en el cual se realizaron los escaneos espectrofotométricos.





### Experimento 3



### Experimento 4

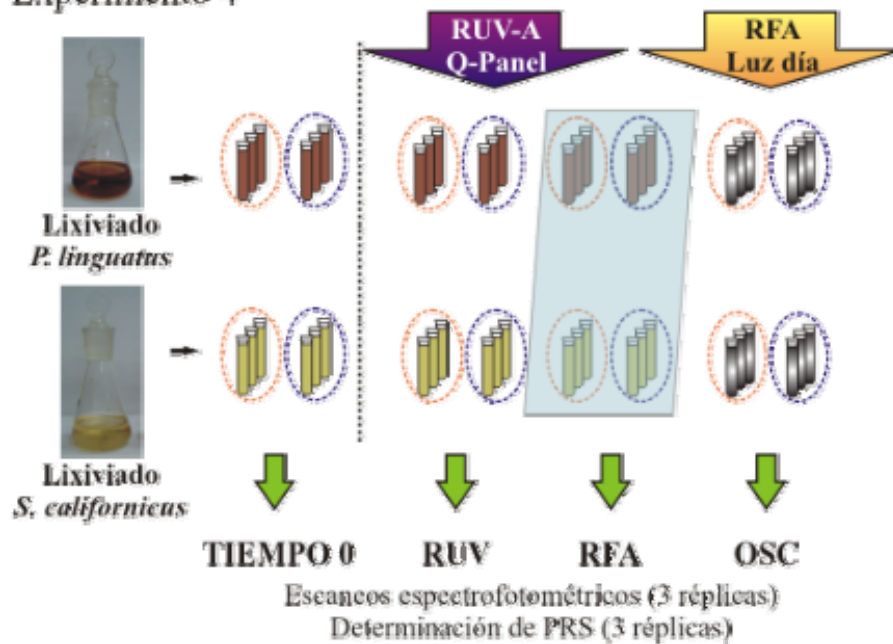


Figura 3.2. Diseño experimental de los Experimentos 3 y 4, en los que se analizó la liberación de P Reactivo Soluble (PRS) en agua de lago (Experimento 3) y lixiviados (Experimento 4) expuestos a diferentes calidades lumínicas. Las flechas verdes indican el tiempo (h) en el cual se realizaron los escaneos espectrofotométricos. La línea punteada anaranjada señala los tubos destinados

para los escaneos espectrofotométricos y la azul, señala los tubos destinados para las determinaciones de PRS.

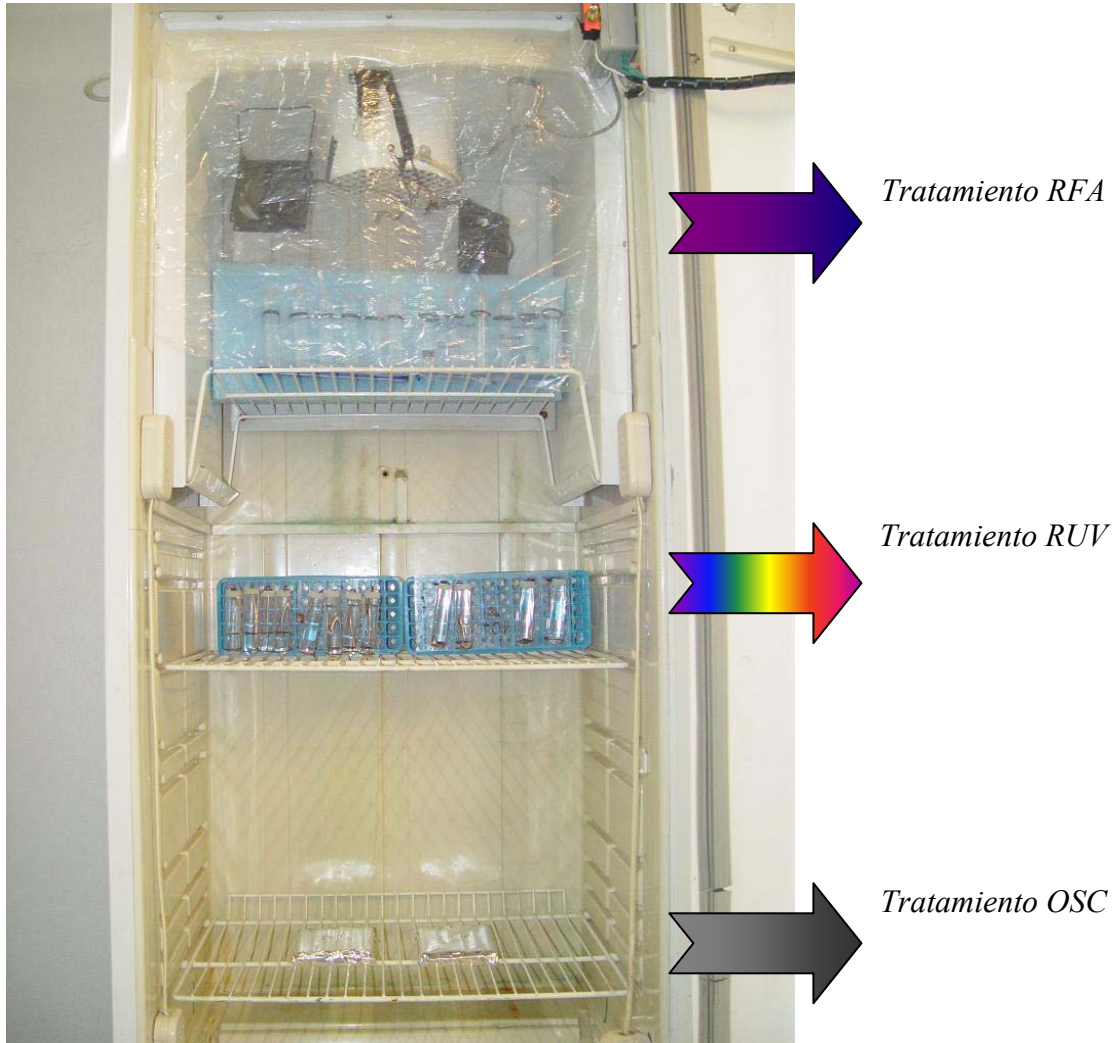


Figura 3.3. Fotografía del incubador utilizado.

### ANÁLISIS DE DATOS

Las diferencias entre los valores de las pendientes espectrales (3 réplicas) correspondientes a los experimentos de exposición de agua de lago ( $S_{UV}$ ) y de lixiviados de macrófitas ( $S_{285-300}$  y  $S_{270-300}$ ) fueron analizadas a través de un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías). También se utilizó un ANOVA de doble vía para el análisis de los valores del cociente  $a_{250}:a_{365}$  de los diferentes lagos a lo largo del tiempo de exposición.



Se utilizó este tipo de análisis estadístico debido a la independencia entre los tubos utilizados para la exposición. Los valores de concentración de PRS registrados en los experimentos de exposición de agua de lago y de lixiviados, fueron analizados a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía). Este análisis fue también utilizado en el experimento de liberación de PRS de lixiviados para analizar las variaciones en el cociente  $a_{250}:a_{365}$  entre los tratamientos. Las comparaciones *a posteriori* fueron realizadas en todos los casos utilizando el Test de Tukey, con un nivel promedio de significancia de  $P = 0.05$ . Las diferencias en los cocientes y en la liberación de PRS entre los tratamientos de exposición a diferentes calidades, fueron analizadas con Test *t*. Además, se analizó si las pendientes  $S_{285-300}$  y  $S_{270-300}$  son buenos estimadores de fotodegradación a través de análisis de regresión entre cada rango de longitud de onda y la relación  $a_{250}:a_{365}$ .

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los paquetes estadísticos SigmaPlot 11.0 o Statistica 6.0.



## RESULTADOS

### *Análisis de variaciones en las características ópticas de la MOD*

#### *Experimento 1*

El análisis de los espectros de absorbancia registrados para los diferentes lagos en el momento inicial (0 h), mostró curvas de absorbancia con patrones similares (Fig. 3.7). Con respecto a los espectros registrados en los diferentes niveles de la columna de agua, no se observaron variaciones significativas en ninguno de los lagos estudiados (ANOVA de dos vías,  $P > 0.05$  en todos los lagos). Sin embargo, los valores máximos de absorbancia fueron diferentes entre los lagos, pudiéndose relacionar con variaciones en la materia orgánica disuelta (Fig. 3.7). El Lago Escondido presentó los mayores valores de  $a_d$  en la región de longitud de onda corta del espectro ( $\sim 31.1 \text{ m}^{-1}$ ), seguido por el Lago Morenito ( $\sim 13.6 \text{ m}^{-1}$ ), y por último el Lago El Trébol ( $\sim 10.2 \text{ m}^{-1}$ ). Por lo tanto, los lagos estudiados presentan valores descendentes en el contenido de MOD coloreada, que es la fracción con mayor absorbancia en la región UV.

La exposición de las muestras de agua a la radiación UV generó un aumento de los valores de  $a_d$ , en la banda de longitud de onda corta, en todos los lagos estudiados y en todos los niveles de profundidad (Fig. 3.7). Asimismo, se observó un incremento de  $S_{UV}$ , luego de la exposición lumínica, evidenciando una disminución en la absorción de las muestras (Tabla 3.1).

El análisis de  $S_{UV}$  en el lago Escondido reveló además un efecto diferencial de la RUV en las diferentes profundidades estudiadas (ANOVA de dos vías, Profundidad  $P < 0.001$ ). En superficie y a los 3 m de profundidad se observó un aumento significativo de  $S_{UV}$  transcurridas las 5 h (ANOVA de dos vías, 0 m:  $P < 0.001$ ; 3 m:  $P < 0.001$ ) y 10 h (ANOVA de dos vías, 0 m y 3 m:  $P = 0.005$ ) de exposición (Tabla 3.1). Por otro lado, en contraposición a la tendencia general, la muestra correspondiente a los 6 m de profundidad mostró un decrecimiento de los valores de  $S_{UV}$  transcurridas las 5 h (ANOVA de dos vías,  $P = 0.009$ ) y las 10 h (ANOVA de dos vías,  $P = 0.005$ ) de exposición. La disminución del efecto generado por la exposición lumínica en esta muestra indicaría la existencia de diferencias en la calidad de la MOD presente en este nivel.

En los lagos Morenito y El Trébol no se observaron variaciones en el efecto de la RUV entre las diferentes profundidades (ANOVA de dos vías, Morenito:  $P = 0.085$  y El



Trébol:  $P = 0.575$ ). Sin embargo, se registró un incremento significativo de los valores de  $S_{UV}$  transcurridos los dos tiempos de irradiación (En ambos lagos: 0 h vs 5 h / 10h,  $P < 0.001$ ). Además, el Lago El Trébol evidenció diferencias significativas entre las 5 h y 10 h ( $P = 0.015$ ) (Tabla 3.1).

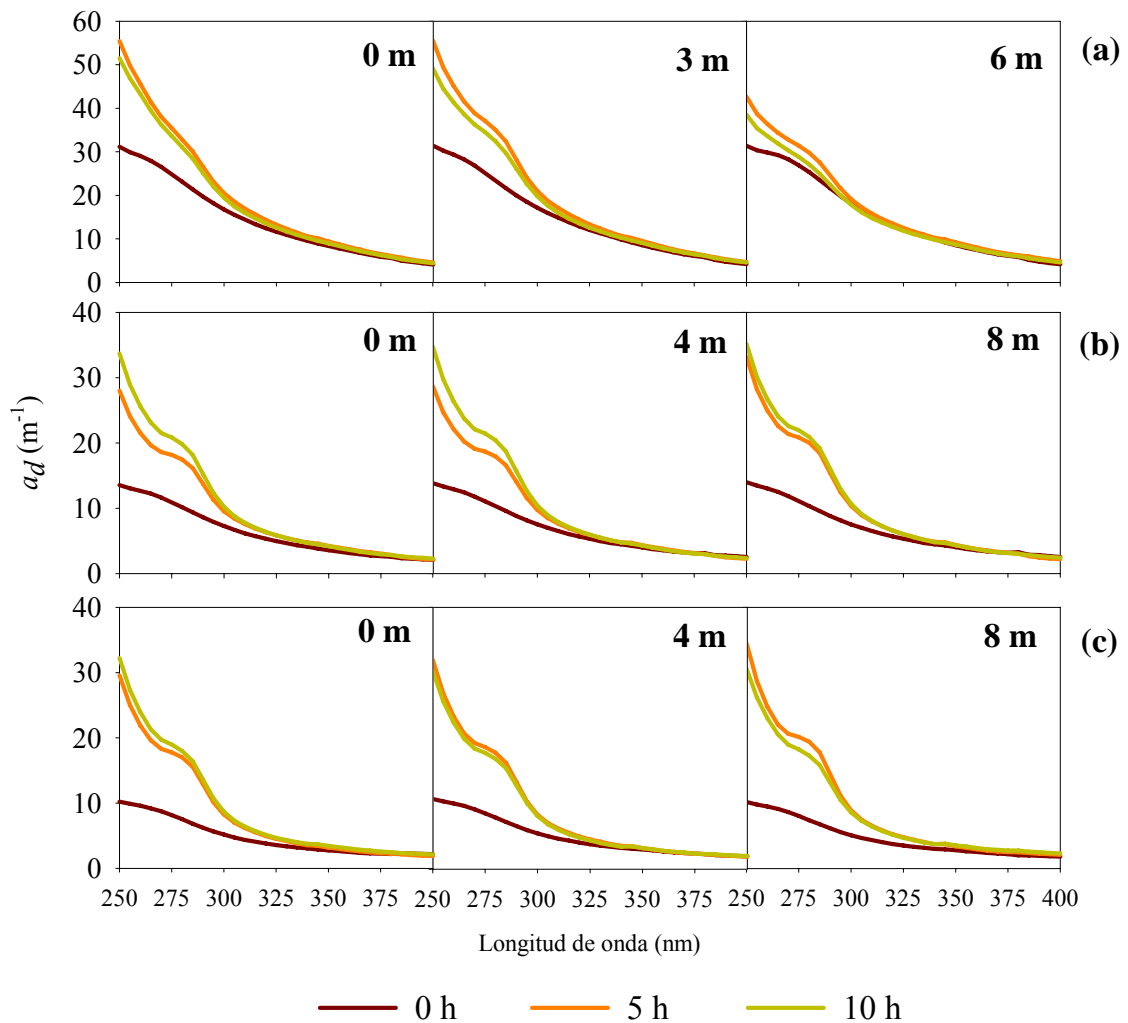


Figura 3.7. Espectros de absorbancia correspondientes a las diferentes profundidades de los lagos Escondido (a), Morenito (b) y El Trébol (c), transcurridas 5 h y 10 h de exposición a radiación UV. Notar el cambio de escala en el eje  $a_d$  entre el Lago Escondido y los demás lagos.



Tabla 3.1. Pendientes espectrales en la banda UV ( $S_{UV}$ ) calculadas para los diferentes lagos, transcurrido el tiempo de irradiación. Se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación standard.

		0 m	3 m - 4 m	6 m - 8 m
Escondido	0 h	0.0141 $\pm$ 0.0001	0.0141 $\pm$ 0.0000	0.0147 $\pm$ 0.0000
	5 h	0.0152 $\pm$ 0.0002	0.0153 $\pm$ 0.0002	0.0139 $\pm$ 0.0005
	10 h	0.0151 $\pm$ 0.0001	0.0154 $\pm$ 0.0001	0.0137 $\pm$ 0.0002
Morenito	0 h	0.0129 $\pm$ 0.0002	0.0112 $\pm$ 0.0010	0.0110 $\pm$ 0.0008
	5 h	0.0153 $\pm$ 0.0006	0.0149 $\pm$ 0.0008	0.0157 $\pm$ 0.0008
	10 h	0.0157 $\pm$ 0.0005	0.0155 $\pm$ 0.0007	0.0154 $\pm$ 0.0002
El Trébol	0 h	0.0106 $\pm$ 0.0001	0.0107 $\pm$ 0.0006	0.0107 $\pm$ 0.0001
	5 h	0.0157 $\pm$ 0.0009	0.0157 $\pm$ 0.0005	0.0155 $\pm$ 0.0009
	10 h	0.0150 $\pm$ 0.0001	0.0148 $\pm$ 0.0006	0.0139 $\pm$ 0.0012

Los valores del cociente  $a_{250}:a_{365}$ , calculados en el tiempo inicial, mostraron también variaciones entre los lagos. El Lago Escondido mostró los menores valores, seguido por el Morenito y luego por El Trébol, el cual presentó los cocientes más altos (Fig. 3.8). Estos resultados indicaron un gradiente de tamaño molecular de la materia orgánica, siendo el Lago Escondido el que presenta la MOD de mayor peso molecular. Asimismo, este lago presentó valores de cociente homogéneos a lo largo de la columna de agua (ANOVA de una vía,  $P = 0.303$ ), mientras que en los lagos restantes se registró una pequeña variación, aunque no significativa (ANOVA de una vía, Morenito:  $P = 0.214$ ; El Trébol:  $P = 0.438$ ), observándose los mayores valores en superficie (Fig. 3.8).

Al analizar los cambios en la relación  $a_{250}:a_{365}$  transcurrido el tiempo de exposición a RUV, se observó un incremento significativo del cociente en todos los lagos, señalando una disminución en el peso molecular promedio de la materia orgánica disuelta (ANOVA de dos vías, Factor Tiempo de exposición en todos los lagos:  $P < 0.001$ ). Con respecto al efecto de las RUV sobre el agua proveniente de las diferentes profundidades, los lagos Morenito y El Trébol no mostraron diferencias (ANOVA de dos vías, Profundidad en Morenito:  $P = 0.569$ ; Profundidad en El Trébol:  $P = 0.988$ ). Sin embargo, en el Lago Escondido, la muestra perteneciente a los 6 m evidenció valores de  $a_{250}:a_{365}$



significativamente menores que en superficie (Test *a posteriori* de Tukey, 6 m vs 0 m,  $P = 0.001$ ) y a los 3 m (6 m vs 3 m,  $P = 0.004$ ) (Fig. 3.8).

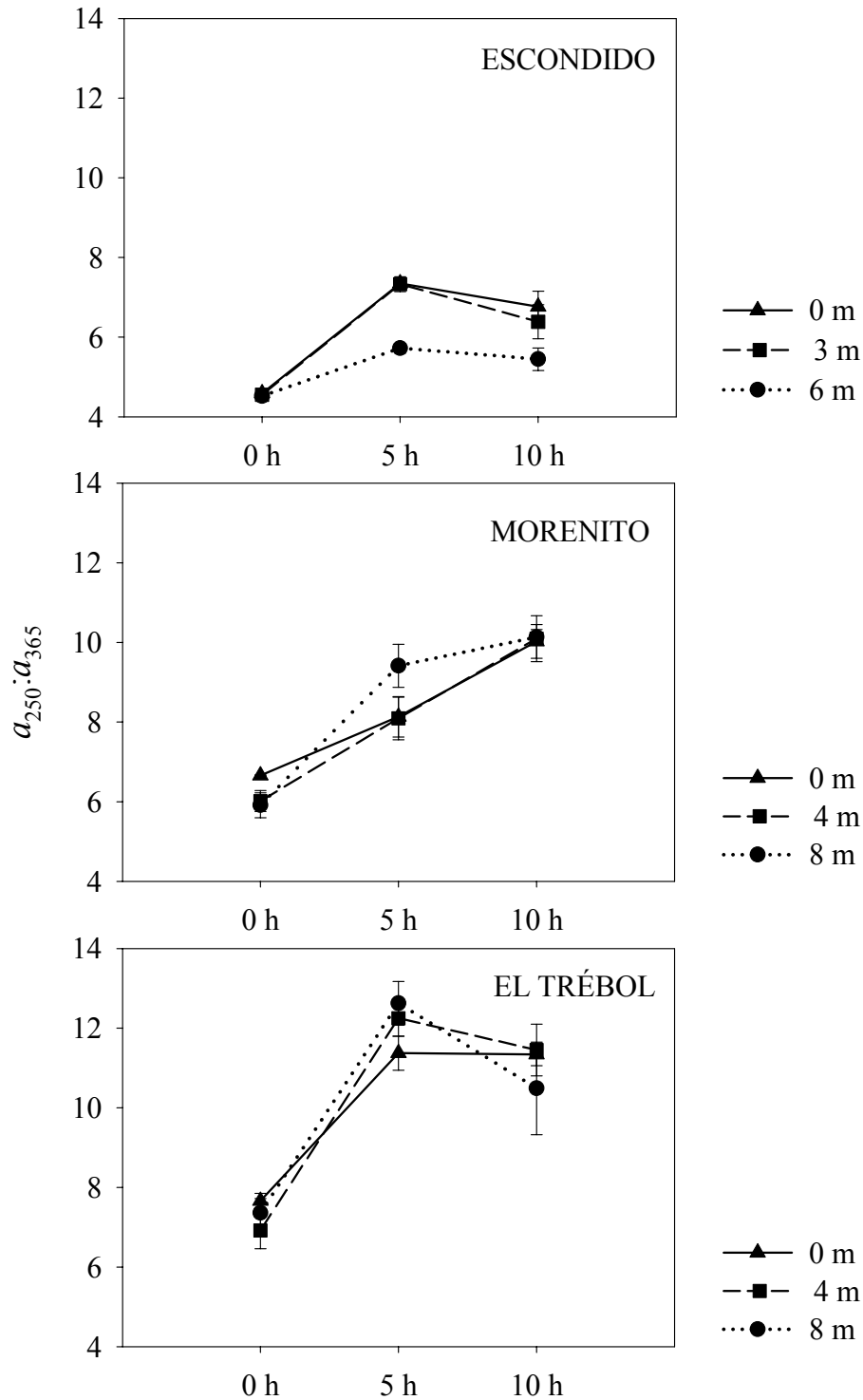


Figura 3.8. Variación del cociente  $a_{250}:a_{365}$  a través del tiempo de incubación en las diferentes profundidades de los lagos estudiados.



### Experimento 2

El espectro de absorbancia registrado para los lixiviados de las dos macrófitas estudiadas mostró diferentes tendencias (Fig. 3.9). Al analizar los escaneos realizados antes de la exposición lumínica (0 h) se pudo observar un patrón bimodal para el lixiviado de *Potamogeton linguatus*, con picos de absorbancia a los 320 nm y 280 nm. Por su parte, el lixiviado de *Schoenoplectus californicus* mostró un espectro unimodal, con un único pico de absorbancia alrededor de los 265 nm. Estas tendencias se mantuvieron para ambas especies de macrófitas, con pequeñas variaciones, en las plantas recolectadas en los dos lagos estudiados (Fig. 3.9).

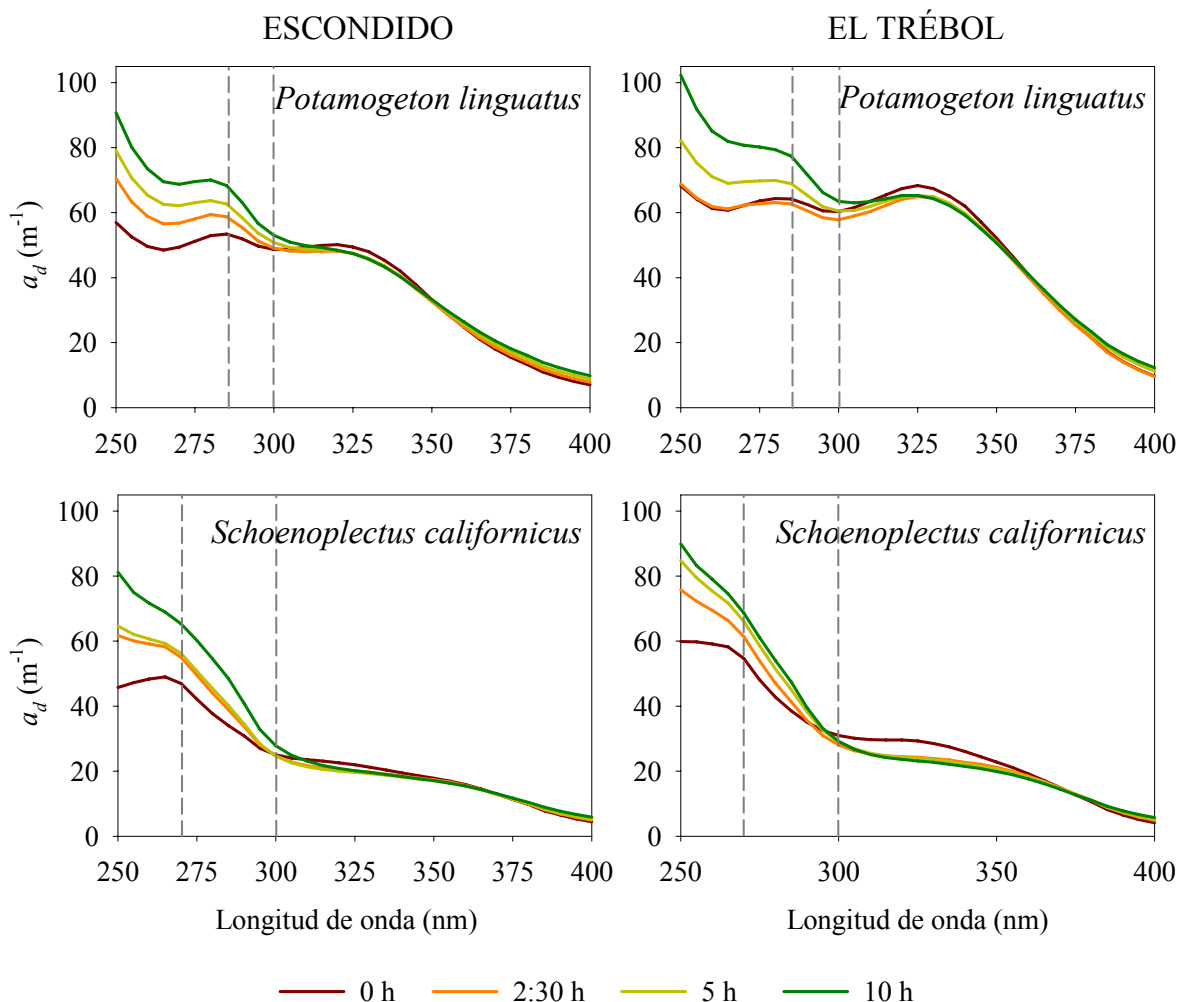


Figura 3.9. Espectros de absorbancia a lo largo del tiempo de exposición a UV de lixiviados de las macrófitas *P. linguatus* y *S. californicus* provenientes de los lagos Escondido y El Trébol.





La tendencia general luego de la exposición lumínica de los lixiviados de *P. linguatus* y *S. californicus*, consistió en una atenuación de los picos de absorbancia registrados en los espectros de ambas especies de macrófitas (Fig. 3.9). Asimismo, se observó un aumento significativo de  $S_{270-300}$  y  $S_{285-300}$  a lo largo de todo el tiempo de exposición para ambas especies de macrófitas (ANOVA de dos vías, Tiempo en *P. linguatus*,  $P < 0.001$ ; Tiempo para *S. californicus*,  $P < 0.001$ ) (Tabla 3.2). Para el caso de *P. linguatus* del lago Escondido, se observaron diferencias significativas en  $S_{285-300}$  entre los tiempos de exposición (Test *a posteriori* de Tukey, en todos los casos  $P \leq 0.003$ ), excepto entre las 2.5 y 5 h ( $P = 0.371$ ). Los lixiviados de *P. linguatus* perteneciente al Lago El Trébol, también mostraron diferencias significativas en sus pendientes entre los diferentes tiempos de exposición (Test *a posteriori* de Tukey, en todos los casos  $P \leq 0.013$ ), excepto entre el momento inicial (0 h) y las 2.5 h ( $P = 0.498$ ). Por su parte, el lixiviado *S. californicus* del Lago El Trébol mostró una pérdida significativa de absorción a lo largo de todo el tiempo de exposición (Test *a posteriori* de Tukey, en todos los casos  $P \leq 0.009$ ), mientras que en el Escondido la diferencia en  $S_{270-300}$  entre 2.5 h y 5 h no fue significativa ( $P = 0.433$ ) (Tabla 3.2). Asimismo, se observaron variaciones en las pendientes de cada especie de macrófita entre los lagos (ANOVA de dos vías, Lago en *P. linguatus*,  $P < 0.001$ ; Lago en *S. californicus*,  $P = 0.009$ ). Para *P. linguatus*, se observaron diferencias significativas entre los lagos dentro de cada uno de los tiempo de irradiación (Test *a posteriori* de Tukey, para todos los tiempos,  $P \leq 0.005$ ). Por otro lado, para *S. californicus*, sólo se observaron diferencias en el momento inicial (0 h) (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.001$ ).

El peso molecular promedio de la materia orgánica disuelta de los lixiviados, estimado a través de la relación  $a_{250}:a_{365}$ , mostró una tendencia muy similar a la observada para los valores de las pendientes (Fig. 3.10). El lixiviado de *P. linguatus* presentó menor tamaño molecular relativo que el de *S. californicus* (Fig. 3.10). Este patrón fue observado tanto en el Lago Escondido como en el Lago El Trébol, sin embargo en el primero de los lagos, la diferencia en el cociente entre ambas macrófitas fue menor. La exposición a la fuente lumínica generó en ambas macrófitas una disminución del tamaño molecular relativo de la materia orgánica disuelta (Fig. 3.10).



Tabla 3.2. Pendientes espectrales calculadas entre 285 nm y 300 nm, para *Potamogeton linguatus* ( $S_{285-300}$ ), y entre 270 nm y 300 nm, para *Schoenoplectus californicus* ( $S_{270-300}$ ). Se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación standard.

		<i>Potamogeton linguatus</i> $S_{285-300}$	<i>Schoenoplectus californicus</i> $S_{270-300}$
Escondido	0 h	0.0064 $\pm$ 0.0001	0.0213 $\pm$ 0.0001
	2.5 h	0.0122 $\pm$ 0.0004	0.0272 $\pm$ 0.0004
	5 h	0.0143 $\pm$ 0.0009	0.0279 $\pm$ 0.0004
	10 h	0.0173 $\pm$ 0.0015	0.029 $\pm$ 0.0001
Trébol	0 h	0.0037 $\pm$ 0.0001	0.0191 $\pm$ 0.0001
	2.5 h	0.0049 $\pm$ 0.0002	0.0267 $\pm$ 0.0002
	5 h	0.0079 $\pm$ 0.0025	0.0281 $\pm$ 0.0005
	10 h	0.0121 $\pm$ 0.0004	0.0293 $\pm$ 0.0004

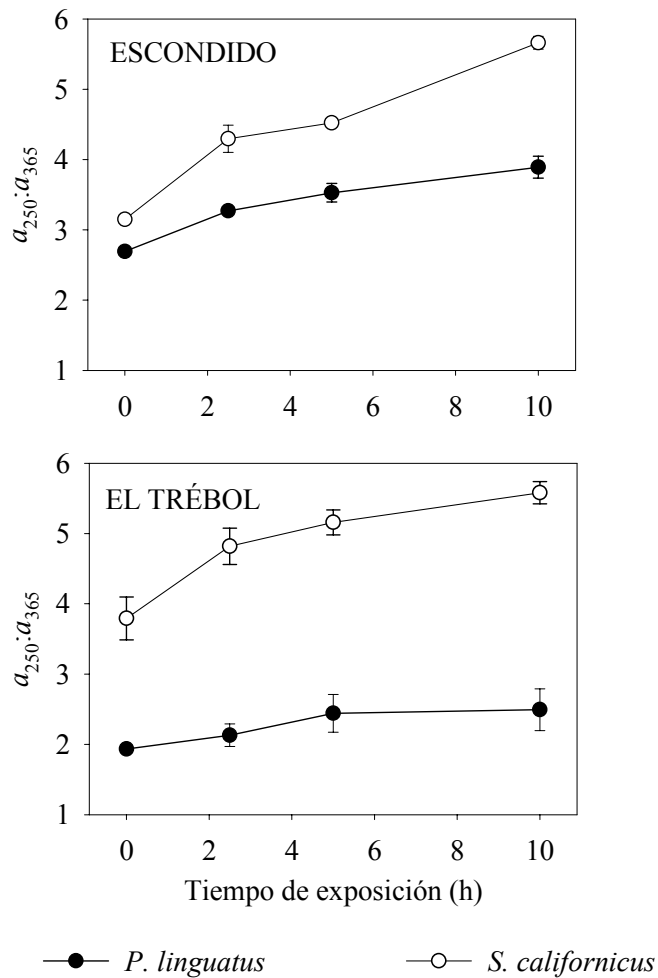


Figura 3.10. Valores del cociente  $a_{250}:a_{365}$  de los lixiviados de *Potamogeton linguatus* y *Schoenoplectus californicus* para los diferentes lagos, transcurrido el tiempo de irradiación. Se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación standard.

