

Tesis Doctoral

Ecología de comunidades microbianas heterótrofas (bacterias y flagelados incoloros) de la turbera de Rancho Hambre, Provincia de Tierra del Fuego

Quiroga, María Victoria

2014-03-20

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:

Quiroga, María Victoria. (2014-03-20). Ecología de comunidades microbianas heterótrofas (bacterias y flagelados incoloros) de la turbera de Rancho Hambre, Provincia de Tierra del Fuego. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Quiroga, María Victoria. "Ecología de comunidades microbianas heterótrofas (bacterias y flagelados incoloros) de la turbera de Rancho Hambre, Provincia de Tierra del Fuego". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-20.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Ecología de comunidades microbianas heterótrofas
(bacterias y flagelados incoloros) de la turbera de
Rancho Hambre, Provincia de Tierra del Fuego**

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

María Victoria Quiroga

Directores de Tesis: Dra. Gabriela Mataloni

Dr. Fernando Unrein

Consejero de estudios: Dra. Irina Izaguirre

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental -3iA

. Universidad Nacional de Gral. San Martín -UNSAM

Buenos Aires, 2013

ÍNDICE

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Agradecimientos.....	iii-iv
Dedicatoria.....	v
Introducción General.....	1-15
Objetivos e Hipótesis.....	16-18
Materiales y Métodos Generales.....	19-33

Capítulo I***Estructura y variación temporal de las comunidades planctónicas en relación con factores ambientales***

Introducción.....	34-36
Materiales y Métodos.....	37-38
Resultados.....	38-53
Discusión.....	54-61

Capítulo II***Estructura y variación temporal de la comunidad de bacterias heterótrofas planctónicas en relación con factores ambientales***

Introducción.....	62-65
Materiales y Métodos.....	65-67
Resultados.....	67-90
Discusión.....	91-97

Capítulo III***Estructura y variación espacial de la comunidad de bacterias heterótrofas que habita el ambiente acuático de la turbera***

Introducción.....	98-100
Materiales y Métodos.....	100-102
Resultados.....	102-109
Discusión.....	110-112

Conclusiones generales.....	113-117
-----------------------------	---------

Bibliografía.....	118-137
-------------------	---------

ECOLOGÍA DE COMUNIDADES MICROBIANAS HETERÓTROFAS (BACTERIAS Y FLAGELADOS INCOLOROS) DE LA TURBERA DE RANCHO HAMBRE, PROVINCIA DE TIERRA DEL FUEGO

En esta tesis se caracterizó por primera vez la estructura y variación temporal de las comunidades que componen la trama trófica planctónica, en relación con parámetros ambientales en cinco lagunas de la turbera de Rancho Hambre, Tierra del Fuego. En primavera, la estructura del plancton fue similar en todas las lagunas. Por el contrario, en el verano tardío se observaron diferencias en la abundancia y biomasa de los distintos componentes tróficos entre los cuerpos de agua someros y profundos. Estas diferencias se explicaron parcialmente en función de los patrones característicos de variación de la temperatura, los cuales a su vez estuvieron regulados por la morfometría de los cuerpos de agua. El estudio en mayor profundidad de la comunidad de flagelados heterótrofos reveló un cambio en el tipo de regulación de la abundancia de los mismos en los dos períodos contrastantes, *bottom-up* en primavera vs. *top-down* en verano tardío, relacionado con cambios en la abundancia y composición del zooplancton. Además, se realizó un estudio polifásico de las bacterias heterótrofas utilizando microscopía de epifluorescencia, análisis de imágenes y citometría de flujo. De acuerdo con un análisis multivariado (RDA) la composición y abundancia de los distintos morfotipos del bacterioplancton estarían determinadas fundamentalmente por la temperatura, el pH y la calidad del carbono orgánico disuelto (índice a_{440}). Se observaron a su vez patrones citométricos característicos para las bacterias heterótrofas de los distintos ambientes acuáticos dentro de la turbera, regulados principalmente por el pH, la conductividad y la clorofila *a*. Estos resultados demuestran que la alta diversidad y variabilidad temporal de los hábitats acuáticos de la turbera de Rancho Hambre influye fuertemente sobre la estructura de la comunidad de bacterias heterótrofas.

PALABRAS CLAVES: Turberas ombrotáficas elevadas, cuerpos de agua, trama trófica planctónica, bacterias heterótrofas, flagelados heterótrofos, Tierra del fuego.

ECOLOGICAL STUDY OF HETEROTROPHIC MICROBIAL COMMUNITIES (BACTERIA AND FLAGELLATES) FROM RANCHO HAMBRE PEAT BOG, TIERRA DEL FUEGO

This is the first characterization of the structure and temporal variation of the communities composing the whole planktonic food web as related to environmental factors over two consecutive ice-free periods in five pools within the Rancho Hambre peat bog, Tierra del Fuego. Although the structures of the planktonic communities in spring were similar, in late summer the abundance and biomass of the different trophic compartments differed among small, shallow water bodies and large ones, partially dictated by distinct pool size-driven patterns of water temperature variation. Detailed analysis of the heterotrophic flagellates revealed a general shift in the regulation of their abundance, changing from bottom-up control in spring to top-down in late summer. This related to variations in zooplankton abundance and composition. Heterotrophic bacteria were studied using a polyphasic approach combining epifluorescence microscopy, image analysis and flow cytometry. A multivariate analysis (RDA) showed that temperature, pH and dissolved organic carbon quality (index a_{440}) mainly regulated the abundance and composition of the different planktonic bacterial morphotypes, whereas the characteristic cytometric patterns of heterotrophic bacteria observed for the different aquatic habitats were influenced by pH, conductivity and chlorophyll a concentration. These results demonstrate that the high environmental diversity and temporal variability of Rancho Hambre peat bog aquatic systems drive the structure of their heterotrophic bacterial communities.

KEYWORDS: peat bogs, pools, planktonic food web, heterotrophic bacteria, heterotrophic flagellates, Tierra del Fuego.

Lo primero que me gustaría destacar es que esta tesis, aunque figure como de mi autoría, es el resultado de una construcción colectiva. Y fueron muchas las personas que subieron y bajaron del “colectivo” en las sucesivas paradas durante estos 5 años de mi vida. Quiero agradecerles de corazón a todos mis “coautores”, tanto colegas como familiares, por ayudarme con su granito de arena. Va a ser difícil poner en palabras mis sentimientos, pero voy a hacer el intento.

Gaby y Fer, gracias por enseñarme TODO lo que sé, por la paciencia y el tiempo que me dedicaron. Me es imposible separar lo laboral de lo personal, y les quiero agradecer además de lo académico por todo su apoyo y contención.

Lombard y Angel, los oráculos de la estadística, gracias por sus consejos. Sin ustedes no habría ganado la batalla contra la estadística, les agradezco su tiempo y ayuda.

Además quiero agradecer a todos los miembros del PICT turberas: Gabita, la Küppers, Cris, Silvina, Lombard, Ali, Sergio y Rodolfo; sin cuyo trabajo esta tesis no se habría logrado.

A todos los integrantes del laboratorio de Limnología de la FCEyN: Romi, Lau, Euge, Gri, Rodri, Paty, Juan, Sole, Solange, Luz, Pablo, Paula, Rubén, Iri, Haydeé, Inés y Guillermo, gracias por abrirme las puertas del laboratorio incondicionalmente y aguantarme hablando hasta por los codos con el que le tocara compartir mi horario de microscopio.

A los integrantes del Grupo de Biodiversidad, Limnología y Biología de la Conservación: Gabita, Vale, Ana, Andre, Pame, Gaby, Rubén y Lizy; y del Laboratorio de Ecología, Teledetección y Eco-Informática del 3iA-UNSAM: Naty, Facu, Marta, Jony, Gaby, Pris y Pato; gracias por generar un lindo grupo de trabajo, el cual siempre estimuló mis ganas de ir a trabajar, aún cuando el transporte público se complotó en mi contra.

A los integrantes del Laboratorio de Ecología y Fotobiología Acuática del IIB-INTECH: Fer, María, Gona, Nadia, Ana, Paulina, Leo, Pepe, Roberto, Marcela y Horacio, gracias por hacerme sentir como en casa.

A los integrantes del CMEG de la Universidad de Pretoria: Don, Angel, Sandra, Thulani, Pieter, Eldie, Denise y Bilal, gracias por hacer de mi estadía en el extranjero una experiencia inolvidable, y soportar mi cotorreo en spanglish.

A toda mi familia: El gran batallón que me ayudó a cuidar a Almis. ¡Papá Marce, Abu Graciela, Abu Eduardo, tía Dani, tía Ale, tío Dani, tía Su: un GRACIAS ESPECIAL para ustedes!

¡Muchas gracias de corazón para todos!

Quiero agradecer el apoyo de la Secretaría de Desarrollo Sustentable y Ambiente, Dirección de Recursos Hídricos de la provincia de Tierra del Fuego, en especial a Sergio Camargo, Rodolfo Iturraspe y Adriana Urciuolo. Además, gracias al Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC), a su director y a Daniel Fernández por el invaluable apoyo logístico brindado.

El proyecto de investigación fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT PICT 1697) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET PIP 11220090100050).

A mi abuela Hortensia Hoyas

INTRODUCCIÓN GENERAL

Conceptos básicos

Dado que el estudio de los turbales se originó principalmente en altas latitudes del hemisferio norte, su terminología posee gran número de expresiones propias de unidades y subunidades del paisaje que muchas veces no poseen equivalentes en español (Roig & Roig, 2004). Además, la terminología internacional comprende varios nombres que no están definidos adecuadamente, e incluso pueden representar diferentes conceptos según el marco del lenguaje al que se traduzca o el área del conocimiento en el cual se lo aplica (Joosten & Clarke, 2002). Por esta razón, se definen a continuación algunos términos que serán utilizados en el desarrollo de la presente tesis.

Se considerará la definición de *humedal* según Joosten & Clarke (2002): “Humedal es un área que es inundada o saturada por aguas superficiales o subterráneas, con una frecuencia y duración suficiente para sustentar el desarrollo de una vegetación típicamente adaptada a condiciones de suelos saturados”.

Los humedales que poseen la capacidad de acumular turba son llamados *turbales* (Roig & Roig, 2004). La *turba* consiste en restos de plantas y animales en un estadio de descomposición incompleta que se acumulan bajo condiciones de saturación de agua permanente. La cantidad de materia orgánica que debe contener dicha acumulación es de al menos el 30% de su peso seco. La turba se acumula de forma sedentaria, es decir, en el mismo lugar donde se origina. La formación de la misma se debe principalmente a las condiciones de anoxia de los suelos saturados del humedal y a la baja tasa de descomposición que presenta el material vegetal característico de estos ambientes (Joosten & Clarke, 2002; Rydin & Jeglum, 2006). Las áreas dentro de los turbales donde la turba está siendo producida y acumulada se llaman *turberas*. En éstas áreas el espesor de la capa de turba siempre es mayor a 50 cm, y en Tierra del Fuego pueden alcanzar los 10 m (Roig & Roig, 2004).

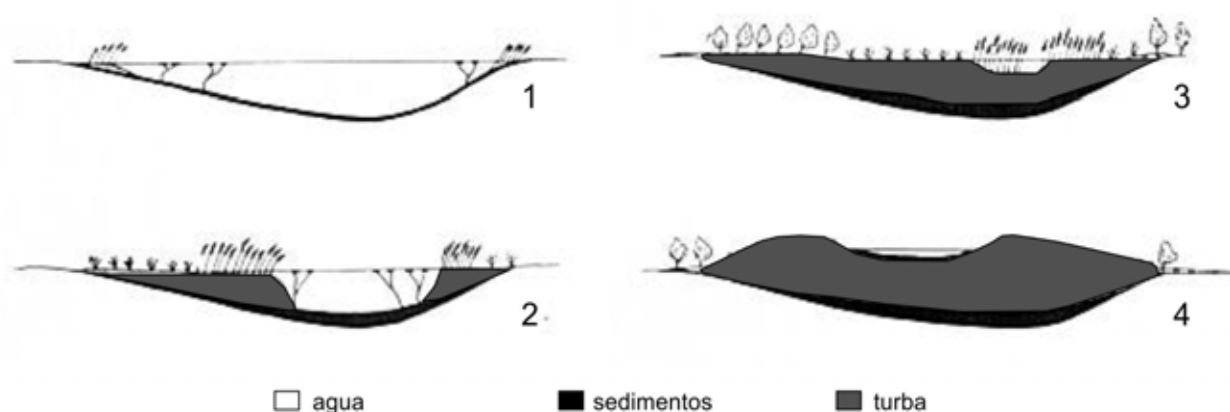
Las turberas: un tipo particular de humedal

Los turbales se forman en zonas con climas húmedos y baja evaporación, bajo condiciones de permanente saturación de agua. Estas condiciones ambientales se reúnen en zonas situadas en altas latitudes (e.g., Tierra del Fuego) o en altas altitudes (e.g., a lo largo de la cordillera de los Andes en Sudamérica) (McQueen, 1995; Cooper *et al.*, 2010). El desarrollo de estos ecosistemas está fuertemente relacionado con la topografía (Roig & Roig, 2004), y se los encuentra frecuentemente en depresiones topográficas, fondos de valles glaciarios o sobre planos donde el agua subterránea se encuentra en la superficie o muy cercana a ella. Las especies vegetales que los habitan están adaptadas a

condiciones extremas de bajo contenido de oxígeno y disponibilidad de nutrientes, y aguas ácidas (Roig & Roig, 2004).

La Figura 1 muestra la formación de una turbera ombrotétrica elevada o *peat bog* (en inglés). Los cuerpos de agua comienzan a ser colonizados por vegetación, particularmente musgos del género *Sphagnum*, que cubre inicialmente sus márgenes. Esto reduce las corrientes, actúa como trampa de sedimentos y la misma vegetación progresivamente cubre la zona de aguas libres colmatando el cuerpo de agua (Figura 1.1 a 1.3). Este estadio se llama turbera minerotétrica (en inglés, *fen*), la cual es alimentada tanto por aportes subterráneos como superficiales, y cuyas aguas son ricas en nutrientes y moderadamente ácidas (Roig & Roig, 2004; Iturraspe, 2010). Luego, si prevalecen las mismas condiciones ambientales, el espesor de la capa de turba aumenta por encima del nivel de las aguas subterráneas, dando lugar a una turbera de tipo ombrotétrica (en inglés, *bog*), cuya única fuente de nutrientes corresponde a la atmósfera (i.e. no posee contacto con las aguas subterráneas), y presenta aguas ácidas pobres en nutrientes (Iturraspe, 2010). Las turberas que desarrollan estos estadios finales ombrotéticos presentan una cobertura vegetal dominada por *Sphagnum*. La turbera ombrotétrica puede continuar elevándose hasta alcanzar una forma de domo, conformando lo que se denomina una turbera ombrotétrica elevada o *peat bog* (en inglés), que se distingue de la anterior por su topografía característica (Figura 1.4).

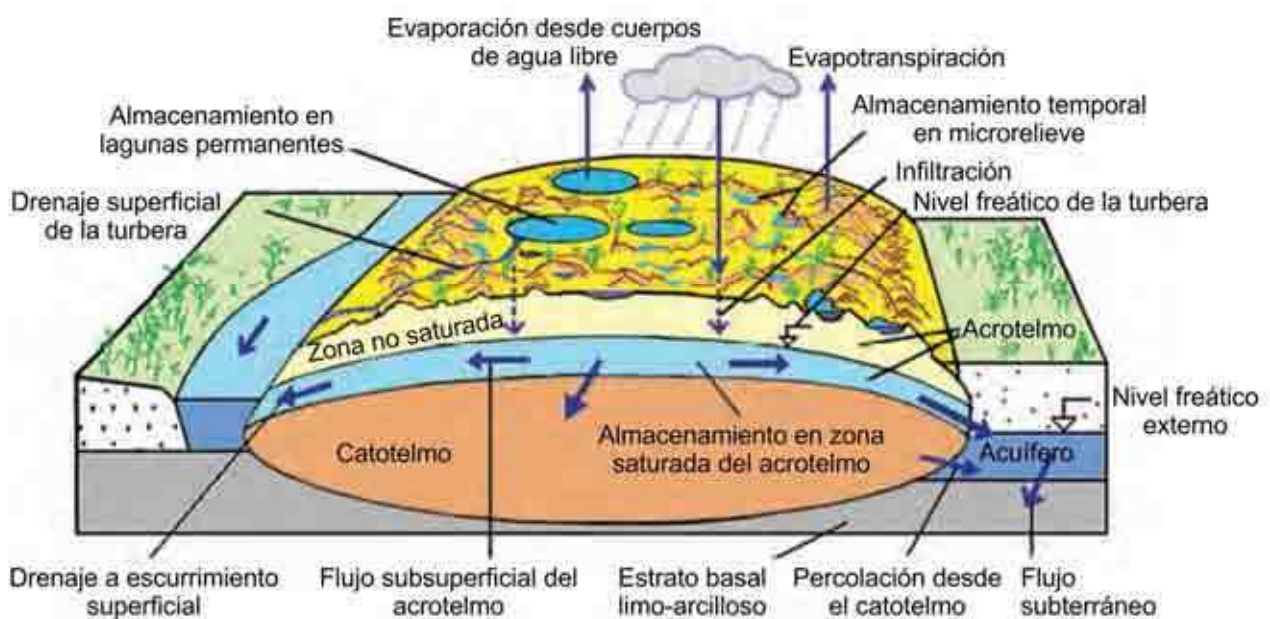
Figura 1: Formación de una turbera ombrotétrica elevada (*peat bog*). Estadios del desarrollo= 1: cuerpo de agua, 3: turbera minerotétrica (*fen*), 4: turbera ombrotétrica elevada (modificado de Visscher, 1949).



En el perfil vertical de las turberas ombrotétricas elevadas se distinguen dos horizontes denominados acrotelmo y catotelmo. El primero es el horizonte superficial hidrológicamente activo, que se caracteriza por presentar un flujo horizontal reducido;

mientras que el segundo se encuentra permanentemente saturado con muy baja permeabilidad. En estos ecosistemas la napa freática es paralela a la superficie convexa de la turbera y está sobreelevada con respecto a la napa freática del terreno circundante (Figura 2). De esta manera el agua superficial o almacenada en el sistema fluye unidireccionalmente hacia los márgenes del domo, aislando al mismo de la influencia de las aguas subterráneas (Iturraspe & Roig, 2000; Iturraspe, 2010).

Figura 2: Ciclo hidrológico de una turbera ombrotrofica elevada (modificado de Iturraspe, 2010).



El musgo Sphagnum: el formador de las turberas

La biología particular de las especies de *Sphagnum* determina en gran medida las características hidrológicas de las turberas. El ápice del musgo o capítulo contiene el meristema de crecimiento apical y presenta una morfología conspicua diferente del resto del talo, permitiéndole crecer en altura de forma indefinida (Figura 3). Sin embargo, la fotosíntesis queda restringida casi exclusivamente al capítulo, ya que la luz penetra sólo unos centímetros desde la superficie de la turbera. A medida que el musgo crece su parte inferior muere, pero permanece conectada físicamente con el capítulo. Las hojas primitivas o filoides de *Sphagnum* poseen grandes células hialinas muertas adaptadas para la conservación de agua, lo que les concede una gran capacidad de almacenaje de agua. Debido a esto, a medida que la superficie de la turbera se sobreeleva el musgo logra retener la napa freática a un nivel superior respecto del terreno circundante. Este constituye un proceso fundamental en la formación de las turberas ombrotroficas, donde

la superficie de la turbera se aísla de la influencia de las aguas subterráneas (Roig & Roig, 2004; Rydin & Jeglum, 2006).

Figura 3: Foto del musgo *Sphagnum magellanicum*.



Los atributos químicos de *Sphagnum* explican en parte el proceso de acidificación asociado a la acumulación de turba. El musgo puede vivir en estos ambientes extremos con baja disponibilidad de nutrientes debido a que posee la capacidad de captar cationes y liberar protones (Clymo, 1964). Este mecanismo le permite captar eficientemente los escasos minerales del ambiente acuático, al mismo tiempo que acidifica el medio, generando condiciones en las cuales el *Sphagnum* es el mejor competidor y prevalece como la vegetación dominante. Además, el musgo es capaz de conservar los nutrientes: transloca metabolitos desde las partes inferiores muertas que se han incorporado a la capa de turba hacia el capítulo principalmente por la vía del simplasto del parénquima, acumulando de esta forma los nutrientes en la nueva biomasa (Aldous, 2002; Rydin & Jeglum, 2006).

Las turberas de Tierra del Fuego

Estos ecosistemas se distribuyen en todos los continentes con una superficie total cercana a los 4 millones de km² (Roig & Roig 2004) y albergan la tercera parte del carbón acumulado en los suelos (Rydin & Jeglum, 2006) y el 10% del agua dulce biodisponible del planeta (Joosten & Clarke, 2002). En tan sólo 200 años el área global de turberas se ha reducido un 20-30%, debido principalmente a la explotación comercial de la turba (Joosten & Clarke, 2002).

La provincia de Tierra del Fuego contiene el 95% de las turberas de la Argentina (Rabassa *et al.*, 1996), las cuales comprenden una extensión de 2700 km² (Iturraspe & Urciuolo, 2004). Bonarelli (1917) realizó el primer relevamiento y mapeo completo de estos ecosistemas australes, en su trabajo clasificó a las turberas en (a) altas de esfagnos higrófilos y (b) bajas: (b1) inmergidas – plantas palustres y (b2) emergidas: (b2.1) de pradera húmeda, (b2.2) de ambientes xéricos y (b2.3) de bosque; en base al tipo y uso de la turba, la geología, el clima y la macroflora. Más tarde, Auer (1965) realizó una exhaustiva descripción de la distribución regional de las turberas de Tierra del Fuego en base a los tipos de vegetación, latitud, altitud y condiciones ambientales. La recopilación más actual de los antecedentes sobre turberas en Tierra del Fuego fue realizada por Roig (2004).

En 2005, el *International Mire Conservation Group* (IMCG) enfatizó la necesidad de realizar un inventario de la biodiversidad y de las funciones y servicios que cumplen las turberas fueguinas, así como el desarrollo de conocimientos básicos para monitorear su comportamiento y sus alteraciones, ya sean relacionados con su creciente explotación o debidos a cambios previstos en el clima regional en el marco del cambio climático. Iturraspe (2010) enumeró los servicios ecosistémicos que cumplen las turberas fueguinas no alteradas, tales como la mitigación de las crecidas, el aporte a los sistemas de escurrimiento en sequías y la depuración del agua superficial o subterránea que ingresa al sistema. Sin embargo, estas funciones se pierden cuando las turberas son intervenidas por el hombre para la extracción de turba. Por otro lado, se ha observado un retroceso de los glaciares en la provincia de Tierra del Fuego como resultado del cambio climático, y las predicciones indican que este proceso continuará incrementándose en el futuro (Iturraspe *et al.*, 2009), disminuyendo las reservas de agua dulce que abastecen a las comunidades locales. Bajo este escenario la función de regulación hidrológica de los humedales de turberas se vuelve un servicio ecosistémico de vital importancia (Iturraspe 2010).

En los últimos años, el gobierno de la provincia de Tierra del Fuego ha implementado acciones que contribuyen a conservar estos ecosistemas vulnerables, así como su uso sustentable. En 2001 se declaró como Reserva Natural y Paisajística a los valles de Tierra Mayor y Carbajal, y en 2009 se declaró como sitio Ramsar al Glaciar Vinciguerra y las turberas asociadas del valle de Andorra, los que constituyen la reserva de agua dulce que abastece a la ciudad de Ushuaia. En 2011 la Secretaría de Desarrollo Sustentable y Ambiente de la provincia emitió la Resolución 401, la cual estableció los criterios para el ordenamiento y la zonificación de las turberas de Tierra del Fuego. Este ordenamiento

territorial de las turberas propone limitar al área de explotación de turba principalmente al sector de Tolhuin, y conservar áreas de interés tales como el Valle de Andorra, Península Mitre, turberas de altura de la región de Moat y la Reserva Natural y Paisajística de los valles de Tierra Mayor y Carbajal.

En este contexto se desarrolló el proyecto de investigación financiado por la ANPCyT (PICT 1697) titulado “Las lagunas de la turbera de Rancho Hambre (Tierra del Fuego) un estudio limnológico integrado”, a través del cual se fundó una línea de investigación interdisciplinaria dedicada al estudio de la estructura y funcionamiento de los ecosistemas limnéticos de turbera. Se consideró a la turbera de Rancho Hambre situada dentro de la Reserva Natural y Paisajística del Valle de Tierra Mayor (Tierra del Fuego) como caso de estudio. La presente tesis doctoral se encuentra dentro del marco de dicho proyecto, y se propone estudiar en particular a los organismos planctónicos que habitan las lagunas de la turbera, con énfasis en las bacterias heterótrofas y los flagelados heterótrofos, y sus posibles interacciones tróficas, contribuyendo al conocimiento de base que la Convención de Ramsar requiere para desarrollar planes de monitoreo y uso sustentable de las turberas de Tierra del Fuego.

El rol de las bacterias heterótrofas (BH) y los flagelados heterótrofos (FH) en la trama microbiana

El concepto del bucle microbiano fue introducido a principio de los '80 por Azam y colaboradores (1983). Este bucle conecta los ciclos del carbono y nutrientes con la red trófica convencional de los sistemas acuáticos. Las bacterias consumen la materia orgánica disuelta, y la reintroducen en la cadena trófica al ser consumidas por flagelados y ciliados. Este concepto se desarrolló en base al estudio de sistemas marinos, donde el bacterioplancton depende casi exclusivamente de la materia orgánica disuelta que exuda el fitoplancton (Azam *et al.*, 1983). Sin embargo, los estudios en lagos húmicos poco productivos han demostrado que éstos son sistemas netamente heterótrofos, donde la producción de dióxido de carbono (respiración) excede su fijación (producción primaria fitoplanctónica), sugiriendo que existen fuentes adicionales de energía (carbono) que sustentan la trama trófica (Jones, 1992; Jansson *et al.*, 2001; Górnjak *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 2013).

Las lagunas de turbera son cuerpos de agua húmicos que contienen una elevada concentración de carbono orgánico disuelto (COD) derivado mayormente de la descomposición del musgo *Sphagnum* (Rydin & Jeglum, 2006). Los estudios de calidad del COD en ríos con cuencas dominadas por turberas de *Sphagnum* spp. al norte de

Suecia demostraron que éste presenta un carácter refractario, es decir coloreado, aromático y de alto peso molecular (Berggren *et al.*, 2007, 2009a, 2009b, 2010), en contraposición al COD más lábil y de menor peso molecular característico de los cuerpos de agua en los que proviene principalmente de los exudados del fitoplancton (Bertilsson & Jones, 2003). Las evidencias sugieren que este carbono refractario característico de los cuerpos de agua húmicos poco productivos constituye un substrato importante para las bacterias, ya que la producción primaria fitoplanctónica es muy baja para sustentar la demanda microbiana de carbono (Jones, 1992; Holland *et al.*, 2013). Una potencial vía por la cual el carbono refractario puede ingresar en la trama trófica es la fotodegradación que ocurre en la superficie de los cuerpos de agua, principalmente mediada por la radiación UV (Moran & Covert, 2003). Esta transformación de la materia orgánica disuelta genera compuestos de menor peso molecular y menor aromaticidad, o sea compuestos más lábiles, los cuales pueden ser asimilados por las bacterias heterótrofas (BH) (Paul *et al.*, 2012). Luego, estas BH son depredadas por flagelados heterótrofos y mixótrofos, ciliados y metazooplancton (Jones, 1992; Holland *et al.*, 2013). De esta manera, la energía fluye principalmente por la vía heterótrofa de la trama trófica en los cuerpos de agua húmicos, dentro de la cual las BH cumplirían un rol fundamental, especialmente en los cuerpos de agua de turberas elevadas (Jones, 1992; Gilbert & Mitchell, 2006; Rydin & Jeglum, 2006).

La composición del zooplancton puede modular las interacciones bióticas dentro de la trama trófica de los sistemas acuáticos (Jürgens & Matz, 2002). Diferentes estudios demuestran un potencial efecto de depredación sobre los FH por parte de los cladóceros (Jürgens, 1994; Jürgens *et al.*, 1996; Tadonlécé *et al.*, 2004; Sommer & Sommer, 2006), los copépodos (Almada *et al.*, 2004) y los rotíferos (Tadonlécé *et al.* 2004; Fermani *et al.*, 2013). En base a estos resultados, la abundancia y composición del zooplancton serían factores claves en la regulación de la abundancia de los FH.

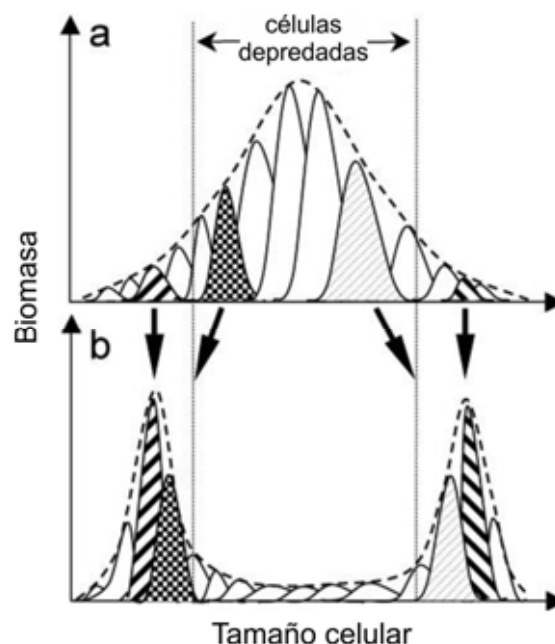
Interacciones tróficas: efectos de la depredación sobre las bacterias heterótrofas

La comunidad de BH es un componente clave de las tramas tróficas planctónicas. A pesar de que las BH usualmente presentan tasas de crecimiento elevadas, sus abundancias en los sistemas acuáticos son llamativamente constantes (con relativamente pocas fluctuaciones comparadas con otros organismos planctónicos), lo que implica que las tasas de mortalidad bacteriana están en el mismo rango que las tasas de producción bacteriana (Jürgens & Massana, 2008). Las principales causas de mortalidad bacteriana son la lisis celular mediada por virus y la depredación por protistas fagótrofos (Fuhrman &

Noble, 1995). Ambos son importantes mecanismos de regeneración de nutrientes, en particular de nitrógeno y fósforo, los que estimulan la proliferación tanto de productores primarios como de otras bacterias (Pernthaler, 2005).

Los protistas depredan preferencialmente sobre las bacterias que presentan una longitud de 1 a 3 μm , mientras que las bacterias más pequeñas o más grandes son consumidas a una tasa inferior (Pernthaler, 2005). De esta manera, la depredación impone distintas tasas de mortalidad sobre las poblaciones bacterianas que presentan diferentes tamaños celulares promedio, como se esquematiza en la Figura 4 (Pernthaler & Amann, 2005). Algunos autores sugieren que esta depredación selectiva es un importante mecanismo estructurador de la comunidad bacteriana y una de las principales causas del predominio de bacterias pequeñas en los sistemas acuáticos, mientras que otros autores proponen que la miniaturización de las bacterias podría estar relacionada con cambios en su estado fisiológico (Jürgens & Matz, 2002). En este sentido, aun existen controversias respecto a de si estas bacterias pequeñas están muertas, si se encuentran en un estado de inactivación celular provocado por déficit de sustratos orgánicos (*starvation*, en inglés), si están en estado de latencia como respuesta a condiciones ambientales desfavorables (*dormancy*, en inglés) o simplemente si son fisiológicamente menos activas (del Giorgio & Gasol, 2008).

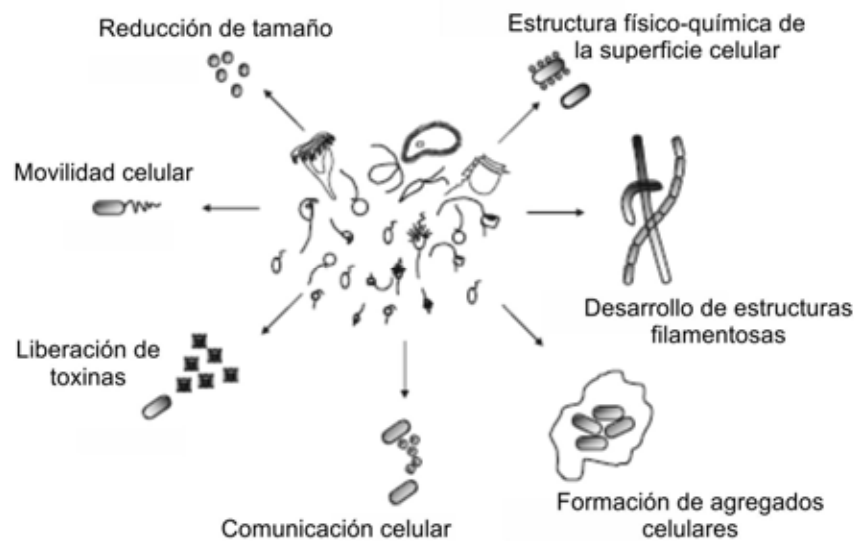
Figura 4: Efecto de la depredación ejercida por protistas sobre la biomasa bacteriana. Se indican las poblaciones bacterianas en función de su tamaño celular. **(a)** Efecto nulo o bajo de depredación: se observa una distribución de tamaños celulares unimodal. **(b)** Alto efecto de depredación: se observa una distribución bimodal, las bacterias muy pequeñas o muy grandes representan el mayor porcentaje de la biomasa (modificado de Pernthaler & Amann, 2005).



Los cambios de la morfología bacteriana relacionados con el efecto de la depredación parecerían estar vinculados al estado trófico de los ambientes acuáticos. En general, en los ambientes con pocos nutrientes se observan células más pequeñas, mientras que en los sistemas con alta disponibilidad de nutrientes las bacterias pueden desarrollar estructuras filamentosas o agregados celulares. Esta diferencia puede estar asociada al costo energético del desarrollo de estructuras más complejas (Jürgens & Matz, 2002).

Además del tamaño celular (Anderson *et al.*, 2011), existen otras propiedades de las bacterias que las vuelven vulnerables a la depredación, tales como la movilidad de las células (Matz & Jürgens, 2005), las propiedades físico-químicas de la superficie celular que intervienen en el reconocimiento de la presa y los exudados bacterianos que atraen a los depredadores (Roberts *et al.*, 2011). En base a esto, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos contra la depredación, los que se observan en la Figura 5.

Figura 5: Mecanismos bacterianos contra la depredación ejercida por protistas heterótrofos (extraído de Pernthaler, 2005).



Métodos de estudio de las bacterias heterótrofas

Está ampliamente aceptado que los métodos tradicionales de cultivo microbiológicos en placa de agar no son la herramienta adecuada para la cuantificación de las bacterias que habitan los ambientes naturales. Estos métodos subestiman en varios órdenes de magnitud la abundancia real de bacterias en el ecosistema, debido a que la mayoría de las bacterias planctónicas no crecen en los medios de cultivo ricos en nutrientes comúnmente utilizados en estas técnicas (Azam *et al.*, 1983; Staley & Konopka, 1985).

El avance en el estudio de las comunidades microbianas fue motorizado por desarrollos tecnológicos. En la década del '80, las técnicas de tinción de ADN junto con la

microscopía de epifluorescencia (MEF) permitieron una estimación precisa de la abundancia de BH en muestras ambientales (Porter & Feig, 1980). Esta técnica se basa en la observación directa de la fluorescencia emitida por los microorganismos teñidos con un colorante específico para ADN, luego de excitarlos con la longitud de onda adecuada; mientras que la autofluorescencia de la clorofila y los pigmentos accesorios (ficoeritrina y ficocianina) permite discriminar a los organismos fotosintéticos. Basándose en el análisis semiautomático de imágenes de MEF, Massana y colaboradores (1997) propusieron un método sencillo y preciso para la medición del tamaño celular promedio de la comunidad de BH. Una década más tarde, Posch y colaboradores (2009) desarrollaron una metodología para estimar el tamaño celular y la abundancia relativa de cada uno de los morfotipos bacterianos (filamentos, bacilos grandes y pequeños, vibrios, cocos grandes y pequeños) presentes en la comunidad de BH, lo cual permitió realizar un estudio más detallado de la morfología bacteriana en muestras ambientales.

A partir de la década del '90 se incorporó la citometría de flujo (CF) al estudio de las comunidades de microorganismos acuáticos. Dicha técnica está basada en el análisis de las características ópticas de las partículas (Yentsch *et al.*, 1983), y permite identificarlas y enumerarlas de acuerdo a su fluorescencia y/o la dispersión de la luz que generan. Este método de estudio permitió obtener información acerca de la estructura interna, la concentración relativa de pigmentos, la actividad celular, la integridad de la membrana celular, entre otros, con un nivel de resolución celular, ya que analiza cada célula individualmente (Gasol & del Giorgio, 2000). Su mayor ventaja radica en la rapidez con la que permite analizar una gran cantidad de muestras. Además, permitió discriminar distintas poblaciones bacterianas en función de su contenido de ácidos nucleicos (Gasol *et al.*, 1999; Bouvier *et al.*, 2007), conocidas como bacterias con alto contenido de ácidos nucleicos (HNA), y bacterias con bajo contenido de ácidos nucleicos (LNA). En el perfil en profundidad de un lago mesotrófico en Austria se identificaron hasta 5 poblaciones citométricas de BH (Andreatta *et al.*, 2004); mientras que en un estudio del picoplancton de 32 cuerpos de agua a lo largo de una transecta latitudinal desde el norte patagónico hasta Tierra del Fuego (45°22'S - 54°52'S) Schiaffino y colaboradores (2013) encontraron lagos con hasta 6 poblaciones citométricas de BH, con un promedio de 4 poblaciones distintas por cuerpo de agua.

