Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR FACULTAD DE CTENCTAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral









Diversidad y ecología de las

Llames, María Eugenia del Rosario

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Llames, María Eugenia del Rosario. (2011). Diversidad y ecología de las comunidades microbiológicas de las lagunas pampeanas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Llames, María Eugenia del Rosario. "Diversidad y ecología de las comunidades microbiológicas de las lagunas pampeanas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 **Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Ecología, Genética y Evolución

DIVERSIDAD Y ECOLOGÍA DE LAS COMUNIDADES MICROBIOLÓGICAS DE LAS LAGUNAS PAMPEANAS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Autor: Lic. María Eugenia del Rosario Llames

Directores de Tesis: Dr. Horacio E. Zagarese- Dra. Irina Izaguirre

Consejera de estudios: Dra. Irina Izaguirre

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecología y Fotobiología Acuática Instituto de Investigaciones Biotecnológicas Instituto Tecnológico Chascomús (IIB-INTECH) CONICET

Diversidad y ecología de las comunidades microbiológicas de las lagunas Pampeanas

RESUMEN

Las bacterias son los organismos más abundantes de la Tierra y son los encargados de mediar en una multitud de procesos críticos para el medio ambiente. En los sistemas acuáticos, el bacterioplancton incluye organismos autótrofos y heterótrofos, de amplia distribución cuya producción y biomasa pueden llegar a constituir un alto porcentaje de la producción primaria total del sistema. Dado su rol central en procesos ecológicos básicos del ecosistema resulta de gran importancia conocer sus patrones de distribución, su dinámica poblacional y los factores más relevantes en la determinación de la estructura y el funcionamiento de esta comunidad, aspectos hasta ahora desconocidos para las comunidades bacterianas de las lagunas pampeanas.

Los primeros estudios en microbiología acuática se realizaron mediante técnicas de cultivo tradicionales. Luego, la introducción de técnicas provenientes de la biología molecular ha permitido avanzar enormemente en el conocimiento de las comunidades microbiológicas. Estas técnicas han permitido estudiar no sólo la identidad, sino también la actividad y la genómica microbiana.

Actualmente existen numerosas especies procariotas descriptas formalmente, sin embargo, aun no existe un consenso en la sistemática bacteriana para definir la unidad biológica fundamental de diversidad. En consecuencia, la mayoría de los trabajos microbiológicos basados en técnicas moleculares adoptan el concepto de "unidad taxonómica operativa" (OTU) para definir los taxones bacterianos de manera pragmática. Dada la heterogeneidad en la resolución genética que las distintas definiciones de OTU imponen, el **Capítulo I** de esta tesis se centró en el análisis comparativo de dos metodologías de *fingerprinting* (ARISA y DGGE) cuyos protocolos fueron puestos a punto para poder describir distintos aspectos de la comunidad bacteriana en ambientes someros de la Región Pampeana. La utilización en conjunto de ambas metodologías fue la estrategia para abordar el mismo problema en dos niveles de análisis complementario que permitió evidenciar tanto las características más conspicuas como los detalles de la estructura de la comunidad obteniendo, así, una descripción más acabada de los sistemas.

i

En el **Capítulo II** se analizó a escala regional el patrón de distribución bacteriano en un set de lagunas representativas de distintos estados alternativos que caracterizan a los sistemas pampeanos. Este análisis se realizó dentro del marco teórico de las Metacomunidades y los resultados indicaron que, de acuerdo a la perspectiva de *Species Sorting*, el patrón observado sería consecuencia del desacople temporal entre la dinámica poblacional local y la dinámica de colonización- extinción que ocurre a nivel regional. Además, el estado de equilibrio alternativo característico de cada sistema influenciaría de manera fundamental la determinación de la estructura comunitaria mientras que la estacionalidad jugaría un rol secundario.

El **Capítulo III** se focalizó en el estudio de la variación temporal de la biodiversidad en dos sistemas de características limnológicas contrastantes. Estos ambientes resultaron altamente sincrónicos en cuanto a la variación de los parámetros físico-químicos, sin embargo, los cambios temporales de la estructura comunitaria no resultaron concordantes entre los dos sistemas. Para la laguna turbia se observó una estrecha relación entre los cambios de biodiversidad y los parámetros ambientales mientras que para la laguna clara no se detectó una relación entre los descriptores comunitarios y los parámetros ambientales considerados. Estos resultados contrastantes indicarían distinto grado de influencia de los factores climáticos de control que operan a nivel regional sobre la determinación de la dinámica de la comunidad bacteriana en cada uno de los sistemas analizados.

Finalmente, en el **Capítulo IV** se presentan los resultados de un experimento a nivel de mesocosmos cuyo objetivo fue comenzar a desentrañar la importancia de la producción primaria fitoplanctónica en la determinación de la riqueza taxonómica de la comunidad bacteriana y fitoplanctónica en sistemas limitados por luz. Las diferencias en producción primaria se correlacionaron significativamente con la riqueza taxonómica de las dos comunidades analizadas y, en ambos casos, se observó una relación cuadrática entre ambos parámetros. Estas observaciones resultaron congruentes con otras observaciones y modelos teóricos que indican que la relación unimodal sería la más frecuentemente observada en sistemas acuáticos.

Palabras claves: bacterioplancton, lagos someros, Región Pampeana, ecología microbiana

Diversity and ecology of microbial communities from shallow lakes from the Pampa plain.

ABSTRACT

Bacteria are the most abundant organisms on Earth and they mediate many critical ecosystem processes. In aquatic systems, bacterioplankton community comprises widely distributed autotrophic and heterotrophic organisms and their secondary production and biomass can represent a large fraction of the total primary production of the system. As regards their key role in basic ecosystem processes, understanding their distribution patterns, their population dynamics and the main factors controlling the structure and functioning of the community have become central objectives for aquatic microbial ecology, particularly in the Pampean Region as these aspects remained unknown.

Initial studies in aquatic microbiology were carried out by traditional cultivation techniques. Later on, molecular approaches have significantly increased our knowledge about microbiological communities. These techniques have allowed us to study not only the identity but also the activity and the microbial genomics.

Currently, a huge number of prokaryotic species have been formally described. However, bacterial systematics has not yet reached a consensus for defining the fundamental unit of biological diversity. Thus, most of the microbiological works adopt the *Operational Taxonomic Units* (OTU) to define bacterial taxa in a pragmatic way. In relation to the heterogeneity in genetic resolution that different OTU definitions impose, **Chapter I** of this thesis focused in the comparison of two fingerprinting methods (ARISA and DGGE) which were set up to describe different aspects of bacterial communities from shallow lakes of the Pampa plain. The strategy of addressing the same ecological problem with these two complementary approaches bore witness to conspicuous as well as fine details of the communities' structure, resulting hence, in a more detailed description of the systems.

In **Chapter II** the regional distribution pattern of bacterial communities was analyzed in a set of shallow lakes that were representative of the different alternative states that characterize pampean shallow lakes. The Metacommunity concept was the theoretical framework applied in this analysis and the results indicated that, according to the Species Sorting perspective, the pattern observed would result from a separation of time scales between local population dynamics and regional colonization- extinction dynamics. Moreover, the alternative equilibrium state that characterized the different shallow lakes seemed to play a major role in structuring the community, while seasonality would be of a lesser importance.

Chapter III focused in the temporal variation of biodiversity in two shallow lakes with contrasting limnological features. These systems showed high spatial synchrony regarding their physical-chemical parameters but no evidence of concordance in the temporal variability of the communities was found. The turbid lake evidenced a tight relationship between changes in biodiversity and environmental parameters while no such relationship was found for the clear lake. This differential pattern between both systems over time would indicate a different degree of connection between local communities' dynamics and extrinsic climatic factors that operate at a regional scale.

Finally, in **Chapter IV** the results from a mesocosm- scale study aimed at investigating the importance of primary productivity in determining bacterial and phytoplanktonic richness in light-limited systems are shown. Differences in productivity correlated significantly with the taxonomic richness of the two communities analyzed and for bacterioplankton as well as for phytoplankton, a quadratic relationship was found between both parameters. These results were consistent with other observations and theoretical models that indicate the hump-shaped curved as the more frequent relationship found in aquatic ecosystem.

Key words: bacterioplankton, shallow lakes, Pampean Region, microbial ecology

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

(;No puedo creer que esto haya pasado tan rápido y que ya esté escribiendo los agradecimientos!...)

En primer lugar quiero agradecer a mis directores por haberme dado la oportunidad de poder llegar a esta instancia y por haber depositado su confianza en mí para poder llevar a cabo este proyecto.

A Horacio quiero agradecerle especialmente todas las oportunidades que me brindó para crecer tanto en el aspecto profesional como en el aspecto personal. Agradezco haber tenido la oportunidad de trabajar junto a una buena persona (que, para mí, es mucho más importante que haber tenido la oportunidad de trabajar junto a un excelente investigador).

A Irina la conozco hace mucho más tiempo y siempre (aun no siendo su becaria) me ha ofrecido su generosidad infinita, su excelente calidad docente y su dedicación en el trabajo. A ella le agradezco su ayuda constante y su excelente predisposición para darme una mano y solucionarme las dificultades que le fui planteando durante todo este tiempo (que no sólo incluye la etapa "mi doctorado"...).

Nunca voy a olvidar una de las primeras salidas de muestreo: yo recién llegada al INTECH, muestreo de las "6 lagunas" y esas cosas de la logística que a mi me tocó acompañar a Iri y a Horacio a muestrear a Kakel Huincul... ¿se acuerdan?... estaba muy húmedo, hubo que caminar mucho de ida y de vuelta, la laguna estaba baja, perdimos la ubicación del auto...No se me borra más la imagen de Horacio (de camisa blanca) acostado boca abajo en el muelle sosteniendo a Irina que estaba prácticamente colgada de un poste, estirándose para llenar el bidón de agua... ¿y por qué lo hicieron?... ¡porque querían evitar la posibilidad de que cayera yo al agua!... ¡esos son directores!

...¿Y cuándo nos quedamos encajadas con Iri a la salida de la laguna El Burro?... Si señores... desde entonces, cada vez que la organización de un muestreo reúne a la dupla Izaguirre-Llames quedó estipulado como "norma de bioseguridad" del laboratorio

V

avisar al cuerpo de bomberos de Chascomús… con nosotras juntas, ¡todo puede pasar!

Obviamente que, además de mis "dires", durante todo este tiempo me acompañó un grupo de compañeros espectaculares a los cuales les debo gran parte de los logros obtenidos en este tiempo: A Marce le agradezco todo su tiempo, toda su la paciencia la "contención experiencia, toda У toda psicológica"... (los que alguna vez intentaron hacer una DGGE saben a lo que me refiero…) que me brindó para que yo pudiera realizar este trabajo. Todo lo que sé de "biología molecular" lo aprendí de ella y sin ese apoyo (y sus mates), creo que aún estaría dando vueltas como alma en pena por los pasillos del instituto al grito de ", no me dio la PCR!" ...

A "Funrein" quiero agradecerle toda su ayuda desinteresada y todos sus consejos (desde los ecológicos-moleculares hasta los "previos-viaje-a-Canadá") que debo tener en cuenta en cada paso que doy. ¡Gracias Fer! Tu punto de vista siempre fue (y es) muy importante para mí.

Además, quiero agradecerles a ambos (Marce y Fer) todo el "aguante" que me hicieron en este último tiempo para que yo pudiera dedicarme "a full" a terminar de escribir mi tesis... ¡¡Gracias, gracias, gracias!! ¡No tienen idea de cómo me facilitaron las cosas!

A Pepe y Roberto (nuestro dúo dinámico)... ¿Saben lo importante que son para nosotros y cuánto nos ayuda en el trabajo que ustedes se ocupen de tantas cosas? Bueno, creo que este es una buena oportunidad para decírselos: ¡sin ustedes, el laboratorio no sería igual! ¡Mil gracias por su trabajo, por la buena onda, los mates y los chistes!

A los chicos (Pau, Anita, Leo, Nana y Gonza) que juntos formamos la "masa de Aguas" (*sic* Vero Cóceres) y que acompañaron y compartieron todo este tiempo conmigo. La buena onda de este grupo me ayudó muchísimo a mi adaptación a esta nueva vida chascomunense.

No quiero olvidarme de "las chicas de Buenos Aires" con las que he compartido esta aventura de doctorarme (Romi: ¿te acordás

vi

Agradecimientos

de esos días aprendiendo DGGE cuando "alguien" nos sugirió robarnos la *Taq* polimerasa de la terminal de ómnibus?)…

También quiero agradecer al Dr Paul del Giorgio por la oportunidad de realizar una pasantía en su laboratorio y a todos sus estudiantes por su buen recibimiento y la ayuda que me brindaron durante mi estancia en Montreal.

El apoyo de mi familia y amigos también fueron fundamentales para que yo llegue a esta instancia. Ellos son "los imprescindibles de mi vida"; sin ellos, yo no soy capaz de hacer nada.

A mis papás (Guadalupe y Roberto) por el apoyo que siempre me brindaron en todos estos años y por su esfuerzo para que nosotros podamos concretar todos nuestros sueños.

A mis hermanos (Fernando y Luis) que juntos formamos el "clan Llames"... ¿se acuerdan?... ¡Son los mejores hermanos del mundo!

A Nico, cuya inocencia y ternura me conmueve y me llena de energía...

A Martín, quien no quiere ser nombrado en los agradecimientos porque considera que todo el esfuerzo en llegar hasta aquí es absolutamente mío... Bueno, lamentablemente tengo que contradecirte: sin tu apoyo incondicional y comprensión todo se me hubiera hecho más difícil.

A Patricia (quien sigue siendo mi angelito de la guarda), amiga y compañera del "lejano oeste"...;;mil gracias por tus consejos!!

A mis hermanas del alma (Flavia y Vale) que son mi "cable a tierra" y que me acompañan, prácticamente, de toda la vida.

A todos... ;gracias por aguantarme!

vii

A las personas imprescindibles en mi vida que sin su apoyo y aliento no hubiese sido capaz de llegar a esta instancia.

ÍNDICE

Introducción General	1
Objetivos	5
Área de Estudio	6

Capítulo IComparaciónentredosmétodosdefingerprinting(ARISAyDGGE)paralacaracterizacióndela comunidadbacterianadelagos someros

Introducción	11
Materiales y Métodos	16
Resultados	27
Discusión	31

<u>**Capítulo II**</u> Análisis del patrón de composición de la comunidad bacteriana planctónica en lagos someros de la Región Pampeana (Pcia. de Buenos Aires, Argentina)

Introducción	38
Materiales y Métodos	44
Resultados	51
Discusión	64

Capítulo III Variación anual de la riqueza y la diversidad del bacterioplancton en dos lagunas que presentan estados de equilibrio contrastantes (clara con desarrollo de macróficas sumergidas y turbia con elevada biomasa fitoplanctónica)

Introducción	69
Materiales y Métodos	72
Resultados	78
Discusión	91

<u>Capítulo IV</u>	La I	produ	cción	ı primaria		con	no fa	ictor
	determ	inante	e de	la	riqueza	bac	teriana	en
	ambien	ites	turbio	s:	Estudio	а	nivel	de
	mesoco	osmos						

Introducción	97	
Materiales y Métodos		

Resultados	.110
Discusión	122

Conclusiones Generales	
Perspectivas	
Bibliografia	

INTRODUCCIÓN GENERAL

El bacterioplancton y su ambiente

Las bacterias representan el grupo más diverso de organismos y cumplen un rol esencial en los procesos ecológicos fundamentales para el sostenimiento de la vida. Dada su versatilidad metabólica y fisiológica, estos organismos son capaces de habitar una gran variedad de ambientes, desde aquellos que ofrecen condiciones ideales para el crecimiento hasta aquellos ambientes extremos cuyas características impiden el desarrollo de cualquier otra forma de vida (Horner- Devine *et al.*2003; Posser *et al.* 2007).

En los ambientes acuáticos, las bacterias que viven en suspensión en la columna de agua reciben el nombre de bacterioplancton. Esta comunidad incluye organismos procariotas autótrofos y heterótrofos de entre 0,2–2µm de tamaño, de amplia distribución cuya producción y biomasa pueden llegar a constituir un alto porcentaje de la producción primaria total del sistema (Craig 1985; Stockner y Antia 1986; Stockner 1988, 1991, 2002; Stockner y MacIsaac 1996).

Esta fracción representa un componente fundamental en el flujo de energía a través del bucle microbiano (*microbial loop*) conectando los ciclos de carbono y nutrientes con el esquema de red trófica convencional. Además, la comunidad bacteriana es responsable de un alto porcentaje de la respiración aeróbica y del total de la respiración anaeróbica en los sistemas acuáticos, constituye uno de los reservorios más grande de C, N, P y Fe (entre otros elementos), representa un componente clave en las redes tróficas acuáticas y su biomasa es un recurso significativo de alimento para muchos organismos (Azam *et al.* 1983, Cole 1999).

Dada la estrecha relación que existe entre esta comunidad y los distintos procesos ecológicos que ocurren en el ambiente, resulta evidente

que aquellos factores que regulen la abundancia, la distribución, la tasa de crecimiento y la respiración de estos organismos sean, en gran medida, los mismos factores que regulen muchos de los procesos claves de los ecosistemas (Cole 1999).

Diversidad bacteriana: métodos moleculares y definición de OTU

La aplicación de técnicas moleculares para el estudio de los microorganismos en ambientes naturales data de mediados de 1980 (Head *et al.*1998) y desde entonces este nuevo enfoque metodológico ha influenciado de manera significativa el entendimiento de la diversidad y ecología microbiana. El análisis comparativo de genes filogenéticamente informativos (como es el caso del ARN ribosomal) ha permitido reconocer nuevos linajes filogenéticos, ampliar el mapa de distribución biogeográfica de los microorganismos y, fundamentalmente, ha puesto en evidencia que la utilización de las técnicas tradicionales de cultivo microbiológico para el estudio de la diversidad microbiana deja fuera del análisis a la mayoría de los microorganismos que habitan en los ambientes naturales, problema universalmente conocido como "*the great plate anomaly*" (Staley y Konopka 1985).

Aproximadamente, 10400 especies de procariotas han sido descriptas formalmente (http://www.bacterio.cict.fr/number.html), sin embargo, aun existen controversias para definir la unidad biológica fundamental de diversidad bacteriana. En la práctica, la mayoría de los trabajos microbiológicos adoptan el concepto de "unidad taxonómica operativa" (OTU: *operational taxonomic unit*). Actualmente, esta terminología se aplica a cualquier taxón definido de manera pragmática y que no necesariamente cumple con todos los requisitos de la definición formal de especie. En otras palabras, esta definición permite clasificar a los individuos en grupos excluyentes de acuerdo a algún criterio consistente de

clasificación (Pedrós-Alió 2006). En el caso de las bacterias (y de los microorganismos en general), descriptores tales como el número de bandas obtenidas a partir de una electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) o el número de clones en una biblioteca genética constituyen unidades taxonómicas operativas que cumplen con los requisitos para ser considerados como tales. Dada la heterogeneidad en la resolución genética que las distintas definiciones de OTU imponen, cabe cuestionarse si el análisis de los datos resulta influenciado de alguna manera por la unidad taxonómica operativa que se utilice. De acuerdo con esto, en el Capítulo I de esta tesis se describe de manera detallada dos metodologías de análisis de huella genética o *fingerprinting* cuyos protocolos fueron puestos a punto para poder describir por primera vez distintos aspectos de la comunidad bacteriana en ambientes someros de la Región Pampeana. En particular, este capítulo metodológico se centra en el análisis comparativo de datos con el fin de evaluar el grado de congruencia y complementariedad de los resultados obtenidos a partir de la aplicación de ambas metodologías.

La comunidad bacteriana y sus reglas de ensamblaje

Dentro de los distintos niveles de organización de la vida se define como *comunidad* a un grupo de especies que coexisten en el espacio y en el tiempo. En términos muy generales, este ensamble de especies está determinado por (i) la capacidad de dispersión de las especies, (ii) las limitaciones al desarrollo que impone el ambiente abiótico y (iii) las interacciones biológicas (Begon *et al.*, 2006).

La primera aproximación que permite comenzar a dilucidar la estructura y funcionamiento de una comunidad consiste en la búsqueda de patrones, es decir, de aquellas similitudes o tendencias repetidas a lo largo de diferentes gradientes ambientales. El reconocimiento de estos patrones resulta fundamental para la formulación y puesta a prueba de hipótesis

sobre los distintos mecanismos subyacentes que definen y mantienen la estructura comunitaria.

De acuerdo con esto, y en relación a la comunidad bacteriana en sistemas acuáticos de la Región Pampeana, en el **Capítulo II** de este trabajo se analiza el patrón de composición de esta comunidad a escala regional con el objetivo de identificar aquellos factores ambientales y espaciales que mejor expliquen la variación de la estructura comunitaria a este nivel de observación.

Por otro lado, tan importante como interpretar los patrones espaciales resulta entender los factores que determinan la secuencia temporal de aparición y desaparición de taxones. El **Capítulo III** se focaliza en el estudio de la variación temporal de la comunidad bacteriana en dos sistemas de características limnológicas contrastantes con el objetivo de analizar la influencia que poseen los factores que actúan a nivel regional (extrínsecos) y los factores sitio-específico (intrínsecos) en la determinación de las dinámicas locales de esta comunidad.

Finalmente, los trabajos previos realizados en ambientes someros de la región indican un rol fundamental de la disponibilidad de luz en la columna de agua como factor determinante de la dinámica observada en ambientes turbios (Lagomarsino *et al.* en prensa, Llames *et al.* 2009; Torremorell *et al.* 2007; 2009). Dado que la importancia intrínseca de los flujos energéticos para la comunidad está particularmente ligada al ambiente abiótico, en el **Capítulo IV** se presentan los resultados de un experimento a nivel de mesocosmos cuyo objetivo es comenzar a desentrañar la importancia de la producción primaria fitoplanctónica en la determinación de la riqueza taxonómica de la comunidad bacteriana y fitoplanctónica en sistemas limitados por luz.

De acuerdo a lo expuesto hasta aquí, se detallan a continuación los objetivos de este trabajo.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Establecer los patrones de diversidad microbiana en lagos someros de la región pampeana en estados de equilibrio contrastantes, y avanzar en la comprensión de los cambios ambientales generados por la actividad humana sobre la biodiversidad microbiana de sistemas acuáticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Evaluar la utilidad de dos técnicas de *fingerprinting* con distinto poder de resolución genética para la caracterización de la comunidad bacteriana en lagos someros eutróficos e hipereutróficos.
- (ii) Realizar la primera caracterización basada en técnicas moleculares de la comunidad bacteriana planctónica en ambientes someros de la Región Pampeana.
- (iii) Analizar la variación temporal de la biodiversidad procariota durante un ciclo anual en ambientes someros con características limnológicas contrastantes (*i.e.* lagunas turbias y claras).
- (iv) Evaluar la importancia de los factores que actúan a nivel regional en la determinación de la estructura y dinámica local de esta comunidad.
- (v) Reproducir en mesocosmos experimentales la condición de limitación por luz que caracteriza a los ambientes turbios de la región y evaluar la importancia de la irradiancia en la determinación de la estructura de la comunidad fitoplanctónica y del bacterioplancton.

Área de Estudio

ÁREA DE ESTUDIO

Los cuerpos de agua seleccionados para este estudio se localizan en la Provincia de Buenos Aires, dentro de la región Pampeana $(35^{\circ} 32' - 36^{\circ} 48'S; 57^{\circ} 47' - 58^{\circ} 07'O)$ (**Figura 1**).

El clima en esta región se define como templado húmedo, sin temporada seca y con veranos cálidos. Normalmente, la región atraviesa por ciclos de sequía-inundación interanuales que se reflejan profundamente en el funcionamiento del humedal y sus lagunas, que constituyen el elemento característico del paisaje de la región.

Estas lagunas consisten en grandes cuerpos de agua (> 100 ha) de origen fluvial-eólico, permanentes, muy poco profundos, que no estratifican térmicamente excepto por períodos muy cortos de tiempo. Quirós y Drago (1999) caracterizaron a estos cuerpos de agua como lagos someros, con tiempos de permanencia de agua y salinidad altamente variables, naturalmente eutróficos y actualmente bajo estrés ambiental manifiesto que incrementa aún más sus contenidos de nutrientes. En las áreas de baja salinidad y con menor impacto antrópico, la vegetación arraigada forma parches de extensión variable que cubren la superficie de las lagunas. Sin embargo, los cambios en el uso de la tierra están provocando un cambio de régimen hacia sistemas hipereutróficos altamente turbios debido al incremento de nutrientes que ingresan a la cuenca por la actividad humana (Quirós *et al.* 2002; Quirós 2005).

La ubicación geográfica de los lagos seleccionados para este trabajo se muestran en la **Tabla 1.**

Área de Estudio



Figura 1: Ubicación geográfica de las lagunas seleccionadas para este trabajo. Los números en las imágenes del panel inferior se corresponden con los números en el

mapa.