El análisis de regresión entre  $S_{285-300}$  para *P. linguatus* y  $S_{270-300}$  para *S. californicus* y sus valores del cociente  $a_{250}:a_{365}$  correspondientes, mostraron una relación positiva significativa en cada caso (Fig. 3.11). Para el lixiviado de *P. linguatus* del Lago Escondido, se observó una correlación positiva con un  $r^2 = 0.849$  ( $P < 0.001$ ), y  $r^2 = 0.815$  en el Lago El Trébol ( $P < 0.001$ ). El lixiviado de *S. californicus* del Lago Escondido mostró también una relación positiva con un  $r^2 = 0.718$  ( $P < 0.001$ ), mientras que en el Lago El Trébol,  $r^2 = 0.795$  ( $P < 0.001$ ).

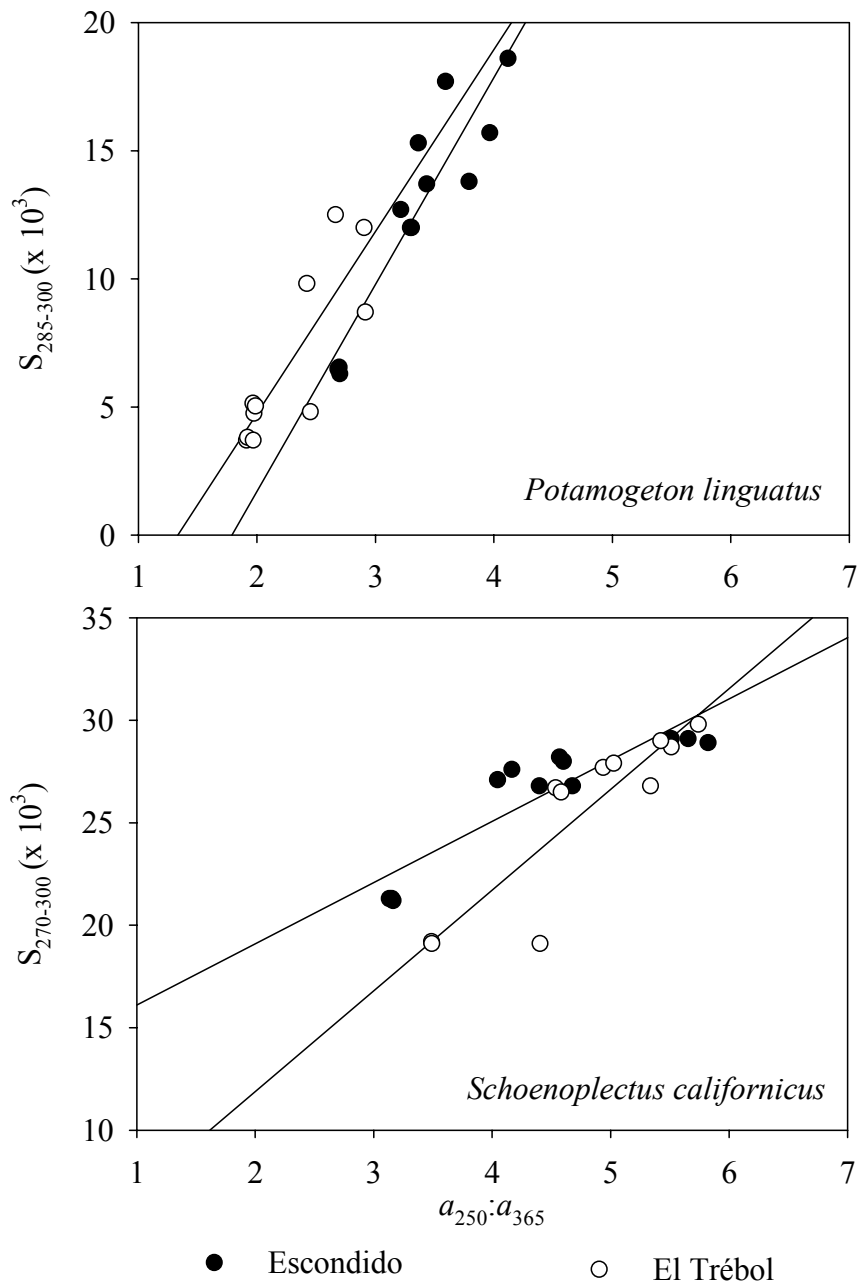


Figura 3.11. Regresión entre los valores de  $S_{285-300}$  vs  $a_{250}:a_{365}$ , para *Potamogeton linguatus*, y de  $S_{270-300}$  vs  $a_{250}:a_{365}$  para *Schoenoplectus californicus*.



*Análisis de liberación de P Reactivo Soluble (PRS) de MOD expuesta a diferentes calidades lumínicas*

*Experimento 3*

La determinación de PRS en las muestras superficiales de los tres lagos estudiados, mostró diferencias significativas entre los mismos (ANOVA una vía,  $P < 0.001$  en todos los casos). La mayor concentración de PRS fue registrada en el Lago Escondido, y el menor valor en el Lago El Trébol (Fig. 3.12). También se observaron diferencias significativas entre los tratamientos lumínicos en cada uno de los lagos (ANOVA una vía, Escondido,  $P = 0.003$ ; Morenito,  $P = 0.021$ ; El Trébol,  $P = 0.001$ ) Con respecto al efecto de la RUV en la exposición de agua de los lagos, se observó un aumento significativo en la concentración de PRS, transcurrido el tiempo de exposición (Test a posteriori de Tukey, Escondido:  $P = 0.012$ ; Morenito,  $P = 0.037$ ; El Trébol,  $P = 0.019$ ). Sin embargo, se observó una respuesta diferente en el tratamiento OSC de los diferentes lagos (Fig. 3.12): en el lago Escondido, la concentración de PRS fue similar a la registrada en T0 (Test a posteriori de Tukey, T0 vs OSC,  $P = 0.132$ ), mientras que en el Lago Morenito se observó liberación de PRS aún en oscuridad. En este último caso, se observó un efecto similar al registrado en el tratamiento RUV resultando ambos tratamientos en diferencias no significativas (Test a posteriori de Tukey, RUV vs OSC,  $P = 0.937$ ). Por otra parte, en el tratamiento OSC del experimento con agua del Lago El Trébol, se observó el mayor porcentaje de liberación de PRS (75 %), difiriendo significativamente de T0 (Test a posteriori de Tukey, T0 vs OSC,  $P = 0.001$ ) y de RUV (RUV vs OSC,  $P = 0.019$ ) (Fig. 3.12).

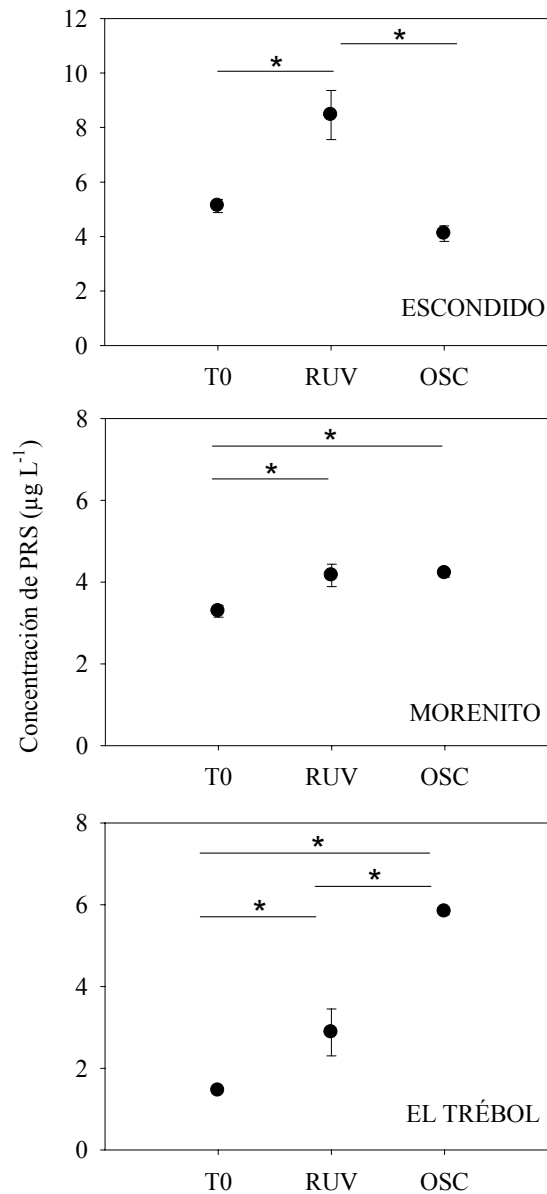


Figura 3.12. Concentración de P Reactivo Soluble (PRS) registrada en el tiempo inicial (T0), transcurrido el tiempo de exposición (RUV-RFA) y en oscuridad (OSC). (\*)  $P < 0.05$ .

#### Experimento 4

En los experimentos de liberación de PRS de lixiviados sometidos a diferentes calidades lumínicas, se observaron variaciones en los valores del cociente  $a_{250}:a_{365}$  (ANOVA de una vía, para *P. linguatus*,  $P < 0.001$ ; para *S. californicus*,  $P = 0.001$ ) (Fig. 3.13). Asimismo, se observó que la concentración de PRS en el lixiviado por gramo de



tejido vegetal fue significativamente mayor para *P. linguatus* (ANOVA de una vía,  $P < 0.001$ ). Por otro lado, al analizar las variaciones en la concentración de PRS entre los tratamientos, se observaron diferencias entre los lixiviados de las dos macrófitas estudiadas (ANOVA de una vía, para *P. linguatus*,  $P = 0.010$ ; para *S. californicus*,  $P < 0.001$ ) (Fig. 3.14). Transcurrido el tiempo de exposición a RUV el lixiviado de *P. linguatus* mostró un incremento en la concentración promedio de PRS, observándose una respuesta similar frente al tratamiento RFA, sin que estas diferencias sean significativas (Test *a posteriori* de Tukey, T0 vs RUV,  $P = 0.184$ ; T0 vs RFA,  $P = 0.179$ ). La mayor liberación de PRS se registró en el tratamiento OSC; esta variación fue significativa en relación a la concentración inicial (Test *a posteriori* de Tukey,  $P = 0.044$ ). Por otro lado, transcurrido el tiempo de exposición a RUV y RFA, el lixiviado de *S. californicus* mostró un descenso en la concentración de PRS (Fig. 3.14). Asimismo, el tratamiento OSC generó mayor liberación de PRS (Test *a posteriori* de Tukey, T0 vs OSC,  $P = 0.003$ ).

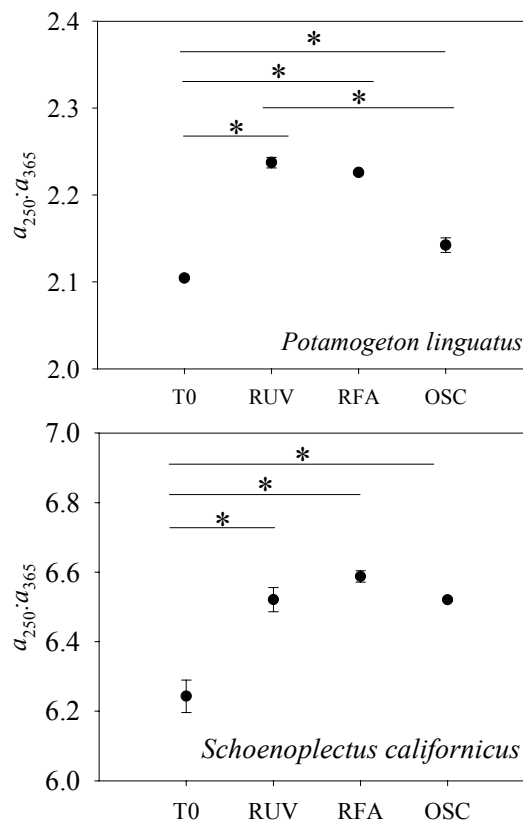


Figura 3.13. Cocientes  $a_{250}:a_{365}$  registrados para los lixiviados de *P. linguatus* y *S. californicus*, en el tiempo inicial (T0) y transcurrido el tiempo de exposición al espectro lumínico completo (RUV), a Radiación Fotosintéticamente activa (RFA) y en oscuridad (OSC) (Columna derecha). (\*)  $P < 0.05$ .

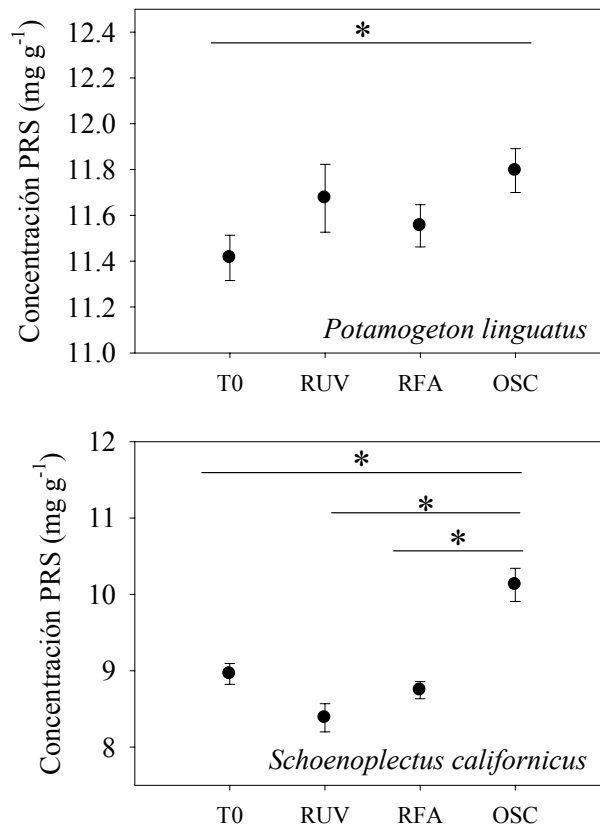


Figura 3.14. Concentración de P Reactivo Soluble (PRS) por gramo de macrófita registrada para los lixiviados de *P. linguatus* y *S. californicus*, en el tiempo inicial (T0) y transcurrido el tiempo de exposición al espectro lumínico completo (RUV), a Radiación Fotosintéticamente activa (RFA) y en oscuridad (OSC). (\*)  $P < 0.05$ .





## DISCUSIÓN

La materia orgánica disuelta afecta las características y procesos en un ecosistema acuático y constituye un importante reservorio de carbono orgánico (Bertilsson & Tranvik 2000). Existe un suministro continuo de MOD a los cuerpos de agua, tanto por un ingreso externo de material de origen terrestre (material alóctono), como interno resultado de la producción primaria del ambiente (material autóctono). La radiación solar, particularmente en el rango ultravioleta (UV-A y UV-B), promueve la fototransformación de la estructura, el peso molecular y las propiedades ópticas de la MOD (Strome & Miller 1978; de Haan & De Boer 1991; Allard et al. 1994; Kulovaara et al. 1996). Los lagos someros andino-patagónicos estudiados son pequeños lagos con relativo alto contenido de carbono orgánico disuelto, en relación con los lagos profundos de la zona. Estos ambientes han sido incluso citados como lagos húmicos o levemente húmicos (Osburn et al. 2001; Zagarese et al. 2001). Los experimentos de fotodegradación de la MOD de los lagos Escondido, Morenito y El Trébol, revelaron variaciones significativas en sus espectros de absorbancia y características ópticas, transcurridas 5 h de exposición a la fuente artificial de RUV. Estos resultados nos permiten aceptar la primera hipótesis de este estudio, en lo que respecta a la fotodegradación de la MOD del agua de lago. Los resultados obtenidos para el lago El Trébol coinciden con lo observado por Zagarese et al. (2001) en un estudio experimental realizado en este lago. En dicho estudio se registró un incremento en la relación  $a_{250}:a_{365}$  con la exposición a UV y los valores registrados para esta relación transcurrida la exposición a RUV fueron similares a los registrados en el presente estudio (entre 10 y 16).

Si bien se registraron cambios en las características ópticas de la MOD en todos los lagos y en todas las profundidades, se observaron diferencias entre los mismos. La MOD correspondiente a los lagos Morenito y El Trébol mostró cambios más acentuados en la relación  $a_{250}:a_{365}$ , que la del Lago Escondido. El mismo patrón fue observado con respecto a los valores de  $S_{UV}$  de las muestras superficiales de los lagos. En un análisis de la fotoreactividad de la MOD de lagos de altura en España, Reche et al. (2001) observaron mayor variación en el tamaño molecular y en  $S_{UV}$  de la MOD de dos lagos de localizados en terreno rocoso, en comparación con dos lagos rodeados por terrenos vegetados. Los autores plantean que la mayor fotoreactividad de los lagos emplazados sobre terreno rocoso puede ser explicada por: una mayor influencia de MOD autóctona (con mayor



fotoreactividad), mayor profundidad media, y diferencias en la química del agua. Las mayores concentraciones de clorofila *a* registradas para los lagos Morenito y El Trébol (ver Capítulo I), con respecto al Escondido, podrían asociarse a una mayor contribución de MOD autóctona al contenido total del lago, y por lo tanto, a una mayor fotoreactividad de la MOD de estos ambientes. Estudios previos han señalado que el grado de degradación fotoquímica previa de la MOD puede tener un importante efecto en la composición del Carbono Orgánico Disuelto (COD) y en su capacidad para fotodegradarse (Morris & Hargreaves 1997; Reche et al. 1999). La morfometría y el régimen de mezcla pueden afectar significativamente el volumen de agua susceptible a reaccionar frente a la exposición lumínica (Reche et al. 2000; Whitehead et al. 2000). En relación con esta característica, los lagos Morenito y el Trébol presentan mayor profundidad media. La MOD del Lago Escondido, con menor profundidad media (5.5 m), probablemente ha sido expuesta mayor cantidad de tiempo a la radiación solar, por lo que puede ser más fotorefractaria que la MOD de los lagos Morenito y El Trébol. Por otro lado, numerosos estudios han señalado que el ambiente iónico en que la MOD se disuelve puede influenciar su fotoreactividad (Gao & Zepp 1998; Reche et al. 1999; Bertilsson & Tranvik 2000). Se ha observado que ambientes ácidos promueven la condensación de los ácidos húmicos en coloides (Thurman 1985), los cuales parecen reducir el acceso de la luz a los enlaces fotoreactivos de la MOD (Reche et al. 1999). Los lagos estudiados presentaron valores de pH muy similares, y alrededor de 7 (ver Capítulo I), por lo que variaciones en su fotoreactividad no podrían ser asociadas a la acidez del agua.

Otra explicación a las diferencias en la fotoreactividad de la MOD de los diferentes lagos podría ser que la capacidad neutralizante (capacidad buffer medida como alcalinidad) del agua afecta la proporción de la MOD que es fotodegradable (Reche et al. 1999). Por lo tanto, en aguas con mayor reserva alcalina la mayor solubilidad de sustancias húmicas o la mayor proporción de sustancias degradables podría contribuir a un contenido de MOD menos recalcitrante. En este sentido, el Lago El Trébol fue el que presentó mayor alcalinidad en el período muestreado, seguido por el Lago Morenito y por último por el Lago Escondido (ver Capítulo I). Estos resultados explicarían los cambios acentuados en  $a_{250}:a_{365}$  y en  $S_{UV}$  de los lagos Morenito y el Trébol, en comparación con el Escondido. De esta manera, los cambios generados por la acción de la RUV en las características ópticas de la MOD de los lagos estudiados, dependerían tanto de las características intrínsecas de la MOD presente en cada lago como de las características químicas del agua.



El proceso de fotodegradación incrementa la transmisión de la RUV a través de la columna de agua, al degradar los compuestos coloreados constituyentes de la MOD que absorben la RUV (Morris et al. 1995). De esta manera, en los lagos húmicos, este proceso se ve restringido principalmente a las capas epilimnética del lago. La MOD de los lagos Morenito y El Trébol, no mostró diferencias en sus pendientes espectrales ni en el tamaño molecular, a lo largo del tiempo de exposición, entre las diferentes profundidades. Esto es esperable debido a que dichos lagos se encontraban en período de mezcla al momento de la toma de muestras (ver capítulo I). Sin embargo, en el Lago Escondido la muestra correspondiente a los 6 m difirió significativamente de los niveles de profundidad restantes. La MOD presente en el nivel más profundo del Lago Escondido mostró una atenuación en la velocidad de fotodegradación, obteniéndose valores de  $a_{250}:a_{365}$  y  $S_{UV}$  significativamente más bajos que en las muestra de superficie y de 3 m. Estas observaciones podrían sugerir una variación en la composición química de la MOD a través de la columna de agua, especialmente evidente en el estado de estratificación en el que se encontraba el Lago Escondido (ver Capítulo I). Este patrón coincide con otros estudios realizados en lagos húmicos (Reche et al. 1999) en los que se registró mayor color en aguas de capas hipolimnéticas que en el epilimnion. De esta manera, los períodos de mezcla, especialmente transcurrido el verano (con mayor exposición solar a altas irradiancias), podrían estar proveyendo de una importante fuente de materia orgánica disuelta coloreada a las capas superficiales del lago.

Varios estudios apoyan la idea de la formación de un complejo MOD-Fe-P, en ambientes con alta concentración de MOD, especialmente de origen alóctono y de alto peso molecular (p. ej. de Haan et al. 1990; Shaw 1994; Shaw et al. 2000). Este complejo generaría una retención de las formas disueltas de Fe y P en la columna de agua, evitando su pérdida en los sedimentos y, a su vez, reduciendo su disponibilidad, generando así una limitación (Maranger & Pullin 2003). La concentración de fósforo, y particularmente la disponibilidad de fosfato, es un factor limitante de la productividad en la mayoría de los lagos (Schindler 1977). Los lagos someros estudiados presentan variación en la concentración de COD y también en el tamaño molecular promedio, siendo el Lago Escondido el que presenta MOD de mayor peso molecular. De esta manera, las variaciones en la liberación de PRS observadas en los distintos lagos como respuesta a los tratamientos lumínicos, se pueden relacionar con las características de la MOD presente.



De todos los mecanismos que se asocian a la biodisponibilidad de Fe y P, la reducción fotoquímica de Fe y la subsiguiente liberación de  $\text{PO}_4^{-3}$  del complejo MOD-Fe-P ha recibido la mayor atención (Maranger & Pullin 2003). Comparando lagos coloreados con lagos claros, Francko & Heath (1979) encontraron liberación de  $\text{PO}_4^{-3}$  con exposición a RUV en lagos coloreados, pero no se observó liberación en lagos claros. Los experimentos realizados en el presente estudio mostraron una liberación significativa de PRS transcurrido el tiempo de exposición a RUV en todos los lagos estudiados. Sin embargo, los lagos con MOD de mayor y de menor peso molecular (Lago Escondido y El Trébol, respectivamente), presentaron mayores concentraciones de PRS liberado que el lago Morenito, el cual presentó una concentración intermedia. Estos resultados coinciden parcialmente con de Haan et al. (1990), quienes encontraron una mayor proporción de Fe y  $\text{PO}_4^{-3}$  asociada a MOD de bajo peso molecular. Asimismo, resultados obtenidos por Zagarese et al. (2001) en el Lago El Trébol demostraron una relación directa entre la liberación de P y exposición a UV; registrando un aumento en la concentración de PRS al disminuir el tamaño de la MOD (aumento de  $a_{250}:a_{365}$ ). Por otro lado, un estudio realizado en un lago eutrófico alcalino con alto contenido de MOD registró una mayor proporción de  $^{33}\text{P}$  en la fracción de mayor peso molecular (Jones et al. 1988), mientras que Jones et al. (1993) observó un decrecimiento en la cantidad de Fe y  $\text{PO}_4^{-3}$  asociado con las fracciones húmicas a bajos valores de pH. El Lago Escondido, fue el que presentó mayor pH en el período de estudio (pH = 7.3), lo cual podría relacionarse con una mayor concentración de PRS, asociada a su MOD de alto peso molecular, y la subsiguiente mayor liberación de  $\text{PO}_4^{-3}$ . De esta manera, el presente estudio muestra que la liberación de PRS en los lagos someros estudiados no se asocia exclusivamente al tamaño molecular de la MOD sino también a factores ambientales que afectan la estabilidad del complejo MOD-Fe-P, tales como el pH.

El Fe(III) puede reaccionar químicamente con la MOD para formar Fe(II) en lo que se conoce como reducción oscura o no fotoquímica del Fe (Stumm & Morgan 1996; Voelker et al. 1997; Pullin 1999). La reducción fotoquímica del Fe se encuentra directamente relacionada con la intensidad lumínica (Emmenegger et al. 2001). Dada la rápida atenuación de la intensidad lumínica y la RUV en aguas coloreadas (Morris et al. 1995), la reducción por oscuridad puede ser un proceso clave para la disponibilidad de Fe y el  $\text{PO}_4^{-3}$  en la columna de agua de ambientes con alto contenido de MOD. Los lagos



estudiados mostraron una liberación de PRS diferencial frente al tratamiento Oscuridad. El Lago El Trébol evidenció la mayor liberación de PRS, seguido por el Lago Morenito, mientras que en el Lago Escondido la liberación de P fue casi nula. Estos resultados señalan que, bajo condiciones experimentales, la liberación del  $\text{PO}_4^{-3}$  asociado al complejo MOD-Fe-P se ve favorecida por la oscuridad en la MOD de menor peso molecular. Si bien la liberación de P vía reducción de Fe en oscuridad permanece sin estudiar, este proceso puede tomar importancia particularmente frente a un incremento en el contenido de MOD de los cuerpos de agua. Un aumento en el ingreso de materia orgánica alóctona o en las tasas de descomposición de macrófitas, generaría un incremento en la coloración del agua y un descenso en la transmisión de la luz hacia niveles más profundos de la columna de agua, favoreciendo la liberación de P.

La mayoría de las plantas acuáticas crecen en forma continua, con una renovación constante de los miembros de la población que van muriendo. Algunas plantas sumergidas crecen activamente en sus puntas apicales y las hojas inferiores fenecen y se van renovando (Wetzel 2001). Claramente, la disminución en la disponibilidad de luz, generada por los ciclos estacionales, se encuentra involucrada con la inducción de la senescencia y con la formación de depósitos de materia orgánica (Wetzel 2001). Por otra parte, se ha demostrado un incremento de la degradación de los depósitos de macrófitas senescentes causado por el aumento de la RUV (Denward & Tranvik 1998). Una vez que la macrófita senescente entra en contacto con el agua, el detritus lixivia rápidamente materia orgánica disuelta que puede ser transformada fotoquímicamente (Wetzel et al. 1995; Denward & Tranvik 1998). Sin embargo, diferencias en la estructura histológica de las macrófitas sumergidas y palustres podrían contribuir al establecimiento de diferencias en la lixiviación. De esta manera, la lixiviación de tejidos duros con altas proporciones de lignina y cutícula gruesa, características de las plantas emergentes, podría ser diferente a la generada en plantas sumergidas, con tejidos pobres en lignina, poco desarrollo de tejidos y cutícula muy fina.

En el presente estudio, los espectros de absorbancia obtenidos para los lixiviados de las macrófitas *Potamogeton linguatus* y *Schoenoplectus californicus* mostraron patrones muy diferentes, sugiriendo diferencias en la composición química de los mismos (no realizada en este estudio). La fotodegradación de la materia orgánica afecta también a la MOD derivada de macrófitas. Los lixiviados de las macrófitas *P. linguatus* y *S. californicus* de los lagos Escondido y El Trébol presentaron una transformación



fotoquímica significativa transcurridas dos horas y media de exposición a RUV, confirmando la primer hipótesis planteada. Posteriormente, se siguió observando aumento de  $S_{UV}$  y del cociente  $a_{250}:a_{365}$ , indicadores de fototransformación, con una atenuación hacia el final de la exposición. Resultados similares fueron obtenidos, a través del análisis de la fluorescencia de la MOD, por Anesio et al. (1999), quienes observaron un efecto de la RUV sobre la calidad de la MOD lixiviada de macrófitas emergentes (*Phragmites australis*, *Typha angustifolia* y *Juncus* sp), con bajos valores de fluorescencia específica después de la irradiación, sin registrar diferencias entre los tratamientos UV-A y UV-A + UV-B. Asimismo, el análisis de la variación del cociente  $a_{250}:a_{365}$  a lo largo del tiempo completo de exposición mostró mayor degradación del lixiviado de *S. californicus* de ambos lagos. En el Lago Escondido, ambas macrófitas parecieron reaccionar a la exposición con UV con la misma rapidez en el primer período de exposición (dos horas y media); sin embargo, en el Lago El Trébol, el lixiviado de *P. linguatus* se degradó más lentamente. Farjalla et al. (2001), observó mayor rapidez en la fotólisis de los lixiviados de la macrófita con hojas flotantes *Hydrocharis morsus-ranae* que en los de la emergente *Phragmites australis*. Nuestros resultados no se corresponden completamente con estas observaciones previas y, por lo tanto, nuestra tercera hipótesis es parcialmente aceptada.

Si bien, es sabido que las macrófitas constituyen una importante fuente de carbono en el contenido total de MOD de los lagos, aún existe desconocimiento en cuanto a la calidad de MOD que aportan. Asimismo, existe poca información acerca de posibles variaciones en el contenido de nutrientes entre los lixiviados de diferentes especies de plantas acuáticas, y su correspondiente influencia en la calidad nutricional de los lagos. Entre las investigaciones más significativas realizadas al respecto se encuentra el estudio de Osborne et al. (2007), quien analizó la existencia de relaciones entre la composición química del tejido vegetal original (tejido senescente) y la naturaleza de la MOD lixiviada de dicho material. En el presente estudio, los lixiviados de las especies de macrófitas utilizadas en los experimentos, mostraron contenidos de P reactivo soluble significativamente diferentes. El lixiviado de *Potamogeton linguatus* fue el que presentó mayor contenido de PRS, con una concentración  $\sim 11.4$  mg PRS por gramo de macrófita, mientras que *S. californicus* presentó  $\sim 9$  mg  $g^{-1}$ . Estas observaciones se relacionan con el hecho de que las diferentes especies de macrófitas localizan los nutrientes en diversos tejidos estructurales y, por lo tanto, la MOD producida resulta diferente en cuanto a contenido de nutrientes (Davis & Van der Valk 1983). Es importante notar que muchas especies de plantas acuáticas



localizan nutrientes en sus rizomas y otras estructuras antes de la senescencia (Twilley et al. 1977); esta observación fue particularmente demostrada para PRS en un importante número de especies de macrófitas (Osborne et al. 2007). Probablemente la menor concentración de PRS registrada en los lixiviados de *S. californicus* se deba a que ha sido movilizado hacia su sistema rizoidal. Sin embargo, se requieren investigaciones más profundas acerca de la localización estructural del P y del N en los tejidos vegetales, particularmente de las especies presentes en los lagos someros de la zona andino-patagónica.

La exposición a radiación UV y a radiación fotosintéticamente activa de los lixiviados, solo evidenció liberación de PRS en el caso de *P. linguatus*. Si bien no se observaron diferencias significativas entre el tiempo inicial y el tratamiento expuesto a UV, la concentración media de PRS fue mayor transcurrido el tiempo de exposición, y similar a la concentración registrada en el tratamiento expuesto a radiación fotosintéticamente activa. Contrariamente a lo esperado, la mayor liberación de PRS se vio asociada al tratamiento oscuridad. El análisis de la variación de la relación  $a_{250}:a_{365}$  y de los valores de PRS, sugieren que en el lixiviado de *P. linguatus* la liberación de PRS estaría asociada a una disminución en el tamaño molecular de la MOD. Sin embargo la escasa diferencia en la concentración de PRS observada entre los diferentes tratamientos, podrían sugerir que el  $PO_4^{-3}$  se encuentra fuertemente ligado a las moléculas de MOD y que quizás es necesaria mayor intensidad de irradiación para su liberación. Por otro lado, los valores de PRS obtenidos para el lixiviado de *S. californicus*, parecen no mostrar relación con la fotodegradación de la materia orgánica, debido a que no se registró liberación de  $PO_4^{-3}$  en los tratamientos expuesto a RUV y RFA. La MOD en oscuridad, mostró la mayor liberación de PRS, a pesar de haberse registrado disminución en el tamaño molecular para este tratamiento. Estos resultados sugieren que la degradación de la MOD generada por la exposición lumínica (fotodegradación) sería diferente a la que se produce en oscuridad (degradación oscura), generando compuestos diferentes, lo cual se ve reflejado en una liberación diferencial de PRS, al menos en *S. californicus*.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten señalar que los lixiviados de las macrófitas *Potamogeton linguatus* y *Schoenoplectus californicus* contribuirían con el contenido total de MOD de los lagos someros resultando importantes para la dinámica de los mismos. Las diferencias observadas entre ambas macrófitas radican en el tamaño molecular de la MOD lixiviada y en el contenido de PRS. De esta manera, las variaciones



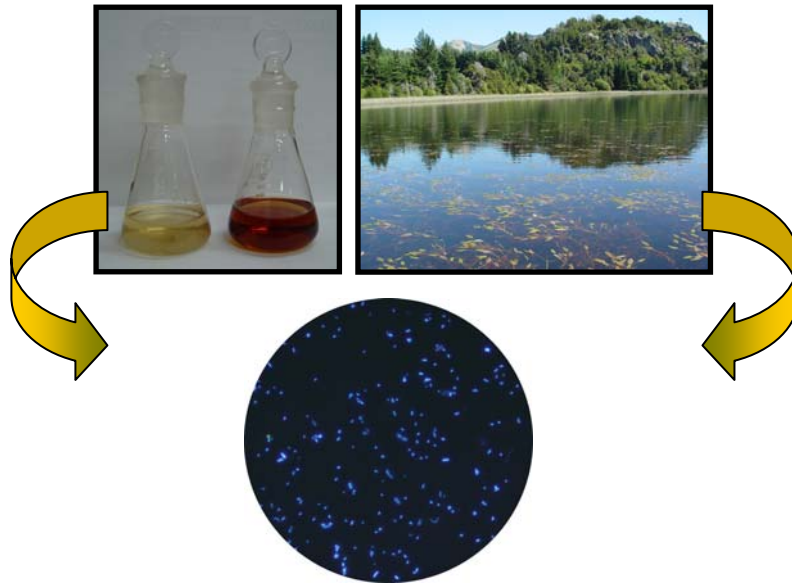
en las características ópticas de los lagos someros estudiados podrían también asociarse a diferencias en el aporte de las macrófitas. Un mayor aporte de lixiviados de *P. linguatus*, ocasionaría MOD de alto peso molecular; mientras que lixiviados de *S. californicus* ocasionaría MOD de menor peso molecular. Esta idea también puede asociarse con la concentración de PRS liberada. Si el mayor aporte de lixiviados es por *S. californicus*, se registrarán mayores concentraciones de PRS en oscuridad. En cambio, mayor concentración de PRS se observará bajo exposición a radiación UV y a radiación fotosintéticamente activa, en el caso de lixiviados de *P. linguatus*. Sin embargo, la MOD aportada por las macrófitas debe sufrir una descomposición biótica sucesiva significativa antes de aproximarse a los tamaños moleculares finales registrados para cada lago (ver Capítulo IV de esta tesis).