El protocolo de fijación ideal de las muestras de organismos para análisis por CF debería ser rápido, preservar los ácidos nucleicos y proteger la autofluorescencia de los pigmentos, sin alterar el tamaño y las propiedades ópticas de las células (Gasol & del Giorgio, 2000). Cuando las células requieren ser teñidas (como es el caso de las BH), la

fijación debería además permeabilizar la membrana celular para facilitar el ingreso del colorante. El *Paraformaldehído* (PFA) penetra las células rápidamente, y se lo considera el fijador más efectivo de ácidos nucleicos y proteínas. Por el contrario, el *Glutaraldehído* (Gluta) penetra las células despacio, y no permeabiliza las membranas de algunas bacterias gram negativas (Bullock, 1984). Sin embargo, se halló que una fijación con Gluta (1% concentración final) protege a los microorganismos de la lisis celular y de la pérdida de autofluorescencia si las muestras se congelan en nitrógeno líquido inmediatamente después de la fijación y se preservan a -80°C hasta su análisis (Vaulot *et al.*, 1989). Resultados similares se observaron utilizando PFA (1% concentración final; Monger & Landry, 1993). Gasol & del Giorgio (2000) compararon la eficiencia de los fijadores formol (4% concentración final), Gluta (1% concentración final) y P+G (1% PFA + 0,05% Gluta concentraciones finales; según Marie *et al.*, 1996) frente a muestras vivas sin fijar; y evaluaron además el efecto del congelamiento de la muestra en nitrógeno líquido luego de la fijación. Estos autores obtuvieron los valores más altos de abundancia de bacterias en muestras fijadas con P+G, mientras que la luz dispersada por las células en un ángulo de 90° (parámetro SSC - asociado con la complejidad interna de la célula y, en partículas pequeñas, también con el tamaño celular) se redujo en todos los protocolos que incluían el congelamiento con nitrógeno líquido. En base a estos resultados, Gasol & del Giorgio (2000) recomiendan el protocolo de fijación con P+G seguida de congelamiento en nitrógeno líquido para el estudio de los procariontes mediante CF.

Por otro lado, la comparación de los métodos utilizados para determinar la abundancia de bacterias en muestras de agua realizada por Lemarchand y colaboradores (2001) mostró una correlación entre los recuentos obtenidos mediante MEF y CF. En este estudio los autores utilizaron microesferas de látex para comparar ambos métodos. Estos resultados concuerdan con los de Schiaffino y colaboradores (2013). Utilizando ambas técnicas, (MEF y CF) estos autores observaron valores similares, cercanos a la recta 1:1. Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado el efecto de los distintos fijadores de CF en cuerpos de agua de turberas, ni la relación entre las abundancias de BH determinadas mediante MEF y CF; lo cual es indispensable para poner a punto la técnica de CF en estos sistemas distróficos con alto contenido de materia orgánica disuelta que dificultan la observación en MEF.

Antecedentes a nivel mundial del estudio de las bacterias heterótrofas y los flagelados heterótrofos en turberas

Gilbert & Mitchell (2006) realizaron una recopilación de la información existente a nivel mundial acerca de la estructura (diversidad, abundancia y biomasa) y relaciones funcionales (descomposición, producción primaria, interacciones tróficas) de las comunidades de bacterias, protistas, hongos y micrometazoos en ecosistemas de turbales, incluyendo turberas como zonas de formación activa de turba. La gran mayoría de los trabajos recopilados corresponden a estudios del microambiente conformado por el agua intersticial del *Sphagnum*, mientras que los trabajos centrados en el estudio de los cuerpos de agua de turberas son muy escasos.

Las BH constituyen el grupo microbiano más abundante en los turbales (Gilbert & Mitchell, 2006), y presentan generalmente un tamaño celular entre 0,3 y 1 μm (Greaves *et al.*, 1973). Fisher y colaboradores (1998) estudiaron la abundancia y la producción bacteriana (incorporación de leucina radioactiva- ^3H) en relación a la temperatura, el pH y la concentración de COD en distintos ambientes superficiales de dos turberas elevadas de EE.UU. En ambas turberas se registraron los valores máximos de pH en los cuerpos de agua y los mínimos en el agua intersticial del *Sphagnum* de la zona del domo, mientras que la concentración del COD mostró un patrón inverso. Este gradiente ambiental determinó tanto la abundancia como la producción bacteriana, observándose los valores mínimos de ambos parámetros en los cuerpos de agua y los máximos en el agua intersticial del *Sphagnum*. Estos resultados se condicen con los de Druvietis y colaboradores (2010), quienes encontraron una correlación positiva entre la abundancia del bacterioplancton y la concentración de sustancias húmicas en lagos de turberas elevadas de *Sphagnum* en Letonia.

Con respecto a la variación anual de la abundancia de las BH, Lara y colaboradores (2011) observaron un patrón estacional de la abundancia del bacterioplancton de una laguna dentro de una turbera elevada en Suiza, con mínimos en invierno y máximos en primavera tardía y verano.

A nivel mundial, los estudios ecológicos de los FH y su rol en los ecosistemas de turberas también son escasos (Gilbert & Mitchell, 2006). Gilbert y colaboradores (1998) informaron una abundancia promedio anual de FH de $2,8 \times 10^3$ células mL^{-1} en el agua intersticial del *Sphagnum* de una turbera minerotrófica en Francia; que en términos de biomasa significó $0,03 \mu\text{gC mL}^{-1}$, registrándose sus valores máximos en verano. Estos autores observaron que la biomasa de FH representó en promedio sólo el 1% de la biomasa conformada por BH, nano- microfitoplancton, ciliados y amebas tecadas; y se

correlacionó débilmente con la biomasa bacteriana (Gilbert *et al.*, 1998). En concordancia con estos resultados, Mieczan (2007a) también registró en el agua intersticial del *Sphagnum* de tres turberas elevadas en Polonia que sólo una pequeña proporción (1%) de la biomasa conformada por BH, FH, ciliados y amebas tecadas correspondía a los FH. En estos ambientes, las relaciones entre los componentes del bucle microbiano sugieren que los FH serían depredados por las amebas tecadas y los ciliados (Gilbert *et al.*, 1998; Mieczan, 2007a).

Antecedentes del estudio de las comunidades planctónicas de turberas de la provincia de Tierra del Fuego

Las condiciones particulares de los cuerpos de agua de turberas de Tierra del Fuego dan lugar a una flora fitoplanctónica única y sorprendentemente diversa (Mataloni, 1999). En Argentina, Yacubson (1963) realizó el primer relevamiento de las desmidiáceas en estos ambientes, el cual se complementó más tarde con los estudios de Mataloni (1991, 1995a) y Lenzenweger (1993). En las lagunas de las turberas fueguinas se han encontrado organismos con características particulares, como ser una nueva especie de hongo parásito del dinoflagelado *Peridinium willei* Huitfeldt-Kaas (Boltovskoy, 1984), Chrysophyceae escamosas (Vigna, 1993), y cianobacterias raras (Mataloni, 1995b), lo que destaca la importancia de estos ecosistemas como reservorios de biodiversidad planctónica.

Dentro del área de la turbera de Rancho Hambre, Mataloni & Tell (1996) realizaron el primer estudio de la estructura del fitoplancton en cinco cuerpos de agua y el río Lasifashaj, en relación con diversos factores ambientales. Las frecuencias relativas de algunos grupos taxonómicos mostraron fuertes correlaciones con factores físicoquímicos, tales como el pH, la conductividad y el fósforo inorgánico disuelto. Por otra parte, un análisis de agrupamiento en base a la composición florística separó a las lagunas en dos grupos, caracterizados por taxocenosis bien diferentes entre sí, tanto en número de especies como en composición taxonómica. Los factores que explicaron estas diferencias florísticas fueron las características morfométricas (área, profundidad media) y la conductividad de las lagunas. Este estudio reveló que los cuerpos de agua dentro de la turbera son ambientes muy heterogéneos, y que esta variabilidad ambiental sería un factor crucial en la determinación de la estructura y composición del fitoplancton.

En un trabajo posterior, Mataloni (1999) estudió las comunidades microalgales en cuerpos de agua de seis turberas localizadas en distintos valles glaciarios del extremo sudoeste de la provincia. Un análisis de correspondencia basado en las frecuencias

relativas de las especies dominantes, mostró que las lagunas de las distintas turberas se agruparon entre sí en función de su estado minerotrófico vs. ombrotrofico, el que determina el pH y la conductividad de sus aguas, mientras que la cercanía geográfica o la pertenencia a una misma cuenca no fueron variables influyentes.

Estos antecedentes sugieren cuáles factores ambientales determinan la biodiversidad del fitoplancton de los cuerpos de agua de la turbera de Rancho Hambre. Sin embargo, ambos estudios (Mataloni & Tell, 1996; Mataloni, 1999) se basaron en datos de un único muestreo temporal, lo cual genera incógnitas acerca de la dinámica de los factores ambientales y su influencia sobre las otras comunidades planctónicas de turbera.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El **objetivo general** de la presente Tesis es caracterizar las comunidades microbianas planctónicas, con énfasis en las bacterias heterótrofas (BH) y los flagelados heterótrofos (FH), y su relación con parámetros ambientales en distintos ambientes de la turbera de Rancho Hambre (Tierra del Fuego) a lo largo de dos períodos de aguas abiertas consecutivos.

Los **objetivos específicos** son:

1. Analizar cuáles variables abióticas (morfométricas, hidrológicas o físico-químicas) o bióticas (potenciales depredadores o competidores por recursos) influyen sobre la dinámica estacional de la abundancia, biovolumen y biomasa de las BH y los FH de las lagunas de la turbera.

2. Estudiar las propiedades descriptoras de la comunidad de BH (abundancia, biomasa, morfología y parámetros citométricos) de los cuerpos de agua de la turbera; combinando técnicas de microscopía de epifluorescencia, análisis de imágenes y citometría de flujo.

3. Analizar de forma comparativa las estimaciones de abundancia y tamaño celular promedio de las BH obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo, así como la eficiencia de los distintos fijadores comúnmente utilizados para citometría de flujo.

4. Comparar la comunidad de BH que habita el agua intersticial del *Sphagnum* con la de los cuerpos de agua mediante citometría de flujo.

Las **hipótesis** que se plantearon son:

1. La morfometría de las lagunas, así como el pH y la conductividad de sus aguas influyen sobre la dinámica estacional de los parámetros descriptores de las BH y los FH.
2. La abundancia y composición del metazooplancton regulan la abundancia de los FH de las lagunas de la turbera.
3. Las condiciones abióticas de la turbera, en particular la gran cantidad de materia orgánica disuelta, no interfieren en el estudio de las BH mediante citometría de flujo. Además, dicho estudio es más eficiente cuando se utiliza el fijador Paraformaldehído+Glutaraldehído.
4. Las poblaciones citométricas de BH que habitan el agua intersticial del *Sphagnum* difieren de aquellas que habitan los cuerpos de agua.

**MATERIALES Y MÉTODOS
GENERALES**

Área de estudio

La provincia de Tierra del Fuego (52°40' – 55°03' S, 65°06' – 68°36' E) se localiza en la Isla Grande de Tierra del Fuego, y se encuentra separada del continente por el estrecho de Magallanes. La isla está conformada por dos placas tectónicas: la Sudamericana al norte y la de Scotia al sur. El límite entre ambas placas está definido por un sistema de fallas que se conoce como Sistema de fallas Magallanes-Fagnano (Buffoni *et al.*, 2009). Grandes planicies caracterizan a la placa Sudamericana, mientras que los Andes fueguinos se observan en dirección oeste-este sobre la placa de Scotia (Rabassa *et al.*, 2006). El clima de la región es templado-frío húmedo, condicionado por masas de aire polares y subpolares. La temperatura está influenciada por la baja insolación durante los meses de invierno, el enfriamiento por ascenso de las masas de aire que penetran en las cuencas y la inversión del gradiente térmico altitudinal. Entre los meses de mayo y septiembre se registran heladas y cobertura nival. Las precipitaciones están condicionadas por barreras orográficas que bloquean el aire húmedo del sur y suroeste (Roig & Collado, 2004).

Iturraspe & Urciuolo (2000) dividieron la provincia de Tierra del Fuego en cuatro cuencas hidrológicas. La cuenca de la zona norte (estepa) comprende a todos los ríos localizados al norte del río Grande, donde las tasas de flujo de la cuenca son pequeñas, y los ambientes lénticos son escasos, someros y de origen eólico. La cuenca de la zona central (transición) comprende el área del Ecotono donde predominan las llanuras onduladas con cursos de agua meandrosos. Aquí una gran proporción del flujo de los valles está ocupado por humedales y turbales. Península Mitre, un área baja, mayormente cubierta por turberas con un muy lento drenaje, constituye la cuenca de la zona este (turbales). Por último, la cuenca de la zona sur (cordillera) está delimitada por los Andes fueguinos al norte y por el canal de Beagle al sur. El área presenta una red de drenaje densa, con ríos en pendiente hacia los valles de turberas, los cuales contienen pequeños cuerpos de agua. Dentro de esta cuenca se localiza el valle de Tierra Mayor, el que fue esculpido por intensos procesos glaciares durante las glaciaciones cuaternarias (Roig & Collado, 2004). Este valle tiene una orientación oeste-este, y su fondo alberga un gran sistema de turberas, incluyendo a la turbera de Rancho Hambre, el área de estudio de esta tesis doctoral (Figura 1.1).

Figura 1.1: Fotografía de la turbera de Rancho Hambre.

La turbera de Rancho Hambre está delimitada hacia el norte por la ruta J que bordea el faldeo de la montaña, hacia el este y el oeste por dos arroyos que colectan el agua que escurre por la ladera norte hacia el fondo del valle, y hacia el sur por el río Lasifashaj, donde escurren los arroyos laterales (Grootjans *et al.*, 2010) (Figura 1.2). El área central de Rancho Hambre presenta la forma característica en domo que define a las turberas ombrotáficas elevadas, y está alimentada sólo por precipitación y descongelamiento de nieve (Roig, 2004; Roig & Roig, 2004). La vegetación del área se encuentra dominada por el musgo *Sphagnum magellanicum* Bridel. Los valores promedio mensuales de temperatura del aire y precipitaciones durante el período de estudio fueron 4,1°C y 60 mm, respectivamente. Además, predominaron los vientos de dirección oeste, coincidiendo con la orientación oeste-este del valle y de los cuerpos de agua. Las velocidades promedio mensuales oscilaron entre 5,3 y 8,7 Km h⁻¹, registrándose máximos de 104,6 Km h⁻¹ (González Garraza, 2012).

Diseño de muestreo

Se estableció una transecta a través del domo de la turbera, desde la ruta J hasta la ribera del río Lasifashaj. Sobre ésta se seleccionaron cinco cuerpos de agua representativos de los dos tipos de morfologías características del ambiente estudiado. (González Garraza *et al.*, 2012). RH1, RH2 y RH4 son cuerpos de agua relativamente

grandes y profundos, siendo RH4 el cuerpo de agua más grande dentro de la turbera; mientras que RH3 y RH5 son más pequeños y someros (Figura 1.2, Tabla 1.1). Se seleccionaron de uno a cuatro puntos de muestreo dentro de cada laguna de acuerdo a su tamaño. En RH1 y RH2 se establecieron tres puntos de muestreo: orilla, centro superficie y centro fondo, y en RH4 se seleccionaron cuatro puntos de muestreo: orilla norte, orilla sur, centro superficie y centro fondo. Para muestrear el punto centro fondo se utilizó una botella limnológica Van Dorn de 5L, la que se suspendió con su borde inferior a 10 cm por encima del fondo para evitar la resuspensión de sedimentos. Los cuerpos de agua pequeños y someros RH3 y RH5 se muestrearon sólo desde la orilla. En febrero de 2010 se realizó además un muestreo del agua intersticial del capítulo (zona apical) del musgo *Sphagnum magellanicum*, en ocho puntos (RH A – RH H), algunos de ellos a las orillas de los cuerpos de agua, y otros alejados de los mismos (Figura 1.2, Tabla 1.2). La posición de los puntos de muestreo se determinó mediante un GPS (Garmin, U.S.A.).

Figura 1.2: Mapa de la turbera de Rancho Hambre. Se indican los cuerpos de agua estudiados en negro (RH1 a RH5), y los puntos donde se analizó el agua intersticial del *Sphagnum* (A a H).

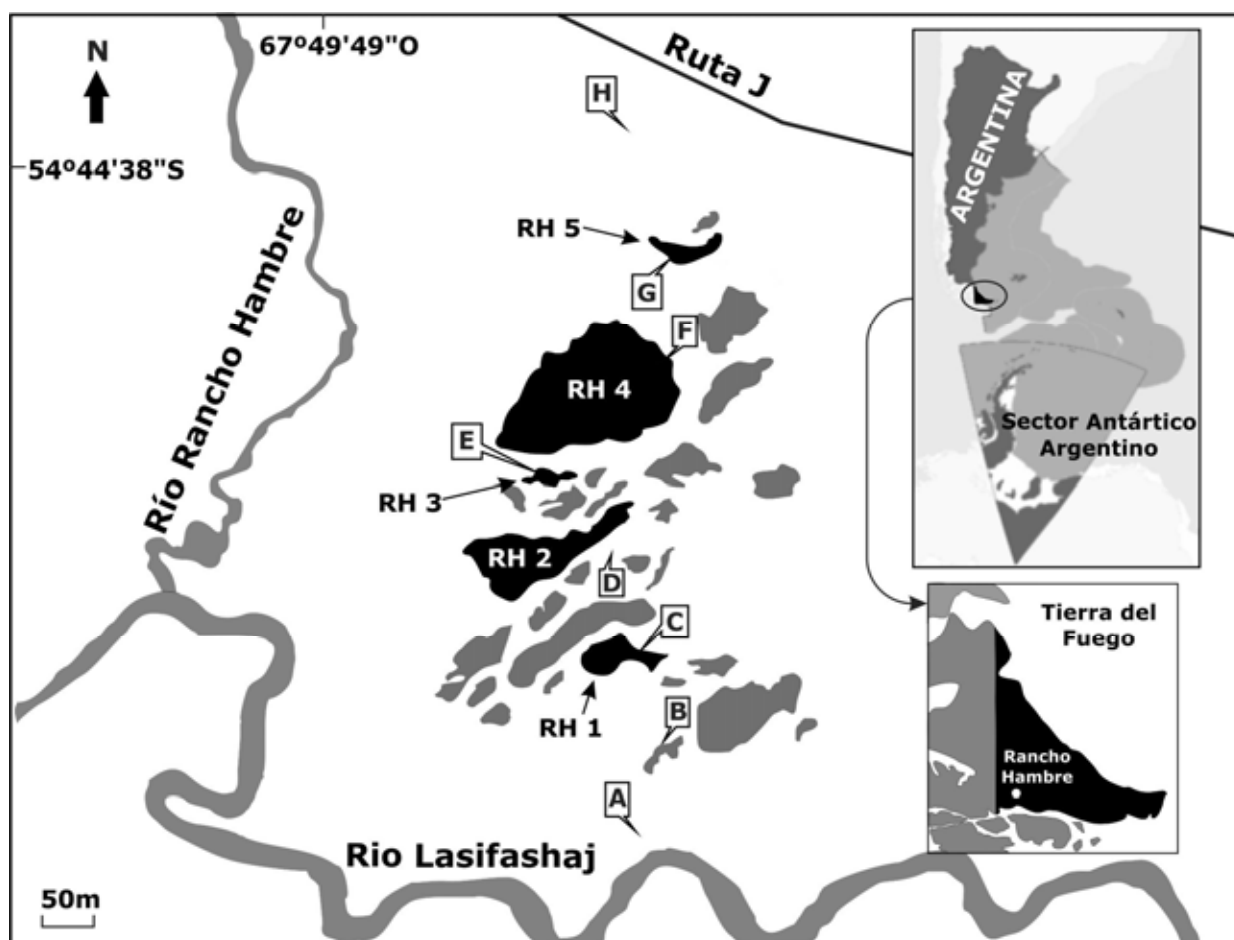


Tabla 1.1: Ubicación geográfica y características morfométricas de los cinco cuerpos de agua estudiados en la turbera de Rancho Hambre (Tierra del Fuego).

Laguna	RH 1	RH 2	RH 3	RH 4	RH 5
Latitud (S)	54° 44' 52,87"	54° 44' 48,61"	54° 44' 46,75"	54° 44' 41,51"	54° 44' 39,35"
Longitud (O)	67° 49' 29,44"	67° 49' 31,66"	67° 49' 32,21"	67° 49' 31,69"	67° 49' 26,7"
Long. máx. efect. (m)	81,9	162,9	50,7	195,7	34,5
Ancho máx. efect. (m)	28,5	66,2	10,5	122,9	12,7
Prof. máx. (cm)	95	150	33	150	33
Perímetro (m)	238	445	115	555	162
Área (m ²)	1824	5976	137	16190	542
DCL	1,6	1,6	2,1	1,2	2,0

DCL: índice de desarrollo de línea de costa.

Tabla 1.2: Ubicación geográfica de los ocho puntos donde se estudió el agua intersticial del *Sphagnum* en la turbera de Rancho Hambre (Tierra del Fuego).

Sitio	Latitud (S)	Longitud (O)	Cuerpo de agua próximo*
RH A	54° 44' 58.1"	67° 49' 29.8"	
RH B	54° 44' 55.4"	67° 49' 28.8"	
RH C	54° 44' 52"	67° 49' 29.7"	RH 1
RH D	54° 44' 49.1"	67° 49' 31.3"	
RH E	54° 44' 46.5"	67° 49' 33.3"	RH 3
RH F	54° 44' 43"	67° 49' 28.1"	RH 4
RH G	54° 44' 39.6"	67° 49' 27.8"	RH 5
RH H	54° 44' 35"	67° 49' 30.7"	

* Se indica la proximidad a los cuerpos de agua (RH1 a RH5).

Régimen de muestreo

Los cinco cuerpos de agua fueron muestreados en ocho ocasiones durante dos períodos de aguas libres (de octubre a abril) consecutivos desde octubre de 2008 hasta abril de 2010. La frecuencia de muestreo se determinó en función del ciclo hidrológico del sistema: octubre –luego del deshielo de primavera; diciembre –pico de descarga a comienzo del verano; febrero –período de estiaje en el verano tardío; abril –pre-congelamiento de otoño. En particular, el relevamiento del agua intersticial del *Sphagnum* se realizó durante el muestreo de febrero de 2010.

En el Capítulo I se caracterizó a las comunidades planctónicas (desde el bacterioplancton hasta el zooplancton) utilizando métodos de microscopía tradicionales, en relación con factores ambientales, a lo largo de los dos períodos consecutivos de aguas abiertas en las cinco lagunas. En el Capítulo II se estudió particularmente a las bacterias heterótrofas de los cinco cuerpos de agua a lo largo del segundo período de aguas abiertas utilizando un enfoque polifásico: microscopía de epifluorescencia – análisis de imágenes y citometría de flujo, en relación con la concentración y calidad de la materia orgánica disuelta. En el Capítulo III se estudió comparativamente a la comunidad de bacterias heterótrofas del agua intersticial del *Sphagnum* con la de los cuerpos de agua utilizando la técnica de citometría de flujo en relación con factores ambientales.

Los detalles de las técnicas utilizadas en cada caso se describen a continuación.

Parámetros abióticos

✓ **Mediciones hidrológicas**

Los niveles hidrométricos se registraron cada tres semanas durante el período de aguas libres. Se utilizaron tubos de plástico (PVC) de 40 mm de diámetro insertados verticalmente en la turba ubicados a orillas de los cuerpos de agua. Los niveles hidrométricos se midieron como las profundidades hasta el tope de los tubos de PVC utilizando una cinta métrica. Luego, se realizó un muestreo topográfico usando una estación total PENTAX R-326EX para referenciar las mediciones del nivel hidrométrico de todos los cuerpos de agua a metros sobre el nivel del mar.

✓ **Variables Físicas y Químicas**

En cada sitio de muestreo se determinó *in situ* la temperatura, el pH, la conductividad y el oxígeno disuelto utilizando un sensor multiparamétrico de campo (HORIBA, Japón), y se recolectaron muestras de agua para realizar los análisis químicos en botellas plásticas, previamente lavadas con una solución de ácido clorhídrico al 2% y enjuagadas con agua destilada-deionizada, las cuales fueron transportadas al laboratorio en condiciones de frío y oscuridad. Las muestras de agua para el estudio de los nutrientes disueltos fueron filtradas a través de filtros de fibra de vidrio Millipore APFF de 0,7 μm de tamaño de poro. Las concentraciones de: amonio (N-NH_4), nitratos (N-NO_3) + nitritos (N-NO_2) y fósforo reactivo soluble (PRS) fueron determinadas de acuerdo a los métodos del salicilato (método Hach N° 8155), reducción del cadmio – diazotización (método Hach N° 8192) y ácido ascórbico (método Hach N° 8048), respectivamente, utilizando un espectrofotómetro Hach DR2800 (Hach Company, EE.UU..) y los kits de reactivos correspondientes, según

los métodos descritos en el Manual de Procedimientos Hach del DR2800 (www.hach.com). La concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) se calculó como la suma de la concentración de amonio más la concentración de nitratos + nitritos. La concentración del carbono orgánico disuelto (COD) se determinó en las instalaciones del Instituto Nacional del Agua (INA) utilizando un método de oxidación catalítica Pt de alta temperatura (Analizador Shimadzu TOC-5000A, Técnica SM 5310B, límite de detección: $0,1 \text{ mg L}^{-1}$) siguiendo las recomendaciones de Sharp y colaboradores (1993). Se midieron las absorbancias sobre muestras de agua filtradas para las longitudes de onda: 250, 254, 320, 365, 440 y 750 nm, con las cuales se calcularon los índices de calidad de la materia orgánica disuelta: a_{440} , estimador de la cantidad de C coloreado de origen terrestre potencialmente disponible para los consumidores del lago (Carpenter *et al.*, 2005); $SUVA_{254}$, estimador de la aromaticidad de COD (Weishaar *et al.*, 2003) y E2:E3, un índice que se correlaciona negativamente con el tamaño molecular promedio (Peuravuori & Pihlaja, 1997).

Por otro lado, se determinaron las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} individualmente como CaCO_3 (mg L^{-1}) en muestras de agua sin filtrar a través del método colorimétrico de la calmagita (método Hach N° 8030), utilizando un espectrofotómetro Hach DR 2800 (Hach Company, EE.UU.) y el kit de reactivos correspondiente. Luego, la dureza total ($\text{mg equiv. CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) se calculó en base a las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} de acuerdo a las ecuaciones del método estándar 2340C (APHA, 1995). Las concentraciones de N y P totales (NT y PT, respectivamente) se determinaron realizando una digestión con persulfato de potasio y ácido bórico de muestras de agua sin filtrar (APHA, 1995), sobre la cual se midieron las concentraciones de nitratos + nitritos y PRS de acuerdo a los métodos Hach previamente descritos.

Parámetros biológicos

✓ Clorofila *a* fitoplanctónica

Se filtró un volumen conocido de agua a través de un filtro de fibra de vidrio Millipore APFF de $0,7 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, y se realizó la extracción de los pigmentos fotosintéticos con etanol caliente ($60-70^\circ\text{C}$) según Nusch (1980). La concentración de clorofila *a* libre de feopigmentos se determinó por espectrofotometría midiendo las absorbancias a 665 y 750 nm antes y después de acidificar con HCl 0,1N, de acuerdo a las ecuaciones de Marker y colaboradores (1980).

Comunidades planctónicas

✓ Estudio polifásico de las Bacterias Heterótrofas (BH)

i. *Microscopía de Epifluorescencia*: En cada sitio de muestreo se tomaron muestras de agua en recipientes plásticos de 120 mL y se fijaron *in situ* 108 mL de muestra con 12 mL de glutaraldehído frío 10% (1% concentración final). Antes de las 24 hs se filtraron submuestras de 2 a 5 mL a través de membranas de policarbonato negras de 0,2 μm de tamaño de poro, agregándose 4.6 diamidino-2-fenilindole (DAPI, concentración final 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como colorante para la tinción del ADN, de acuerdo al procedimiento descrito por Porter & Feig (1980). Los filtros se montaron entre porta y cubreobjetos con aceite de inmersión apto para epifluorescencia y se preservaron en freezer a -20°C . Los recuentos se realizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX40F4 (Olympus, Japón) bajo un aumento de 1000x. Las BH (teñidas con DAPI) se contaron excitando con radiación UV (340-390 nm). Este método no permite diferenciar las arqueas de las eubacterias, por lo que en este trabajo se incluirán todas dentro de las BH. Se contaron tantos campos como fueran necesarios para alcanzar un error inferior al 10% en la estimación de la abundancia (Venrick, 1978). El error porcentual de los recuentos se calculó según Venrick (1978) utilizando la fórmula:

$$\text{error \%} = \left[\frac{\text{DS}}{\sqrt{n}} * t_{(\alpha, 1-n)} * X^{-1} \right] * 100$$

donde DS es el desvío estándar, n es el número de campos, X es la media y t es el valor de t-Student con $\alpha = 0,05$.

ii. *Análisis de imágenes*: Los preparados de epifluorescencia se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado para fluorescencia y dotado de una cámara Nikon DS-Fi1. Las imágenes se analizaron mediante el programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics), y se calcularon los parámetros celulares: área (μm^2), perímetro (μm), longitud (μm), ancho (μm), MinFerret (μm , valor mínimo de las tangentes de α : 0, 10, 20, a 180° del objeto), MaxFerret (μm , valor máximo de las tangentes de α : 0, 10, 20, a 180° del objeto), volumen (μm^3), utilizando las secuencias de macros y las fórmulas para cálculo de volumen propuestas por Massana *et al.* (1997). Se estudiaron en promedio 235 células por muestra. En base a los parámetros celulares se calcularon la elongación ($\text{elongation} = \text{MaxFerret}/\text{MinFerret}$) y la circularidad ($\text{circularity} = 4 * \pi * \text{área} * \text{perímetro}^{-2}$) de cada célula (Posch *et al.*, 2009). Luego, se utilizó el procedimiento descrito por Posch *et al.* (2009) para determinar la contribución de los distintos morfotipos bacterianos a la abundancia total (Figura 1.3). La conversión de

biovolumen a biomasa se realizó utilizando la relación carbono-volumen derivada por Norland (1993) de los datos de Simon & Azam (1989).

Figura 1.3: Procedimiento para determinar la contribución de los distintos morfotipos bacterianos a la abundancia total, en base a los parámetros celulares determinados con análisis de imágenes.

Se remueven en cada paso sucesivo solo las células que cumplen los requisitos

	<u>Filtro:</u>		<u>Morfotipo:</u>
	no hay filtros	→	Todas las bacterias
A.	Longitud > 5µm	→	Filamentos
B.	Elongación > 2,3 Circularidad < 0,85	→	Bacilos grandes
C.	1,1 < Elongación < 5 Circularidad < 0,7	→	Vibrios
D.	Elongación < 2,5 0,5 < Circularidad = 1 MaxFerret > 0,6 µm	→	Cocos grandes
E.	Circularidad < 0,95	→	Bacilos Pequeños
F.	Circularidad > 0,95	→	Cocos pequeños
G.	sin restricciones	→	Morfotipos raros

iii. *Citometría de Flujo:* Las muestras para citometría de flujo se tomaron utilizando tres fijadores: a) Paraformaldehído 1% + Glutaraldehído 0,05% (P+G), b) Glutaraldehído 1% (Gluta) y c) Paraformadehído 1% (PFA) (concentraciones finales); con el fin de evaluar la eficiencia de cada fijador. Las muestras se colectaron en crioviales de 4,5 ml de capacidad y se fijaron en oscuridad (4 mL de muestra + 0,4 mL de fijador), luego se preservaron a -80°C hasta su posterior análisis. El estudio del bacterioplancton se realizó mediante un citómetro de flujo FACSAria II (Becton Dickinson, U.S.A.) equipado con un láser azul (488 nm emisión) y uno rojo (633 nm emisión). Este citómetro permite adquirir hasta seis parámetros simultáneamente: 4 colores (FL1, FL2, FL3 y FL4) además de la luz dispersada en un ángulo de 2-15° (forward scatter, FSC) y la luz dispersada en un ángulo de 90° (side scatter, SSC). El FL1 corresponde a la fluorescencia verde luego de excitarse con luz azul (488 nm excitación, 530/30 nm BP emisión) lo que permitió identificar a los organismos que fueron teñidos con SybrGreen I (i.e. BH). El FL2 es la fluorescencia naranja luego de excitarse con luz azul (488 nm excitación, 585/42 nm BP emisión) que permitió detectar la autofluorescencia de la ficoeritrina. El FL3 corresponde a

la fluorescencia roja luego de excitarse con luz azul (488 nm excitación, 670 nm LP emisión) que permitió detectar la autofluorescencia de la clorofila *a*. El FL4 es la fluorescencia roja luego de excitarse con luz roja (635 nm excitación, 661/61 nm BP emisión) que corresponde a la autofluorescencia de la ficocianina. El FSC está relacionado con el tamaño y morfología de las partículas; mientras que el SSC está asociado con la complejidad interna de la célula, y en partículas pequeñas también con el tamaño. Para el análisis, se tiñó una submuestra de 400 μ l con 2 μ l de Sybr-Green I (494/521). Como estándar interno se utilizó una solución de microesferas de látex fluorescentes (Fluospheres® carboxylate modified microspheres, 1 μ m yellow-green fluorescent 505/515, Molecular Probes), de tamaño y fluorescencia constante, la que se adicionó a cada muestra antes de ser analizada. Las bacterias heterótrofas se detectaron en citogramas de SSC vs. FL1 y FL3 vs. FL1 siguiendo el criterio de Gasol & del Giorgio (2000).

✓ **Picofitoplancton y Flagelados Heterótrofos (FH)**

La abundancia de picoalgas y FH fue determinada mediante recuentos con microscopio de epifluorescencia. Las muestras de agua se recolectaron y se trataron según lo descrito previamente para las BH. Se filtraron submuestras de 2 a 5 mL a través de membranas de 0,2 μ m de tamaño de poro en el caso de las picoalgas, mientras que para los FH se filtraron submuestras de 8 a 25 mL a través de membranas de 0,8 μ m de tamaño de poro. Los filtros se prepararon y conservaron de acuerdo a lo descrito anteriormente, y los recuentos se realizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX40F4 (Olympus, Japón) bajo un aumento de 1000x. Las algas piceucariotas (PE) se observaron excitando con luz azul (460-495 nm) y las picocianobacterias (PC) con luz azul y verde (530-550 nm) (Callieri & Pinolini, 1995). Bajo excitación con luz azul las PE se ven rojas, debido a la autofluorescencia de la clorofila *a* y las PC se ven amarillas (células ricas en ficoeritrina) o rojas oscuras (células ricas en ficocianina), dependiendo de la presencia o ausencia de ficoeritrina. Excitadas con luz verde las PC se ven amarillas/naranjas (células ricas en ficoeritrina) o rojas (células ricas en ficocianina) (Callieri, 2008). Con el fin de enumerar a los FH, se identificó excitando con radiación UV (340-390 nm) a todos los flagelados (teñidos con DAPI), y luego con luz azul se verificó la ausencia de pigmentos fotosintéticos. Se aceptó un error máximo del 20% en la estimación de la abundancia de ambas comunidades según Venrick (1978).

El tamaño de las células se estimó mediante análisis de imágenes. Los preparados de epifluorescencia se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i

equipado para fluorescencia y dotado de una cámara Nikon DS-Fi1. Las imágenes se analizaron mediante el programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics) y se calcularon los respectivos tamaños celulares utilizando la aproximación a formas geométricas descrita por Hillebrand *et al.* (1999). Para la conversión de biovolumen a biomasa se utilizaron los factores de conversión a carbono según Søndergaard *et al.* (1991) y Børsheim & Bratbak (1987) para las PE y los FH, respectivamente. Los recuentos y la estimación de biovolumen y biomasa de las picoalgas fueron realizados por la Dra. Gabriela González Garraza en el marco de su tesis doctoral (González Garraza, 2012).

✓ **Nano- y microfitoplancton**

Para el estudio cualitativo se recolectaron muestras concentradas con una red de plancton de 18 μm de tamaño de poro por arrastre en la zona limnética de los cuerpos de agua profundos; mientras que en los cuerpos de agua someros se tomó un volumen aproximado de 50 L de agua con balde, el cual se filtró por la red de plancton con el fin de evitar la resuspensión de los sedimentos poco consolidados del fondo. Una submuestra se observó *in vivo* y otra se preservó con formol al 4%. La flora microalgal se identificó utilizando una vasta cantidad de bibliografía, la cual incluyó los trabajos florísticos de West & West (1904, 1905, 1908, 1912, 1922), Irénée-Marie (1939), Cosandey (1964), Komárek & Fott (1983), Krammer & Lange-Bertalot (1986, 1988, 1991), Komárek & Anagnostidis (1999, 2005), así como los estudios previos del fitoplancton de turberas de Tierra del Fuego (Mataloni, 1991; 1995a; 1995b; 1997). Para el análisis cuantitativo se recolectaron muestras por duplicado en frascos plásticos de 120 mL y se preservaron con una solución ácida de lugol al 1%. Las muestras se dejaron sedimentar al menos por 24 hs en cámaras de 10 mL y los recuentos se realizaron en un microscopio invertido Olympus bajo un aumento de 400x según el método de Utermöhl (1958). Se aceptó un error máximo del 20% en la estimación de la abundancia de la especie dominante según Venrick (1978).