Laguna	Numeración en la Fig. 1	Ubicación Geográfica	Estado de equilibrio
Chascomús (CH)	1	35° 36'S; 58° 02'O	Turbio- abundante biomasa fitoplanctónica
La Limpia (LI)	2	35° 37'S; 57° 48'O	Turbio- alta concentración de arcillas
San Jorge (SJ)	3	35° 40'S; 57° 47'O	Turbio- abundante biomasa fitoplanctónica
Lacombe (LAC)	4	35° 49'S; 57° 49'O	Turbio- abundante biomasa fitoplanctónica
El Triunfo (TRI)	5	35° 51'S; 57° 52'O	Claro – vegetado
Kakel Huincul (KH)	6	36° 48'S; 57° 47'O	Claro - vegetado

Tabla 1: Coordenadas geográfica de las lagunas seleccionadas en la Llanura Pampeana.Los sitios fueron numerados en dirección N-S.

Del total de sitios seleccionados, 5 lagunas (Chascomús (CH), La Limpia (LI), San Jorge (SJ), Lacombe (LAC) y El Triunfo (TRI)) pertenecen a la cuenca del Río Salado, mientras que la restante (Kakel Huincul (KH)) pertenece al sistema de lagunas marginales de la cuenca fluvial centro-este de la provincia de Buenos Aires (Toresani *et al.* 1994). De acuerdo a lo propuesto por Scheffer y colaboradores (1993), 2 de estas lagunas (KH y TRI) se encuentran en un estado de aguas claras y vegetadas, colonizadas por macrófitas sumergidas ((*Myriophyllum* sp. y *Ceratophyllum demersum*) y emergentes (*Schoenoplectus californicus*). Por otro lado, 3 de estas lagunas (CH, LAC y SJ) se encuentran en un estado turbio, caracterizado por una escasa profundidad del disco de Secchi y una alta abundancia de fitoplancton (Allende *et al.* 2009). La laguna restante (LI) corresponde a un tercer estado de equilibrio previamente descripto por Quirós y colaboradores (2002) para esta región. Este sistema se encuentra en un estado turbio pero la turbidez está determinada, fundamentalmente, por una alta concentración de arcillas en suspensión. Esta laguna carece de vegetación arraigada emergente o sumergida y la abundancia de fitoplancton es escasa (Allende *op.cit.*). Todas estas lagunas poseen una profundidad media inferior a 2 m.

Comparación entre dos métodos de *fingerprinting* (ARISA y DGGE) para la caracterización de la comunidad bacteriana de lagos someros

INTRODUCCIÓN

El estudio de la diversidad microbiana en ambientes naturales ha avanzado enormemente a partir de la introducción de técnicas provenientes de la biología molecular basadas en el análisis de diferentes aspectos del gen que codifica para el ARN ribosomal. En particular, el campo de la ecología acuática microbiana se ha beneficiado por un gran desarrollo de diversas técnicas que en los últimos 20 años han permitido estudiar no sólo la identidad, sino también la actividad y la genómica microbiana (Azam 2001).

Dentro de los métodos utilizados en este campo se ha desarrollado un tipo de técnicas que permiten obtener un "perfil genético" o "huella genética" (*fingerprinting*) de la comunidad. Estos métodos aprovechan diferentes propiedades del material genético obtenido a partir de la muestra ambiental (*e.g.* longitud de secuencia, presencia o ausencia de sitios de restricción, comportamiento de desnaturalización) y permiten obtener una rápida visualización del ensamble microbiano permitiendo así, analizar cambios espaciales y temporales dentro de la comunidad y facilitar la comparación entre diferentes comunidades.

Entre los métodos de "huella genética" más utilizados podemos mencionar al Análisis de Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Terminales de Restricción (T-RFLP: *Terminal-Restriction Fragments Length Polymorphism*) (Avaniss-Aghajani *et al.* 1994; Liu *et al.* 1997), Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer *et al.* 1993; 1997) y el Análisis Automatizado del Espacio Intergénico Ribosomal (ARISA: *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) (Fisher y Triplett 1999; Yannarell y Triplett 2005), entre otros (para una revisión detallada de los métodos referirse a Kirk *et al.* 2004 y Nocker *et al.* 2007).

En particular, ARISA constituye un método rápido y efectivo que puede resultar especialmente útil en aquellos estudios ecológicos que requieren alta resolución espacial y temporal en el análisis. El método implica una separación por electroforesis capilar basada en la longitud de amplicones marcados fluorescentemente. Estos amplicones se obtienen a partir de la amplificación del espacio intergénico (ITS: internal transcribed spacer) dentro del operón que codifica para el ARN ribosomal (rARN). En particular, el fragmento analizado corresponde a aquel espacio entre los genes que codifican para la subunidad pequeña (16S) y grande (23S) del mismo (Fisher and Triplett 1999). Este espacio intergénico 16S-23S se caracteriza por ser heterogéneo tanto en su secuencia como en la longitud del mismo. Esta heterogeneidad se debe, principalmente, a la presencia (en bacterias Gram (-)) o ausencia (en bacterias Gram (+)) de secuencias que codifican para ARN de transferencia (tARN) en esta región intergénica (Liao 2000). Estos dos tipos de variación (*i.e.* secuencia y longitud) hacen a este espacio intergénico una región muy útil para la tipificación de cepas y separación entre especies bacterianas cercanas entre sí en aquellos casos donde la secuencia del gen ribosomal 16S rARN no permite suficiente resolución (Scheinert et al. 1996).

En el caso de la técnica de DGGE, el método se basa en la separación de fragmentos de ADN cuya longitud es similar pero que difieren en su secuencia. Esta técnica consiste en amplificar una región específica del gen que codifica para la subunidad pequeña (16S) del ARN ribosomal a partir del ADN ambiental. Luego estos fragmentos son separados de acuerdo a su punto de desnaturalización (*melting point*) en un gel de poliacrilamida que posee un gradiente desnaturalizante generado a partir de una concentración adecuada de formamida y urea. Además, esta técnica permite la escisión del gel de las bandas de interés (*i.e.* aquellas que distinguen a la comunidad) y su posterior identificación a través de su

secuenciación (Muyzer et al. 1993; Muyzer y Smalla 1998). Esta metodología tiene el potencial de detectar diferencias en el comportamiento de desnaturalización de pequeños fragmentos de ADN cuyas secuencias difieren, en teoría, en apenas un par de bases. En consecuencia, esta técnica ha resultado particularmente útil para la identificación de los miembros dominantes en la comunidad (Lindström y Leskinen 2002).

Sin embargo, dado que son técnicas moleculares basadas en la extracción del ADN total de la comunidad y su posterior amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*), tanto la técnica de ARISA como la de DGGE están sujetas a los errores sistemáticos introducidos por estos procedimientos (Suzuki y Giovannoni 1996; Wintzingerode *et al.* 1997; Crosby y Criddle 2003).

En el caso de los perfiles obtenidos a partir de la técnica de ARISA, Fisher y Triplett (1999) han concluido que las relaciones entre el número de fragmentos en el perfil y la diversidad absoluta de la comunidad que el perfil representa debe ser realizada con cautela. Estos autores señalan que, por un lado, la existencia de solapamiento en la longitud del espacio intergénico entre organismos no relacionados puede llevar a una subestimación de la diversidad mientras que, por otro lado, un mismo organismo puede estar aportando más de una señal al perfil como consecuencia de diferencias en las longitudes de los espacios intergénicos de las distintas copias del operón, dentro de un mismo genoma.

En relación a la técnica de DGGE, se estima que esta técnica puede detectar entre 1-2% de las especies totales que conforman la comunidad, es decir, sólo las especies dominantes (MacNaughton *et al.*, 1999). Además, los distintos fragmentos de ADN que difieren en su secuencia pueden presentar características similares de movilidad dentro del gel de poliacrilamida. En consecuencia, fragmentos diferentes migran juntos,

dificultando la diferenciación (Gelsomino et al. 1999). Por otro lado, una misma especie puede llegar a generar más de una señal en el perfil como consecuencia de la existencia de múltiples copias del gen 16S rARN que difieren ligeramente en sus secuencias (Gelsomino *et al. op. cit.*; Niemi *et al.* 2001).

Otro factor a tener en cuenta al momento de la utilización de estas técnicas está relacionado con el posterior análisis de los perfiles obtenidos. Índices de similitud de diversos tipos (cuantitativos, semicuantitativos y basados en datos de presencia-ausencia) son utilizados de manera generalizada para evaluar cuantitativamente las similitudes entre diferentes comunidades (Fisher y Triplett 1999; Hewson y Fuhrman 2004; Yannarell y Triplett 2005). Dadas las características de los distintos coeficientes utilizados (referirse a Legendere y Legendre 1998 para una exhaustiva descripción de los mismos), los resultados obtenidos a partir de la aplicación de estos índices estarán, obviamente, influenciados por el número de unidades taxonómicas operativas (OTU: operational taxonomic *units*) definidas para cada técnica, las cuales, a su vez, dependen de factores tales como el límite de detección de la técnica utilizada y las características particulares del fragmento amplificado. En consecuencia, distintos tipos de transformaciones de los datos ecológicos pueden producir discrepancia en las conclusiones a las que se arriba (e.g. conclusiones basadas en datos de presencia-ausencia de especies vs. abundancia de especies) (Clarke y Green 1988; Clarke y Ainsworth 1993).

En función de lo mencionado hasta aquí en lo referido a las fuentes de variabilidad inherentes a estas metodologías, cabe mencionar que son muy pocos los trabajos que han abordado empíricamente estudios comparativos de distintas técnicas (Díez *et al.* 2001; Casamayor *et al.* 2002). En consecuencia, el objetivo del presente capítulo es utilizar como modelo a un set de lagunas pampeanas caracterizadas por diferentes estados de equilibrio alternativo (*sensu* Scheffer *et al*.1993) para comparar los perfiles genéticos obtenidos a partir de dos técnicas diferentes como son la técnica de ARISA y DGGE. Las preguntas subyacentes en este análisis son (i) si resultan comparables los resultados obtenidos por ambas técnicas y, (ii) dada la diferencia en poder de resolución genético de ambas, interesa analizar cuál es el grado de complementariedad de estas dos técnicas.

El significado ecológico de los resultados obtenidos será analizado y discutido en el Capítulo II de esta tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del muestreo

El estudio se llevó a cabo durante un período de 13 meses, desde el mes de marzo de 2008 hasta el mes de abril de 2009, inclusive. Se tomaron muestras en las 6 lagunas de la región mencionadas en el apartado "Área de Estudio" (*i.e.* Chascomús, San Jorge, La Limpia, Lacombe, El Triunfo y Kakel Huincul), con una frecuencia bimensual. En cada sitio y fecha se obtuvieron muestras subsuperficiales de agua utilizando botellas plásticas de 10 L que, previamente, fueron lavadas con ácido clorhídrico diluído (2%), luego con sucesivos enjuagues de agua destilada, y finalmente, enjuagadas *in situ* con agua de cada laguna. Una vez tomadas las muestras, las botellas fueron mantenidas dentro de contenedores refrigerados y en oscuridad hasta su procesamiento en el laboratorio, aproximadamente entre 2 a 4 horas posteriores a su recolección.

Tratamiento de las muestras biológicas

Las muestras biológicas fueron prefiltradas secuencialmente a través de una malla de nylon de 50 μ m de tamaño de poro y, luego, a través de una malla de nylon de 20 μ m de tamaño de poro (ambas enjuagadas cuidadosamente con agua MiliQ) con el fin de eliminar las partículas y protistas de mayor tamaño. Dependiendo del tipo de laguna, luego de esta prefiltración se filtraron con bomba de vacío entre 100 mL (lagunas turbias) y 1000 mL (lagunas claras) de muestra a través de filtros de policarbonato (Millipore) de 3 μ m de porosidad. El eluído recolectado luego de esta filtración fue, finalmente, filtrado a través de filtros fueron colocados separadamente en tubos eppedorff previamente esterilizados y dichos tubos fueron almacenados a -80°C hasta su posterior utilización.

Para este trabajo únicamente se realizó la extracción de ADN y posterior análisis del material retenido en los filtros de 0,2 µm de porosidad.

Protocolo de extracción de ADN

El proceso de extracción del material genético comenzó con la adición al filtro de la solución de lisis CTAB a 60°C y su posterior incubación a 60°C por 30 minutos. Luego de la incubación, se adicionó a los lisatos una solución de cloroformo y alcohol isoamílico y los tubos se centrifugaron a máxima velocidad por 10 minutos. La fase acuosa (sobrenadante) se transfirió a otro eppendorff estéril y se repitió el lavado con la solución alcohólica mencionada. Luego de recuperar la fase acuosa, se adicionó igual volumen de isopropanol y las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 4°C con el fin de precipitar el ADN extraído. Luego de esta incubación, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 30 minutos. Finalmente, el pellet obtenido fue lavado con una solución de etanol fría, fue secado y el ADN fue resuspendido en solución reguladora TE 1 X. Los extractos obtenidos se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Obtención del perfil genético de la comunidad bacteriana por el método de DGGE (Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante)

Amplificación por PCR de los fragmentos correspondientes al gen 16S rARN

Para este análisis se utilizó 1 μ L del extracto del material genético como molde para la amplificación. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 50 μ L. La composición de la mezcla de reacción fue: solución reguladora a una concentración final de 1X La secuencia del termociclador se inició con un paso de precalentamiento por 5 minutos a 94°C, seguido por 10 ciclos que consistieron en: desnaturalización a 94°C por 1 minuto; hibridización (*annealing*) a 65°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 3 minutos. Durante estos 10 ciclos, la temperatura de hibridización disminuyó en 1°C por ciclo hasta que se alcanzó la temperatura final de 56°C (ciclos *touchdown*). Luego de estos 10 ciclos *touchdown*, se realizaron 25 ciclos más que consistieron en: desnaturalización a 94°C por 1 minuto; hibridización (*annealing*) a 55°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 3 minutos. Finalmente, se realizó un ciclo final de elongación a 72°C por 10 minutos.

El producto de PCR obtenido fue analizado en un gel de agarosa al 1% y cuantificado por comparación con un marcador estándar de corrida de bajo peso molecular (100 bp).

Condiciones electroforéticas

Los fragmentos obtenidos por PCR fueron analizados en un gradiente entre 40% y 80% de desnaturalización, de acuerdo a lo descripto previamente para comunidades bacterianas (Muyzer *et al.* 1997; Schauer *et al.* 2003). La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida al

6%, sumergido en la solución reguladora TAE a una concentración final de 1X y a una temperatura de 60°C. Se sembró en cada calle del gel entre 500 a 800 ng del producto de amplificación de las muestras ambientales y la corrida se llevó a cabo a 100 voltios durante 16 horas. Luego de la electroforesis, los geles fueron teñidos por 45 minutos con el fluorocromo específico de ácidos nucléicos SyberGold (Molecular Probes) y fueron visualizados bajo luz ultravioleta utilizando un transiluminador convertible de luz dual acoplado al software FOTO/Analyst PC Image Application (*Photodyne*, New Berlin, EEUU)

Las imágenes digitalizadas de los geles fueron analizadas con el software TotalLab 100 (Nonlinear Dynamics). Este software genera perfiles de densidad en cada calle, detecta bandas y calcula la contribución relativa de cada banda respecto de la señal total de la calle. Las bandas ubicadas en la misma posición en el gel fueron detectadas automáticamente por el software y posteriormente se realizó la inspección visual del alineamiento de bandas de manera tal de corregir algún error que pudiera haberse cometido con el alineamiento automático.

Una vez finalizado el análisis de las imágenes, se generaron dos matrices, una basada en la presencia-ausencia de bandas en cada calle (matriz cualitativa) y otra basada en la intensidad relativa de bandas (*i.e.* intensidad de cada banda comparada con la intensidad total de la calle correspondiente) (matriz cuantitativa). Estas dos matrices se exportaron a una planilla de EXCEL (Microsoft) para continuar con el análisis numérico.

<u>Obtención del perfil genético de la comunidad bacteriana por el</u> <u>método de ARISA (Análisis Automatizado del Espacio Intergénico</u> <u>Ribosomal)</u>

Amplificación por PCR de los fragmentos correspondientes al espacio intergenénico 16S-23S del operón rADN

En este caso, se utilizaron 5 µL del ADN extraído como molde para la amplificación. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 50 µL. La composición de la mezcla de reacción fue: solución reguladora a una concentración final de 1X (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂, 300 μ g ml⁻¹ de BSA, 200 μ M de cada uno de los desoxirribonucleótidos (Invitrogen), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos 16S-1406F (TGY ACA CAC CGC CCG T) y 23Sr-130R (GGG TTB CCC CAT TCR G). En este caso el cebador forward se 5' sitio sintetizó unido en su al marcador fluorescente 6carboxifluoresceína (6-FAM). Finalmente, 2,5U de la enzyma Taq polimerasa platinum (Invitrogen) completó la mezcla de reacción. En este caso también los oligonucleótidos resultan específicos del dominio Bacteria, en consecuencia, el grupo Archea también quedó excluido de este análisis.

La secuencia del termociclador se inició con un paso de precalentamiento por 2 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos que consistieron en: desnaturalización a 94°C por 35 segundos; hibridización (*annealing*) a 55°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 2 minutos. Finalmente, se realizó un ciclo final de elongación a 72°C por 2 minutos.

El producto de PCR obtenido fue purificado utilizando el kit Pure-Link (Invitrogen) y luego fue analizado en un gel de agarosa al 1,5% y cuantificado por comparación con un marcador estándar de corrida de bajo peso molecular (100 bp).

Condiciones de corrida de la electroforesis capilar

En base a la cuantificación del producto de amplificación obtenido, se realizaron diluciones adecuadas de forma tal de preparar las mezclas de corrida con una cantidad estandarizada de producto de PCR. Dicha mezcla estuvo compuesta por 5 ng del producto de amplificación, 0,2 μ L del marcador estándar interno de corrida GS 1200 LIZ (GeneScan- Applied Biosystems) y 13,8 μ L de formamida demonizada. Esta mezcla se desnaturalizó a 94°C por 2 minutos y luego fue colocada en hielo hasta su análisis.

Luego de la desnaturalización los fragmentos obtenidos fueron discriminados utilizando el analizador genético ABI 3730xl cuyos capilares contenían al polímero POP-7 (Applied Biosystems). Las señales fluorescentes detectadas por el equipo fueron traducidas a diagramas denominados *electroferogramas* los cuales están conformados por una serie de picos alineados que representan cada uno de los fragmentos presentes en la muestra y cuya longitud está estimada por comparación con los fragmentos del marcador interno de corrida. Estos electroferogramas fueron analizados con el software Peak Scanner 1.0 (Applied BIosystems) el cual permite calcular la altura y el área de cada pico, los cuales son proporcionales a la cantidad de ADN presente en el fragmento.

Análisis de los electroferogramas

Luego de la inspección visual y de la corrección manual de cada uno de los electroferogramas, las matrices generadas para cada electroferograma por el software Peak Scanner fueron exportadas a una planilla de EXCEL (Microsoft) para continuar con el análisis de los perfiles. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio, además del ITS, amplifican ~352 bp extras que corresponden a la porción 3' del gen 16S rADN y 5' del gen 23S rADN (**Figura 1.1**). En consecuencia, sólo los fragmentos cuyo tamaño osciló entre 350bp y 1200bp fueron incluidos en el análisis (Fisher y Triplett 1999). Además, se optó por un criterio conservativo para determinar el límite de detección de la señal: la altura mínima considerada para discriminar entre señal y ruido fue establecida en 50 unidades de fluorescencia (UF) (Yannarell y Triplett 2005).



Figura 1.1: Ubicación de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo en el operón rARN. La numeración en la parte superior indica la posición inicial y final de cada gen de acuerdo a la numeración utilizada en *E. coli*. En rojo se indica la posición de *annealing* de los cebadores utilizados en la técnica de ARISA y la cantidad extra de pares de bases (bp) de cada gen amplificado. En gris se indica la posición de *annealing* y el tamaño del amplicón generado por amplificación con el protocolo de DGGE.

Una vez eliminados los picos que estuvieran fuera del rango de tamaño considerado o que cuya altura resultó menor a 50 UF, se procedió a la normalización de las señales en cada uno de los electroferogramas para eliminar las variaciones en la detección de la señal entre muestras diferentes y permitir la comparación entre las mismas. Para ello, se dividió la altura y el área de cada pico por la intensidad total de fluorescencia (en UF) del perfil (*i.e.* la suma total de fluorescencia de todas las alturas por un lado y la suma total de fluorescencia areal, por otro). De esta manera, los

valores de altura de los picos y de área de los mismos quedaron expresados como proporción relativa de la señal total en cada perfil (Yannarell y Triplett 2005).

Para minimizar el impacto relativo de los picos más pequeños en el análisis se procedió de la siguiente manera: para cada perfil se ordenó de menor a mayor las alturas normalizadas de los picos. Una vez ordenados, se eliminaron en orden creciente todos aquellos picos pequeños que, en conjunto, representaban un valor menor o igual a un 10% de la fluorescencia total del perfil.

Finalmente, para eliminar las imprecisiones entre muestras en la asignación de la longitud de los fragmentos, se alinearon los perfiles y se asignó cada fragmento a un rango de tamaño (ventana) de forma manual (proceso denominado *manual binning*) (Schwalbach *et al.* 2005). Para la determinación del rango de tamaño se utilizó el criterio de "ventana fija" (Fisher y Triplett 1999; Hewson y Fuhrman 2004) y se utilizó un tamaño de ventana (*bin size*) de 1- 2 bp para aquellos fragmentos < 1000 bp y de 3- 5 bp para fragmentos >1000 bp.

Una vez finalizados estos procedimientos, se generaron dos matrices, una basada en la presencia-ausencia de los distintos fragmentos en todas las muestras analizadas (matriz cualitativa) y otra basada en la fluorescencia relativa del área de los fragmentos (matriz cuantitativa). Estas tres matrices se exportaron a una planilla de EXCEL (Microsoft) para continuar con el análisis numérico.

Definición de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU)

El perfil genético de la comunidad obtenido a partir de DGGE consistió en un patrón de bandas en donde cada banda fue considerada como una unidad taxonómica operativa (OTU). Cada una de estas OTU fue considerada como un sucedáneo de cada grupo filogenéticamente coherente y predominante de organismos presentes en el sistema.

Por otro lado, el perfil genético obtenido a partir del método ARISA consistió en patrones complejos de picos en donde cada pico del electroferograma fue definido como una OTU. En este caso, cada OTU representa, como mínimo, una cepa bacteriana presente en el ensamble original (Fisher y Triplett 1999).

Análisis numérico de los datos

Se realizó un ANOVA de dos factores (factor Sitio y factor Técnica) para comparar la relación entre unidades taxonómicas operativas (OTU) determinadas a partir de cada técnica.

Para analizar el efecto de la utilización de distintos tipos de índices en el análisis de datos moleculares, se estimaron dos tipos de índices de similitud (cualitativo y cuantitativo) a partir de las matrices correspondientes obtenidas por cada técnica.

Dado que, desde el punto de vista ecológico, la ausencia de una especie en dos sitios no aporta información ya que la misma puede estar ausente debido a que diversos motivos (*i.e.* limitaciones en la dispersión, ambos sitios constituyen un nicho cuyas características están por debajo de su óptimo de desarrollo, o ambos sitios están por encima de su óptimo, o uno está por encima y otro por debajo (o viceversa), etc.) se optó por la
utilización de índices de similitud asimétricos, es decir, índices que tratan a la doble ausencia de manera diferente al resto de los valores.

Como índice cualitativo (basado en la matriz de presencia-ausencia) se estimó el coeficiente de similitud de Jaccard (S(j)) (Legendre y Legendre 1998) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S(j)(x1, x2) = \frac{a}{(a+b+c)}$$

donde *a* corresponde al número de OTU (*i.e.* bandas para DGGE; fragmentos para ARISA) compartidas por el sitio 1 y 2, *b* corresponde al número de OTU presentes en la muestra 1 y ausentes en la muestra 2 y *c* corresponde al número de OTU presentes en la muestra 2 y ausentes en la muestra 1.

Como índice cuantitativo (basado en las matrices de intensidades relativas) se estimó el coeficiente de similitud de Bray-Curtis (Legendre y Legendre *op. cit.*) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S(b)(x1, x2) = \frac{2A}{B+C}$$

donde A corresponde a la suma de las intensidades relativas mínimas entre todas las OTU compartidas por el sitio 1 y 2 mientras que B y C corresponde a la suma de intensidades del total de OTU presentes en el sitio 1 y 2, respectivamente.

De acuerdo con esto, se obtuvieron un total de cuatro matrices de similitud (2 tipos de datos x 2 técnicas) de tamaño 30 x 30: matriz "Cuali ARISA"; matriz "Cuali DGGE", matriz "Cuanti ARISA" y matriz "Cuanti DGGE":

Para poner a prueba la Hipótesis Nula de "no concordancia entre ambas técnicas" se realizó la comparación de las matrices de similitud utilizando el test de Mantel basado en el coeficiente de correlación de Spearman (r_S) (Legendre y Legendre, 1998). Las cuatro matrices que resumen las relaciones en la estructura de la composición de la comunidad bacteriana entre las distintas muestras, fueron comparadas utilizando el coeficiente de correlación de Spearman y el resultado de las comparaciones fue sintetizado en un *cluster* basado en dicho índice y utilizando el método de enlace simple como algoritmo de unión.