## CAPÍTULO IV

### EFECTO DE LA RUV SOBRE AGUA DE LAGO Y LIXIVIADO DE MACRÓFITAS: RESPUESTA BACTERIANA A CAMBIOS EN CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS DE LA MATERIA ORGÁNICA DISUELTA



## INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas acuáticos la materia orgánica disuelta (MOD) natural es una combinación de exudados, lixiviados, mineralización y condensación de productos provenientes del suelo, de la vegetación terrestre, macrófitas y algas. La mayor concentración de MOD presente en los cuerpos de agua dulce, comparados con ecosistemas marinos, se asocia a menudo a la presencia de macrófitas. Particularmente, en lagos someros con una zona litoral bien desarrollada, las macrófitas pueden constituir una importante fuente de MOD (Wetzel 1992). Las macrófitas son productores primarios de gran importancia en los ecosistemas acuáticos, contribuyendo con grandes cantidades de MOD, tanto a través de la liberación extracelular como a través del envejecimiento de los tejidos y subsiguiente liberación de constituyentes disueltos o particulados al agua circundante (Bertilsson & Jones 2003).



Uno de los principales papeles del carbono orgánico disuelto (COD) en los ambientes acuáticos es actuar como fuente de carbono y energía para la cadena microbiana. Las bacterias son organismos claves en el ciclo del carbono en los ecosistemas acuáticos, cumpliendo un rol preponderante en el flujo de energía a través de las redes alimentarias como consecuencia de su elevada abundancia y crecimiento potencial (Salonen et al. 1992). En relación con esto, los cambios en la composición y características del stock de MOD en los ecosistemas influyen sobre la estructura comunitaria o la actividad bacteriana o ambas (Reche et al. 1998; Pérez & Sommaruga 2006).

La interacción de la MOD con las RUV dan como resultado un importante número de reacciones fotoquímicas con una progresiva pérdida de color, un descenso en la absorbancia espectrofotométrica, especialmente en longitudes de onda corta y un menor tamaño molecular promedio (Morris & Hargreaves 1997). El tamaño y el peso molecular se indican a menudo como un factor determinante que influye sobre la utilización microbiana de la MOD, por lo tanto alteraciones fotoquímicas causadas por la radiación solar de longitud de onda corta pueden ser un factor que conduce a un aumento en la biodisponibilidad del COD (Tranvik & Bertilsson 2001). Estudios previos han demostrado que la radiación ultravioleta se relaciona con la biodisponibilidad de MOD (Lindell et al. 1995; Wetzel et al. 1995) debido a la ruptura de las moléculas de alto peso molecular a otras de menor peso. Recientemente, análisis de laboratorio de la interacción entre MOD y RUV, han demostrado tanto una estimulación del crecimiento bacteriano después de la fotoalteración de la MOD (De Lange et al. 2003), como un efecto negativo en la actividad bacteriana (Pérez & Sommaruga 2007).

Estudios previos en lagos andinos nord-patagónicos han demostrado que el incremento de la fotooxidación se relaciona principalmente con la radiación UV-A (Osburn et al. 2001). Debido a que estos lagos presentan zonas litorales extendidas colonizadas por la macrófita sumergida *Potamogeton linguatus* (Modenutti et al. 1998 y Capítulos I, II y III de esta tesis). De este modo, la MOD derivada de las macrófitas podría cumplir un rol importante como fuente de carbono para la actividad microbiana. Asimismo, la interacción entre la MOD del lago y la RUV depende en gran medida de la mezcla vertical, por lo que en los lagos someros, que presentan un régimen termal de mezcla continua, el efecto de la RUV sobre MOD puede ser uniforme a lo largo de la columna de agua (Zagarese et al. 2001). En el cuarto capítulo de esta tesis se analizó experimentalmente la respuesta del bacterioplancton a la adición de lixiviados de la macrófita sumergida *Potamogeton linguatus* y la modificación fotoquímica causada por la exposición a RUV. Los



experimentos se llevaron a cabo con el agua y la comunidad bacteriana correspondiente a dos lagos someros con stocks de MOD diferenciales: el Lago Escondido y el lago El Trébol. A continuación se detallan los objetivos e hipótesis de este capítulo.



## OBJETIVOS

1. Analizar el efecto interactivo entre la fuente de materia orgánica disuelta y la radiación UV en el crecimiento y la actividad bacteriana en dos lagos andinos someros del norte de la Patagonia (Lago Escondido y Lago El Trébol).
2. Analizar la variación en la composición del ensamble bacteriano a cambios en la fuente y tamaño molecular relativo de la MOD.

## HIPÓTESIS

1. La fuente de MOD afecta la actividad y abundancia bacteriana.
2. La estructura del ensamble bacteriano cambiaría dependiendo de la fuente de MOD.

## PREDICCIONES

De acuerdo con la primera hipótesis se establecieron las siguientes predicciones:

1. La adición de MOD estimularía a las bacterias.
2. La adición de lixiviado incrementará el crecimiento bacteriano y la actividad, y finalmente.
3. La actividad bacteriana generará un incremento en el tamaño relativo de la MOD por el consumo preferencial de MOD de bajo peso molecular.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### SITIO DE ESTUDIO Y MUESTREO

Para llevar a cabo este experimento se utilizó agua y lixiviados de macrófitas de los lagos Escondido y El Trébol. Como se mencionó en el capítulo I, estos lagos presentan comunidades bacterianas con producciones (primaria y bacteriana) diferenciales, por lo que resulta interesante este estudio comparativo. Además, ambos lagos presentan zonas litorales con la misma composición de macrófitas, por lo que resulta válida la utilización de sus lixiviados y la comparación entre las respuesta bacterianas frente a la adición de éstos.

Este estudio se llevó a cabo en verano de 2007 durante el mes de enero, momento de mayor intensidad lumínica del año, como se señaló también para los ensayos realizados en el Capítulo III. Un día antes del comienzo del experimento, se colectó un volumen de 5 litros de agua de cada lago y se tomaron perfiles verticales de temperatura, de irradiancia en las bandas de UV (305, 320, 340 y 380 nm) y Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA, 400-700 nm) con un radiómetro sumergible PUV 500B (Biospherical Instruments). El agua se muestreó en la capa superficial de cada uno de los lagos, se colocó en bidones lavados previamente con ácido clorhídrico y se transportó inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. Parte del volumen muestreado se designó para la determinación de la concentración de nutrientes, Carbono Orgánico Disuelto (COD), abundancia y caracterización del ensamble natural de procariotas.

### TRABAJO DE LABORATORIO

El agua de lago se filtró a través de filtros GF/F muflados y luego a través de filtros de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  (MSI N02SP02500). El volumen filtrado fue utilizado para la determinación de amonio (N-NH<sub>4</sub>), Fósforo Disuelto Total (PDT) y concentración de COD. La potencial contribución de COD por parte de los filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  fue analizada previamente comparando agua MilliQ filtrada y no filtrada. No se observaron diferencias, por lo que concluimos que los filtros no contribuyeron con COD a la muestra. Por otro lado, la concentración de Fósforo Total (PT) se determinó en agua sin filtrar. Para las determinaciones de PT y PDT, las muestras fueron digeridas con persulfato a 125°C a 1.5 atm durante 1 h. La concentración de fósforo se determinó por el método de reducción con ácido ascórbico y el amonio por el método de azul de indofenol (APHA 1992).



Un volumen de 30 mL de cada muestra se transfirió a frascos de borosilicato muflados y mantenidos en oscuridad a 4°C hasta la determinación de la concentración de COD con un Shimadzu TOC 5000 (ISE, Pallanza, Italia). Además, se realizaron escaneos espectrofotométricos (250 nm- 790 nm) del agua de lago filtrada por 0.2 µm en cubetas de cuarzo de 10 cm de paso óptico utilizando un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV2450. Se calculó la relación  $a_{250} : a_{365}$  como una medida del tamaño molecular relativo de las moléculas de MOD (Pérez & Sommaruga 2007). Además, se utilizó el coeficiente de absorción COD-específico a 254 nm ( $a^*_{254}$ ), como una estimación del grado de aromaticidad de la material orgánica disuelta presente en cada lago y luego en cada tratamiento del experimento (Weishaar 2003; Pérez & Sommaruga 2007). La caracterización del ensamble procariota se llevó a cabo utilizando la técnica de Hibridización Fluorescente *in situ* con Señal Amplificada por Deposición de Catalizador (CARD-FISH) de acuerdo con Sekar et al. (2003) y Pernthaler et al. (2002).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento consistió en la incubación del ensamble procariota natural de los lagos Escondido y El Trébol. Se llevó a cabo un diseño factorial de dos factores:

1. Fuente de MOD, con “Agua de lago” y “Lixiviado de macrófitas” como niveles.
2. Irradiación previa de la MOD con RUV, con “Irradiado” y “No Irradiado” como niveles.

La incubación se llevó a cabo en un incubador en condiciones de oscuridad, tapando los frascos con papel de aluminio, y a una temperatura constante de 20°C (Fig. 4.1).

Las diferentes fuentes de MOD se obtuvieron como se describe a continuación. El agua de lago (Lago Escondido y Lago El Trébol) fue filtrada en forma secuencial a través de filtros GF/F muflados (a 450°C durante 1 h) (Whatmann) y luego a través de filtros estériles de celulosa de 0.2 µm (Sartorius). Todo el material de vidrio utilizado fue esterilizado previamente a través de un autoclavado durante 30 minutos. Un volumen de 800 mL de agua de lago filtrada se distribuyó en tubos de cuarzo de 50 mL, previamente muflados, y fue artificialmente irradiado durante 5 h con dos tubos fluorescentes UVA-340 (Q-Panel Lab Products, Cleveland, OH, U.S.A.). Los tubos de cuarzo se distribuyeron horizontalmente en un soporte a 30 cm de distancia de la fuente de luz de acuerdo a Bertilsson & Tranvik (2000). Como se señaló en el capítulo III, el espectro de UV de los



tubos de luz utilizados es cercano a la luz solar entre los 280 y 350 nm (Shick 1992). Durante la incubación, se midió la irradiancia recibida por los tubos con un radiómetro PUV 500B (Biospherical Instruments). Las mediciones efectuadas revelaron que el agua recibió  $35 \mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  de la banda de 340 nm. Este nivel de irradiancia es equivalente a la luz solar recibida al mediodía en verano en la superficie de los lagos andinos. Con este procedimiento se estableció el tratamiento AL-UV (agua de lago filtrada e irradiada) mientras que el agua de lago sin exponer a UVR constituyó el tratamiento AL (agua de lago filtrada).

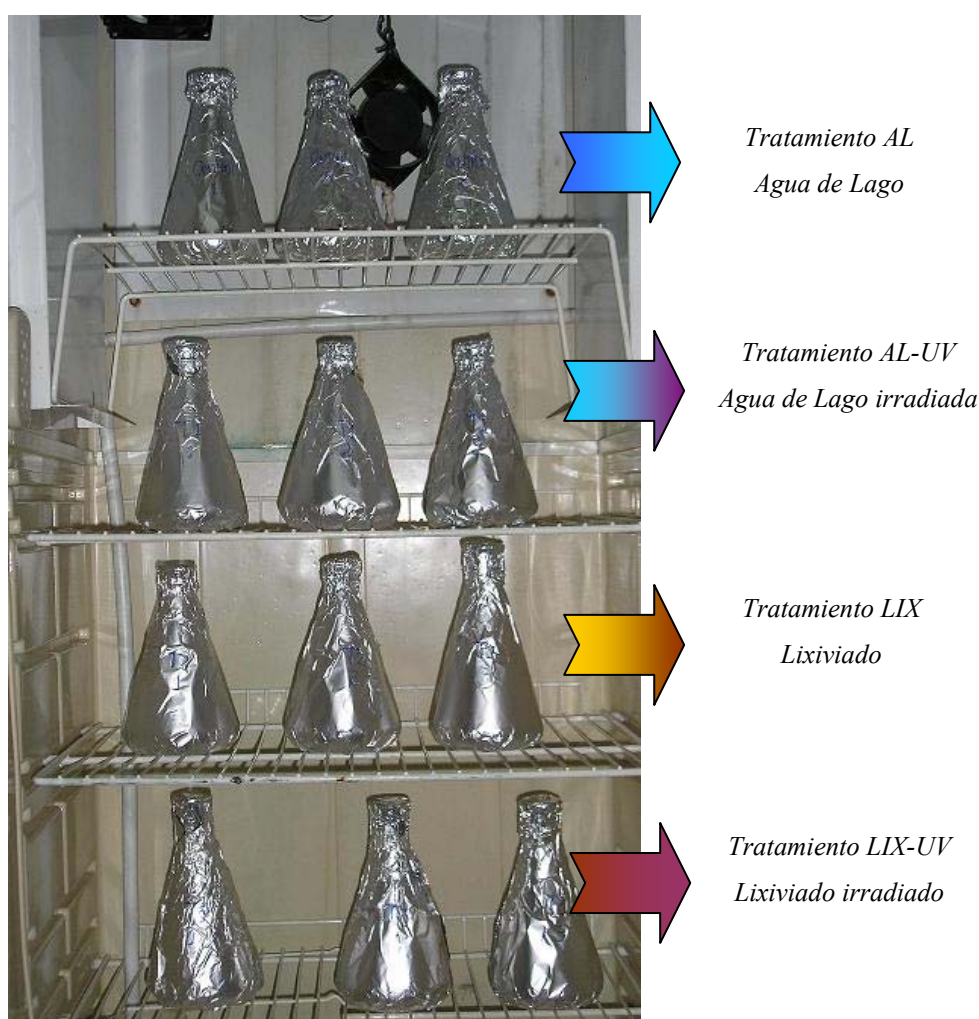


Figura 4.1. Fotografía del incubador con los diferentes tratamientos del experimento y sus respectivas réplicas.

Con el objetivo de obtener el lixiviado de macrófitas, se recolectaron hojas de *P. linguatus* en cada lago. Las hojas fueron cuidadosamente lavadas con agua destilada para



remover la flora y fauna asociada, y luego fueron secadas a temperatura ambiente. Dos días previos a la realización del experimento se comenzó con la preparación del lixiviado. Las hojas de macrófitas fueron colocadas en agua MilliQ en heladera (4°C) durante 48 horas de acuerdo al protocolo de Anesio et al. (2000). El lixiviado obtenido fue tratado como el agua natural de lago, es decir, filtrado a través de filtros GF/F muflados y filtros estériles de acetato de celulosa de 0.2 µm. El volumen filtrado obtenido fue diluido con agua MilliQ hasta una concentración final aproximada de 3 mg L<sup>-1</sup> de COD. Finalmente, 800 mL de lixiviado diluido fueron irradiados en tubos de cuarzo como se describió anteriormente para el agua de lago. Estos lixiviados constituyeron el tratamiento LIX (lixiviado) y tratamiento LIX-UV (lixiviado irradiado). En todos los casos, se utilizaron 50 mL de agua (3 réplicas) para la determinación de COD y la obtención del espectro de absorbancia.

Se colocaron 250 mL de cada preparación (AL, AL-UV, LIX y LIX-UV) en frascos de 500 mL por triplicado. A continuación, se completaron todos los frascos con 250 mL de un inóculo de bacterias. El inóculo de bacterias se preparó filtrando agua de lago (Lago Escondido o El Trébol) a través de filtros de policarbonato de 2 µm con el objetivo de eliminar predadores tales como nanoflagelados y ciliados. Cabe señalar que se llevó a cabo un estudio adicional previo, el cual mostró que si se filtra el agua de lago a través de 1 µm se retiene el 60 % de la comunidad bacteriana (Tabla 4.1). Es por esta razón que se decidió filtrar a través de 2 µm para asegurar la obtención del ensamble procariota natural completo de cada lago. Por otro lado, se midió la retención de flagelados en el filtrado de 2 µm y no se observó presencia de estos organismos. En los lagos Escondido y El Trébol la mayoría de los flagelados (> 90 %) corresponden a especies mixotróficas mayores a las 2 µm, tales como *Chrysochromulina parva* (la especie más pequeña) que presenta un diámetro promedio de 3.6 µm, mientras que los nanoflagelados heterotróficos se encuentran en muy baja proporción (5- 8 %). Sin embargo, no podemos garantizar que esporas u otras formas de resistencia hayan sido filtradas a través de filtros de 2 µm. De todas maneras, las muestras analizadas al finalizar el tiempo de incubación (96 horas) no mostraron presencia de flagelados en las muestras, indicando que si alguna espora fue filtrada, el crecimiento de los flagelados fue indetectable, por lo tanto no pudieron causar alta mortalidad bacteriana en los experimentos. Durante la incubación, no observamos una disminución en el crecimiento bacteriano, excepto en una réplica del Lago Escondido (AL-UV) que fue eliminada del análisis. Por otro lado, la condición de oscuridad, bajo la cual se realizó la incubación, podría probablemente sustentar la observación de un crecimiento indetectable por parte de nanoflagelados mixotróficos.





Tabla 4.1. Abundancia bacteriana en muestras del lago Escondido de dos fechas diferentes en agua sin filtrar, filtrada a través de filtros de policarbonato de 2  $\mu\text{m}$  y de 1  $\mu\text{m}$ .

	Sin filtrar	2 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$
Abundancia bacteriana (x $10^6$ cél $\text{mL}^{-1}$ )	1.676	1.583	0.502
	3.909	2.730	2.004
Porcentaje promedio de pérdida celular	-	17	60

Se tomaron submuestras al inicio del experimento (T0), a las 48 horas (T2) y a las 96 horas (T4) para la determinación de la producción, abundancia, e identificación bacteriana. Asimismo, se tomaron submuestras en T0 y T4 para realizar los escaneos espectrofotométricos. La submuestra correspondiente a T0 se obtuvo 2 horas después del montado del experimento, para permitir a las bacterias aclimatarse a las condiciones experimentales.

También se realizaron experimentos adicionales con el objetivo de analizar potenciales cambios en la MOD en ausencia de un inóculo bacteriano. Éstos tratamientos fueron denominados AL-CONTROL y LIX -CONTROL, y consistieron en agua de cada lago y lixiviados, respectivamente. Los frascos fueron incubados como se describió anteriormente para los demás tratamientos, obteniéndose submuestras diariamente para realizar escaneos espectrofotométricos.

#### DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN, ABUNDANCIA BACTERIANA E IDENTIFICACIÓN DEL ENSAMBLE PROCARIOTA

Se midió producción bacteriana como incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Leucina (Simon & Azam 1989) como se describió en los capítulos I y II. La actividad del ensamble bacteriano se evaluó como producción específica, dividiendo la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]-Leucina por la abundancia celular bacteriana.

Las muestras de bacterias (10 mL) fueron conservadas con solución de formaldehído filtrado (0.2  $\mu\text{m}$ ) (concentración final de 2 % v/v). La enumeración de células totales se



llevó a cabo tiñendo con DAPI, bajo microscopio de epifluorescencia. Se contó un mínimo de 1000 células de bacterias totales por muestra y se procesaron las imágenes con un sistema de análisis de imágenes (Image ProPlus; Media Cybernetics).

La técnica de CARD-FISH se llevó a cabo como se describió en el Capítulo II. Básicamente, esta técnica se lleva a cabo utilizando sondas marcadas con una señal tiramida de amplificación como describió Pernthaler et al. (2002). Un volumen aproximado de 10 mL de muestra de agua se filtró a través de filtros de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  (Nuclepore). Los filtros fueron embebidos en agarosa en baja densidad, secados a temperatura ambiente y luego almacenados a 20 °C hasta su procesamiento. A continuación se cortaron los filtros en pequeñas porciones, las cuales fueron permeabilizadas con lisozima y acromopeptidasa de acuerdo a Sekar et al. (2003). La hibridización con sondas de oligonucleótidos marcados con 5'-horseradish peroxidasa (HPR), se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Pernthaler et al. (2002) en frascos de reacción de 0.5 mL con 300  $\mu\text{L}$  de buffer de hibridización y las sondas marcadas con 5'-HPR a una concentración final de 0.5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Las sondas utilizadas para el análisis de los ensamblajes naturales de los lagos correspondieron a EUB338 para el dominio *Bacteria*, ARCH915 para el dominio *Archaea*, BET42a para la subclase  $\beta$ -*Proteobacteria*, CF319 para el grupo de *Cytophaga-Flavobacterium*, y HGC69 para la clase *Actinobacteria*. Durante el experimento se estudiaron las variaciones en el ensamblaje bacteriano mediante el análisis de los grupos  $\beta$ -*Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium*, y *Actinobacteria*. Además, se utilizó la sonda NON338 como control. La proporción de formamida en el buffer de hibridización fue siempre del 55 %, excepto para las sonda ARCH915 (40 %) y HGC69a, para las cuales se utilizó un 35 %. Las células se hibridizaron a 35°C durante al menos 2 horas y hasta un tiempo máximo de 4 horas. Después de la hibridización, las secciones de filtros se lavaron en buffer de lavado a 37°C durante 15 minutos con una apropiada cantidad de cloruro de sodio, dependiendo de la proporción de formamida en el buffer de hibridización (Sekar et al. 2003). Los filtros se tiñeron con DAPI (1 mg: 100 mL) y se analizaron bajo microscopio de epifluorescencia Olympus BX 50 con un aumento de 1250X. Se contaron al menos 10 campos al azar para enumerar las bacterias teñidas con FISH, y se calculó el valor porcentual de cada taxa de bacterias.



## ANÁLISIS DE DATOS

La tasa de crecimiento bacteriano fue calculado en dos intervalos: T0-T2 y T2-T4; de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\text{Ln}N_f - \text{Ln}N_i}{\Delta t}$$

donde  $\mu$  es la tasa de crecimiento bacteriano,  $N_i$  es la abundancia bacteriana inicial,  $N_f$  es la abundancia bacteriana final y  $\Delta t$  es el tiempo de incubación en días.

La significancia del efecto de los tratamientos a lo largo del tiempo de incubación para las características ópticas de la MOD, la abundancia bacteriana, la producción bacteriana específica y el porcentaje de bacterias teñidas con DAPI, se analizó utilizando un análisis de varianza factorial de 4 x 3 (ANOVA de doble vía de medidas repetidas). Para el análisis de las tasas de crecimiento se aplicó un ANOVA de dos vías. Las comparaciones múltiples fueron realizadas con un Test de Tukey con un nivel de significancia de  $P = 0.05$ . Los valores de concentración de nutrientes de ambos lagos se compararon con un Test  $t$ . Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los paquetes estadísticos SigmaPlot 11.0 y Statistica 6.0.



## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS ÓPTICAS Y QUÍMICAS DE LOS LAGOS Y LOS EXPERIMENTOS

Los lagos Escondido y El Trébol mostraron coeficientes de atenuación similares para las longitudes de onda en la región de RFA (Tabla 4.2) y, en ambos lagos, la RFA alcanzó el fondo, mostrando una irradiancia de  $15.33 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en el Lago Escondido y  $19.4 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  en el Lago El Trébol. Sin embargo, los coeficientes de atenuación en el rango de UV mostraron diferencias y dichas diferencias se incrementaron hacia menores longitudes de onda. En particular, en el Lago Escondido se observó una absorción más intensa en las longitudes de onda cortas de la radiación solar (Tabla 4.2).

La concentración de COD varió entre los dos lagos, siendo el Lago Escondido el que presentó mayores valores de concentración (Tabla 4.3). De la misma manera, el tamaño relativo medio de los compuestos de MOD, expresados con la relación  $a_{250}:a_{365}$ , fue menor en este lago, indicando un mayor peso molecular promedio (Tabla 3.3, Test  $t$  entre AL de los lagos Escondido y El Trébol,  $P < 0.001$ ). Estos valores sugieren que la MOD de ambos lagos difiere en su tamaño o peso molecular y en sus características ópticas.

La concentración de nutrientes al momento de este experimento fue diferente entre los dos lagos. La concentración de N-NH<sub>4</sub> y PT fue mayor en el Lago El Trébol (Tabla 4.2, Test  $t$ ,  $P = 0.031$  y  $P = 0.035$ , respectivamente) mientras que el PDT no mostró diferencias significativas (Test  $t$ ,  $P = 0.206$ ). La biomasa de organismos autótrofos, estimada como concentración de clorofila  $a$ , también mostró importantes diferencias entre los lagos, exhibiendo el Lago El Trébol valores significativamente mayores (Test  $t$ ,  $P = 0.004$ ).



Tabla 4.2. Características ópticas y químicas de los lagos Escondido y El Trébol al comienzo de la incubación. La concentración de nutrientes y clorofila *a* se expresan como media  $\pm$  error standard.

	ESCONDIDO	EL TRÉBOL
$K_{d\text{RFA}}$	0.492	0.487
$K_{d\text{380}}$	2.692	1.615
$K_{d\text{340}}$	4.671	2.289
$K_{d\text{320}}$	6.343	2.766
$K_{d\text{305}}$	8.069	2.970
$\text{N-NH}_4^+$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$4.28 \pm 1.42$	$6.48 \pm 1,79$
PDT ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$4.1 \pm 0.9$	$5.2 \pm 0.57$
PT ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$5.7 \pm 1.86$	$11.4 \pm 2.5$
Clorofila <i>a</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$0.9 \pm 0.37$	$5.50 \pm 0.12$

En nuestros experimentos, la concentración inicial de COD en (T0) del agua de lago y los lixiviados de macrófitas, variaron en todos los casos (Tabla 4.3, ANOVA dos vías,  $P < 0.001$  y Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$ , excepto los lixiviados entre Lago Escondido y El Trébol  $P > 0.05$ ).



Tabla 4.3. Características ópticas de la MOD en los tratamientos (AL, AL-UV, LIX y LIX-UV) al comienzo (T0) y al final (T4) del experimento. La concentración de COD, la relación  $a_{250}: a_{365}$  y  $a_{254}^*$  se expresan como media  $\pm$  error standard.

Lago	Tratamiento	COD (mg L <sup>-1</sup> )	$a_{250}: a_{365}$		$a_{254}^*$	
			T0	T4	T0	T4
ESCONDIDO	AL	2.46 $\pm$ 0.10	4.942 $\pm$ 0.062	4.19 $\pm$ 0.07	7.636 $\pm$ 0.365	7.445 $\pm$ 0.460
	AL-UV		5.312 $\pm$ 0.158	4.42 $\pm$ 0.05	9.337 $\pm$ 0.30	7.664 $\pm$ 1.280
	LIX	3.04 $\pm$ 0.04	2.812 $\pm$ 0.018	3.26 $\pm$ 0.28	7.917 $\pm$ 0.38	5.567 $\pm$ 1.133
	LIX-UV		2.968 $\pm$ 0.002	3.36 $\pm$ 0.09	9.617 $\pm$ 0.858	5.803 $\pm$ 0.884
EL TRÉBOL	AL	2.12 $\pm$ 0.16	7.60 $\pm$ 0.123	5.01 $\pm$ 0.16	3.780 $\pm$ 0.167	7.670 $\pm$ 0.961
	AL-UV		12.10 $\pm$ 2.060	5.88 $\pm$ 0.06	4.616 $\pm$ 0.054	8.585 $\pm$ 0.422
	LIX	3.15 $\pm$ 0.01	2.11 $\pm$ 0.169	3.17 $\pm$ 0.05	5.211 $\pm$ 0.005	6.355 $\pm$ 0.116
	LIX-UV		2.59 $\pm$ 0.114	3.46 $\pm$ 0.03	6.836 $\pm$ 0.648	7.521 $\pm$ 0.504

El agua de lago y los lixiviados de macrófitas cambiaron sus características ópticas después de la exposición a RUV. En ambos casos, el valor absoluto de la pendiente de la curva de absorbancia en la región UV del espectro (250-400 nm) incrementó luego de la exposición, como también aumentó la absorbancia a longitudes de onda corta (< 300 nm). Aunque se observaron algunas diferencias entre los espectros de ambos lagos, la tendencia general fue la misma, mostrando los mayores valores de absorbancia hacia las longitudes de onda más cortas. Sin embargo, las curvas de los lixiviados variaron en relación al agua de lago, mostrando absorbancias mucho más altas en el rango de UV-B y UV-A, con un patrón bimodal (Fig. 4.2a y c). Luego de 96 horas de incubación, las características ópticas del agua fueron modificadas por la actividad bacteriana. La tendencia observada en ambos lagos consistió en una reducción de las diferencias entre los tratamientos, llevando las características ópticas a asemejarse al agua de lago (Fig. 4.2b y d). En este caso, el patrón bimodal de los lixiviados, observado al comienzo de la incubación, se vio suavizado hasta incluso desaparecer. Por otro lado, transcurridas las 96 horas de incubación, los tratamientos CONTROL (AL y LIX) mantuvieron las misma tendencia observada en el T0 de los tratamientos AL y LIX, evidenciando estabilidad química transcurrida la incubación.

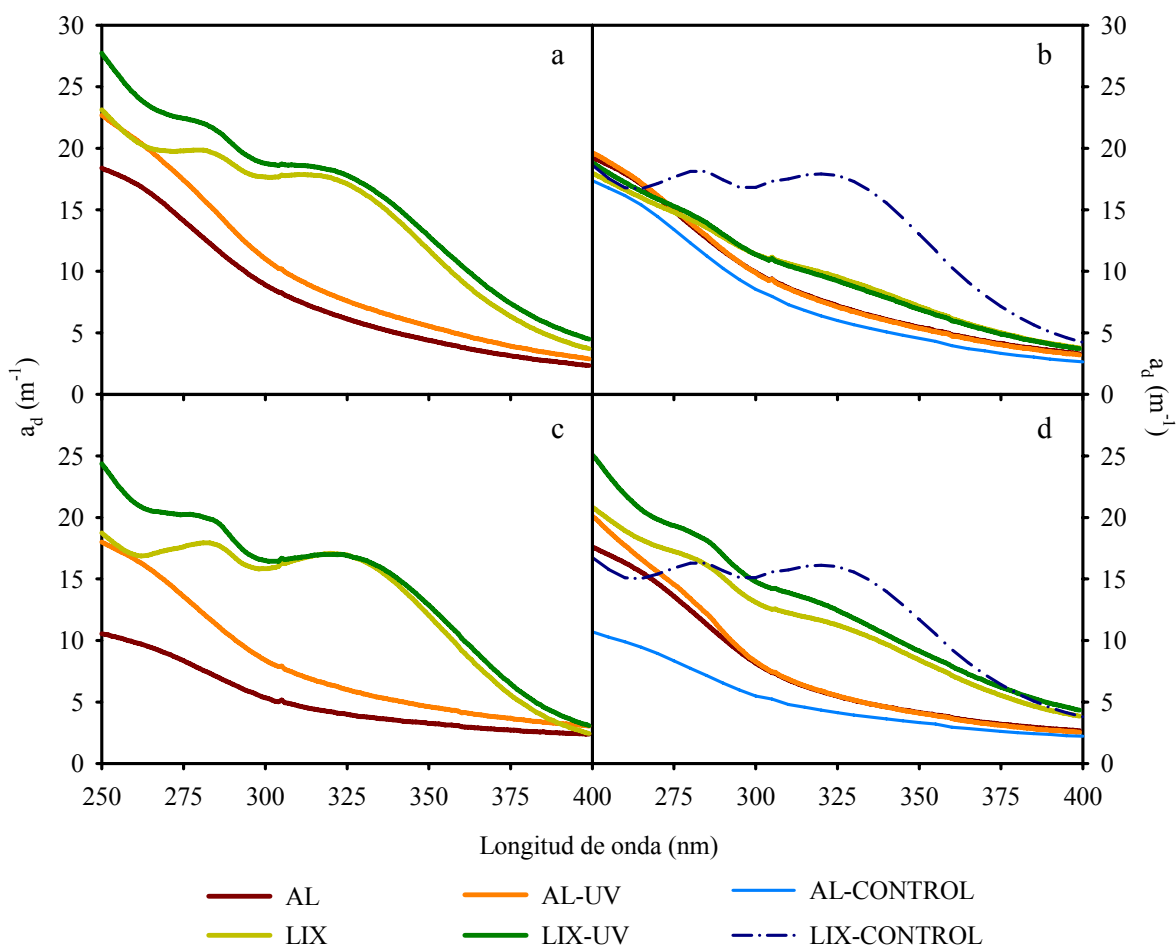


Figura 4.2. Espectros de absorbancia espectrofotométrica de los diferentes tratamientos al comienzo (T0) y al final de (T4, 96 h) de la incubación. a: Lago Escondido en T0, b: Lago Escondido en T4, c: Lago El Trébol en T0, b: Lago El Trébol en T4. AL: Agua de lago; AL-UV: Agua de lago expuesta a UV; LIX: Lixiviado de macrófita; LIX-UV: Lixiviados de macrófita expuesto a UV; AL-CONTROL: Control de agua de Lago; LIX-CONTROL: Control de lixiviado de macrófita.