Los volúmenes promedio de las especies del nano- y microfitoplancton se estimaron utilizando las aproximaciones a formas geométricas descritas por Hillebrand *et al.* (1999). La biomasa se calculó utilizando los factores de conversión a carbono según Reynolds (2006).

Las especies del nano- y microfitoplancton se clasificaron en función de sus estrategias nutricionales en dos grupos: fitoplancton autótrofo (FA) y flagelados mixótrofos (FM). La clasificación de los FM se realizó en base a datos bibliográficos. Se consideraron mixótrofos sólo aquellos taxones fitoplanctónicos presentes en las lagunas de Rancho Hambre para los cuales estudios experimentales previos demostraban su capacidad de

fagotrofia; entre ellos *Ochromonas* spp. (Boëchat *et al.*, 2007), *Dinobryon sertularia* (Bird & Kalff, 1987), dinoflagelados (Loeblich III, 1984; Stoecker, 1999), *Cryptomonas* spp. (Lepistö & Holopainen, 2003; Danilov & Ekelund, 2001; Urabe *et al.*, 2000) y *Dictyochophyceae* (Sekiguchi *et al.*, 2003). El estudio del nano- y microfitoplancton fue llevado a cabo por la Dra. Gabriela González Garraza en el marco de su tesis doctoral (González Garraza, 2012).

✓ **Ciliados**

En cada sitio de muestreo se recolectaron muestras de agua por duplicado con bidones de plástico de boca ancha y se fijaron *in situ* con lugol acético al 2% (Finlay & Guhl, 1992). Las muestras se dejaron decantar por 24 hs, y luego se redujo el volumen a 120 mL. Además se colectaron muestras vivas, preservadas en frío, con las cuales se desarrollaron cultivos en laboratorio. La identificación de especies se realizó utilizando el método de impregnación con protargol descrito por Wilbert (1975), junto con la observación de muestras vivas en lupa binocular y microscopio óptico. La clasificación se realizó de acuerdo a Lynn (2008), y la identificación de especies se basó en los trabajos de Kahl (1930, 1931, 1932, 1935), Foissner & Berger (1996), Foissner y colaboradores (1991, 1992, 1994, 1995, 1999), y trabajos taxonómicos específicos. Las muestras se dejaron sedimentar en cámaras de 10 mL por 24 hs y se realizaron los recuentos utilizando un microscopio invertido bajo un aumento de 150x y 600x (Utermöhl, 1958).

Los volúmenes de las especies de ciliados se estimaron a partir de células fijadas con lugol utilizando las aproximaciones a formas geométricas descritas por Hillebrand *et al.* (1999). Estos valores fueron corregidos en función de la contracción causada por el fijador de acuerdo a Müller & Geller (1993). La biomasa se estimó utilizando el factor de conversión a carbono según Putt & Stoecker (1989).

De las 125 especies de ciliados que se registraron en las lagunas (González Garraza, 2012) sólo siete taxones representaron en promedio el 86% de la abundancia total de ciliados. Por esta razón se analizaron dichos taxones individualmente, mientras que los demás fueron agrupados como ciliados poco abundantes. El estudio de los ciliados fue realizado por la Dra. Gabriela Küppers en el marco del mismo proyecto de investigación que esta Tesis.

✓ **Amebas tecadas**

Las amebas tecadas viven principalmente asociadas a sustratos y son un grupo abundante y diverso en el agua intersticial del *Sphagnum* spp. (Mieczan, 2010a, 2010b; Mitchell *et al.*, 2000). Por esta razón, se recolectaron muestras por duplicado para estudiar esta comunidad sólo en las orillas de los cuerpos de agua, filtrando 35 L de agua a través de una red de 15 μm de tamaño de poro, y fijando el filtrado con una solución de Lugol ácido al 1% (Finlay & Guhl, 1992). Las muestras se dejaron sedimentar en cámaras de 10 mL por 24 hs y se realizaron los recuentos utilizando un microscopio invertido bajo un aumento de 400x de acuerdo a la técnica de Utermöhl (1958).

✓ **Metazooplancton**

Para el estudio cualitativo se recolectaron muestras concentradas utilizando una red de plancton de 110 μm de tamaño de poro para el mesozooplancton (cladóceros, copépodos adultos y copepoditos) y otra red de 53 μm de tamaño de poro para el microzooplancton (nauplii de copépoda y rotíferos), por arrastre diagonal en la zona limnética de los cuerpos de agua profundos; mientras que en los cuerpos de agua someros se tomó un volumen aproximado de 50 L de agua con balde, el cual se filtró por la red de plancton con el fin de evitar la resuspensión de los sedimentos poco consolidados del fondo. Las muestras se fijaron *in situ* con etanol 96%. Además se tomaron muestras cuantitativas por duplicado, utilizando una botella limnológica de Van Dorn de 5 L se filtraron entre 5 y 20 L de agua a través de un tamiz de 53 μm de tamaño de poro, las cuales se fijaron *in situ* con formaldehído al 4%. El mesozooplancton se submuestreó con un dispositivo de Russell, y los recuentos se realizaron en una cámara de Bogorov de 5 mL utilizando una lupa binocular. El microzooplancton se submuestreó con una pipeta de Hensen Stempel y los recuentos se realizaron en una cámara de Sedgewick-Rafter de 1 mL utilizando un microscopio óptico. Se analizaron las submuestras necesarias (mínimo tres) para alcanzar un error menor al 10% en la estimación de la abundancia (José de Paggi & Paggi 1995). La identificación taxonómica se basó en los trabajos de Reid (1985) y Bayly (1992) para copépodos; Paggi (1979, 1995), Smirnov (1992), Orlova-Bienkowskaja (1998) y Benzie (2005) para cladóceros; y Ruttner-Kolisko (1974), Boltovskoy & Urrejola (1977) y Voigt & Koste (1978) para rotíferos.

Los volúmenes promedio de cada especie de rotíferos (μm^3 en peso húmedo) se estimaron aplicando las fórmulas geométricas descritas por Ruttner-Kolisko (1977), considerando un peso específico igual a 1. Luego se transformaron a peso seco asumiendo que éste equivalía al 10% del peso húmedo, excepto para el género

Asplancha que correspondió al 3,9% (Dumont *et al.*, 1975). El peso seco de los cladóceros y copépodos se calculó a partir de las regresiones de longitud - peso seco según Bottrell *et al.* (1976). La biomasa del metazooplancton, expresada como contenido de carbono se estimó como el 48% de su peso seco de acuerdo a los estudios de rotíferos de Rossa *et al.* (2007) y de microcrustáceos de Andersen & Hessen (1991).

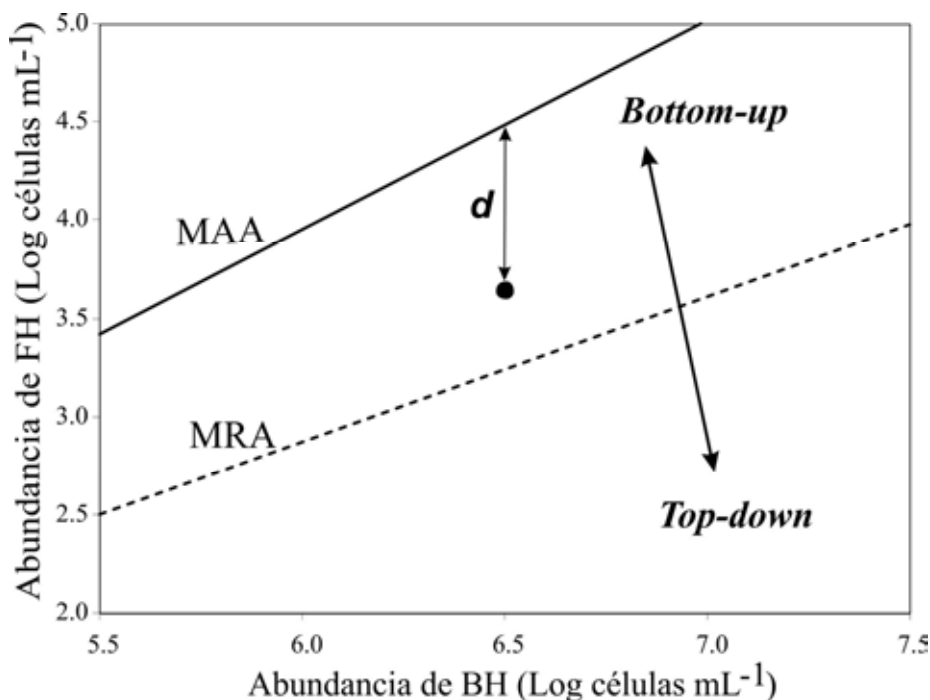
El metazooplancton se clasificó de acuerdo a sus características taxonómicas y tróficas en los siguientes grupos “taxonómico- tróficos”: rotíferos microfiltradores (RMF), nauplii de copépoda microfiltradores (NMF), cladóceros filtradores (CF), copépodos omnívoros (CO) y predadores (P, este grupo incluye copépodos adultos Cyclopoida y rotíferos predadores). Dentro de los rotíferos, los predadores raptos fueron clasificados como predadores, mientras que los demás fueron clasificados como RMF. El estudio del metazooplancton fue realizado por la Lic. Cristina Marinone y la Dr. Silvina Menu Marque en el marco del mismo proyecto de investigación que esta Tesis.

Análisis de datos

✓ **Modelo empírico**

Basado en una amplia base de datos que incluía tanto aguas oceánicas como cuerpos de agua dulce en un amplio gradiente de condiciones tróficas, Gasol (1994) propuso un modelo empírico que permite inferir la importancia de los procesos de regulación por disponibilidad de presas (*bottom-up*) vs. depredación (*top-down*) a los que se ve sujeta la abundancia de los FH. El modelo consiste en un espacio bivariado cuyos ejes corresponden a las abundancias transformadas (Log_{10}) de BH y FH (Figura 2). El autor calculó una ecuación lineal que representa la abundancia máxima que pueden alcanzar los FH para una dada densidad de bacterias, considerando un amplio rango de abundancias de BH (10^5 a $3,2 \times 10^7$ células mL^{-1}) (MAA -*maximum attainable abundance*) y asumiendo que los FH se alimentan sólo de BH. Asimismo, calculó otra ecuación lineal que representa la abundancia promedio de los FH para una dada abundancia de BH (MRA -*mean realized abundance*). Esta recta MRA se utiliza como referencia para interpretar la importancia relativa de cada tipo de regulación. Si los puntos se ubican por debajo de esta línea media se sugiere que la abundancia de los FH está regulada mayormente por procesos de depredación (*top-down*); mientras que en el caso de que los puntos se encuentren cercanos a la recta MAA, los procesos de regulación por disponibilidad de recursos (*bottom-up*) serían más importantes.

Figura 1.1: Modelo empírico propuesto por Gasol (1994) que permite estimar la importancia relativa de los mecanismos de control de la abundancia de los FH (*bottom-up* vs. *top-down*). MAA: *maximun attainable abundance*, MRA: *mean realized abundance*, d: distancia D.



La diferencia entre la abundancia de HF observada en el sistema y su máxima densidad posible predicha por la recta MAA para el valor de abundancia de bacterias observado representa el grado de desacople entre las abundancias de HF y BH (distancia D). Este parámetro puede correlacionarse con las abundancias de los potenciales predadores de los FH (Gasol, 1994).

✓ **Estimaciones de tamaño celular promedio (TC) de las BH**

Se estimó el TC bacteriano en base a parámetros citométricos utilizando dos fórmulas descriptas en la bibliografía (Gasol & del Giorgio, 2000; Tadonlécé *et al.*, 2005).

Gasol & del Giorgio (2000) utilizaron el protocolo de Massana y colaboradores (1997) para medir el TC de bacterias planctónicas del lago Cromwel en Quebec, Canadá (rango de TC: 0,03 - 0,09 μm^3) y lo relacionaron con el parámetro citométrico FL1, obteniendo la regresión lineal:

$$\text{TC} [\mu\text{m}^3] = 0,0075 + 0,11 * \text{FL1} \quad (1)$$

Por otro lado, Tadonlécé y colaboradores (2005) estimaron el TC de bacterias planctónicas de ambientes acuáticos oligotróficos de Quebec, Canadá mediante AI-MEF, y lo relacionaron con el parámetro citométrico SSC, obteniendo la regresión lineal:

$$\text{TC} [\mu\text{m}^3] = 0,0049 + 2,976 * \text{SSC} \quad (2)$$

CAPÍTULO I

ESTRUCTURA Y VARIACIÓN TEMPORAL DE LAS COMUNIDADES PLANCTÓNICAS EN RELACIÓN CON FACTORES AMBIENTALES

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, los antecedentes del estudio de los componentes de la trama trófica de cuerpos de agua de turberas se limitan al relevamiento de ciertas comunidades: el bacterioplancton en turberas de E.E.UU. (Fisher *et al.*, 1998); el fitoplancton en turberas de Tierra del Fuego (Mataloni & Tell, 1996; Mataloni, 1999) y de Hungría (Bórics *et al.*, 2002); el fitoplancton y zooplancton en una turbera elevada subtropical de Bhutan (turbera de altura, Sharma & Bhattarai, 2005); el zooplancton en turberas elevadas de Polonia (Klimaszyk & Kuczynska-Kippen, 2006; Kuczynska-Kippen, 2008; Demetraki-Paleolog, 2010); el bacterioplancton, fitoplancton y zoobentos en una turbera elevada de Letonia (Druvietis *et al.*, 2010); las bacterias heterótrofas, flagelados, amebas tecadas, ciliados, rotíferos y crustáceos en turberas elevadas de Polonia (Mieczan, 2007a, 2010a). Pero hasta la fecha no existen bases de datos acerca de la trama trófica completa de estos sistemas acuáticos particulares.

A pesar de que la mayoría de los turbales se localizan en el hemisferio norte, en la isla de Tierra del Fuego se encuentra el complejo de turberas más austral del mundo, el cual comprende un área extensa con desarrollo de turberas ombrotróficas elevadas (Lindsay *et al.*, 1988). Éstas albergan numerosos cuerpos de agua, los que en conjunto son capaces de retener la totalidad de las precipitaciones ordinarias, y actúan como reguladores del flujo de agua en el sistema (Iturraspe, 2010). Las lagunas que se hallan interconectadas por canales naturales superficiales poseen ingresos adicionales al agua de las precipitaciones, y muestran mayores valores de pH y dureza (estado minerotrófico; González Garraza *et al.*, 2012). Sin embargo, el continuo crecimiento en altura del *Sphagnum* de las áreas lindantes a las lagunas eventualmente genera el aislamiento hidrológico de los cuerpos de agua (se pierden las conexiones superficiales), los cuales pasan a estar alimentados exclusivamente por las precipitaciones, y sus aguas se tornan menos duras y más ácidas (estado ombrotrófico; Rydin & Jeglum, 2006; Iturraspe, 2010; González Garraza *et al.*, 2012). En particular, en la turbera de Rancho Hambre se observó que tanto las propiedades morfométricas de los cuerpos de agua (Mataloni & Tell, 1996; González Garraza *et al.*, 2012), como las variables climáticas (González Garraza *et al.*, 2012) son factores que influyen sobre las propiedades físico-químicas de las lagunas. Esta influencia está fuertemente mediada por el grado de interconexión superficial de los cuerpos de agua con la cuenca (González Garraza *et al.*, 2012), y genera una alta heterogeneidad ambiental aún entre cuerpos de agua separados por unos pocos metros de distancia. Se comprobó que esta variabilidad ambiental, principalmente el estado minero- vs. ombrotrófico de las lagunas, a su vez regula la estructura del fitoplancton de la

turbera (Mataloni & Tell, 1996; Mataloni, 1999; González Garraza, 2012). Estos resultados se condicen con los de Bórics y colaboradores (2002), quienes observaron que las propiedades hidrológicas y la diversidad de hábitats son los parámetros determinantes de la riqueza específica en ensamblajes algales de lagunas de turberas de Hungría. Sin embargo, todavía no se sabe cómo la dinámica de los factores ambientales influye sobre las comunidades planctónicas en esta turbera fueguina. Estudios previos de los ciclos estivales mostraron que los cuerpos de agua someros de la Península Antártica (la región antártica más próxima a la isla de Tierra del Fuego) son ambientes dinámicos, en los que la temperatura regula la variación de los parámetros abióticos durante el período de aguas libres, los cuales a su vez determinan la estructura de las comunidades planctónicas (Izaguirre *et al.*, 2003) así como los mecanismos de regulación de la abundancia del fitoplancton (Mataloni *et al.*, 2000). En base a estos antecedentes, se hipotetiza que la temperatura será un factor clave en la regulación del ciclo estacional de las comunidades planctónicas en las lagunas de la turbera de Rancho Hambre.

Los cuerpos de agua someros de turberas elevadas, como es el caso de Rancho Hambre, se clasificaron tradicionalmente como cuerpos de agua húmicos (Keskitalo & Eloranta, 1999). Sin embargo, el corpus teórico sobre el funcionamiento de este tipo de ecosistemas se desarrolló principalmente en base a estudios de lagos húmicos profundos del hemisferio norte, que presentan características morfométricas e hidrológicas contrastantes respecto de los cuerpos de agua someros de turberas. Por ejemplo, los primeros generalmente presentan una cubeta conformada por el suelo mineral, mientras que en las turberas elevadas la cubeta está constituida por el *Sphagnum* (Iturraspe, 2010). Además, a diferencia de los lagos húmicos, las lagunas de turberas elevadas no presentan conexión con la napa freática, por lo que están aisladas del medio acuático que las rodea. Por estas razones, el estudio limnológico integral de las lagunas de la turbera de Rancho Hambre aportará nueva información al conocimiento general acerca de los cuerpos de agua húmicos.

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar a las comunidades planctónicas (desde las bacterias heterótrofas hasta el zooplancton) a lo largo de dos ciclos anuales consecutivos en cinco lagunas con diferentes características morfométricas de la turbera de Rancho Hambre. Además, analizar cuáles variables tanto abióticas como bióticas influyen sobre la estructura de los componentes de la trama trófica en general y sobre la dinámica estacional de la abundancia, biovolumen y biomasa de las bacterias heterótrofas (BH) y los flagelados heterótrofos (FH) en particular.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este Capítulo se caracterizó a las comunidades planctónicas (desde las bacterias heterótrofas hasta el zooplancton) utilizando métodos de microscopía tradicionales, en relación con factores ambientales, a lo largo de los dos períodos consecutivos de aguas abiertas en las cinco lagunas (desde octubre de 2008 hasta abril de 2010). Las técnicas utilizadas para estudiar tanto las comunidades planctónicas como las variables ambientales se detallaron previamente en la sección de Materiales y Métodos Generales.

Análisis estadístico

La existencia de diferencias significativas entre los valores de los parámetros físico-químicos registrados en los distintos puntos de muestreo dentro de cada uno de los cuerpos de agua profundos (RH1, RH2 y RH4) se estudió utilizando un diseño de análisis de varianza multivariado (MANOVA) en bloques aleatorizados, considerando los períodos de muestreo como bloques y los puntos de muestreo dentro de las lagunas como factores de efectos fijos. Además se realizó para cada variable abiótica un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores utilizando el modelo III de bloques aleatorizados sin réplicas (Zar, 2010). Estos análisis también se realizaron para estudiar la existencia de diferencias significativas entre los valores de abundancias totales de BH, PE y FH registrados en los distintos puntos de muestreo dentro de las lagunas, ya que no se contaba con réplicas de los recuentos de microscopía de epifluorescencia. Por el contrario, para las demás comunidades planctónicas, la existencia de diferencias significativas entre los valores de abundancia registrados en cada una de las lagunas en cada fecha de muestreo se evaluó utilizando un análisis de varianza de un factor (Zar, 2010), ya que se contaba con réplicas de los recuentos. Para realizar estos análisis se utilizó el programa SPSS 15.0.1 (Statsoft, USA).

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en la matriz de abundancia de las comunidades planctónicas con el fin de caracterizar a las lagunas de acuerdo a la composición de sus tramas tróficas, utilizando el programa NTSYSpc 2.2 (Exeter Software, USA). La matriz de abundancia fue transformada ($\log_{10} + 1$) previo a realizar el PCA (ter Braak & Smilauer, 2002).

Las correlaciones entre las distintas variables fueron realizadas utilizando la prueba no paramétrica Rho de Spearman, mediante el programa SPSS 15.0.1 (Statsoft, USA).

Se realizaron regresiones lineales múltiples utilizando el método de selección de variables de a pasos (*Stepwise Multiple Regressions*) con las abundancias, biovolumenes y biomásas de BH y FH (variable dependiente), y las siguientes variables ambientales:

pH, conductividad, oxígeno disuelto, dureza total, concentraciones de: carbono orgánico disuelto, nitrógeno inorgánico disuelto y fósforo reactivo soluble, abundancia y biomasa de HB o FH (dependiendo de la variable dependiente), abundancias y biomásas totales del picofitoplancton, del nano- y microfitoplancton, de los ciliados y del metazooplancton, como variables independientes. Las variables dependientes que no cumplieron el supuesto de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) fueron transformadas linealmente (Log_{10} o x^{-1}).

RESULTADOS

Parámetros ambientales

Observaciones de campo mostraron que los cinco cuerpos de agua de la turbera de Rancho Hambre presentaron diferentes cuencas de aporte, delimitadas topográficamente por sectores elevados de turba con vegetación arbustiva (renovales de *Nothofagus* sp.). Además, algunos de los cuerpos de agua presentaron conexiones hidrológicas superficiales a través de canales naturales. Los cuerpos de agua profundos RH1 y RH4 presentaron entradas y/o salidas, mientras que RH2 y los cuerpos de agua someros RH3 y RH5 estuvieron aislados hidrológicamente.

No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros físico-químicos registrados en una misma fecha en los distintos puntos de muestreo dentro de cada uno de los cuerpos de agua profundos (ANOVA $p > 0,05$). En base a estos resultados se consideraron para el análisis en este capítulo los valores promedio para cada cuerpo de agua.

La temperatura promedio de cada una de las cinco lagunas durante el período de estudio varió entre 8,5 y 11,8 °C, con un rango de variación para todo el sistema de 1,1 – 24,9 °C (Tabla 2). Los cuerpos de agua grandes (RH1, RH2 y RH4) presentaron tanto temperaturas promedio como rangos de variación menores que los sistemas más someros (RH3 y RH5).

El pH varió poco en el tiempo, y las lagunas se clasificaron en dos grupos en base a sus valores: ligeramente ácidas (RH1 y RH4) y ácidas (RH2, RH3 y RH5) (Tabla 2).

La variación temporal de la concentración de los nutrientes disueltos en cada laguna excedió la variación espacial dentro de la turbera en cada muestreo. Por esta razón, los valores observados en todos los cuerpos de agua se ubicaron dentro del mismo rango de variación (Tabla 2). Lo mismo ocurrió con el COD, aunque los valores promedio de los sistemas más someros (RH3 y RH5) fueron mayores que los cuerpos de agua más grandes (RH1, RH2 y RH4). Un análisis exhaustivo de la influencia de factores

meteorológicos y morfométricos sobre los parámetros abióticos puede encontrarse en González Garraza y colaboradores (2012).

Tabla 1.1: Parámetros físico-químicos de las cinco lagunas de la turbera de Rancho Hambre.

Lagunas	RH 1	RH 2	RH 3	RH 4	RH 5
Temperatura (°C)	8,8 (2,3 - 17,5)	8,6 (1,1 - 15,9)	11,8 (3,2 - 24,9)	8,5 (3,3 - 14,9)	10,6 (1,7 - 19,7)
pH	5,7 (5,0 - 7,1)	4,5 (3,8 - 5,5)	4,5 (3,6 - 5,4)	6,3 (5,2 - 7,0)	4,6 (4,1 - 5,4)
Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	24 (14 - 50)	23 (9 - 40)	33 (10 - 82)	30 (16 - 60)	26 (5 - 50)
OD (mM)	0,33 (0,26 - 0,44)	0,35 (0,24 - 0,45)	0,33 (0,27 - 0,40)	0,33 (0,24 - 0,38)	0,31 (0,27 - 0,36)
DT (mg equiv, $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	26 (7 - 41)	24 (7 - 46)	22 (8 - 43)	30 (11 - 43)	22 (11 - 36)
NID (μM)	3,3 (0,5 - 7,3)	3,8 (0,5 - 17,1)	3,9 (0,7 - 7,4)	3,1 (1,4 - 7,6)	2,6 (0,0 - 5,2)
PRS (μM)	1,7 (0,8 - 2,7)	1,5 (0,7 - 2,5)	2,0 (1,0 - 4,2)	1,1 (0,5 - 1,9)	1,0 (0,6 - 1,6)
COD (mM)	0,65 (0,45 - 0,80)	0,64 (0,42 - 0,75)	0,93 (0,23 - 1,22)	0,43 (0,37 - 0,50)	0,77 (0,32 - 1,04)

Se muestran los valores promedio para cada cuerpo de agua, y el rango de variación entre paréntesis ($n = 8$ para cada laguna, excepto COD $n = 5$). OD: oxígeno disuelto, DT: dureza total, NID: nitrógeno inorgánico disuelto, PRS: fósforo reactivo soluble, COD: carbono orgánico disuelto.

Abundancia y composición de las comunidades planctónicas

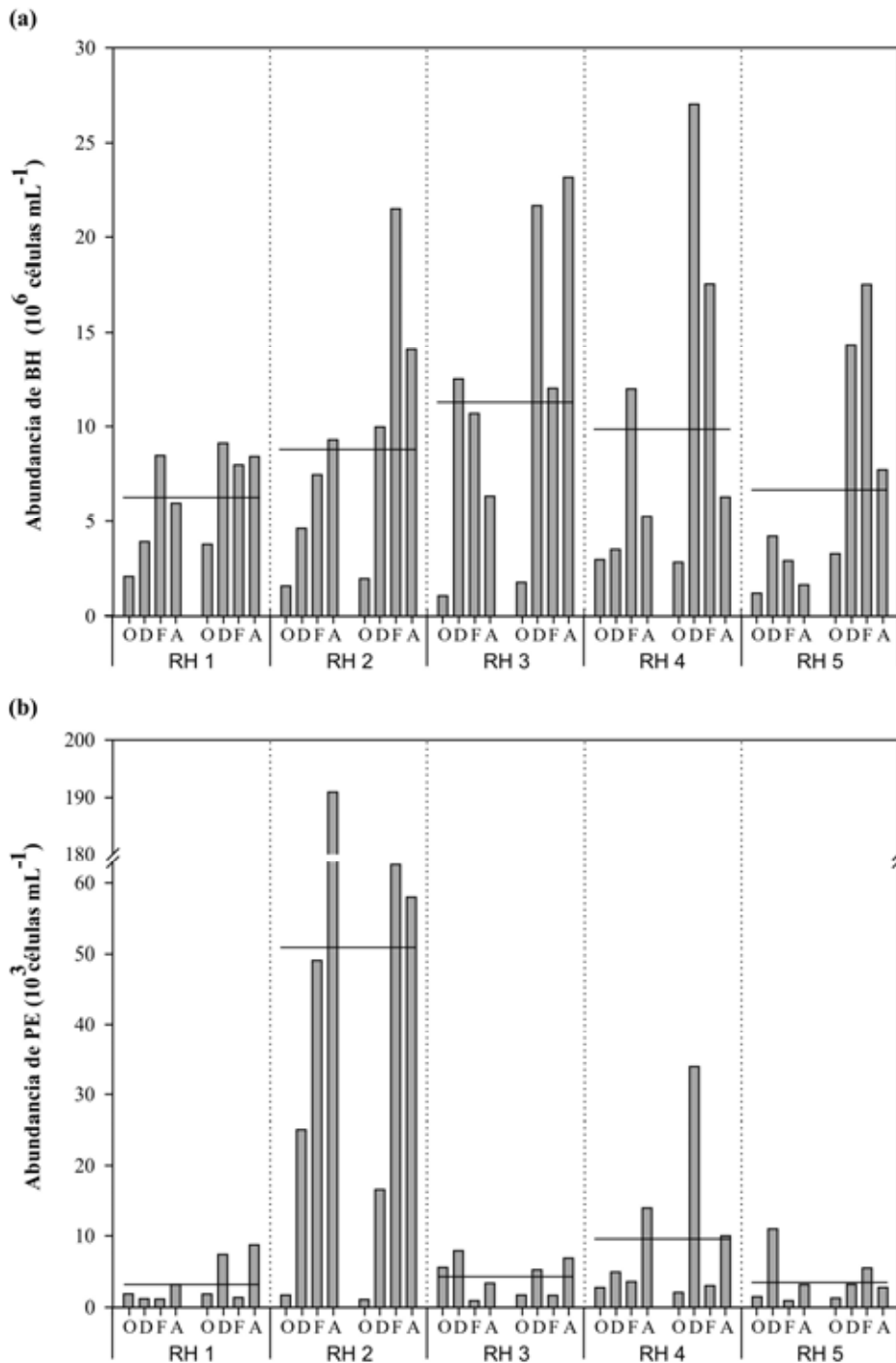
No se encontraron diferencias significativas entre los valores de abundancia de las comunidades planctónicas en los distintos puntos de muestreo dentro de cada uno de los cuerpos de agua profundos (RH1, RH2 y RH3, MANOVA - ANOVA $p > 0,05$). En base a esta distribución espacial homogénea, se consideraron para el análisis en este capítulo los valores promedio para cada cuerpo de agua en las distintas fechas de muestreo.

La abundancia promedio de bacterias heterótrofas (BH) en cada laguna durante el período de estudio varió entre $6,2$ y $11,1 \times 10^6$ células mL^{-1} (Figura 1.2a). La abundancia de BH se correlacionó significativamente con la temperatura ($r = 0,34$; $p = 0,031$; $n = 40$), presentando un patrón estacional con valores mínimos en primavera (octubre, $< 3,8 \times 10^6$ células mL^{-1}), y máximos en verano (diciembre-febrero). En particular, el pico máximo de $2,8 \times 10^7$ células mL^{-1} se registró en RH4 en diciembre del 2009. No se observaron morfologías de tipo filamentosas durante el período de estudio.

El picoplancton autótrofo (fracción $< 2 \mu\text{m}$) de los cuerpos de agua estuvo compuesto solamente por picoalgas eucariotas (PE) ya que no se observaron picocianobacterias. La abundancia promedio de PE durante el período de estudio varió entre $3,3$ y $9,3 \times 10^3$

células mL^{-1} en todos los cuerpos de agua, excepto en RH2 (Figura 1.2b). En esta laguna, se observó un valor medio de $5,1 \times 10^4$ células mL^{-1} , con máximos de hasta $1,9 \times 10^5$ células mL^{-1} en verano tardío (febrero) y otoño (abril).

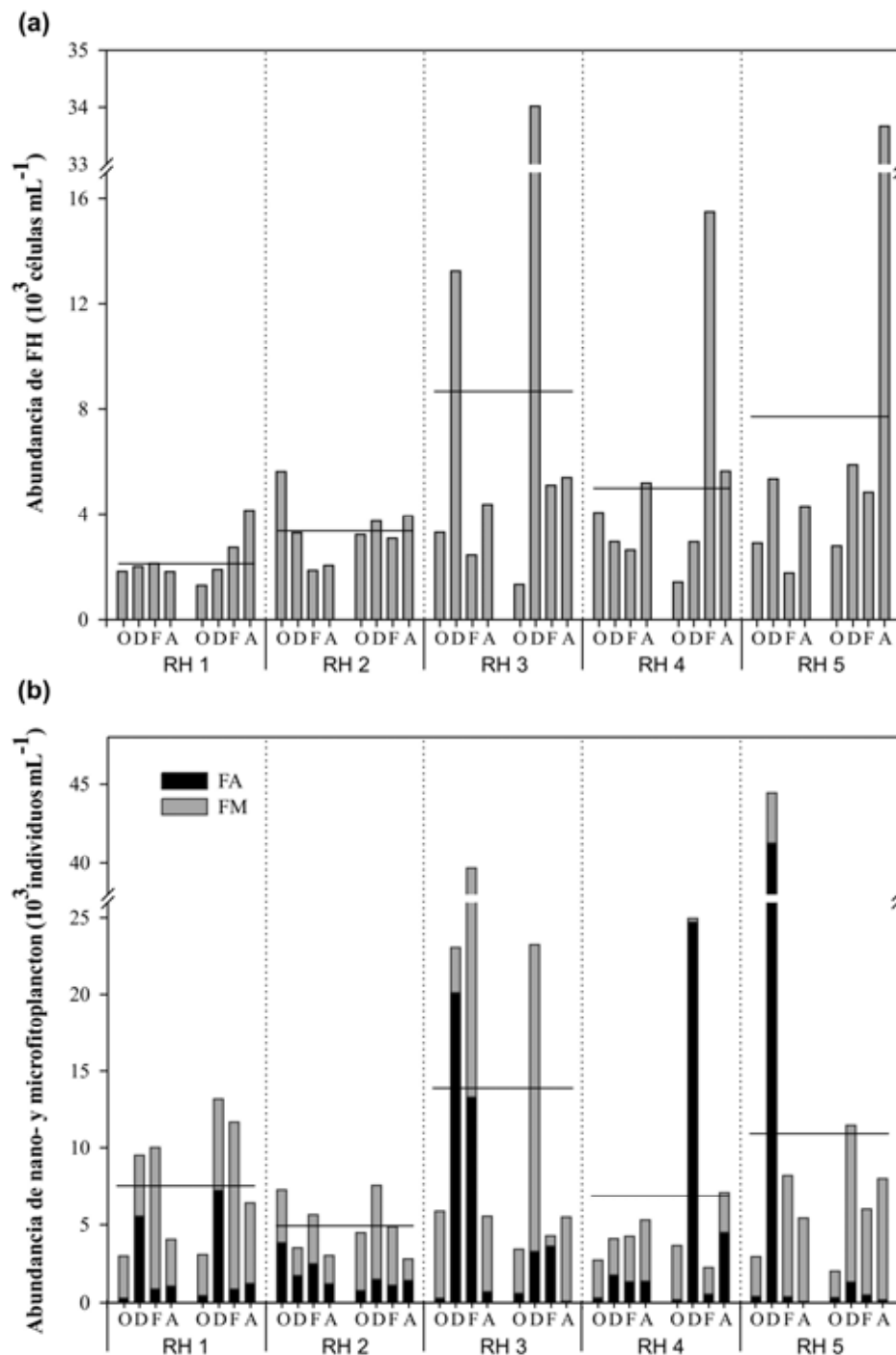
Figura 1.2: Abundancias de **(a)** bacterias heterótrofas (BH) y **(b)** picoalgas eucariotas (PE) en las lagunas estudiadas. Las líneas indican los valores promedio del período de estudio para cada cuerpo de agua.



La gran mayoría de los flagelados heterótrofos (FH) presentó un diámetro esférico equivalente (DEE) $< 5 \mu\text{m}$. Los valores de abundancia promedio para cada laguna durante el período de estudio oscilaron entre $2,2$ y $8,7 \times 10^3$ células mL^{-1} (Figura 1.3a). La

abundancia de esta comunidad no presentó ningún patrón claro de variación temporal. Los valores máximos se observaron en RH3 y RH5 en diciembre y abril (hasta $3,4 \times 10^4$ células mL^{-1}), respectivamente. Concordantemente, los valores promedio más altos se registraron en estos dos cuerpos de agua someros.

Figura 1.3: Abundancia de **(a)** flagelados heterótrofos (FH) y **(b)** nano- y microfitoplancton en las lagunas estudiadas. FA: fitoplancton autótrofo, FM: flagelados mixótrofos. Las líneas indican los valores promedio del período de estudio para cada cuerpo de agua.



La abundancia del nano- y microfitoplancton (fracción $>2 \mu\text{m}$) se correlacionó significativamente con la temperatura en todos los cuerpos de agua ($r = 0,52$; $p = 0,001$; $n = 40$), presentando un patrón estacional con mínimos en primavera y máximos en verano (Figura 1.3b). En general dominaron las algas flageladas mixótrofas (FM) en todas las lagunas, representadas principalmente por las Chrysophyceae nanoflageladas cf. *Ochromonas* spp.; las cuales comprendieron en promedio el 70% de la abundancia total del nano- y microfitoplancton. Sin embargo, se observaron picos de diferentes especies de fitoplancton autótrofo (FA) en diciembre en todas las lagunas, representados principalmente por la Cryptophyceae *Plagioselmis* sp. en RH1 (primer verano), RH2, RH3 y RH5; y por *Kirchneriella microscópica* Nygaard (Chlorococcales, Chlorophyceae) en RH1 (segundo verano) y RH4 (González Garraza, 2012). Se observó un cociente FM:FH >1 en el 80% de las muestras de febrero, reflejando la prevalencia de la estrategia nutricional mixotrófica entre los flagelados fagótrofos en el verano tardío. Durante el resto del período de aguas libres los FM dominaron en RH1 y los FH en RH4; mientras que el cociente FM:FH permaneció cercano a 1 en las demás lagunas. Considerando las abundancias de los FH y del nano- y microfitoplancton (FM, FA), la forma de nutrición mixotrófica también prevaleció, ya que en promedio los FM representaron el 42% de la abundancia total (FH + FM + FA), los FH el 38% y el FA el 20%, considerando todas las lagunas y fechas de muestreo juntas.