Finalmente, para analizar la relación en la estructura de la composición de la comunidad bacteriana entre sitios, se calculó para cada una de las cuatro matrices anteriores el promedio de similitud por sitio. Luego de esta transformación, las matrices originales fueron reducidas a cuatro matrices de tamaño 5 x 5 y con cada una de ellas se realizó un análisis de agrupamiento (*cluster*) basados en dicho promedio y utilizando en todos los casos el método UPGMA (*unweighted pair- group average linkage*) como algoritmo de enlace.

Tanto los análisis de *cluster* como los tests de Mantel fueron realizados con el programa XLStat (AddinSoft SARL) mientras que el análisis de ANOVA se realizó con el paquete estadístico provisto en el software SigmaPlot 11.0 (Systat inc.).

RESULTADOS

Para poder realizar la comparación entre las matrices generadas a partir de ambas metodologías se eliminaron de este análisis aquellas muestras cuya amplificación resultó negativa en uno u otro análisis. En consecuencia, de un total de 41 muestras obtenidas, 11 fueron eliminadas. Entre estas 11, 7 correspondieron al muestreo de la laguna La Limpia (turbia inorgánica) cuyo material genético no se logró amplificar a partir del protocolo de amplificación para ARISA.

El ANOVA de dos factores realizado en base al número de unidades taxonómicas operativas detectadas (OTU) indicó diferencias significativas entre ambas técnicas ($p_{lagunas}$ = 0,355, $p_{técnica}$ <0,001, $p_{interacción}$ = 0,411). En términos generales, el número de OTU detectado por el método de ARISA resultó mayor que el detectado por la técnica de DGGE (**Figura 1.2**).



Figura 1.2: Comparación en el número de unidades taxonómicas operativas (OTU) detectadas por ambas técnicas en cada sitio.

Los análisis de *cluster* realizados a partir de los valores promedios de similitud entre sitios (matrices de 5x5) evidenciaron un efecto del tipo de técnica utilizada sobre el ordenamiento de los mismos. Sin embargo, al analizar cada técnica por separado, no se observa un efecto del tipo de índice utilizado sobre la relación entre los sitios (**Figura 1.3 a-d**).



Figura 1.3: Clasificación de los 5 sitios basados en el análisis de *cluster* realizados a partir de las matrices de similitud promedio para cada sitio obtenidas a partir de un índice cualitativo (Jaccard) y otro semicuantitativo (Bray-Curtis)

En la **Tabla 1.1** se indican los coeficientes de correlación de Spearman (r_S) obtenidos en la comparación de las distintas matrices de similitud obtenidas a partir de los perfiles genéticos generados por cada técnica (matrices de 30 x 30). En todos los casos, las correlaciones resultaron significativas (p< 0,0001).

Matriz	Cuali ARISA	Cuanti ARISA	Cuali DGGE	Cuanti DGGE
Cuali ARISA	1,00			
Cuanti ARISA	0,84	1,00		
Cuali DGGE	0,26	0,29	1,00	
Cuanti DGGE	0,21	0,23	0,94	1,00

Tabla 1.1: Valores de los coeficientes de correlación obtenidos a partir de losdistintos tests de Mantel realizados. Los mismos se basaron en el índice de correlaciónde Pearson (r_M). En todos los casos, las correlaciones resultaron significativas (p<0,0001).</td>

Sin embargo, la estructura de los datos tendió a ser más similar entre datos generados por un mismo tipo de técnica (independientemente del tipo de dato utilizado) que entre técnicas diferentes (**Figura 1.4**).



Figura 1.4: Análisis de *cluster* comparando los set de datos generados a partir de ambas técnicas. Los nodos del árbol se basan en los resultados de los tests de Mantel realizados. Las ramas representan a cada una de las matrices de similitud generadas a partir de los tres tipos de datos utilizados (cualitativos y cuantitativos).

Los resultados presentados hasta aquí evidencian que, si bien existen diferencias en la estructura de los datos generada por ambas técnicas, el peso de dichas diferencias no resultan lo suficientemente significativas como para rechazar la Hipótesis Nula ya que, en términos generales, la estructura de los datos generados por ambas técnicas resultaron consistentes entre sí.

DISCUSIÓN

Como se mencionara en la introducción de este capítulo, existe una serie de dificultades e incertidumbre en lo que respecta a los procesos que unen a la estructura de la comunidad microbiana en su ambiente natural con la caracterización de la misma basada en aspectos moleculares del ensamble. Hoy en día sigue siendo un tema de debate hasta qué punto la variabilidad metodológica altera el aspecto real de la comunidad en la naturaleza. Estas dificultades e incertidumbre se pueden categorizar dentro de dos grandes grupos: i- la relevancia ecológica de las distintas unidades taxonómicas definidas en cada técnica y ii- el uso de datos cuantitativos (*i.e.* intensidad relativa) versus datos cualitativos (*i.e.* presencia - ausencia) generados a partir de estas técnicas.

En lo que respecta a ARISA, esta técnica no aporta ningún tipo de información filogenética sobre la comunidad bacteriana, por lo tanto, resulta dificultoso determinar la relevancia ecológica de los cambios observados en las unidades taxonómicas descriptas únicamente a partir de perfiles de ARISA. La respuesta definitiva a esta cuestión depende, en última instancia, de la habilidad de estas unidades taxonómicas en distinguir especies diferentes y, a su vez, si son las especies las unidades ecológicas las que responden al cambio ambiental.

En este sentido, la técnica de DGGE presenta la ventaja de que las bandas pueden ser secuenciadas, facilitando el monitoreo de filotipos particulares en el ensamble natural. Si embargo, estas secuencias obtenidas representan menos de un tercio de la longitud total de la secuencia del gen 16S rARN y su calidad no siempre es óptima, factores que dificultan la resolución filogenética de la técnica. Por ejemplo, para el set de lagunas seleccionadas para este trabajo se escindieron aproximadamente 200 bandas a partir de las cuales no fue posible obtener secuencias de calidad adecuada para ser comparadas con la base de datos del BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Limitaciones de este tipo han sido reportadas en ambientes extremadamente diversos como suelos y tapetes microbianos (Ferris y Ward 1997; Muyzer *et al.*1998). Por otro lado, el problema de la co-migración de bandas y la presencia de copias múltiples del operón en un mismo genoma imponen otra limitación metodológica a la determinación de la riqueza bacteriana en el ambiente.

Sin embargo, a pesar de todas estas dificultades y de las diferencias metodológicas entre ambas técnicas, el patrón general de la estructura de la comunidad bacteriana descripto a través de ambas metodologías resultó razonablemente similar. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Díez y colaboradores (2001), quienes compararon perfiles genéticos de ensambles naturales de picoeucariotas obtenidos a partir de DGGE y T-RFLP, y con los resultados de Casamayor y colaboradores (2002), quienes compararon ensambles de archeabacterias, eubacterias y picoeucariontes en un gradiente de salinidad. Para el caso particular de las eubacterias, Casamayor y colaboradores (op. cit.) compararon la estructura de esta comunidad utilizando tres protocolos diferentes de DGGE y la técnica de RISA (versión no automatizada del ARISA donde la detección de los fragmentos del ITS se realiza a través de una corrida electroforética en un gel de poliacrilamida (Borneman y Triplett 1997). Estos autores concluyeron que, independientemente del protocolo o técnica utilizada, la estructura general del ensamble se mantuvo. En concordancia con estos autores, la variabilidad observada en los set de datos obtenidos en este estudio estaría asociada a los diferentes niveles de resolución genética que cada una de estas técnicas posee y, en este sentido, resulta interesante analizar el significado de las diferencias observadas.

En este trabajo, los resultados de los *clusters* basados en DGGE han puesto de manifiesto de manera más clara las diferencias limnológicas más evidentes entre las lagunas.

El hecho de que la técnica cuya resolución está sesgada hacia los taxones dominantes refleje de manera más marcada las diferencias entre los distintos ambientes podría explicarse a través de los conceptos de Magurran y Henderson (2003) en relación a la distribución de abundancia entre las especies presentes en una comunidad. Según estos autores, las comunidades ecológicas pueden separarse en dos componentes: aquellas especies más abundantes y frecuentes (especies núcleo o *core species*) y aquellas menos abundantes y muy poco frecuentes (especies raras u ocasionales).

En relación a la comunidad bacteriana, los taxones más abundantes (core taxa) están bien adaptados a su ambiente, llevan a cabo la mayoría de las funciones del ecosistema, crecen activamente y sufren mayores pérdidas por predación o lisis viral, mientras que los taxones menos representados se por un crecimiento extremadamente lento, presencia caracterizan esporádica en ambientes limitantes para su desarrollo y ausencia de control por predación o lisis viral (Pedrós-Alió 2006). De acuerdo con esto, las diferencias más marcadas entre los ambientes fueron evidenciadas a partir de la técnica de DGGE ya que la misma sólo detecta aquellas entidades más abundantes que son, en última instancia, las entidades que determinan la tendencia en la fenología de la comunidad. Por otro lado, el patrón obtenido a partir de ARISA pone de manifiesto la presencia de aquellas entidades raras u ocasionales las cuales, bajo condiciones ambientales particulares pueden, eventualmente, reemplazar al grupo núcleo de taxones existente (Magurran y Henderson 2003, Pedrós-Alió op.cit.).

El otro punto de conflicto en la utilización de las técnicas de huella genética se relaciona con el uso de los datos cuantitativos para describir el patrón general de abundancia de estos organismos. Existen numerosos ejemplos en la literatura que documentan que la aplicación de la técnica de PCR en muestras heterogéneas (como aquellas que resultan de la extracción de ADN total de una muestra ambiental) puede modificar la proporción del producto respecto a su proporción original (Suzuki y Giovannoni 1996; Polz y Cavanaugh 1998; Suzuki et al. 1998) influyendo, así, sobre la determinación de la abundancia natural de organismos en la muestra (Farrelly et al. 1995). De acuerdo con esto, muchos autores han optado por una aproximación más conservativa e índices tales como el coeficiente de similitud de Jaccard o de Sørensen han sido ampliamente utilizados para evaluar la similitud entre comunidades (e.g. Murray et al. 1996, 1998; Liu et al. 1997; Lindström 1998; Schwalbach et al. 2005; Hewson *et al.* 2006 a y b). Sin embargo, Muylaert y colaboradores (2002) encontraron que la utilización de datos cualitativos puede llegar a enmascarar la relación que exista entre los perfiles genéticos y las variables ambientales explicativas. Por otro lado, Yannarell y Triplett (2005) pusieron en evidencia la influencia desproporcionada que ejercen aquellas OTU cuya señal apenas sobrepasa el límite de detección (i.e. menos abundantes) cuando se utilizan coeficientes basados en datos de presenciaausencia.

Es útil recordar en este punto que la utilización de estos índices de similitud tiene por objetivo evaluar la diversidad beta o diversidad entre hábitats, es decir, el grado de cambio biótico a través de gradientes ambientales (Whittaker, 1972). La principal ventaja de los índices es que resumen una gran cantidad de información en un solo valor y nos permiten hacer comparaciones rápidas y sujetas a comprobación estadística entre la diversidad de distintos hábitats o la diversidad de un mismo hábitat a través

del tiempo. El análisis del valor de importancia de las especies (*i.e.* utilización de datos cuantitativos) permite identificar aquellos grupos (*i.e.* especies u OTU, en este caso) que por su escasa representatividad en la comunidad son más sensibles a las perturbaciones ambientales. En el caso particular de la comunidad bacteriana, el hecho de identificar un cambio en la diversidad, ya sea en el número de OTU, en la distribución de la abundancia de los mismos o en su dominancia sería un indicio de procesos empobrecedores de la diversidad del sistema (Magurran, 1988).

Los altos coeficientes de correlación obtenidos en este trabajo al comparar de manera cualitativa y cuantitativa el mismo set de datos evidenciaron que, independientemente del tratamiento matemático de los datos, se detectó un patrón biológico común y constante, a partir de ambas metodologías. Dado que los índices en sí mismos no son más que herramientas matemáticas para describir y comparar, en este caso, la diversidad de OTU, resultaría una aproximación recomendable realizar el análisis de datos basado en distintas transformaciones de los mismos de forma tal de comparar los resultados y poder discernir sobre el modelo más apropiado a utilizar. Además, esta metodología permitiría evidenciar aquellos patrones comunes en la estructura de los datos, los cuales constituirían una solución robusta al problema planteado.

De lo expuesto hasta aquí se concluye que ambas técnicas resultan consistentes y proveen una aproximación razonable para el estudio de las variaciones ecológicamente relevantes de la comunidad bacteriana de las lagunas de la Región Pampeana. Más aun, la utilización en conjunto de ambas metodologías permitió abordar el mismo problema en dos niveles de análisis complementario de forma tal de poner de manifiesto tanto las características más conspicuas de la estructura de la comunidad así como también aquellos detalles en su composición obteniendo, de esta manera, una descripción más acabada de los sistemas.

Análisis del patrón de composición de la comunidad bacteriana planctónica en lagos someros de la Región Pampeana (Pcia. de Buenos Aires, Argentina)

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos fundamentales de la ecología es comprender los patrones de distribución espacial y temporal de los organismos como punto de partida para poder inferir sobre los mecanismos subyacentes que generan y mantienen la biodiversidad (Green y Bohannan 2006). En este sentido, la búsqueda de patrones en la distribución de los microorganismos se ha convertido en un objetivo primordial dentro de la ciencia de la ecología microbiana (Van der Gucht *et al.* 2007). En particular, entender los factores determinantes de los patrones de distribución bacterianos resulta de singular importancia dada la gran diversidad del grupo, su rol fundamental en diversos procesos ambientales que sustentan la vida sobre la Tierra y su gran importancia dentro de las ciencias aplicadas en áreas tales como la biorremediación (degradación biológica de contaminantes) y la bioprospección (búsqueda de nuevos compuestos bioquímicos con aplicaciones médicas e industriales) (Horner-Devine *et al.* 2004).

Actualmente, existe un debate intensivo en cuanto a si las comunidades microbianas comparten patrones de distribución y de diversidad similares a aquellos descriptos para macroorganismos. La hipótesis tradicional entre los microbiólogos supone ubicuidad de los microorganismos (*everything is everywhere but environment selects*. Baas-Becking 1934). Los argumentos más citados a favor de esta hipótesis se basan en las altas abundancias locales sostenidas por estas poblaciones, su rápida proliferación, sus altas tasas de dispersión y la baja probabilidad de extinción a nivel local debido a la presencia de estadíos de resistencia (Finlay y Clarke 1999; Curtis *et al.* 2002; Torsvik *et al.* 2002; Fenchel y Finlay 2004).

Sin embargo, un creciente número de trabajos, que abarcan desde comunidades bacterianas a pequeños metazoos, ponen en evidencia la existencia de patrones biogeográficos marcados e, inclusive, la existencia de aislamiento geográfico en ciertos taxones microbianos (Dolan 2005; Foissner 2006.; Green y Bohannan 2006; Martiny *et al.* 2006; Van der Gucht *et al.* 2007).

De esta yuxtaposición de ideas y de observaciones se desprende que la interpretación de los datos biogeográficos no es trivial y requiere de un marco teórico que permita fundamentar las observaciones realizadas en cuanto al patrón de distribución, los mecanismos que lo generan y, eventualmente, posibilitar cierto grado de predicción en cuanto a la dinámica de los organismos en el ambiente (*e.g.* Prosser *et al.* 2007). La mayor tradición histórica del estudio de la biogeografía de plantas y animales ha permitido el desarrollo de un cuerpo teórico cuya aplicación y generalidad han comenzado a evaluarse en el análisis de los patrones de distribución microbianos (*e.g.* Martiny *et al.* 2006; Van der Gught *et al. op. cit.*; Logue y Lindström 2008).

Durante las últimas décadas del siglo XX, la teoría de la Biogeografía de Islas de McArthur y Wilson (1967) tuvo una importante influencia en la manera de pensar de los ecólogos en cuanto a los organismos y sus patrones espaciales de distribución, y fue por un tiempo el principal paradigma para el diseño de reservas y manejo. Sin embargo, dada la falta de consenso en cuanto a la configuración espacial que debían tener los hábitats de forma tal de maximizar la riqueza de especies, surgió la necesidad de enfrentarse al problema desde otra óptica. Así, a partir de la década de los 90, el concepto de Metacomunidades (Hanski y Gilpin, 1991) evolucionó tomando como referencia la denominada Teoría de Metapoblaciones (Hanski, 1999). Dentro de este contexto teórico, se define como *metacomunidad* a un grupo de comunidades locales interconectadas entre sí por la dispersión de múltiples especies que, potencialmente, pueden interactuar entre sí. En oposición a las visiones tradicionales, el concepto de metacomunidades permite explicar la dinámica espacial de las comunidades en función de procesos ecológicos que ocurren tanto a escala de organización local como regional (*e.g.* Leibold *et al.* 2004; Logue y Lindström 2008; Logue *et al.* 2008).

Dentro de este marco conceptual y en relación a la comunidad bacteriana, en hábitats heterogéneos y con un alto grado de conexión, las altas tasas de dispersión que caracterizan a esta comunidad pueden generar dos patrones de diversidad contrastantes:

Por un lado, si no existe separación temporal entre la dinámica local de la comunidad y la dinámica de inmigración y emigración regional, la estructura y dinámica de la población local resulta afectada cuantitativamente por los procesos de dispersión que ocurren a nivel regional. Este acoplamiento de procesos que ocurren a diferentes escalas provoca la homogeneización de la composición de la comunidad bacteriana a nivel de metacomunidad como resultado del "efecto de masa" y "efecto de rescate". En otras palabras, si los distintos parches se encuentran lo suficientemente interconectados, la dispersión resulta en una relación fuente-sumidero entre poblaciones de distintos parches. Esta perspectiva corresponde al paradigma de Efecto de Masa y según ésta, la heterogeneidad ambiental promueve diferencias en la composición de la comunidad, sin embargo, el efecto de la inmigración provoca que, dentro de cada comunidad se retengan, inclusive, aquellos taxones menos favorecidos por el ambiente. En consecuencia, se espera que la composición de la comunidad varíe tanto a lo largo del gradiente ambiental como con la distancia entre ambientes "fuente" y "sumidero" (Figura 2.1a). En el caso extremo de ambientes extremadamente interconectados, la homogeneización de la composición provocada por el efecto de masa puede ser tan marcada que el efecto de las condiciones ambientales queda enmascarado y la correlación entre ocurrencia de taxones y las condiciones ambientales se reduce.

Si, por el contrario, existe separación temporal entre la dinámica local de la población y la dinámica de colonización-extinción, es decir, la tasa de crecimiento poblacional es lo suficientemente alta como para desacoplar la dinámica poblacional local de la dinámica de dispersión regional, entonces, la dinámica de la comunidad dependería de diferentes aspectos de las condiciones ambientales y resultaría independiente de los efectos de la distribución espacial de los sistemas. Esta segunda perspectiva corresponde a la perspectiva de *Species Sorting* (Segregación de Especies), la cual enfatiza la separación de nichos mientras que predice que la similitud en la estructura de la comunidad resulta independiente de la distancia entre comunidades dado que la dispersión ocurre a nivel global (**Figura 2.1-b**).

Las **Figuras 2.1 a** y **b** corresponden a la representación esquemática de las predicciones de ambos modelos respecto de los efectos de las condiciones ambientales locales y la tasa de dispersión regional sobre la estructura de la comunidad bacteriana.



Figura 2.1: Contribución de los efectos de la distancia entre hábitas y de las condiciones ambientales según la perspectiva de *Efecto de masa* (a) y *Species Sorting* (b). El eje x representa la distancia geográfica entre hábitats o la similitud ambiental entre los mismos, mientras que el eje y representa la similitud en composición comunitaria entre los distintos hábitats (Adaptado de Martiny *et al.* 2006).

El cuestionamiento inmediato que surge al comparar patrones de distribución de microorganismos dentro de marcos conceptuales desarrollados para macroorganismos es cómo comparar unidades taxonómicas equivalentes. Dado que aún la sistemática bacteriana no ha llegado a un consenso para definir a la unidad fundamental de diversidad biológica (*i.e.* especie), resulta más interesante indagar a qué nivel de resolución taxonómica el patrón de distribución observado se asemeja a aquel descripto para macroorganismos (Green y Bohannan 2006).

En este sentido, son pocos los trabajos que analizan los efectos de la distribución geográfica y las condiciones ambientales en la determinación del patrón de distribución de la comunidad bacteriana (*e.g.* Hewson y Fuhrman 2004; Reche *et al.* 2005; Yannarell y Triplett 2005; Green y Bohannan *op. cit.*) y más escaso aún es el número de trabajos que analizan

42

patrones biogeográficos considerando distintos niveles de resolución taxonómica (*e.g.* Cho y Tiedje 2000).

El objetivo general de este capítulo es evaluar los efectos de la distribución espacial y las condiciones ambientales locales en la determinación del patrón de composición de la comunidad bacteriana en lagos someros de la Región Pampeana que presentan distintos estados de equilibrio (lagunas turbias vs lagunas claras). Este análisis se realizó con dos niveles de resolución genética (DGGE y ARISA) y las preguntas subyacentes planteadas fueron las siguientes: ¿cuál de los modelos propuestos permite describir mejor el patrón de distribución observado?; ¿cuáles son los factores ambientales principales que controlan la composición de la comunidad bacteriana?, ¿condiciones ambientales similares generan comunidades bacterianas similares? y ¿de qué manera los factores ambientales de control se relacionan con el tipo de régimen del sistema?

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del muestreo

Se tomaron muestras subsuperficiales de agua en cada una de las 6 lagunas descriptas en la sección "Área de estudio" con una frecuencia bimensual durante un período de 13 meses (marzo 2008- abril 2009). Las muestras fueron refrigeradas y mantenidas en oscuridad hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. Los detalles del muestreo y del tratamiento de las muestras biológicas fueron descriptos en el Capítulo I de esta tesis.

Propiedades ópticas y físico-químicas

Se tuvo acceso a los datos físico-químicos que forman parte de la tesis doctoral de Leonardo Lagomarsino, cuyos datos fueron obtenidos a partir de los mismos muestreos que se realizaron para el desarrollo de esta tesis.

Las características ópticas de las lagunas fueron analizadas a través de mediciones del coeficiente de atenuación vertical de la radiación solar (Kd), utilizando un espectrorradiómetro USB 2000 (Ocean Optics). Este instrumento permitió obtener el perfil espectral de la columna de agua en cada sitio y fecha. Estos perfiles fueron utilizados para calcular en cada caso los coeficientes de atenuación vertical de la radiación fotosintéticamente activa (400- 700 nm) (Kd_{PAR}).

En cada ambiente se realizaron mediciones *in situ* de temperatura del agua (T°), pH (pH-ímetro Orion; ATI Orion, VWR Scientific); conductividad (Cond) (Hach Company) y oxígeno disuelto (OD) (YSI 5000 meter; YSI Incorporated).

En el laboratorio se realizaron la medición de turbidez nefelométrica (Turb) (2100P Hach Company) y la determinación de alcalinidad (Alc) por titulación de acuerdo al método de Gran (Wetzel & Likens, 2000). Además, se determinó la concentración de los nutrientes principales. La concentración de fósforo total (FT) se evaluó por el Método del Ácido Ascórbico, previa digestión ácida de la muestra; la determinación de nitritos y nitratos (N-(NO₂+NO₃) se llevó a cabo por el Método de Reducción con Cadmio, mientras que el nitrógeno orgánico (Norg) se determinó por el Método semi-micro Kjeldahl (APHA 1992). Se definió al nitrógeno total (NT) como la suma [Norg + (N-(NO₂+NO₃)].

La concentración de sólidos en suspensión (SS) se obtuvo a partir del filtrado de volúmenes conocidos de agua a través de filtros Whatman GF/C previamente secados y pesados. Estos filtros se dejaron secar en la estufa (103- 105 °C) hasta peso constante (APHA, 1992). Para estimar el peso seco libre de cenizas los filtros con el material seco retenido fueron calcinados a 530°C por 3 hs. Luego de la calcinación, los filtros fueron pesados nuevamente y por diferencia se estimó el contenido de materia orgánica (MO) y materia inorgánica (MI) en cada muestra (APHA *op. cit.*).

Finalmente, se estimó la concentración de clorofila-*a* (Cl-a) por el método de extracción con acetona (Marker *et al.* 1980).

<u>Tratamiento de las muestras biológicas, extracción de ADN y</u> <u>obtención de los perfiles genéticos de la comunidad por el método de</u> <u>ARISA y DGGE</u>

El tratamiento detallado de las muestras fue descripto en el Capítulo I. A modo de facilitar la lectura, en la **Figura 2.2** se presenta un esquema de la metodología.



Figura 2.2: Esquema metodológico de la obtención de los perfiles genéticos de la comunidad bacteriana utilizando las técnicas de ARISA y DGGE. Para mayor detalle, remitirse a la sección metodológica del Capítulo I de esta tesis.