En el lago Escondido la relación  $a_{250} : a_{365}$  mostró diferencias significativas entre los tratamientos y el tiempo (T0 y T4) (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, tratamientos  $P < 0.001$  y tiempo  $P = 0.028$ ). La exposición a RUV y la adición de lixiviados en el lago Escondido produjo un leve y no significativo incremento en la relación (Tabla 4.3, Test *a posteriori* de Tukey, AL vs AL-UV  $P = 0.086$  y LIX vs LIX-UV  $P =$



0.077). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre el agua de lago y los lixiviados (Tabla 4.3, Test *a posteriori* de Tukey, AL vs LIX  $P < 0.001$  y AL-UV vs LIX-UV  $P < 0.001$ ). Transcurridas las 96 horas de incubación, se observaron diferencias significativas entre todos los tratamientos (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$  en todos los casos), confirmando que la actividad bacteriana modifica las características ópticas de la MOD, tanto del agua de lago como de los lixiviados).

En el Lago El Trébol la relación  $a_{250}: a_{365}$  también mostró diferencias significativas (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, tratamientos  $P < 0.001$  y tiempo  $P = 0.003$ ), pero en este caso la exposición a RUV generó una variación significativa en la relación en el agua de lago (Tabla 4.2, Test *a posteriori* de Tukey, AL vs AL-UV  $P < 0.001$ ). Después de las 96 horas de incubación, el agua de lago mostró diferencias con los otros tratamientos, como en el lago Escondido (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$  en AL y AL-UV).

El coeficiente de absorción DOC-específico a 254 nm ( $a^{*254}$  a T0) exhibió en el Lago Escondido casi el doble de los valores registrados en El Trébol, indicando un mayor grado de aromatización (Tabla 4.3, Test *t* AL Escondido vs El Trébol,  $P < 0.001$ ).

En ambos lagos el coeficiente mostró diferencias significativas entre los tratamientos y en el tiempo (Tabla 4.3, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, Lago Escondido, Tratamientos  $P = 0.021$  y Tiempo  $P < 0.001$ ; Lago El Trébol, Tratamientos  $P = 0.001$  y Tiempo  $P < 0.001$ ).

Después de la exposición a RUV, los valores de  $a^{*254}$  incrementaron significativamente en todos los tratamientos en el lago El Trébol (Test *a posteriori* de Tukey, AL vs AL-UV  $P < 0.001$  y LIX vs LIX-UV  $P = 0.049$ ) y en el agua natural del Lago Escondido (Test *a posteriori* de Tukey, AL vs AL-UV  $P = 0.024$ ). Después de la incubación el coeficiente  $a^{*254}$  decreció significativamente en todos los tratamientos excepto en el agua natural del Lago Escondido (Tabla 4.3, Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$ ). Por el contrario, en el lago El Trébol este parámetro se vio incrementado en todos los tratamientos excepto en el LIX-UV, indicando un mayor grado de aromatización después de la actividad bacteriana (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$ ).

#### ABUNDANCIA BACTERIANA, TASA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN BACTERIANA

La abundancia bacteriana inicial fue muy similar entre los tratamientos en los dos lagos, variando entre  $1.31$  y  $1.76 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, y aumentando a lo largo del tiempo de





incubación en ambos lagos (Fig. 4.2). En los dos experimentos, los lixiviados de macrófitas expuestos a UV (LIX-UV) presentaron las mayores abundancias, seguidos por los lixiviados no irradiados (LIX), luego por el agua de lago expuesta a RUV (AL-UV) y finalmente el agua de lago no expuesta (AL) (ANOVA de dos vías de medidas repetidas,  $P < 0.05$  en todos los casos) (Fig. 4.2).

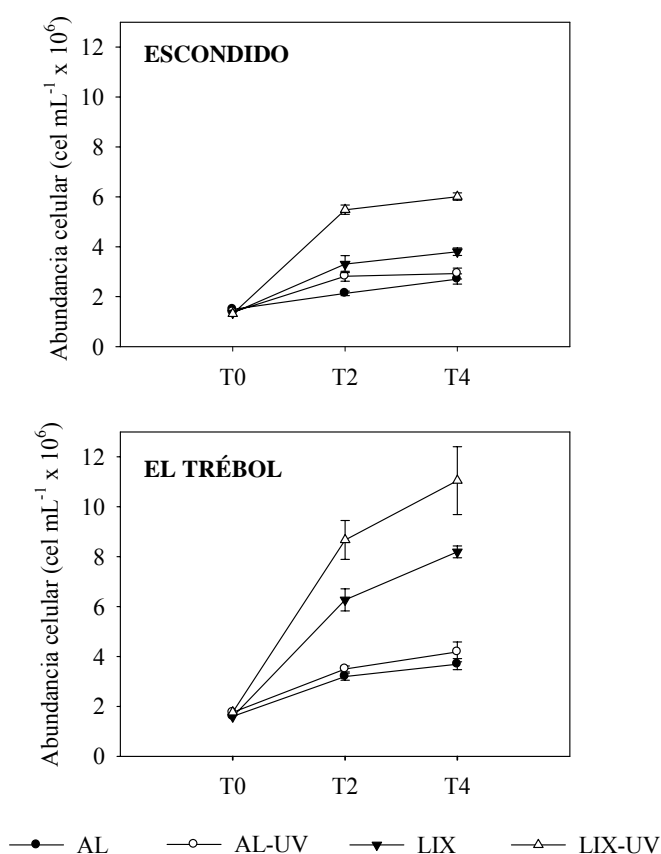


Figura 4.2. Abundancia celular bacteriana ( $\text{cél mL}^{-1}$ ) durante el tiempo de incubación en los cuatro tratamientos en los lagos Escondido y El Trébol. Los símbolos en cada tiempo representan la media de tres réplicas; las barras verticales corresponden a  $\pm$  el error standard.

Los mayores incrementos se observaron en las primeras 48 horas observándose luego una reducción de dicho incremento, en todos los tratamientos y en los dos lagos (Fig. 4.2). En particular, en T2 y T4, el Test *a posteriori* de Tukey indicó que en ambos experimentos existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 4.2). Este efecto fue



confirmado con el cálculo de las tasa de crecimiento de cada tratamiento. Claramente se pudo observar que ambos lagos muestran mayores tasas de crecimiento bacteriano en el primer intervalo de incubación (T0-T2) en todos los tratamientos, incrementando desde AL hacia LIX-UV (ANOVA de dos vías, en Lago Escondido,  $P = 0.013$  y en Lago El Trébol,  $P < 0.001$ ). En el segundo período de 48 horas de incubación, las tasas de crecimiento fueron menores que aquéllas del primer intervalo, para todos los tratamientos (Fig. 4.3).

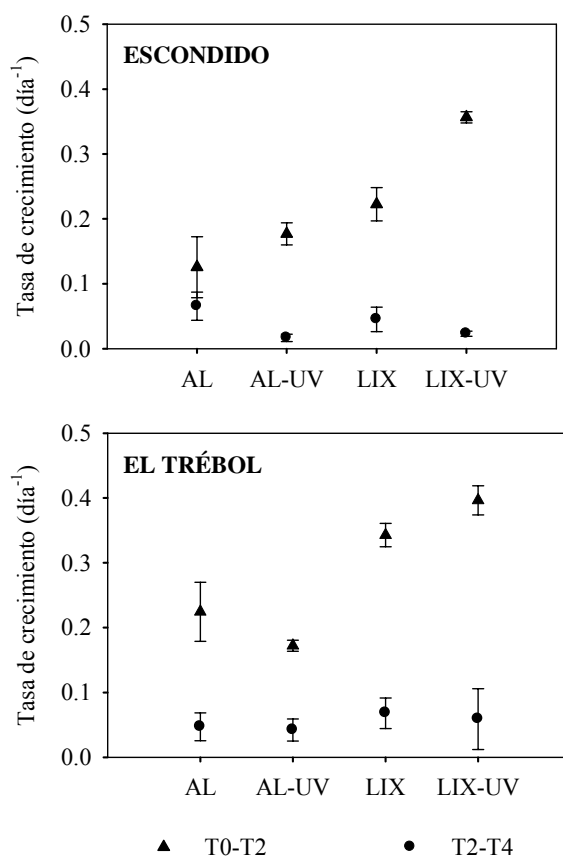


Figura 4.3. Tasa de crecimiento (día<sup>-1</sup>) en los intervalos: tiempo inicial-48 h (T0-T2) y 48-96 h (T2-T4), en los cuatro tratamientos en los lagos Escondido y El Trébol. Los símbolos en cada nivel de tratamientos representa la media de cultivos triplicados; las barras verticales corresponden a los valores promedio  $\pm$  el error standard.

La producción bacteriana específica celular se mostró altamente dependiente de la fuente de MOD (ANOVA de dos vías de medidas repetidas,  $P < 0.001$  entre tratamientos y tiempo,  $P = 0.002$  tratamientos x tiempo) mostrando diferentes patrones en los lagos (Fig. 4.4). En el lago Escondido se observaron mayores valores en los tratamientos con lixiviados de macrófitas (LIX y LIX-UV), siendo el LIX el de mayor producción (Fig. 4.4,



LIX diferente de todos los demás tratamientos; Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.05$  en todos los casos). Por el contrario, en el Lago El Trébol los mayores valores de producción bacteriana se observaron en el agua de lago (AL y AL-UV), en particular, en el tratamiento de agua de lago expuesta a RUV (Fig. 4.4, AL diferente de todos los demás tratamientos; Test *a posteriori* de Tukey,  $P = 0.002$  en todos los casos). Considerando el tiempo de incubación, la producción bacteriana fue muy baja en el agua (expuesto y no expuesta a RUV) del Lago Escondido durante todo el tiempo de incubación (Test *a posteriori* de Tukey,  $P > 0.05$ ). Todos los tratamientos del Lago El Trébol y los LIX y LIX-UV del lago Escondido mostraron incrementos significativos en la producción bacteriana entre el tiempo inicial y T2 (Test *a posteriori* de Tukey,  $P < 0.001$  en todos los casos).

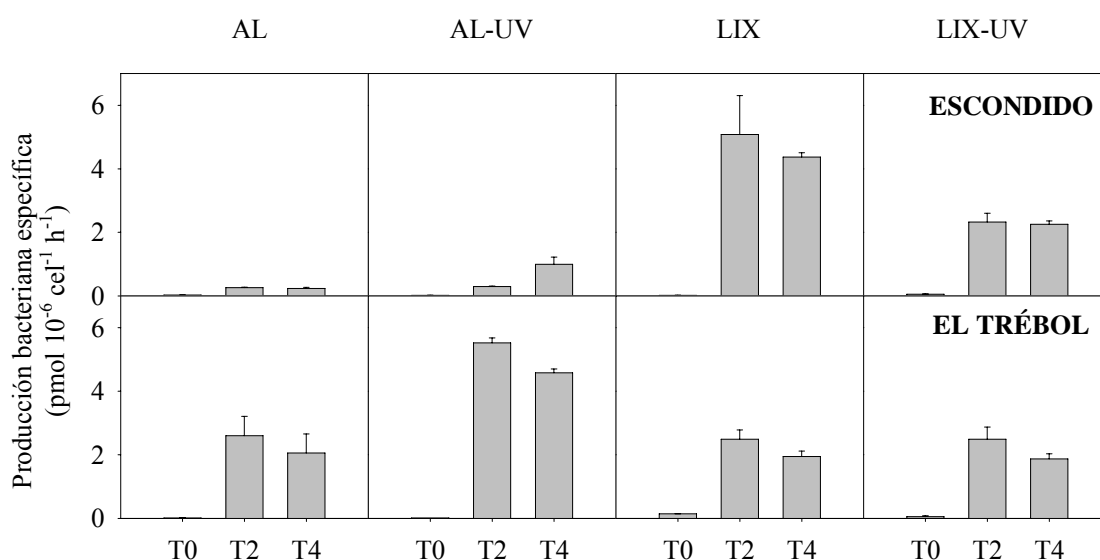


Figura 4.4. Producción bacteriana específica celular ( $\text{pmol } 10^{-6} \text{ cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en los tratamientos durante las incubaciones. Cada barra es la media de cultivos triplicados  $\pm$  el error standard.

#### CARACTERIZACIÓN DEL ENSAMBLE PROCARIOTA

Tanto en el lago Escondido como en El Trébol se observó una dominancia del dominio *Bacteria* (EUB338) sobre *Archaea* (ARCH915) (Fig. 4.5). Considerando las células marcadas, *Bacteria* (EUB338) estuvo representada por un promedio de 63.3 % en el Lago Escondido y un 70 % en el Lago El Trébol, mientras que *Archaea* solo un 1.2 % y



1.5 %, respectivamente. El ensamble de *Bacteria* se vio dominado por el grupo de las  $\beta$ -*Proteobacteria*, seguido por *Actinobacteria* en el Lago El Trébol y por bacterias *Cytophaga-Flavobacterium* en el Lago Escondido (Fig. 4.5).

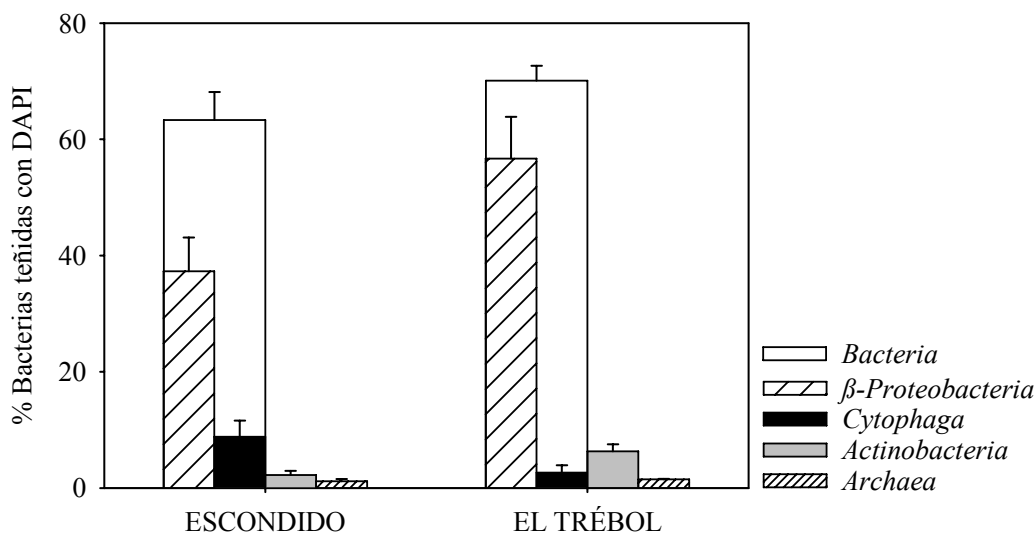


Figura 4.5. Abundancia relativa de los grupos bacterianos determinados con las sondas EUB338 (*Bacteria*), BET42a ( $\beta$ -*Proteobacteria*), CF319 (*Cytophaga-Flavobacterium*), HGC6a (*Actinobacteria*) y ARCH915 (*Archaea*) en los lagos Escondido y El Trébol en muestras superficiales. Los valores están expresados como porcentaje de bacterias teñidas con DAPI y representan la media de tres réplicas  $\pm$  el error standard.

Durante nuestro experimento con agua del lago Escondido y lixiviados, se mantuvo la dominancia de  $\beta$ -*Proteobacteria* (Fig. 4.6a). Sin embargo, en nuestro tratamiento con agua de lago no irradiada se observaron importantes cambios en la abundancia relativa de los grupos *Cytophaga* y *Actinobacteria*, cuyos valores se vieron incrementados en T2 y T4, respectivamente. En los tratamientos con lixiviados, observamos un decrecimiento de ambos grupos hacia la dominancia completa de  $\beta$ -*Proteobacteria*. En el experimento con agua del lago El Trébol, también se observó una dominancia completa de  $\beta$ -*Proteobacteria* en todos los tratamientos y tiempos (Fig. 4.6b). Sin embargo, en AL hubo un incremento del grupo de las *Actinobacteria* en T4 y en AL-UV un aumento en la abundancia relativa de bacterias *Cytophaga-Flavobacterium*. Con la adición de lixiviados de macrófitas en el agua de a de El Trébol, observamos nuevamente una prevalencia de  $\beta$ -*Proteobacteria* sobre los demás grupos procariontas.

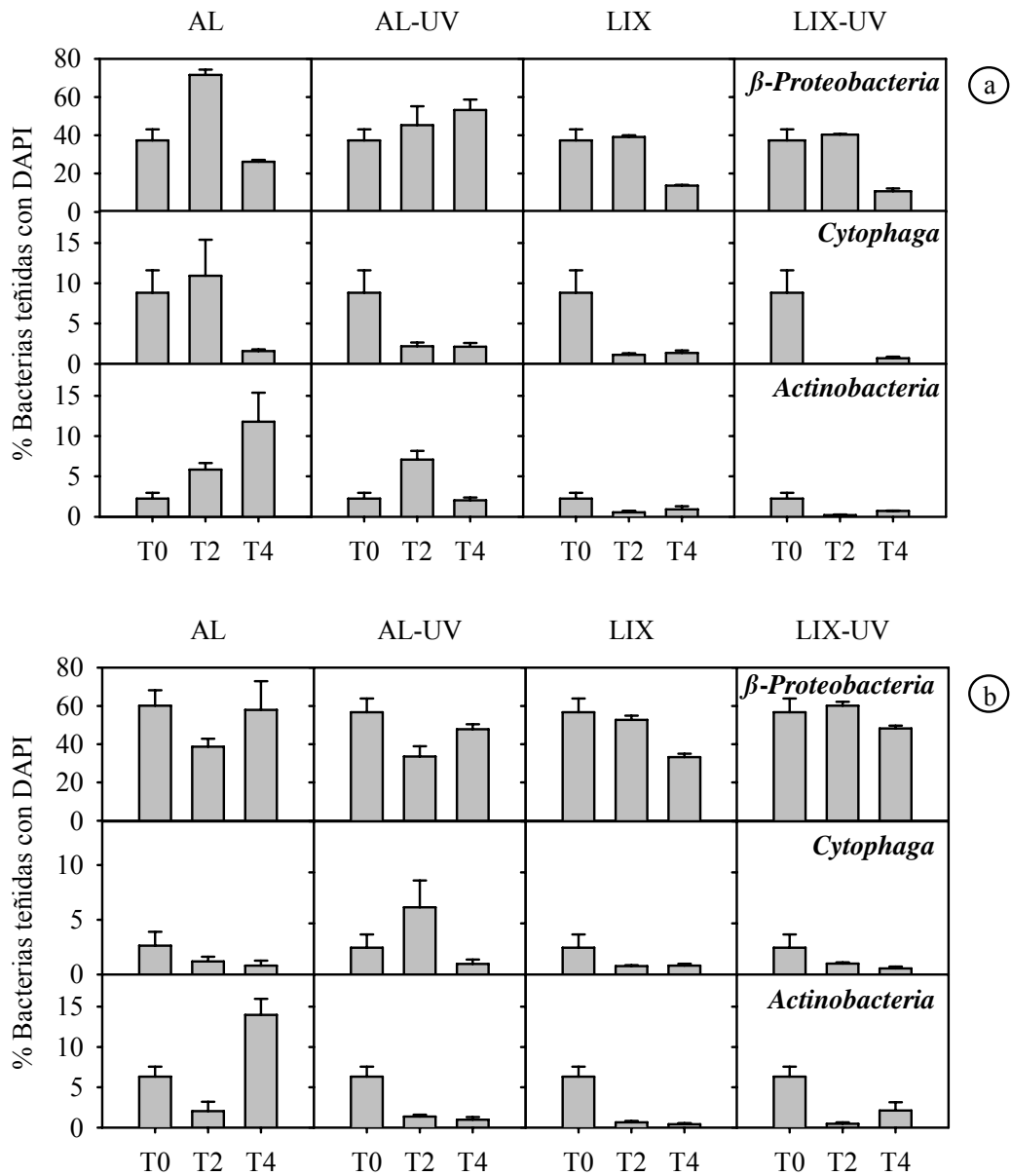


Figura 6. Abundancia relativa de  $\beta$ -Proteobacteria (sonda BET42a), bacterias *Cytophaga-Flavobacterium* (sonda CF319) y *Actinobacteria* (sonda HGC69a) en los diferentes tratamientos en a) Lago Escondido y b) Lago El Trébol. Los valores se expresan como el porcentaje de bacterias teñidas con DAPI y representan la media  $\pm$  el error Standard.



## DISCUSIÓN

En los ecosistemas acuáticos, la MOD utilizada como sustrato por parte de las bacterias para su metabolismo difiere en sus características químicas y ópticas, dependiendo de su origen (McKnight et al. 2001; Benner 2002). La MOD derivada de productores primarios (por ejemplo, algas) muestran moléculas comparativamente de menor tamaño que aquellas originadas externamente al cuerpo de agua, mayormente en el ecosistema terrestre circundante (Bertilsson & Jones 2003). En este sentido, los dos lagos andinos estudiados difirieron de manera importante ya que en el Lago El Trébol la MOD derivaría de productores pelágicos, considerando la alta concentración de clorofila *a* observada en la columna de agua y la alta relación  $a_{250}:a_{365}$ .

Un importante número de compuestos biológicamente disponibles se pueden formar después de la exposición de la MOD a la RUV, incluyendo ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Miller & Moran 1997; Bertilsson & Tranvik 1998). De esta manera, esperaríamos un incremento en la relación  $a_{250}:a_{365}$  después de la irradiación con UV. Al irradiar la MOD del tratamiento LIX-UV, se observó un decrecimiento leve en el tamaño molecular de la MOD (Tratamiento LIX-UV) (menor al 7 % en el Lago Escondido y 19 % en el Lago El Trébol). Una respuesta similar se observó en el agua del Lago Escondido (Tratamiento AL-UV). Por el contrario, el agua del Lago El Trébol, con un stock de MOD de menor tamaño molecular, mostró mayor respuesta a la exposición a RUV (37 %) sugiriendo que la DOM de pequeño tamaño presenta una rápida reacción a las exposiciones con RUV en el laboratorio. Pérez y Sommaruga (2007) indicaron que un incremento en el coeficiente  $a_{254}^*$  luego de la irradiación, sugiere un proceso de humificación. Brisco & Ziegler (2004) propusieron un proceso similar para explicar el decrecimiento en la biodisponibilidad de materia orgánica refractaria luego de la exposición a radiación solar. En todos los tratamientos (agua de lago o lixiviados, en Escondido o El Trébol) el coeficiente  $a_{254}^*$  en muestras con MOD irradiada, fueron mayores que aquella medida en MOD sin irradiar, mostrando que la aromatización de la MOD debido a RUV es independiente de la fuente.

Las incubaciones realizadas con agua de lago y lixiviados sin el inóculo bacteriano no mostraron cambios ni en el espectro de absorbancia en el rango de UV ni en la relación  $a_{250}:a_{265}$ . De esta manera, se pueden asignar las variaciones de la MOD, durante el tiempo de incubación, a la actividad bacteriana. Al finalizar los experimentos, y como resultado de



la actividad bacteriana, se incrementó el tamaño molecular promedio de la MOD en los tratamientos con agua de lago (AL y AL-UV). Estos resultados pueden indicar que en el agua natural de lago el bacterioplancton prefiere utilizar moléculas pequeñas de MOD de manera rápida, permaneciendo sin utilizarse la fracción de moléculas más grandes. Estudios previos han demostrado que componentes de bajo peso son utilizados rápidamente, contribuyendo al crecimiento bacteriano, aunque estos compuestos comprenden una fracción relativamente pequeña del stock de MOD presente en el agua natural de lago (Amon & Benner 1996). Por otro lado, los tratamientos con lixiviados (LIX y LIX-UV) mostraron un incremento en la relación  $a_{250}:a_{365}$  a lo largo de la incubación, indicando que en este caso el tamaño molecular de la MOD disminuye. Moran & Hodson (1990) mostraron que las sustancias de elevado peso molecular son compuestos altamente refractarios; sin embargo, un pequeño porcentaje de ellos están disponibles para ser tomados y metabolizados por los ensamblajes bacterianos presentes en los lagos. Asimismo, Tranvik & Bertilsson (2001) mostraron que los lixiviados son una fuente de MOD que se encuentra disponible para el metabolismo bacteriano de la misma manera que la materia orgánica del agua de lago. De esta manera, es esperable que las bacterias accedan a la fracción recalcitrante, correspondiente a las moléculas grandes, por lo que en los tratamientos con lixiviados de este estudio, el bacterioplancton probablemente actuó rompiendo las moléculas y generando otras de menor tamaño.

La radiación UV puede estimular el crecimiento bacteriano a través de transformaciones que consisten en la ruptura de MOD refractaria a compuestos de menor peso molecular (Obernosterer & Herndl 2000). Por otro lado, la MOD puede también convertirse en más biorefractaria, lo cual puede afectar negativamente a la comunidad bacteriana (Naganuma et al. 1996). En trabajos previos se ha demostrado que es posible que la MOD autóctona se haga más recalcitrante para las bacterias, después de la exposición a luz solar (Pausz & Herndl 1999). Los resultados obtenidos en las incubaciones de este estudio sugirieron que la abundancia bacteriana está relacionada tanto con la irradiación con UV como con la adición de lixiviados; por lo tanto, los resultados confirman la primera predicción. Sin embargo, el incremento en la concentración de MOD (por adición de lixiviados expuestos o no a RUV) solo indujo un incremento en la producción bacteriana en el Lago Escondido, indicando que la segunda predicción debería ser considerada parcialmente confirmada. Bajo las condiciones experimentales, el menor peso molecular observado en el agua de Lago de El Trébol parece mantener una elevada producción bacteriana en las condiciones experimentales. Por lo tanto, la adición de



lixiviados solo incrementa el tamaño molecular, pero no incrementa la toma de carbono por parte de las bacterias. Estudios previos han obtenido resultados similares, señalando un efecto negativo en la producción bacteriana al inocularlas en MOD derivada de macrófita tratada con RUV (Anesio et al. 2000; Farjalla et al. 2001). Más recientemente, Pérez y Sommaruga (2007) mostraron que después de una exposición con UV, el grado de aromatización se vio incrementado favoreciendo así la presencia de carbono disuelto menos disponible para la actividad bacteriana. Esto también fue observado en los experimentos realizados en este estudio. Sin embargo, después de las 96 horas de incubación los resultados, en cuanto al grado de aromaticidad de la materia orgánica, variaron entre los lagos. En el Lago Escondido el coeficiente  $a^*_{254}$  decreció, indicando que la materia orgánica resultó menos aromática después de la actividad bacteriana. Por el contrario, en el Lago El Trébol este coeficiente aumentó en todos los tratamientos al final de la incubación, sugiriendo que la MOD remanente es altamente aromática. En relación a estos resultados obtenidos, la tercera predicción puede también ser considerada parcialmente confirmada.

Los resultados obtenidos también sugieren que el ensamble bacteriano difirió entre los lagos. La importancia del grupo de las  *$\beta$ -Proteobacteria*, dentro del ensamble bacteriano, es común en los hábitats de agua dulce (Glockner et al. 1999; Simek et al. 2006), lo cual fue observado en los dos lagos estudiados. Este grupo tiene estrategias oportunistas y crece significativamente más rápido (Burkert et al. 2003; Simek et al. 2006), reaccionando muy rápidamente a la manipulación experimental de los recursos disponibles (adición de lixiviados y exposición con RUV) desplazando competitivamente a los demás grupos bacterianos. Sin embargo, se pudieron observar diferencias en la contribución relativa de los otros grupos procariotas. Las bacterias del grupo *Cytophaga-Flavobacterium* exhibieron un incremento en su abundancia relativa en AL-UV del Lago El Trébol sugiriendo una contribución de este grupo a la elevada producción celular en el tratamiento de agua de lago expuesta a UV. En este sentido, se ha señalado que en agua dulce, el rol clave en la degradación de macromoléculas es probablemente compartido por las  *$\beta$ -Proteobacteria* y las bacterias *Cytophaga-Flavobacterium* (Kirchman et al. 2004). Asimismo, las *Actinobacteria* también son comunes en una variedad de hábitats de agua dulce (Glockner et al. 2000; Warnecke et al. 2005) y se observó que prevalecieron en el Lago Escondido, con MOD comparativamente de mayor tamaño molecular. Por lo tanto, la hipótesis que plantea un cambio del ensamble bacteriano en relación al tratamiento de MOD interactuando con la RUV puede ser aceptada.



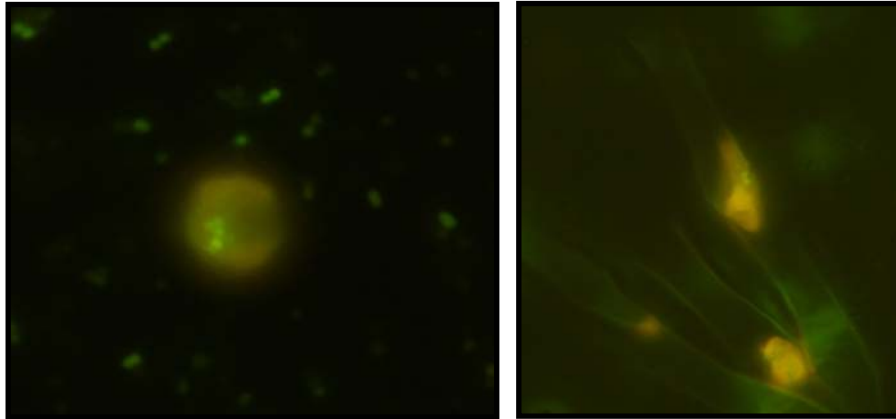


Los resultados de estos experimentos sugieren que las transformaciones fotoquímicas de la MOD influyen en la actividad bacteriana, aunque la naturaleza de esta respuesta podría depender principalmente del origen de la MOD irradiada. De esta manera, la abundancia bacteriana y la tasa de crecimiento fueron afectadas positivamente por la adición de lixiviados, mientras que la composición del ensamble bacteriano se vio más afectado por la exposición a UV. En conclusión, un incremento en las radiaciones UV, un importante factor en el cambio climático global, puede ser particularmente significativo en ecosistemas tales como los lago someros estudiados, en los cuales una parte importante de la MOD es originada por macrófitas sumergidas y emergentes de la zona litoral.



## CAPÍTULO V

### EFECTO DE LA RUV EN EL RENDIMIENTO FOTOSINTÉTICO Y EN LA ACTIVIDAD DE BACTERIVORÍA EN NANOFLAGELADOS.



## INTRODUCCIÓN

Los nanoflagelados, en particular los mixótrofos, son importantes constituyentes del fitoplancton de los lagos someros estudiados (Bastidas Navarro et al. en prensa, ver Capítulo I y II). Por esta razón se ha realizado un estudio focalizado en estos organismos. Los flagelados mixótrofos son significativos miembros de las redes tróficas planctónicas en muchos tipos de ambientes acuáticos (Isaksson 1998; Jansson et al. 1999), ya que combinando el proceso de fotosíntesis con la fagotrofia, intervienen en más de un nivel trófico, actuando como productores y como consumidores de carbono orgánico (Bergström et al. 2003). Sin embargo, la importancia de los flagelados mixótrofos en las comunidades planctónicas puede variar sustancialmente, dependiendo del balance entre las diferentes fuentes de carbono y energía (Jones 2000). En este sentido, condiciones desfavorables de luz y alta concentración de Carbono Orgánico Disuelto (COD), podrían afectar a los autótrofos obligados, debido al aumento de la limitación por luz y a la competencia por P



inorgánico con las bacterias (Jones 2000). Asimismo, ambientes con alto contenido de Materia Orgánica Disuelta (MOD) se caracterizan por presentar comunidades planctónicas con una mayor importancia relativa de las bacterias (Jansson et al. 2000; Karlsson et al. 2001) y así los mixótrofos podrían poseer una ventaja competitiva sobre los autótrofos obligados debido a que la fagotrofia les permite la utilización de las bacterias como fuente de nutrientes (Jansson 1993). Debido a que las relaciones C:P y C:N de las presas (mayormente bacterias) es usualmente menor que aquellas de los mixótrofos, las bacterias constituyen fuentes de nutrientes minerales para estos organismos en condiciones limitantes de nutrientes (Thingstad et al. 1996).