Las especies dominantes de los ciliados y sus hábitos alimenticios se muestran en la Tabla 1.2, mientras que sus abundancias se observan en la Figura 1.4. Se registraron sólo algunas especies mixótrofas en bajas abundancias, por lo que éstas se incluyeron dentro de la categoría de “ciliados poco abundantes”. Los cuerpos de agua profundos e hidrológicamente conectados (RH1 y RH4) presentaron una dinámica estacional con máximos de abundancia total en otoño (abril), mientras que los demás cuerpos de agua presentaron diferentes comportamientos. Además, todas las muestras de primavera y otoño (octubre y abril) se hallaron dominadas por las especies raptorales *Balanion planctonicum* (Foissner, Oleksiv & Müller) Foissner, Berger & Kohmann y *Urotricha* spp.; excepto en las lagunas RH2 y RH5, donde las especies picoplanctívoras por excelencia *Rimostrombidium hyalinum* (Mirabdullaev) Petz & Foissner y *Cyclidium* sp. dominaron ocasionalmente. Por otro lado, se observaron altas abundancias de *Pelagostrombidium fallax* (Zacharias) Krainer, el taxón dominante más grande, en todas las lagunas en verano.

Con respecto a las amebas tecadas, sólo se encontraron unos pocos especímenes muertos (aproximadamente 1 individuo L^{-1}) en las muestras de plancton de las orillas de

los cuerpos de agua. Se identificó sólo una especie viva (*Diffflugia oblonga* Ehrenberg) en el cuerpo de agua somero RH5, la que presentó una muy baja abundancia (hasta 15 individuos L⁻¹).

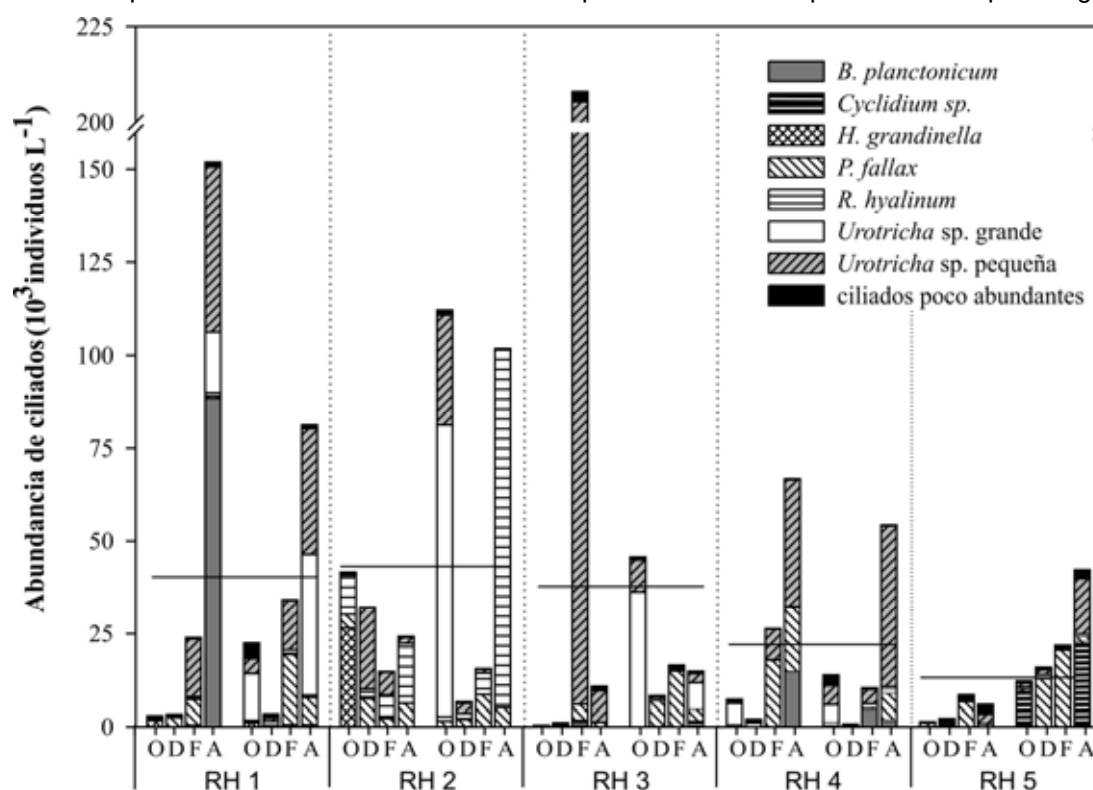
Tabla 1.2: Ciliados dominantes de las lagunas de Rancho Hambre, y sus hábitos alimenticios según Šimek y colaboradores (1996).

Taxón	Hábito alimenticio	Laguna ^a
<u>Oligotrichida</u>		
<i>Halteria grandinella</i> (Müller) Dujardin	Suspensívoro de partículas finas muy eficiente.	RH2
<i>Pelagostrombidium fallax</i> (Zacharias) Krainer	Suspensívoro de partículas finas menos eficiente, filtrador de partículas gruesas, detritófago.	todas
<i>Rimostrombidium hyalinum</i> ^b (Mirabdullaev) Petz & Foissner	Suspensívoro de partículas finas muy eficiente.	RH2
<u>Scuticociliatida</u>		
<i>Cyclidium</i> sp.	Suspensívoro de partículas finas muy eficiente.	RH5
<u>Prostomatea</u>		
<i>Balanion planctonicum</i> (Foissner, Oleksiv & Müller) Foissner, Berger & Kohmann	Predador raptorial.	RH1, RH4
<i>Urotricha</i> sp. grande	Predador raptorial.	todas
<i>Urotricha</i> sp. pequeña	Predador raptorial.	todas

^aSe indican en cuáles lagunas se observaron altas abundancias de cada taxón.

^bEl hábito alimenticio se estimó utilizando las tasas de depredación específicas determinadas por Callieri *et al.* (2002).

Figura 1.4: Abundancia y composición de los ciliados en las lagunas de Rancho Hambre. Las líneas indican los valores promedio de la abundancia total en el período de estudio para cada cuerpo de agua.



Los taxones dominantes del metazooplancton y sus hábitos alimenticios se muestran en la Tabla 1.3. La abundancia total del metazooplancton se correlacionó significativamente con la temperatura ($r = 0,55$; $p = 0,0002$; $n = 40$), y presentó un patrón estacional con mínimos en primavera (≤ 62 individuos L^{-1}). Los picos máximos se registraron en los cuerpos de agua someros (hasta 6762 individuos L^{-1}) (Figura 1.5a).

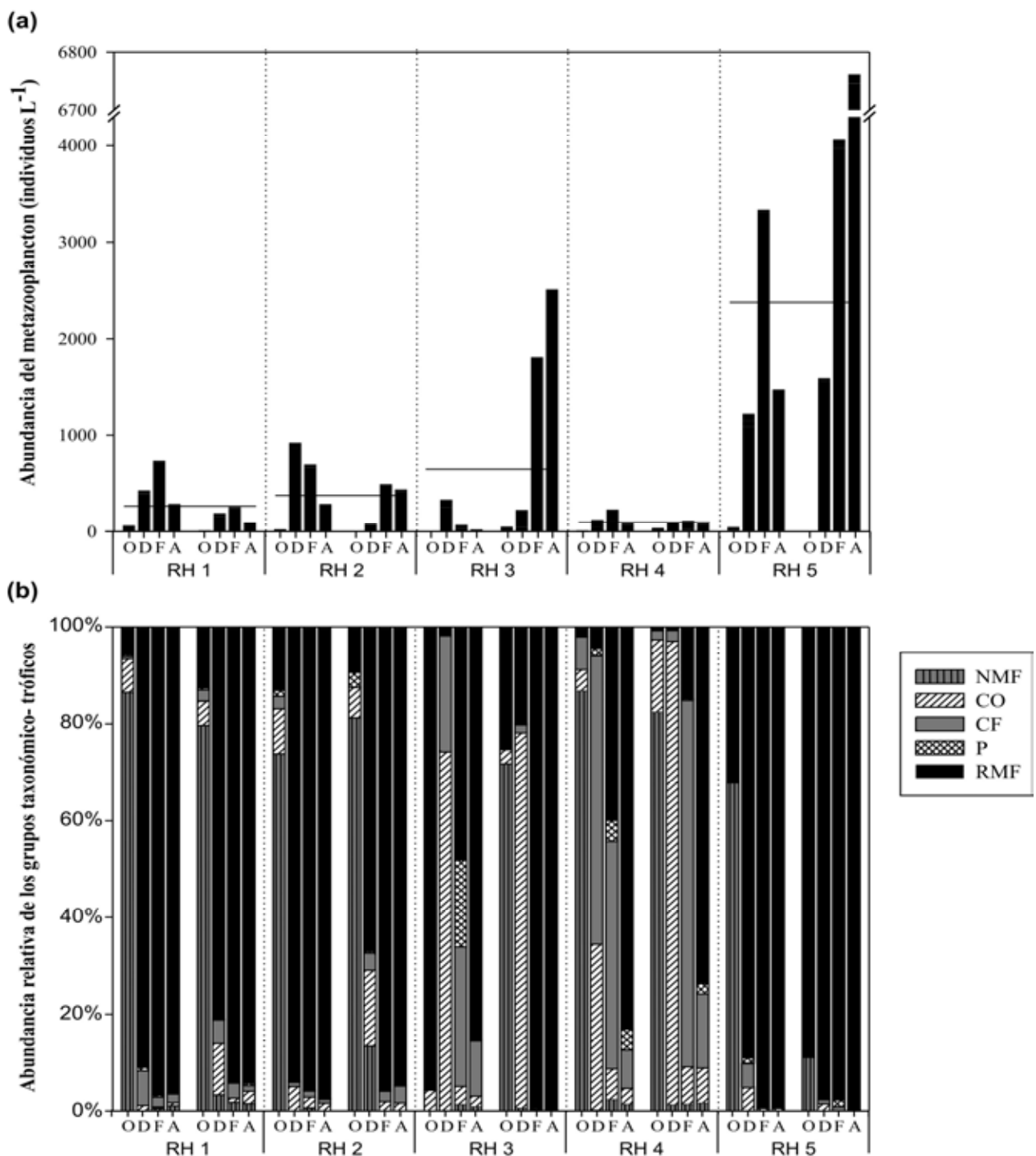
Tabla 1.3: Taxones dominantes del metazooplancton de las lagunas de Rancho Hambre, y sus hábitos alimenticios.

Taxón	Hábito alimenticio
<u>Rotífera</u>	
<i>Ascomorpha ecaudis</i> Perty	Raptor de algas
<i>Asplanchna girodi</i> de Guerne	Predador raptor
<i>Colurella</i> sp.	Microfiltrador
<i>Conochilus unicornis</i> Rousselet	Microfiltrador
<i>Keratella ona</i> Boltovskoy & Urrejola	Microfiltrador
<i>Keratella valdiviensis</i> Thomasson	Microfiltrador
<i>Ploesoma truncatum</i> Levander	Predador raptor
<i>Polyarthra dolichoptera</i> Idelson	Raptor de algas
<i>Synchaeta pectinata</i> Ehrenberg	Raptor de algas
<i>Testudinella emarginula</i> Stenroos	Microfiltrador
Bdelloidea	Microfiltrador
<u>Cladocera</u>	
<i>Alona</i> spp.	Filtrador
<i>Bosmina chilensis</i> Daday	Filtrador
<i>Ceriodaphnia</i> cf. <i>dubia</i> Richard	Filtrador
<i>Chydorus</i> sp.	Filtrador
<i>Daphnia commutata</i> Ekman	Filtrador
<i>Pleuroxus</i> sp.	Filtrador
<u>Copepoda</u>	
<i>Boeckella poppei</i> Mrázek	
➤ nauplii	Microfiltrador
➤ copépodos adultos y copepoditos	Omnívoro
<i>Bryocyclops</i> spp.	Omnívoro
<i>Diacyclops</i> sp. (adultos)	Predador raptor
<i>Eucyclops</i> sp. (adultos)	Predador raptor
Harpacticoida Parastenocarididae (copepoditos + adultos)	Omnívoro
<i>Tropocyclops prasinus meridionalis</i> Kiefer	
➤ nauplii	Microfiltrador
➤ copepoditos	Omnívoro
➤ copépodos adultos	Predador raptor

La dinámica estacional de la abundancia relativa de los cinco “grupos taxonómico-tróficos” mostró que los nauplii microfiltradores (NMF) representaron más del 70% de la abundancia total en casi todas las muestras de primavera (octubre), mientras que los rotíferos microfiltradores (RMF) dominaron en verano – otoño (diciembre hasta abril) en la

mayoría de las lagunas (Figura 1.5b). En particular, RH4 presentó una composición distinta en los muestreos de verano (diciembre y febrero), con los cladóceros filtradores (CF) representando al grupo dominante.

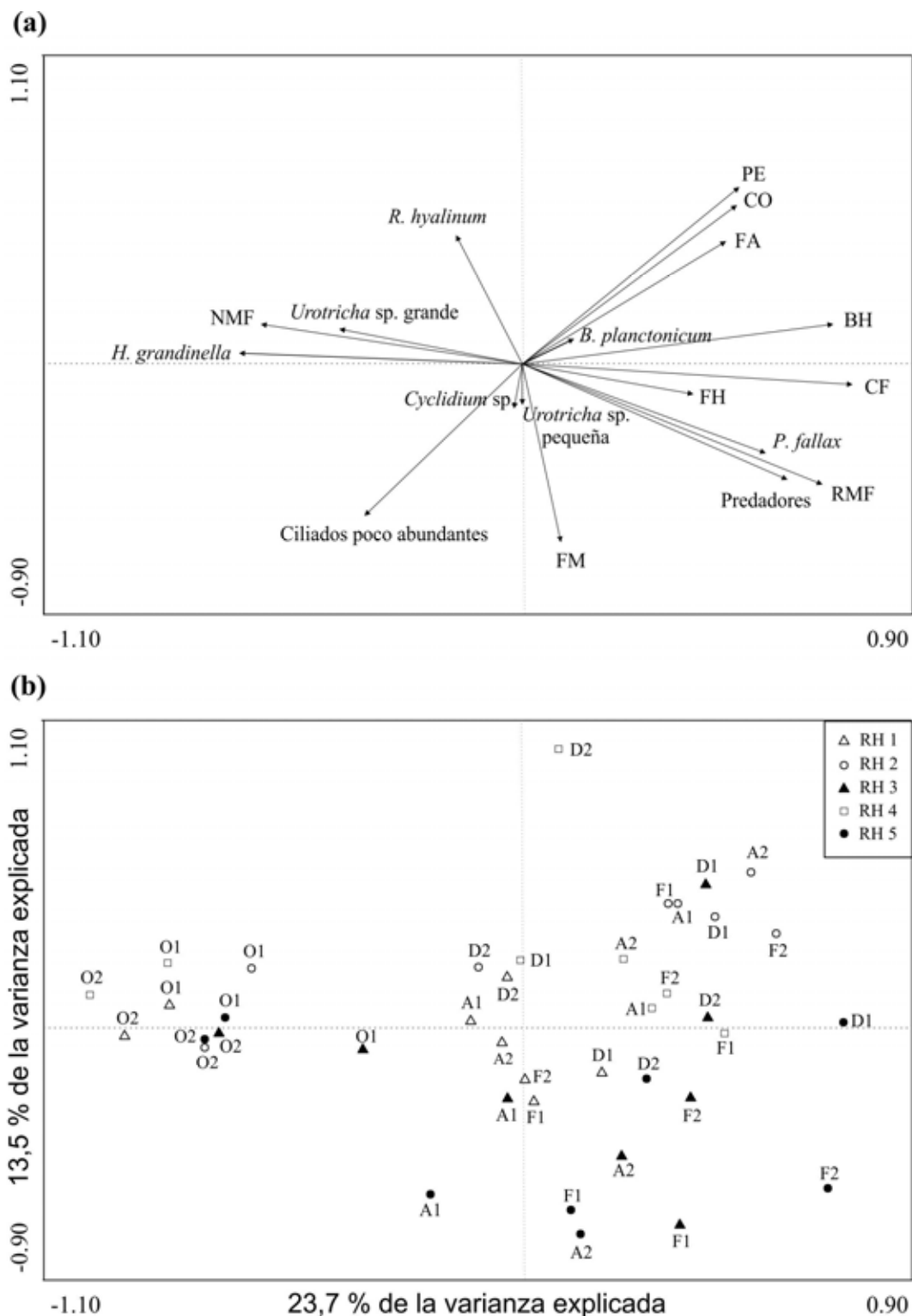
Figura 1.5: (a) Abundancia total del metazooplancton, y (b) abundancia relativa de los cinco grupos taxonómico-tróficos en las lagunas de Rancho Hambre. NMF: nauplii microfiltradores, CO: copépodos omnívoros, CF: cladóceros filtradores, P: rotíferos y copépodos predadores, RMF: rotíferos microfiltradores. Las líneas en (a) indican los valores promedio de la abundancia total en el período de estudio para cada cuerpo de agua.



Variación temporal de la estructura de las comunidades planctónicas

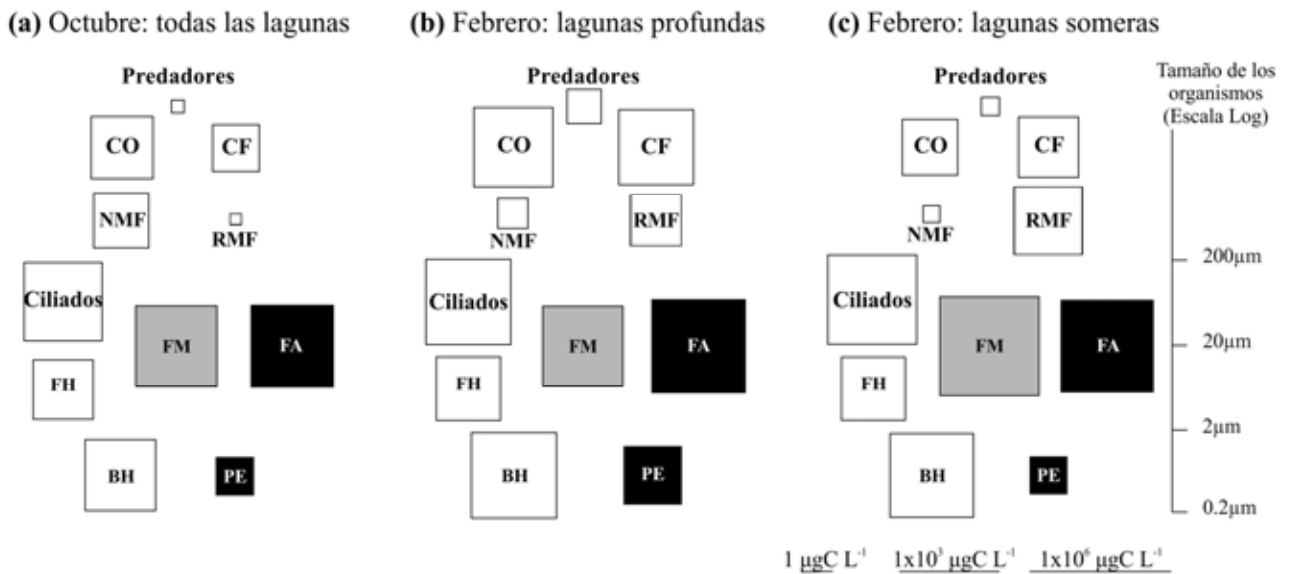
Los resultados del Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en las abundancias de las comunidades planctónicas de las cinco lagunas durante el período de estudio se muestran en la Figura 1.6 con el fin de exhibir claramente los autovectores que representan a las variables (Figura 1.6a), y cómo las muestras se ordenaron en el espacio multivariado en función de los mismos (Figura 1.6b). Los primeros dos ejes explicaron el 37,2 % de la varianza. El primer eje explicó el 23,7 % de la varianza y se asoció positivamente con las abundancias de los CF, BH y RMF (autovectores = 0,76; 0,71 y 0,69 respectivamente), y negativamente con las abundancias del ciliado *H. grandinella* y los NMF (autovectores = -0,65 y -0,60 respectivamente) (Figura 7a). El segundo eje explicó el 13,5 % de la varianza y se relacionó principalmente con las abundancias de FM, PE y CO (autovectores = -0,64; 0,63 y 0,57 respectivamente). El ordenamiento de las muestras a lo largo del primer eje reveló una asociación de las muestras de octubre con altas abundancias de *H. grandinella*, NMF y *Urotricha* sp. grande, y con bajas abundancias de BH y metazooplancton adulto. Por otro lado, las muestras de febrero y abril de RH2 se posicionaron en el cuadrante superior derecho asociadas con altas abundancias de PE, CO y FA, mientras que las mismas fechas de muestreo de las lagunas someras RH3 y RH5 se ubicaron en el cuadrante inferior derecho del diagrama relacionadas con altas abundancias de FM y RMF.

Figura 1.6: Ordenamiento de las muestras obtenido mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA), basado en las abundancias de las comunidades planctónicas. **(a)** Se muestran los autovectores de las distintas variables. **(b)** Se muestra la ordenación de las muestras en base a las variables. BH: bacterias heterótrofas, PE: picoalgas eucariotas, FA: nano- y microfitorplancton autótrofo, FM: flagelados mixótrofos, FH: flagelados heterótrofos, RMF: rotíferos microfiltradores, NMF: nauplii microfiltradores, CO: copépodos omnívoros, CF: cladóceros filtradores, Predadores: rotíferos y copépodos predadores. Identificación de las muestras: las letras indican el mes de muestreo (O: octubre, D: diciembre, F: febrero, A: abril), mientras que los números indican el ciclo estacional muestreado (1: primer ciclo, 2: segundo ciclo).



La Figura 1.7 muestra la biomasa promedio de las comunidades planctónicas en dos períodos contrastantes: la primavera (octubre) y el verano tardío (febrero). Debido a que todas las lagunas presentaron estructuras tróficas similares en primavera (ver Figura 1.6b), en la Figura 1.7a se representan los valores promedio para las cinco lagunas. Sin embargo, la abundancia total del metazooplancton en verano tardío separó a los cuerpos de agua en dos grupos: grandes y profundos por un lado (RH1, RH2 y RH4, valor promedio 419 individuos mL⁻¹), y pequeños y someros por el otro (RH3 y RH5, valor promedio 2320 individuos mL⁻¹) (Figura 1.5a). Por esta razón en las Figuras 1.7b y 1.7c se representaron los valores promedio de las muestras de febrero para los cuerpos de agua profundos y someros, respectivamente. De la observación de la Fig. 1.7 surge que con respecto a los procariotas, la biomasa de BH se incrementó en febrero con respecto a octubre, tanto en los cuerpos de agua profundos como someros; mientras que la biomasa de PE aumentó mucho más en los cuerpos de agua profundos, debido a las altísimas abundancias de PE en RH2. La biomasa del nano- y microfitoplancton estuvo representada equitativamente por ambos modos de nutrición (FA y FM) en octubre. Por el contrario, el FA dominó en los cuerpos de agua profundos en febrero, mientras que en los someros la biomasa estuvo mayormente representada por FM. Se observaron valores de biomasa similares en ambas estaciones tanto para los FH como para los ciliados, pero la composición de los ciliados en primavera difirió de la de verano tardío. *Urotricha* sp. grande dominó la mayoría de las muestras de octubre, mientras que *Urotricha* sp. pequeña y *P. fallax* representaron más del 80% de la abundancia total en febrero. Sin embargo, las notables diferencias observadas en los tres modelos se deben principalmente a los grupos taxonómico-tróficos del metazooplancton. En octubre la biomasa de los metazoos estuvo representada principalmente por crustáceos: NMF, CO y CF. Los dos últimos grupos continuaron dominando el metazooplancton de los cuerpos de agua profundos en verano tardío, probablemente debido al reclutamiento de una gran proporción de las larvas nauplii observadas en primavera. Este incremento a su vez contribuyó al aumento de la biomasa de los rotíferos y copépodos predadores en estas lagunas. Sin embargo, en las lagunas someras se observó el mayor incremento de la biomasa de los RMF, los que dominaron estos sistemas en febrero.

Figura 1.7: Biomasa de las diferentes comunidades planctónicas de las lagunas de Rancho Hambre en dos periodos contrastantes. **(a)** Valores promedio de las muestras de primavera (octubre). **(b)** Valores promedio de las muestras de las lagunas profundas (RH1, RH2 y RH4) en verano tardío (febrero). **(c)** Valores promedio de las muestras de las lagunas someras (RH3 y RH5) en verano tardío (febrero). El área del cuadrado se relaciona proporcionalmente con la biomasa transformada ($\text{Log}_{10} + 1$) de los respectivos componentes planctónicos. Abreviaciones referentes a las comunidades planctónicas de acuerdo a la Figura 1.6. Modo de nutrición: blanco: heterótrofo, gris: mixótrofo, negro: autótrofo.



Factores que determinan la abundancia, el biovolumen y la biomasa de las bacterias heterótrofas y los flagelados heterótrofos

La abundancia de BH se correlacionó positivamente con las abundancias de picoalgas eucariotas, nano- microfitoplancton autótrofo, flagelados heterótrofos, rotíferos microfiltradores y predadores, cladóceros filtradores, copépodos omnívoros y predadores y el ciliado *P. fallax* (Tabla 1.4); y con las variables abióticas: temperatura, conductividad, oxígeno disuelto (OD), dureza total (DT) y nitrógeno total. Por otro lado, la abundancia de FH se correlacionó significativamente con la concentración del carbono orgánico disuelto (COD).

Tabla 1.4: Correlaciones significativas (Rho de Spearman; $p < 0,05$) entre las abundancias de las bacterias heterótrofas (BH) y los flagelados heterótrofos (FH) y parámetros abióticos y bióticos (abundancias de otras comunidades planctónicas). * $p < 0,01$; $n = 40$.

	BH	FH
Temperatura	0,341	
Conductividad	0,471*	
Oxígeno disuelto	0,542*	
Dureza total	0,378	
Nitrógeno total	0,515*	
Carbono orgánico disuelto		0,442
Picoalgas eucariotas	0,437*	
Nano-microfitoplancton autótrofo	0,364	
Flagelados heterótrofos	0,357	
<i>P. fallax</i>	0,407*	
Rotíferos microfiltradores	0,385	
Cladóceros filtradores	0,477*	
Copépodos omnívoros	0,520*	
Rotíferos y copépodos predadores	0,330	

Con el objeto de determinar cuáles variables explicaron significativamente la variación de la abundancia, biovolumen y biomasa de BH y FH a lo largo del período de estudio en las lagunas de la turbera de Rancho Hambre, estos descriptores de las comunidades se relacionaron con variables ambientales: pH, conductividad, OD, DT, COD, nitrógeno inorgánico disuelto (NID) y fósforo reactivo soluble (PRS) y con las abundancias o biomasa de las otras comunidades planctónicas: BH o FH, picoalgas eucariotas, nano- y microfitoplancton (FA + FM), ciliados y metazooplancton. Se utilizaron regresiones lineales múltiples (con el método de selección de variables independientes por pasos, *stepwise multiple regression*) considerando como variables independientes a los parámetros abióticos por un lado; y las variables bióticas por el otro, con el fin de evitar colinealidad entre las variables independientes. Los resultados se observan en las Tablas 1.5 y 1.6.

Tabla 1.5: Regresiones lineales múltiples: variables significativas y parámetros estadísticos.

Variable dependiente (modelo N°)	Variables independientes	Variables significativas	Coefficiente de regresión parcial estandarizado	R ²	P	n
Abundancia de BH (1)	abióticas	Conductividad	0,652	0,393	0,002	20
Abundancia de BH (2)	bióticas	Abundancia de FH	0,323	0,081	0,042	40
Biovolumen de BH (3)	abióticas	Conductividad	0,492	0,200	0,028	20
Biovolumen de BH (4)	bióticas	Abundancia del nano- y microfitoplancton	0,321	0,079	0,044	40
Biomasa de BH (5)	abióticas	Conductividad	0,550	0,264	0,012	20
Biomasa de BH (6)	bióticas	Biomasa del nano- y microfitoplancton	0,416	0,285	0,002	40
		Biomasa del metazooplancton	0,329			
		Biomasa de PE	0,297			
Abundancia de FH (7)	abióticas	Conductividad	-0,727	0,584	0,001	20
		OD	0,381			
		DT	0,347			
Abundancia de FH (8)	bióticas	Abundancia de BH	-0,389	0,129	0,013	40
Biovolumen de FH (9)	abióticas	Conductividad	0,732	0,551	< 0,001	20
		COD	0,379			
Biovolumen de FH (10)	bióticas	Abundancia de metazooplancton	0,386	0,267	0,001	40
		Abundancia de BH	0,336			
Biomasa de FH (11)	abióticas	Conductividad	0,734	0,552	< 0,001	20
		COD	0,376			
Biomasa de FH (12)	bióticas	Biomasa del metazooplancton	0,348	0,098	0,028	40

Tabla 1.6: Modelos de las regresiones lineales múltiples de la Tabla 1.5.

Modelo (1): BH (células L ⁻¹) = -1 10 ¹⁰ + 1 10 ⁹ x conductividad (μS cm ⁻¹)
Modelo (2): BH (células L ⁻¹) = 7 10 ⁹ + 303,216 x FH (células L ⁻¹)
Modelo (3): BH (Log μm ³ mL ⁻¹) = 4,872 + 0,030 x conductividad (μS cm ⁻¹)
Modelo (4): BH (Log μm ³ mL ⁻¹) = 5,258 + 1,18 10 ⁻⁸ x nano- microfitoplancton (ind L ⁻¹)
Modelo (5): BH (Log μg C L ⁻¹) = 1,312 + 0,033 x conductividad (μS cm ⁻¹)
Modelo (6): BH (Log μg C L ⁻¹) = 1,630 + 3,05 10 ⁻⁴ x nano- microfitoplancton (μg C L ⁻¹) + 3,10 10 ⁻⁴ x metazooplancton (μg C L ⁻¹) + 0,007 x PE (μg C L ⁻¹)
Modelo (7): FH (células L ⁻¹) ⁻¹ = 1,55 10 ⁻⁷ - 2,3 10 ⁻⁸ x conductividad (μS cm ⁻¹) + 4,3 10 ⁻⁸ x OD (ppm) + 6,1 10 ⁻⁹ x DT (mg equiv. CaCO ₃ L ⁻¹)
Modelo (8): FH (células L ⁻¹) ⁻¹ = 4,24 10 ⁻⁷ - 1,1 10 ⁻¹⁷ x BH (células L ⁻¹)
Modelo (9): FH (Log μm ³ mL ⁻¹) = 3,068 + 0,059 x conductividad (μS cm ⁻¹) + 0,047 x COD (ppm)
Modelo (10): FH (Log μm ³ mL ⁻¹) = 4,564 + 9,22 10 ⁻⁵ x metazooplancton (ind L ⁻¹) + 1,6 10 ⁻¹¹ x BH (células L ⁻¹)
Modelo (11): FH (Log μg C L ⁻¹) = - 0,596 + 0,060 x conductividad (μS cm ⁻¹) + 0,047 x COD (ppm)
Modelo (12): FH (Log μg C L ⁻¹) = 1,059 + 2,96 10 ⁻⁴ x metazooplancton (μg C L ⁻¹)

Relaciones tróficas potenciales entre las comunidades planctónicas

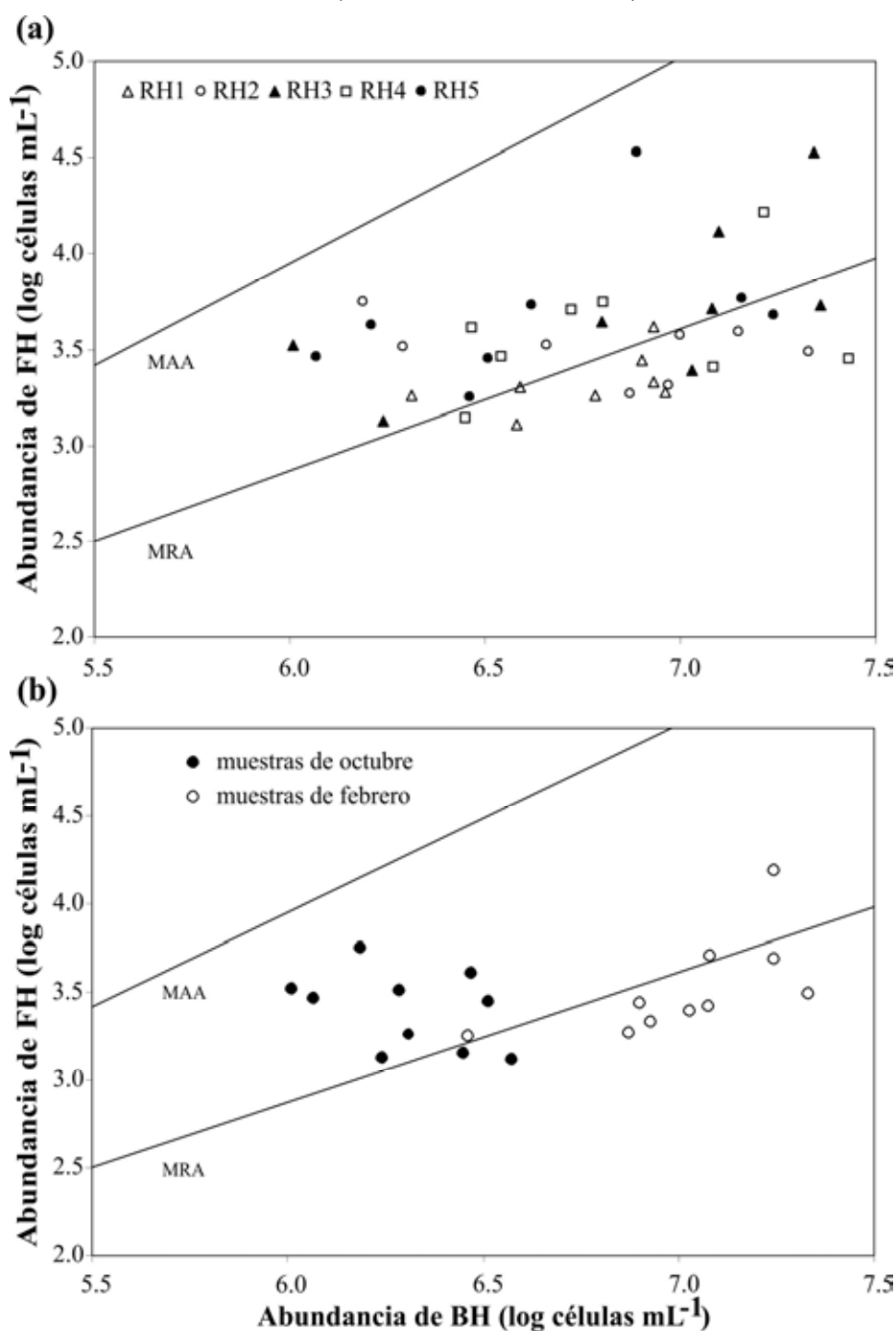
El modelo empírico de Gasol (1994)

La Figura 1.8a muestra la posición de las muestras de las lagunas de Rancho Hambre dentro del marco del modelo empírico propuesto por Gasol (1994). De acuerdo con este modelo, la abundancia de los FH estaría regulada principalmente por la disponibilidad de presas (*bottom-up*) en las cinco lagunas a lo largo del período de estudio. La distancia D se correlacionó positivamente con la concentración de BH en todos los cuerpos de agua ($r = 0,64$; $p < 0,0001$; $n = 40$). Además, se realizó un análisis particular de las muestras de los períodos mas contrastantes: primavera y verano tardío (octubre y febrero) dentro del marco del mismo modelo (Figura 1.8b). La ubicación de estas muestras sugiere un cambio general en el tipo de regulación de la abundancia de los FH, siendo predominantemente tipo *bottom-up* en primavera y *top-down* en verano tardío. La abundancia promedio de los FH varió muy poco, de $2,8 \times 10^3$ células mL⁻¹ en octubre a $4,2 \times 10^3$ células mL⁻¹ en febrero, mientras que la abundancia promedio de las bacterias se incrementó un orden de magnitud en febrero con respecto a octubre ($2,2 \times 10^6$ células mL⁻¹ y $1,2 \times 10^7$ células mL⁻¹, respectivamente). La distancia D para este grupo de

muestras se correlacionó con las abundancias de cladóceros filtradores, rotíferos y copépodos predadores, copépodos omnívoros, rotíferos microfiltradores y el ciliado dominante *P. fallax* ($r = 0,73$; $r = 0,69$; $r = 0,65$; $r = 0,63$; $r = 0,58$ respectivamente; en todos los casos $p < 0,01$ y $n = 20$).

Figura 1.8: Ubicación de las muestras de las lagunas de Rancho Hambre en el marco del modelo empírico propuesto por Gasol (1994). **(a)** Todas las muestras de las cinco lagunas en las ocho fechas de muestreo.

(b) Sólo las muestras correspondientes a octubre y febrero. MAA: línea que representa la abundancia máxima que pueden alcanzar los FH para una dada densidad de bacterias (*maximun attainable abundance*), MRA: línea que representa la abundancia real promedio de los FH para una dada abundancia de BH (*mean realized abundante*).