Análisis numéricos

Variables explicativas

a- Variables ambientales

Las variables cuantitativas ambientales consideradas fueron: temperatura del agua (T°), pH, conductividad (Cond), alcalinidad (Alc), turbidez nefelométrica (Turb), oxígeno disuelto (OD), coeficiente de extinción vertical de la luz (Kd), concentración de nitrógeno total (NT), concentración de fósforo total (FT), sólidos totales en suspensión (SS), contenido de materia orgánica en sólidos en suspensión (MO), contenido de materia inorgánica en los sólidos en suspensión (MI) y concentración de clorofila-*a* (Cl-a).

La matriz de variables ambientales fue estandarizada y a partir de la misma se construyó una matriz de distancia entre sitios utilizando el coeficiente de Distancia Euclidiana (Legendre y Legendre 1998). La matriz resultante fue transformada a su matriz de similitud complementaria (1-Distancia) y esta matriz final resultante (matriz de similitud ambiental) fue utilizada en los análisis subsiguientes.

b- Posición geográfica

La distancia geográfica en línea recta entre cada uno de los sitios fue calculada a partir de los datos de latitud y longitud de cada sitio de muestreo. Estas distancias calculadas se ordenaron en una matriz (matriz de distancia geográfica) que fue utilizada en los análisis subsiguientes.

Variables de respuesta (perfiles de DGGE y ARISA)

Para dar el mismo peso a las distintas unidades taxonómicas presentes en las muestras, el análisis se basó en la comparación de la riqueza de OTU de cada sitio (*i.e.* sólo se consideró la presencia- ausencia de los mismos). En consecuencia, las comparaciones de a pares entre los

sitios se realizaron mediante el coeficiente de similitud de Jaccard el cual se aplicó a cada una de las matrices generadas a partir de las dos técnicas utilizadas. Como resultado, se obtuvieron dos matrices de similitud basadas en la composición de la comunidad bacteriana de cada sitio (matriz de similitud genética basada en DGGE y matriz de similitud genética basada en ARISA).

Análisis multivariados

Se realizaron tests Parciales de Mantel basados en el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) para comparar las tres matrices de interés: imatriz de similitud genética; ii-matriz de similitud ambiental y iii- matriz de distancia geográfica (Smouse et al. 1986). Esta metodología permite estimar la correlación entre dos matrices, controlando los efectos de la tercera (r (AB.C)) y en este caso se aplicó para analizar cuánto de la variabilidad en el patrón de composición genética se explica por las condiciones ambientales y si existe una variabilidad residual en el patrón de composición que se encuentre espacialmente estructurada. Tanto la matriz de distancia geográfica como la matriz de similitud generada a partir de los datos ambientales fueron comparadas por un lado, con la matriz de similitud generada a partir del análisis de DGGE y, luego, con la matriz generada a partir del análisis de ARISA. En el caso de la comparación entre matrices de similitud, la prueba realizada fue unilateral, sobre la región superior de la distribución de referencia (H_a: $r_s > 0$), mientras que para la comparación entre matrices de similitud y distancia la prueba realizada fue unilateral sobre la región inferior de la distribución correspondiente ((Ha: rs < 0).

Los patrones de similitud obtenidos a partir de los perfiles genéticos resultantes de las dos técnicas fueron analizados a través de un análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS: non-metric multidimensional scaling). Esta técnica permite representar cada uno de los objetos como un punto en un espacio de pocas dimensiones (en este caso, 3 dimensiones) cuyas interdistancias reproducen prácticamente la ordenación en el espacio multidimensional original. En el caso del análisis nodimensional, el criterio de bondad de ajuste depende sólo del orden de los valores y no de sus valores absolutos (Linares 2001). Este análisis se realizó utilizando 30 configuraciones iniciales aleatorias (Clarke y Green 1988) y el grado de ajuste entre la representación en un espacio de baja dimensión y la matriz original fue determinado utilizando el índice de stress de Kruskal (Legendre y Legendre 1998) de acuerdo a la fórmula:

Stress (fórmula 1) = $\{3(D-d)^2/3 D^2\}^{1/2}$

donde D corresponde al rango del orden de las distancias entre los objetos en el espacio multidimensional original y d corresponde al rango del orden de las distancias estimadas por el modelo de regresión para la representación en un espacio de pocas dimensiones.

La ordenación obtenida a partir del NMDS fue utilizada para investigar la relación entre las variables ambientales y los patrones de composición de la comunidad bacteriana. Para ello se correlacionó cada una de las 13 variables ambientales con los *scores* de los sitios sobre cada uno de los 3 ejes de ordenación utilizando el coeficiente de correlación de Spearman.

Para poner a prueba la significación de los grupos generados a partir del escalamiento multidimensional, se realizó un análisis de similitud (ANOSIM) (Clarke y Green *op.cit.*) basados en los grupos obtenidos a partir de los perfiles generados por DGGE y por ARISA, separadamente. El test ANOSIM genera un estadístico (R) y la magnitud de este estadístico indica el grado de separación entre grupos. Un valor de 1 indica completa separación de los grupos mientras que un valor de 0 indica no separación de los mismos.

Finalmente, para analizar en detalle las relaciones entre las comunidades bacterianas de los distintos sitios, se realizaron análisis de *cluster* basados en el coeficiente de similitud de Jaccard y en el método de enlace medio (UPGMA) como algoritmo de unión.

Otros análisis numéricos

Se realizó un ANOVA de un factor para comparar la relación entre unidades taxonómicas operativas determinadas a partir de cada técnica. Además, se realizó un ANOVA no paramétrico (test de Kruskal-Wallis) para comparar las frecuencias relativas de tamaños de los fragmentos obtenidos por la técnica de ARISA en cada laguna.

Tanto los análisis de *cluster* como los tests de Mantel fueron realizados con el programa XLStat (AddinSoft SARL) mientras que los análisis de escalamiento multidimensional (NMDS) y de similitud (ANOSIM) se realizaron con el programa PAST 2.0 (Hammer *et al.* 2001). El análisis de ANOVA no paramétrico (Kruskall-Wallis) se realizó con el paquete estadístico provisto en el software SigmaPlot 11.0 (Systat inc.).

RESULTADOS

Como se mencionara en el Capítulo I, las muestras de la laguna La Limpia no pudieron ser analizadas por la técnica de ARISA. En consecuencia, los análisis realizados en este capítulo con los datos obtenidos por DGGE se realizaron tanto considerando como eliminando a esta laguna. Como los resultados no fueron afectados sustancialmente y se mantuvieron consistentes con o sin la consideración de este sistema, se optó por mantener los datos obtenidos para La Limpia en este análisis.

Por otro lado, cabe mencionar que durante el período de estudio la región experimentó un período de sequía que provocó la disminución de los niveles de la columna de agua en los distintos sistemas. Este proceso se evidenció, fundamentalmente, en un aumento generalizado de la turbidez en las lagunas estudiadas.

PERFILES DE DGGE

La **Figura 2.3** corresponde a los perfiles genéticos obtenidos para cada sitio de muestreo y en cada fecha.

Para las 6 lagunas estudiadas se detectaron un total de 531 bandas (OTU) en 58 posiciones diferentes. Solamente 4 posiciones (10, 16, 29 y 43) fueron compartidas por todas las lagunas y, en promedio, estas posiciones representaron entre un 8,7% y un 81,4% del total de intensidad relativa por calle (promedio: 23,3%). Las lagunas CH y SJ (turbias con abundante biomasa fitoplanctónica) compartieron 4 posiciones exclusivas (2, 6, 23 y 33), mientras que las lagunas claras vegetadas (TRI y KH) compartieron una única posición (posición 51). Una sola posición resultó exclusiva de la laguna CH (posición 57) mientras que dos posiciones solo fueron detectadas en la laguna SJ (posición 7 y 58). La laguna LI (turbia inorgánica) y LAC (turbia con abundante biomasa fitoplactónica) no mostraron ningún patrón distintivo.



Figura 2.3: Perfiles obtenidos por le técnica de DGGE en donde los fragmentos de ~ 600 bp del gen 16S rARN fueron separados en un gradiente de 40% a 80% de desnaturalización. Las iniciales corresponden al sitio de muestreo: C: Chascomús, S:
San Jorge, Li: La Limpia, La: Lacombe, K: Kakel Huincul, T: El Triunfo. Los números corresponden a la fecha de muestreo (2008-2009): 1: Marzo, 2: Mayo, 3: Julio, 4: Septiembre, 5: Noviembre, 6: Febrero, 7: Abril

En términos generales, el promedio de OTU por laguna, fue mayor en CH (18 ± 8) que en el resto de los ambientes (SJ: 13 ± 5; LI: 9 ± 5; LAC: 10 ± 2; KH: 13 ± 3; TRI: 13 ± 5) ($p_{\text{ANOVA}} = 0,016$).

El dendrograma obtenido a partir del análisis de *cluster* sugiere que el tipo de ambiente (*i.e.* claros vegetados, turbios con alta biomasa algal y turbio inorgánico) resultó más importante que la estacionalidad en la determinación de la composición de la comunidad bacteriana (**Figura 2.4**). La laguna Lacombe (LAC) fue el único sitio que mostró un claro patrón temporal: la comunidad bacteriana al comienzo del estudio resultó más similar a aquella de las lagunas claras vegetadas (TRI y KH), mientras que hacia el final del período de muestreo la comunidad bacteriana resultó más



Figura 2.4: Análisis de *cluster* del set de datos generados por DGGE basado en el coeficiente de similitud de Jaccard y el método de unión de enlace medio (UPGMA).

La **Figura 2.5** (**a**, **b** y **c**) muestra la ordenación en 3 dimensiones de los sitios en base a la matriz de presencia-ausencia. El test de correlación realizado en base a las variables ambientales vs los *scores* sobre cada uno de los ejes de ordenación del NMDS indicaron una correlación significativa y positiva del eje 1 con la concentración de clorofila-*a* (Cl-*a*) (r = 0,39; p =0,0292; N = 31). El eje 3 correlacionó significativamente con las siguientes variables: concentración de fósforo total (FT) (r = 0,735; p < 0,0001; N = 32), turbidez nefelométrica (Turb) (r = 0,726; p < 0,0001; N = 39), coeficiente de extinción vertical de la luz (Kd) (r = 0,674; p < 0,0001; N = 35), sólidos en suspensión (SS) (r = 0,673; p < 0,0001; N = 38), contenido de materia inorgánica en sólidos en suspensión (r = 0,610; p < 0,0001; N = 38), contenido de materia orgánica (r = 0,606; p < 0,0001; N = 38) y Cl-*a* (r = 0,579; p < 0,0001; N = 39). Finalmente, el eje de ordenación 2 no mostró correlación significativa con ninguna de las variables ambientales consideradas.

En términos generales, la ordenación según los ejes 1 y 2 (**Figura 2.5-a**) segregó a los sitios caracterizados por una baja contribución de la biomasa fitoplanctónica (*scores* hacia la izquierda) de aquellos donde la contribución fitoplanctónica resulta relevante (*scores* hacia la derecha). La ordenación de acuerdo a los ejes 2 y 3 (**Figura 2.5-b**) se relaciona fundamentalmente con el estado trófico de los sitios (eutróficos hacia la izquierda e hipereutróficos hacia la derecha) y con el tipo de ambiente (claros hacia la izquierda y turbios hacia la derecha); por otro lado, la combinación de los ejes 1 vs 3 (**Figura 2.5-c**) fue la que mejor separó a los sitios de acuerdo al régimen de cada uno (*i.e.* claros vegetados (KH y TRI), turbios con alto aporte de biomasa fitoplanctónica (CH y SJ) y turbio inorgánico (LI)).





Dado que el análisis de similitud entre sitios resultó significativo (ANOSIM R= 0,565, p < 0,0001) la hipótesis de "no diferencia en la composición de la comunidad bacteriana entre sitios" fue rechazada. Los resultados de las comparaciones de a pares se muestran en la **Tabla 2.1**, Los valores p de cada prueba, corregidos por al aproximación de Bonferroni, indican que las diferencias del sitio LI por un lado, el grupo CH-SJ y el grupo LAC-TRI-KH por otro, difieren significativamente entre

	R	Valor p
Test Global	0,565	< 0,0001
CH vs SJ	0,257	0,1305
CH vs LI	0,806	0,0075
CH vs LAC	0,685	0,0195
CH vs KH	0,769	0,0120
CH vs TRI	0,450	0,0195
SJ vs LI	0,661	0,0075
SJ vs LAC	0,534	0,0135
SJ vs KH	0,710	0,0030
SJ vs TRI	0,391	0,0135
LI vs LAC	0,409	0,0210
LI vs KH	0,800	0,0075
LI vs TRI	0,789	0,0030
LAC vs KH	0,589	0,0075
LAC vs TRI	0,347	0,1380
KH vs TRI	0,196	0,7155

sí, permitiendo separar 3 grandes grupos caracterizados por comunidades bacterianas diferentes.

 Tabla 2.1: Análisis de similitud (ANOSIM) con las comparaciones de todos los sitios entre sí. Un valor *R* de 0 refleja la hipótesis nula de "no diferencias entre sitios" mientras que un valor *R* de 1 corresponde a la hipótesis alternativa en la cual las similitudes dentro de un sitio son mayores que las similitudes entre sitios. Las celdas en gris indican las comparaciones no significativas.

PERFILES DE ARISA

Como se mencionara en el Capítulo I, no se logró la amplificación del ADN extraído de las muestras de la laguna La Limpia con el protocolo utilizado para esta técnica. En consecuencia, este sitio no pudo ser analizado por ARISA.

En total se registraron 452 fragmentos diferentes a partir de los perfiles obtenidos para los 5 sitios restantes (CH, SJ, LAC, KH y TRI). La **Figura 2.6** muestra un perfil representativo de cada sitio obtenido por ARISA mientras que en la **Figura 2.7** se observa la distribución de frecuencias de tamaño de los fragmentos en cada sitio de muestreo.



Figura 2.6: Ejemplos de los perfiles de ARISA obtenidos en cada sitio. El eje *x* indica el tamaño (en pares de bases) de los fragmentos y el eje *y* indica la intensidad de la señal (en unidades de fluorescencia (UF)).



Figura 2.7: Distribución de frecuencias relativas de todos los fragmentos que caracterizaron a cada sitio.

El promedio del número de fragmentos (OTU) detectados en las distintas lagunas fue de 38 (± 26) en CH, 38 (± 17) en TRI, 39 (± 37) en SJ, 42 (± 27) en LAC y 46 (± 8) en KH. El número de OTU detectadas, así como la distribución de frecuencias de tamaños en cada sitio, no evidenciaron diferencias significativas ($p_{\text{ANOVA (OTU)}} = 0,810$; $p_{\text{Kruskall-Wallis}}$ _{Tamaños}= 0,221).

El análisis de *cluster* mostró un patrón más complejo que aquel obtenido a partir del análisis de DGGE (**Figura 2.8**). Sin embargo, existe un patrón general en común entre ambos análisis: con algunas excepciones, los ambientes claros-vegetados (TRI y KH) se agruparon separadamente de aquellos turbios con abundante biomasa fitoplanctónica (CH y SJ). Además, la composición bacteriana en la laguna Lacombe (LAC) mostró el mismo patrón estacional: primeramente similar a aquella de los ambientes claros para luego volverse más cercana a aquella de los ambientes turbios.

En relación al subcluster "turbio", la estacionalidad resultó evidente en las muestras de CH: las muestras de otoño (CH₁; CH₂; CH₇) fueron menos similares a aquellas de primavera (CH₄; CH₅) y verano (CH₆). En oposición, SJ no mostró un claro patrón estacional.



Figura 2.8: Análisis de *cluster* del set de datos generados por ARISA basado en el coeficiente de similitud de Jaccard y el método de unión de enlace medio (UPGMA).

La ordenación por NMDS de los sitios de acuerdo a sus perfiles genéticos se muestra en la **Figura 2.9**

En este caso, el test de correlación realizado en base a las variables ambientales vs los *scores* sobre cada uno de los ejes de ordenación indicaron una correlación levemente significativa y negativa del eje 1 con el coeficiente de extinción vertical de la luz (Kd) (r = -0,41; p = 0,0486; N = 24). El eje 2 correlacionó significativamente con el contenido de materia inorgánica en sólidos en suspensión (r = 0,457; p = 0,0167; N = 27), sólidos en suspensión (SS) (r = 0,424; p = 0,0275; N = 27) y turbidez nefelométrica (Turb) (r = 0,374; p = 0,0495; N = 28). Finalmente, el eje de ordenación 3 correlacionó con las siguientes variables: Cl-a (r = 0,738; p <0,0001; N =20), turbidez nefelométrica (Turb) (r = 0,731; p < 0,0001; N =
28), coeficiente de extinción vertical de la luz (Kd) (r = 0,659; p < 0,0001; N = 24), contenido de materia orgánica en sólidos en suspensión (r = 0,639; p = 0,0003; N = 27), sólidos en suspensión (SS) (r = 0,623; p < 0,0001; N = 27), fósforo total (FT) (r = 0,528; p = 0,0005; N = 26) y contenido de materia inorgánica en sólidos en suspensión (r = 0,485; p = 0,0105; N = 38).



Figura 2.9: Biplots de la ordenación por NMDS basada en los datos cualitativos generados por ARISA. Cada uno de los símbolos representa los sitios a partir de los cuales se obtuvieron los perfiles genéticos. a: dimensión 1 vs 2; b: dimensión 3 vs 2; c: dimensión 1 vs 3.Stress = 0,16. Las flechas indican el sentido de correlación de las variables ambientales

La ordenación de los sitios de acuerdo a los ejes 2 vs 3 resultó la que mejor segregó a los sitios entre sí y permitió distinguir tres grupos diferentes basados en la composición de sus comunidades (**Figura 2.9-b**). Los ejes 1 y 3 (**Figura 2.9-c**) claramente separaron a los sistemas "turbios" de los "claros" mientras que no se obtuvo un patrón claro de la ordenación obtenida en base a los ejes 1 y 2 (**Figura 2.9-a**).

El test de similitud (ANOSIM) realizado en base a todo el set de datos evidenció diferencias significativas entre los sitios (R= 0,4304; p < 0,0001). La comparación de a pares (**Tabla 2.2**) evidenció la existencia de 3 grupos diferentes en relación a la composición bacteriana: la comunidad bacteriana tipo *Chascomús*; la comunidad bacteriana tipo *San Jorge* y la comunidad bacteriana tipo *El Triunfo-Lacombe*. La similitud entre muestras de la comunidad bacteriana que caracterizó a Kakel Huincul (similitud dentro de grupo) no difirió significativamente de las similitudes entre sitios (entre grupos), en otras palabras, la composición bacteriana en KH no mostró un patrón exclusivo que permitiera separarla del resto de los sitios.

	R	Valor p
Global Test	0,430	< 0,0001
CH vs SJ	0,470	0,0280
CH vs LAC	0,546	0,0189
CH vs KH	0,631	0,0640
CH vs TRI	0,851	0,0251
SJ vs LAC	0,542	0,0123
SJ vs KH	0,248	0,2390
SJ vs TRI	0,580	0,0165
LAC vs KH	0,237	0,4650
LAC vs TRI	0,155	1,0000
KH vs TRI	0,521	0,0460

Tabla 2.2: Análisis de similitud (ANOSIM) con las comparaciones de todos los sitios entre sí. Un valor *R* de 0 refleja la hipótesis nula de "no diferencias entre sitios" mientras que un valor *R* de 1 corresponde a la hipótesis alternativa en la cual las similitudes dentro de un sitio son mayores que las similitudes entre sitios. Las celdas en gris indican las comparaciones no significativas.

Los resultados de los tests parciales de Mantel realizados con el fin de evaluar la importancia de los factores ambientales y de la distribución geográfica de los sitios en la determinación del patrón de composición de la comunidad bacteriana en los sistemas lagunares pampeanos analizados se muestran en la Tabla 2.3. Los nombres de las matrices que figuran entre paréntesis corresponden a las matrices que fueron comparadas mientras que la tercera matriz, ubicada fuera del paréntesis corresponde al factor cuyo efecto fue removido. Por ejemplo, los resultados presentados en la forma Amb.)*Dist. Geogr" "(Sim. Gen.*Sim. deben interpretarse como correlación entre la matriz de similitud genética y la de similitud ambiental, luego de remover los efectos de la distancia geográfica.

Comparación	Al	RISA	DGGE		
	<i>r</i> _s	Valor p	r _s	Valor p	
(Sim. Gen.*Sim. Amb.)*Dist. Geogr.	0,338	< 0,0001	0,109	= 0,002	
(Sim. Gen.*Dist. Geogr.)*Sim. Amb.	-0,069	= 0,177	-0,194	< 0,0001	

Tabla 2.3: Coeficientes de correlación obtenidos para los tests parciales deMantel realizados entre las matrices de similitud genética (Sim. Gen.), similitudambiental (Sim. Amb.) y distancia geográfica (Dist. Geogr.). Un valor p < 0,050 indicaque la correlación es estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye la primera caracterización del patrón de composición de la comunidad bacteriana para los sistemas lacustres de la Región Pampeana.

Los resultados generales obtenidos a partir de las dos técnicas moleculares aplicadas indican que la tendencia general de la variación del patrón de composición entre los distintos sistemas se encuentra significativamente influenciada por las condiciones ambientales locales, independientemente de la resolución taxonómica utilizada. Más precisamente, se observó una estrecha relación entre el patrón de composición bacteriano y el estado de equilibrio alternativo de los sistemas, mientras que no se evidenció un efecto significativo de la estacionalidad en la determinación de dicho patrón. Este patrón general resultó evidente tanto a nivel de análisis del 16S rARN como del ITS.

Diversos trabajos realizados en comunidades bacterianas han puesto de manifiesto que la estructura de estas comunidades se encuentra influenciada localmente por factores ambientales tales como el tipo de hábitat (*e.g.* Dolan 2005), factores abióticos (*e.g.* Dumestre *et al.* 2002; Kisand y Nõges 2004; Lindström *et al.* 2005), la productividad del ecosistema, las interacciones biológicas (*e.g.* Jurgens y Matz 2002; Van der Gught *et al.* 2005) y la actividad humana (*e.g.* MacCaig *et al.*1999; Buckley y Schmidt 2001), entre otros. Estos resultados apoyan parte de la hipótesis propuesta por Baas-Becking (1934) quien postuló un rol fundamental de los factores ambientales locales como responsables de la variación espacial observada en los patrones de diversidad microbianos ("...*but environment selects"*).

En relación a los sistemas lagunares estudiados en este trabajo, Allende y colaboradores (2009) analizaron las distintas fracciones de tamaño del fitoplancton (picofitoplancton, nanofitoplancton y

64

microfitoplancton) en 10 lagunas de la región que incluyen a los sistemas aquí analizados. Estos autores concluyeron que los tres tipos de sistemas turbios-orgánicos y turbios-inorgánicos) difieren (claros-vegetados, marcadamente en sus características ópticas, sus concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD) y que las diferencias ambientales afectan directamente a la estructura de la comunidad fitoplanctónica en los distintos tipos de sistemas. Teniendo en cuenta que la fuente de carbono dominante en un sistema (i.e exudados fitoplanctónicas, aporte de macrófitas acuáticas, escorrentía desde la cuenca) tiene una gran influencia sobre el bacterioplancton (Van der Gucht et al. 2001; Muylaert et al. 2002; Kisand y Nõges 2004), las diferencias entre las lagunas en lo que respecta a este recurso podrían ser una de las causas más importantes que estaría influenciando la determinación de la estructura de la comunidad bacteriana en cada sistema. Sin embargo, esta conclusión resulta preliminar y constituye, en realidad, una hipótesis que debe ser testeada en el futuro, por ejemplo, mediante la realización de experimentos con transplantes cruzados.

Otro factor, quizás menos evidente, que afectaría la estructura de la comunidad en estas lagunas parecería ser la profundidad de la columna de agua. Durante el período de estudio la región atravesó un período de sequía que se reflejó en una marcada disminución del volumen de agua en los sistemas. Dada la relación directa que existe entre la profundidad de la columna de agua y la resuspensión, uno de los efectos de esta disminución del volumen fue el aumento generalizado de la turbidez de los sistemas. Concomitantemente con estos cambios ambientales, se observaron cambios en la composición que fueron reflejados por ambas técnicas. El cambio más evidente fue observado en la laguna Lacombe, sin embargo, los sistemas claros vegetados también mostraron cierta variación temporal en la estructura de la comunidad que, en términos generales, se manifestaron en

patrones de composición más similares a los observados en los sistemas turbios hacia el final del período de estudio.

En relación a los dos niveles de resolución genética utilizadas en este trabajo, Frederick Cohan (2002) sugirió que el criterio de definición de especie bacteriana basado en la comparación de secuencias del 16S rARN se correspondería con el nivel de "género" para macroorganismos, mientras que los ecotipos dentro las especies bacterianas conformarían el nivel taxonómico que presenta todas las propiedades dinámicas típicas definidas para las especies eucariotas. Sin entrar en discusión sobre la definición del concepto de especie bacteriana, resulta evidente que la definición de las distintas unidades operativas (OTU) en base al gen 16S rARN resulta más abarcativa que la definición basada en el ITS. Estas diferencias se reflejaron en los resultados obtenidos en este trabajo y, en concordancia con los resultados obtenidos por Cho y Tiedje (2000) y Casamayor y colaboradores (2002), el patrón obtenido con la técnica de mayor resolución (i.e. ARISA) permitió detectar sutiles diferencias en la estructura de la comunidad entre las distintas lagunas que no fueron reflejadas a un nivel de resolución más amplio (*i.e.* DGGE).