Desde el reconocimiento del concepto de “bucle microbiano”, se ha considerado a los nanoflagelados heterótrofos (NFH) como importantes consumidores de picofitoplancton y bacterias (Sherr & Sherr 1994; Sommaruga & Psenner 1995). Debido a que los NFH presentan altas tasas de bacterivoría, procesan una porción significativa de la materia y de la energía en la zona pelágica (Caron 1991). Sin embargo, se ha observado que los flagelados mixótrofos pueden desplazar a los heterótrofos obligados en determinados ambientes (Jansson et al. 1999; Bergström & Jansson 2000; Bergström et al. 2003; Medina Sanchez & Villar Argai 2004). Los flagelados heterótrofos dependen de un umbral mínimo de requerimiento de carbono que está dado por la abundancia bacteriana (Havskum & Riemann 1996) y puede variar entre  $0.5 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> (Zubkov & Sleigh 1995). Si las condiciones están debajo de este umbral, los nanoflagelados mixótrofos pueden desplazar a los heterótrofos por su capacidad de usar la energía lumínica y fijar carbono a través de la fotosíntesis (Bergström & Jansson 2000).

Dada su importancia en los ecosistemas acuáticos, la bacterivoría por protozoos ha sido un tema de interés durante las últimas 3 décadas. Estudios previos se han focalizado principalmente en el desarrollo y perfeccionamiento de métodos para la medición de la tasa de bacterivoría por protozoos (Sherr & Sherr 1983; Sherr et al. 1987; Simek & Straskrbova's 1992; Vrba et al. 1993, 1996) y en el estudio de la importancia de la bacterivoría en el flujo de carbono a través de la cadena trófica en diversos ambientes (p. ej. Sherr & Sherr 1994, 2002; Isaksson et al. 1999; Balseiro et al. 2004; Medina Sanchez et al. 2004; Kamjunke et al. 2007; Ichinotsuka et al. 2006). Sin embargo, existen pocos estudios acerca del efecto de factores de stress ambiental, tal como la radiación UV, en la actividad de bacterivoría (Sommaruga et al. 1996; Wickham & Carstens 1998; Sommaruga & Buma 2000; Sanders et al. 2005). La acción de las RUV sobre los organismos autótrofos radica en dos efectos principales, los cuales se traducen en una disminución de la tasa de



crecimiento. Uno de ellos es el daño del material genético como consecuencia de la formación de dímeros de ciclobutano pirimidina, mayormente dímeros de timidina (Boelen et al. 1999; Helbling et al. 2001a; Klisch et al. 2005). El segundo y más estudiado efecto es la inhibición de la tasa de fotosíntesis, la cual ha sido observada tanto en áreas polares (Neale et al. 1998), como templadas (p. ej. Barbieri et al. 2002; Helbling et al. 2001b, 2004; Modenutti et al. 2004; Villafañe et al. 2004, 2008) y en ambientes tropicales (Villafañe et al. 1999, 2007). Se ha observado que esta inhibición de la producción primaria podría estar asociada a la inhibición del fotosistema II (PSII) (Schofield et al. 1995) y de las actividades de la enzima RUBISCO (Neale et al. 1993). Numerosos estudios de campo han demostrado que la RUV-A posee un significativo efecto inhibitor de la producción primaria en la naturaleza (Helbling et al. 2001a, Carrillo et al. 2002, Modenutti et al. 2004). A pesar de que se ha registrado el efecto negativo de las RUV sobre la fotosíntesis en un gran número de especies fitoplanctónicas y ambientes, la respuesta a las RUV depende de las características biológicas, físicas y ópticas de los ecosistemas bajo estudio (Helbling et al. 2001a). Con respecto a la respuesta a las RUV de los organismos heterótrofos, uno de los principales efectos observados en nanoflagelados por ejemplo, ha sido la pérdida de movilidad y un consecuente descenso de la bacterivoría (Sommaruga et al. 1996; Ochs 1997; Ochs & Eddie 1998).

La región de los lagos andino-patagónicos se encuentra próxima al vortex Antártico Polar y al agujero de ozono (Orce & Helbling 1997), por lo tanto, recibe proporcionalmente altos niveles de radiación solar RUV. El Lago Escondido, cuya cadena microbiana ha sido descrita previamente en el Capítulo I y II de esta tesis, presenta un contenido relativamente alto de materia orgánica disuelta ( $2.96 \text{ mg L}^{-1}$ ), con una comunidad fitoplanctónica dominada por nanoflagelados mixótrofos y con la presencia de especies de nanoflagelados heterótrofos. Es por esto que constituye un interesante escenario para el estudio del efecto de las radiaciones ultravioletas en el proceso de fotosíntesis y de bacterivoría, tanto en los nanoflagelados mixótrofos, así como también la bacterivoría de los nanoflagelados heterótrofos. En este último capítulo se analizó la respuesta a diferentes condiciones lumínicas de la microcomunidad pelágica del Lago Escondido. La respuesta de la microcomunidad fue medida como variaciones en el rendimiento fotosintético (autótrofos y mixótrofos) y en la actividad de bacterivoría de los nanoflagelados mixótrofos y heterótrofos. En la medición del rendimiento fotosintético se implementaron técnicas de fluorescencia, las cuales han adquirido, en estos últimos años, particular importancia para



el análisis del estado fisiológico de las comunidades de fitoplancton (Behrenfeld et al. 2006; Barbieri 2007).



## OBJETIVOS

1. Analizar las variaciones en el rendimiento fotosintético de nanoflagelados mixótrofos en diferentes niveles de la columna de agua del Lago Escondido y en tres estaciones del año.
2. Estudiar las variaciones estacionales en la tasa de bacterivoría de nanoflagelados mixótrofos y heterótrofos.
3. Analizar experimentalmente el efecto de diferentes condiciones lumínicas (Luz completa (RUV+RFA), Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA), y Oscuridad (OSC), en el rendimiento fotosintético y en la bacterivoría de nanoflagelados mixótrofos.

## HIPÓTESIS

1. Las relaciones de obtención de C por fotosíntesis y por fagotrofia en los flagelados mixotróficos se ven afectadas por la condición lumínica.

## PREDICCIONES

1. La exposición a RUV afecta de manera negativa tanto el proceso de fotosíntesis como la fagotrofia.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Lago Escondido en tres ocasiones: Primavera de 2007 (Diciembre), Verano de 2008 (Febrero) y Otoño de 2008 (Junio). En cada ocasión de muestreo se registró temperatura, oxígeno disuelto, y se tomaron muestras de agua con una botella de Van Dorn en superficie, a los 3 m y a los 6 m de profundidad. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en bidones lavados previamente con HCl, en condiciones de oscuridad y de temperatura controlada. El volumen muestreado fue utilizado para la determinación de nutrientes (PT, PDT y Amonio), la caracterización óptica de la materia orgánica disuelta, la determinación de la abundancia algal y bacteriana, y la realización de los experimentos.

### EXPERIMENTOS DE EXPOSICIÓN: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CALIDAD LUMÍNICA EN EL RENDIMIENTO FOTOSINTÉTICO DE LA COMUNIDAD ALGAL DEL LAGO ESCONDIDO

En esta serie de experimentos se procedió al análisis del efecto del espectro de luz completo y de la radiación fotosintéticamente activa en la respuesta fotosintética de la comunidad fitoplanctónica completa del Lago Escondido, conformada mayoritariamente por nanoflagelados mixótrofos (ver Capítulo II). La respuesta fotosintética fue analizada a través del estudio de las variaciones en la eficiencia fotosintética bajo las diferentes condiciones lumínicas. A continuación se explicará en qué consistió la metodología utilizada para la medición de los parámetros fotosintéticos y el diseño experimental.

#### *Medición de parámetros fotosintéticos*

Las mediciones fueron realizadas con un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (PAM), específicamente con un WATER-PAM, fluorómetro específico para el estudio del fitoplancton (Fig. 5.1 Foto del WATERPAM). Este fluorómetro incluye una Unidad de Control PAM operada por computadora (Heinz Walz GmbH) y una Unidad WATER-ED con una cubeta de cuarzo de 15 mm de diámetro (Heinz Walz) (Fig. 5.1).

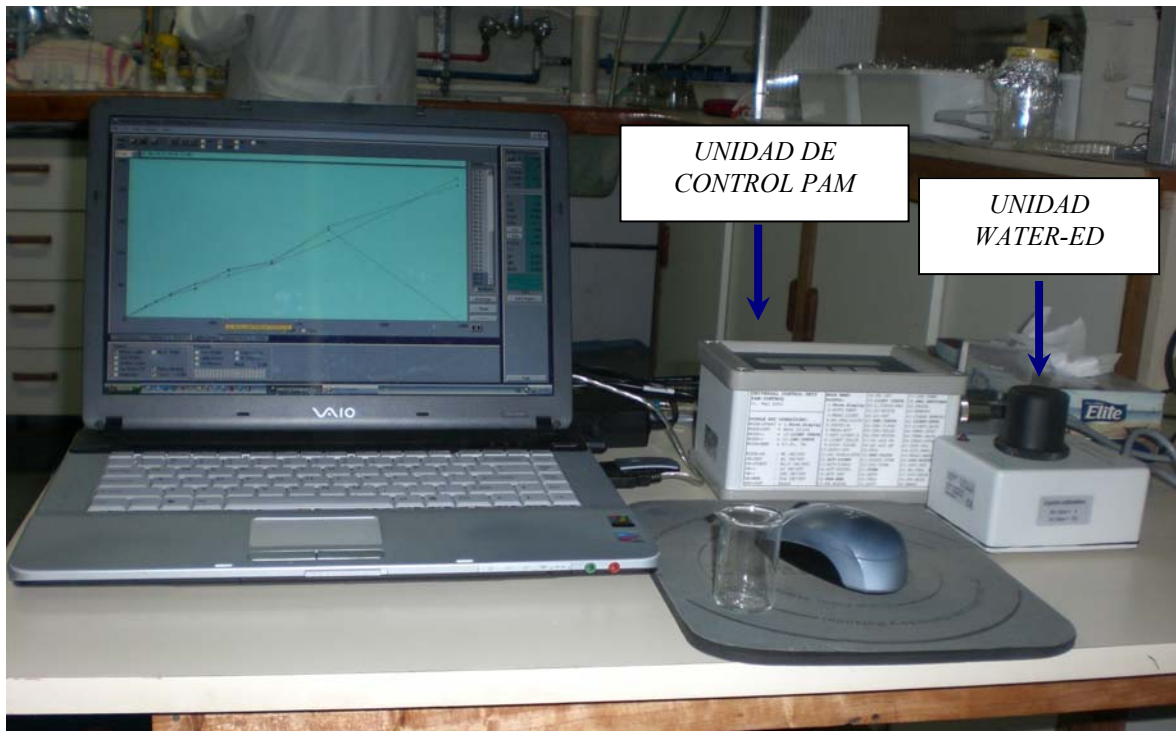


Figura 5.1. Fluorómetro de Pulso de Amplitud Modulada (PAM), constituido por la Unidad de Control PAM operada por computadora (Heinz Walz GmbH) y la Unidad WATER-ED con una cubeta de cuarzo de 15 mm de diámetro (Heinz Walz).

Las técnicas de fluorimetría, desarrolladas en la última década, permiten el estudio de la fase fotoquímica del proceso de fotosíntesis, pudiendo establecerse las variaciones rápidas en la cadena de transporte electrónico, como así también el daño en los fotosistemas y la disipación de energía excedente a través de vías no fotoquímicas (Barbieri 2007). La energía absorbida, pero no utilizada en el proceso fotoquímico de fotosíntesis puede traducirse en disipación no fotoquímica (por ejemplo disipación de calor o daño generado por la luz en la clorofila del Fotosistema II) o en fluorescencia (re-emisión de energía en forma de luz). Los análisis de fluorescencia utilizan este balance de energía para proveer información sobre la eficiencia fotoquímica en base a cambios en la fluorescencia del Fotosistema II (PSII) bajo un rango de diferentes tratamientos lumínicos (Mackey et al. 2008).





En particular, los fluorómetros PAM, utilizan tres diferentes luces para manipular el aparato fotosintético, específicamente a la molécula de clorofila *a* (Ralph & Gademann 2005). En primer lugar, se emite una luz débil ( $0.15 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), la cual genera fluorescencia sin inducir la fotosíntesis, con el objetivo de determinar la proporción de centros de acción cerrados del PSII. La fluorescencia emitida en este caso es denominada Fluorescencia mínima ( $F_0$ ), si la muestra estaba adaptada a la oscuridad, o Fluorescencia mínima instantánea ( $F'_0$ ), si estaba adaptada a la luz. La segunda fuente de luz, utilizada para analizar la actividad fotosintética, es un pulso saturante ( $>10,000 \mu\text{mol fotonos m}^{-1} \text{s}^{-1}$ , 0.4-0.8 s), el cual cierra los centros de reacción del PSII, resultando en una emisión mayor de fluorescencia. Esta fluorescencia se denomina Fluorescencia máxima ( $F_m$ ), en adaptación a oscuridad, o Fluorescencia máxima instantánea ( $F'_m$ ), cuando la muestra ha sido adaptada a la luz. La tercera fuente de luz es utilizada para manipular el aparato fotosintético, desencadenando el proceso de fotosíntesis, y es conocida como luz actínica. La identificación de los valores de fluorescencia mencionados, que se utilizan en el cálculo de los parámetros de fluorescencia del PSII, se vuelve más fácil analizando un trazado típico de fluorescencia (Maxwell & Johnson 2000). En la Figura 5.2, tomada de Mackey et al. (2008) se ejemplifica un trazado de Fluorescencia Relativa vs Tiempo donde podemos identificar los diferentes valores de fluorescencia.

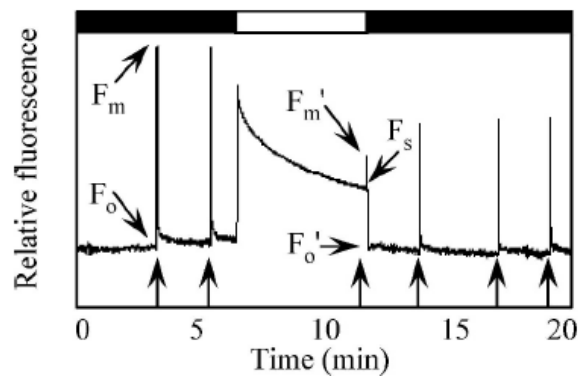


Figura 5.2. Ejemplo de trazado de fluorescencia de la clorofila, tomado de Mackey et al. (2008) mostrando los niveles de fluorescencia utilizados para el cálculo de parámetros fotosintéticos. La línea gruesa en la parte superior indica períodos de ausencia (negro) y presencia (blanco) de luz actínica. Las flechas a lo largo de la absisa indican la frecuencia de pulsos saturantes.



Entre los principales parámetros fotosintéticos que se calculan a partir de los valores de fluorescencia señalados, se encuentra la eficiencia fotoquímica instantánea del PSII ( $\phi_{PSII}$ ), la cual mide la proporción de luz absorbida (pulso actínico con una intensidad determinada) por la clorofila asociada al PSII que es utilizada en el proceso fotoquímico. A partir de los valores de  $\phi_{PSII}$  multiplicados por la intensidad lumínica aplicada, se puede calcular un parámetro de particular importancia: la Tasa Relativa de Transporte de Electrones (ETR, Electron Transport Rate) (Schreiber et al. 1994). Bajo condiciones de laboratorio, existe una fuerte relación lineal entre  $\phi_{PSII}$  y la eficiencia en la fijación de carbono (Fryer et al. 1998), por lo que los valores de ETR, pueden ser utilizados como una aproximación a la tasa de fotosíntesis (Genty et al. 1989).

En cada ocasión de muestreo se procedió a la medición de ETR y a la construcción de Curvas Lumínicas de ETR vs  $E$  (Irradiancia) en las muestras correspondientes a los diferentes niveles de profundidad del Lago Escondido (superficie, 3 m y 6 m). Las curvas lumínicas se construyeron con intensidades que fueron desde 0 a 2334  $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Para el experimento de exposición a las diferentes condiciones lumínicas, se utilizaron muestras correspondientes a los 3 m de profundidad del Lago Escondido, en todos los casos. Los valores de los parámetros obtenidos inmediatamente arribadas las muestras al laboratorio fueron registrados como Tiempo Inicial del experimento (T0).

#### *Diseño experimental*

Se realizaron tres tratamientos, exponiéndose 250 mL de agua natural del lago (conteniendo en consecuencia la microcomunidad natural) a diferentes condiciones lumínicas: (1) Luz completa (RUV+RFA), (2) Radiación Fotosintéticamente activa (RFA), y (3) Oscuridad (OSC). Las muestras de este último tratamiento serán utilizadas posteriormente sólo en el experimento de bacterivoría. Las fuentes lumínicas fueron dos tubos fluorescentes UVA-340 (Q-Panel Lab Products, Cleveland, OH, U.S.A.), cuyo espectro de irradiancia se detalla en el capítulo III, y 2 tubos fluorescentes luz día emisores de Radiación Fotosintéticamente Activa. El experimento tuvo una duración de 4 horas y se realizó en balones de cuarzo de 250 mL. Para el tratamiento expuesto a RFA se cortó la fracción UV del espectro lumínico emitido por las lámparas UVA-340 Q-Panel a través de un filtro de nylon que corta el espectro a los 400 nm (ver Capítulo III). Por último, en el caso del tratamiento OSC se utilizaron balones cubiertos con papel aluminio. Cada uno de los tratamientos se llevó a cabo con tres réplicas.



Todos los balones fueron colocados en un soporte giratorio especialmente diseñado, para favorecer una rotación lenta (medio giro a 0.25 rpm cada tres minutos) y una irradiación homogénea del volumen de cada balón (Fig. 5.3). Los soportes fueron ubicados en un incubador a la temperatura del lago, correspondiente a cada fecha de muestreo, y se dejó aclimatar la microcomunidad a las condiciones experimentales durante 20 minutos, para luego comenzar la exposición lumínica de 4 h.

Transcurrido el tiempo de irradiación se procedió nuevamente al registro de los valores de ETR, como en T0.



Figura 5.3. Fotografía del incubador con el dispositivo experimental utilizado en el experimento de exposición



## EXPERIMENTOS DE BACTERIVORÍA: ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CONDICION LUMÍNICA EN LA TASA DE INGESTA DE PRESAS MARCADAS POR PARTE DE NANOFLAGELADOS MIXÓTROFOS Y HETERÓTROFOS

Este experimento se llevó a cabo con las muestras irradiadas en el experimento descrito anteriormente, en los muestreos de verano y otoño. De esta manera, se analizó la bacterivoría de los nanoflagelados expuestos previamente a: (1) Luz completa (RUV+RFA), (2) Radiación Fotosintéticamente Activa (RFA), y (3) Oscuridad (OSC).

La bacterivoría fue determinada a través de la técnica de inoculación de bacterias marcadas fluorescentemente (BMF). Las BMF fueron preparadas previamente siguiendo el método de Simek & Straskrbova (1992), el cual se describe sintéticamente a continuación. Luego de una prefiltración a través de filtro de 2  $\mu\text{m}$  de poro (Osmonics Inc., MN, USA), se concentró la comunidad bacteriana del Lago Escondido en un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro. Las células bacterianas fueron separadas de la superficie del filtro por sonicación. Posteriormente fueron fijadas al calor y teñidas con 5-[(4,6-dichlorotriazin-2-yl) amino] fluoresceína (DTAF) de acuerdo a Sherr et al. (1987). Las BMF fueron conservadas en freezer en alícuotas de 1 mL.

Antes de ser utilizado, el inóculo de BMF fue descongelado a la temperatura experimental y sonicado durante 20 minutos para separar posibles agrupamientos. Asimismo se procedió a la estimación de abundancia de BMF bajo microscopio de epifluorescencia. La inoculación de las BMF se realizó en un 20 % de la abundancia total de las bacterias registrada para la muestra en cada ocasión de muestreo. Para ello, en cada ocasión de muestreo se destinó una muestra inicial para el recuento bacteriano (siguiendo el procedimiento ya mencionado en los capítulos I y II). Por otra parte, para estimar la abundancia inicial de los nanoflagelados se utilizaron 250 mL de muestra siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo II.

Finalizado el tiempo de irradiación (y de toma de muestra de 35 mL para estimar los parámetros fotosintéticos mencionados anteriormente), se procedió con la inoculación de las BMF en cada balón. Una vez realizada la inoculación, los balones fueron dejados en las mismas condiciones experimentales y se tomaron submuestras de 20 mL a los 5, 10, 15, 20 y 40 minutos de cada uno. Estas muestras fueron fijadas en forma secuencial con lugol acético (0.5 % concentración final), formaldehído al 2 % y tiosulfato de sodio al 3 % para aclarar el color (Sherr & Sherr 1993). Las muestras fueron mantenidas en oscuridad y



refrigeradas hasta su análisis. Dentro de los 3 días posteriores a la fijación, las muestras fueron teñidas con DAPI y filtradas a través de filtros de policarbonato negros de 1  $\mu\text{m}$  (Poretics, Livermore, CA, USA). Se cuantificó el número de presas (BMF) ingeridas por nanoflagelados mixotróficos y heterotróficos, en microscopio de epifluorescencia (Olympus B50) con luz UV (filtro U-MWU) y luz azul (filtro U-MWB filter).

La tasa instantánea de bacterivoría fue estimada a partir de la pendiente de la regresión lineal entre tiempo y el número promedio de BMF por célula (Sherr & Sherr 1993).

### ANÁLISIS DE DATOS

Las curvas lumínicas de ETR vs  $E$  fueron ajustadas a la siguiente ecuación de Eilers & Peeters (1988) con el paquete estadístico SigmaPlot (Versión 11.0):

$$\text{ETR}(E) = \frac{E}{aE^2 + bE + c}$$

Los valores de los coeficientes  $a$ ,  $b$  y  $c$  de la ecuación fueron utilizados para el cálculo de: la pendiente inicial ( $\alpha$ ), la tasa de producción máxima ( $P_{\text{max}}$ ), la Intensidad óptima de fotosíntesis ( $I_m$ ), y la intensidad de saturación ( $I_k$ ) (Fig. 5.4).

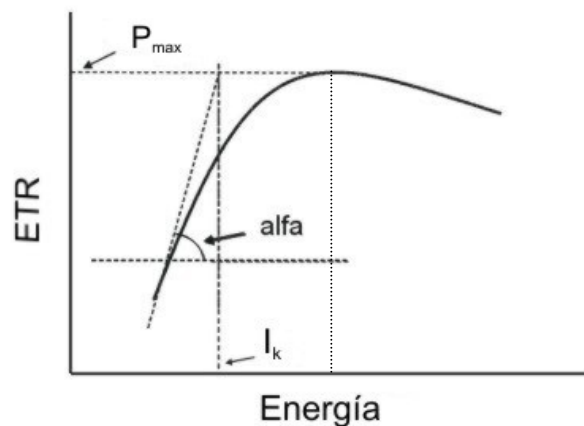


Figura 5.4. Curva típica de Tasa de transporte de electrones (ETR) vs Intensidad lumínica ( $E$ ). Referencias:  $\alpha$ : pendiente inicial;  $I_m$ : Intensidad óptima ;  $I_k$ : Intensidad de saturación;  $P_{\text{max}}$ : producción máxima.

La comparación entre los parámetros fotosintéticos ( $\alpha$ ,  $I_m$ ,  $I_k$  y  $P_{\text{max}}$ ) obtenidos para: (a) las diferentes profundidades y (b) los diferentes tratamientos del experimento de



exposición, se llevó a cabo a través de un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. En (a) los factores fueron “Profundidad” y “Estación del año”, mientras que en (b) los factores fueron “Tratamiento” y “Estación del año”. La significancia de las diferencias entre las curvas de número de BMF ingeridas por célula vs tiempo, obtenidas en los experimentos de bacterivoría, fueron analizadas a través de un análisis de covarianza (ANCOVA); el cofactor utilizado fue “Tiempo”. Las comparaciones múltiples *a posteriori* fueron realizadas en todos los casos utilizando el Test de Tukey, con un nivel promedio de significancia de  $P = 0.05$ .

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los paquetes estadísticos SigmaStat 3.1 o Statistica 6.0.

Con el objetivo de analizar el balance entre autotrofia y heterotrofia en los nanoflagelados mixótrofos transcurrido el tiempo de irradiación, se compararon dos relaciones estimadoras de la variación de estos diferentes estados tróficos. Como estimador de la variación de autotrofia se calculó la relación entre el valor de  $P_{\max}$  obtenido en el tratamiento RFA ( $A_{RFA}$ ) y el  $P_{\max}$  correspondiente al tratamiento RUV+RFA ( $A_{RUV+RFA}$ ). Por otro lado, se calculó la relación entre las tasas de bacterivoría de los tratamientos correspondientes ( $H_{RFA}$  y  $H_{RUB+RFA}$ ), como estimador de la variación en la heterotrofia. El valor obtenido de cada cociente indica el efecto de la RUV, así, si el cociente da mayor de 1 es que la RUV afectó negativamente a la autotrofia o heterotrofia. De esta manera, también se pueden comparar ambos cocientes para estimar cuál de ambos modos fue más afectado por la radiación. Entonces si:

$$\frac{A_{RFA}}{A_{RUV+RFA}} = \frac{H_{RFA}}{H_{RUV+RFA}}$$

ambos modos de alimentación se vieron afectados por igual,

En cambio, si:

$$\frac{A_{RFA}}{A_{RUV+RFA}} > \frac{H_{RFA}}{H_{RUV+RFA}}$$

el balance entre las dos maneras de alimentación se ve desplazado hacia la heterotrofia, y viceversa.



## RESULTADOS

### LA FOTOSÍNTESIS A LO LARGO DE LA COLUMNA DE AGUA

Los valores de ETR registrados en el campo variaron de acuerdo a la profundidad muestreada y entre las diferentes estaciones del año; los mayores valores de ETR fueron registrados en el nivel superficial en todos los muestreos (Fig. 5.5). La tasa inicial de la curva lumínica ( $\alpha$ ) varió significativamente entre las diferentes profundidades y entre los muestreos, observándose una interacción entre ambos factores (ANOVA de dos vías, “Profundidad”  $P = 0.004$ ; “Estación del año”  $P < 0.001$ ; “Profundidad” x “Estación del año”  $P = 0.040$ ). Solamente se observaron diferencias significativas entre los niveles muestreados en primavera, registrándose variación entre los 3 m y los 6 m (Test a posteriori de Tukey,  $P = 0.003$ ). De esta manera, las muestras correspondientes a primavera, particularmente la de los 6 m, mostró mayor eficiencia en la toma de energía lumínica para la fotosíntesis. Con respecto a los valores de tasa máxima de fotosíntesis ( $P_{\max}$ ), variaron de manera significativa a lo largo de la columna de agua y entre los diferentes muestreos, sin observarse interacción entre los factores (ANOVA de dos vías, “Profundidad”  $P < 0.001$ ; “Estación del año”  $P < 0.001$ ; “Profundidad” x “Estación del año”  $P = 0.432$ ). Se observó una disminución en la capacidad de los fotosistemas para utilizar la energía lumínica absorbida (disminución en  $P_{\max}$ ) a lo largo del tiempo muestreado; en primavera se registraron  $P_{\max} \sim 130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que en otoño los valores oscilaron  $\sim 190 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Test a posteriori de Tukey,  $P < 0.008$  en todos los casos). Asimismo, se observó un gradiente de disminución de  $P_{\max}$  desde la superficie hacia el fondo del lago, observándose este patrón en todos los muestreos (Test a posteriori de Tukey,  $P < 0.03$  en todos los casos) (Fig. 5.5). Por otro lado, la intensidad de saturación ( $I_k$ ) mostró un patrón similar al observado para  $P_{\max}$ , registrándose una disminución significativa en los valores de  $I_k$  desde primavera de 2007 a otoño de 2008 (Test a posteriori de Tukey,  $P < 0.001$  en todos los casos).

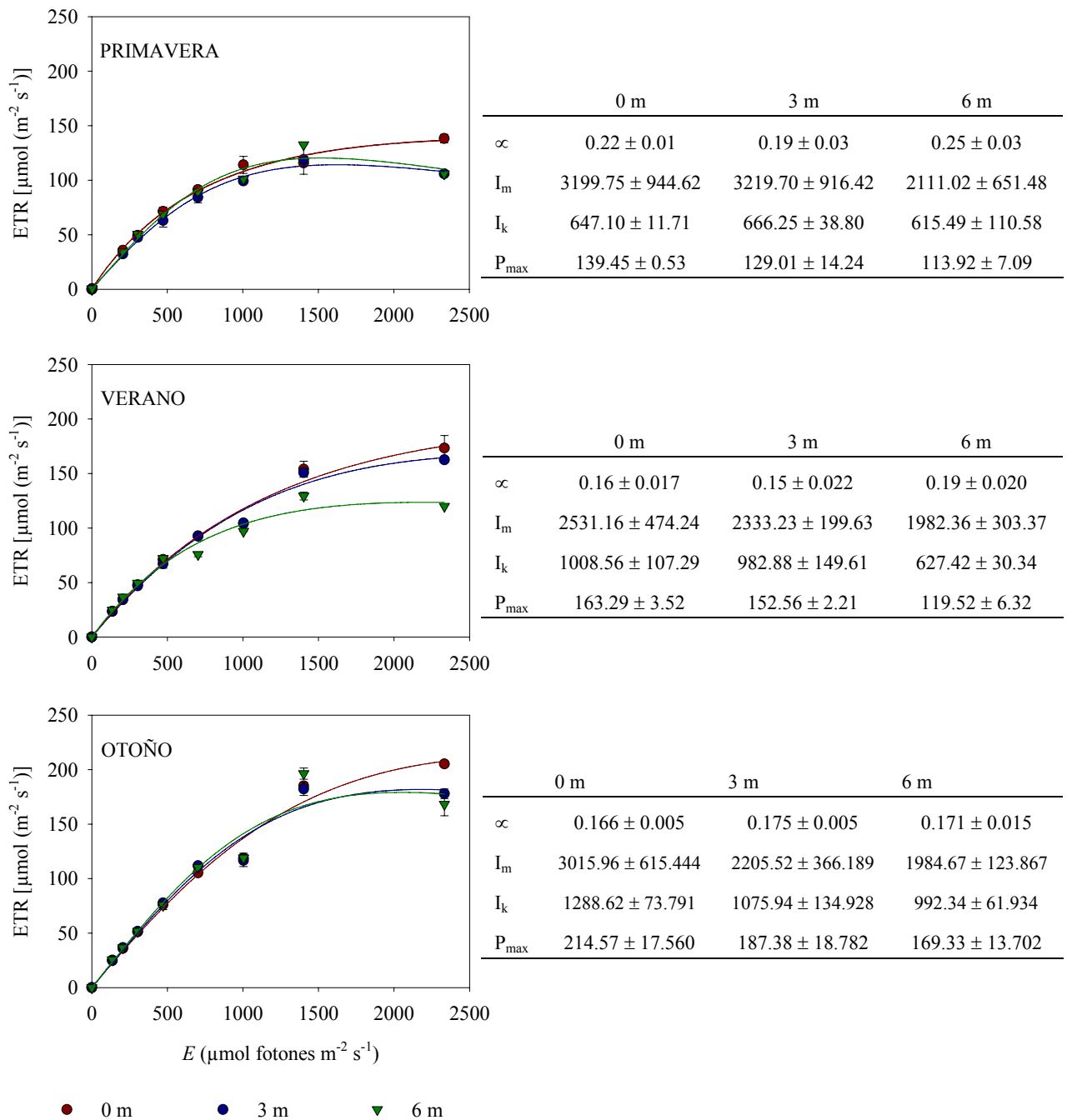


Figura 5.5. Curvas de respuesta lumínica ETR vs ( $E$ ) (columna izquierda) y valores de los parámetros  $\infty$ ,  $I_m$ ,  $I_k$  y  $P_{max}$  (columna derecha) obtenidos para los niveles de profundidad en las diferentes fechas de muestreo. Se presentan los valores promedio  $\pm$  la desviación standard.





### LA FOTOSÍNTESIS EN EL EXPERIMENTO DE EXPOSICIÓN

La pendiente inicial de las curvas lumínicas, obtenida para los tratamientos RUV+RFA y RFA no mostró diferencias significativas entre los mismos (ANOVA de dos vías,  $P = 0.853$ ). Sin embargo, los valores variaron significativamente entre los diferentes muestreos ( $P < 0.001$ ), siguiendo el mismo patrón decreciente, desde primavera de 2007 a otoño de 2008, descrito en la sección anterior. Por otro lado, la tasa máxima de fotosíntesis fue significativamente mayor en el tratamiento RFA en los muestreos de primavera y verano (ANOVA de dos vías,  $P = 0.015$ , Test *a posteriori* de Tukey,  $P = 0.015$  en ambos casos). Los valores de  $I_k$  mostraron una variación significativa entre los muestreos y entre los tratamientos, sin registrarse interacción entre ambos factores (ANOVA de dos vías,  $P < 0.001$  para ambos factores; “Profundidad” x “Estación del año”  $P = 0.53$ ). Particularmente, el tratamiento RFA mostró valores de Intensidad de saturación significativamente mayores en todos los muestreos ( $P < 0.001$ ).