DISCUSIÓN

A pesar de que los turbales ocupan extensas áreas en el hemisferio norte, se conoce muy poco acerca de la ecología de las lagunas de turberas (Gilbert & Mitchell, 2006; Rydin & Jeglum, 2006). Los estudios previos se han enfocado solamente en una o un grupo particular de comunidades planctónicas, por lo que los resultados de este capítulo constituyen el primer relevamiento completo de la trama trófica planctónica de las lagunas de turberas elevadas. Debido a esto, fue imposible comparar los resultados de Rancho Hambre con otros sets de datos completos de sistemas similares.

Mataloni & Tell (1996) realizaron el primer estudio limnológico de los cuerpos de agua de la turbera de Rancho Hambre, y encontraron diferencias en los parámetros físico-químicos (principalmente la conductividad y el pH) de lagunas que estaban separadas entre sí por unos pocos metros de distancia. Recientemente, González Garraza y colaboradores (2012) analizaron en detalle los parámetros físico-químicos registrados en las cinco lagunas de Rancho Hambre entre octubre de 2008 y abril de 2010. A partir de un Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en éstos, propusieron un modelo interpretativo para la caracterización de las lagunas de esta turbera. El primer eje del PCA representó un gradiente minero-ombrotrofico, a lo largo del cual las muestras pertenecientes a las lagunas profundas y conectadas hidrológicamente (RH1 y RH4, con aportes de agua adicionales a las precipitaciones) se relacionaron con valores altos de pH y dureza total, mientras que las lagunas someras y aisladas hidrológicamente (RH3 y RH5, alimentadas solamente por precipitaciones) mostraron un tipo de agua menos dura y más ácida. Por otro lado, la ordenación de las muestras respecto del segundo eje reflejó un gradiente temporal, con las muestras de fines de verano (febrero) localizadas generalmente en la parte superior del diagrama, mientras que las condiciones de bajas temperaturas (octubre) se ubicaron en la parte inferior. Por su parte, RH2 presentó características intermedias entre ambos grupos: por ser un cuerpo de agua relativamente grande mostró un patrón de variación de la temperatura similar al de las lagunas profundas; pero por otro lado al hallarse aislado hidrológicamente como las lagunas someras, sus aguas ácidas reflejaron un estado ombrotrofico (González Garraza *et al.*, 2012). Debido a esto, las características físico-químicas de RH2 mostraron la máxima variación estacional respecto de las lagunas estudiadas. Este comportamiento único de RH2 podría explicar parcialmente la singularidad de su estructura planctónica. Esta laguna presentó abundancias muy altas de picroalgas eucariotas, más de dos órdenes de magnitud mayores que las registradas en las demás lagunas, conjuntamente con altas abundancias de los ciliados picoplanctívoros por excelencia *H. grandinella* y *R. hyalinum*.

Las abundancias promedio de BH registradas en las lagunas de Rancho Hambre ($6,2$ a $11,1 \times 10^6$ células mL^{-1}) fueron levemente mayores que las descritas en estudios previos de lagunas de turberas ombrotáficas de Suecia ($1,4 \times 10^6$ células mL^{-1} según Langenheder *et al.*, 2006); Polonia ($5,4 \times 10^6$ células mL^{-1} según Mieczan, 2010a); las montañas Jura de Suiza ($1,2 \times 10^5$ células mL^{-1} según Lara *et al.*, 2010) y Letonia ($1,2 - 3,3 \times 10^6$ células mL^{-1} según Druvietis *et al.*, 2010). Los flagelados mixótrofos dominaron el nano- y microfitoplancton de las lagunas de la turbera de Rancho Hambre, representados principalmente por las Chrysophyceae cf. *Ochromonas* spp. (González Garraza, 2012). Estos resultados se condicen los de Lara y colaboradores (2011), quienes estudiaron la diversidad molecular eucariota en una laguna de turbera elevada y observaron que las secuencias más abundantes se identificaban como Chrysophyceae. Además, en áreas frías como la Antártida también se ha observado que las Chrysophyceae dominan el fitoplancton de lagos oligo- a mesotróficos al comienzo y final del verano, períodos en los cuales los cuerpos de agua presentan una cobertura de hielo (Izaguirre *et al.*, 1993; Izaguirre *et al.*, 1998; Pose & Izaguirre, 1998).

Con respecto a los ciliados, las abundancias promedio registradas en Rancho Hambre ($13,8 - 43,6 \times 10^3$ individuos L^{-1}) fueron similares a las observadas por Mieczan en diferentes ambientes de turberas ombrotáficas al este de Polonia: $7 - 26 \times 10^3$ individuos L^{-1} en estanques, $5 - 23 \times 10^3$ individuos L^{-1} en lagunas y $28 - 55 \times 10^3$ individuos L^{-1} en pequeños ojos de agua (Mieczan, 2007a, 2007b, 2010a). Además, los picos máximos registrados en RH1 y RH4 en otoño concuerdan con la dinámica estacional descrita por Mieczan para los ciliados en pequeños cuerpos de agua de turberas ombrotáficas de *Sphagnum* (Mieczan, 2007a, 2007b).

Por otro lado, sólo se encontraron individuos aislados de amebas tecadas en las lagunas de Rancho Hambre, en contraste con las observaciones de Mieczan (2010a, 2010b) de abundancias mayores a $2,1 \times 10^5$ individuos L^{-1} en pequeños ojos de agua. Cabe destacar que las amebas tecadas viven principalmente asociadas a sustratos y son un grupo abundante y diverso en el agua intersticial del *Sphagnum* spp. (Mitchell *et al.*, 2000), pero no así en los cuerpos de agua. De hecho, los pequeños ojos de agua estudiados por Mieczan (2010a, 2010b) presentaron un área de $0,5$ a 2 m^2 y una profundidad máxima de 20 cm , recibiendo una mayor influencia del ambiente superficial del *Sphagnum* con respecto a las lagunas de Rancho Hambre (área: $137 - 16190 \text{ m}^2$; profundidad máxima: $33 - 150 \text{ cm}$), donde la única especie viva hallada en la laguna somera RH5 provendría de los sedimentos y no del ambiente limnético (D. Gilbert, comunicación personal).

Los rotíferos microfiltradores dominaron ampliamente el metazooplancton de Rancho Hambre, con picos de abundancia que alcanzaron los 6762 individuos L^{-1} . Estos resultados se condicen con los de Klimaszyk & Kuczynska-Kippen (2006), quienes observaron que los rotíferos dominaron sobre los crustáceos, presentando picos de abundancias mayores a 8000 individuos L^{-1} , en una laguna dentro de una turbera elevada en Polonia. Por el contrario, la abundancia del metazooplancton en una laguna de una turbera subtropical de altura (1950 m sobre el nivel del mar) en Bután mostró un rango de variación de 34 – 123 individuos L^{-1} , y estuvo equitativamente representada por rotíferos, cladóceros y copépodos (Sharma & Bhattarai, 2005).

Como conclusión, la comparación de las comunidades planctónicas de Rancho Hambre con los pocos estudios previos a nivel mundial mostró: (i) una composición similar en grupos dominantes del fito- y metazooplancton de Rancho Hambre con respecto a las turberas de altas latitudes del hemisferio norte, y (ii) valores de abundancia de las comunidades planctónicas de Rancho Hambre similares o levemente superiores respecto de las previamente descritas en la bibliografía de turberas. Sin embargo, se necesita comparar los resultados de Rancho Hambre con más conjuntos de datos integrados de las comunidades planctónicas de turberas para comprobar el patrón espacial y temporal del plancton en estos ecosistemas particulares.

Por otro lado, las lagunas de turberas ombrotóricas se clasifican generalmente como sistemas húmicos (Keskitalo & Eloranta, 1999). En función de esto, se comparó la trama trófica planctónica de Rancho Hambre con las de otros ambientes húmicos (Macek *et al.*, 2001; Graham *et al.*, 2004; Grossart *et al.*, 2008; Tadonléléké *et al.*, 2005). Si bien las abundancias de BH, FH y del nano- y microfitoplancton observadas en Rancho Hambre fueron levemente superiores a las descritas para un lago de turbera en Wisconsin, Estados Unidos (Graham *et al.*, 2004), el lago experimental Grosse Fuchskuhle en el noreste de Alemania (Macek *et al.*, 2001; Grossart *et al.*, 2008), y cuatro lagos húmicos y un embalse en Québec, Canadá (Tadonléléké *et al.*, 2005), la abundancia máxima de ciliados registrada en Rancho Hambre ($2,1 \times 10^5$ individuos L^{-1}) superó por más de un orden de magnitud los picos máximos descritos por Graham y colaboradores (2004) y Tadonléléké y colaboradores (2005). Los últimos autores sugieren que el ciliado *Cyclidium glaucoma* Müller cumple un rol fundamental en la regulación de la estructura del bacterioplancton, depredando selectivamente sobre la población bacteriana identificada mediante citometría de flujo como HNA-hs (bacterias con mayor contenido de ácidos nucleicos y alto SSC). De esta manera, dicho ciliado cumpliría el rol de especie clave y

podría incluso regular la estructura de la trama trófica planctónica en estos lagos húmicos de Canadá.

El picofitoplancton autótrofo comprende tanto organismos procariotas (picocianobacterias -PC) como eucariotas (PE). Según Callieri, generalmente se observa un valor de abundancia de PC un orden de magnitud mayor respecto de las PE (Callieri, 2008), aunque en determinadas condiciones lumínicas, como ser en lagos menos transparentes y eutróficos, las PE prevalecen sobre las PC (Craig, 1987; Pick & Agbeti, 1991). En la turbera de Rancho Hambre no se encontraron PC en ninguna de las lagunas a lo largo de los dos períodos consecutivos de aguas libres estudiados. Estos resultados se condicen con los de Stockner & Shortreed (1991), quienes observaron que el picoplancton autótrofo de lagos húmicos estaba representado principalmente por PE, mientras que la abundancia de PC decrecía a medida que las aguas presentaban un carácter más ácido, llegando a representar una fracción despreciable del picofitoplancton en lagos con pH menor a 6. Sin embargo, considerar sólo el pH ácido de las lagunas de Rancho Hambre no explica la ausencia total de PC en estos sistemas.

Las Chrysophyceae mixótrofas dominaron el nano- y microfitoplancton de las lagunas de Rancho Hambre, lo que se condice con el estudio de Bergström y colaboradores (2003). Estos autores observaron que los flagelados mixótrofos dominan el fitoplancton de lagos húmicos en Suecia debido a su capacidad para captar los nutrientes almacenados en la biomasa bacteriana. Según Jones (2000), la mixotrofia sería una estrategia exitosa para las algas en lagos húmicos, donde (1) las aguas coloreadas generan un ambiente lumínico poco favorable para los organismos estrictamente autótrofos, (2) las concentraciones de nutrientes inorgánicos disueltos son generalmente bajas, y (3) la alta concentración de materia orgánica disuelta generalmente sustenta altas abundancias de bacterias heterótrofas.

Las Chrysophyceae mixótrofas fueron incluso más abundantes que los FH. Numerosos estudios han demostrado que las algas mixótrofas son los principales consumidores de bacterias en los sistemas oligotróficos, siendo las responsables de más del 50% de la bacterivoría total en muchos cuerpos de agua dulce (Bird & Kalff, 1986; Domaizon et al., 2003) así como en sistemas marinos (Unrein et al., 2007; Zubkob & Tarran, 2008) y llegando a presentar tasas de depredación similares a las de los FH (Bird & Kalff, 1986; Shannon et al., 2007). Además, Bergström y colaboradores (2003) observaron que el cociente FM:FH se correlacionó positivamente con la disponibilidad de luz. Este patrón se condice con los resultados experimentales de Flöder y colaboradores (2006), quienes demostraron que los cultivos de *Ochromonas minima* (Chrysophyceae) son capaces de

ingerir bacterias en distintas condiciones de intensidad lumínica, pero que sólo crecen en condiciones de intensidad lumínica alta. Esto sugiere que la capacidad de fotosintetizar que poseen los flagelados mixótrofos los beneficia en relación a los flagelados heterótrofos en condiciones de intensidad lumínica alta, y podría explicar parcialmente los elevados cocientes FM:FH observados en febrero (verano tardío) en las lagunas de Rancho Hambre.

En el análisis de los parámetros limnológicos registrados durante el período de estudio en Rancho Hambre, González Garraza y colaboradores (2012) encontraron que todas las muestras de primavera (octubre) eran similares entre sí, y diferían de la mayoría de las muestras de verano y otoño principalmente debido a que presentaban mayores concentraciones de oxígeno disuelto y menores concentraciones de fósforo y nitrógeno totales. En concordancia con estos resultados, la estructura del plancton analizada aquí fue similar en todas las lagunas en primavera, caracterizándose por altas abundancias de los primeros estadios de desarrollo de copépodos (NMF) y de los ciliados *H. grandinella* y *Urotricha* sp. grande, y bajas abundancias de estadios adultos de metazoos y BH. En función de esto, se hipotetiza que las condiciones ambientales homogéneas al comienzo del período de aguas libres determinan procesos similares de regulación de la trama trófica en los cinco cuerpos de agua con características morfométricas contrastantes.

En verano tardío (febrero) sin embargo, se observó un incremento en las abundancias de los estadios adultos del metazooplancton, con picos máximos en los cuerpos de agua pequeños (RH3 y RH5) (Figura 1.5). Además, estos cuerpos de agua mostraron mayores abundancias de rotíferos y copépodos predadores y RMF, y menores abundancias de NMF, CO y CF en relación a las lagunas profundas. Esta diferencia en la estructura del metazooplancton en verano tardío se podría explicar parcialmente a partir del patrón de variación de la temperatura del agua, ya que los cuerpos de agua someros (RH3 y RH5) mostraron temperaturas más altas y rangos de variación diarios más amplios en relación con los profundos (RH1, RH2 y RH4), sometiendo a los metazoos a diferentes condiciones ambientales en función de la morfometría del cuerpo de agua. Correlaciones positivas entre la temperatura del agua y la abundancia, la biomasa y la supervivencia del zooplancton han sido previamente observadas en otros ambientes acuáticos (Cook *et al.*, 2007; MacLennan *et al.*, 2012).

Mediante el estudio de la biomasa de las comunidades planctónicas de la turbera de Rancho Hambre se detectaron variaciones temporales (primavera vs. verano tardío) y espaciales (cuerpos de agua profundos vs. someros). La biomasa se incrementó notablemente entre la primavera y el verano en todas las lagunas, pero además se

observaron diferencias respecto de la contribución de los distintos componentes planctónicos a la biomasa planctónica total en febrero. Las comunidades de PE, FA, CO, CF y rotíferos y copépodos predadores dominaron la biomasa total en los cuerpos de agua profundos, mientras que en los cuerpos de agua someros las BH dominaron la biomasa picoplanctónica, los FM dominaron frente al FA, y los RMF representaron el mayor porcentaje de la biomasa del metazooplancton. Estos resultados sugieren que en este momento la energía se canaliza de manera distinta a través de la trama trófica en los dos tipos de ambientes acuáticos (grandes y profundos vs. pequeños y someros).

Estudio específico de las comunidades de bacterias heterótrofas y flagelados heterótrofos

En función de las regresiones lineales analizadas, la conductividad fue el único factor ambiental entre todos los estudiados que determinó el patrón de la abundancia, el biovolumen y la biomasa de las BH, mientras que tanto la conductividad como el COD explicaron la dinámica de los FH. En Rancho Hambre se observó un amplio rango de variación de la conductividad ($5 - 82 \mu\text{S cm}^{-1}$), debido a variaciones temporales en cada cuerpo de agua más que a las variaciones espaciales dentro de la turbera (González Garraza, 2012). El hecho de que la conductividad sea el factor abiótico más relevante en la determinación de la dinámica de las BH y los FH refleja la estacionalidad del patrón de sus abundancias, biovolumenes y biomasa. Por otra parte, se observó una relación estrecha entre las abundancias de las BH y los FH. Sin embargo, los cambios estacionales del biovolumen y biomasa de las BH estuvieron regulados principalmente por la abundancia y biomasa del nano- y microfitoplancton respectivamente; observándose relaciones positivas entre dichas variables. Por el contrario, la dinámica del biovolumen y biomasa de los FH se halló regulada por el metazooplancton, reflejando un potencial efecto de regulación *top-down* sobre este grupo.

El modelo empírico propuesto por Gasol (1994) permite inferir interacciones tróficas potenciales a partir de los datos de abundancia de BH y FH. Este modelo asume que los FH se alimentan exclusivamente de BH, que todas las BH son comestibles, y no considera otros posibles bacterívoros. Como se discutió más arriba, los flagelados mixótrofos serían importantes consumidores de bacterias en Rancho Hambre, y su efecto no estaría considerado en el marco del modelo. Sin embargo, estudios experimentales demostraron que los FH $<5 \mu\text{m}$ son los principales consumidores de BH (Sherr & Sherr, 1991), mientras que los FH de $5-10 \mu\text{m}$ depredan preferencialmente sobre partículas de aproximadamente $2 \mu\text{m}$ de radio (Sherr & Sherr, 1991; Sherr *et al.*, 1991). Al respecto, en

las lagunas de Rancho Hambre la gran mayoría de los FH enumerados presentó un diámetro esférico equivalente (DEE) $<5 \mu\text{m}$. Además, se observó una ausencia total de picocianobacterias, convirtiendo a las algas picoeucariotas, representadas por células grandes (DEE $\approx 2 \mu\text{m}$; González Garraza, 2012), en la única presa alternativa respecto de las BH. Por otro lado, la ausencia de bacterias filamentosas en Rancho Hambre sugiere que ésta no es una estrategia bacteriana exitosa frente a la depredación ejercida por protistas.

El análisis de los dos períodos contrastantes (octubre vs. febrero) en el marco del modelo empírico de Gasol (1994) mostró que la abundancia de los FH estuvo principalmente regulada por procesos de tipo *bottom-up* en primavera, mientras que en verano tardío se observó un cambio en el tipo de regulación a *top-down* en todas las lagunas de la turbera, reflejando un patrón general del sistema. La distancia D para estos períodos se correlacionó positivamente con las abundancias de rotíferos microfiltradores y predadores, cladóceros filtradores, copépodos omnívoros y predadores, y el ciliado *P. fallax*, todos potenciales depredadores de los FH. La abundancia del metazooplancton se incrementó en las muestras de febrero con respecto a las de octubre, y estuvo dominada por cladóceros en RH4 y por rotíferos en el resto de las lagunas. El impacto negativo de los cladóceros sobre los FH ha sido confirmado en numerosos trabajos (Jürgens, 1994; Jürgens *et al.*, 1996; Tadonlécé *et al.*, 2004; Sommer & Sommer, 2006); mientras que la variación del cociente BH:FH también se ha relacionado con un potencial efecto de depredación de los rotíferos sobre los FH (Tadonlécé *et al.* 2004; Fermani *et al.*, 2013). El copépodo omnívoro dominante de Rancho Hambre *B. poppei* es un depredador oportunista que puede ingerir presas pequeñas ($5 \mu\text{m}$) del tamaño de los FH observados en esta turbera austral (Weller, 1977). Por otro lado, Šimek y colaboradores (1996) demostraron que el ciliado más grande hallado en Rancho Hambre, *P. fallax*, además de depredar sobre el picoplancton consume organismos mayores a $2 \mu\text{m}$, convirtiéndose en otro potencial depredador de FH.

El cambio en el tipo de regulación de la abundancia de los FH observado en Rancho Hambre en el marco del modelo de Gasol (1994) probablemente sea una consecuencia del cambio estacional en la estructura del zooplancton, la que podría determinar las demás interacciones bióticas a través de un efecto de cascada trófica (Jürgens & Matz, 2002). Además, las interacciones bióticas cambian diferencialmente para los dos grupos de lagunas (someras vs. profundas) en el verano tardío dependiendo de la morfometría del cuerpo de agua, ya que las distintas estructuras de los metazoos halladas en los dos

grupos de lagunas estarían reguladas principalmente por el patrón de variación de la temperatura del agua.

La presente caracterización de la variación espacial y temporal de la estructura del plancton de las lagunas de la turbera de Rancho Hambre, junto con la caracterización limnológica de las lagunas realizada por González Garraza *et al.* (2012) constituyen la primera base de datos de la trama trófica completa de lagunas de turberas elevadas. Esta base de datos permitió proponer un modelo interpretativo respecto de cómo los factores abióticos definen la estructura de las comunidades plantónicas en esta turbera en particular. Con el fin de ampliar el espacio de inferencia de estos hallazgos, sería interesante realizar más relevamientos completos del plancton de lagunas de turberas elevadas para determinar si este patrón es representativo de las turberas elevadas del resto del mundo y evaluar cuanto difieren éstos de otros ecosistemas acuáticos húmicos.

CAPÍTULO II

ESTRUCTURA Y VARIACIÓN TEMPORAL DE LA COMUNIDAD DE BACTERIAS HETERÓTROFAS PLANCTÓNICAS EN RELACIÓN CON FACTORES AMBIENTALES

INTRODUCCIÓN

Se considera que la degradación bacteriana de la materia orgánica disuelta (MOD) es un proceso clave en el ciclo del carbono (Azam *et al.*, 1983). La MOD se define como la porción de materia orgánica que pasa a través de un filtro de tamaño de poro menor a 0,7 μm , y está compuesta por numerosos compuestos químicos, desde pequeñas moléculas orgánicas hasta polímeros de sustancias húmicas, los cuales están biodisponibles en diferente grado para ser utilizados por los microorganismos (Aitkenhead-Peterson *et al.*, 2003). La biodisponibilidad de la MOD está regulada por factores intrínsecos, tales como sus atributos químicos (e.g. la susceptibilidad a la degradación por radiación UV), que están determinados por la fuente y la diagénesis de la materia; así como por factores extrínsecos que regulan el metabolismo bacteriano, por ejemplo la temperatura, las interacciones tróficas e incluso la composición filogenética de la comunidad bacteriana (del Giorgio & Davis, 2003).

La MOD que se lixivia de turberas consiste principalmente de restos de *Sphagnum*, los que presentan bajo contenido de nutrientes (Asada & Warner, 2005), compuestos de carbono refractarios (Johnson & Damman, 1991) y compuestos químicos con propiedades antimicrobianas (Verhoeven & Liefveld, 1997). Su calidad fluctúa poco estacionalmente (Ågren *et al.*, 2008), incluso durante períodos de intenso flujo generado por el deshielo primaveral no se observan cambios en la calidad del carbono orgánico exportado en cuencas dominadas por turberas de *Sphagnum* (Berggren *et al.*, 2009a). Sin embargo, se ha registrado un efecto de dilución del carbono orgánico en este período. Según Berggren *et al.* (2009a), esto se debe a que durante el deshielo no se activan nuevas fuentes de carbono en las turberas, ya que se encuentran constantemente saturadas de agua, por lo que el incremento de la escorrentía superficial diluye la concentración del carbono orgánico –sin modificar su calidad– en los arroyos de la cuenca.

Berggren y colaboradores (2010) demostraron que una baja proporción (1,6–1,8%) de la MOD que se origina en turberas de *Sphagnum* está conformada por compuestos de bajo peso molecular, tales como ácidos carboxílicos, amino ácidos libres y carbohidratos simples; los cuales son asimilados por las bacterias constituyendo el 15-17% de la demanda bacteriana de carbono (DBC: respiración + producción). En este estudio se observó que la respiración bacteriana fue proporcional a la concentración de la MOD, mientras que la producción bacteriana se relacionó con la calidad del carbono orgánico. En concordancia con estos resultados, se ha observado que la abundancia del bacterioplancton de turberas de *Sphagnum* se relaciona con el pH y la concentración del

carbono orgánico disuelto (EE.UU.; Fisher *et al.*, 1998); y con la concentración de sustancias húmicas (Letonia; Druvietis *et al.*, 2010).

Un método comúnmente utilizado para la estimación de la abundancia de procariotas heterótrofos (arqueas + eubacterias) en muestras ambientales es la técnica de microscopía de epifluorescencia (MEF), la cual se basa en la observación directa de la fluorescencia emitida por los microorganismos teñidos con un colorante específico para ADN (Porter & Feig, 1980). Recientemente, Posch y colaboradores (2009) desarrollaron una metodología para estimar el tamaño celular y la abundancia relativa de cada uno de los morfotipos bacterianos (filamentos, bacilos grandes y pequeños, vibrios, cocos grandes y pequeños) utilizando el análisis semiautomático de imágenes de MEF. Otra técnica que también permite cuantificar BH en muestras ambientales es la citometría de flujo –CF (Gasol & del Giorgio, 2000). En general, las estimaciones de abundancia de BH planctónicas utilizando ambas técnicas (MEF y CF) arrojan valores similares para cultivos de *Escherichia coli*, muestras de agua dulce y salobre incluyendo lagos profundos, someros y cuerpos de agua temporarios (Monfort & Baleux, 1992; Salcher *et al.*, 2007; Schiaffino *et al.*, 2013) así como para muestras de agua marina (Li *et al.*, 1995; Troussellier *et al.*, 1999). Sin embargo, en los sistemas acuáticos de turberas la gran mayoría de los objetos cuantificados con MEF no se afilia con los dominios *Bacteria* ni *Archaea* (Dedysh *et al.*, 2006; Kulichevskaya *et al.*, 2011), por lo que la estimación de abundancia de BH con dicha técnica podría no concordar con la obtenida utilizando CF en estos sistemas particulares.

Las poblaciones citométricas se componen de células que comparten propiedades citométricas similares, como por ejemplo bacterias con alto y bajo contenido de ácidos nucleicos (HNA y LNA, respectivamente), las que tradicionalmente se asociaron con diferentes niveles de actividad celular (Gasol & del Giorgio, 2000). Se postuló que las HNA eran las bacterias más activas de la comunidad, mientras que las LNA representaban células inactivas, en estado de latencia o con muy bajos niveles de actividad celular (Gasol *et al.*, 1999; Lebaron *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios actuales revelan que las diferencias entre estas poblaciones citométricas no se relacionan con un nivel de actividad o tamaño celular específico, sino que presentan composiciones filogenéticas distintas (Wang *et al.*, 2009; Vila-Costa *et al.*, 2012). Por lo tanto, debido a que la distribución y abundancia de las poblaciones citométricas en un citograma componen el patrón citométrico de una muestra de agua, se podría hipotetizar que patrones citométricos distintos representarían composiciones filogenéticas características.

En función de estos antecedentes, se propone utilizar un enfoque polifásico combinando técnicas de MEF (abundancia), análisis de imágenes –AI (morfotipos, tamaño celular) y CF (abundancia, poblaciones citométricas) para estudiar la comunidad de BH de los cuerpos de agua de la turbera de Rancho Hambre e identificar los principales factores que determinan su estructura. Asimismo, se propone analizar de forma comparativa la eficiencia de los distintos fijadores comúnmente utilizados para CF, así como las estimaciones de abundancia y tamaño celular de las BH obtenidas mediante MEF y CF. La descripción de esta comunidad utilizando información complementaria obtenida con las distintas técnicas contribuirá al conocimiento general de las BH de turberas, y en particular constituirá la primera base de datos sobre esta comunidad para turberas de Tierra del Fuego.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se estudió la comunidad de bacterias heterótrofas planctónicas utilizando un enfoque polifásico: MEF, AI y CF, en relación con la concentración y calidad de la materia orgánica disuelta. Se analizó el segundo período de aguas abiertas estudiado (octubre de 2009 - abril de 2010), ya que sólo durante el mismo se tomaron muestras para el estudio de la concentración y calidad del COD y para el estudio de las BH utilizando CF. Las técnicas utilizadas para estudiar tanto las BH como las variables ambientales se detallaron previamente en la sección de Materiales y Métodos Generales.

Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en la matriz de correlación de las variables limnológicas con el fin de caracterizar a las lagunas y analizar la dinámica de sus características físico-químicas, utilizando el programa NTSYSpc 2.2 (Exeter Software, U.S.A.). La matriz de datos abióticos fue transformada ($\log_{10} + 1$) previamente a realizar el PCA (ter Braak & Smilauer, 2002).

Para estudiar la composición de los morfotipos bacterianos se calculó una matriz de similitud (índice de Bray Curtis) a partir de la matriz de abundancia de los mismos. Los patrones de similitud obtenidos se visualizaron utilizando 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, preservando la relación de las interdistancias (que equivalen al grado de similitud) entre los objetos. Cabe destacar que el valor absoluto de las interdistancias entre los puntos no se conserva necesariamente. Por el contrario, el objetivo de este

método es posicionar separados en el espacio de ordenamiento a los objetos poco similares, mientras que los objetos similares se ordenan próximos (Legendre & Legendre, 1998). La bondad de ajuste entre la representación en un espacio de baja dimensión y la matriz original se determinó mediante el índice *Stress* según la fórmula:

$$\text{Stress (fórmula 1)} = [\sum(D - d)^2 / \sum(D^2)]^{1/2} \text{ (Legendre \& Legendre, 1998)}$$

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. Este análisis se realizó mediante el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001).

Luego se estudió la matriz de similitud (índice Bray Curtis) para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los períodos de muestreo utilizando un diseño de análisis de varianza multivariado no paramétrico (PERMANOVA, función “*adonis*” del paquete *vegan* del programa R) (Anderson, 2001). La existencia de diferencias significativas entre las lagunas y los puntos de muestreo dentro de las lagunas se analizó utilizando un diseño anidado de PERMANOVA de dos factores, considerando los períodos de muestreo como bloques y las lagunas y los puntos dentro de las lagunas como factores de efectos fijos. Un valor de p significativo ($<0,05$) como resultado de un análisis PERMANOVA puede deberse a diferencias en los valores medios de los grupos, es decir, a la varianza entre grupos; a diferencias en la dispersión dentro de los grupos; o ambas (Anderson, 2001; Anderson, 2006). Por esta razón se realizó un análisis de homogeneidad multivariada de grupos de varianzas con pruebas de permutación (dispersión dentro de los grupos, función “*betadisper*” del paquete *vegan* del programa R) (Anderson, 2006), análogo al test de Levene para homogeneidad de varianzas. Este análisis calcula las distancias entre los objetos (muestras) y el centroide del grupo, luego hace un promedio de estas distancias para cada grupo y los compara entre sí utilizando un análisis de varianza. El valor de p de la prueba se obtiene comparando el estadístico F calculado con los estadísticos F generados por 999 permutaciones al azar.

Para estudiar el efecto de los parámetros abióticos sobre los patrones de composición de los morfotipos bacterianos se realizó un Análisis de Redundancia (RDA) (Legendre & Legendre, 1998) utilizando el programa R. Este método de ordenación se seleccionó dado que el análisis DCA (*Detrended Canonical Analysis*) reveló una respuesta lineal de los morfotipos bacterianos (ter Braak & Smilauer, 2002). Se utilizó la selección forward para agregar variables ambientales al modelo (función “*ordistep* – selección forward” del paquete *Vegan* – programa R). La significación del modelo global y de los ejes canónicos fue determinada mediante la función “*anova.cca*” del paquete *Vegan* del programa R.

Para evaluar la eficiencia de los tres fijadores utilizados para CF, se realizaron test no paramétricos de Kruskal-Wallis entre los promedios poblacionales de cada variable (abundancia de BH, FL1, FL3 y SSC). En los casos en que se encontraron diferencias significativas se realizaron comparaciones de a pares mediante la prueba de Mann-Whitney, aplicando la corrección de Bonferroni, utilizando el SPSS 15.0.1 (Statsoft, U.S.A.).

Se utilizó la prueba no paramétrica Rho de Spearman para estudiar las correlaciones entre las distintas variables. Además, se realizaron regresiones lineales, corroborando previamente el supuesto de normalidad de la variable dependiente (Prueba Kolmogorov-Smirnov). Estos análisis se realizaron mediante el programa SPSS 15.0.1 (Statsoft, U.S.A.).

El coeficiente de variación porcentual (CV) del nivel hidrométrico para cada laguna se calculó como $CV = (\text{desviación estándar/promedio}) * 100$.

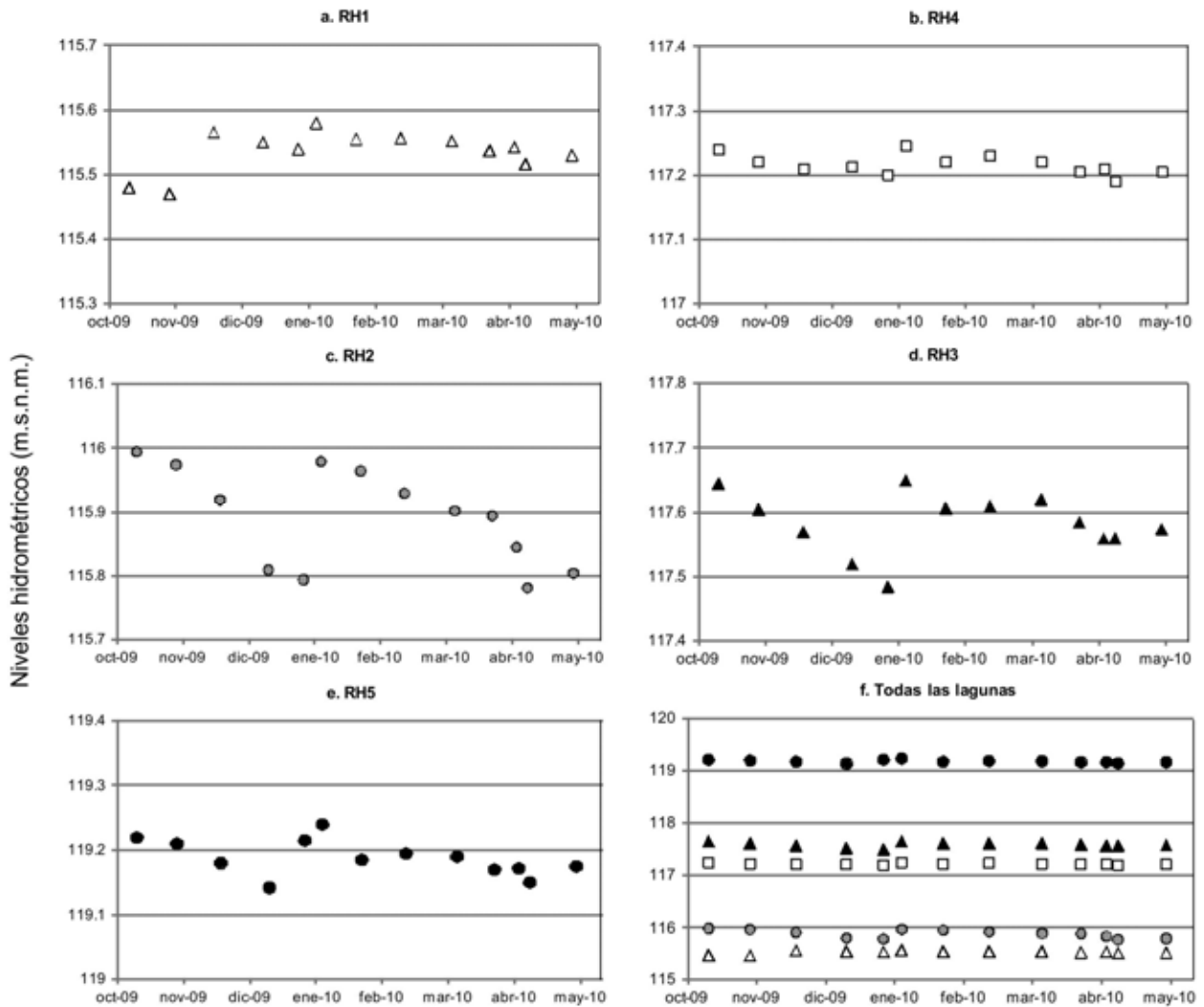
RESULTADOS

Parámetros hidrológicos

Cada uno de los cuerpos de agua estudiados dentro de la turbera de Rancho Hambre presentó su propia cuenca de aportes. Observaciones de campo mostraron que las mismas estaban delimitadas topográficamente por sectores elevados de turba que soportaban vegetación arbustiva (renovales de *Nothofagus* sp.), y además que algunos de los cuerpos de agua estaban interconectados superficialmente a través de canales naturales. Los cuerpos de agua más profundos RH1 y RH4 presentaron entradas y/o salidas, mientras que RH2 y los cuerpos de agua más someros RH3 y RH5 se hallaron aislados hidrológicamente.

Los niveles hidrométricos observados en las cinco lagunas desde octubre de 2009 hasta mayo de 2010 se muestran en la Figura 2.1. RH2, RH3 y RH5 presentaron un marcado descenso del nivel hidrométrico entre octubre y diciembre de 2009. RH2 mostró el nivel hidrométrico más variable (CV= 25%), RH1, RH3 y RH5 presentaron valores intermedios (CV= 8%, 13% y 7%, respectivamente), mientras que el cuerpo de agua de mayor superficie, RH4, fue el más estable (CV= 4%) (Figura 2.1f). Un análisis exhaustivo de los parámetros hidrológicos de las lagunas estudiadas puede encontrarse en González Garraza *et al.* (2012).

Figura 2.1: Niveles hidrométricos (metros sobre el nivel del mar) registrados durante el período de estudio en los cuerpos de agua (modificado de González Garza *et al.*, 2012).



Parámetros físico-químicos

La Tabla 2.1 resume los valores medios, mínimos y máximos de los parámetros físico-químicos medidos durante el ciclo estacional (octubre 2009 – abril 2010) en las cinco lagunas de la turbera de Rancho Hambre.