Estas diferencias de resolución también influyeron sobre la determinación del efecto de la distribución geográfica de los sistemas en la definición del patrón de composición observado. La correlación obtenida entre la matriz de similitud genética obtenida por DGGE y la matriz de distancia geográfica pone de manifiesto la distribución no- aleatoria de los sitemas (*i.e.* los ambientes se encuentran ordenados casi en forma lineal, con una distribución N- S donde los ambientes turbios se ubican hacia el extremo norte y los claros hacia el extremo sur). En otras palabras, el efecto espacial detectado a nivel de DGGE no podría ser interpretado como una señal biogeográfica que indique cierto grado de limitación en la dispersión

de estos organismos. Esta observación se refuerza con los resultados obtenidos por ARISA en donde la mayor resolución de la técnica evidenció una contribución más marcada de las condiciones ambientales locales en la determinación del patrón de composición que aquella observada en el patrón de DGGE, mientras que la correlación con los factores regionales (dispersión) resultó no significativa, reflejando un efecto de homogeneización de la composición a nivel regional.

De lo expuesto hasta aquí se concluye que la Teoría de Metacomunidades, desarrollada para explicar los patrones de distribución de macroorganismos, resulta una herramienta útil para explicar el patrón de composición de la comunidad bacteriana de las lagunas de la Región Pampeana. Los resultados indican que la perspectiva de *Species Sorting* resultaría el mejor modelo para explicar la estructura comunitaria observada. De acuerdo a este paradigma, el patrón observado surgiría de la interacción entre las altas tasas de dispersión características de estos micoorganismos y una alta eficiencia en la respuesta comunitaria frente a cambios ambientales, como consecuencia de las altas tasas de crecimiento poblacional. Variación anual de la riqueza y la diversidad del bacterioplancton en dos lagunas que presentan estados de equilibrio contrastantes (clara con desarrollo de macróficas sumergidas y turbia con elevada biomasa fitoplanctónica)

Capítulo III

INTRODUCCIÓN

La gran variedad de organismos planctónicos que coexisten en los ambientes acuáticos ha motivado el desarrollo de diversas teorías cuyo fin ha sido comprender e interpretar la organización y el sostenimiento de la diversidad de las distintas comunidades que conforman estos ecosistemas (e.g. Hardin 1960; Hutchinson 1961; Connell 1978; Padisák et al. 1993). Entender los factores que controlan esta diversidad constituye una tarea complicada debido al amplio espectro de procesos e interacciones que afectan la coexistencia de las distintas especies dentro de las comunidades. Ecológicamente, estos factores de control pueden separarse en factores extrínsecos (regionales) o intrínsecos (sitio-específicos). Los factores extrínsecos corresponden a aquellas variables que fluctúan de manera externa al sistema acuático y que incluyen a los factores climáticos (i.e. temperatura, régimen pluvial), procesos de polución (i.e. vertido de nutrientes o sustancias tóxicas), cambios en las prácticas agrícolas de la cuenca o la fragmentación de hábitat. Por otro lado, los factores intrínsecos corresponden a las distintas interacciones bióticas (e.g. herbivoría, competencia, predación) y a las variaciones estocásticas que regulan las dinámicas de las distintas poblaciones locales (Scheffer et al. 2001; Scheffer y Carpenter 2003; Kent *et al.* 2007).

Los lagos y ríos que conforman el paisaje de una determinada región geográfica comparten características climáticas que, de manera directa o indirecta, influencian la diversidad y la actividad de los organismos planctónicos. Las señales de esta influencia regional suelen detectarse a partir del análisis de las series temporales como cambios sincrónicos de las características físicas, químicas e, inclusive, biológicas en los distintos sistemas (Liebhold *et al.* 2004; Crump y Hobbie 2005). Esta sincronicidad suele resultar más evidente en sistemas donde los factores climáticos se

69

distribuyen de manera uniforme sobre las distintas cuencas de drenaje. En oposición, patrones temporales asincrónicos se observan en aquellos sistemas de una misma región donde la variación intrínseca (sitio-específica) se superpone a la variación de los factores climáticos regionales en la determinación de la dinámica temporal local (Kent *et al.* 2007).

En relación a la comunidad bacteriana, existen pocos trabajos que hayan analizado de manera comparada los patrones temporales locales de variación de esta comunidad y la influencia de los factores extrínsecos en la determinación de la estructura comunitaria (*e.g.* Van der Gught *et al.* 2001; Crump y Hobbie 2005; Stepanauskas *et al.*2003; Yannarell *et al.* 2003; Lindström 2006; Kent *et al. op. cit.*). La mayoría de estos trabajos han explorado sistemas con comunidades bacterianas similares y la resolución temporal ha sido mensual o estacional, mientras que sólo dos de ellos (Yannarell *et al. op. cit.*; Kent *et al. op.cit.*) han utilizado una frecuencia de muestreo mayor (entre 5 y 15 días) y han demostrado cambios estacionales concordantes a nivel comunitario entre sistemas de una misma región cuyas comunidades bacterianas resultaron diferentes.

Los ambientes someros constituyen sistemas dinámicos que responden rápidamente ("copian") a las variaciones del ambiente. La escasa profundidad de estos sistemas los vuelve muy dependientes de los cambios que afectan el ciclo hídrico, ya se trate de variaciones de las variables meteorológicas (precipitaciones, humedad, temperatura), como de prácticas agrícolas y obras hidráulicas en la cuenca.

Las lagunas pampeanas no son la excepción y, de acuerdo a los estudios previos realizados en la región (Quirós *et al.* 2002; 2006; Quirós 2005; Sosnovsky y Quirós 2006), la dinámica de estos sistemas está gobernada en gran medida por las condiciones climáticas e hidrológicas.

70

Los resultados obtenidos en el Capítulo II de esta tesis sugieren que, dentro de la región geográfica considerada, existiría un *pool* genético compartido entre las distintas lagunas a partir del cual se seleccionarían los distintos ensambles bacterianos (*sorting*) en función del estado de equilibrio alternativo que caracteriza a los distintos sistemas.

Resulta interesante, entonces, analizar la variación temporal de la estructura de la comunidad bacteriana a lo largo de un período anual en sistemas de la región que presentan estados de equilibrio contrastantes. Específicamente, en este capítulo analizaremos si los cambios en la diversidad de las comunidades bacterianas locales están asociados a los cambios en las condiciones climáticas y si los patrones de variación resultan congruentes entre estos dos sistemas de características limnológicas contrastantes.

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del muestreo

El estudio se llevó a cabo durante un período de 13 meses, desde el mes de marzo de 2008 hasta el mes de abril de 2009, inclusive. Se tomaron muestras en la laguna Chascomús (35° 36'S; 58° 02'O; turbia, con alta densidad fitoplanctónica) y en la laguna El Triunfo (35° 51'S; 57° 52'O; clara, vegetada), con una frecuencia de 15 días entre muestreos. En cada sitio y fecha se obtuvieron muestras subsuperficiales de agua utilizando botellas plásticas de 10 L que, previamente, fueron lavadas con ácido y enjuagadas *in situ* con agua de cada laguna. Una vez tomadas las muestras, las botellas fueron mantenidas dentro de contenedores refrigerados y en oscuridad hasta su procesamiento en el laboratorio, aproximadamente entre 2 a 4 horas luego de su recolección.

Propiedades físico-químicas

Se tuvo acceso a los datos físico-químicos que forman parte de la tesis doctoral de Leonardo Lagomarsino, cuyos datos fueron obtenidos a partir de los mismos muestreos que se realizaron para el desarrollo de esta tesis.

En cada ambiente se realizaron mediciones *in situ* de temperatura del agua (T°), pH (pH-ímetro Orion; ATI Orion, VWR Scientific); conductividad (Cond) (Hach Company) y oxígeno disuelto (OD) (YSI 5000 meter; YSI Incorporated).

En el laboratorio se midió la turbidez nefelométrica (Turb) (2100P Hach Company) y se determinó la alcalinidad (Alc) por titulación de acuerdo al método de Gran (Wetzel & Likens, 2000). Además, se determinó la concentración de los nutrientes principales. La concentración de fósforo total (FT) se evaluó por el Método del Ácido Ascórbico, previa digestión ácida de la muestra; la determinación de nitritos y nitratos (N- (NO_2+NO_3)) se llevó a cabo por el Método de Reducción con Cadmio, mientras que el nitrógeno orgánico (Norg) se determinó por el Método semi-micro Kjeldahl (APHA 1992). Se definió al nitrógeno total (NT) como la suma [Norg + (N-(NO_2+NO_3)].

La concentración de sólidos en suspensión (seston) se obtuvo a partir del filtrado de volúmenes conocidos de agua a través de filtros Whatman GF/C previamente secados y pesados. Estos filtros se dejaron secar en la estufa (103- 105 °C) hasta peso constante (APHA, *op. cit.*). Para estimar el peso seco libre de cenizas los filtros con el material seco retenido fueron calcinados a 530°C por 3 hs. Luego de la calcinación, los filtros fueron pesados nuevamente y por diferencia se estimó el contenido de materia orgánica (MO) y materia inorgánica (MI) en cada muestra (APHA *op. cit.*).

<u>Tratamiento de las muestras biológicas, extracción de ADN y</u> obtención de los perfiles genéticos de la comunidad por el método de <u>DGGE</u>

El tratamiento detallado de las muestras fue descripto en el Capítulo I, en la sección correspondiente a la metodología de DGGE. A modo de facilitar la lectura, en la **Figura 3.1** se presenta un esquema resumen de la metodología utilizada para este trabajo.



Figura 3.1: Esquema metodológico de la obtención de los perfiles genéticos de la comunidad bacteriana utilizando las técnicas de DGGE. Para mayor detalle, remitirse a la sección metodológica del Capítulo I de esta tesis.

Descriptores de la comunidad bacteriana

Las matrices de intensidad relativa y de presencia-ausencia de OTU obtenidas a partir de los perfiles genéticos de ambas lagunas fueron exportadas a planillas de EXCEL para los análisis subsiguientes.

La riqueza de OTU se obtuvo a partir de las matrices cualitativas obtenidas para cada sitio de muestreo. Además, a partir de las matrices de intensidad relativa se estimaron otros dos descriptores de diversidad para cada fecha de muestreo en cada laguna. Por un lado, se estimó el índice de Shannon-Weaver (1949) según la fórmula:

$$H = -\sum_{i=1}^{s} (pi)(\log_2 pi)$$

donde *S* corresponde al número de OTU y p_i corresponde a la contribución relativa de cada banda a la intensidad total de cada calle del gel (*i.e.* intensidad relativa). De acuerdo a Peet (1974), el índice de Shannon-Weaver corresponde al *tipo I* de índices que incluye a aquellos índices que resultan más sensibles a cambios en los taxones menos abundantes que conforman la comunidad.

Por otro lado, se estimó el índice de Simpson (1949) de acuerdo a la fórmula:

$$D = \sum p i^2$$

donde p_i tiene el mismo significado mencionado más arriba. Este índice se incluye dentro del *tipo II*, que corresponde a aquellos índices más sensibles a cambios en los taxones más abundantes (Peet *op.cit.*). Para que la interpretación comparativa entre ambos índices sea más directa, se graficó el índice complementario de Simpson (1-D).

De acuerdo al cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedacia, se realizaron pruebas de t- de Student (paramétrico) o pruebas de Mann-Whitney (no paramétrico) para comparar los distintos descriptores comunitarios entre ambas lagunas.

Para analizar la variación temporal de la estructura de la comunidad bacteriana en ambos sitios de muestreo, se tomaron ambas matrices cuantitativas (*i.e.* de intensidad relativa) y se les aplicó la transformación log_{10} (1+y) donde "y" corresponde al valor de intensidad relativa de cada banda. Esta transformación permite reducir el sesgo que imponen los taxones dominantes en relación a los taxones de menor representación cuando se comparan estructuras comunitarias diferentes (Clarke y Green 1988). A partir de estas matrices cuantitativas transformadas se estimó el coeficiente de similitud de Bray-Curtis (Legendre y Legendre 1998) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S(b)(x1,x2) = \frac{2A}{B+C}$$

donde *A* corresponde a la suma de las intensidades relativas mínimas entre todas las OTU compartidas por el sitio 1 y 2 mientras que *B* y *C* corresponde a la suma de intensidades del total de OTU presentes en el sitio 1 y 2, respectivamente. De esta manera, se obtuvieron 2 matrices de similitud (una por cada laguna) de tamaño 27 x 27. Con cada una de estas matrices se realizó un análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS: non-metric multidimensional scaling) en donde los cambios temporales de los perfiles genéticos obtenidos en cada sitio fueron representados en un espacio de 2 dimensiones. Este análisis se realizó utilizando 30 configuraciones iniciales aleatorias (Clarke y Green *op. cit.*) y el grado de ajuste entre la representación en un espacio de baja dimensión y la matriz original fue determinado utilizando el índice de stress de Kruskal (fórmula 1) (Legendre y Legendre 1998) cuya fórmula se describió en la sección metodológica del Capítulo II de esta tesis.

La ordenación obtenida a partir del NMDS fue utilizada para investigar la relación entre los descriptores comunitarios (*i.e.* riqueza de OTU; índice de diversidad de Shannon-Weaver e índice de similitud de Simpson) y los patrones de composición de la comunidad bacteriana. Para ello se correlacionó cada una de estas variables con los *scores* de los sitios sobre cada uno de los 2 ejes de ordenación utilizando el coeficiente de correlación de Spearman.

Se realizó un ANOVA de un factor (factor "estación del año") para comparar la relación entre unidades taxonómicas operativas (OTU) en los distintos sitios durante las distintas estaciones del año. Además, a partir de las dos matrices de similitud previamente descriptas se calculó la matriz complementaria de distancia (1- Similitud de Bray-Curtis) y para cada sitio de muestreo se estimó el promedio estacional de distancia, el cual fue utilizado para analizar la tasa de cambio biótico estacional en cada caso.

Finalmente, se estimó el índice de correlación de Spearman para analizar el grado de asociación entre las condiciones ambientales locales y los estadísticos de diversidad estimados en cada sitio de muestreo.

RESULTADOS

Parámetros físico-químicos

La **Tabla 3.1** resume los valores máximos, mínimos y medios de las principales variables ambientales medidas en cada sitio.

	Cl	nascomú	IS	El Triunfo				
	Media	Máx.	Mín.	Media	Máx.	Mín.		
Temperatura (°C)	15,9	24,0	6,0	16,1	24,0	5,5		
Oxígeno disuelto (mg l ⁻¹)	9,5	14,4	6,2	8,9	12,8	4,0		
рН	9,1	9,4	9,0	9,1	9,9	8,2		
Conductividad (mS cm ⁻¹)	2,6	3,7	2,3	1,7	2,7	1,4		
Alcalinidad (µEq l ⁻¹)	10116	15647	7926	8785	14339	6215		
Turbidez (NTU)	238	797	58	3,2	9,4	0,8		
Seston (mg l ⁻¹)	224	463	84	4,9	16	0,4		
% MO	41,2	56,1	30,5	92,4	100	70,6		
NT (µg l ⁻¹)	4216	18448	2118	3141	11002	1254		
FT (µg l ⁻¹)	720	1136	296	87	220	6		

Tabla 3.1: Valores medios, máximos y mínimos de los principales parámetrosfísicos y químicos medidos en ambos sitios durante el período de estudio. NT: nitrógenototal; FT: fósforo total; %MO: porcentaje de materia orgánica en seston.

En ambos casos, la temperatura del agua siguió la tendencia estacional, presentando los valores mínimos en invierno y los máximos en verano mientras que el oxígeno disuelto mostró un patrón de variación inverso (i.e. máximos en invierno y mínimos en verano) y se correlacionó negativamente con la temperatura ($r_{(Ch)} = -0.550$, p = 0.008, N = 22; $r_{(Tr)} = -$ 0,646, p = 0,002, N = 20). Los valores de pH, conductividad y alcalinidad registrados resultaron dentro del rango típico para las lagunas de la región. En particular, tanto los valores de conductividad como de alcalinidad resultaron mayores en Chascomús que en El Triunfo y ambos parámetros se correlacionaron significativamente en ambos sitios ($r_{(Ch)} = 0,673$, p < 0,0001, N = 21; $r_{(Tr)} = 0,755$, p < 0,0001, N = 23) . La turbidez nefelométrica y la concentración de seston reflejaron el estado de equilibrio que caracteriza a cada laguna y en cada sitio se correlacionaron significativamente (($r_{(Ch)} = 0.988$, p < 0.0001, N = 23; $r_{(Tr)} = 0.836$, p < 0,0001, N = 24). Estos últimos parámetros descriptos (conductividad, alcalinidad, turbidez y seston) evidenciaron una gran sincronicidad en ambas lagunas (Figura 3.2 a-b y Figura 3.3 a-b) y mostraron un marcado aumento a partir del mes de octubre de 2008. Este aumento se debió al descenso del nivel hidrométrico que se registró en todos los sistemas, consecuencia del período seco que atravesó la región. En relación al contenido de materia orgánica en el seston, los valores obtenidos indican una marcada diferencia en la composición del mismo: en la laguna Chascomús los sólidos en suspensión están compuestos, en términos generales, de partes aproximadamente iguales de materia orgánica y materia inorgánica, mientras que en la laguna El Triunfo, casi la totalidad del material en suspensión corresponde a materia orgánica (Tabla 3.1). Finalmente, las concentraciones de fósforo y nitrógeno resultaron dentro del rango característico de sistemas eutróficos e hipereutróficos y, en ambos sitios, se observó una tendencia creciente del contenido de nutrientes a partir de comienzos de octubre de 2008.



Figura 3.2: Variación temporal de (a) la conductividad y (b) la alcalinidad en ambos sitios de muestreo.

Capítulo III



Figura 3.3: Variación temporal de (a) la concentración de seston y (b) la turbidez nefelométrica en ambos sitios de muestreo.

Bacterioplancton

La **Figura 3.4** corresponde a los perfiles genéticos obtenidos para cada sitio de muestreo y en cada fecha.



Chascomús





Figura 3.4: Perfiles obtenidos por le técnica de DGGE en donde los fragmentos de ~ 600 bp del gen 16S rARN fueron separados en un gradiente de 40% a 80% de desnaturalización.

En la laguna Chascomús se detectaron un total de 734 bandas en 65 posiciones diferentes, mientras que en la laguna El triunfo, el número total de bandas detectadas fue de 405, distribuidas en 52 posiciones diferentes.

El escalamiento multidimensional no métrico realizado en base a la matriz de intensidad relativa transformada obtenida a partir de los perfiles genéticos de cada laguna, muestra los cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en ambos sitios a lo largo del período de muestreo. Sobre los ejes se indican las variables bióticas que correlacionaron significativamente con los ejes de ordenación. Las flechas rojas indican el sentido de aumento de dichas variables. (**Figura 3.5**).

La ordenación de las fechas de muestreo en cada sitio indica cambios graduales en la estructura de la composición del bacterioplancton a lo largo de todo el período de estudio. Para la laguna Chascomús, estos cambios de estructura resultaron más pronunciados a mediados de las distintas estaciones (CH 4-5: entre 19 de mayo y 2 de julio de 2008; CH 8-9: entre 15 y 30 de julio de 2008; CH 14-15: entre 6 y 20 de octubre de 2008 y CH 21-22: entre 21 de enero y 3 de febrero de 2009). Por otro lado, en la laguna El Triunfo los cambios más marcados ocurrieron entre la primera y segunda fecha de muestreo (entre el 27 de marzo y 21 de abril de 2008); a mediados de la primavera (TRI 14-15: entre 6 y 20 de octubre de 2008) y hacia el final de la primavera (TRI 17-18: entre 24 de noviembre y 9 de diciembre de 2008).



Figura 3.5: Escalamiento multidimensional que representa el cambio en la estructura de la comunidad en ambas lagunas durante el período de estudio. Las líneas de punto unen fechas consecutivas de muestreo. Las flechas circulares indican la tendencia general del cambio estacional. Stress de Kruskal (1): Chascomús: 0,18; El Triunfo: =0,19

Las correlaciones observadas entre los ejes de ordenación y los estadísticos biológicos indican que los cambios temporales en la estructura de la comunidad de la laguna Chascomús se caracterizaron por un aumento en la riqueza de OTU ($r_{\text{Riqueza OTU-Dim 1}} = 0,420$, p = 0,033, N = 26; $r_{\text{Riqueza OTU-Dim 2}} = -0,510$, p = 0,008, N = 26), y una variación de dominancia general que se reflejó tanto en aquellos filotipos de mayor contribución relativa (*i.e.* filotipos "dominantes") ($r_{\text{fndice D-Dim 2}} = 0,484$, p = 0,012, N = 26) como en aquellos de poca contribución relativa al total de la señal del perfil genético (*i.e.* filotipos "menos abundantes") ($r_{\text{fndice H-Dim 2}} = -0,490$, p = 0,011, N = 26). Para el caso de la laguna El Triunfo, la tendencia temporal también se caracterizó por la variación de la riqueza de OTU ($r_{\text{Riqueza OTU-Dim 1}} = -0,396$, p = 0,041, N = 27) pero los cambios en la estructura de la comunidad resultaron mejor explicados por cambios en la dominancia de los filotipos de menor contribución a la señal total ($r_{\text{indice H-Dim 2}} = -0,386$, p = 0,047, N = 27).

El análisis estacional de la variación de riqueza de OTU indicó diferencias significativas entre las distintas estaciones del año sólo en la laguna Chascomús (p = 0,012) y en este sitio la riqueza resultó mayor durante la primavera (33 ± 2 OTU) (**Figura 3.6**).

El grado de reemplazo de OTU (*i.e.* cambio biótico estacional) se indica en la **Figura 3.6** como la variación del índice de distancia de Bray-Curtis. Los resultados obtenidos indican que la laguna El Triunfo mostró una mayor variabilidad estacional en la composición del bacterioplancton mientras que la composición de esta comunidad en la laguna Chascomús tendió a estabilizarse hacia el final del período de muestreo.









Figura 3.6: Riqueza de OTU y distancia promedio de Bray-Curtis estimados a partir de la matriz de intensidad relativa de bandas obtenida a partir del perfil genético de cada laguna. Los asteriscos indican diferencias significativas en la riqueza de OTU.

La **Tabla 3.2** resume los valores de los distintos índices de diversidad calculados para cada sitio de muestreo mientras que la **Figura 3.7** (**a**, **b** y **c**) muestra la variación comparada de los mismos durante todo el período de estudio.

	Riqueza de OTU				Índice de diversidad de Simpson (D)				Índice de diversidad de Shannon- Weaver (H)			
	Media	Máx.	Mín.	CV (%)	Media	Máx.	Mín.	CV (%)	Media	Máx.	Mín.	CV (%)
Chascomús El Triunfo	28 15	36 25	16 5	19,0 35,0	0,04 0,09	0,06 0,21	0,03 0,05	22,2 43,5	4,71 3,71	5,08 4,55	3,98 2,29	6,4 15,1

Tabla 3.2: Valores medios, máximos, mínimos y coeficiente de variación (CV) de los distintos índices de diversidad estimados para cada sitio de muestreo

En términos generales, tanto la riqueza de OTU como ambos índices de diversidad variaron durante todo el período de estudio y los valores estimados indicaron que, en promedio, estos parámetros bióticos resultaron significativamente mayores en la laguna Chascomús que en la laguna El Triunfo (p < 0,001 para las tres comparaciones) (**Figura 3.7 a, b** y c). Las fluctuaciones de estos estadísticos resultaron más marcadas en la laguna El Triunfo que en la laguna Chascomús y, en ambos sitios, la mayor variación se observó en el índice de Simpson (D), el cual es más sensible a cambios en los taxones más abundantes (**Tabla 3.2**).



Figura 3.7: Comparación de la variación temporal de (**a**) riqueza de OTU, (**b**) índice complementario de Simpson (1-D) y (**c**) índice de Shannon- Weaver (H)

La **Tabla 3.3** muestra las correlaciones entre los parámetros biológicos y ambientales en cada sitio de muestreo.

Al analizar la relación entre los descriptores biológicos de la diversidad bacteriana y los factores ambientales locales se obtuvieron resultados contrastantes entre ambos sitio de muestreo.

En el caso de la laguna Chascomús, los resultados indican una marcada asociación de las condiciones ambientales locales con la riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana. En particular, los factores relacionados con la productividad del sistema y la variabilidad del recurso (NT, PT, %MO) así como los factores relacionados con la estacionalidad (T°) y la transparencia de la columna de agua (seston, turbidez) resultaron significativos en la determinación de la estructura de la comunidad bacteriana.

Por el contrario, en la laguna El Triunfo, ninguno de los parámetros ambientales considerados mostró una relación significativa con los descriptores biológicos de esta comunidad.