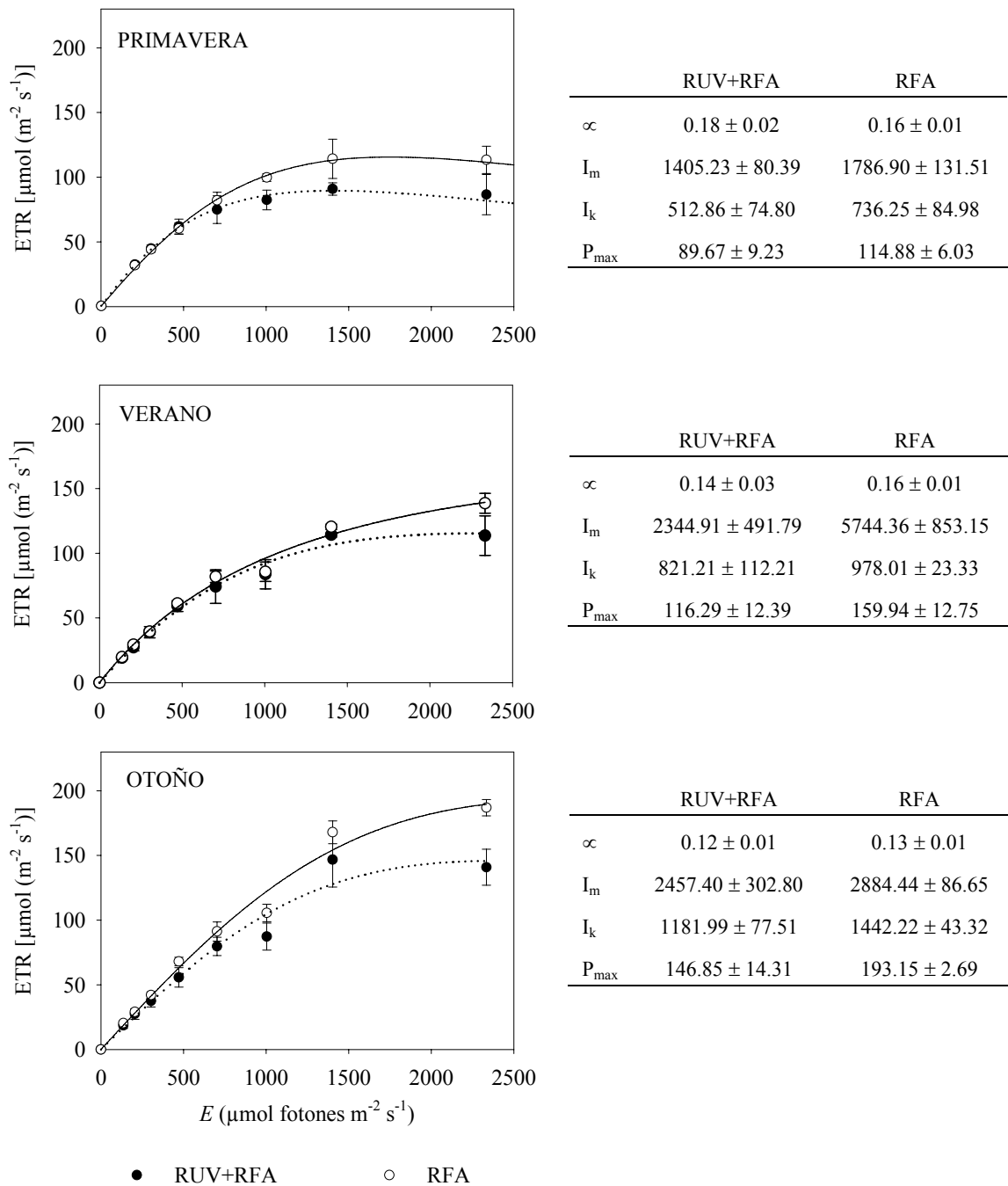


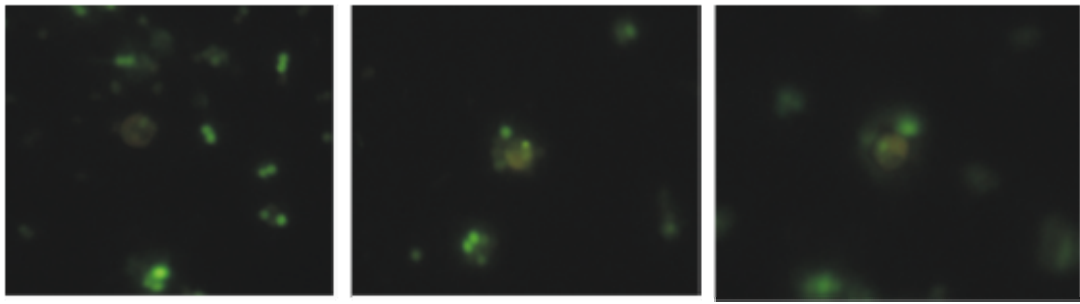
Figura 5.6. Curvas de respuesta lumínica ETR vs ( $E$ ) (Columna izquierda) y valores de los parámetros  $\infty$ ,  $I_m$ ,  $I_k$  y  $P_{max}$  (columna derecha) obtenidos para los tratamientos RUV+RFA y RFA en los diferentes experimentos estacionales. Se presentan los valores promedio  $\pm$  la desviación standard.



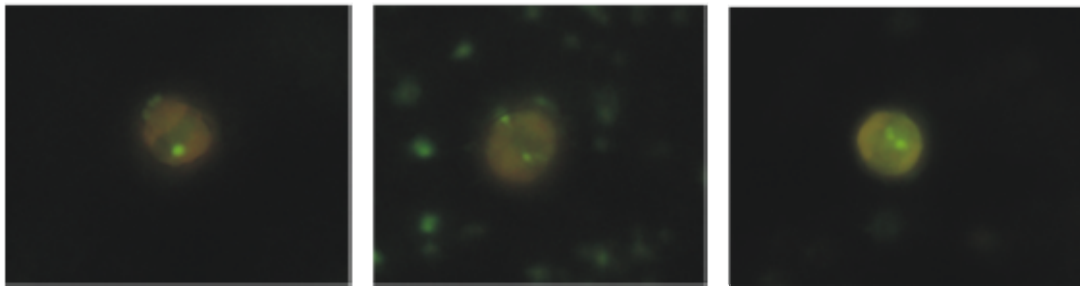
## ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES LUMÍNICAS SOBRE LA BACTERIVORÍA

Los experimentos de bacterivoría realizados y la consiguiente inspección de las muestras bajo microscopio de epifluorescencia nos permitieron identificar a nanoflagelados mixótrofos y heterótrofos así como también a los ciliados presentes. Las especies de nanoflagelados que conformaron el grupo de los mixótrofos fueron: *Rhodomonas lacustris*, *Cryptomonas* sp, *Chrysochromulina parva*, *Dinobryon divergens* y *Gymnodinium varians* (Fig. 5.7). Con respecto a los organismos heterótrofos se observó la presencia de nanoflagelados (HNF) (Fig. 5.8) y ciliados de las clases Oligotrichida y Prostomatida (Fig. 5.9).

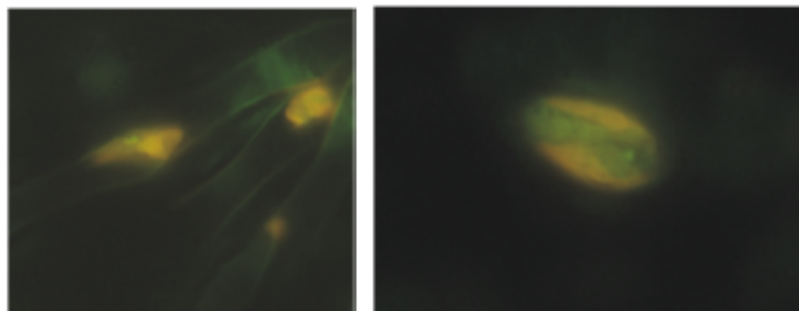
En verano, el mayor porcentaje de organismos con presencia de bacterias marcadas en su interior pertenecieron a las especies *R. lacustris* y *G. varians*. En otoño, el mayor porcentaje de bacterias ingeridas se registró en el interior de individuos de *C. parva*. Por otro lado, *D. divergens* sólo se observó ingestión de presas marcadas en el experimento realizado en verano. Estos resultados se corresponden con las abundancias y las especies dominantes registradas en las muestras del lago (Ver Capítulo II).



*Chrysochromulina parva*



*Gymnodinium varians*



*Dinobryon divergens*

*Cryptomonas sp*

Figura 5.7. Fotografías de las especies de nanoflagelados mixótrofos observados con presencia de bacterias marcadas fluorescentemente (verdes) en su interior.

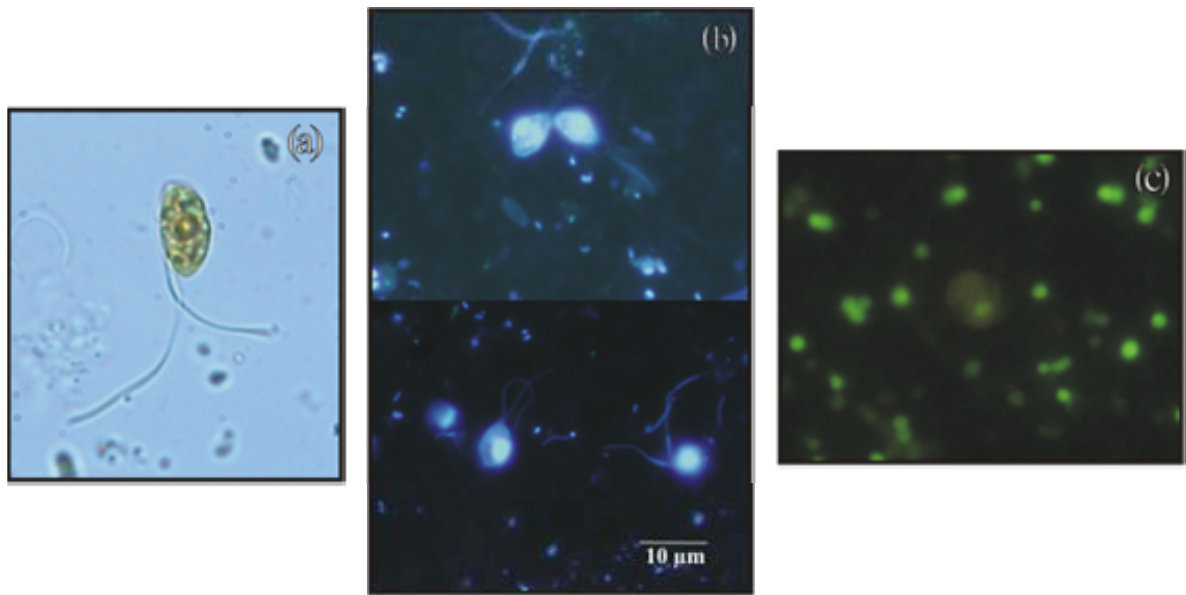


Figura 5.8. Fotografía en microscopio invertido (a) y en microscopio de epifluorescencia con luz UV (b) y con luz azul (c) de nanoflagelados heterótrofos observados en el Lago Escondido.

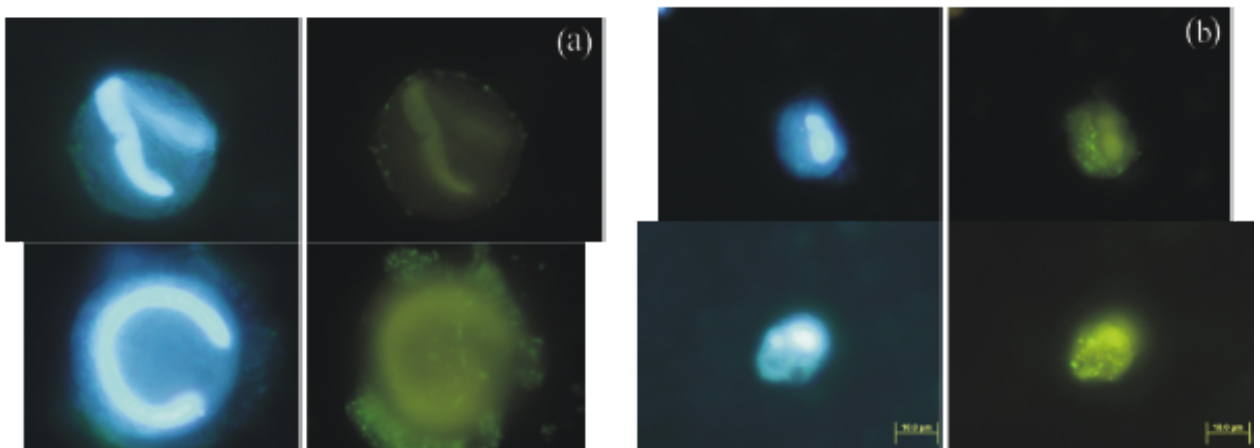


Figura 5.9. Fotografías de ejemplares con luz UV (primer columna) y luz azul (segunda columna) de ciliados de las clases Oligotrichida (a) y Prostomatida (b) observados con presencia de bacterias marcadas fluorescentemente (verdes) en su interior.



En ambos experimentos realizados (verano y otoño) se observó que la comunidad estuvo dominada por los nanoflagelados mixótrofos, tal como fuera ya mencionado en el capítulo II. Esta dominancia varió entre un 85 % y 97 % de abundancia total en los experimentos de verano y otoño respectivamente. Las mayores abundancias de *R. lacustris*, *D. divergens* y *G. varians* se observaron en el experimento de verano (618 cel mL<sup>-1</sup> en total). Por el contrario, *C. parva* fue más abundante en otoño alcanzando una abundancia de 1600 cél mL<sup>-1</sup> (Ver Capítulo II).

En el experimento realizado en verano, la relación obtenida entre el número de BMF ingerido por célula de nanoflagelado mixótrofo en función del tiempo (min) mostró una distribución exponencial acercándose a un valor umbral para todos los tratamientos analizados (RUV+RFA, RFA y OSC). La presencia de un valor máximo de número de bacterias marcadas ingeridas nos indica que después de los 20 min de incubación se alcanzó un equilibrio entre ingestión y digestión de BMF. El ajuste de los valores a la curva fue significativo en todos los tratamientos (Regresión exponencial,  $P < 0.0001$  en todos los casos), alcanzándose un valor umbral mayor en el tratamiento RFA (0.45 BMF cel<sup>-1</sup>). Los tratamientos RUV+RFA y OSC mostraron una distribución similar con un valor umbral cercano a las 0.33 BMF cel<sup>-1</sup> (Fig. 5.10a). Para realizar el cálculo de la tasa de bacterivoría se realizó la regresión lineal de los valores registrados entre los 5 min y los 20 min de incubación, sección lineal de la curva (Sherr & Sherr 1993) (Fig. 5.10b). La regresión lineal de los valores de BFM ingeridas en función del tiempo (entre 5 min y 20 min) fue significativa ( $P < 0.0001$  para RUV+RFA y RFA, y  $P = 0.0004$  para OSC) mostrando el mismo patrón que la regresión exponencial. El análisis de covarianza realizado en esta última serie de regresiones lineales mostró diferencias significativas entre el tratamiento RFA y los tratamientos RUV+RFA y OSC, sin observarse diferencias significativas entre los dos últimos (ANCOVA:  $P < 0.0001$ , Test *a posteriori* de Tukey, RFA vs RUV+RFA,  $P = 0.0005$ ; RFA vs OSC,  $P = 0.0001$ ; RUV+RFA vs OSC,  $P = 0.57$ )

Por otro lado, también se observó una relación lineal significativa entre los valores de BMF ingeridos por nanoflagelados heterótrofos en función del tiempo en todos los tratamientos ( $P = 0.0029$  para RUV+RFA,  $P = 0.0013$  para RFA, y  $P = 0.0004$  para OSC) (Fig. 5.11). Las diferencias entre las curvas correspondientes a los diferentes tratamientos fueron significativas (ANCOVA,  $P < 0.0001$ ). El análisis *a posteriori* realizado reveló similitud entre RFA y RUV+RFA (Test *a posteriori* de Tukey,  $P = 0.21$ ) los cuales difirieron significativamente del tratamiento OSC (Test *a posteriori* de Tukey, OSC vs RFA,  $P = 0.002$ ; OSC vs UV-RFA,  $P < 0.001$ ).

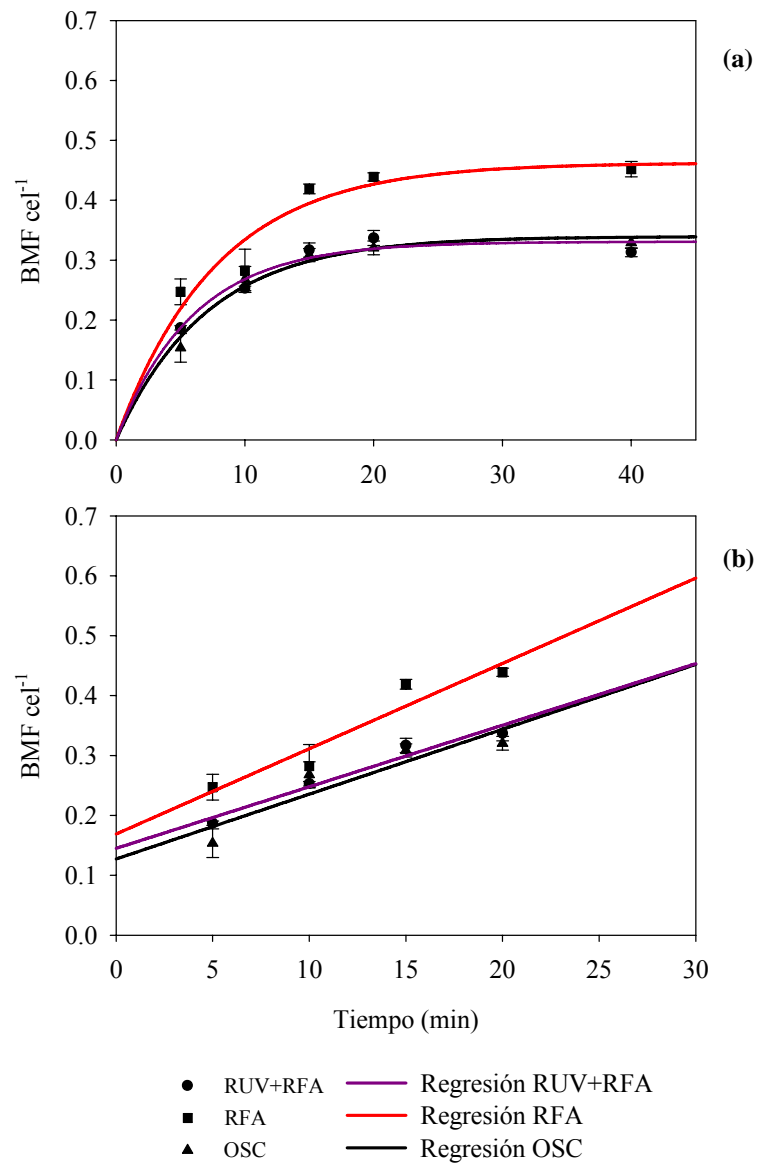


Figura 5.10. Número de presas ingeridas por célula de nanoflagelado mixótrofo a lo largo del tiempo de duración del experimento de bacterivoría realizado en Febrero de 2008. En (a) se incluyen los valores obtenidos a los 40 minutos, ajuntándose a una ecuación exponencial, mientras que en (b) no se incluyen dichos valores y se ajustó a una ecuación lineal.

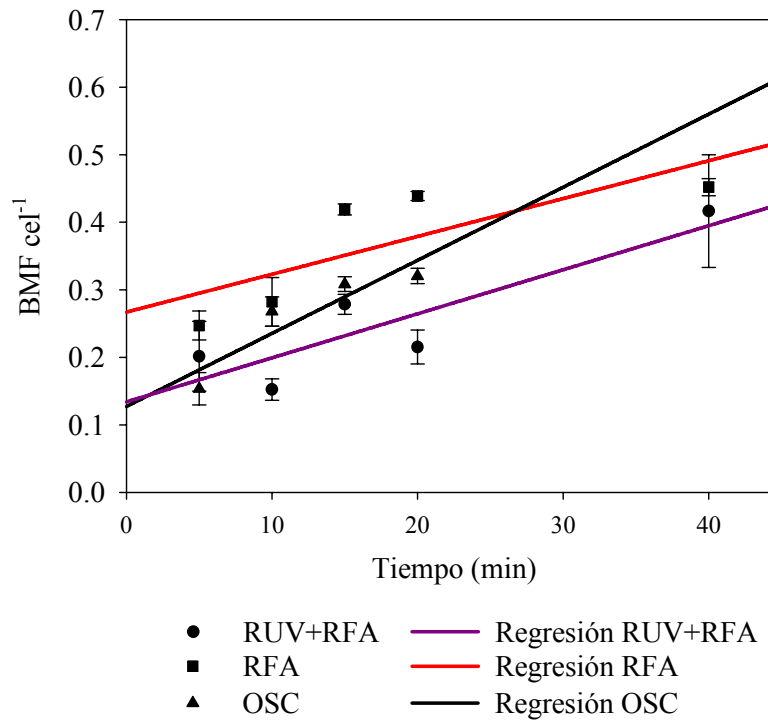


Figura 5.11. Número de presas ingeridas por célula de nanoflagelado heterótrofo a lo largo del tiempo de duración del experimento de bacterivoría realizado en Verano de 2008.

En el experimento de bacterivoría realizado en otoño, los valores de BMF ingeridas por célula de nanoflagelado mixótrofo fueron menores que los registrados en verano para todos los tratamientos. La regresión lineal de dichos valores en función del tiempo fue significativa ( $P < 0.05$  para todos los tratamientos). Las curvas pertenecientes a los diferentes tratamientos difirieron entre sí (ANCOVA,  $P = 0.008$ ), observándose diferencias significativas entre los tratamientos RUV+RFA y OSC (Test *a posteriori* de Tukey,  $P = 0.001$ ). Si bien el análisis estadístico no evidenció diferencias entre RUV+RFA y RFA, la pendiente correspondiente a RUV+RFA fue menor (Fig. 5.12).

Por su parte, también el número de BMF ingeridas por célula de nanoflagelado heterótrofo en cada uno de los tratamientos se relacionó de manera lineal con el tiempo de incubación transcurrido ( $P = 0.048$  para RUV+RFA,  $P = 0.036$  para RFA, y  $P = 0.0023$  para OSC) (Fig. 5.12). El análisis de covarianza realizado para este grupo de nanoflagelados mostró diferencias significativas entre las curvas de los tratamientos (ANCOVA,  $P = 0.027$ ), con diferencias significativas entre OSC y RUV+RFA (Test *a posteriori* de Tukey,  $P = 0.015$ ).



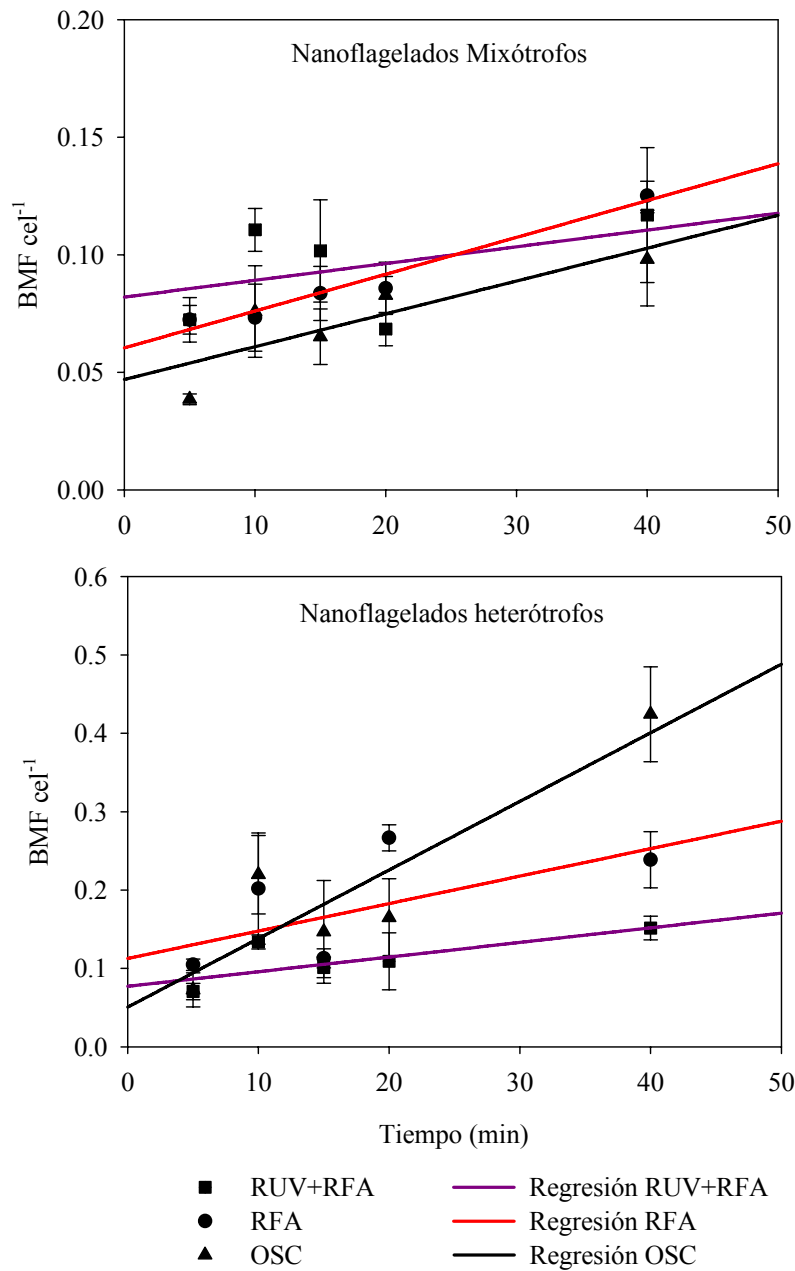


Figura 5.12. Número de presas ingeridas por célula de nanoflagelado mixótrofo y heterótrofo a lo largo del tiempo de duración del experimento de bacterivoría realizado en otoño.

El análisis de las tasas de bacterivoría, estimadas a partir de la pendiente de la regresión lineal entre tiempo y el número promedio de BMF por célula, mostró diferentes patrones entre los tratamientos y en las dos fechas de experimentación (verano y otoño).



Los nanoflagelados mixótrofos mostraron las menores tasas de bacterivoría en el experimento de otoño, manteniéndose relativamente constantes en los tres tratamientos (entre los 0.042 y 0.096 BMF  $\text{cel}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) (Fig. 5.13). En el verano, la mayor tasa de bacterivoría se registró en el tratamiento expuesto a RFA, mientras que en RUV+RFA y OSC se observaron tasas similares. Los nanoflagelados heterótrofos incubados en ausencia de luz, presentaron las mayores tasas de ingesta de bacteria marcadas, en las dos estaciones de experimentación. La mayor diferencia entre los organismos heterótrofos expuesto a RUV+RFA y RFA se registraron en el experimento de verano (Fig. 5.13).

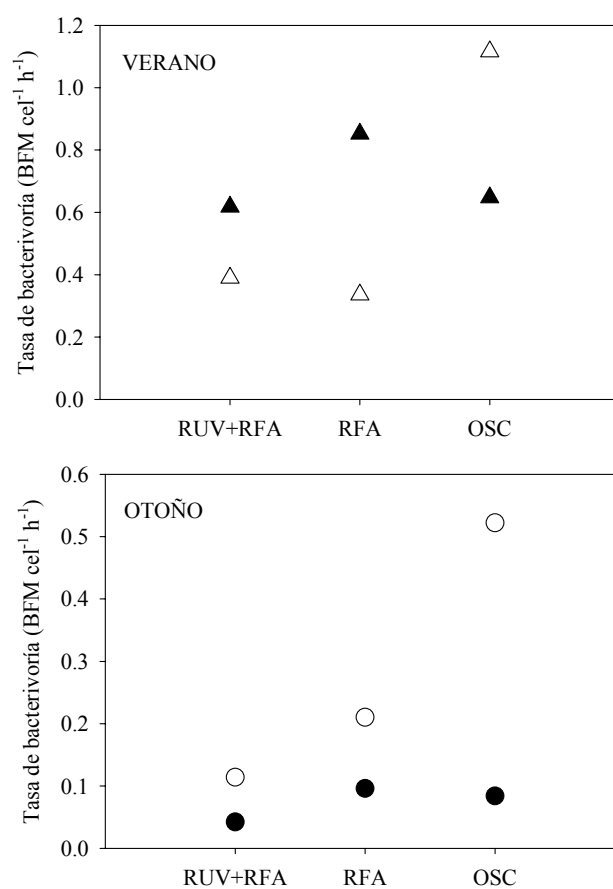


Figura 5.13. Tasas de ingesta correspondientes a nanoflagelados mixótrofos (símbolos negros) y heterótrofos (símbolos blancos) registradas en los tratamientos RUV+RFA, RFA y OSC en los experimentos realizados en verano y otoño. Notar cambio de escala entre figuras.



## BALANCE ENTRE AUTOTROFÍA Y HETEROTROFÍA EN NANOFLAGELADOS MIXÓTROFOS

La relación estimadora de variación en la autotrofia ( $A_{RFA} : A_{RUV+RFA}$ ) no mostró diferencias significativas entre el experimento de verano y el de otoño (Test  $t$ ,  $P = 0.068$ ), evidenciando un efecto similar de la RUV sobre la producción máxima ( $P_{max}$ ) de la comunidad algal presente (mixótrofos fundamentalmente) en el lago en ambos experimentos (Tabla 5.1). Por otro lado, al comparar los valores de la relación estimadora de variación en la heterotrofia ( $H_{RFA} : H_{RUV+RFA}$ ), en otoño se registró un mayor efecto de la RUV en la bacterivoría (Test  $t$ ,  $P = 0.008$ ) (Tabla 5.1).

La comparación de ambas relaciones mostró variaciones entre verano y otoño (Tabla 5.1). En verano la relación  $A_{RFA} : A_{RUV+RFA}$  fue mayor que  $H_{RFA} : H_{RUV+RFA}$ , lo cual indica que el efecto de la exposición a RUV fue mayor en el proceso de fotosíntesis, desplazando el balance entre ambos procesos hacia la heterotrofia. Por otro lado, en otoño se vio más afectado el proceso de bacterivoría frente a la exposición a RUV, desplazando el balance hacia la autotrofia.

Tabla 5.1. Valores de las relación indicadoras de autotrofia y heterotrofia.

Relación	Verano	Otoño
Autotrofia $A_{RFA} : A_{RUV+RFA}$	$1.589 \pm 0.025$	$1.325 \pm 0.141$
Heterotrofia $H_{RFA} : H_{RUV+RFA}$	$1.291 \pm 0.124$	$2.310 \pm 0.034$



## DISCUSIÓN

La radiación solar y el suministro de nutrientes son los principales factores que determinan la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas (Xenopoulos et al. 2002). Por lo tanto, cualquier alteración en alguna de estas variables abióticas puede afectar el ecosistema (Medina Sanchez et al. 2006). Frente a una alta relación Intensidad lumínica: nutrientes, el fitoplancton se encuentra en una condición lumínica estresante resultado de una elevada intensidad de la radiación solar, lo cual puede conducir a un desacople entre el proceso de fotosíntesis y el crecimiento, particularmente en ambiente deficiente de nutrientes (Berman Frank & Dubinsky 1999). Como consecuencia, el fitoplancton libera mayor cantidad de materia orgánica disuelta (MOD) con elevados valores de las relaciones C:N y C:P (Berman Frank & Dubinsky 1999; Carrillo et al. 2002; Medina Sánchez et al. 2006). La mayor liberación de C se asocia a un mecanismo fisiológico algal que permite el reciclaje intracelular de los nutrientes limitantes (Plaxton & Carswell 1999). Los valores de la relación luz: nutrientes registrados en el presente estudio en verano de 2008 fueron mayores que los observados en otoño; en verano la relación fue de 562.5 ( $1800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1} : 3.20 \mu\text{g L}^{-1} \text{P}$ ) y en otoño fue 317.5 ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1} : 3.78 \mu\text{g L}^{-1} \text{P}$ ). De esta manera, en verano el fitoplancton del Lago Escondido podría encontrarse liberando mayor cantidad de C, como exudados. Estas condiciones favorecen adaptativamente a las algas con capacidad de fagotrofia, como lo son las especies mixotróficas, debido a que al ingerir bacterias incorporan importantes cantidades de nutrientes. De esta manera, resultan esperables las mayores tasas de bacterivoría tal como fueran las registradas en el verano.