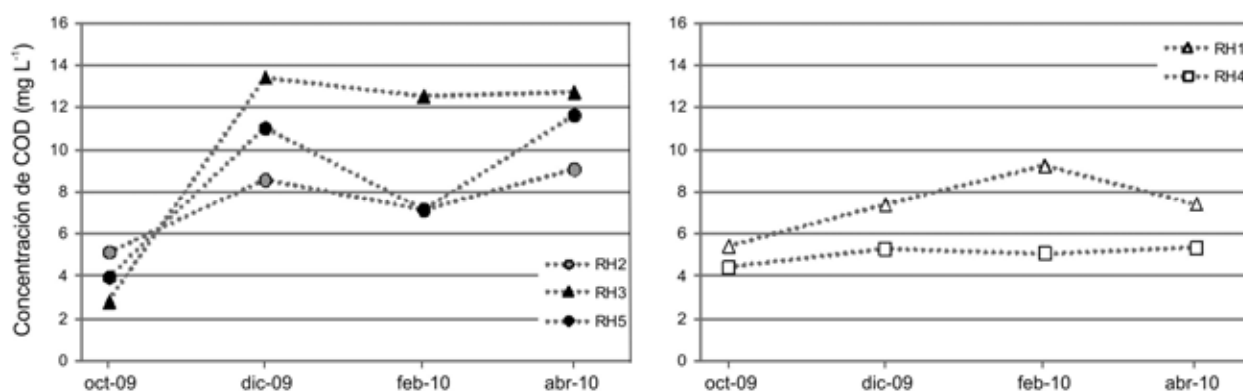
Tabla 2.1: Parámetros físicos y químicos de las cinco lagunas estudiadas.

	RH1	RH2	RH3	RH4	RH5
Temperatura (°C)	7,8 (2,2-10,7)	8,0 (1,1-11,1)	8,5 (3,2-11,6)	6,5 (2,3-11,1)	9,0 (1,7-14,3)
pH	6,2 (4,9-7,2)	5,0 (4,8-5,5)	4,9 (4,7-5,4)	6,3 (5,0-7,1)	4,9 (4,7-5,4)
Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	21 (13-27)	22 (9-29)	24 (15-29)	26 (12-34)	21 (5-27)
OD (mg L^{-1})	11 (10-11)	11 (10-11)	11 (10-12)	11 (11-12)	11 (10-11)
DT ($\text{mg equiv. CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	33 (21-51)	28 (17-46)	21 (14-32)	35 (23-56)	24 (20-26)
NID ($\mu\text{g L}^{-1}$)	32 (0-84)	24 (0-41)	45 (10-103)	51 (0-208)	40 (11-73)
NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5270 (1320-9790)	7315 (1650-13530)	6985 (1980-11330)	4785 (660-7480)	6408 (3410-10230)
PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	49 (10-100)	43 (10-110)	68 (40-130)	38 (0-130)	33 (20-50)
PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	151 (99-242)	154 (88-264)	215 (132-308)	158 (66-330)	160 (77-341)
COD (mg L^{-1})	7,5 (5,2-12,7)	7,9 (5,1-11,3)	10,4 (2,8-13,4)	5,0 (3,6-5,9)	8,4 (3,9-11,6)
a_{440} (m^{-1})	4,0 (3,0-6,0)	4,1 (5,3-2,5)	6,2 (1,4-8,8)	3,1 (0,2-9,2)	5,5 (2,5-9,4)
SUVA ₂₅₄ ($\text{L mg}^{-1} \text{ m}^{-1}$)	7,4 (4,7-9,2)	8,1 (6,3-11,2)	8,5 (7,6-9,7)	5,9 (4,4-10,4)	8,5 (5,9-12,6)
E2:E3	4,1 (3,3-5,2)	3,9 (3,8-4,2)	4,3 (4,0-4,6)	3,1 (2,3-3,9)	3,9 (3,1-4,7)

Se muestran los valores registrados en cada punto de muestreo a lo largo del período de estudio. Se calcularon los valores promedio; con los mínimos y máximos del rango de variación entre paréntesis ($n_{\text{RH1}} = 11$, $n_{\text{RH2}} = 10$, $n_{\text{RH3}} = 4$, $n_{\text{RH4}} = 16$, $n_{\text{RH5}} = 4$). OD: oxígeno disuelto, DT: dureza total, NID: nitrógeno inorgánico disponible, NT: nitrógeno total, PRS: fósforo reactivo soluble, PT: fósforo total, COD: carbono orgánico disuelto; a_{440} , SUVA₂₅₄ y E2:E3: índices de calidad de la materia orgánica disuelta.

La concentración del carbono orgánico disuelto (COD) presentó un patrón estacional en todas las lagunas, registrándose los valores más bajos para cada cuerpo de agua en primavera (octubre) (Figura 2.2). Este parámetro se incrementó entre los muestreos de primavera (octubre) y principios de verano (diciembre) en todos los cuerpos de agua. Sin embargo, el incremento fue marcado en el cuerpo aislado hidrológicamente RH2 y en los someros RH3 y RH5; mientras que en los cuerpos de agua profundos con conexiones superficiales, RH1 y RH4, se observó un incremento menos pronunciado.

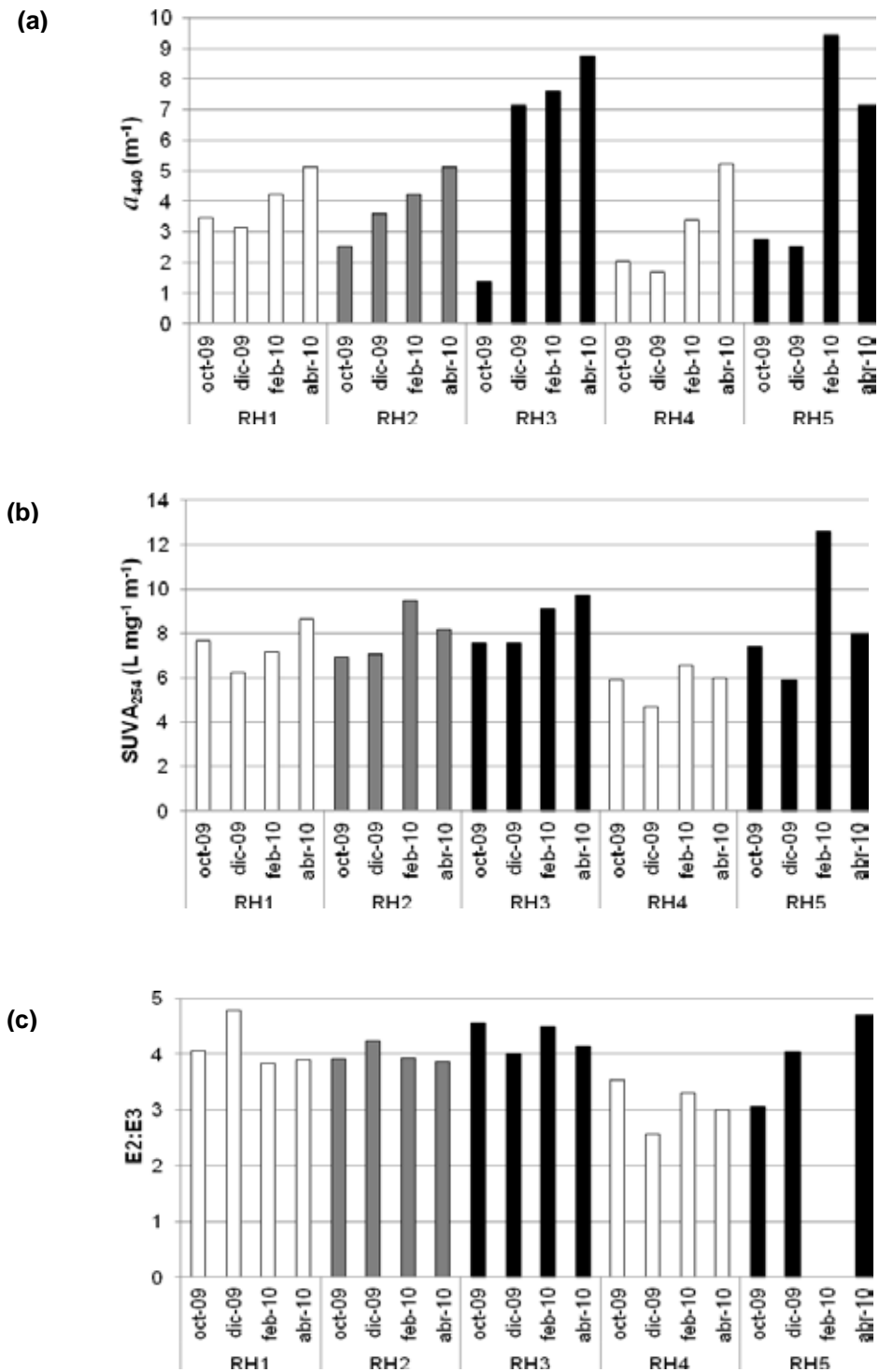
Figura 2.2: Concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en las lagunas.



La variación temporal del índice a_{440} mostró un incremento continuo en la contribución de compuestos terrestres coloreados a la composición del COD a lo largo del período de estudio en las cinco lagunas (Figura 2.3a). Además, en el verano tardío (febrero) y otoño (abril) se observó la mayor contribución de compuestos aromáticos a la composición del COD, es decir los valores máximos del índice $SUVA_{254}$ para cada laguna (Figura 2.3b). En este período, la materia orgánica disuelta presentó un carácter más coloreado (a_{440}) y aromático ($SUVA_{254}$), es decir, más refractario. Por el contrario, no se observó una variación temporal clara del índice E2:E3, registrándose valores cercanos a 4 en todos los cuerpos de agua (Figura 2.3c).

Se observó una correlación significativa entre la concentración de COD y el índice a_{440} ($r = 0,64$; $p < 0,001$; $n=43$).

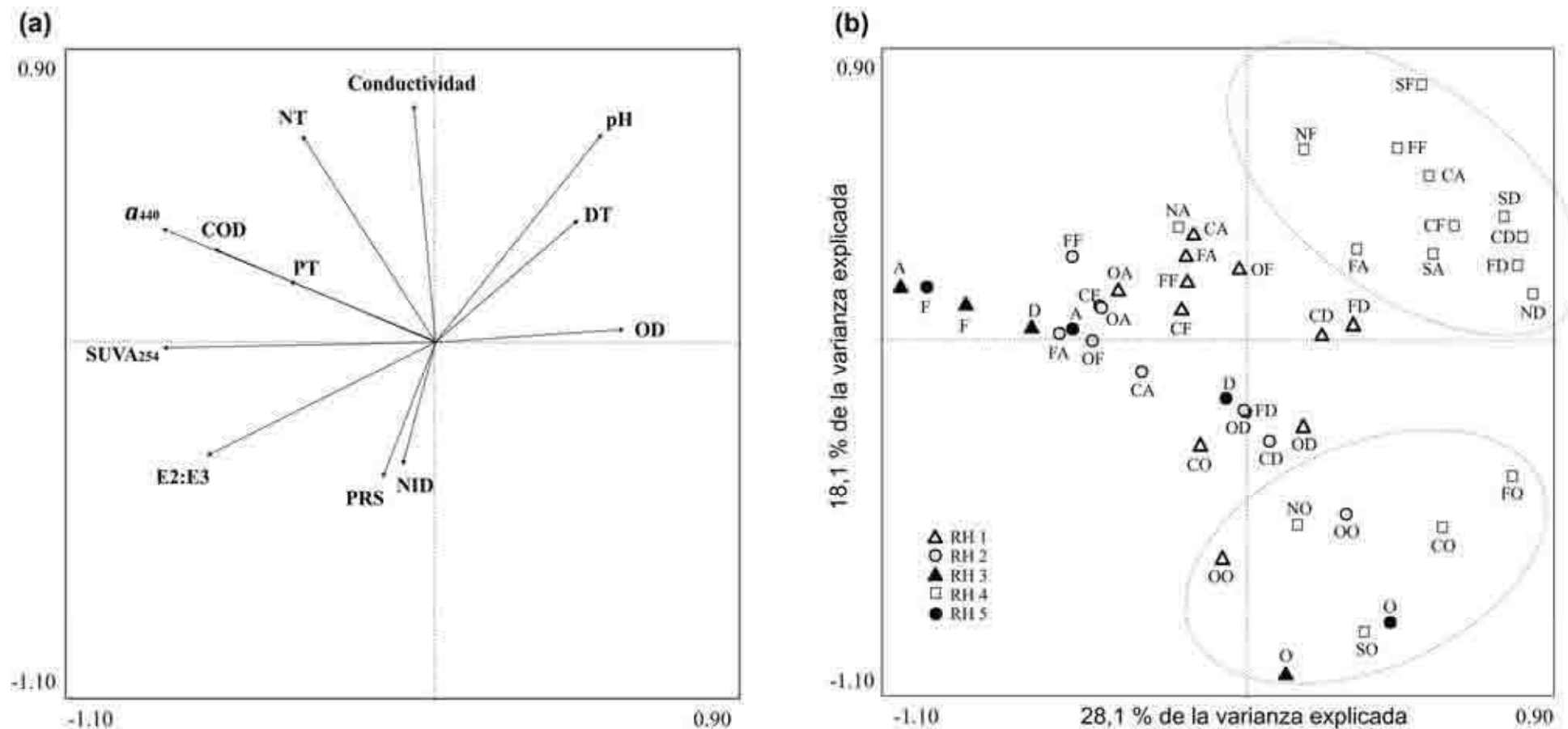
Figura 2.3: Índices de calidad de la materia orgánica disuelta registrados en las lagunas. a_{440} : estimador de la cantidad de C de origen terrestre -coloreado- potencialmente disponible para los consumidores del lago, $SUVA_{254}$: estimador de la aromaticidad de COD, y E2:E3: el índice se correlaciona negativamente con el tamaño molecular promedio de la materia orgánica disuelta.



Los resultados del Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en la matriz de correlación de las variables físico-químicas registradas en las cinco lagunas durante el período de estudio se muestran en la Figura 2.4a,b con el fin de exhibir claramente los autovectores que representan a las variables, y cómo las muestras se ordenaron en el espacio multivariado en función de los mismos. Los primeros dos ejes explicaron el 46,2% de la varianza. El primer eje explicó el 28,1% de la varianza y se asoció con los índices de calidad de la materia orgánica disuelta: a_{440} , $SUVA_{254}$ y E2:E3, y con la concentración del COD (autovectores = -0,82; -0,81; -0,69 y -0,66 respectivamente) (Figura 2.4a). El segundo eje explicó el 18,1% de la varianza y se relacionó principalmente con las variables conductividad, pH y NT (autovectores = 0,73; 0,64 y 0,63 respectivamente).

Las muestras de primavera (octubre) se localizaron en la parte inferior del diagrama y se asociaron con valores bajos de conductividad y NT. Por otro lado, las muestras de verano (diciembre, febrero) y otoño (abril) de RH4 se ubicaron en el cuadrante superior derecho, relacionadas con altos valores de pH y dureza total (condiciones minerotróficas) y con bajos valores del índice E2:E3, mientras que las mismas muestras de las lagunas pequeñas y someras RH3 y RH5 se ubicaron en la mitad izquierda del diagrama, asociadas con condiciones ombrotólicas y con altos valores de concentración de COD y de los índices $SUVA_{254}$ y a_{440} .

Figura 2.4: Ordenamiento de las muestras obtenido mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA), basado en la matriz de correlación de las variables físico-químicas. (a) Se muestran los autovectores de las distintas variables. (b) Se muestra la ordenación de la muestras en base a las variables. OD: oxígeno disuelto, DT: dureza total, NID: nitrógeno inorgánico disponible, NT: nitrógeno total, PRS: fósforo reactivo soluble, PT: fósforo total, COD: carbono orgánico disuelto; a_{440} , $SUVA_{254}$ y E2:E3: índices de calidad de la materia orgánica disuelta. Identificación de las muestras: primer letra indica el sitio de muestreo (O: orilla, C: centro superficie, F: centro fondo, N: orilla norte, S: orilla sur), mientras que la segunda letra indica el mes de muestreo (O: octubre de 2009, D: diciembre de 2009, F: febrero de 2010, A: abril de 2010).



Estudio de las bacterias heterótrofas utilizando microscopia de epifluorescencia y análisis de imágenes

La abundancia de BH presentó un patrón estacional, con valores mínimos en primavera (octubre) en todos los cuerpos de agua (Figura 2.5a). La contribución de los cocos pequeños a la abundancia total de BH fue siempre mayor al 60% (Figura 2.5b), alcanzado valores del 90% en ocasiones; mientras que la contribución de los filamentos (longitud > 5 μm) fue prácticamente despreciable. Los valores de tamaño celular promedio de los distintos morfotipos bacterianos se muestran en la Tabla 2.2.

Figura 2.5: (a) Abundancia promedio por cuerpo de agua de las bacterias heterótrofas (BH) determinada mediante MEF. (b) Contribución porcentual a la abundancia total de los distintos morfotipos bacterianos.

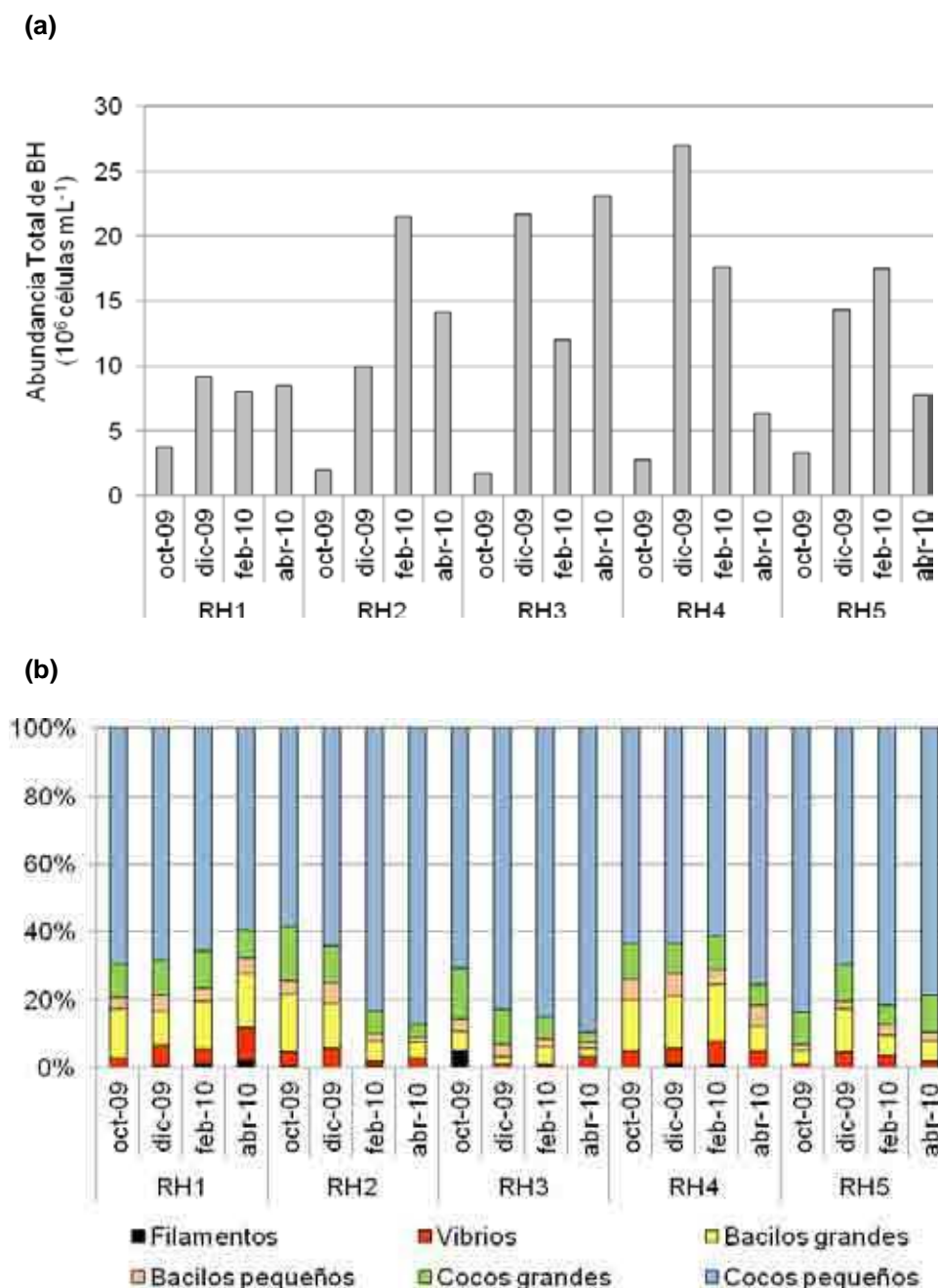


Tabla 2.2: Tamaño celular de los morfotipos bacterianos.
Se muestran los valores promedio \pm la desviación estándar.

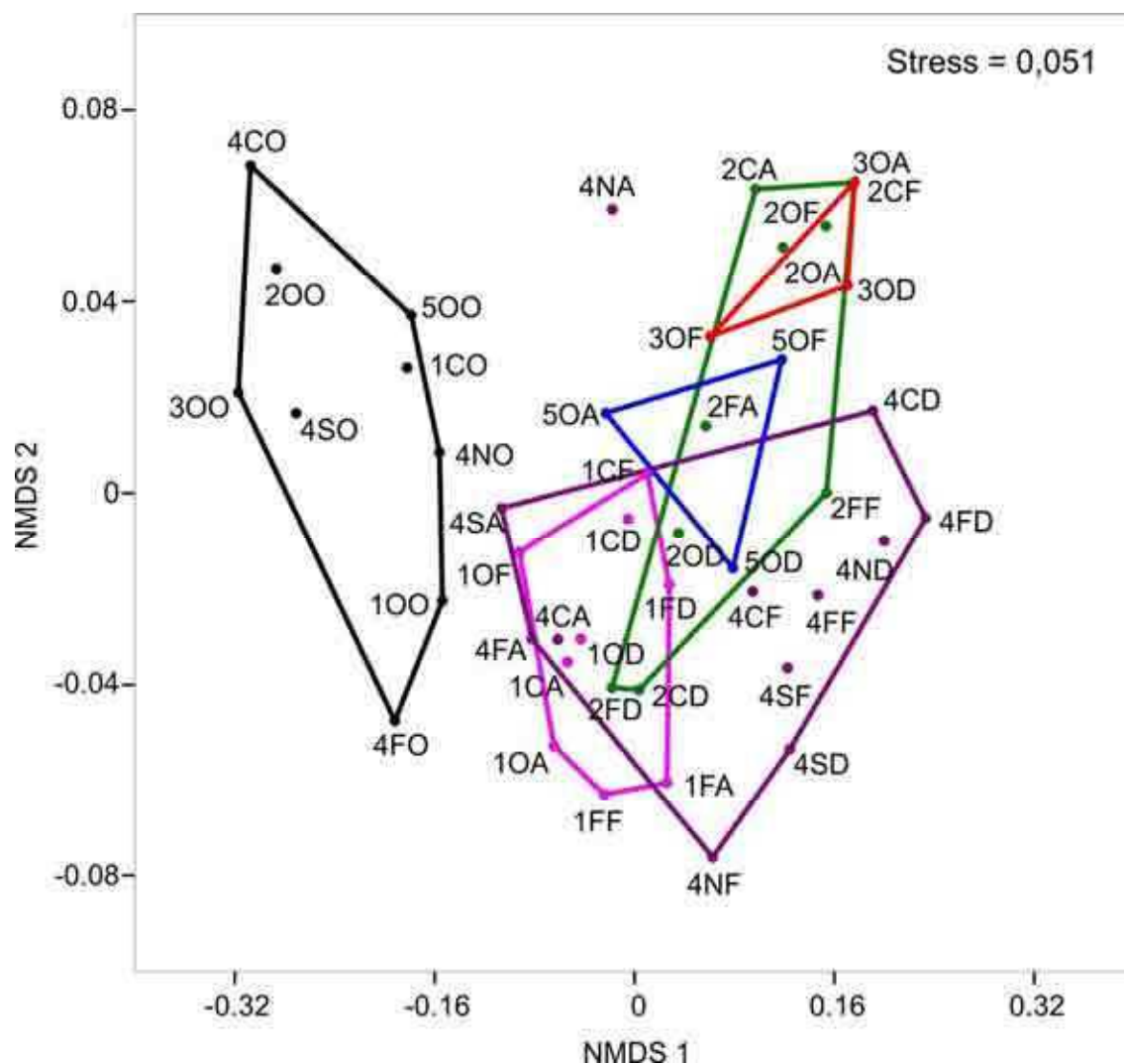
Morfotipos	Tamaño celular (μm^3)
Filamentos	0,4567 \pm 0,1653
Vibrios	0,0741 \pm 0,0265
Cocos grandes	0,0735 \pm 0,0447
Bacilos grandes	0,0609 \pm 0,0191
Bacilos pequeños	0,0308 \pm 0,0042
Cocos pequeños	0,0227 \pm 0,0041

La Figura 2.6 muestra la ordenación de las muestras en el espacio bidimensional resultante de un NMDS, basado en la matriz de similitud (índice Bray Curtis) obtenida a partir de la matriz de abundancia de los morfotipos bacterianos. La interdistancia entre dos sitios en el espacio multivariado representa el grado de similitud entre sus respectivas composiciones de morfotipos bacterianos, siendo los sitios más cercanos entre sí más similares.

La distribución de las muestras respecto del primer eje reveló una composición de morfotipos bacterianos característica de las muestras de primavera (octubre), reflejado un patrón temporal. El segundo eje, en cambio, reflejó un gradiente minero-ombrotrofico. La mayoría de las muestras de verano (diciembre-febrero) y otoño (abril) de las lagunas RH2, RH3 y RH5 se agruparon en la mitad superior del diagrama, mientras que la mayoría de las muestras del mismo período de las lagunas RH1 y RH4 se localizaron en la mitad inferior, sugiriendo una fuerte influencia del estado minero- vs. ombrotrofico del cuerpo de agua sobre la composición de morfotipos bacterianos.

Figura 2.6: Ordenamiento de las muestras obtenido mediante un Análisis de Escalamiento Multidimensional No-Métrico (NMDS), basado en la matriz de similitud (índice Bray Curtis) obtenida a partir de la matriz de abundancia de los morfotipos bacterianos.

Identificación de las muestras: el número indica la laguna (1-5 corresponde a RH1-RH5); la primer letra indica el sitio de muestreo (O: orilla, C: centro superficie, F: centro fondo, N: orilla norte, S: orilla sur), la segunda letra indica el mes (O: octubre, D: diciembre, F: febrero, A: abril). Las líneas de color representan los *convex hulls* de: octubre -negro, RH1 -rosa, RH2 -verde, RH3 -rojo, RH4 -violeta y RH5 -azul.



El efecto de la estacionalidad sobre la composición de los morfotipos bacterianos que se observó en la Figura 2.6 se estudió utilizando un análisis de PERMANOVA (Tabla 2.3). Este test reveló diferencias significativas entre las muestras de primavera (octubre) y las muestras de verano-otoño. En base a estos resultados, la similitud entre lagunas y puntos dentro de las lagunas se estudió utilizando un diseño anidado de PERMANOVA (Tabla 2.4), considerando al período de muestreo como bloques. No se observaron diferencias en la composición de morfotipos bacterianos entre puntos de muestreo dentro de las lagunas (orilla, orilla norte, orilla sur, centro superficie, centro fondo), mientras que entre

lagunas, las comparaciones de a pares indicaron que la laguna RH1 difirió de RH2 y RH3. La interacción entre ambos factores estudiados (lagunas y puntos de muestreo dentro de lagunas) fue no significativa. Con el fin de evaluar si los valores de p significativos se debían exclusivamente a una diferencia en los valores medios de los grupos, se corroboró la homogeneidad multivariada de grupos de varianzas con pruebas de permutación. No se observaron diferencias en la dispersión dentro de los grupos para los meses ($F = 0,345$; $p = 0,805$), las lagunas ($F = 2,29$; $p = 0,087$) y los puntos dentro de lagunas ($F = 0,32$; $p = 0,872$).

Tabla 2.3: Análisis de varianza multivariado no paramétrico (PERMANOVA) entre los períodos de muestreo (grupos), con las comparaciones de a pares de todos los grupos entre sí. Un valor de p significativo indica que la composición de morfotipos bacterianos difiere entre grupos.

	F	Valor p
Test Global	14,93	< 0,001
Octubre vs. Diciembre	35,17	< 0,001
Octubre vs. Febrero	39,06	< 0,001
Octubre vs. Abril	21,32	<0,001
Diciembre vs. Febrero	0,05	0,949
Diciembre vs. Abril	3,37	0,061
Febrero vs. Abril	3,58	0,047

Tabla 2.4: Análisis de varianza multivariado no paramétrico (PERMANOVA) de dos factores en bloques aleatorizados, considerando los periodos de muestreo como bloques y las lagunas y los puntos dentro de las lagunas como factores de efectos fijos. Se indican las comparaciones de a pares entre lagunas. Un valor de p significativo indica que la composición multivariada de morfotipos bacterianos difiere entre grupos.

	F	Valor p
Laguna	1,30	0,015
Puntos dentro de laguna	0,50	0,587
Interacción (Laguna*Sitio)	0,15	0,982
<i>Comparaciones de a pares:</i>		
RH1 vs. RH2	6,07	0,005
RH1 vs. RH3	4,53	0,016
RH1 vs. RH4	2,33	0,105
RH1 vs. RH5	1,21	0,314
RH2 vs. RH3	0,46	0,759
RH2 vs. RH4	0,96	0,389
RH2 vs. RH5	0,38	0,831
RH3 vs. RH4	0,63	0,515
RH3 vs. RH5	0,48	0,547
RH4 vs. RH5	0,30	0,766

Tanto la abundancia de BH totales, como las abundancias de los distintos morfotipos - excepto los filamentos- se correlacionaron positivamente con la temperatura (Tabla 2.5). Estos concuerdan con el patrón estacional observado para la abundancia de BH totales (Figura 2.5a). Además, la abundancia de los filamentos, los vibrios y los bacilos grandes y pequeños se correlacionó con el pH, parámetro que determina el carácter minero-ombrotrófico de las lagunas. La abundancia de los cocos pequeños –el morfotipo dominante- se correlacionó positivamente con la conductividad y las concentraciones de COD y NT; contribuyendo en gran medida a las correlaciones observadas entre las mismas variables ambientales y la abundancia de BH totales.

Tabla 2.5: Correlaciones significativas (Rho de Spearman; $p < 0,05$) entre las abundancias de BH totales y de los morfotipos bacterianos; y los parámetros físico-químicos. DT: dureza total, COD: carbono orgánico disuelto; a_{440} y E2:E3: índices de calidad de la materia orgánica disuelta, NID: nitrógeno inorgánico disponible, NT: nitrógeno total, PRS: fósforo reactivo soluble.

	BH totales	Filamentos	Vibrios	Bacilos grandes	Bacilos pequeños	Cocos grandes	Cocos pequeños
Temperatura	0,65**	-	0,46*	0,54**	0,59***	0,77***	0,62***
pH	-	0,57**	0,53**	0,42*	0,35	-	-
Conductividad	0,42*	-	0,36	-	0,39	-	0,43*
DT	-	0,30	-	-	-	-	-
COD	0,38	-	-	-	-	-	0,44*
a_{440}	-	-	-	-	-	-	0,30
E2:E3	-	-	-0,37	-0,36	-0,33	-	-
NID	-0,37	-	-0,40*	-0,39*	-	-0,51**	-0,34
NT	0,59**	-	-	-	-	0,34	0,62***
PRS	-	-	-	-	-	-0,31	-

* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; $n = 45$.

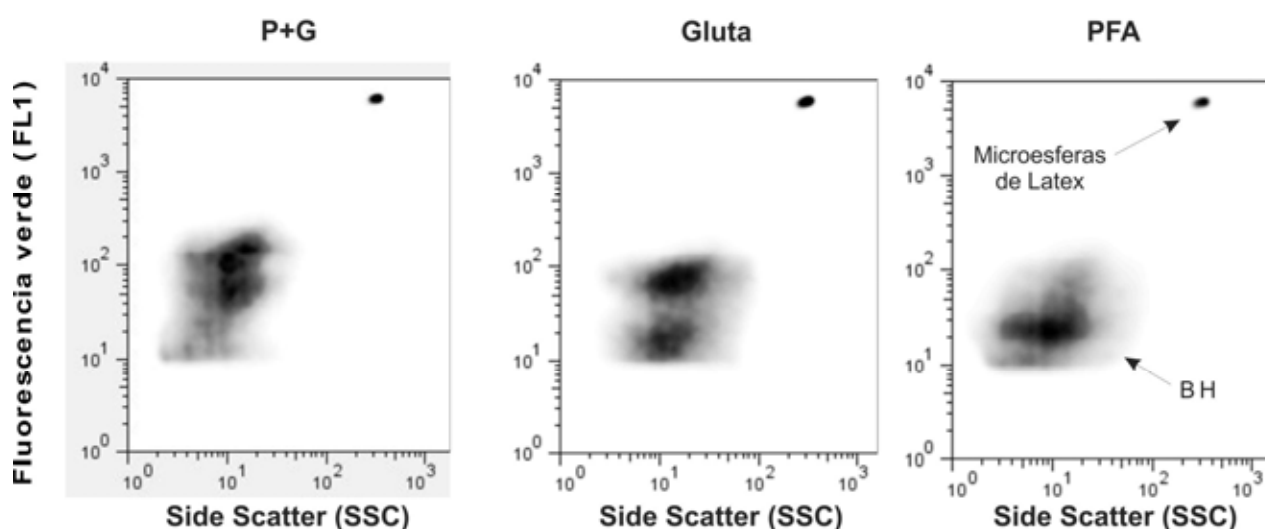
Para estudiar cómo los parámetros abióticos influyeron sobre los patrones de composición de los morfotipos bacterianos se realizó un Análisis de Redundancia (RDA) (Figura 2.7). Los factores ambientales que explicaron significativamente la variabilidad de dichos patrones fueron: la temperatura, el pH, los índices de calidad de la materia orgánica E2:E3 y a_{440} , y el NID ($p < 0,05$; función “ordistep – selección forward” del paquete Vegan – programa R), por lo cual éstas fueron las únicas variables que se incluyeron en el modelo. El porcentaje de varianza de la relación morfotipo-ambiente explicada por los dos primeros ejes fue del 66%. Tanto el modelo global como los dos primeros ejes canónicos resultaron significativos ($p < 0,001$; función “anova.cca” del paquete Vegan - programa R). La variable con mayor influencia sobre el eje 1 fue la temperatura (coeficiente de correlación = 0,82); mientras que las variables asociadas en mayor medida al eje 2 fueron el pH y el índice a_{440} (coeficientes de correlación = 0,66 y -0,63; respectivamente). El ordenamiento de las muestras respecto del primer eje reflejó un gradiente estacional. Las muestras de los meses fríos: primavera (octubre) y otoño (abril) se localizaron en la mitad izquierda del diagrama. En particular, la mayoría de las muestras de octubre se ordenaron en el cuadrante superior izquierdo asociadas con bajas temperaturas y altos valores de NID, y presentaron bajas abundancias de cocos. Las muestras de verano (diciembre y febrero) se ubicaron en la mitad derecha del diagrama asociadas con altas temperaturas, y presentaron altas abundancias de todos los morfotipos.

En la parte superior derecha del diagrama se ubicaron la mayoría de las muestras de verano de RH1 y RH4, cuyas aguas son moderadamente ácidas ($> \text{pH}$) y contienen materia orgánica disuelta de mayor peso molecular promedio ($< \text{E2:E3}$), donde se observa mayor contribución de los filamentos, vibrios y bacilos grandes y pequeños a la composición de morfotipos bacterianos. En cambio, en la parte inferior del diagrama se localizan las mismas muestras de RH2, RH3 y RH5, caracterizados como cuerpos de agua ácidos ($< \text{pH}$) cuya materia orgánica disuelta presenta un carácter más coloreado ($> a_{440}$), con mayor contribución de cocos pequeños a la composición de morfotipos bacterianos.

Estudio de las bacterias heterótrofas utilizando CF

El estudio de las BH de las lagunas de Rancho Hambre mediante CF utilizando los fijadores Paraformaldehído+Glutaraldehído (P+G), Glutaraldehído (Gluta) y Paraformaldehído (PFA), confirmó que el patrón de las poblaciones citométricas observado es característico de cada fijador (Figura 2.8).

Figura 2.8: Citogramas correspondientes al análisis de una muestra de RH1 mediante CF utilizando los fijadores: Paraformaldehído+Glutaraldehído (P+G), Glutaraldehído (Gluta) y Paraformaldehído (PFA). BH: bacterias heterótrofas.



Los valores promedio de abundancia total de BH y los respectivos parámetros citométricos obtenidos con los fijadores: P+G, Gluta y PFA se muestran en la Figura 2.9. Los valores promedio de cada parámetro se compararon mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones de a pares utilizando la prueba de Mann-Whitney aplicando la corrección de Bonferroni.