					Cha	ascomús						
Parámetro	Н	D	Turb	OD	Temp	Cond	рН	NT	FT	Seston	%MO	Alc
Riqueza OTU	0,989	-0,977	0,650	-0,270	0,437	0,339	-0,060	0,489	0,680	0,666	-0,442	0,560
	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,208	0,041	0,112	0,785	0,013	< 0,001	< 0,001	0,027	< 0,001
	26	26	22	23	22	23	23	25	25	25	25	21
н		-0,992	0,642	-0,226	0,393	0,263	-0,053	0,435	0,639	0,624	-0,428	0,512
		< 0,001	< 0,001	0,295	0,070	0,222	0,806	0,030	< 0,001	< 0,001	0,033	0,018
		26	22	23	22	23	23	25	25	25	25	21
D			-0,635	0,200	-0,361	-0,276	0,082	-0,405	-0,652	-0,617	0,427	-0,483
			< 0,001	0,357	0,097	0,200	0,706	0,045	< 0,001	< 0,001	0,033	0,026
			22	23	22	23	23	25	25	25	25	21
					EI	Triunfo						
Parámetro	Н	D	Turb	OD	Temp	Cond	рН	NT	FT	Seston	%MO	Alc
Riqueza OTU	0,996	-0,988	0,096	0,317	-0,037	-0,025	0,077	0,144	-0,257	0,072	0,118	-0,142
	< 0,001	< 0,001	0,650	0,121	0,868	0,902	0,711	0,479	0,193	0,720	0,553	0,493
	27	27	24	25	21	25	25	26	27	27	27	25
н		-0,993	0,060	0,343	-0,058	-0,053	0,057	0,115	-0,256	0,054	0,132	-0,135
		< 0,001	0,777	0,092	0,797	0,798	0,784	0,574	0,194	0,785	0,508	0,515
		27	24	25	21	25	25	26	27	27	27	25
D			-0,007	-0,320	0,090	0,083	-0,013	-0,088	0,297	-0,030	-0,141	0,180
			0,972	0,118	0,690	0,689	0,949	0,664	0,130	0,878	0,479	0,385
			24	25	21	25	25	26	27	27	27	25

Tabla 3.3: Correlaciones entre los estadísticos descriptores de la comunidad bacteriana y los parámetros físico- químicos de cada sitio de muestreo. Para cada par de variables se muestra el coeficiente de correlación de Spearman, el valor p y el N para cada comparación. H: índice de Shannon-Weaver; D: índice de Simpson; Turb: turbidez; OD: oxígeno disuelto; Temp: temperatura; Cond: conductividad; NT: nitrógeno total;

FT: fósforo total; %MO: porcentaje de materia orgánica en seston; Alc: alcalinidad

DISCUSIÓN

Consideraciones metodológicas

Para este análisis se han utilizado tanto los datos de presenciaausencia de OTU como la intensidad de bandas de DGGE para analizar la variación de la estructura de la comunidad bacteriana en dos sistemas que presentan estados de equilibrio contrastantes. De acuerdo a lo analizado y discutido en el Capítulo I de esta tesis, la aplicación de la técnica de PCR en muestras heterogéneas puede modificar la proporción del producto respecto a su proporción en la muestra original (Suzuki y Giovannoni 1996), comprometiendo de esta manera las interpretaciones cuantitativas. Sin embargo, numerosos trabajos han demostrado que los cambios en la intensidad relativa de las bandas se correlacionan con cambios en la abundancia relativa de las respectivas poblaciones dentro de una comunidad (Nübel et al. 1999; Riemann et al. 1999; Casamayor et al. 2000; 2002). En consecuencia, a los fines comparativos y dada la alta reproducibilidad de esta técnica (Schauer et al. 2003; Díez et al. 2001), la utilización de los datos de intensidad relativa de bandas resulta una aproximación adecuada para analizar los cambios relativos de abundancia de las distintas poblaciones que conforman la comunidad bacteriana en cada uno de los sistemas considerados.

Variación temporal de las características ambientales

El análisis de las variables ambientales reflejó el estado de equilibrio alternativo que caracteriza a cada una de las dos lagunas analizadas y coinciden con las descripciones previas realizadas en estos sistemas (Quirós *et al.* 2002; Torremorell *et al.* 2007; Allende *et al.* 2009; Silvoso *et al.* 2010). Durante el ciclo anual considerado, la región atravesó por un período de sequía que se tradujo en un descenso generalizado del nivel hidrométrico en las lagunas de la región. Este descenso volumétrico causó un efecto de concentración de nutrientes así como también un aumento de la resuspensión de material desde el sedimento que se reflejó en un aumento de la turbidez. Estas observaciones concuerdan con las previamente realizadas por Quirós y colaboradores (2002) quienes señalaron que las condiciones extremas de sequedad o los períodos de lluvias intensas que caracterizan a la región generan procesos de concentración-dilución de sus componentes que conllevan cambios en la estructura v el funcionamiento de los sistemas pampeanos. Independientemente de los valores absolutos de las variables físicoquímicas medidas en cada laguna, ambos sistemas mostraron un alto grado de coherencia temporal en la respuesta a los cambios ambientales. Estos cambios sincrónicos observados evidencian la influencia a nivel regional que ejercen los factores ambientales sobre las variables físicas y químicas de estas lagunas (Quirós et al. op. cit.; 2006; Quirós 2005; Sosnovsky y Quirós 2006).

Comunidad bacteriana

El análisis de los perfiles genéticos (Figura 3.4) así como la visualización de los cambios en la estructura comunitaria a través del escalamiento multidimensional (Figura 3.5) no evidenciaron cambios abruptos en la estructura de la comunidad bacteriana entre las sucesivas fechas de muestreo en cada uno de los sistemas analizados. En términos generales, ambas series temporales mostraron un patrón general de cambio estacional que resultó más marcado en la laguna El Triunfo (clara vegetada) que en la laguna Chascomús (turbia). Estos patrones coinciden con los resultados obtenidos por Van der Gucht y colaboradores (2001) quienes compararon la composición y la dinámica estacional del bacterioplancton en un lago turbio (Blankaart) y un lago claro vegetado (Visvijver) en Bélgica. Estos autores observaron que, mientras que en el

lago turbio los cambios resultaron graduales, el lago claro mostró un patrón de cambio más pronunciado que resultó más marcado hacia el final de la primavera e inicio del verano. En este trabajo, los autores sugirieron que las altas tasas de cambio observadas en el lago claro estarían asociadas a la muerte masiva de las macrófitas sumergidas que ocurrió durante el verano y que produjo un marcado descenso del nivel de oxígeno, mortandad masiva de los peces y condiciones momentáneas de "aguas turbias". Esta dinámica no se observó en la laguna El Triunfo. Sin embargo, los datos aquí presentados resultan una evidencia más de que las diferencias ecológicas entre las lagunas pueden influenciar de manera pronunciada la composición de la comunidad bacteriana (Horner-Devine et al. 2004). Dado que la presencia de vegetación acuática en sistemas someros influencia de manera directa la dinámica de nutrientes, la producción secundaria fitoplanctónica y la producción primaria (flagelados heterotróficos y zooplancton) (Scheffer et al. 1993), se plantea la hipótesis de que la presencia de macrófitas constituiría un factor determinante de la estructura de la comunidad bacteriana en sistemas claros poco profundos.

Además, a pesar de la sincronicidad observada en la variación de los parámetros físico-químicos de la laguna Chascomús y El Triunfo, los cambios temporales de la estructura comunitaria no resultaron concordantes entre los dos sistemas y la relación entre los descriptores comunitarios y los parámetros ambientales mostraron un patrón diferenciado que indicaría distinto grado de conexión entre las variables limnológicas locales de cada laguna con los factores climáticos regionales.

En el caso de la laguna Chascomús el patrón comunitario resultó comparativamente más estable a lo largo del tiempo y las correlaciones observadas entre los estadísticos biológicos y las variables abióticas evidencian la influencia de los factores ambientales que operan a nivel

93

regional en la determinación de la dinámica de la comunidad. Estos resultados son congruentes con los trabajos previos realizados en este cuerpo de agua en donde se observó que existe una estrecha conexión entre la variación estacional de la radiación solar incidente, el contenido de fósforo del material particulado, la concentración de seston y la estructura y funcionamiento del fitoplancton y del zooplancton (Llames *et al.* 2009; Torremorell *et al.*2009; Iachetti 2011; Lagomarsino *et al.* en prensa).

Por el contrario, en la laguna El Triunfo el patrón de variación comunitario resultó más dinámico y no se detectó ninguna relación directa significativa entre los estadísticos biológicos y las variables ambientales consideradas. En este sentido cabe destacar que en el caso de períodos de sequía, la influencia del río Salado sobre las lagunas localizadas sobre su cuenca disminuye y en consecuencia, la influencia de los factores intrínsecos de cada cuerpo de agua sobre la dinámica local resulta más evidente (Renella 2007 en Silvoso *et al.* 2010). De acuerdo con esto, la falta de relación entre los descriptores biológicos y los factores ambientales haría suponer que, al menos durante el período considerado, los factores intrínsecos de este sistema jugarían un rol preponderante en la determinación de la dinámica temporal del bacterioplancton de esta laguna (Kent *et al.* 2007).

Cabe mencionar, además, que en este cuerpo de agua la variación del patrón comunitario resultó más influenciada por cambios en las OTU menos representadas, de acuerdo a las correlaciones observadas entre los descriptores comunitarios y los ejes de ordenación del NMDS. Una posible explicación a esta observación podría relacionarse con el aumento de la turbidez en esta laguna. De acuerdo a los resultados obtenidos y a las observaciones realizadas por Kisand y Nõges (2004), resulta probable que el descenso del nivel hidrométrico haya favorecido la resuspensión de

94

sedimentos desde el fondo con el concomitante transporte de bacterias bénticas dentro de la columna de agua. Este aporte de organismos desde el bentos afectaría la dinámica del bacterioplancton aumentando la proporción de bacterias ticoplanctónicas en la estructura de la comunidad.

Como se mencionara en la introducción, resultan escasos los trabajos que analicen de manera comparada el patrón de variación temporal de la comunidad bacteriana a lo largo de un período anual y, en particular, este trabajo constituye el primer análisis de este tipo para sistemas someros de Sudamérica. El principal aporte de este tipo de análisis es poder discernir la importancia relativa que poseen aquellos factores que ejercen influencia a nivel regional y aquellos inherentes a cada tipo de sistema en la determinación de la estructura comunitaria y su funcionamiento. Este conocimiento resulta imprescindible para poder generar un marco predictivo que permita analizar los posibles efectos de la actividad antrópica sobre este tipo de sistemas y, en particular, sus efectos sobre la comunidad microbiana.

La producción primaria como factor determinante de la riqueza bacteriana en ambientes turbios: Estudio a nivel de mesocosmos
INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista del manejo de ecosistemas y de la conservación, entender los factores que controlan la biodiversidad a nivel local constituye uno de los objetivos centrales de la ecología general. En este sentido, la evidencia empírica sugiere que la producción primaria (i.e. la tasa de captura de energía y fijación de carbono por parte de los productores primarios) ejercería un rol fundamental en la determinación de la biodiversidad, especialmente de la riqueza específica, en plantas y animales (Mittelbach et al. 2001; Evans et al. 2005). La forma de expresión cuadrática o curva unimodal son las relaciones más frecuentemente observadas entre la productividad de los sistemas y su riqueza específica, aunque otras relaciones también resultan posibles (Waide et al. 1999; Mittelbach et al. op.cit.). La comunidad microbiana no parece ser la excepción y diferentes trabajos sugieren que los microorganismos y, en particular, el bacterioplancton, siguen estos patrones ecológicos observados en macroorganismos (Kauzinger y Morin 1998; Bohannan y Lenski 2000; Kassen et al. 2000; Horner-Devine et al. 2003; Prosser et al. 2007).

En el caso de los sistemas acuáticos, existe una estrecha relación entre la radiación incidente y la producción primaria del ecosistema. Esta relación resulta aun más relevante en sistemas someros ricos en nutrientes, en donde la disponibilidad de luz en la columna de agua puede resultar el factor limitante de la productividad del sistema (Scheffer 1998), como ocurre en los sistemas acuáticos pampeanos.

La laguna Chascomús (35° 36'S; 58° 02'O) es, quizás, el cuerpo de agua más extensamente estudiado de la región Pampeana. Este sistema turbio presenta un régimen de mezcla polimíctico y, excepto por algunas zonas litorales vegetadas, carece de macrófitas arraigadas. Los estudios previos realizados en esta laguna indican que la productividad primaria de este sistema está limitada por la disponibilidad de luz y que tanto los patrones de producción anual fitoplanctónica así como los de variación de seston en la columna de agua se encuentran directamente relacionados con la radiación solar incidente (I_0) (Torremorell *et al.* 2007). Estos trabajos han evidenciado, además, que la transparencia del agua (Torremorell *op. cit.*) y el contenido de fósforo por unidad de seston (Lagomarsino *et.al.* en prensa) se relacionan de manera inversa con I_0 . En conjunto, estos resultados indican que la disponibilidad de luz es un factor clave para entender el funcionamiento de aquellos sistemas cuya turbidez tiene un origen biogénico.

En relación al bacterioplancton, los resultados obtenidos en el Capítulo III de esta tesis sugieren que los factores extrínsecos resultarían más importantes en la determinación de la estructura de la comunidad bacteriana en la laguna Chascomús. De acuerdo con esto y dada la fuerte influencia que ejerce la irradiancia incidente en la determinación de la dinámica temporal de este cuerpo de agua, en este capítulo se explora la relación existente entre la producción primaria fitoplanctónica (factor directamente dependiente de la irradiancia) y la riqueza taxonómica bacteriana. En particular, se analiza si este aspecto de la biodiversidad del bacterioplancton responde a los cambios temporales de la productividad primaria del sistema y si el patrón observado coincide con los patrones generales observados para otros organismos. Para ello, se realizó un experimento a nivel de mesocosmos en donde se manipuló la disponibilidad de luz de forma tal de reproducir las condiciones de limitación por luz que caracterizan a esta laguna. En este sistema experimental se aplicaron técnicas moleculares acopladas a técnicas estadísticas de extrapolación para estimar la riqueza de OTU bacterianos y permitir la comparación entre las distintas réplicas de los tratamientos. Además, los resultados obtenidos para la comunidad bacteriana fueron

comparados con los patrones de riqueza algal obtenidos para el mismo sistema.

Capítulo IV

MATERIALES Y MÉTODOS

<u>Diseño experimental</u>

El experimento se llevó a cabo en el predio del Instituto Tecnológico Chascomús, en 12 tanques de 3000 litros de capacidad (2 m de diámetro x 1 m de altura). Los tanques se agruparon de a tres y se ubicaron debajo de una cubierta de filtros de densidad neutra de forma tal de obtener los 4 niveles de tratamiento (100% de irradiancia incidente; 75%; 50% y 25%). La cobertura se ubicó en todos los casos a una altura de 2,2 m (*i.e.* 1,2 m por encima del borde superior del tanque) de forma tal de permitir una ventilación suficiente y evitar calentamiento por "efecto invernadero"

(Figura 4.1).

Los tanques se llenaron con agua sin filtrar proveniente de la laguna Chascomús. Para esto, el agua fue recogida por un camión cisterna de 10 m^3 de capacidad y transportada inmediatamente hacia los tanques. Los tanques se llenaron hacia el final de la primavera (10 de noviembre de 2006) y, una vez llenos, el agua de cada tanque permaneció en mezcla constante por la acción de un sistema de aireación colocado en cada uno de ellos. La intensidad de mezcla resultó lo suficientemente enérgica como para evitar la estratificación pero no tanto como para impedir el hundimiento de aquellas especies algales más pesadas (*i.e.* diatomeas). Además, como consecuencia del cambio de la velocidad de mezcla entre la laguna y el tanque, en el fondo se observó el depósito de una capa fina de sedimentos.



Figura 4.1: Esquema del diseño experimental desarrollado para este trabajo. Los carteles amarillos indican el nivel de tratamiento de irradiancia incidente para cada grupo de tanques.

El período de estabilización a las nuevas condiciones de los mesocosmos fue de una semana y, durante ese tiempo se realizaron mediciones ocasionales de pH, oxígeno disuelto y transparencia. El período de muestreo formal comenzó el 21 de noviembre de 2006 y finalizó el 12 de diciembre de 2006. Para el análisis realizado en este trabajo, se utilizaron los datos de la fecha de muestreo en que la diferencia de

producción primaria entre los tratamientos fue máxima (5 de diciembre de 2006).

Parámetros físico-químicos y producción primaria fitoplanctónica

La radiación solar se monitoreó de manera continua utilizando un radiómetro ubicado sobre el techo del instituto, a unos 50 m de distancia de los tanques. El radiómetro (IL 1700- International Laight) consta de 3 sensores: uno para radiación fotosintéticamente activa (PAR) (400-750 nm); uno para radiación ultravioleta A (UVA) (320- 400 nm) y uno para radiación ultravioleta B (UVB) (295-320 nm). El instrumento se encuentra conectado a una computadora y la adquisición de datos ocurre a una frecuencia de 5 min durante las 24 hs del día. Además, se monitoreó la radiación incidente que alcanzaba la superficie de agua de los tanques utilizando un radiómetro sumergible (Eldonet; Real Time Computers, inc.).

Se obtuvieron los perfiles verticales de irradiancia en la columna de agua (350-750 nm) a partir de un espectro-radiómetro (USB 2000, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) conectado a una sonda de fibra óptica. A partir de estos perfiles, se estimó el coeficiente de atenuación vertical de la luz (kd_{PAR}) para cada tanque. Luego, se estimó la irradiancia media en la columna de agua (I_{media}) según;

$$I_{media} = (I_0 \cdot e^{-kd (PAR) \cdot Z}) / (kd (PAR) \cdot Z)$$

donde I_0 es la irradiancia media incidente durante las horas de luz; *kd* (PAR), es el coeficiente de atenuación vertical de la luz y Z la profundidad de la columna de agua. Estas determinaciones fueron realizadas por personal del Laboratorio de Ecología y Fotobiología Acuática IIB-INTECH (Gonzalo Pérez).

Se monitoreó la temperatura y la estructura térmica de la columna de agua de manera continua utilizando un sistema continuo de adquisición de datos (*i.e. data loggers* Termochrons, OnSolution). Para ello, en cada tanque se colocó un sensor a ~ 10 cm de profundidad. Además, se colocaron dos grupos de 4 sensores equiespaciados desde la superficie al fondo en dos tanques correspondientes a los tratamientos más extremos (*i.e.* 100% y 25% de irradiancia incidente).

Además, se realizaron mediciones *in situ* diarias de temperatura del agua, pH (pH-ímetro Orion; ATI Orion, VWR Scientific); conductividad (Hach Company), turbidez nefelométrica (Turner Design SCUFA), profundidad del disco de Secchi y oxígeno disuelto (YSI 5000 meter; YSI Incorporated).

En el laboratorio se realizaron las determinaciones de seston y de los nutrientes principales (totales y disueltos). La concentración de sólidos en suspensión (seston) se obtuvo a partir del filtrado de volúmenes conocidos de agua a través de filtros Whatman GF/C previamente secados y pesados. Estos filtros se dejaron secar en la estufa (103-105 °C) hasta peso constante y la determinación se realizó por diferencia de pesos entre el filtro conteniendo el material antes y después de ser secado en estufa (APHA, 1992). La determinación de nutrientes se realizó a partir de muestras sin filtrar (nutrientes totales) y filtradas (fracción disuelta). La concentración de fósforo se evaluó por el Método del Ácido Ascórbico, previa digestión ácida de la muestra. La fracción particulada de fósforo se determinó por diferencia entre la concentración de fósforo total y la fracción de fósforo disuelta. La determinación de nitritos y nitratos (N-(NO₂+NO₃) se llevó a cabo por el Método de Reducción con Cadmio, el amonio se determinó por el Método del Fenato, mientras que el nitrógeno orgánico (Norg) se determinó por el Método semi-micro Kjeldahl (APHA 1992). Se definió al nitrógeno total (NT) como la suma [Norg + (N- (NO_2+NO_3)]. Estas determinaciones fueron realizadas por Leonardo Lagomarsino, José Bustingorry y Roberto Escaray en el INTECH.

En relación a la determinación de la producción primaria fitoplanctónica, se tuvo acceso a los datos de las determinaciones *in situ* de producción realizadas por el método de ¹⁴C (Steeman- Nielsen, 1952) en cada una de las réplicas experimentales. Estas determinaciones fueron realizadas por Ana Torremorell en el marco del desarrollo de su tesis doctoral.

Comunidad fitoplanctónica

El análisis de la fracción picofitoplanctónica (0,2-2 µm) se realizó a partir de muestras recolectadas en frascos de PVC de 100 ml las cuales fueron fijadas con glutaraldehído al 2%. Para los recuentos de esta fracción se procedió a la filtración en oscuridad de una dilución 1:4 de las muestras a través de membranas Nucleopore de policarbonato de 0,22 µm de poro de color negro. Para cada réplica experimental se realizó un preparado (i.e. se contó con 3 recuentos por cada tratamiento) los cuales se preservaron en freezer a -20°C. Se utilizó el método de recuento directo utilizando un microscopio Nikon equipado para epifluorescencia bajo un aumento total igual a 1000X. (Kepner y Pratt, 1994). Los recuentos se realizaron utilizando luz verde para Cyanobacteria (BP 546 nm, FT 580 nm, LP 590 nm) y luz azul para picofitoplancton eucariótico (BP 450-490 nm, FT 510 nm, LP 520 nm) (Callieri y Pinolini 1995). En los recuentos de ambas fracciones se aceptó como máximo un error del 20% en la estimación de la abundancia. La estimación final de la misma, expresada en número de individuos ml⁻¹ resulta del promedio de los recuentos de los tres preparados de cada tratamiento.

Las muestras para el análisis cualitativo de la fracción nano- (2- 20 μ m) y microplanctónica (> 20 μ m) de la comunidad fitoplanctónica fueron colectadas utilizando una red de 20 μ m de poro, a fin de concentrar

104

convenientemente el material, y fijadas con formol al 2%. En el laboratorio, las muestras fueron observadas bajo microscopio óptico.

Para la clasificación sistemática del material algal recolectado se adoptó en general el criterio de Bourrelly (1970, 1972, 1981). La determinación taxonómica de las algas se realizó en base a sus características morfológicas. Para la identificación a nivel específico se consultó principalmente la siguiente bibliografía: Komárek y Fott (1983) para las Chlorococcales; Komárek y Anagnostidis (1999), Komárek y Anagnostidis (2005) y Komárek (2003) para Cyanobacteria; Javornicky (2003) para las Cryptophyceae; Vinocur *et al.* (1994) y Tell (1973) para las Bacillariophyceae.

Para el análisis cuantitativo de las fracciones algales nano- y microfitoplanctónicas se recolectó el material en un frasco de PVC de 250 ml el cual se fijó con Lugol acidificado al 1%. Las muestras, previamente diluidas al 2% con agua MQ, fueron colocadas en cámaras de recuento de 10 ml y se dejaron sedimentar por 24 hs previo a su observación bajo microscopio invertido. Para cada réplica de los cuatro tratamientos se contaron dos cámaras. Las abundancias se estimaron mediante el método de microscopio invertido (Utermöhl, 1958), aceptando como máximo un 20% de error en la estimación de la abundancia de las entidades más frecuentes (Venrick, 1978). Para la estimación del error se aplicó la siguiente fórmula:

$$e = \left(s \,/\, \sqrt{n} \right) \cdot t_{(\alpha; n-1)} \,/\, \overline{x}$$

donde *e* es el error porcentual, *s* el desvío estándar, *n* el número de campos, \overline{x} la media muestral y $t_{(\forall;n-1)}$ el valor obtenido a partir de la distribución de Student considerando un alfa de 0,05. Los valores obtenidos para cada réplica, expresados en número de individuos ml⁻¹ (ind. ml⁻¹), resultan del promedio de los valores estimados de densidad a partir de las dos cámaras contadas para cada una.

Bacterioplancton: Extracción de ADN y obtención de los perfiles genéticos por el método de DGGE

En cada réplica experimental se obtuvo una muestra cuyo tratamiento fue idéntico al descripto para las muestras ambientales detallado en el Capítulo I en la sección correspondiente a la metodología de DGGE. A modo de facilitar la lectura, en la **Figura 4.2** se presenta el esquema resumen de la metodología utilizada para este trabajo.



Figura 4.2: Esquema metodológico de la obtención de los perfiles genéticos de la comunidad bacteriana utilizando las técnicas de DGGE. Para mayor detalle, remitirse a la sección metodológica del Capítulo I.

Estimación de la riqueza taxonómica

Para la fracción fitoplanctónica mayor (nano- y microfitoplancton) se determinó la riqueza específica como el número total de especies morfológicas registradas en cada tanque experimental.

En relación al bacterioplancton, la riqueza de OTU fue estimada por extrapolación a partir de los perfiles genéticos cualitativos (presenciaausencia) obtenidos para cada una de las réplicas de los cuatro tratamientos. Para ello, se utilizó la aproximación no paramétrica (Hughes *et al.* 2001; Bohannan y Hughes 2003) aplicando la estimación de Chao (1984) de acuerdo a la fórmula:

$$Chao1 = S_{obs} + (a^2/2b)$$

donde *S*_{obs} corresponde al número de OTU observadas, *a* corresponde al número de OTU observadas una sola vez (*singletons*) y *b* corresponde al número de OTU observadas dos veces (*doubletons*). Los cálculos se realizaron utilizando el programa EstimateS (Colwell 1997).