La relación positiva entre la intensidad lumínica y la fagotrofia ha sido interpretada como una estrategia muy exitosa para el suministro de los nutrientes necesarios para la asimilación de carbono a través del proceso fotosintético (Li et al. 2000; Urabe et al. 2000; Modenutti & Balseiro 2002; Medina Sanchez et al. 2004). En forma coincidente con estos estudios previos, los experimentos de bacterivoría realizados en el presente estudio revelaron una mayor tasa de ingesta por parte de los organismos mixótrofos, expuestos a luz (RFA) que en condiciones de oscuridad. Este efecto se observó con particular claridad y, tal como fuera esperado, en el experimento realizado en verano con la mayor incidencia lumínica recibida en la superficie del cuerpo de agua. La irradiancia registrada para el muestreo de verano fue de  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mientras que en el muestreo de otoño fue de



1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La diferencia entre las tasas de bacterivoría registradas para los diferentes tratamientos en el experimento de otoño, son claramente menores que las observadas en verano, mientras que las tasas registradas para los organismos heterótrofos se distribuyen de manera similar en ambos experimentos. De esta manera, se puede decir que la ingesta de presas por parte de los mixótrofos estudiados estaría relacionada directamente con la radiación fotosintéticamente activa.

Al analizar conjuntamente los parámetros fotosintéticos obtenidos y las tasas de bacterivoría de los nanoflagelados mixótrofos, se pudo observar también un patrón diferencial entre las dos fechas de experimentación. En el experimento realizado en verano, el tratamiento expuesto al espectro lumínico completo (RUV+RFA), presentó menor valor del parámetro fotosintético  $P_{\text{max}}$ , lo que indica un efecto negativo de la RUV en la producción primaria. El mayor valor promedio de  $P_{\text{max}}$  se registró en el tratamiento RFA, y esto se correspondió con el mayor valor de tasa de bacterivoría. Estas observaciones podrían confirmar también una relación directa entre la actividad de fotosíntesis y el hábito fagotrófico de las especies de mixótrofos presentes durante el verano. Las especies dominantes en este período fueron *R. lacustris*, *D. divergens* y *G. varians*; estas especies presentarían, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestros experimentos, como primer modo de nutrición la autotrofia, pero requerirían la ingesta de presas para suplementar su nutrición. Por lo tanto estas especies serían del tipo C, de acuerdo con la clasificación de Jones (1997), ya que su tasa de ingesta es proporcional a la intensidad lumínica.

En el experimento realizado en otoño, también se registró en el tratamiento RFA el mayor valor promedio de  $P_{\text{max}}$ , conjuntamente con la mayor tasa de bacterivoría. Sin embargo, la tasa de ingesta registrada en el tratamiento OSC también fue alta y muy similar a la observada en RFA ( $0.084 \text{ BMF cel}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Estos resultados podrían indicarnos la presencia de una especie determinada con elevada abundancia, cuya tasa de ingesta se relaciona con la limitación lumínica asociada a la disminución en la incidencia lumínica de otoño. Si bien la especie de mixótrofas observadas durante los muestreos, y por consiguiente en los experimentos, fueron siempre las mismas, las abundancias relativas variaron. La especie mixótrofa que dominó ampliamente en la muestra de lago de otoño fue *Chrysochromulina parva*, siendo esta especie la que además presentó el mayor porcentaje de bacterias ingeridas en el experimento de otoño. Esta especie podría incluirse dentro del grupo de mixótrofos descrito por Jones (1997) (Grupo B), cuyo modo de nutrición



primario es la fototrofia, pero que suplementa su crecimiento por fagotrofia cuando su crecimiento se ve limitado por luz.

Por otro lado, los nanoflagelados heterótrofos mostraron mayores tasas de bacterivoría en oscuridad que en luz (RFA). Esto es esperable debido a que estos organismos no dependen de la luz para su alimentación, a diferencia de los nanoflagelados mixótrofos, por lo que en oscuridad los nanoflagelados heterótrofos se ven beneficiados competitivamente. Por otra parte, se observaron menores tasas de bacterivoría en el tratamiento expuesto a RUV. Estas observaciones evidenciaron una mayor sensibilidad de estos organismos a la RUV, particularmente en el experimento de otoño. Esto podría verse asociado a una reducción en la movilidad o una alteración en la morfología celular, lo cual obstaculizaría la fagotrofia, como ha sido demostrado en otros estudios (Sommaruga et al. 1996, Sommaruga & Buma 2000). Sin embargo, también se ha observado que diferentes especies presentan diferentes grados de reducción en su movilidad frente a la exposición a UV (Sommaruga & Buma 2000), por lo tanto, resultaría importante que posteriores estudios contemplaran un análisis de las variaciones morfológicas de estos nanoflagelados.

Como se mencionó anteriormente, frente a altas intensidades de RFA el fitoplancton incrementa la excreción de C de bajo peso molecular. Por otro lado, resultados experimentales también han mostrado que algas expuestas a RUV excretan mayores valores de C orgánico, concluyéndose que esta excreción puede considerarse un indicador de stress fisiológico (Berman Frank & Dubinsky 1999, Carrillo et al. 2002). En relación con estas observaciones, varios estudios han registrado bajos valores de la relación C:P en algas expuestas a RUV (Xenopoulos et al. 2002; Medina Sanchez et al. 2006). En ambientes como el Lago Escondido, donde el componente predominante (> 85 %) son los nanoflagelados mixótrofos, sería esperable que un aumento en las RUV generara un descenso en la relación C: nutrientes. Durante el verano, cuando la intensidad de la incidencia lumínica es mayor, se registró una relación C:P = 277.386 y C:N = 10, mientras que en otoño los valores fueron C:P = 312.33 y C:N = 16.25 (Bastidas Navarro, datos propios). Este descenso en la relación C:P generada por un aumento de la incidencia de las RUV, durante el verano, constituiría un mejoramiento en la calidad del alimento de los herbívoros (Sterner & Elser 2002; Xenopoulos et al. 2002; Katechakis et al. 2005). Esto podría relacionarse con los resultados obtenidos de nuestros experimentos que indican un desplazamiento de los nanoflagelados mixótrofos hacia la heterotrofia. Bajo exposición a UVR, el ingreso de nutrientes se incrementa en relación a la fijación de C.



A partir de los estudios presentados en este capítulo hemos observado que existe un balance en la mixotrofia entre la fijación de C por fotosíntesis y la ingesta de partículas, y que este balance es modulado por la calidad lumínica incidente. De esta manera, la exposición a RUV generó un desbalance de estos modos de alimentación hacia la heterotrofia en verano y de la autotrofia en otoño. Estas variaciones se relacionan también con una composición específica diferencial de mixótrofos. Los desbalances observados en nuestros experimentos traerían aparejados cambios sustanciales en las relaciones C: nutrientes que podrían repercutir en toda la cadena trófica del lago.

## CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones de este trabajo se refieren a los efectos de la radiación ultravioleta (RUV) sobre la materia orgánica disuelta (MOD) y su consecuente efecto en las comunidades microbianas de lagos someros de la región andino-patagónica. Los principales puntos son:

1. Este trabajo demuestra el importante papel de las macrófitas (*Schoenoplectus californicus* y *Potamogeton linguatus*) como fuente de MOD, a través de sus lixiviados, en estos ecosistemas.
2. El contenido de MOD afecta al balance entre la Producción Primaria y la Producción Bacteriana (PP:PB) y cambia el espectro de la luz que ingresa a estos lagos afectando a la composición de los pigmentos de las picocianobacterias.
3. La radiación solar debería incluirse como un factor importante en estos ambientes debido a que la relación PP:PB puede verse disminuida por la fotoinhibición de la PP en la superficie, independientemente de la concentración de MOD.
4. La fotodegradación es un fenómeno de gran importancia que afecta al tamaño molecular de MOD del lago y de lixiviados de macrófitas así como también a la liberación de fósforo.
5. Las bacterias se ven afectadas tanto en su producción como en la estructura del conjunto bacteriano en relación a la interacción calidad de la MOD / RUV. El grupo de las  $\beta$ -*Proteobacteria* fue dominante pero las *Cythofaga-Flavobacterium* y *Actinobacteria* pueden verse beneficiadas después de un período de exposición a RUV.
6. Por otra parte, al comparar la producción bacteriana entre las zonas litoral y pelágica, se puede concluir que las macrófitas aportan con MOD fotodegradable (MOD de mayor peso molecular) en la zona litoral durante la primavera, lo cual contribuye a un incremento en la producción.
7. Considerando a los componentes mixótrofos de la microcomunidad (nanoflagelados fundamentalmente) se observó que el balance entre la fijación de C por fotosíntesis (autotrofia) y la ingesta de partículas (heterotrofia) es afectado por la calidad lumínica incidente. La RUV generó un desbalance entre estos modos de nutrición hacia la heterotrofia en verano y hacia la autotrofia en otoño.



**BIBLIOGRAFÍA**

- Aiken, G. R., D. M. McKnight & R. L. Wershaw (1985) Humic Substances in Soil, Sediment and Water—Geochemistry, Isolation and Characterization. Wiley, New York.
- Allard, B., H. Borén, C. Petterson & G. Zhang (1994) Degradation of humic substances by UV irradiation. *Environ. Int.* 20, 97-101.
- Amon, R. M. W. & R. Benner (1996) Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 41, 41–51.
- Anesio, A. M., C. Mans, T. Denwars, L. J. Tranvik & W. Graneli (1999) Decreased bacterial growth on vascular plant detritus due to photochemical modification. *Aquat. Microb. Ecol.* 17, 159-165.
- Anesio, A. M., J. Theil-Nielsen & W. Graneli (2000) Bacterial growth on photochemically transformed leachates from aquatic and terrestrial primary producers. *Microb. Ecol.* 40, 200-208.
- Añón Suárez, D. A. (1991) Distribución del bentos del lago Escondido (Río Negro, Argentina) con especial énfasis en los quironómidos (Diptera, Chironomidae). *Stud. Neotrop. Fauna. Environ.* 26, 149-157.
- Añón Suárez, D. A. (1997) Estructura y Dinámica de la Taxocenosis Chironomidae (Diptera, Nematocera) de un Lago Andino. Tesis de Doctorado en Ciencias en Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Plata.
- Añón Suárez, D. A. (2002) Life history and secondary production of *Ablabesmya reissi* (Diptera, Chironomidae) from Lake Escondido, Bariloche, Argentina. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 21, 414-429.
- APHA (1992) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Part 4000, APHA, Washington, DC.
- Arrieta, J. M. & G. J. Herndl (2002) Changes in bacterial  $\beta$ -glucosidase activity during a coastal phytoplankton bloom. *Limnol. Oceanogr.* 47, 594–599.
- Arvola, L. & P. Kankaala (1989) Winter and spring variability in phyto-and bacterioplankton in lakes with different water colour. *Aqua. Fennica* 19, 29-39.
- Arvola, L., K. Salonen & M. Rask (1999) Food webs of humic waters. Trophic interactions. En *Limnology of humic waters* (Editado por Keskitalo J. & P. Eloranta), pp. 265-276. Backhuys Publishers, Leiden. The Netherlands.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, R. A. Meyer-Reil & F. Thingstad (1983) En *Flows of Energy and Materials in Marine Ecosystems: Theory and Practice* The cycling of organic matter by bacterioplanktonic pelagic marine systems: Microenvironmental considerations

- (Editado por Fashman M. J. R.), pp. 345-360. NATO Conference Series 4, Marine Sciences. Plenum Press, New York.
- Balseiro, E. G. & B. E. Modenutti (1990) Zooplankton Dynamics of Lake Escondido (Río Negro, Argentina) with special reference to a population of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Calanoida). *Int. Rev. Gesam. Hydrobiol.* 75, 475-491.
- Balseiro, E. G., B. E. Modenutti & C. P. Queimaliños (1997) Nutrient recycling and shifts in N:P ratio by different zooplankton structures in a South Andes lake. *J. Plankton Res.* 19, 805-817.
- Balseiro, E. G., C. P. Queimaliños & B. E. Modenutti (2004) Grazing impact on autotrophic picoplankton in two south Andean lakes (Patagonia, Argentina) with different light:nutrient ratios. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77, 73-85.
- Bano, N., M. A. Moran & R. E. Hodson (1998) Photochemical formation of labile organic matter from two components of dissolved organic carbon in a freshwater wetland. *Aquat. Microb. Ecol.* 16, 95-102.
- Barbieri, E. S. (2007) Efectos interactivos de la radiación ultravioleta y de la capa superficial de mezcla en la productividad fitoplanctónica marina en latitudes medias. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad Nacional del Comahue.
- Barbieri, E. S., V. E. Villafañe & E. W. Helbling (2002) Experimental assessment of UV effect on temperate marine phytoplankton when exposed to variable radiation regimes. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1648-1655.
- Bastidas Navarro, M. A. & V. Diaz Villanueva (2004) Distribución espacial de las diatomeas en el fitoplancton de un lago somero andino-patagónico. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 39, 33-40.
- Bastidas Navarro, M. A. & B. E. Modenutti (2007) Efecto de la estructuración por macrófitas y por recursos alimentarios en la distribución horizontal de tecamebas y rotíferos en un lago andino patagónico. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 80, 345-362.
- Bastidas Navarro, M. A., E. Balseiro & B. Modenutti (2009) Effect of UVR on Lake Water and Macrophyte Leachates in Shallow Andean-Patagonian Lakes: Bacterial Responses to Changes in Optical Features. *Photoch. Photobiol.* 85, 332-340.
- Bastidas Navarro, M. A., B. Modenutti, C. Callieri, R. Bertoni & E. Balseiro. Balance between primary and bacterial production in North Patagonian shallow lakes. *Aquat. Ecol.* en prensa DOI 10.1007/s10452-008-9220-9.
- Behrenfeld, J. M., K. Worthington, M. R. Sherrell, P. F. Chavez, P. Strutton, P. McPhaden, D. M. Shea (2006) Controls on tropical Pacific Ocean productivity revealed through nutrient stress diagnostics. *Nature* 442, 1025–1028.
- Benner, R. (2002) Chemical composition and reactivity. En *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (Editado por D. A. Hansell & C. A. Carlson), pp. 59-90. Academic Press, New York, USA.

- Benner, R. (2003) Molecular indicators of the bioavailability of dissolved organic matter. En *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter* (Editado por Findlay, S. E. G. & R. L. Sinsabaugh), pp. 121-137. Academic Press, San Diego, California.
- Benner, R. & B. Biddanda (1998) Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter: effects on bacterial growth. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1373-1378.
- Bergstrom, A. K. & M. Jansson (2000) Bacterioplankton production in humic lake Ortrasket in relation to input of bacterial cells and input of allochthonous. *Microb. Ecol.* 39, 101-115.
- Bergstrom, A. K., M. Jansson, S. Drakare & P. Blomqvist (2003) Occurrence of mixotrophic flagellates in relation to bacterioplankton production, light regime and availability of inorganic nutrients in unproductive lakes with differing humic contents. *Freshwat. Biol.* 48, 868-877.
- Berman Frank, I. & Z. Dubinsky (1999) Balanced growth in aquatic plants: Myth or reality? *Bioscience* 49, 29-37.
- Bertilsson, S. & J. B. Jones (2003) Supply of dissolved organic matter to aquatic ecosystems: autochthonous sources. En *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter* (Editado por S. E.G. Findlay & R. L. Sinsabaugh), pp. 3-24. Academic Press, San Diego, USA.
- Bertilsson, S. & L. J. Tranvik (1998) Photochemically produced carboxylic acids as substrates for freshwater bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* 43, 885-895.
- Bertilsson, S. & L. J. Tranvik (2000) Photochemical transformation of dissolved organic matter in lakes. *Limnol. Oceanogr.* 45, 753-762.
- Boelen, P., I. Obemosterer, A. A. Vink & A. G. J. Buma (1999) Attenuation of biologically effective UV radiation in tropical Atlantic waters measured with a biochemical DNA dosimeter. *Photochem. Photobiol.* 69, 34-40.
- Bothwell, M. L., D. M. J. Sherbo & C. M. Pollok (1994) Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: influence of trophic-level interactions. *Science* 265, 97-100.
- Brinkmann, T., D. Sartorius & F. H. Frimmel (2003) Photobleaching of humic rich dissolved organic matter. *Aquatic Sciences* 65, 415-424.
- Brisco, S. & S. Ziegler (2004) Effect of solar radiation on the utilization of dissolved organic matter (DOM) from two headwater streams. *Aquat. Microb. Ecol.* 37, 197-208.
- Burkert, U., K. Warnecke, D. Babenzien, E. Zwirnmann & J. Pernthaler (2003) Members of a readily enriched  $\beta$ -Proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6550-6559.
- Callieri, C. (2008) Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Rev.* 1, 1-28.

- Callieri, C., E. Amicucci, R. Bertoni & L. Vörös (1996) Fluorometric characterization of two picocyanobacteria strains from different underwater light quality. *Int. Revue. Hydrobiol.* 81, 13-23.
- Callieri, C., G. Morabito, Y. Huot, J. P. Neale & E. Litchman (2001) Photosynthetic response of pico-and nanoplanktonic algae to UVB, UVA and PAR in high mountain lake. *Aquat. Sci.* 63, 286-293.
- Callieri, C., B. E. Modenutti, C. P. Queimaliños, R. Bertoni & E. G. Balseiro (2007) Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquat. Ecol.* 41, 511-523.
- Caron, D. A. (1991) Evolving role of protozoa in aquatic nutrient cycles. En *Protozoa and their Role in Marine Processes* (Editado por P.C. Reid, C.M. Turley & P.H. Burkill), pp. 387-415. NATO ASI Series, Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin.
- Carpenter, S. R., J. J. Cole, J. F. Kitchell & M. L. Pace (1998) Impact of dissolved organic carbon, phosphorus, and grazing on phytoplankton biomass and production in experimental lakes. *Limnol. Oceanogr.* 43, 73-80.
- Carrillo, P., J. M. Medina Sanchez & M. Villar Argainz (2002) The interaction of phytoplankton and bacteria in a high mountain lake: importance of spectral composition of solar radiation. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1294-1306.
- Carrillo, P., J. M. Medina Sánchez, M. Villar Argaiz, J. A. Delgado Molina & F. J. Bullejos (2006) Complex interactions in microbial food webs: Stoichiometric and functional approaches. *Limnetica* 25, 189-204.
- Corno, G., B. E. Modenutti, C. Callieri, E. G. Balseiro, R. Bertoni & E. Caravati (2009) Bacterial diversity and morphology in deep ultraoligotrophic Andean lakes: Role of UVR on vertical distribution. *Limnol. Oceanogr.* 54, 1098-1112.
- Crutzen, P. J. (1992) Ozone depletion—Ultraviolet on the increase. *Nature* 356, 104-105.
- Currie, D. J. & J. Kalff (1984) A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnol. Oceanogr.* 29, 298-310.
- Davis, C. & A. Van der Valk (1983) Litter decomposition in prairie glacial marshes. En *Freshwater Wetlands: Ecological Processes and Management Potential* (Editado por R. Good, D. Whigham & R. Simpson). Academic Press, New York, NY.
- de Haan, H. (1992) Impacts of environmental changes on the biogeochemistry of aquatic humic substances. *Hydrobiologia* 229, 59-71.
- de Haan, H. & T. de Boer (1986) Geochemical aspects of aqueous iron, phosphorus and dissolved organic carbon in the humic Lake Tjeukemeer, the Netherlands. *Freshwat. Biol.* 6, 661-672.

- de Haan, H. & T. de Boer (1987) Applicability of light absorbance and fluorescence as measures of concentration and molecular size of dissolved organic carbon in humic Lake Tjeukemeer. *Water Res.* 21, 731-734.
- de Haan, H., R. I. Jones & K. Salonen (1990) Abiotic transformation of iron and phosphate in humic lake water revealed by double-isotope labeling and gel filtration. *Limnol. Oceanogr.* 35, 491-497.
- de Hoyos, C., J. J. Aldasoro, M. Toro & F. A. COMÍN. 1998. Specific composition and ecology of chrysophyte flagellates in Lake Sanabria (NW Spain). *Hydrobiologia* 369/370, 287-295.
- de Lange, H.J., D.P. Morris & C.E. Williamson (2003) Solar ultraviolet photodegradation of DOC may stimulate freshwater food webs. *J. Plankton Res.* 25, 111-117.
- del Giorgio, P. A. & J. Davis (2003) Patterns in dissolved organic matter lability and consumption across aquatic ecosystems. En *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter* (Editado por Findlay, S. E. G. & R. L. Sinsabaugh), pp. 400-424. Academic Press, San Diego, California.
- del Giorgio, P. A. & C. M. Duarte (2002) Respiration in the open ocean. *Nature* 420: 379-384.
- del Giorgio, P. A. & R. H. Peters (1994). Patterns in planktonic P:R ratios in lakes: influence of lake trophic and dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* 39: 772-787.
- del Giorgio, P. A., Y. T. Prairie & D. F. Bird (1997) Coupling between rates of bacterial production and the abundance of metabolically active bacteria in lakes, counted using CTC reduction and flow cytometry. *Microb. Ecol.* 34: 144-154.
- DeLong, E. F., L. T. Taylor, T. L. Marsh & C. M. Preston (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic Archaea and Bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5554-5563.
- Denward, C. M. & L. J. Tranvik (1998) Effects of solar radiation on aquatic macrophyte litter decomposition. *Oikos* 82, 51-58.
- Díaz, M. M. & F. L. Pedrozo (1993) Seasonal succession of phytoplankton in a small Andean Patagonian lake (Rep. Argentina) and some consideration about the PEG Model. *Arch. Hydrobiol.* 127, 167-184.
- Díaz, M. M. & F. L. Pedrozo (1996) Nutrient limitation in Andean-Patagonian lakes at latitude 40-41° S. *Arch. Hydrobiol.* 138, 123-143.
- Dillon, P. J. & L. A. Molot (1997) Dissolved organic and inorganic carbon mass balances in central Ontario lakes. *Biogeochemistry* 36, 29-42.
- Drakare, S., P. Blomqvist, A. Bergstrom & M. Jansson (2002) Primary production and phytoplankton in relation to DOC input and bacterioplankton production in humic Lake Östräsket. *Freshwat. Biol.* 47, 41-52.

- Eiler, A., S. Langenheder & S. Bertilsson (2003) Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3701-3709.
- Eilers, P. & J. Peeters (1988), A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol. Model.* 42, 199-205.
- Eloranta, P. 1989. Scaled chrysophytes (Chrysophyceae and Synurophyceae) from national park lakes in southern and central Finland. *Nord. J. Bot.* 8, 671-681.
- Eloranta, P. 1995. Phytoplankton of the national park lakes in central and southern Finland. *Ann. Bot. Fenn.*, 32, 193-209.
- Emmenger, L., R. Schononberger, L. Sigg & B. Sulzberger (2001) Light-induced redox cycling of iron in circumneutral lakes. *Limnol. Oceanogr.* 46, 49-61.
- Fahnenstiel, G. L., D. G. Redalje & S. E. Lohrenz (1994) Has the importance of photoautotrophic picoplankton been overestimated? *Limnol. Oceanogr.* 39, 432-438.
- Farjalla, V. F., A. M. Anesio, S. Bertilsson & W. Granéli (2001) Photochemical reactivity of aquatic macrophyte leachates: abiotic transformations and bacterial response. *Aquat. Microb. Ecol.* 24, 187-195.
- Fenchel, T (1986) The ecology of heterotrophic microflagellates. *Adv. Microb. Ecol.* 9, 57-97.
- Ferrero, M., M. Eory, G. Ferrera, I. Shloss, H. Zagarese, M. Vernet & F. Momo (2006) Symposium-in-Print: UV Effects on Aquatic and Coastal ecosystems Vertical Mixing and Ecological Effects of Ultraviolet Radiation in Planktonic Communities. *Photochem. Photobiol.* 82, 898-902.
- Findlay, S. (2003) Bacterial response to variation in dissolved organics matter. En *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter* (Editado por Findlay, S. E. G. & R. L. Sinsabaugh), pp. 363-379. Academic Press, San Diego, California.
- Findlay, S. E. G. & R. L. Sinsabaugh (2003) *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, California.
- Foreman, C. M. & J. S. Covert (2003) Linkages between dissolved organic matter composition and bacterial community structure. En *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter* (Editado por Findlay, S. E. G. & R. L. Sinsabaugh), pp. 343-362. Academic Press, San Diego, California.
- Francko, D. A. & R. T. Heath (1979) Functionally distinct classes of complex phosphorus compounds in lake water. *Limnol. Oceanogr.* 27, 564-569.
- Fry, J.C. (1988) Determination of biomass. En *Methods in Aquatic Bacteriology* (Editado por Austin, B.), pp. 27-72, Chichester (Wiley).
- Fryer, M. J., J. R. Andrews, K. Oxborough, D. A. Blowers & N. R. Baker (1998) Relationship between CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron transport and active O<sub>2</sub> metabolism

- in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol.* 116, 571-580.
- Gao, W. & R. G. Zepp (1998) Factors influencing photoreactions of dissolved organic matter in a coastal river of the Southeastern United States. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2940-2946.
- Genty, B. E., J. M. Briantais & N. R. Baker (1989) Relative quantum efficiencies of the two photosystems of leaves in photorespiratory and non-photorespiratory conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 28, 1-10.
- Gervais, F., J. Padisák & R. Koschel (1997) Do light quality and low nutrient concentration favour picocyanobacteria below the thermocline of the oligotrophic Lake Stechlin? *J. Plankton Res.* 19, 771-781.
- Glockner, F. O., B. M. Fuchs & R. Amann (1999) Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3721-3726.
- Glockner, F. O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Dessinova, J. Pernthaler, A. Pernthaler & R. Amann (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5053-5065.
- Granéli, W., M. Lindell & L. Tranvik (1996) Photo-oxidative production of dissolved inorganic carbon in lakes of different humic content. *Limnol. Oceanogr.* 41, 698-706.
- Green, S. A. & N. V. Blough (1994) Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1903-1916.
- Gurung, T. B., J. Urabe & M. Nakanishi (1999) Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. *Aquat. Microb. Ecol.* 17, 27-35.
- Häder, D. P., H. D. Kumar, R. C. Smith & R. C. Worrest (2007) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 267-285.
- Hahn, M. W., H. Lünsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Höfle, J. Boenigk & P. Stadler (2003). Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1442-1451.
- Havskum, H. & B. Riemann (1996) Ecological importance of bacterivorous, pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137, 251-263.
- Helbling, E. W., A. G. J. Buma, M. K. De Boer & V. E. Villafañe (2001a) In situ impact of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and DNA in temperate marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211, 43-49.

- Helbling, E. W., V. E. Villafañe & E. S. Barbieri (2001b) Sensitivity of winter phytoplankton communities from Andean lakes to ultraviolet-B radiation. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74, 273-282.
- Helbling, E. W., E. S. Barbieri, R. P. Sinha, V. E. Villafañe & D. P. Häder (2004) Dynamics of potentially protective compounds in Rhodophyta species from Patagonia (Argentina) exposed to solar radiation. *J. Photoch. Photobiol.* 75, 63-71.
- Helms, J. R., A. Stubbins, J. D. Ritchie, E. C. Minor, D. J. Kieber & K. Mopper (2008) Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 53, 955-969.
- Hessen, D. O. (1985) The relation between bacterial carbon and dissolved humic compounds in oligotrophic lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 215-223.
- Hessen, D. O. (1998) Food webs and carbon cycling in humic lakes. En *Aquatic Humic substances: Ecology and Biogeochemistry* (Editado por Hessen D. O. & L. J. Tranvik), pp. 285-316. Springer-Verlag, Berlin.
- Hessen, D. O., K. Nygaard, K. Salonen & A. Vahatalo (1994) The effects of substrate stoichiometry on microbial activity and carbon degradation in humic lakes. *Environ. Int.* 20, 67-76.
- Huisman, J., J. Sharples, J. M. Stroom, P. M. Visser, E. E. A. Kardinaal, J. M. H. Verspagen & B. Sommeijer (2004) Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology* 85, 2960-2970.
- Ichinotsuka, D., U. Hiroyuki & N. Shin-Ini (2006) Relative importance of nanoflagellates and ciliates as consumers of bacteria in a coastal sea area dominated by oligotrichous *Strombidium* and *Strombolidium*. *Aquat. Microb. Ecol.* 42, 132-147.
- Isaksson, A. (1998) Phagotrophic phytoflagellates in lakes – a literature review. *Arch. Hydrobiol.* 51, 63-90.
- Isaksson, A., A. K. Bergstrom, P. Blomqvist & M. Jansson (1999) Bacterial grazing by phagotrophic phytoflagellates in a deep humic lake in northern Sweden. *J. Plankton Res.* 21, 247-268.
- Jansson, M. (1993) Uptake, exchange, and excretion of orthophosphate in phosphate starved *Scenedesmus quadricauda* and *Pseudomonas* K7. *Limnol. Oceanogr.* 38, 1162-1178.
- Jansson, M., P. Blomqvist, A. Jonsson & A. K. Bergstrom (1996) Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Örrträsket. *Limnol. Oceanogr.* 41, 1552-1559.
- Jansson, M., A. K. Bergstrom, P. Blomqvist, A. Isaksson & A. Jonsson (1999) Impact of allochthonous organic carbon on microbial food web carbon dynamics and structure in Lake Örrträsket. *Arch. Hydrobiol.* 144, 409-428.



- Jansson, M., A. K. Bergström, P. Blomqvist & S. Drakare (2000) Allochthonous organic carbon and phytoplankton/bacterioplankton production relationships in lakes. *Ecology* 81, 3250-3255.
- Jones, H. L. J. (1997) A classification of mixotrophic protists based on their behaviour. *Aquat. Microb. Ecol.* 37, 35-43.
- Jones, R. I. (1990) Phosphorus transformations in the epilimnion of humic lakes: biological uptake of phosphate. *Freshwat. Biol.* 23, 323-337.
- Jones, R. I. (1992) The influence of humic substances on lacustrine planktonic food chains. *Hydrobiologia* 229, 73-91.
- Jones, R. I. (2000) Mixotrophy in planktonic protist: an overview. *Freshwat. Biol.* 45, 219-226.
- Jones, R. I., K. Salonen & H. de Haan (1988) Phosphorus transformations in the epilimnion of humic lakes: abiotic interactions between dissolved humic materials and phosphate. *Freshwat. Biol.* 19, 357-369.
- Jones, R. I., P. J. Shaw & H. de Haan (1993) Effects of dissolved humic substances on the speciation of iron and phosphate at different pH and ionic strength. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1052-1059.
- Jonsson, A., M. Meili, A. K. Bergström & M. Jansson (2001) Whole-lake mineralization of allochthonous and autochthonous organic carbon in a large humic lake (Örträsket, N. Sweden). *Limnol. Oceanogr.* 46, 1691-1700.
- Kamjunke, N., T. Henrichs & U. Gaedke (2007) Phosphorus gain by bacterivory promotes the mixotrophic flagellate *Dinobryon* spp. during re-oligotrophication. *J. Plankton Res.* 29, 39-46.
- Kankaala, P. (1988) The relative importance of algae and bacteria as food for *Daphnia longispina* (Cladocera) in a polyhumic lake. *Freshwat. Biol.* 19, 285-296.
- Kankaala, P., L. Arvola, T. Tulonen & A. Ojala (1996) Carbon budget for the pelagic food web of the euphotic zone in a boreal lake (Lake Pääjärvi). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1663-1674.
- Karentz, D., M. L. Bothwell, R. B. Coffin, A. Hanson, G. J. Herndl, S. S. Kilham, M. P. Lesser, M. Lindell, R. E. Moeller, D. P. Morris, P. J. Neale, R. W. Sanders, C. S. Weiler & R. G. Wetzel (1994) Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of working group on bacteria and phytoplankton. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 43, 31-69.
- Karlsson, J., A. Jonsson & M. Jansson (2001) Bacterioplankton production in lakes along an altitudinal gradient in the subarctic north of Sweden. *Microb. Ecol.* 42, 372-382.
- Katano, T., S. Nakano, H. Ueno, O. Mitamura, K. Anbutsu, M. Kihira, Y. Satoh, V. Drucker & M. Sugiyama (2005) Abundance, growth and grazing loss rates of picophytoplankton in Barguzin Bay, Lake Baikal. *Aquat. Ecol.* 39, 431-438.