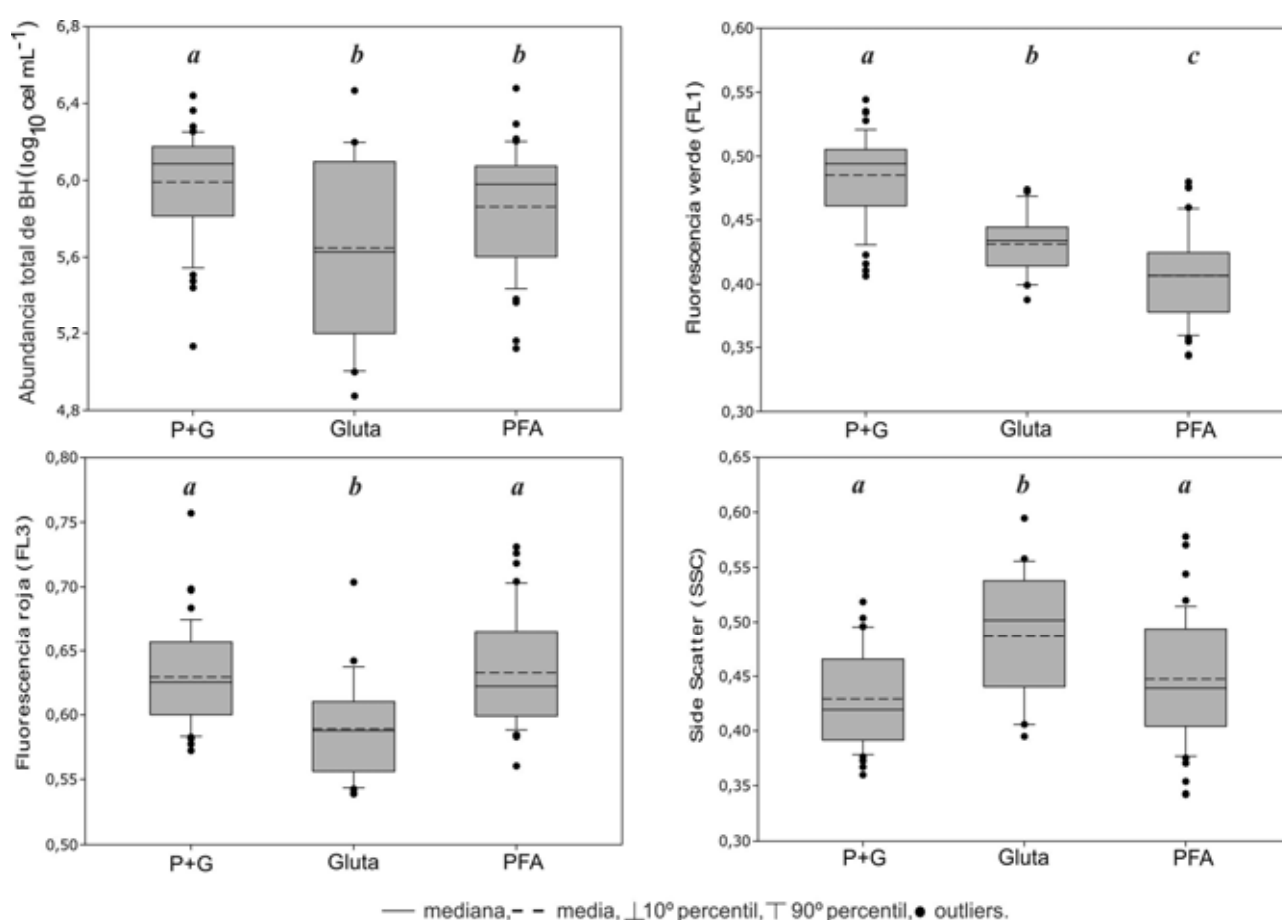
Con el fijador P+G se obtuvieron los mayores valores de abundancia y fluorescencia verde (FL1). Este último parámetro se asocia con el contenido relativo de ácidos nucleicos por célula, ya que corresponde a la fluorescencia verde del colorante de tinción de ADN (SybrGreen I) que se utiliza para identificar a las BH. Los valores del FL1 varían en función del fijador utilizado, debido a que éste determina la permeabilidad de la membrana celular respecto del colorante y el estado de preservación del material genético.

El valor del parámetro citométrico Side-Scatter (SSC) fue similar entre el P+G y el PFA, y menor que para el Gluta. Estos resultados sugieren que el Gluta modifica las propiedades ópticas de las células incrementando la señal del SSC. Este parámetro está relacionado con la complejidad interna de la célula, y en partículas pequeñas (como por

ejemplo las BH) también con el tamaño celular, por lo que la distorsión de este parámetro podría conducir a conclusiones erróneas.

Por último, los valores de fluorescencia roja (FL3) obtenidos con los fijadores P+G y PFA fueron similares, y mayores que los registrados para el Gluta. A pesar de que el SybrGreen I tiene su máximo de emisión en la longitud de onda correspondiente al FL1, ésta también logra ser captada en menor medida por el receptor del FL3 debido al solapamiento del espectro de emisión del colorante y el rango de captación del detector FL3.

Figura 2.9: Valores promedio de abundancia total de BH y parámetros citométricos asociados obtenidos con los fijadores: Paraformaldehído+Glutaraldehído (P+G), Glutaraldehído (Gluta) y Paraformaldehído (PFA). Las letras indican diferencias significativas entre fijadores. $n_{P+G} = 45$, $n_{Gluta} = 21$, $n_{PFA} = 45$.



Los patrones citométricos de las BH fueron característicos de cada laguna. En la Figura 2.10 se muestran como ejemplo los biplots que representan las muestras de orilla de los cuerpos de agua en verano tardío. Además, en las muestras fijadas con P+G se identificaron hasta tres poblaciones citométricas de BH caracterizadas por su contenido de ácidos nucleicos: bacterias con bajo contenido de ADN (LNA), contenido intermedio de ADN (INA) y alto contenido de ADN (HNA) (Figura 2.11).

Figura 2-10: Citogramas correspondientes a las bacterias heterótrofas (BH) de las orillas de los cuerpos de agua en verano tardío. El análisis se realizó sobre muestras fijadas con P+G.ML: microesferas de látex.

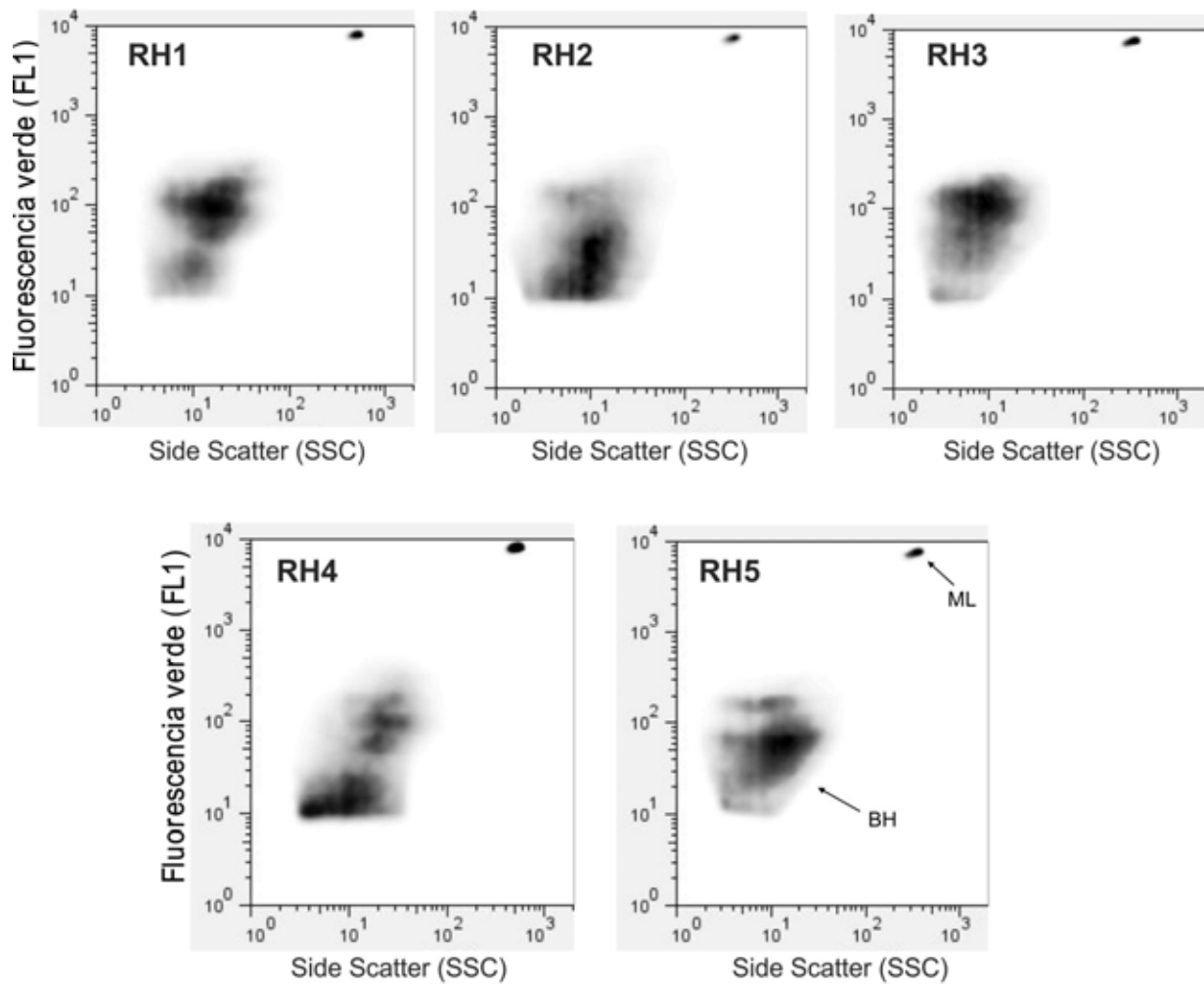
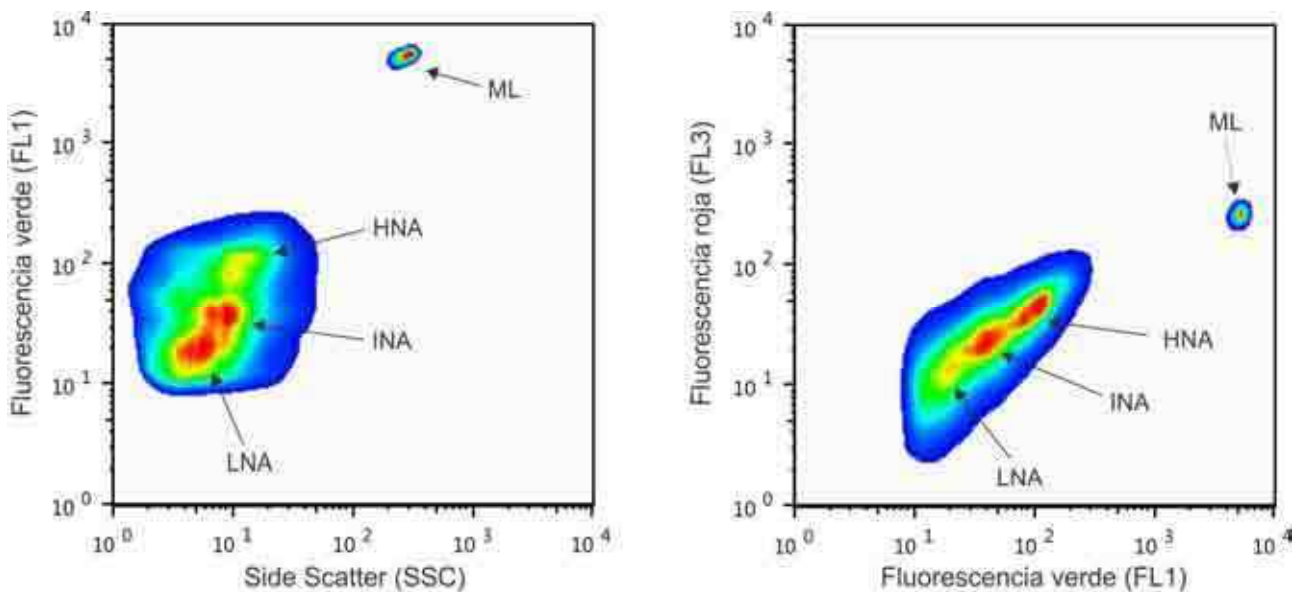
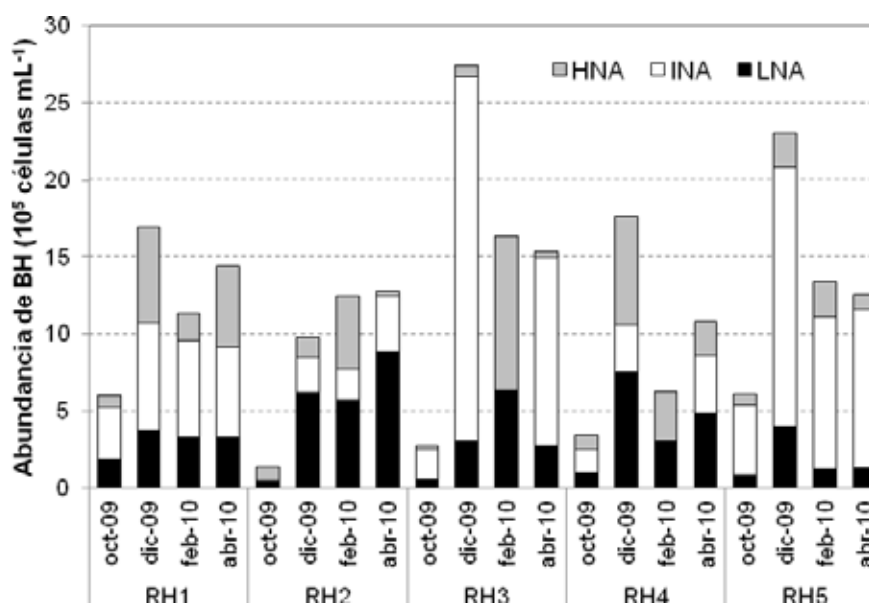


Figura 2.11: Citogramas correspondientes a las bacterias heterótrofas (BH) de una muestra de orilla de RH4 a comienzos del verano. Se indican las distintas poblaciones citométricas identificadas: bacterias con bajo contenido de ADN (LNA), contenido intermedio de ADN (INA) y alto contenido de ADN (HNA). La muestra se fijó con P+G.ML: microesferas de latex.



La variación estacional de la abundancia de las poblaciones citométricas de BH en las cinco lagunas se muestra en la Figura 2.12. Para cada laguna, los menores valores de abundancia tanto de BH totales como de las poblaciones citométricas (LNA, INA, HNA) se observaron en primavera (octubre).

Figura 2.12: Abundancia promedio por cuerpo de agua de la comunidad de bacterias heterótrofas (BH) y las poblaciones citométricas: bacterias con bajo contenido de ADN (LNA), contenido intermedio de ADN (INA) y alto contenido de ADN (HNA).



La abundancia total de BH, así como la de las poblaciones citométricas se correlacionaron positivamente con la temperatura, las concentraciones de nitrógeno total y carbono orgánico disuelto (Tabla 2.6), confirmando la estacionalidad y dependencia nutricional del bacterioplancton determinada mediante la técnica de MEF. Además, el parámetro FL1 (asociado al contenido de ácidos nucleicos) tanto de la comunidad de BH como de las poblaciones citométricas se correlacionó negativamente con el pH y la dureza total, y positivamente con la concentración de COD y los índices de calidad de la materia orgánica disuelta. Por otro lado, la concentración del COD se correlacionó negativamente con el parámetro SSC, sugiriendo un efecto sobre la complejidad interna de las células.

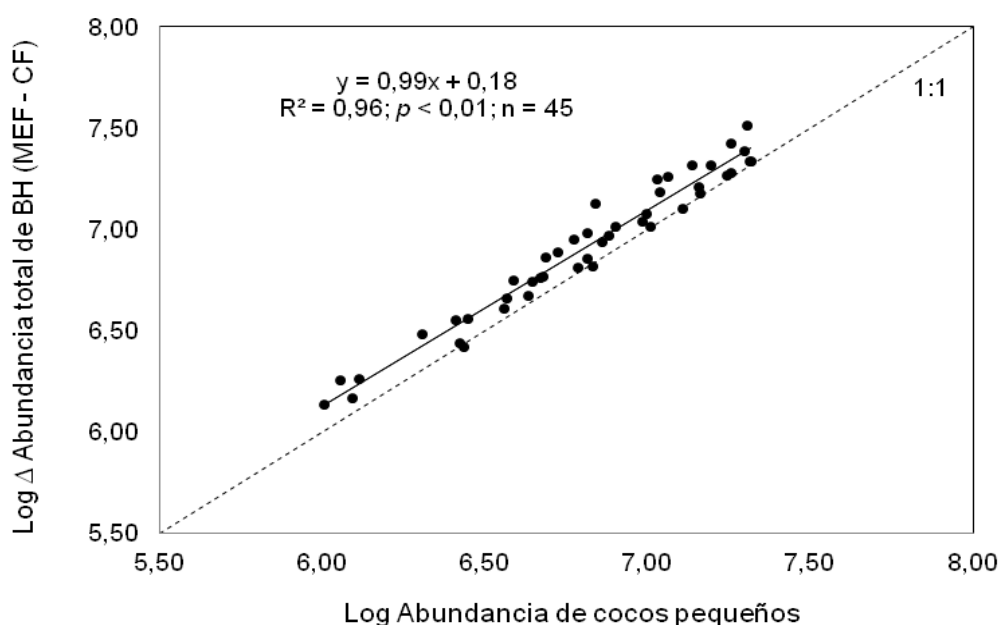
Tabla 2.6: Correlaciones significativas (Rho de Spearman; $p < 0,05$, $n=45$) entre los parámetros físico-químicos y las abundancias y los parámetros citométricos (FL1, SSC) de la comunidad de bacterias heterótrofas (BH) y de las poblaciones citométricas: bacterias con bajo contenido de ADN (LNA), contenido intermedio de ADN (INA) y alto contenido de ADN (HNA). DT: dureza total, NT: nitrógeno total, COD: carbono orgánico disuelto; a_{440} , $SUVA_{254}$ y E2:E3: índices de calidad de la materia orgánica disuelta.

	Temperatura	pH	DT	NT	COD	a_{440}	$SUVA_{254}$	E2:E3
BH	-	-	-	-	-	-	-	-
Abundancia	0,48	-	-	0,45	0,50	-	-	-
FL1	-	-0,42	-0,47	-	0,56	0,44	0,43	0,57
SSC	-0,32	-	-	-0,31	-0,55	-	-	-
HNA	-	-	-	-	-	-	-	-
Abundancia	0,47	0,52	0,41	-	-	-	-	-
FL1	-	-0,55	-0,62	-	0,46	0,37	0,36	0,53
SSC	-0,51	-	-	-	-	-	-	-
INA	-	-	-	-	-	-	-	-
Abundancia	0,82	-	-	0,37	0,67	-	-	0,39
FL1	-	-0,52	-0,57	-	0,54	0,42	0,40	0,46
SSC	-	-	-	-	-0,40	-	-	-
LNA	-	-	-	-	-	-	-	-
Abundancia	0,38	-	-	0,46	0,33	-	-	-
FL1	-	-0,41	-0,50	0,32	0,71	0,52	0,39	0,37
SSC	-	-	0,37	-	-0,43	-	-	-

Comparación entre métodos de estudio de las BH

Los valores de abundancia total de BH obtenidos mediante MEF y CF difirieron entre sí en un orden de magnitud, registrándose los mayores valores con la técnica de microscopía. Esta diferencia se relacionó con la abundancia de los cocos pequeños (Figura 2.13), observándose una regresión lineal significativa entre ambas variables

Figura 2.13: Relación entre la abundancia del morfotipo coco pequeño y la diferencia observada en la estimación de abundancia total de BH utilizando microscopía de epifluorescencia (MEF) y citometría de flujo (CF).



En función de estos resultados se utilizaron muestras de una campaña realizada en octubre de 2012, en la cual se muestrearon sólo las orillas de los cinco cuerpos de agua, para estimar la abundancia de las BH utilizando la configuración tradicional del equipo para la técnica de CF (descrita en la sección de Materiales y Métodos Generales, utilizando microesferas de látex de 1 μm como patrón); y además una nueva configuración del equipo aumentando los fotomultiplicadores del FL1 y utilizando microesferas de látex de 0,5 μm como patrón, las que presentan un tamaño similar al de las bacterias de estos cuerpos de agua. Los citogramas observados utilizando ambas configuraciones sugieren que la configuración tradicional del equipo capta la totalidad de la comunidad de BH detectable mediante esta técnica (Figura 2.14). Se observó un incremento del ruido con la configuración nueva (Figura 2.14b) en relación con la configuración tradicional (Figura 2.14a); sin embargo se estimaron abundancias de BH prácticamente similares con ambas configuraciones (Figura 2.15).

Figura 2.14: Citogramas correspondientes a las bacterias heterótrofas (BH) de una muestra de orilla de RH1. (a) Configuración tradicional y (b) configuración nueva del equipo. La muestra se fijó con P+G.

ML: microesferas de látex.

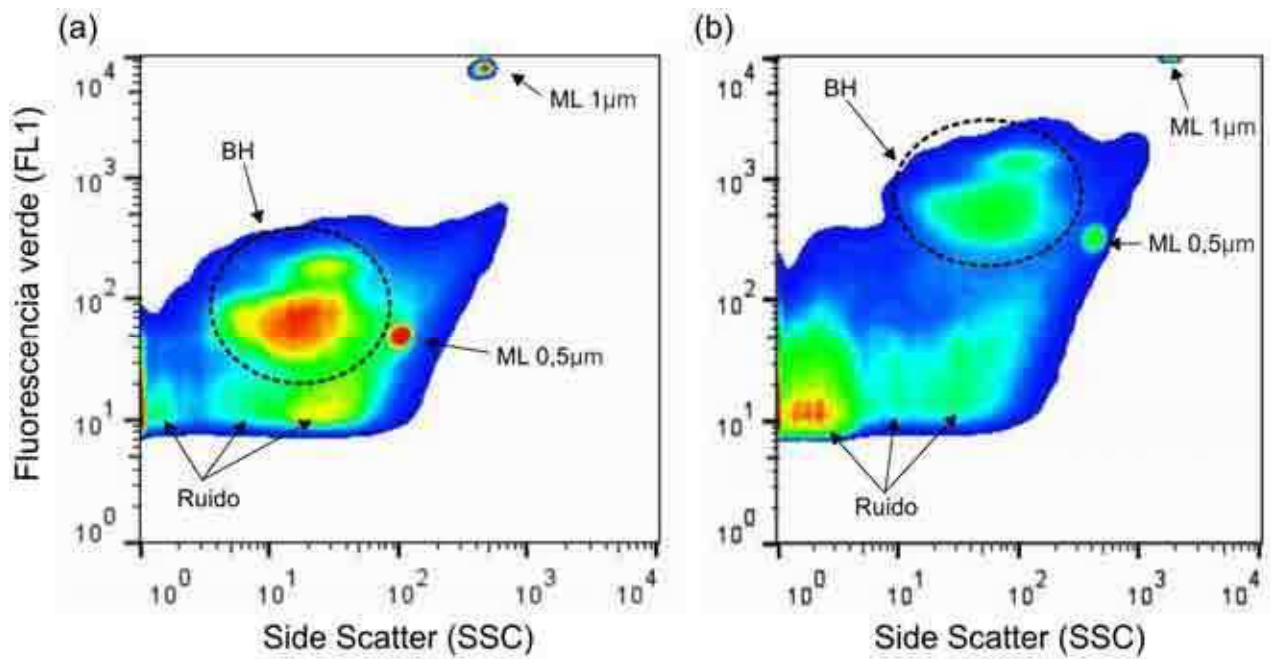
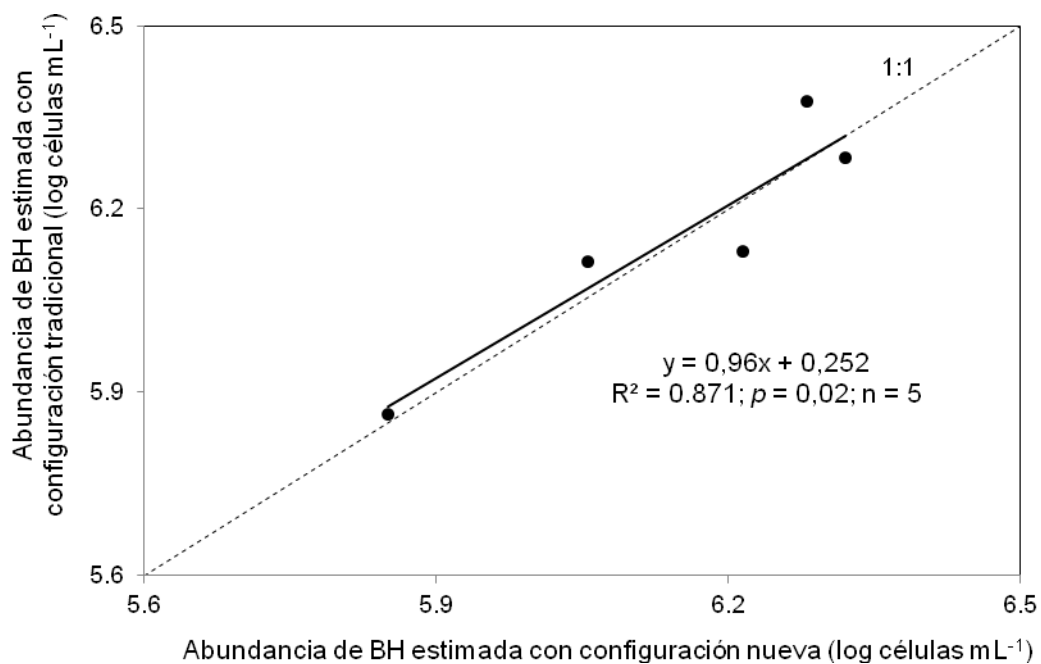


Figura 2.15: Relación entre las abundancias de bacterias heterótrofas (BH) estimadas con las configuraciones tradicional (ML $1\mu\text{m}$) y nueva (ML $0,5\mu\text{m}$) del citómetro de flujo.



Por otro lado, se comparó el tamaño celular promedio (TC) de la comunidad de BH estimado mediante el protocolo semiautomático de análisis de imágenes de microscopía de epifluorescencia (AI-MEF) descrito por Massana y colaboradores (1997) con las estimaciones de TC en base a parámetros citométricos utilizando fórmulas descritas en la bibliografía (Gasol & del Giorgio, 2000; Tadonlécé *et al.*, 2005) (Figuras 2.16 y 2.17).

Se estimaron dos TC de la comunidad de BH planctónicas de Rancho Hambre: (i) considerando todos los morfotipos de BH detectados mediante AI-MEF, y (ii) excluyendo a los cocos pequeños debido a que este morfotipo bacteriano no se detectó en los citogramas (ver Figura 2.13). En el primer caso se obtuvieron valores entre 0,02 y 0,05 μm^3 , con sólo 2 muestras de las 45 analizadas presentando valores $\geq 0,07 \mu\text{m}^3$ (considerados como *outliers*); mientras que en el segundo caso se registró un rango de variación de 0,05 a 0,09 μm^3 , observándose valores $\geq 0,12 \mu\text{m}^3$ en sólo 3 muestras (considerados como *outliers*).

En la Figura 2.16a, b se utilizó la fórmula descrita por Gasol & del Giorgio (2000) para estimar el TC:

$$\text{TC} [\mu\text{m}^3] = 0,0075 + 0,11 * \text{FL1} \quad (1)$$

Mientras que en la Figura 2.17a, b se utilizó la fórmula descrita por Tadonlécé y colaboradores (2005):

$$\text{TC} [\mu\text{m}^3] = 0,0049 + 2,976 * \text{SSC} \quad (2)$$

Utilizando la fórmula 1 se calcularon valores de TC de BH similares a los estimados mediante AI-MEF sólo cuando se excluyeron los cocos pequeños (Figura 2.16b); sin embargo en ningún caso se observó relación entre el TC determinado mediante AI-MEF y el parámetro citométrico FL1 (Figura 2.16c, d). Por otro lado, la fórmula 2 calculó valores de TC de BH 20 veces mayores que los estimados utilizando AI-MEF (Figura 2.17a, b), mientras que se observaron regresiones lineales significativas considerando al SSC como variable independiente (Figura 2.17c, d), aunque estos modelos explicaron menos del 30% de la varianza del TC medido con AI-MEF. Con los datos analizados en la presente tesis no se halló ningún modelo que permita estimar correctamente el TC de las BH de la turbera de Rancho Hambre utilizando parámetros citométricos.

Figura 2.16: Relaciones entre las estimaciones de tamaño celular promedio (TC) utilizando análisis de imágenes de microscopía de epifluorescencia (AI-MEF) y citometría de flujo. (a, b) El TC se calculó utilizando el parámetro citométrico FL1 según Gasol & del Giorgio (2000). (c, d) Relación entre el TC estimado mediante AI-MEF y FL1. Para estimar el TC se consideraron todos los morfotipos bacterianos determinados mediante AI-MEF (a, c), o se excluyeron los cocos pequeños (b, d). Puntos en gris: *outliers*.

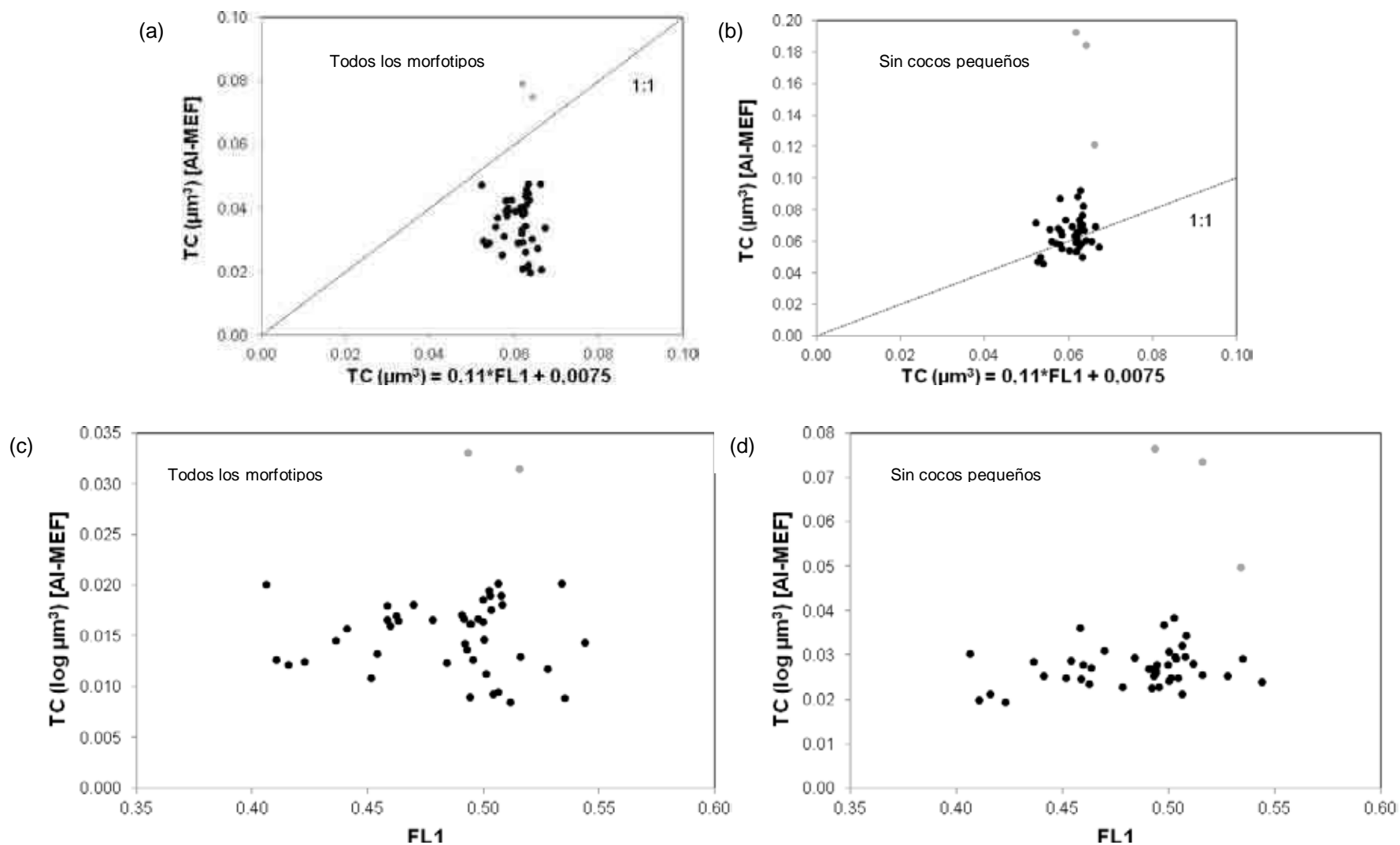
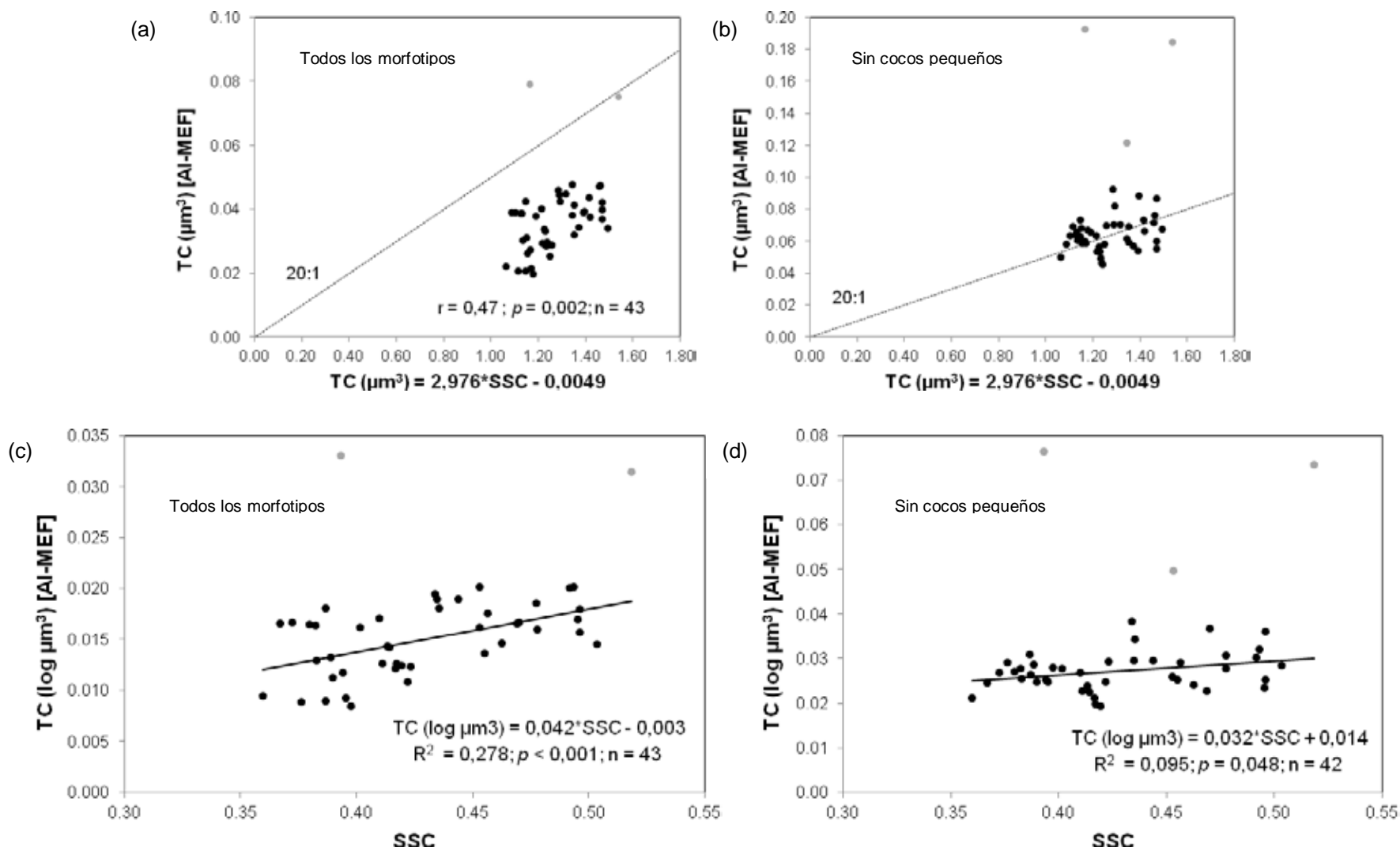


Figura 2.17: Relaciones entre las estimaciones de tamaño celular promedio (TC) utilizando análisis de imágenes de microscopía de epifluorescencia (AI-MEF) y citometría de flujo. (a, b) El TC se calculó utilizando el parámetro citométrico SSC según Tadonleké *et al.* (2005). (c, d) Relación entre el TC estimado mediante AI-MEF y SSC. Para estimar el TC se consideraron todos los morfotipos bacterianos determinados mediante AI-MEF (a, c), o se excluyeron los cocos pequeños (b, d). Puntos en gris: *outliers*.



DISCUSIÓN

Caracterización ambiental de las lagunas de la turbera

La caracterización de las muestras de las lagunas de Rancho Hambre en función de sus variables físico-químicas entre octubre de 2009 y abril de 2010 reveló un gradiente temporal, donde las muestras de primavera fueron similares entre sí. Además, durante el verano y otoño se observó un gradiente respecto del estado de las lagunas: altos valores de pH y dureza total reflejaron las condiciones minerotróficas en RH4, mientras que altos valores de concentración de COD y de los índices $SUVA_{254}$ y a_{440} se asociaron con condiciones ombrotróficas en las lagunas más someras RH3 y RH5. Esta caracterización se condice con el análisis de los parámetros limnológicos realizado por González Garraza (2012), lo que refleja que el set de datos analizados en este Capítulo (segundo período de aguas abiertas) presenta un patrón similar al observado para el conjunto de datos de los dos períodos de aguas abiertas consecutivos.