Análisis multivariados

Para comparar la estructura de la comunidad bacteriana entre los tratamientos, se tomó la matriz de intensidad relativa (*i.e.* matriz cuantitaiva) y se le aplicó la transformación log_{10} (1+y) donde "y" corresponde al valor de intensidad relativa de cada banda. Esta transformación permite reducir el sesgo que imponen los taxones dominantes en relación a los taxones de menor representación cuando se comparan estructuras comunitarias (Clarke y Green 1988) diferentes. A partir de estas matrices cuantitativas transformadas se estimó el coeficiente de similitud de Bray-Curtis (Legendre y Legendre 1998) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S(b)(x1, x2) = \frac{2A}{B+C}$$

donde *A* corresponde a la suma de las intensidades relativas mínimas entre todas las OTU compartidas por las réplicas 1 y 2 mientras que *B* y *C* corresponde a la suma de intensidades del total de OTU presentes en las réplicas 1 y 2, respectivamente. De esta manera, se obtuvo una matriz de similitud de tamaño 12 x12. A partir de esta matriz se calculó el promedio de similitud por tratamiento. Luego de esta transformación, la matriz original fue reducida a una matriz de tamaño 4 x 4 y con ella se realizó un análisis de agrupamiento (*cluster*) basados en dicho promedio y utilizando el método UPGMA (*unweighted pair- group average linkage*) como algoritmo de enlace.

Además, se analizó la correlación entre la composición del micro- y nanofitoplancton con la composición de la comunidad bacteriana entre las distintas réplicas de los tratamientos. Para ello, se construyó una matriz de similitud aplicando el índice de Bray-Curtis a partir de los datos de densidad algal estimados a partir de los recuentos realizados por la técnica de microscopio invertido. Esta matriz de similitud algal se comparó con la matriz de similitud genética obtenida para el bacterioplancton (ambas matrices de tamaño 12 x 12). La comparación de las matrices de similitud se realizó utilizando el test de Mantel basado en el coeficiente de correlación de Spearman (r_s) (Legendre y Legendre, 1998). La prueba realizada fue unilateral, sobre la región superior de la distribución de referencia (H_a : $r_s > 0$). Tanto los análisis de *cluster* como el test de Mantel fueron realizados con el programa XLStat (AddinSoft SARL).

<u>Análisis univariados</u>

Se aplicaron modelos de regresión lineal y cuadrática para examinar la relación entre la riqueza y la productividad en las dos comunidades analizadas (*i.e.* fitoplancton y bacterioplancton). Antes de cada análisis se realizaron tests de Kolmogorov- Smirnov y tests de correlación de Spearman para comprobar el cumplimiento de normalidad y homogeneidad de varianza, respectivamente. Sólo se presentan los datos de aquel modelo que resultó significativo para explicar los patrones observados.

Además, se realizaron ANOVA de un factor para comparar la relación entre las variables físico-químicas y biológicas entre los distintos tratamientos. Finalmente, se estimó el índice de correlación de Spearman para analizar el grado de asociación entre las variables ópticas (*i.e.* profundidad del disco de Secchi, turbidez nefelométrica, concentración de seston y kd).

Dado que en este trabajo sólo se analizaron los datos obtenidos en una única fecha de muestreo, para este análisis se asumió un 10% de probabilidad de cometer error de Tipo I (probabilidad de rechazar la Hipótesis nula cuando ésta es verdadera). En consecuencia, se consideran diferencias significativas si p# 0,10

RESULTADOS

Parámetros físico-químicos

La **Tabla 4.1** resume los valores medios para cada tratamiento de los distintos parámetros físico-químicos correspondientes a la fecha de muestreo que se analiza en este trabajo. La irradiancia media diaria incidente (I_0) en esta fecha fue de 130, 29 W m⁻² mientras que el valor mínimo de irradiancia media (I_{media}) en la columna de agua resultó de 2,61 W m⁻² (tratamiento de 25% de irradiancia incidente) y el máximo de 9,00 W m⁻² (tratamiento de 75% de irradiancia incidente).

Los valores de temperatura, pH, oxígeno disuelto y conductividad medidos en los mesocosmos resultaron dentro del rango observado en la laguna Chascomús (Torremorell *et al.* 2009). La variación de temperatura se correspondió con la variación de la temperatura ambiente, sin embargo, se observaron diferencias entre los distintos tratamientos. Al realizar el promedio diario de temperatura, la temperatura media en la columna de agua del tratamiento de 100% de irradiancia incidente resultó 2,9 °C mayor que la temperatura en el tratamiento de 25%. El pH resultó alcalino y la concentración de oxígeno se mantuvo cerca de los niveles de saturación.

	Tratamiento (% de Irradiancia Incidente)							
Parámetros físico-químicos (media \pm SD)	100	75	50	25				
Profundidad (cm)	86,33 (±1,15)	81,50 (±1,32)	81,67 (±2,89)	81,33 (±1,53)				
Temperatura (°C)	24,00 (±0,00)	22,00(±0,00)	21,00 (±0,00)	19,70(±0,03)				
Oxígeno Disuelto (mg l^{-1})	9,82 (±0,58)	10,40 (±1,43)	10,23 (±0,21)	9,32 (±1,12)				
pH	9,20 (±0,17)	9,06 (±0,13)	8,88 (±0,13)	8,82 (±0,12)				
Profundidad del disco de Secchi (cm)	14,83 (±0,29)	21,83(±0,76)	21,33 (±0,58)	25,67(±2,52)				
Turbidez (NTU)	43,20 (±3,93)	25,20 (±3,17)	29,70 (±1,50)	20,70 (±6,78)				
Conductividad (mS cm ⁻¹)	2,31 (±0,04)	2,16 (±0,14)	2,43 (±0,02)	2,00 (±0,03)				
Fósforo Total ($\mu g l^{-1}$)	452,49 (±49,07)	341,73 (±32,91)	352,41 (±31,46)	296,36 (±48,58)				
Nitrógeno Total ($\mu g \Gamma^1$)	5345,20 (±2569,46)	4914,27 (±754,93)	5497,54 (±878,04)	5533,84(±2461,41)				
kd_{PAR} (m ⁻¹)	11,25 (±2,10)	9,09 (±0,64)	9,12 (±0,22)	7,81 (±2,65)				
I_{media} (W m ⁻²)	7,44 (±0,25)	8,11 (±0,20)	5,66 (±0,26)	3,33 (±0,63)				
$I_0 ~({\rm W m}^{-2})$	130,29							

Tabla 4.1: Valores medios de los principales parámetros físico- químicos medidos para cada tratamiento. SD: desvío estándar; kd:coeficiente de extinción vertical de la luz; I_{media} : irradiancia media en la columna de agua estimada en cada mesocosmos; I_0 irradiancia mediadiaria incidente.

En relación a los nutrientes, tanto la concentración de fósforo como la concentración de nitrógeno total se mantuvieron dentro de los valores típicos de ambientes eutróficos e hipereutróficos registrados para la cuenca del Salado (Izaguirre y Vinocur 1994). En particular, la concentración de nitrógeno total resultó variable y no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p_{ANOVA} = 0,975$). Por el contrario, la concentración de fósforo total mostró diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p_{ANOVA} = 0,010$) y, en promedio, la concentración de este parámetro resultó mayor en el tratamiento de 100% de irradiancia incidente. Además. la fracción particulada de fósforo resultó significativamente mayor en el tratamiento de 100% ($p_{ANOVA} = 0,021$) (Figura 4.3.a) y se correlacionó significativamente con la concentración de seston (Figura 4.3.b). Sin embargo, se observó que el contenido de fósforo por unidad de seston (i.e. fósoforo particulado/ seston) tendió a relacionarse de manera inversa con la radiación incidente en cada tratamiento (Figura **4.4**). Las diferencias resultaron marginalmente significativas y, en promedio, los valores más altos se registraron en los tratamientos de menor incidencia de luz (25-50%) ($p_{ANOVA} = 0,065$).

La concentración de seston y la turbidez nefelométrica correlacionaron significativamente (R^2 = 0,821; p< 0,001; N=12) y resultaron dependientes de la radiación incidente recibida en cada tratamiento. Los mesocosmos más expuestos (100% irradiancia) presentaron la menor transparencia y la mayor concentración de seston (p_{ANOVA} turbidez < 0,001; p_{ANOVA} seston < 0,001) (**Figura 4.5.a** y **b**).

Finalmente, se observaron correlaciones significativas (p < 0,001 en todos los casos) entre el coeficiente de atenuación vertical de la luz (kd_{PAR}), la turbidez nefelométrica (Turb) y la profundidad del disco de Secchi (DS)

(kd_{PAR} vs Turb: R= 0,849; kd_{PAR} vs DS: R= -0,776; Turb vs DS: -0,945; N= 12 para todas las comparaciones.



Figura 4.3: a- Concentración comparada del fósforo particulado de los distintos tratamientos. b- Relación entre la concentración de seston y la concentración de fósforo particulado



Figura 4.4: Comparación del contenido de fósforo por unidad de seston en los distintos tratamientos.



Figura 4.5: Comparación de los valores de a- turbidez nefelométrica y b- concentración de seston

Producción Primaria

La producción primaria fitoplanctónica mostró una fuerte relación directa con la irradiancia incidente y las diferencias entre los tratamientos resultaron significativas (**Figura 4.6**) ($p_{ANOVA} < 0,001$). Los valores de producción primaria diaria por unidad de área variaron entre 5,83 (± 1,58) mg C m⁻² d⁻¹ en el tratamiento de 25% de irradiancia incidente y 39,54 (± 1,58) en el tratamiento de 100%. Al comparar el valor obtenido de irradiancia óptima fotosintética (I_k) en los distintos mesocosmos, en el 84% de los casos (10 datos de un total de 12) la irradiancia media en la columna de agua (I_{media}) resultó menor que I_k (**Figura 4.7**).



Figura 4.6: Producción primaria promedio estimada para cada tratamiento.



Figura 4.7: Relación entre la irradiancia media estimada para la columna de agua de cada réplica (I_{media}) y el valor obtenido de irradiancia óptima fotosintética (I_k) a partir de cada una de las curvas de Producción vs Irradiancia.

Bacterioplancton y Fitoplancton

A partir de los perfiles de DGGE se detectaron un total de 114 OTU distribuidas en 26 posiciones diferentes. El análisis de *cluster* realizado en base a la matriz promedio de similitud de la estructura de la comunidad bacteriana de las distintas réplicas permitió agrupar a los tratamientos en 3 grupos: el grupo correspondiente a los tratamientos de baja irradiancia incidente (*i.e.* 25% y 50%); el tratamiento de irradiancia incidente (*i.e.* 75%) y el de máxima irradiancia incidente (*i.e.* 100%) (**Figura 4.8**).



Figura 4.8: Agrupamiento de las muestras calculado en base a la matriz de distancia promedio obtenida a partir de las distancias estimadas entre todas las réplicas de cada tratamiento.

En relación a la comunidad fitoplanctónica, se observaron patrones diferentes en las distintas fracciones de tamaño. Para la fracción menor (picoeucariotas + picocyanobacteria) no se observaron diferencias significativas en la densidad entre los distintos tratamientos (p_{ANOVA} = 0,489). Por el contrario, las diferencias observadas en la fracción de mayor tamaño de esta comunidad (nanofitoplancton + microfitoplancton) resultaron significativas (p_{ANOVA} < 0,001) y, en promedio, se observó un incremento de la densidad con el aumento de la radiación incidente (**Figura 4.9.a**). Sin embargo, la composición relativa de esta fracción permaneció aproximadamente constante entre los distintos tratamientos (**Figura 4.9.b**).



Figura 4.9: a- Comparación de las densidades de las distintas fracciones de tamaño del fitoplancton en cada uno de los tratamientos. b- Composición relativa del microfitoplancton y del nanofitoplancton en los distintos tratamientos.

El test de Mantel realizado entre las matrices de distancia obtenidas separadamente para la comunidad fitoplanctónica y el bacterioplancton resultó no significativo (p_{MANTEL} = 0,605) evidenciando que aquellos pares de réplicas que mostraron mayor similitud en su composición algal no resultaron similares en su composición bacteriana.

Sin embargo, al analizar la variación de riqueza específica en función de la productividad estimada para cada tratamiento ambas comunidades mostraron la misma tendencia: en ambos casos los valores máximos de riqueza específica se obtuvieron a valores intermedios de producción primaria (**Figura 4.10 a** y **b**). La **Tabla 4.2** muestra los resultados de los modelos de regresión aplicados a cada conjunto de datos.

			Coef.	ES (Coef.)	t	р	R^2	g.l.
Bacterioplancton	Modelo cuadrático general					0,0046	0,6979	2
		constante	10,5577	2,9609	3,5658	0,0061		
		Prod.	1,0862	0,3878	2,8009	0,0207		
		Prod. ²	-0,0179	0,0083	-2,1605	0,0590		
N Fitoplancton (micro- y nano-)	Modelo cuadrático general					0,0264	0,554	2
		constante	10,2633	1,7096	6,0033	0,0002		
		Prod.	0,6587	0,2204	2,9885	0,0152		
		Prod. ²	-0,0124	0,0046	-2,6954	0,0246		

Tabla 4.2: Coeficientes de regresión estimados para analizar el grado derelación entre la producción primaria y la riqueza del bacterioplancton y delfitoplancton. Coef.: coeficiente de regresión de cada término; ES: error estándar para laestimación del coeficiente; t: valor de la prueba t; p: valores de p < 0,1 indicancorrelaciones significativas; g.l.: grados de libertad.



Figura 4.10: Relación entre la producción primaria y la riqueza taxonómica para **a**- el bacterioplancto y **b**- el fitoplancton (microfitoplancton + nanofitoplancton).

DISCUSIÓN

El diseño experimental buscó reproducir las condiciones de limitación por luz que caracterizan a los sistemas someros turbios, como es la laguna Chascomús (Torremorell *et al.* 2009). Este tipo de limitación se ve favorecido por la alta concentración de nutrientes y la mezcla continua de la columna de agua que promueve una tasa alta de producción primaria por parte de la comunidad autotrófica, aumento de la concentración de seston y, en consecuencia, la reducción de la transparencia en la columna de agua (Scheffer *et al.* 1993; Huisman y Weissing 1994; Huisman 1999; Huisman *et al.* 2002).

El modelo teórico (Huisman *et al.* 2002) predice que bajo condiciones de limitación por luz, se observa una relación directa entre la turbidez y la radiación solar incidente. Los resultados de este trabajo mostraron esta tendencia (**Figura 4.5.a**) e indicaron que esta reducción de la transparencia se debió a un aumento en la concentración de seston (**Figura 4.5.b**). Estos resultados junto con las correlaciones significativas entre el coeficiente de extinción vertical de la luz (k_d), la profundidad del disco de Secchi y la turbidez nefelométrica sugieren que, además, la transparencia en estos sistemas estuvo controlada por la dispersión y la absorción de la luz por parte del material particulado (plancton + tripton).

Por otro lado, en este trabajo se evaluó el grado de limitación por luz comparando de manera directa la irradiancia media en la columna de agua (I_{media}) con la irradiancia óptima fotosintética (I_k) (Ferrero *et al*.2006). Para esta fecha, 10 comparaciones de un total de 12 (y 34 de un total de 36 durante todo el tiempo que duró el experimento), la irradiancia media en la columna de agua resultó inferior a la irradiancia óptima fotosintética (**Figura 4.7**).

Estos resultados experimentales, en conjunto, coinciden con las observaciones previas realizadas en la laguna (Torremorell *et al.* 2007; 2009; Pérez *et al.* 2009; Lagomarsino *et al.* en prensa) e indican que las condiciones de limitación por luz que prevalecen en este sistema pudieron ser reproducidas por este diseño experimental.

Los 4 niveles del tratamiento aplicados a los mesocosmos (25%; 50%; 75% y 100%) corresponden a la radiación solar incidente que recibe la laguna durante verano e invierno, respectivamente. Un efecto colateral del diseño experimental fue las diferencias de temperatura entre los distintos tratamientos. Sin embargo, estas diferencias resultaron pequeñas si las comparamos con el rango natural de variación de este parámetro en la laguna (~ 18°C de variación anual). En otras palabras, el diseño experimental reprodujo las condiciones de irradiancia que ocurren en la laguna y, a la vez, redujo las diferencias de temperatura en un factor de 6. En consecuencia, si bien estas diferencias no pueden ignorarse, resultaron relativamente pequeñas al compararlas con el rango anual de temperatura del sistema.

En relación a la producción primaria y la riqueza taxonómica, el efecto de los distintos niveles de sombreado afectó la tasa fotosintética de los productores primarios y se observó mayores niveles de productividad en los mesocosmos más expuestos (**Figura 4.6**). Estas diferencias en producción primaria se correlacionaron significativamente con la riqueza taxonómica de las dos comunidades analizadas y, en ambos casos, se observó una relación cuadrática entre ambos parámetros. Estos resultados son congruentes con otras observaciones y modelos teóricos que indican que la relación unimodal es la más frecuentemente observada (Tilman y Pacala 1993; Mittelbach *et al.* 2001), particularmente, en ambientes acuáticos (Waide *et al.* 1999; Mittelbach *et al. op. cit.*). Sin embargo,

diversos autores discuten que la escala espacial de análisis influye en el tipo de relación que se observa entre la riqueza y la energía de un sistema (Waide et al. 1999; Mittelbach et al. 2001; Chase y Leibold 2002; Evans et al. 2005). Por ejemplo, Kassen y colaboradores (2000) realizaron un experimento en microcosmos utilizando cultivos de Pseudomonas fluorescens y observaron una marcada relación unimodal entre la diversidad y la productividad en microcosmos que ofrecían ambientes heterogéneos para el desarrollo de las distintas cepas. Este trabajo, sin embargo, consideró sólo cepas de una única especie y un único nivel trófico. Por otro lado, Horner-Devine y colaboradores (2003) realizaron experimentos en mesocosmos y observaron que la productividad podía influenciar la composición y la riqueza tanto de la comunidad bacteriana como de la comunidad algal. El patrón de variación observado por estos autores para el fitoplancton coincide con el observado en este trabajo. Sin embargo, al analizar la relación para la comunidad bacteriana, los patrones observados resultaron más complejos que los observados en el presente trabajo. Estos autores concluyeron que la riqueza bacteriana resultó afectada por el nivel de productividad, pero la respuesta no se observó a nivel comunitario sino que resultó taxón-específica. Finalmente, Dodson y colaboradores (2000) investigaron la relación entre productividad y riqueza en 33 lagos naturales y en 6 lagos experimentales del hemisferio norte. En este trabajo realizaron observaciones a campo y analizaron datos de los lagos experimentales que habían sido manipulados a corto (3 años) y largo plazo (21-24 años). En todos los casos compararon los datos de 6 comunidades (fitoplancton, rotíferos, cladóceros, copépodos, macrófitas y peces) en relación a la producción primaria del sistema. En ambientes naturales observaron relaciones significativas y unimodales para las 6 comunidades analizadas. Sin embargo, en los lagos experimentales que habían sido enriquecidos en nutrientes las observaciones resultaron

variadas y dependientes de la historia de enriquecimiento y restauración de los distintos sistemas.

Teniendo en cuenta la influencia que ejercería la escala experimental en los patrones observados y a la limitación del análisis estadístico debido al número de observaciones, los resultados obtenidos en el presente estudio deben considerarse preliminares. Sin embargo, este trabajo constituye la primera observación que sugiere la existencia de una relación significativa entre la riqueza del bacterioplancton y la productividad en sistemas limitados por luz.

Además, dada la estrecha relación que existe entre el funcionamiento de los sistemas someros turbios de la región y el flujo energético (Lagomarsino *et al.* en prensa; Llames *et al.* 2009; Torremorell *et al.* 2007; 2009), los resultados aquí presentados aportan indicios para un mejor entendimiento de los posibles efectos que tendría un cambio de irradiancia en la columna de agua sobre la dinámica de estos sistemas.

En este sentido, existen tres formas de enriquecer a un sistema acuático con un mayor nivel de irradiancia en la columna de agua: (i) aumento de la irradiancia incidente, (ii) descenso del nivel hidrométrico y (iii) disminución de la atenuación en la columna de agua (Diehl 2007). En relación a la irradiancia incidente, ésta es influenciada de manera directa por cambios en la cobertura nubosa mientras que los cambios en el nivel hidrométrico se relacionan directamente con los cambios que puedan ocurrir en el régimen de precipitaciones y con las obras hidráulicas realizadas sobre la cuenca. Finalmente, la atenuación de la luz en la columna de agua se ve afectada marcadamente por el ingreso de material a través de la escorrentía desde la cuenca de drenaje y, por lo tanto, también es dependiente de cambios en el régimen pluvial. Actualmente, en la región pampeana, las vastas extensiones de terreno dedicadas a la cría de ganado están siendo destinadas a cultivo de soja y este cambio en el uso de la tierra tiende a continuar en las próximas décadas (Pengue 2005). Por otro lado, los datos indican que la isoyeta de 600 mm que marca, aproximadamente, el límite occidental de la zona apta para la agricultura en la pampa húmeda se ha desplazado 200 km hacia el oeste de la región, aumentando considerablemente la superficie de terreno apta para cultivo (Barros *et al.* 2006). Dado que todos estos cambios ambientales se relacionan de manera directa con los cambios en el ambiente lumínico, resulta fundamental continuar con las investigaciones sobre las potenciales consecuencias que los cambios en la disponibilidad de luz puedan tener sobre la dinámica de los ambientes someros de la región.

CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo de tesis doctoral constituye la primera caracterización del patrón de composición de la comunidad bacteriana en ambientes lacustres de la Región Pampeana. Los resultados obtenidos constituyen un importante aporte ya que permiten avanzar en el entendimiento de la estructura de los componentes microbianos de lagunas de la región que se encuentran en distintos estados de equilibrio, aportando información ecológica sobre las comunidades procariotas que se desarrollan en estos sistemas.

Desde el punto de vista metodológico (Capítulo I), la comparación de las dos técnicas moleculares utilizadas para el análisis de esta comunidad en los ambientes pampeanos (ARISA y DGGE) resultaron aproximaciones adecuadas y congruentes para describir la estructura del bacterioplancton en dos niveles de resolución genética complementarios que permitieron una mejor comprensión de los patrones observados.

En relación a la composición comunitaria a nivel regional (Capítulo II). realizado dentro del marco conceptual de el análisis las metacomunidades (Hanski y Gilpin, 1997) puso en evidencia la aplicabilidad y la generalidad de conceptos ecológicos desarrollados para macroorganismos y permitió comprender y explicar los patrones de composición bacterianos de estos sistemas lacustres. En el contexto de este marco conceptual, para los sistemas analizados el modelo de Sorting de Especies resultó el que mejor explicó el patrón de composición. De acuerdo con este paradigma, el patrón observado sería consecuencia del desacople temporal entre las tasas de dispersión regional que caracterizan a estos microorganismos y la eficiencia de respuesta de la comunidad local frente a los cambios ambientales (altas tasas de crecimiento). La ausencia de un efecto de la distribución espacial de los sistemas en la determinación de la

estructura comunitaria y la estrecha relación entre la ocurrencia de los distintos taxones bacterianos y las condiciones ambientales particulares de cada laguna serían resultado de este desacople entre la dinámica local y la dinámica de colonización-extinción regional. En particular, el estado de equilibrio alternativo característico de cada sistema ejercería una influencia fundamental en la estructura comunitaria bacteriana, mientras que la estacionalidad jugaría un rol secundario.

En relación a los factores determinantes, los resultados obtenidos a partir del análisis de la variación temporal de la estructura comunitaria en ambientes de características limnológicas contrastantes (Capítulo III), sugieren que la importancia de los factores extrínsecos (regionales) e intrínsecos (sitio-específicos) en la determinación a nivel local de la composición bacteriana también estarían asociados al estado de equilibrio alternativo. En el caso de la laguna turbia, el patrón comunitario resultó comparativamente más estable a lo largo del tiempo y las correlaciones observadas entre los estadísticos biológicos (i.e. riqueza específica, índice de Shannon-Weaver y de Simpson) y las variables abióticas evidenciaron la influencia de los factores ambientales que operan a nivel regional en la determinación de la dinámica de la comunidad. Contrariamente, en la laguna clara vegetada el patrón de variación comunitario resultó más dinámico y no se detectó ninguna relación directa significativa entre los estadísticos biológicos y las variables ambientales consideradas. De acuerdo con esto, y dado que en sistemas someros la presencia de vegetación acuática influencia de manera directa la estructura y dinámica de las comunidades que allí se desarrollan (Scheffer et al. 1993), se plantea la hipótesis de que la presencia de macrófitas constituiría un factor determinante de la estructura de la comunidad bacteriana local en las lagunas de la región.