- Katechakis, A., T. Haseneder, R. Kling & H. Stibor (2005) Mixotrophic versus photoautotrophic specialist algae as food for zooplankton: The light: nutrient hypothesis might not hold for mixotrophs. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1290-1299.
- Keskitalo, J. & P. Eloranta, P. (1999) *Limnology of humic waters*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Kirchman, D. L. (2002) Reply to Peters (2002) Overcoming linearisation errors in calculating bacterial growth rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 245, 309-310.
- Kirchman, D. L., A. I. Dittel, S. E. G. Findlay & D. Fischer (2004) Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in Hudson River, New York. *Aquat. Microb. Ecol.* 35, 243-257.
- Kirk, J. T. O. (1980) Spectral Absorption properties of natural waters: contribution of the soluble and particulate fractions to light absorption in some inland waters of south-eastern Australia. *Aust. J. Marine. Freshwater Res.* 31, 287-296.
- Klisch M., R. P. Sinha, E. W. Helbling & D. P. Häder (2005) Induction of thymine dimers by solar radiation in natural freshwater phytoplankton assemblages in Patagonia, Argentina, *Aquat. Sci.* 67, 72-78.
- Kronberg, L. (1999) Content of humic substances in freshwater. En *Limnology of Humic Waters* (Editado por Keskitalo, J. & P. Eloranta), pp. 9-10. Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands.
- Kulovaara, M., N. Corin, P. Backlund & J. Tervo (1996) Impact of UV254-Radiation on aquatic humic substances. *Chemosphere* 33, 783-790.
- Lepistö, L. & U. Rosenström (1998) The most typical phytoplankton taxa in four types of boreal lakes. *Hydrobiologia* 369/370, 89-97.
- Lewis, W. (2002) Yield of nitrogen from minimally disturbed watersheds of the United States. *Biogeochemistry* 57, 375-385.
- Li, A. S., D. K. Stoecker & D. W. Coats (2000) Mixotrophy in *Gyrodinium galatheanum* (Dinophyceae): Grazing responses to light intensity and inorganic nutrients. *J. Phycol.* 36, 33-45.
- Lindell, M. J., W. Graneli & L. Tranvik (1995) Enhanced bacterial growth in response to photochemical transformation of dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 40, 195-199.
- Litjens, R. A. J., T. I. Quickenden & C. G. Freeman (1999) Visible and near-ultraviolet absorption spectrum of liquid water. *Appl. Opt.* 38, 1216-1223.
- Loiselle, S. A., L. Bracchini, A. M. Dattilo, M. Ricci, A. Tognazzi, A. Cózar & C. Rossi (2009) Optical characterization of chromophoric dissolved organic matter using wavelength distribution of absorption spectral slopes. *Limnol. Oceanogr.* 54, 590-597.

- Lovell, C. R. & A. Konopka (1985) Primary and bacterial production in two dimictic Indiana lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 485-491.
- Mackey, K. R. M., A. Paytan, A. R. Grossman & S. A. Bailey (2008) A photosynthetic strategy for coping in a high light, low-nutrient environment. *Limnol. Oceanogr.* 53, 900-913.
- Maranger, R. & M. J. Pullin (2003) Elemental complexation by dissolved organic matter in lakes: Implications for Fe speciation and the bioavailability of Fe and P. En *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter* (Editado por Findlay, S. E. G. & R. L. Sinsabaugh), pp. 185-214. Academic Press, San Diego, California.
- Maxwell, K. & G. N. Johnson (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668.
- McKnight, D. M. & G. R. Aiken (1998) Sources and age of aquatic humus. En *Aquatic Humic Substances* (Editado por Hessen D. O. & L. J. Tranvik), pp. 9-39. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- McKnight, D., E. Thurman & R. Wershaw (1985) Biogeochemistry of Thoreau's Bog, Concord, Massachusetts. *Ecology* 66, 1339-1352.
- McKnight, D. M., E. W. Boyer, P. K. Westerhoff, P. T. Doran, T. Kulbe & D. T. Andersen (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* 46, 38-48.
- Medina Sanchez, J. M., M. Villar Argaiz & P. Carrillo (2002) Modulation of the bacterial response to spectral solar radiation by algae and limiting nutrients. *Freshwat. Biol.* 47: 2191-2204.
- Medina Sanchez, J. M., M. Villar Argaiz & P. Carrillo (2004) Neither with nor without you: A complex algal on bacterioplankton in a high mountain lake. *Limnol. Oceanogr.* 49, 1722-1733.
- Medina Sanchez, J. M., M. Villar Argaiz & P. Carrillo (2006) Solar radiation-nutrient interaction enhances the resource and predation algal control on bacterioplankton: A short experimental study. *Limnol. Oceanogr.* 51, 913-924.
- Menden Deuer, S. & E. J. Lessard (2000) Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.* 45, 569-579.
- Miller, W. M. (1998) Effects of UV radiation on aquatic humus: Photochemical principles and experimental considerations. En *Aquatic humic substances: Ecology and biogeochemistry* (Editado por D. O. Hessen & L. Tranvik), pp. 125-141. 133. *Ecological Studies* 133, Springer-Verlag.
- Miller, W. P. & M. A. Moran (1997) Interaction of photochemical and microbial processes in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1317-1324.

- Modenutti, B. E. & E. G. Balseiro (2002) Mixotrophic ciliates in an Andean lake: dependence on light and prey of an *Ophrydium naumanni* population. *Freshwat. Biol.* 47, 121-128.
- Modenutti, B. E. & M. C. Diéguez (1996) Population dynamics of *Collotheca mutabilis* (Rotifera, Monogononta) in two argentine Andean lakes with different thermal regimes. *Rev. Br. Biol.* 56, 403-408.
- Modenutti, B. & G. L. Pérez (2001) Planktonic ciliates from an oligotrophic south andean lake, Morenito Lake (Patagonia, Argentina). *Braz. J. Biol.* 61, 389-395.
- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro, C. P. Queimaliños, D. Añón Suarez, M. C. Dieguez & R. J. Albariño (1998) Structure and dynamics of food web in Andean lakes. *Lakes & Reservoirs, Res. Management* 3, 179-186.
- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro & C. P. Queimaliños (2000) Ciliate community structure in two South Andes lakes: The effect of lake water on *Ophrydium naumanni* distribution. *Aquat. Microb. Ecol.* 21, 299-307.
- Modenutti, B. E., E. G. Balseiro, C. Callieri, C. Queimaliños & R. Bertoni (2004) Increase in photosynthetic efficiency as a strategy of planktonic organisms exploiting deep lake layers. *Freshwat. Biol.* 49, 160-169.
- Modenutti, B., E. Balseiro, C. Callieri, R. Bertoni & C. Queimaliños (2005) Effect of UV-B and different PAR intensities on the primary production of the mixotrophic planktonic ciliate *Stentor araucanus*. *Limnol. Oceanogr.* 50, 864-871.
- Modenutti, B., E. Balseiro, C. Callieri & R. Bertoni (2008) Light vs food supply as factors modulating niche partitioning in two pelagic mixotrophic ciliates. *Limnol. Oceanogr.* 53, 446-455.
- Molot, L. A. & P. J. Dillon (1997) Photolytic regulation of dissolved organic carbon in northern lakes. *Global Biogeochem. Cycles* 11, 357-365.
- Mopper, K., X. Zhou, R. J. Kieber, D. J. Kieber, R. J. Sikorski & R. D. Jones (1991) Photochemical degradation of dissolved organic carbon and its impact on the oceanic carbon cycle. *Nature* 353, 60-62.
- Moran, M. A. & J. S. Covert (2003) Photochemically mediated linkages between dissolved organic matter and bacterioplankton. En *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter* (Editado por Findlay S. & R. L. Sinsabaugh), pp 243-263. Academic Press, San Diego, California.
- Moran, M. A. & R. E. Hodson (1990) Bacterial production on humic and nonhumic components of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* 35, 1744-1756.
- Moran, M. A. & R. G. Zepp (1997) Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1307-1316.
- Moran, M. A. & R. G. Zepp (2000) UV radiation effects on microbes and microbial processes. En *Microbial ecology of the oceans* (Editado por Kirchman D. L.), pp. 201-228. Wiley.

- Moran, M. A., W. D. Sheldon & R. G. Zepp (2000) Carbon loss and optical property changes during long-term photochemical and biological degradation of estuarine dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1254-1264.
- Morris, D. P. & B. R. Hargreaves (1997) The role of photochemical degradation of dissolved organic carbon in regulating the UV transparency of three lakes on the Pocono Plateau. *Limnol. Oceanogr.* 42, 239-249.
- Morris, D. P., H. Zagarese, C. E. Williamson, E. G. Balseiro, B. R. Hargreaves, B. Modenutti, R. Moeller & C. Queimaliños (1995) The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1381-1391.
- Mostajir, B., S. Demers, S. de Mora, C. Belzile, J.-P. Chanut, M. Gosselin, S. Roy, P.Z. Villegas, J. Fauchot & J. Boucard (1999) Experimental test of the effect of ultraviolet-B radiation in a planktonic community. *Limnol. Oceanogr.* 44, 586-596.
- Münster, U. & R. J. Chróst (1990) Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter. En *Aquatic microbial ecology* (Editado por Overbeck J. & R. J. Chróst), pp. 8-46. Springer-Verlag, New York.
- Münster, U., E. Heikkinen, M. Likolammi, M. Järvinen, K. Salonen & H. De Haan (1999) Utilization of polymeric and monomeric aromatic and amino acid carbon in a humic boreal forest lake. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 54, 105-134.
- Naganuma, T., S. Konishi, T. Inoue, T. Nekane & S. Sulizaki (1996) Photodegradation or photoalteration? Microbial assay of the effect of UV-B on dissolved organic matter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 135, 309-310.
- Neale, P. J., J. J. Cullen, M. P. Lesser & A. Melis (1993) Physiological bases for detecting and predicting photoinhibition of aquatic photosynthesis by PAR and UV radiation. En *Photosynthetic responses to the environment* (Editado por H. Y. Yamamoto & C. M. Smith), pp. 61-77. American Society of Plant Physiologists.
- Neale, P. J., R. F. Davis & J. J. Cullen (1998) Interactive effects of ozone depletion and vertical mixing on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Nature* 392, 585-589.
- Neale, P. J., E. Litchman, C. Sobrino, C. Callieri, G. Morabito, V. Montecino, Y. Huot, P. Bossard, C. Lehmann & D. Steiner (2001) Quantifying the response of phytoplankton photosynthesis to ultraviolet radiation: Biological weighting functions versus in situ measurements in two Swiss lakes. *Aquat. Sci.* 63, 265-285.
- Nelson, N. B., D. A. Siegel & A. F. Michaels (1998) Seasonal dynamics of colored dissolved organic matter in the Sargasso Sea (Part I). *Deep Sea Res.* 45, 931-957.
- Nusch, E. A. (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 14, 14-36.

- Obernosterer, I. & G. J. Herndl (2000) Differences in the optical and biologic reactivity of the humic and non-humic component of marine and terrestrially-derived DOC in two contrasting coastal marine environments. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1120-1129.
- Obernosterer, I., B. Reitner & G. J. Herndl (1999) Contrasting effects of solar radiation on dissolved organic matter and its bioavailability to marine bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* 44, 1645-1654.
- Ochs, C. A. (1997) Effects of UV radiation on grazing by two marine heterotrophic nanoflagellates on autotrophic picoplankton. *J. Plankton Res.* 19, 1517-1536.
- Ochs, C. A. & L. P. Eddy (1998) Effects of UV-A (320 to 399 nanometers) on grazing pressure of a marine heterotrophic nanoflagellate on strains of the unicellular cyanobacteria *Synechococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 287-293.
- Ochs, C. A., J. J. Cole & G. E. Likens (1995) Population dynamics of bacterioplankton in an oligotrophic lake. *J. Plankton Res.* 17, 365-391.
- Odum, E. P. (1972) *Ecología*. Nueva Editorial Interamericana, México D. F.
- Orce, V. L. & E. W. Helbling (1997) Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: extent of the 'Ozone hole'. *Global Planet. Change* 15, 113-121.
- Osborne, T. Z., P. W. Inglett & R. Reddy (2007) The use of senescent plant biomass to investigate relationships between potential particulate and dissolved organic matter in a wetland ecosystem. *Aquat. Bot.* 86, 53-61.
- Osburn, C. L., D. P. Morris, K. A. Thorn & R. E. Moeller (2001) Chemical and optical changes in freshwater dissolved organic matter exposed to solar radiation. *Biogeochemistry* 54, 251-278.
- Paruelo, J.M., E. G. Jobbágy & O. E. Sala (1998) Biozones of Patagonia (Argentina). *Ecol. Austral* 8, 145-153.
- Pausz, C. & G. J. Herndl (1999) Role of ultraviolet radiation on phytoplankton extracellular release and its subsequent utilization by marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 18, 85-93.
- Pedrozo, F., S. Chillrud, P. Temporetti & M. Díaz (1993) Chemical composition and nutrient limitation in rivers and lakes of northern Patagonian Andes (39.5°42'S; 71°W) (Rep Argentina). *Verh. Internat. Verein. Teor. Appl. Limnol.* 25, 207-214.
- Pérez, G. L., C. P. Queimaliños & B. E. Modenutti (2002) Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *J. Plankton Res.* 24, 591-599.
- Pérez, M. T. & R. Sommaruga (2006) Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2527-2537.

- 
- Pérez, M. T. & R. Sommaruga (2007) Interactive effects of solar radiation and dissolved organic matter on bacterial activity and community structure. *Environ. Microbiol.* 9, 2200-2210.
- Pernthaler, A., J. Pernthaler & R. Amann (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3094-3101.
- Pick, F. R. (1991) The abundance and composition of freshwater picocyanobacteria in relation to light penetration. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1457-1462.
- Pick, F. R. & D. M. Agbeti (1991) The seasonal dynamic and composition of photosynthetic picoplankton communities in temperate lakes in Ontario, Canada. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 76, 565-580.
- Pienitz, R. & W. F. Vincent (2000) Effect of climate change relative to ozone depletion on UV exposure in subarctic lakes. *Nature* 404: 484-487.
- Pinhassi, J., F. Azam, J. Hemphala, R. A. Long, J. Martinez, U. L. Zweifel & A. Hagström (1999) Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics, and organic matter degradation. *Aquat. Microb. Ecol.* 17, 13-26.
- Plaxton, W.C. & M. C. Carswell (1999) Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. *En Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization* (Editado por Lerner H. R.), pp. 349-372. Marcel Dekker, New York.
- Poff, N. L., M. M. Brinson & J. W. Day (2002) Aquatic ecosystems and global climate change: potential impacts on inland freshwater and coastal wetland ecosystems in the United States. [www.pewtrusts.org/our\\_work\\_ektid30677.aspx](http://www.pewtrusts.org/our_work_ektid30677.aspx).
- Pomeroy, L. R. & W. J. Wiebe (1988) Energetics of microbial food webs. *Hydrobiologia* 159, 7-18.
- Porter, K. G. & Y. S. Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25, 943-948.
- Pullin, M. J (1999) The thermodynamics and kinetics of iron-dissolved organic matter interactions in model fresh waters. Ph.D. Kent State University.
- Qualls, R. & C. Richardson (2003) Factors controlling the concentration, export, and decomposition of dissolved organic nutrients in the Everglades of Florida. *Biogeochemistry* 62, 197-229.
- Rae, R., C. H. Williams, I. Hawes, A. M. Schwarz & W. F. Vincent (2001) Penetration of solar ultraviolet radiation into New Zealand lakes: influence of dissolved organic carbon and catchment vegetation. *Limnology* 2, 79-89.
- Ralph, P. J. & R. Gademann (2005) Rapid Light Curves: A powerful tool for the assessment of Photosynthetic activity. *Aquat. Bot.* 82, 222-237.
-

- Raven, J. A. (1997) Phagotrophy in phototrophs. *Limnol. Oceanogr.* 42, 198–205.
- Reche, I., M. L. Pace & J. J. Cole (1998) Interactions of photobleaching and inorganic nutrients in determining bacterial growth on colored dissolved organic carbon. *Microb. Ecol.* 36, 270-280.
- Reche, I., M. L. Pace & J. J. Cole (1999) Relationship of trophic and chemical conditions to photobleaching of dissolved organic matter in lake ecosystem. *Biogeochemistry* 44, 259-280.
- Reche, I., M. L. Pace & J. J. Cole (2000) Modeled effect of dissolved organic carbon and solar spectra on photobleaching in lake ecosystems. *Ecosystems* 3, 419-432.
- Reche, I., E. Pulido-Villena, J. M. Condeporcuna & P. Carrillo (2001) Photoreactivity of dissolved organic matter from high mountain lakes of Sierra Nevada, Spain. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 33: 426-434.
- Reissig, M., C. P. Queimaliños & E. G. Balseiro (2003) Effect of *Galaxias maculatus* on nutrient dynamics and phytoplankton biomass in a North Patagonian oligotrophic lake. *Environ. Biol. Fish.* 68, 15-24.
- Roy, S., B. Mohovic, S. M. F. Giancesella, I. Schloss, M. Ferrario & S. Demers (2006) Effects of Enhanced UV-B on Pigment-based Phytoplankton Biomass and Composition of Mesocosm-enclosed Natural Marine Communities from Three Latitudes. *Photochem. Photobiol.* 82, 909-922.
- Sachse, A., D. Babenzien, G. Ginzler, J. Gelbrecht & C. E. W. Steinberg (2001) Characterization of dissolved organic carbon (DOC) in a dystrophic lake and adjacent fen. *Biogeochemistry* 54, 276-296.
- Salonen, K., P. Kankaala, T. TOLONEN, T. Hammar, M. James, T. R. Metsälä & L. Arvola (1992) Planktonic food chains of a highly humic lake. II. A mesocosm experiment in summer during dominance of heterotrophic processes. *Hydrobiologia* 229, 143-157.
- Sanders, R. W. (1991) Mixotrophic protists in marine and freshwater ecosystems. *J. Protozool.* 38, 76-81.
- Sanders, R. W., U. G. Berninger, E. L. Lim, P. F. Kemp & D. A. Caron (2000) Heterotrophic and mixotrophic nanoplankton predation on picoplankton in the Sargasso Sea and on Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 192, 103-118.
- Sanders, R. W., A. L. Macaluso, T. J. Sardina & D. L. Mitchell (2005) Photoreactivation in two freshwater ciliates: differential responses to variations in UV-B flux and temperature. *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 283-292.
- Saunders, G. W. (1976) Decomposition in freshwater. En *The role of terrestrial and aquatic organisms in decomposition processes* (Editado por Anderson J. M. & A. Macfadyen), pp. 341-373. Blackwell Scientific Publications. Oxford.



- Saunders, G. W., F. B. Trama & R. W. Bachmann (1962) Evaluation of a modified  $^{14}\text{C}$  technique for shipboard estimation of photosynthesis in large lakes. Publ. Great Lakes Res. Div., Univ. Mich. 8, 61 pp.
- Schindler, D. W. (1977) Evolutions of phosphorus limitation in lakes. *Science* 195, 260-262.
- Schindler, D. W. (1997) Widespread effects of climatic warming on freshwater ecosystems in North America. *Hydrol. Process.* 11, 1043-1067.
- Schindler, D.W. & P. J. Curtis (1997) The role of DOC in protecting freshwaters subjected to climatic warming and acidification from UV Exposure. *Biogeochemistry* 36, 1-8.
- Schindler, D. W., S. E. Bayley, B. R. Parker, K. G. Beaty, D. R. Cruikshank, E. J. Fee, E. U. Schindler & M. P. Stainton (1996a) The effects of climatic warming on the properties of boreal lakes and streams at the Experimental Lakes Area, Northwestern Ontario. *Limnol. Oceanogr.* 41, 1004-1017.
- Schindler, D. W., J. P. Curtis, B. R. Parker & M. P. Stainton (1996b) Consequences of climate warming and lake acidification for UV-B penetration in North American boreal lakes. *Nature* 379, 705-708.
- Schofield, O., B. M. A. Kroon & B. B. Prézelin (1995) Impact of ultraviolet-B radiation on photosystem II activity and its relationship to the inhibition of carbon fixation rates for Antarctic ice algae communities. *J. Phycol.* 31: 703-715.
- Schönhuber, W., B. Fuchs, S. Juretschko & R. Amann (1997). Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3268-3273.
- Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, K. Warnecke, T. Posch & R. Amann (2003) An improved protocol for quantification of freshwater of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2928-2935.
- Semenas, L. G. (1999) Estructura comunitaria de parásitos en *Galaxias maculatus* (Pisces, Galaxiidae) y *Percichthys trucha* (Pisces, Percichthyidae) del Lago Escondido (Río Negro, Argentina). Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Shaw, P. J. (1994) The effect of pH, dissolved humic substances, and iron composition on the transfer of iron and phosphate to particulate size fraction in epilimnetic lake water. *Limnol. Oceanogr.* 39, 1734-1743.
- Shaw, P. J., R. I. Jones & H. De Haan (2000) The influence of humic substances on the molecular weight distributions of phosphate and iron in epilimnetic lake waters. *Freshwat. Biol.* 45, 383-393.
- Sherr, E. B. & B. F. Sherr (1983) A double-staining epifluorescence technique to assess frequency of dividing cells and bacterivory in natural populations of heterotrophic microprotozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1388-1393.

- Sherr, E. B. & B. F. Sherr (1993) Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. En *Current Methods in Aquatic Microbial Ecology* (Editado por Kemp P., B. Sherr, E. Sherr & J. Cole), pp. 207-212. Lewis Publishing, New York.
- Sherr, E. B. & B. F. Sherr (1994) Bacterivory and herbivory: Key roles of phagotrophic protists in pelagic food webs. *Microbial Ecol.* 28: 223-235.
- Sherr, E. B. & B. F. Sherr (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Anton. Leeuw.* 81, 293-308.
- Sherr, B. F., E. B. Sherr & R. D. Fallon (1987) Use of monodispersed fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 958-965.
- Shick, J. M., W. C. Dunlap, B. E. Chalker, A. T. Banaszak & T. K. Rosenzweig (1992) Survey of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 90, 139-148.
- Simek, K. & V. Straskrbova (1992) Bacterioplankton production and protozoan bacterivory in a mesotrophic reservoir. *J. Plankton Res.* 14, 773-787.
- Šimek, K., J. Pernthaler, M. G. Weinbauer, K. Hornák, J. R. Dolan, J. Nedoma, M. Masin & R. Amann (2001) Changes in bacterial community composition, dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a meso-eutrophic reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2723-2733.
- Simek, K., K. Hornak, J. Jezbera, J. Nedoma, J. Vrba, V. Straskrbova, M. Macek, J. R. Dolan & M. W. Hahn (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ. Microbiol.* 8, 1613-1624.
- Simon, M. & K. Azam (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201-213.
- Sommaruga, R. & A. G. J. Buma (2000) UV-induced Cell Damage is Species-specific among Aquatic Phagotrophic Protists. *J. Eukariot. Microbiol.* 47, 450-455.
- Sommaruga, R. & R. Psenner (1995) Permanent presence of grazing resistant bacteria in a hypertrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3457-3459.
- Sommaruga, R., A. Oberleiter & R. Psenner (1996) Effect of UV radiation on the bacterivory of a heterotrophic nanoflagellate. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4395-4400.
- Steeman Nielsen, E. (1951) Measurement of the production of organic matter in the sea by means of carbon-14. *Nature* 167, 684-685.
- Steeman-Nielsen, E. (1952) The use of radioactive carbon ( $^{14}\text{C}$ ) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 18: 117-140.
- Steinberg, C. E. W. & U. Münster (1985) Geochemistry and ecological role of humic substances in lakewater. En *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water* (Editado por Aiken G.

- R., D. M. McKnight, R. L. Wershaw & P. MacCarthy), pp. 433-455. Wiley, New York.
- Sterner, R. W. & J. J. Elser (2002) *Ecological stoichiometry*. Princeton University Press.
- Stockner, J. G. (1991) Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: the view from the summit. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 76, 483-492.
- Stomp, M., J. Huisman, L. Vörös, J. R. Pick, M. Laamanen, T. Haverkamp & L. Stal (2007) Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol. Lett.* 10, 290-298.
- Straškrabová, V., C. Callieri, P. Carrillo, L. Cruz-Pizarro, J. Fott, P. Hartman, M. Macek, J.M. Medina-Sánchez, J. Nedoma & K. Šimek (1999) Investigations on pelagic food webs in mountain lakes - aims and methods. En *Pelagic food web in mountain lakes*. Mountain Lakes Research Program (Editado por Straškrabová V., C. Callieri & J Fott). *J. Limnol.* 58, 77-87.
- Strober, Q., R. Jones & D. Schmidt (1995) Ultra trace level mercury in the Everglades ecosystem: a multi-media canal pilot study. *Water Air Soil Pollut.* 80, 991-1001.
- Strome, D. J. & M. C. Miller (1978) Photolytic changes in dissolved humic substances. *Verh. Int. Verein. Limnol.* 20, 1248-1254.
- Stumm, W. & J. J. Morgan (1996) *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*. Wiley, New York.
- Sun, J. & D. Liu (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplakton . *J. Plankton Res.* 25, 1331-1346.
- Tamburini, C., M. Garel, B. A. Ali, B. Mérigot, P. Kriwy, B. Charriere & G. Budillon (2009) Distribution and activity of Bacteria and Archaea in the different water masses of the Tyrrhenian Sea. *Deep-Sea Res.* 56, 700-712.
- Thingstad, T. F. H. (2003) Physiological models in the context of microbial food webs. En *Aquatic ecosystems: Interactivity of dissolved organic matter* (Editado por Findlay, S. E. G. & R. L. Sinsabaugh), pp. 383-396. Academic Press, San Diego, California.
- Thingstad, T. F., H. Havskum, K. Garde & B. Riemann (1996) On the strategy of “eating your competitor”: A mathematical analysis of algal mixotrophy. *Ecology* 77, 2108-2118.
- Thomasson, K. (1963) Araucarian Lakes. *Acta Phytogeogr. Suec.* 47, 1-139.
- Thurman, E. M. (1985) *Organic geochemistry of natural water*. Nijhoff/Junk, Boston, MA.
- Torremorell, A., M. E. Llamas, G. L. Pérez, R. Escaray, J. Bustingorry & H. Zagarese (2009) Annual patterns of phytoplankton density and primary production in a large, shallow lake: the central role of light. *Freshwat. Biol.* 54, 437-449.
- Tranvik, L. J. (1988) Availability of dissolved organic carbon for planktonic bacteria in oligotrophic lakes of different humic content. *Microb. Ecol.* 16, 311-322.

- Tranvik, L. J. (1989) Bacterioplankton growth, grazing mortality and quantitative relationship to primary production in a humic and a clearwater lake. *J. Plankton Res.* 11, 985-1000.
- Tranvik, L. J. (1992) Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop. *Hydrobiology* 229, 107-114.
- Tranvik, L. J. (1993) Microbial transformation of labile dissolved organic matter into humic-like matter in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12, 177-183.
- Tranvik, L.J. & S. Bertilsson (2001) Contrasting effects of solar UV radiation on dissolved organic sources for bacterial growth. *Ecol. Lett.* 4, 458-463.
- Twardowski, M. S., E. Boss, J. M. Sullivan & P. L. Donaghay (2004) Modeling the spectral shape of absorbing chromophoric dissolved organic matter. *Mar. Chem.* 89, 69-88.
- Twilley, R., M. Brinson & G. Davis (1977) Phosphorus adsorption, translocation, and secretion in *Nuphar luteum*. *Limnol. Oceanogr.* 22, 1022-1032.
- Uehlinger, U. & J. Bloesch (1989) Primary production of different phytoplankton size classes in an oligo-mesotrophic Swiss lake. *Arch. Hydrobiol.* 116, 1-21.
- Urabe J., T.B. Gurung, T. Yoshiba, T. Sekino, M. Nakanishi, M. Maruo & E. Nakayama (2000) Diel changes in phagotrophy by *Cryptomonas* in Lake Biwa. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1558-1563.
- Villafañe, V. E., M. Andrade, V. Lairana, F. Zaratt, E. W. Helbling (1999) Inhibition of phytoplankton photosynthesis by solar ultraviolet radiation: studies in Lake Titicaca, Bolivia. *Freshwat. Biol.* 42, 215-224.
- Villafañe, E. V., A. G. J. Buma, P. Boenel & E. W. Helbling (2004) Solar UVR-induced damage and inhibition of photosynthesis in phytoplankton from Andean lakes of Argentina. *Arch. Hydrobiol.* 161, 245-266.
- Villafañe, E. V., K. Gao, P. Li, G. Li & E. W. Helbling (2007) Vertical mixing within the epilimnion modulates the UVR-induced photoinhibition in tropical freshwater phytoplankton from southern China. *Freshwat. Biol.* 52, 1260-1270.
- Villafañe, V. E., P. J. Janknegt, M. de Graaff, R. J. W. Visser, W. H. van de Poll, A. G. J. Buma & E. W. Helbling (2008) UVR-induced photoinhibition of summer marine phytoplankton communities from Patagonia. *Mar. Biol.* 154, 1021-1029.
- Vincent, W. F. & C. Belzile (2002) UV effects on aquatic microbial food webs in northern lakes and rivers. En *UV Radiation and Arctic ecosystems* (Editado por Hesse D. O.), pp. 137-155. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin.
- Vincent, W. F., R. Rae, I. Laurion, C. Howard-Williams & J. C. Priscu (1998) Transparency of Antarctic ice-covered lakes to solar UV radiation. *Limnol. Oceanogr.* 43, 618-624.
- Vodacek, A., N. Blough, M. Degrandpre, E. Peltzer, R. Nelson (1997) Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: Terrestrial inputs and photooxidation. *Limnol. Oceanogr.* 42, 674-686.

- Voelker, B. M., F. M. M. Morel & B. Sulzberger (1997) Effects of fulvic acids on Fe (II) oxidation by hydrogen peroxide. *Environ. Sc. & Technol.* 30, 1106-1114.
- Vörös, L., C. Callieri, K. V. Balogh & R. Bertoni (1998) Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia* 370, 117-125.
- Vrba, J., K. Simek, J. Nedoma & P. Hartman (1993) MUF-P-N-acetylglucosaminide hydrolysis by a high affinity enzyme, a putative marker of protozoan bacterivory. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3091-3101.
- Vrba, J., K. Simek, J. Pernthaler & R. Psenner (1996) Evaluation of extracellular, high-affinity P-N-acetylglucosaminidase measurements from freshwater lakes: an enzyme assay to estimate protistan grazing on bacteria and picocyanobacteria. *Microb. Ecol.* 32, 81-99.
- Warnecke, F., R. Amann & J. Pernthaler (2004) Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.* 6, 242-253
- Warnecke, K., R. Sommaruga, R. Sekar, J. S. Hofer & J. Pernthaler (2005) Abundances, identity, and growth state of Actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5551-5559.
- Weishaar, J. L., G. R. Aiken, M. S. Fram, R. Fujii & K. Mopper (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4702-4708.
- Weisse, T. (1993) Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. In *Advances in microbial ecology* (Editado por Jones, J. G.), pp. 327- 370. Plenum Press, New York.
- Wetzel, R. G. (1990) Land-water interfaces. *Metabolic and limnological regulators*. *Verh. Internat. Verein. Teor. Appl. Limnol.* 24, 6-24.
- Wetzel, R. G. (1992) Gradient-dominant ecosystems: sources and regulatory functions of dissolved organic matter in freshwater ecosystems. *Hydrobiologia* 229, 181-198.
- Wetzel, R. G. (2001) *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Academic Press, San Diego, California.
- Wetzel, R. G., P. G. Hatcher & T. S. Bianchi (1995) Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1369-1380.
- Wetzel, R. G. & G. E. Likens (1991) *Limnological Analyses*. Springer-Verlag, New York.
- White, P. A., J. Kalff, J. B. Rasmussen & J. M. Gasol (1991) The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats. *Microb. Ecol.* 21, 99-118.
- Whitehead, R. F., S. De Mora, D. Demers, M. Gosselin, P. Monfort & B. Mostajir (2000) Interactions of ultraviolet-B radiation, mixing, and biological activity on

- photobleaching of natural chromophoric dissolved organic matter: A mesocosm study. *Limnol. Oceanogr.* 45, 278-291.
- Wickham, S. & M. Carstens (1998) Effects of ultraviolet-B radiation on two arctic microbial food webs. *Aquat. Microb. Ecol.* 16, 163-171.
- Williamson, C. E. (1995) What role does UV-B radiation play in freshwater ecosystems? *Limnol. Oceanogr.* 40, 386-392.
- Williamson, C., E. Stemberger, D. P. Morris, T. M. Frost & S. G. Paulsen (1996) Ultraviolet radiation in North American lakes: Attenuation estimates from DOC measurements and implications for plankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 41, 1024-1034.
- Williamson, C. E., W. Dodds, T. K. Kratz & M. A. Palmer (2008) Lakes and streams as sentinels of environmental change in terrestrial and atmospheric processes. *Front. Ecol. Environ.* 6, 247-254.
- Xenopoulos, M. A., P. C. Frost & J. J. Elser (2002) Joint effects of UV radiation and phosphorus supply on algal growth rate and elemental composition. *Ecology* 83, 423-435.
- Yan, N. D., W. Keller, N. M. Scully, D. R. S. Lean & P. J. Dillon (1996) Increasing UV-B penetration in a lake owing to drought-induced acidification. *Nature* 381, 141-143.
- Zagarese, H. E., M. Diaz, F. Pedrozo, M. Ferraro, W. Cravero & B. Tartarotti (2001) Photodegradation of natural organic matter exposed to fluctuating levels of solar radiation. *J. Photochem. Photobiol.* 61, 35-45.
- Zepp, R. G., T. V. Callaghan & D. J. Erickson (2003) Interactive effects of ozone depletion and climate change on biogeochemical cycles. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 51-61.
- Zubkov, M. V. & M. A. Sleight (1995) Ingestion and assimilation by marine protists fed on bacteria labeled with radioactive thymidine and leucine estimated without separating predator and prey. *Microb. Ecol.* 30, 157-170.