Finalmente, a partir del estudio experimental en el cual se analizó el efecto de la limitación por luz como factor determinante de la dinámica temporal en ambientes turbios de la región, surgen evidencias de la existencia de una relación significativa cuadrática entre la riqueza taxonómica del bacterioplancton y del fitoplancton y la productividad primaria en este tipo de sistemas.

PERSPECTIVAS

Una de las ventajas de la aplicación de la técnica de DGGE es que la metodología permite darle una identidad a las unidades taxonómicas operativas a partir de la secuenciación de aquellas bandas cuyo patrón de presencia/ausencia y/o de intensidad resultan más interesantes para caracterizar a la comunidad. Sin embargo, dada la gran diversidad de organismos presentes en los sistemas analizados, en este trabajo no se han podido obtener secuencias adecuadas que permitan una caracterización más acabada de los taxones procariotas que conforman las comunidades aquí descriptas. En consecuencia, sería recomendable la utilización de otras técnicas moleculares tales como la generación de bibliotecas genéticas (*clone libraries*) a partir del clonado de los fragmentos amplificados por PCR (Nocker *et al.* 2007) o la pirosecuenciación, método que consiste en una modificación del clásico Método de Sanger (DeLong 2009), como metodologías alternativas que permitan obtener una caracterización filogenética de las bacterias presentes en los distintos sistemas.

Por otro lado, además de las técnicas aplicadas en esta tesis para analizar la biodiversidad y las sugeridas en el párrafo anterior, resultaría interesante la utilización de técnicas moleculares independientes del paso de amplificación por PCR, tal como lo es la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH: *Fluorescence in situ Hybridization*). Este tipo de metodología complementaría los análisis aquí realizados, permitiendo analizar la variación temporal de los distintos grupos bacterianos presentes en las lagunas.

Finalmente, otro aspecto interesante a analizar sería la relación entre la composición de la comunidad bacteriana y la función ecológica que estos microorganismos cumplen en el ecosistema. Una manera de comenzar a analizar los aspectos funcionales de esta comunidad en distintos sistemas sería la realización de experimentos fisiológicos a nivel comunitario

130

utilizando un sistema de placas comercialmente denominadas BIOLOG (Garland 1999; Garland *et al.* 2001). En líneas muy generales esta metodología consiste en analizar los patrones de capacidad potencial que presenta una comunidad de respirar diferentes fuentes de carbono. El procedimiento experimental permite obtener una especie de *figerprinting* metabólico o perfil del nivel fisiológico comunitario (Lehman *et al.*, 1995) cuyos resultados se analizan de manera similar al análisis de los perfiles genéticos, es decir, la significancia estadística de las observaciones se estudia a partir de la aplicación de técnicas de análisis multivariados.

Dr. Horacio E. Zagarese

Dra. Irina Izaguirre

BIBLIOGRAFÍA

- Allende L, Tell G, Zagarese H *et al.* Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia*. 2009; 624: 45-60
- American Public Health Association. Stanard Methods for the Examination of water and Wastewater. Water Environment Federation, Arlington, VA. 1992
- Avaniss-Aghajani E, Jones K, Chapman D, Brunk C. A molecular technique for identification of bacteria using small-subunit ribosomal-RNA sequences. *Biotechniques*.1994; 17: 144–149
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil LA y Thingstad F. The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*. 1983; 10 (3): 257-263
- Azam F. Introduction, history and overview: The 'Methods ' to our Madness. Methods in Microbiology. 2001; 30: 1-12
- Baas-Becking LGM. Geobiologie of Inleiding Tot de Milieukunde. Van Stockum & Zoon, The Hauge, The Netherlands. 1934
- Barros V, Clarke R y Silva Díaz P (eds). Climate Change in the La Plata Basin. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires. 2006
- Begon M, Townsend C y Harper J. Ecology: from individuals to ecosystems. Blackwell Publishing (eds). 2006
- Bohannan BJM y Hughes J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Current Opinion in Microbiology*. 2003; 6: 282-287
- Bohannan BJM y Lenski RE. The relative importance of competition and predation varies with productivity in a model community. *The American Naturalist*. 2000; 156: 329-340
- 11. Borneman J y Triplett EW. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population
shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63 (7): 2647-2653.

- 12. Bourrelly P. Les algues d'eau douce. I. Boubée, París.1970
- 13. Bourrelly P. Les algues d'eau douce. II. Boubée, París. 1972
- 14. Bourrelly P. Les algues d'eau douce. III. Boubée, París.1981
- 15. Buckley D y Schmidt T. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology*. 2001; 42: 11-21
- Callieri C y Pinolini ML. Picoplankton in Lake Maggiore, Italy. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*. 1995; 80: 491–501
- Casamayor EO, Massana R, Benlloch S *et al.* Changes in archeal, bacterial and eukaryal assamblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology*. 2002; 4 (6): 338-348
- Casamayor, EO, Schäfer H, Bañeras L, *et al.* Identification and spatio-temporal differences between microbiol assamblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66: 499-508
- Chao A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. Scandinavian Journal of Statistic. 1984; 11: 265-270
- 20. Chase JM y Leibold MA. Spatial scale dictates the productivity-biodiversity relationship. *Nature*. 2002; 416: 427-430
- Cho JC y Tiedje JM. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66 (12): 5448-5456
- 22. Clarke KR y Green RH. Statistical design and analysis for "biological effects" study. *Marine Ecology- Progress Series*. 1988, 46: 213-226
- Clarke KR y Ainsworth M. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology- Progress Series*. 1993; 92: 205-219

- 24. Cohan FM. What are bacterial species? Annual Review of Microbiology. 2002; 56: 457-87
- 25. Cole JJ. Aquatic microbiology for ecosystem scientists: new and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems*. 1999; 2: 215-225.
- 26. Colwell RK. EstimateS. Statistical Estimation of species richness and shared species of samples. Versión 8. URL <purl.oclc.org/estimates>
- Connell JH. Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science*. 1978; 199: 1302-1310
- Craig SR. Distribution of algal picoplankton in some European freshwaters. Abstracts from the 2nd International Phycological. Congress, Copenhagen, agosto de 1985: 31
- Crosby LD y Criddle CS. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques*. 2003; 34 (4): 2-9
- Crump B y Hobbie J. Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Limnology & Oceanography*. 2005; 50 (6): 1718-1729
- Curtis TP, Sloan WT, y Scannell JW. Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002; 99: 10494-10499
- DeLong EF. The microbial ocean from genomes to biomes. *Nature*. 2009; 459: 200-206
- Diehl S. Paradoxes of enrichment: effects of increased light versus nutrient supply on pelagic producer-grazer systems. *The American Naturalist*. 2007; 169: E173–E191
- 34. Díez B, Pedrós-Alió C, Marsh T, y Massana R. Application of Denaturing Gradiente Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assamblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67 (7): 2942-2951

- Dodson SI, Arnott SE, Cottingham KL. The relationship in lake communities between primary productivity and species richness. *Ecology*. 2000; 81 (10): 2662-2679
- Dolan CJR. Biogeography of aquatic microbes: An introduction to the biogeography of aquatic microbes. *Aquatic Microbial Ecology*. 2005; 41: 39-48
- 37. Dumestre JF, Casamayor EO, Massana R, y Pedrós-Alió C. Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). Aquatic Microbial Ecology. 2002; 26: 209–221
- Evans KL, Greenwood JJD y Gaston KJ. Dissecting the species-energy relationship. Proceedings of the Royal Society. Series B. Biological Sciences. 2005; 272: 2155-2163
- 39. Farrelly V, Rainey FA y Stackebrandt E. Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61(7): 2798-2801.
- Fenchel T, Finlay BJ. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *BioScience*. 2004; 54 (8): 777-784.
- Ferrero E, Eöry M, Ferreyra G *et al.* Vertical mixing and ecological effects of ultraviolet radiation in planktonic communities. *Photochemistry and Photobiology.* 2006; 82: 898-902
- 42. Ferris MJ y Ward DM. Seasonal distribution of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63: 1375-1381
- 43. Finlay BJ y Clarke KJ. Ubiquitous dispersal of microbial species. *Nature*. 1999;
 400: 828
- 44. Fisher MM y Triplett EW. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial

communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65(10):4630-4636

- 45. Foissner W. Biogeography and Dispersal of Micro-organisms: A Review Emphasizing Protists. *Acta Protozoologica*. 2006; 45: 111-136
- 46. Garland JL. Potential and limitations of BIOLOG for microbial community analysis. En: Methods of Microbial Community Analysis. Microbial Biosystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. 1999
- Garland JL, Mills AL y Young JS. Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP). Soil Biology & Biochemistry. 2001; 33: 1059-1066
- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G y Elsas JDV. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 1999; 38: 1-15
- Green J y Bohannan JM. Spatial scaling of microbial biodiversity. *TRENDS in* Ecology and Evolution. 2006; 21 (9): 501-507
- 50. Hammer Ø, Harper DAT y Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics software for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001; 4 (1): 1-9
- 51. Hanski I y Gilping M. Metapopulation dynamics- brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1991; 42: 3-16
- 52. Hanski I. Metapopulation Ecology. Oxford University Press, Oxford, UK. 1999
- 53. Hardin G. The competitive exclusion principle. Science. 1960; 131: 1292-1297
- 54. Head IM, Saunders JR y Pickup RW. Microbial evolution, diversity and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*. 1998; 35: 1-21

- 55. Hewson I y Fuhrman JA. Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004; 70 (6): 3425-3433
- 56. Hewson I, Steele JA, Capone DG y Fuhrman JA (a). Temporal and spatial scales of variation in bacterioplankton assemblages of oligotrophic surface waters. *Marine Ecology Progress Series*. 2006; 311: 67-77
- 57. Hewson I, Steele JA, Capone DG y Fuhrman JA (b). Remarkable heterogeneity in meso- and bathypelagic bacterioplankton assemblage composition. *Limnology & Oceanography*. 2006; 51 (3): 1274-1283
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH y Bohannan BJM. Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*. 2003; 6: 613-622
- Horner-Devine MC, Carney KM y Bohannan BJM. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London*. 2004; 271: 113-122
- 60. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH y Bohannan BJM. Minireview: Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67 (10): 4399-4406
- Huisman J y Weissing FJ. Light-limited growth and com- petition for light in well-mixed aquatic environments: an elementary model. *Ecology*. 1994; 75: 507–520
- 62. Huisman J. Population dynamics of light-limited phytoplankton: microcosm experiments. *Ecology*. 1999; 80: 202–210
- Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM *et al.* Principles of the light-limited chemostat: theory and ecological applications *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002; 81: 117–133
- 64. Hutchinson GE. The Paradox of the Plankton. *The American Naturalist*. 1961;
 95 (882):137-145
- 65. Iachetti C. Dinámica del fitoplancton de la laguna Chascomús (Buenos Aires). Seminario de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011

- 66. Izaguirre I. y Vinocur A. Typology of shallow lakes of the Salado River basin (Argentina) based on Phytoplankton communities. *Hydrobiologia*. 1994; 277: 49.62
- 67. Javornicky P. Taxonomic notes on some freshwater planktonic Cryptophyceae based on light microscopy. *Hydrobiologia*. 2003; 502: 271-283
- Jurgens K y Matz C. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002; 81: 412-434
- 69. Kassen R, Buckling A, Bell G, Rainey PB. Diversity peaks at intermediate productivity in a laboratory microcosm. *Nature*. 2000; 406: 508-512
- Kauzinger CMK, y Morin PJ. Productivity controls food-chain properties in microbiological communities. *Nature*. 1998; 395: 495-497
- 71. Kent AD, Yannarell AC, Rusak JA et al. Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *The ISME journal*. 2007; 1: 38-47
- 72. Kepner RL y Pratt JR. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiological Reviews*. 1994: 58 (4): 603-615
- 73. Kirk JL, Beaudette LA, Hart M *et al.* Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 2004; 58: 169-188.
- Kisand V y Nõges T. Abiotic and biotic factors regulating dynamics of bacterioplankton in a large shallow lake. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004; 50: 51-62.
- 75. Komárek J y Fott B. Chlorophyceae, Chlorococcales. En: Elster H.-J. y W. Ohle (eds). Die Binnengewässer. Das Phytoplankton des Süsswasser, 16. Nägele y Obermiller, Stuttgart. 1983
- 76. Komárek J y Anagnostidis K. Cyanoprokaryota. 1. Chroococcales. En: Fischer, G. (ed) Pascher Süsswasserflora von Mitteleuropa 19/1. Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm. 1999

- Komárek J. Plantik oscillatorialean cyanoprokaryotes (short review according to combined phenotype and molecular aspects). *Hydrobiologia*. 2003; 502: 367-382.
- Komárek J. y Anagnostidis K. Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. En: Elsevier (ed) Pascher Süsswasserflora von Mitteleuropa. 2005
- 79. Lagomarsino L, Pérez GL, Escaray R, Bustingorry JF y Zagarese H. Weather variables as drivers of seasonal phosphorus dynamics in a shallow hypertrophic lake (Laguna Chascomús, Argentina). *Fundamental and Applied Limnology*. En prensa.
- Legendre P y Legendre L. Numerical Ecology. Developments in Environmental Modelling 20. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. 1998
- Lehman RM, Ringelberg D, Colwell FS y White DC. Drilling mud microbial communities as fortuitous tracks for sample collection in deep terrestrial habitats. *Journal of Microbiological Methods*. 1995; 22: 263-281
- Leibold MA, Holyoak M, Mouquet N *et al.* The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. *Ecology Letters*. 2004; 7: 601-613.
- Liao D. Gene conversion drives within genic sequences: Concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archea. *Journal of Molecular Evolution*. 2001; 51: 305-317
- Liebhold A, Koenig WD, Bjornstad ON. Spatial Synchrony in Population Dynamics. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 2004; 35 (1): 467-490
- Escalamiento Multidimensional: Conceptos y enfoques. Revista Investigación Operacional. 2001; 22 (2): 173-183
- Lindström ES. Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. FEMS Microbiology Ecology. 1998; 27 (2): 163-174
- 87. Lindström ES y Leskinen E. Do Neighboring Lakes Share Common Taxa of Bacterioplankton ? Comparison of 16S rDNA Fingerprints and Sequences from Three Geographic Regions. *Microbial Ecology*. 2002; 44:1-9

- 88. Lindström ES, Kamst-van Agterveld MP y Zwart G. Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature and lake water retention time. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71: 8201-8206
- Kindström ES. External control of bacterial community structure in lakes. Limnology & Oceanography. 2006; 51 (1): 339-342
- 90. Liu WT, Marsh TL, Cheng H y Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63: 4516–4522
- Llames ME, Lagomarsino L, Diovisalvi N *et al.* The effects of Light availability in shallow, turbid waters: a mesocosm study. *Journal of Plankton Research*. 2009; 31 (12): 1517-1529
- Logue JB y Lindström ES. Biogeography of bacterioplankton in inland waters. Freshwater Reviews. 2008; 1: 99-114
- 93. Logue JB, Bürgmann H y Robinson CT. Progress in the Ecological Genetics and Biodiversity of Freshwater Bacteria. *BioScience*. 2008; 58 (2):103-113
- 94. Mac Caig AE, Glover LA y Prosser JI. Molecular análisis of bacterial community structure and Diversity in unimproved and improved Upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65: 1721-1730
- 95. Macnaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD *et al.* Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65(8): 3566-3574.
- 96. Magurran AE. Ecological diversity and its measurement. 1. Ecological communities. Diversity. Mathematical models. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1988
- Magurran AE y Henderson PA. Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature*. 2003; 422: 714-716
- 98. Marker AFH, Nusch A, Rai H. y Riemann B. The measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardization of methods:

conclusions and recommendations. *Archiv fur Hydrobiologie Beihandlung Ergebnisse der Limnologie*. 1980; 14: 91–106.

- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. Nature Reviews- Microbiology. 2006; 4: 102-112
- 100.McArthur RH y Wilson EO. The theory of island biogeography. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 1967
- 101.Mittelbach G, Steiner C,Scheiner M *et al*.What is the observed relationship between species richness and productivity? *Ecology*. 2001; 82 (9): 2381-2396
- 102.Murray E, Hollibaugh JT, Orrego C. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62(7): 2676-2680.
- 103.Murray AE, Preston CM, Massana R. *et al.* Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Applied and Environmental Micorbiology*. 1998; 64: 2585-2595
- 104.Muylaert K, Van der Gucht K V, Vloemans N et al. Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. Applied and Environmental Microbiology. 2002; 68: 4740-4750
- 105.Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993; 59: 695–700
- 106.Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: Akkermans ADL, van Elsas JD y de Bruijn FJ (Eds). Molecular Microbial Ecology Manual Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1997; 3.4.4: pp. 1–27

- 107.Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998; 73: 127-141
- 108.Niemi RM, Heiskanen I, Wallenius K, Lindstrom K. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*. 2001; 45:155-165
- 109.Nocker A, Burr M, Camper AK. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*. 2007; 54: 276-289.
- 110.Nübel U, Engelen B, Fleske A *et al.* Sequence heterogeneities of genes encoding
 16S rRNA's in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel
 electrophoresis. *Journal of* Bacteriology.1996; 178: 5636-5643
- 111.Padisák J, Reynolds CS y Sommer U (eds). Intermediate DisturbanceHypothesis in phytoplankton ecology. Developments in hydrobiology 81.Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Belgica. 1993
- 112.Pedrós- Alió C. Marine microbial diversity: can it be determined? TRENDS in Microbiology. 2006; 14 (6): 257-263
- 113.Peet RK. The measurement of species diversity. Annual Review of Ecology and Systematics. 1974; 5 (1): 285-307
- 114.Pengue WA. Transgenic Crops in Argentina: the ecological and social debt. Bulletin of Science, Technology & Society. 2005; 25: 314–322
- 115.Pérez GL, Torremorell A, Bustingorry J *et al.* Optical characteristics of shallow lakes from the Pampa and Patagonia regions of Argentina. *Limnologica*. 2010; 40: 30-39
- 116.Polz MF y Cavanaugh CM. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64: 3724-3730
- 117.Prosser JI, Bohannan BJM, Curtis TP, et al. The role of ecological theory in microbial ecology. Nature. 2007; 5:384-392.
- 118.Quirós R, Drago E. The environmental state of Argentinean lakes: An overview. Lakes & Reservoirs: Research and Management. 1999; 4: 55–64

- 119.Quirós R, Rennella AM, Boveri MB *et al.* Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral.* 2002; 12: 175-185
- 120.Quirós R. La ecología de las lagunas de las Pampas. Investigación y Ciencia.
 Madrid, España (en prensa). 2005. Disponible en: http://www.agro.uba.ar/users/quiros/
- 121.Quirós R, Boveri MB, Petracchi CA *et al.* Los efectos de la agriculturación del humedal pampeano sobre la eutrofización de sus lagunas. En: Eutrofização na América do Sul: Causas, conseqüências e tecnologias de gerenciamento e controle, 1-16. José Galizia Tundisi, Takako Matsumura-Tundisi, Corina Sidagis Galli (eds). Instituto Internacional de Ecologia, Instituto Internacional de Ecologia e Gerenciamento Ambiental, Academia Brasileira de Ciências, ConselhoNacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, InterAcademy Panel on International Issues, InterAmerican Network of Academies of Sciences. 2006
- 122.Reche ISR, Pulido-Villena E, Morales-Vaquero R y Casamayor E. Does ecosistema size determine aquatic bacterial richness? *Ecology*. 2005; 86: 1715-1722
- 123.Reimann L, Steward GF, Fandino LB *et al.* Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes. *Deep Sea Research II.* 1999; 46: 1791-1811
- 124.Schauer M, Balagué V, Pedrós-Alió C y Massana R. Seasonal canges in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquatic Microbial Ecology*. 2003; 32:1163–1174
- 125.Scheffer M, Hosper SH, Meijer ML et al. Alternative Equilibria in Shallow Lakes. Trends in Ecology & Evolution. 1993; 8 (8): 275-279
- 126.Scheffer M. Ecology of shallow lakes. Londo: Chapman & Hall. 1998
- 127.Scheffer M, Carpenter S, Foley J et al. Catastrophic shifts in ecosystems. Nature. 2001; 413: 591-596

- 128.Scheffer M y Carpenter S. Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 2003; 18 (12): 648-656
- 129.Scheinert P, Krausse R, Ullman U, et al. Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer. Journal of Microbiological Methods. 1996; 26:103–117
- 130.Schwalbach M, Brown M y Fuhrman J. Impact of light on marine bacterioplankton community structure. *Aquatic Microbial Ecology*. 2005; 39:235-245
- 131.Shannon, C.E. y W. Weaver. The mathematical theory of communication. University Illinois Press, Urbana. 1949
- 132.Silvoso J, Izaguirre I y Allende L. Picoplankton structure in clear and turbid eutrophic shallow lakes: A seasonal study. *Limnologica*. 2010; en prensa. Disponible en: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2010.10.001</u>
- 133.Simpson EH. Measurement of Diversity. Nature. 1949; 163, 688-688
- 134.Smouse PE, Long JC y Sokal RR. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology* 1986; 35: 627–632
- 135.Sosnovsky A y Quirós R. El estado trófico de pequeñas lagunas pampeanas, su relación con la hidrología y el uso de la tierra. *Ecología Austral*. 2006; 16: 115-124
- 136.Staley JT y Konopka A. Measurement of *in situ* activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1985; 39: 321-346
- 137.Steeman-Nielsen E. The use of radioactive carbon (¹⁴C) for measuring organic production in the sea. *Journal du Conseil*. 1952; 18: 117–140
- 138.Stepanauskas R, Moran M, Bergamaschi B y Hollibaugh JT. Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquatic Microbial Ecology*. 2003; 31: 85-98

- 139.Stockner JG y Antia NJ. Algal Picoplankton from Marine and Freshwater
 Ecosystems: A Multidisciplinary Perspective. Canadian Journal of
 Fisheries and Aquatic Sciences. 1986; 43 (12): 2472-2503
- 140.Stockner JG. Phototrophic Picoplankton: An Overview from Marine and Freshwater Ecosystems. *Limnology and Oceanography*. 1988; 33 (4), Part
 2: Comparative Ecology of Freshwater and Marine Ecosystems: 765-775
- 141.Stockner JG 1991. Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: The view from the summit. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*. 1991; 76 (4): 483-492
- 142.Stockner JG y MacIsaac EA. The British Columbia Lake fertilization program: overview after two decades of salmon enhancement. *Regulated Rivers*. 1996; 12:344–356
- 143.Suzuki MT y Giovannoni SJ. Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62(2):625-630.
- 144.Suzuki M, Rappé M y Giovannoni SJ. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64 (11): 4522-4529
- 145.Tell G. Sobre algunas diatomeas de la laguna Chascomús (Prov. Buenos Aires, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 1973; 15 (1): 51-71
- 146.Tilman D y Pacala S. The maintenance of species richness in plant communities.En: RE Ricklefs y D Schulter (eds). Species diversity in ecological communities. University of Chicago Press, Chicago. 1993; 13-25
- 147.Toresani NI, López HL, Gómez SE. Lagunas de la Provincia de Buenos Aires. Contribución científica del Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet", 607. Ministerio de la Producción de la Prov. Buenos Aires. Dirección de Intereses Marítimos, La Plata. Argentina. 1994. 108 pp.

- 148.Torremorell A, Bustingorry JF, Escaray R y Zagarese H. Seasonal dynamics of a large, shallow lake, laguna Chascomús: The role of light limitation and other physical variables. *Limnologica*. 2007; 37:100-108
- 149.Torremorell A, Llames ME, Pérez G et al. Annual patterns of phytoplankton density and primary production in a large, shallow lake: the central role of light. Freshwater Biology. 2009; 54: 437-449
- 150.Torsvik V, Øvreas L y Thingstad TF. Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*. 2002; 296: 1064-1066
- 151.Utermöhl H. Zur vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung Limnologie*. 1958; 9: 1-38
- 152.Van Der Gucht K, Sabbe K, De Meester L *et al.* Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environmental Microbiology*. 2001; 3 (11): 680-90.
- 153.Van der Gucht K., Cottenie K, Muylaert K et al. The power of species sorting: Local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007; 104 (51): 20404-20409
- 154.Venrick E. How many cells to count? En: Sournia A (ed) Phytoplankton manual. UNESCO Press, Paris. 1978; 167–180
- 155.Vinocur A, O`Farrell I e Izaguirre I. Contribution to the knowledge of the diatom flora of the Salado River Basin (Buenos Aires Province, Argentina). *Nova Hedwigia*. 1994; 58: 153-175
- 156.Waide RB, Willig MR, Steiner CF *et al.* The relationship between productivity and species richness. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1999; 30: 257-300
- 157.Wetzel RG y Likens GE. Limnological Analyses. Springer-Verlag, New York. 2000; 429 pp.
- 158. Whittaker RH. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon*. 1972;21 (2/3): 213-251

- 159.Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 1997; 21: 213-229
- 160.Yannarell a C, Kent AD, Lauster GH, Kratz TK, Triplett EW. Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology*. 2003; 46 (4): 391-405
- 161.Yannarell AC, Triplett EW. Geographic and Environmental Sources of Variation in Lake Bacterial Community Composition. Applied and Environmental Microbiology. 2005; 71(1):227-239

"Los conceptos y principios fundamentales de la naturaleza son invenciones libres del espíritu humano..."

(Albert Einstein)