Los estudios de COD en ríos de cuencas dominadas por turberas de *Sphagnum* spp. al norte de Suecia demostraron que éste presenta un carácter refractario (Berggren *et al.*, 2007, 2009a, 2009b, 2010), y que además su calidad fluctúa poco estacionalmente (Ågren *et al.*, 2008; Berggren *et al.*, 2009a). Esto concuerda con lo observado en las lagunas de Rancho Hambre, donde el análisis de la calidad de COD reveló una predominancia de compuestos terrestres coloreados, aromáticos y de alto peso molecular.

El patrón estacional de la concentración de COD observado en las lagunas de Rancho Hambre, con valores mínimos en primavera (octubre), se condice con los estudios de Berggren y colaboradores (2009a) en cuencas dominadas por turberas de *Sphagnum* en Suecia. Estos autores postulan que el deshielo primaveral diluye la concentración del carbono orgánico que se exporta hacia los cuerpos de agua de la cuenca, lo que podría explicar el patrón observado en Rancho Hambre. Por otro lado, en la estación seca (diciembre) se observó un marcado aumento de la concentración de COD acompañado de un descenso del nivel hidrométrico en las lagunas sin conexiones superficiales RH2, RH3 y RH5, sugiriendo que la evaporación es una variable que influye sobre la dinámica del COD en estos cuerpos de agua. El incremento menos pronunciado en la concentración de COD durante este período en RH1 y RH4 podría atribuirse a la estabilidad del nivel hidrométrico en estas lagunas, causada por la microtopografía de la turbera.

Estudio de las BH utilizando MEF y AI

La abundancia de BH presentó un patrón estacional, con valores mínimos en primavera en todos los cuerpos de agua de Rancho Hambre. Este ciclo estacional es similar al observado por Lara y colaboradores (2011) en una laguna de turbera elevada en Suiza, donde las abundancias mínimas de BH ocurrieron en invierno y las máximas en primavera tardía y verano.

El estudio de la morfología bacteriana en Rancho Hambre reveló que los cocos pequeños son el morfotipo dominante (>60% de la abundancia total de BH); representados por células de $0,023 \mu\text{m}^3$ de volumen celular promedio (diámetro esférico equivalente = $0,35 \mu\text{m}$). Estos resultados concuerdan con el estudio de Gilbert y colaboradores (1998), donde los cocos representaron el morfotipo bacteriano dominante (89%) en el agua intersticial del *Sphagnum* de una turbera minerotrófica en Francia. Este predominio de bacterias pequeñas podría deberse a diversas razones. Entre ellas, una elevada presión de depredación de los protistas bacterívoros puede favorecer selectivamente el desarrollo de bacterias muy pequeñas (efecto conocido como miniaturización) o bien demasiado grandes (e.g. filamentos) para que puedan ser ingeridas por los depredadores (Figura 4 de la Introducción General; Pernthaler & Amann, 2005). En los ambientes con baja disponibilidad de nutrientes se observan en general células pequeñas, a diferencia de los sistemas con alta disponibilidad de nutrientes donde las bacterias pueden desarrollar estructuras filamentosas o agregados celulares en respuesta a la depredación (Jürgens & Matz, 2002). Pernthaler (2005) postuló que la ausencia de filamentos bacterianos en ambientes oligotróficos como los océanos está relacionada con esta interacción entre la limitación por nutrientes y la depredación; lo que podría explicar la contribución prácticamente despreciable de filamentos a la abundancia total de BH observada en Rancho Hambre.

El Análisis de Redundancia (RDA) reveló que las variables físico-químicas que explicaron significativamente la variabilidad de los patrones de composición de los morfotipos bacterianos de Rancho Hambre fueron: la temperatura, el pH, los índices de calidad de la materia orgánica E2:E3 y a_{440} , y el NID. Los estudios previos de la comunidad de BH de turberas alrededor del mundo también sugieren que el pH, la concentración y calidad de la materia orgánica disuelta (EE.UU- Fisher *et al.*, 1998; Letonia- Druvietis *et al.*, 2010; Suecia- Berggren *et al.*, 2010) y la concentración de amonio (Francia- Gilbert *et al.*, 1998) determinan la abundancia y la actividad (producción y respiración) de esta comunidad. Cabe destacar que en la mayoría de las muestras de

las lagunas de Rancho Hambre el NID se halló presente principalmente como amonio, debido al ambiente reductor de la turbera (González Garraza *et al.*, 2012)

Se observó un patrón temporal de la abundancia de los morfotipos bacterianos, con las muestras de primavera asociadas con bajas abundancias de cocos; y las de verano con altas abundancias de todos los morfotipos. Este patrón estacional podría explicarse en función de la temperatura del agua, ya que se ha demostrado que ésta regula el metabolismo bacteriano (del Giorgio & Davis, 2003) relacionándose de manera positiva con la abundancia de BH y su tasa de crecimiento (White *et al.*, 1991; Coveney & Wetzel, 1995; Schiaffino *et al.*, 2013). Además, los resultados del PERMANOVA demostraron que la composición de morfotipos bacterianos de las muestras de primavera fue significativamente diferente respecto de las de verano-otoño, lo que podría relacionarse con el cambio estacional en la abundancia y composición del metazooplancton descrito en el *Capítulo 1*, ya que éstos factores pueden modular las interacciones bióticas a través de un efecto de cascada trófica determinando tanto la estructura de distribución de tallas de la comunidad bacteriana así como su composición taxonómica (Jürgens & Matz, 2002).

Además, tanto en el NMDS como en el RDA las muestras de verano-otoño se ordenaron en relación al estado minero- vs. ombrotrofico de los cuerpos de agua. En RH1 y RH4, las lagunas moderadamente ácidas con MOD de mayor peso molecular promedio, se observó mayor contribución de los filamentos, vibrios y bacilos grandes y pequeños a la composición de morfotipos bacterianos; mientras que en RH2, RH3 y RH5, las lagunas ácidas con MOD más coloreada se registró la mayor contribución de cocos pequeños. Estos resultados sugieren que el estado minero- vs. ombrotrofico de las lagunas sería un factor determinante de la composición de morfotipos bacterianos.

Estudio de las BH utilizando CF

El análisis comparativo de la eficiencia de los distintos fijadores utilizados para CF confirma que el P+G es el más adecuado para el análisis de las BH planctónicas en el sistema de turbera estudiado, ya que con el mismo se obtuvieron los mayores valores de abundancia y fluorescencia verde (FL1) y no se registró un efecto de distorsión sobre el Side Scatter (SSC). Este fijador es el recomendado por Gasol & del Giorgio (2000) para el estudio de los procariotas de ambientes acuáticos en general. Sin embargo, no existían evidencias previas de que el P+G fuera el fijador más eficiente para el estudio de las BH de ambientes de turberas en particular. Es probable que el P+G reúna las propiedades de ambos compuestos químicos: el *Paraformaldehído* penetra las células rápidamente, fijando efectivamente ácidos nucleicos y proteínas (Gasol & del Giorgio, 2000); mientras

que el *Glutaraldehído* protege a los microorganismos de la lisis celular y de la pérdida de autofluorescencia (Vaulot *et al.*, 1989).

Las abundancias de BH totales y de las poblaciones citométricas (LNA, INA, HNA) presentaron un patrón estacional en todas las lagunas de la turbera, con mínimos en primavera. Dichas abundancias se correlacionaron con las concentraciones de nitrógeno total y carbono orgánico disuelto, reflejando una dependencia nutricional de las BH. Estos resultados se condicen con los obtenidos utilizando la técnica de MEF, lo que sugiere fuertemente que las BH de Rancho Hambre están reguladas *bottom-up* tanto por sustratos orgánicos –carbono como por sustratos inorgánicos –nitrógeno. Además, coinciden con los antecedentes del estudio de esta comunidad en otras turberas del mundo (Fisher *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 1998; Druvietis *et al.*, 2010; Berggren *et al.*, 2010).

Las poblaciones citométricas se componen de células que comparten propiedades citométricas similares, como por ejemplo bacterias con alto y bajo contenido de ácidos nucleicos (HNA y LNA, respectivamente), las cuales representan a su vez el patrón citométrico de una muestra de agua. Según estudios recientes, estas poblaciones citométricas poseen composiciones filogenéticas propias (Wang *et al.*, 2009; Vila-Costa *et al.*, 2012), por lo que se podría hipotetizar que patrones citométricos distintos representarían composiciones filogenéticas características. En la turbera de Rancho Hambre se observaron patrones citométricos de BH propios de cada laguna, lo que podría indicar diferencias respecto de la composición de la comunidad bacteriana. Resultados preliminares del estudio de la diversidad de la comunidad de BH de las cinco lagunas de la turbera utilizando herramientas de análisis metagenómico confirman esta hipótesis. Este estudio actualmente en desarrollo en el marco de un Proyecto de Colaboración Bilateral con la República de Sudáfrica revela hasta ahora que las muestras tomadas dentro de cada laguna en octubre de 2012 presentan composiciones de la comunidad bacteriana más similares entre sí que entre muestras de lagunas vecinas (datos no publicados). De esta manera, las huellas genéticas obtenidas con la técnica TRFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*) muestran que la composición de la comunidad bacteriana es característica de cada cuerpo de agua. Estas diferencias parecerían responder a la gran diversidad ambiental relevada dentro de la turbera, corroborando las observaciones de Mataloni & Tell (1996) respecto del fitoplancton. Estos autores postularon que la alta diversidad de hábitats acuáticos es un factor crucial en la determinación de la alta biodiversidad total de las comunidades planctónicas encontrada en los sistemas acuáticos en esta turbera.

La comunidad de BH totales, así como las distintas poblaciones citométricas (LNA, INA, HNA) se caracterizan mediante CF principalmente en base a dos parámetros citométricos: (i) FL1 -asociado al contenido de ácidos nucleicos y (ii) SSC –relacionado con la complejidad interna de las células y/o con su tamaño (Gasol & del Giorgio, 2000). En Rancho Hambre, los resultados revelan que las condiciones ambientales influyen sobre los parámetros citométricos de las BH planctónicas. En efecto, no sólo el parámetro FL1 fue influido tanto por el carácter minero-ombrotrofico de las lagunas (pH y dureza total), como por la cantidad y calidad del COD, sino que además el SSC se relacionó con la concentración del COD. Los parámetros FL1 y SSC son propios de cada patrón citométrico, y de acuerdo con lo que se discutió previamente, patrones citométricos distintos representarían composiciones filogenéticas características (Vila-Costa *et al.*, 2012). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el pH, la dureza total y la concentración y calidad del COD determinan la composición taxonómica de la comunidad de BH de las lagunas de Rancho Hambre.

Comparación entre métodos de estudio de las BH

En general, las técnicas de MEF y CF estiman valores similares de abundancia de BH tanto en cultivos de bacterias patógenas así como en muestras ambientales de diversos sistemas acuáticos (Monfort & Baleux, 1992; Li *et al.*, 1995; Troussellier *et al.*, 1999; Salcher *et al.*, 2007; Schiaffino *et al.*, 2013). Sin embargo, en las lagunas de Rancho Hambre se observó una diferencia de aproximadamente un orden de magnitud entre dichas estimaciones de abundancia, con los mayores valores para la técnica de MEF. Esta diferencia estuvo determinada por la abundancia de los cocos pequeños, el morfotipo bacteriano que presentó el menor volumen celular promedio ($0,023 \mu\text{m}^3$, diámetro esférico equivalente = $0,35 \mu\text{m}$), pero a su vez el más abundante de todos los morfotipos identificados (>60% de la abundancia total de BH).

Esta dominancia de cocos pequeños también fue observada por Gilbert y colaboradores (1998) en una turbera minerotrófica de Francia, donde llegaron a representar el 89% de la abundancia de BH totales del agua intersticial del *Sphagnum*. Aun existen controversias respecto de si estas bacterias pequeñas están muertas, si se encuentran en un estado de inactivación celular provocado por déficit de sustratos orgánicos (*starvation*, en inglés), si están en estado de latencia como respuesta a condiciones ambientales desfavorables (*dormancy*, en inglés) o simplemente si son fisiológicamente menos activas (del Giorgio & Gasol, 2008). Aunque tradicionalmente estos minúsculos puntos que se observan mediante la tinción del ADN en MEF se

consideraron en los recuentos de procariotas heterótrofos (arqueas + eubacterias), todavía se discute cuál es su origen o afiliación taxonómica. Está comprobado que la tinción del ADN con DAPI que se utiliza para identificar bacterias mediante MEF puede también teñir virus (Bettarel *et al.*, 2000) o incluso detrito y partículas submicrométricas, lo que conduce potencialmente a una sobreestimación de la abundancia total de BH utilizando dicha técnica (Posch *et al.*, 2009). El estudio morfológico de Posch y colaboradores (2009) demostró que más del 80% de los cocos pequeños no pueden ser identificados como eubacterias utilizando sondas fluorescentes específicas con la técnica de deposición catalizada e hibridación *in situ* (CARD-FISH), por lo que estos autores postulan que los cocos pequeños podrían ser partículas virales. La técnica de CARD-FISH permite afiliar las células teñidas con DAPI a los dominios *Bacteria* y *Archaea*, y a distintos subgrupos taxonómicos dentro de esos dominios dependiendo de la especificidad de la sonda (Pernthaler *et al.*, 2002; Pernthaler *et al.*, 2004). En turberas en particular se observó que el 80% de los objetos teñidos con DAPI en muestras del agua intersticial del *Sphagnum* son células de tamaño pequeño con longitudes $\leq 0,5\mu\text{m}$ que no se detectan con sondas para *Bacteria* ni *Archaea* (Siberia- Dedysch *et al.*, 2006). Esto condice con los resultados de Kulichevskaya y colaboradores (2011), quienes encontraron que en promedio sólo un 38% del total de células teñidas con DAPI se identificaron como *Bacteria* y un 4% como *Archaea* tanto en lagos húmicos como en el agua intersticial del *Sphagnum* de turberas elevadas pertenecientes a las cuencas hidrográficas de dichos lagos en Rusia.

Los virus constituyen el grupo más abundante de partículas que contienen ácidos nucleicos en el océano (Cottrell & Suttle, 1991; Marie *et al.*, 1999a). En lagunas y estuarios la abundancia de virus supera cinco veces la de bacterias (Paul *et al.*, 1991; Noble & Fuhrman, 1998); mientras que tanto en los fiordos de Noruega (Børsheim *et al.*, 1990) así como en las aguas oceánicas del Pacífico Ecuatorial, el Mediterráneo y en el canal de la Mancha (Marie *et al.*, 1999a) se han observado valores del cociente virus:bacterias cercanos a 10. Li & Dickie (2001) estudiaron el patrón estacional de dicho cociente durante casi una década en un estuario de Canadá, observando valores de 4 en invierno y 17 en verano, con una media anual de 7. En Rancho Hambre, los cocos pequeños representaron el 90% de la abundancia total de las BH en determinadas ocasiones. Dicha relación sugiere que esta morfología probablemente esté representada por partículas virales y no por procariotas heterótrofos. Incluso, los cocos pequeños no se detectaron en los citogramas utilizando el protocolo estándar para el estudio de procariotas mediante CF (Gasol & del Giorgio, 2000), sin importar el tamaño de las

microesferas de látex que se utilizan como patrón ni la configuración del equipo. Cabe destacar que el protocolo para el estudio del bacterioplancton mediante CF difiere del utilizado para virus (Marie et al., 1999a, b). En base a estas diferencias metodológicas, el hecho de que los cocos pequeños no hayan sido detectados con el protocolo estándar de CF para procariontes sustenta la hipótesis de que sean partículas virales.

En función de estos resultados, resulta de gran interés cuantificar la comunidad viral de las lagunas de la turbera de Rancho Hambre utilizando CF. De manera complementaria, sería interesante realizar el estudio de los procariontes heterótrofos de estos sistemas utilizando CARD-FISH con el objeto de determinar qué porcentaje de los objetos teñidos con DAPI se identifican como *Bacteria* o *Archaea*.

CAPÍTULO III

ESTRUCTURA Y VARIACIÓN ESPACIAL DE LA COMUNIDAD DE BACTERIAS HETERÓTROFAS QUE HABITA EL AMBIENTE ACUÁTICO DE LA TURBERA

INTRODUCCIÓN

Las turberas elevadas presentan una microtopografía particular, con sectores de turba permanentemente elevados sobre el nivel de la napa freática que soportan vegetación arbustiva, sectores en los cuales el nivel del agua fluctúa y depresiones permanentemente saturadas de agua (Rydin & Jeglum, 2006). Estas últimas comprenden lagunas de diferentes tamaños y profundidades, las que pueden presentar conexiones hidrológicas superficiales a través de canales naturales, o permanecer aisladas hidrológicamente (González Garraza, 2012). Además, las áreas adyacentes a los márgenes del domo generalmente se encuentran saturadas de agua, debido a la escorrentía superficial en la pendiente (Iturraspe & Roig, 2000; Iturraspe, 2010). De esta manera, la superficie de la turbera elevada comprende diversos microhábitats acuáticos con propiedades físico-químicas características. El agua intersticial del *Sphagnum* en los sectores elevados de turba es más ácida y presenta valores mayores de conductividad y concentración de COD que los cuerpos de agua dentro de la turbera (Fisher *et al.*, 1998; Mataloni, 1999; Mieczan & Siczek, 2010; Kulichevskaya *et al.*, 2011).

Mataloni (1999) estudió las comunidades microalgales en relación con factores ambientales en distintos puntos a lo largo de transectas dispuestas según un gradiente de sequedad: zona limnética, zona de transición y el agua intersticial del musgo alejada 80, 160 y 320 cm perpendicularmente del borde del cuerpo de agua en seis turberas pertenecientes a distintos valles glaciarios localizados en el extremo sudoeste de Tierra del Fuego incluyendo a la turbera de Rancho Hambre. Esta autora observó que el pH disminuía y la conductividad aumentaba a medida que se alejaba del cuerpo de agua. A lo largo de este gradiente se observó además una disminución de la riqueza específica, revelando una fuerte presión ambiental sobre la biota. En este estudio las sucesiones de la comunidad microalgal en el gradiente de sequedad en distintas turberas fueron convergentes, y además las comunidades microalgales de las respectivas lagunas estuvieron más influenciadas por el carácter minero- u ombrotrofico del cuerpo de agua que por su cercanía geográfica o pertenencia a una misma cuenca.

Respecto de la comunidad de BH, Fisher y colaboradores (1998) observaron mayores valores de abundancia y producción bacteriana en el agua intersticial del *Sphagnum* de la zona del domo respecto de los cuerpos de agua en turberas elevadas de EE.UU. Estos microambientes presentaron valores de pH y concentración de COD contrastantes. Un estudio reciente de la composición filogenética de la comunidad bacteriana que habita el agua intersticial del *Sphagnum* en turberas minero- y ombrotroficas de EE.UU. sugiere que el pH es un importante factor estructurador de la composición de dicha comunidad, la

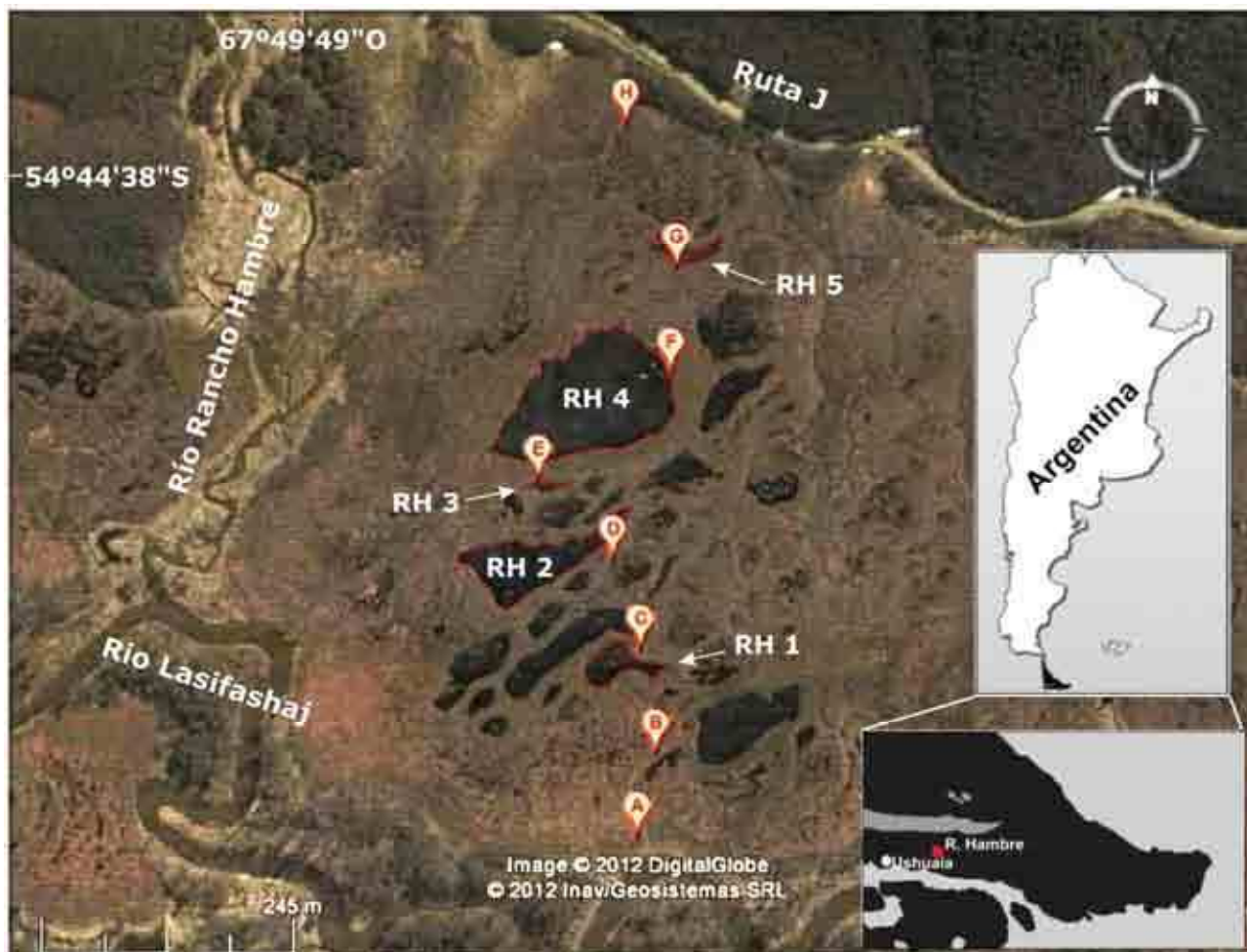
cual también se relacionó con el tamaño y la aromaticidad de la materia orgánica disuelta, es decir con los índices de calidad de la materia orgánica disuelta E2:E3 y SUVA₂₅₄, respectivamente (Lin *et al.*, 2012). Por otro lado, varios autores han encontrado diferencias en la composición filogenética de la comunidad de BH en lagos húmicos respecto del agua intersticial del *Sphagnum* de turberas elevadas pertenecientes a las cuencas hidrográficas de dichos lagos en Rusia (Kulichevskaya *et al.*, 2011; Belova *et al.*, 2012; Fetodova *et al.*, 2012), las que eran más ácidas que los lagos. Estos resultados revelan por un lado la existencia de una elevada diversidad bacteriana en los distintos hábitats acuáticos de la turbera, y por otro lado sugieren que el pH y la concentración y calidad del COD serían los principales factores determinantes de la composición de dicha comunidad.

La técnica de citometría de flujo (CF) provee información adicional a la estimación de la abundancia, ya que los parámetros citométricos de una determinada comunidad reflejan además su estructura interna. Dichos parámetros definen el patrón citométrico de una muestra de agua, el que puede indicar diversidad de estados fisiológicos (Li, 1997) y/o relacionarse con afiliaciones taxonómicas (Vila-Costa *et al.*, 2012). Sin embargo, existen pocos estudios en los que se estudie la estructura o diversidad de las comunidades planctónicas utilizando CF (fitoplancton- Li, 1997; bacterioplancton- Andreatta *et al.*, 2004; picoplancton- Schiaffino *et al.*, 2013). En este Capítulo se propone utilizar la técnica de CF para comparar la comunidad de BH que habita el agua intersticial del *Sphagnum* con la de las lagunas dentro de la turbera de Rancho Hambre, y se hipotetiza que las condiciones físico-químicas de las aguas influyen sobre la diversidad bacteriana, determinando en consecuencia el patrón citométrico de las BH en esta turbera.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se estudiaron particularmente las muestras de febrero de 2010. En esta ocasión se estableció una transecta, a lo largo de la cual se seleccionaron doce puntos correspondientes a las cinco lagunas (RH1 a RH5) y ocho puntos donde se tomó muestra del agua intersticial del *Sphagnum* (A a H) (Figura 3.1). Se analizó mediante la técnica de CF a la comunidad de BH del ambiente acuático de la turbera, comparando los distintos puntos de la transecta entre sí. Las técnicas utilizadas para estudiar tanto las BH como las variables ambientales se detallaron previamente en la sección de *Materiales y Métodos Generales*. En este capítulo se analizaron sólo las muestras de CF fijadas con Paraformaldehído+Glutaraldehído (P+G), en base a los resultados del *Capítulo II*.

Figura 3.1: Mapa de la turbera de Rancho Hambre. Se indican los cuerpos de agua (RH1 a RH5) y los puntos donde se estudió el agua intersticial del *Sphagnum* (A a H).



Análisis estadístico

La existencia de diferencias significativas entre los valores de los parámetros abióticos registrados en los distintos puntos de la transecta se evaluó utilizando un análisis de varianza de un factor ANOVA (Zar, 2010). En el caso particular del pH, las diferencias significativas entre los grupos se determinaron utilizando la prueba *post hoc* de Tukey. Por otro lado, se utilizó la prueba no paramétrica Rho de Spearman para estudiar las correlaciones entre las distintas variables. Ambos análisis se realizaron mediante el programa SPSS 15.0.1 (Statsoft, U.S.A.).

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en la matriz de correlación de las variables ambientales con el objetivo de caracterizar el ambiente acuático a lo largo de la transecta, utilizando el programa NTSYSpc 2.2 (Exeter Software,

U.S.A.). La matriz de datos fue transformada ($\text{Log}_{10} + 1$) previamente a realizar el PCA (ter Braak & Smilauer, 2002).

Con el fin de estudiar los patrones obtenidos mediante CF se realizó un análisis de agrupamiento (Análisis de *Cluster*) basado en la matriz de parámetros citométricos (FL1, FL3 y SSC) utilizando el método de Ward como algoritmo de enlace, mediante el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001).

Para determinar cuáles parámetros ambientales influyeron sobre los patrones citométricos se realizó un Análisis de Redundancia (RDA) (Legendre & Legendre, 1998) utilizando el programa R. Este método de ordenación se seleccionó dado que el análisis DCA (*Detrended Canonical Analysis*) reveló una respuesta lineal de los parámetros citométricos (FL1, FL3 y SSC) (ter Braak & Smilauer, 2002). Se utilizó la selección forward para agregar variables ambientales al modelo (función “ordistep – selección forward” del paquete Vegan – programa R). La significación del modelo global y de los ejes canónicos fue determinada mediante la función “anova.cca” del paquete Vegan del programa R.

RESULTADOS

Parámetros ambientales

La Tabla 3.1 resume los parámetros ambientales registrados en los sitios terrestres y en las orillas de los cuerpos de agua en el verano tardío de 2010.

Los sitios estudiados pueden agruparse en función de sus valores medios de pH: agua intersticial del *Sphagnum* (pH = 4,4), cuerpos de agua ombrotroficados (RH2, RH3 y RH5; pH = 4,9) y cuerpos de agua minerotroficados (RH1 y RH4; pH = 6,6) (ANOVA $p < 0,001$; prueba post hoc de Tukey $p < 0,004$ en todos los casos).

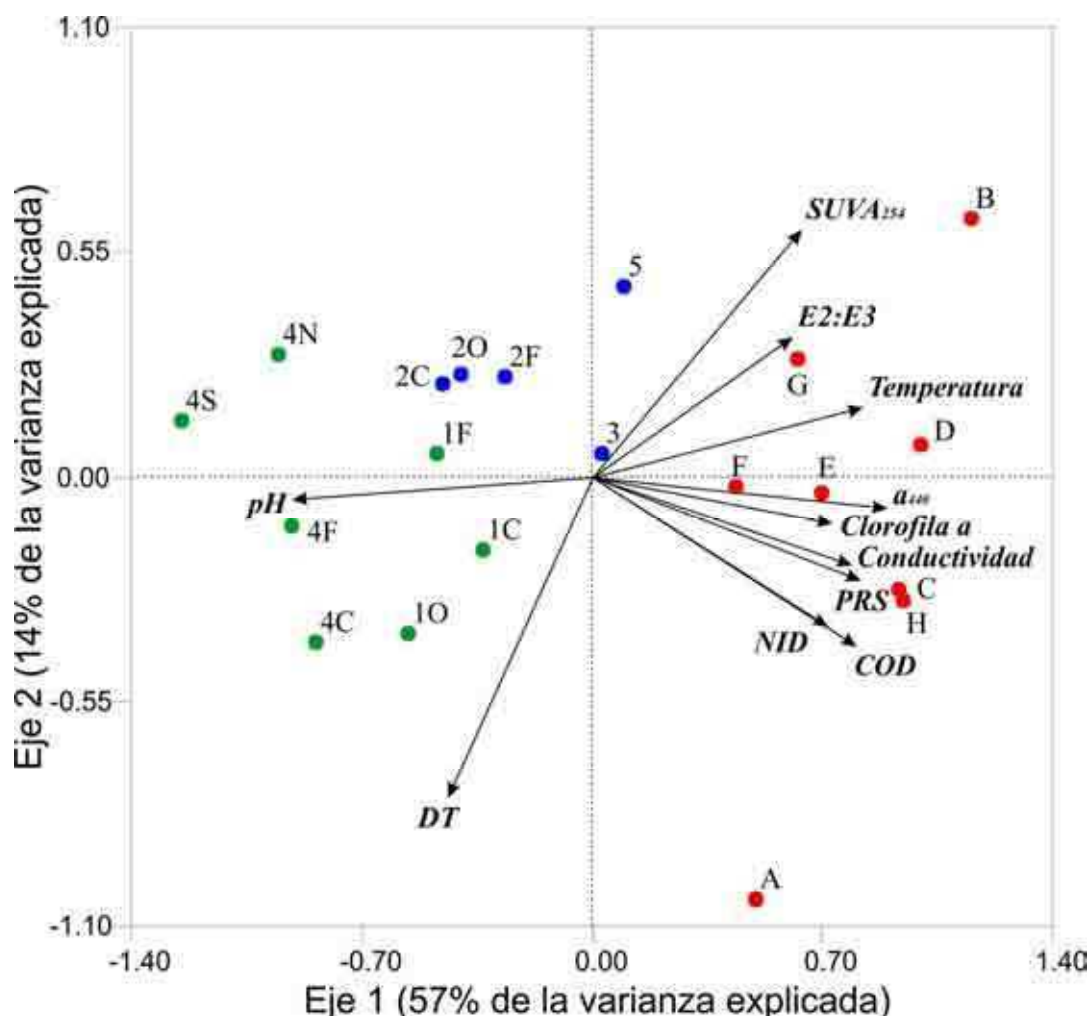
La conductividad y concentración de COD observadas en el agua intersticial del *Sphagnum* (valores medios: $57,7 \mu\text{S cm}^{-1}$ y $15,0 \text{ mg L}^{-1}$; respectivamente) fueron significativamente mayores a las registradas en las lagunas ($25,9 \mu\text{S cm}^{-1}$ y $7,4 \text{ mg L}^{-1}$; respectivamente) (ANOVA $p < 0,001$ en ambos casos). En concordancia con este patrón, las concentraciones de nutrientes en el agua intersticial del *Sphagnum* fueron significativamente mayores que en las lagunas: NID (187 vs. $33 \mu\text{g L}^{-1}$), NT (51731 vs. $8624 \mu\text{g L}^{-1}$), PRS (123 vs. $28 \mu\text{g L}^{-1}$) y PT (720 vs. $202 \mu\text{g L}^{-1}$) (ANOVA $p < 0,002$ en todos los casos).

Tabla 3.1: Parámetros ambientales de los puntos de muestreo de la transecta de febrero de 2010: agua intersticial del *Sphagnum* (A – H) y orillas de los cuerpos de agua (1–5 indica RH1-RH5). DT: dureza total, NID: nitrógeno inorgánico disponible, NT: nitrógeno total, PRS: fósforo reactivo soluble, PT: fósforo total, COD: carbono orgánico disuelto. Índices de calidad de la materia orgánica disuelta = a_{440} : estimador de la cantidad de C coloreado de origen terrestre potencialmente disponible para los consumidores del lago, SUVA₂₅₄: estimador de la aromaticidad del COD, y E2:E3: el índice se correlaciona negativamente con el tamaño molecular promedio de la materia orgánica disuelta. S/D: sin dato.

Sitio	A	B	1	C	D	2	E	3	F	4	G	5	H
Temperatura (°C)	11,3	14,2	10,1	14,8	14,7	10,1	20,1	11,6	11,3	9,3	16,1	14,3	14,6
pH	4,45	4,28	5,94	4,50	4,30	5,19	4,42	4,66	4,29	6,65	4,53	4,82	4,34
Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	58	71	21	78	58	23	37	26	47	27	35	27	78
DT (mg equiv. $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)	71	21	39	37	17	34	S/D	32	25	37	20	25	34
NID ($\mu\text{g L}^{-1}$)	359	53	53	76	177	30	52	45	371	0	87	22	321
NT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	29480	79200	8030	62700	30800	10010	S/D	11330	62260	5610	46640	8250	51040
PRS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	160	140	30	160	160	40	80	40	30	10	90	40	160
PT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1023	451	121	605	671	143	S/D	154	913	176	759	341	616
COD (mg L^{-1})	18,1	10,6	12,7	21,5	16,3	5,9	13,0	12,5	12,4	4,0	8,9	7,1	19,1
a_{440} (m^{-1})	10,1	7,8	3,9	20,0	13,6	4,1	10,6	7,6	9,2	4,4	11,3	9,4	10,4
SUVA ₂₅₄ ($\text{L mg}^{-1} \text{ m}^{-1}$)	6,6	18,8	4,7	11,9	10,6	11,2	9,5	9,1	9,2	10,4	12,0	12,6	8,1
E2:E3	3,3	8,1	3,8	4,2	4,0	4,0	4,0	4,5	4,1	3,0	3,6	S/D	5,9
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4,54	5,44	0,67	1,36	4,12	0,44	3,89	0,54	1,94	1,09	3,89	0,60	2,11

Figura 3.2: Ordenamiento de las muestras obtenido mediante un PCA, basado en la matriz de correlación de las variables ambientales. Abreviaciones de los parámetros ambientales de acuerdo con la Tabla 3.1.

El color de los puntos: verde, azul y rojo indica el pH medio del grupo de muestras: 6,6; 4,9 y 4,4; respectivamente. Las muestras de las lagunas se identifican con números (1-5 = RH1-RH5) y letras (punto dentro de la misma= O: orilla, C: centro superficie, F: centro fondo, N: orilla norte, S: orilla sur). El agua intersticial del *Sphagnum* se identifica con letras (A – H).



Los resultados del Análisis de Componentes Principales (PCA) basado en la matriz de correlación de las variables ambientales registradas en los puntos de la transecta se muestran en la Figura 3.2. Los primeros dos ejes explicaron el 71,6% de la varianza. El primer eje explicó el 57,3% de la varianza y se asoció principalmente con el pH, el índice a_{440} , la temperatura y la concentración de PRS (autovectores = -0,92; 0,90; 0,83 y 0,82 respectivamente). Las muestras de la laguna minerotrófica RH4 se localizaron en el extremo izquierdo del diagrama caracterizadas por pH más neutrales y menor conductividad, las muestras de las lagunas someras ombrotróficas RH3 y RH5 se localizaron en el centro del diagrama representando condiciones intermedias, y los puntos

del agua intersticial del *Sphagnum* se localizaron en el extremo derecho reflejando un ambiente acuático más ácido y con mayor conductividad.

El segundo eje explicó el 14,3% de la varianza y se relacionó con la dureza total y el índice SUVA₂₅₄ (autovectores = -0,79 y 0,60 respectivamente). Los tres grupos definidos por su valor de pH medio se dispersaron a lo largo de este eje.

Estudio de las bacterias heterótrofas utilizando CF

Las abundancias de BH calculadas a través de CF para todos los puntos de la transecta de febrero de 2010 se observan en las Figuras 3.3 y 3.4. Los valores de las lagunas y del agua intersticial del *Sphagnum* no son comparables debido a la diferencia en unidades (células mL⁻¹ vs células mg⁻¹ peso seco de *Sphagnum*, respectivamente). Dentro de los cuerpos de agua, RH4 presentó los menores valores de abundancia; mientras que en los puntos extremos de la transecta (A y H) se observaron los valores máximos para el agua intersticial del *Sphagnum*.

Las correlaciones significativas entre la abundancia de BH de los cuerpos de agua y las variables ambientales se muestran en la Tabla 3.2. En el agua intersticial del *Sphagnum* ésta se correlacionó sólo con el índice SUVA₂₅₄ ($r = -0,881$; $p = 0,004$; $n=8$).

Figura 3.3: Abundancia de las bacterias heterótrofas (BH) en los cuerpo de agua.

Verde: lagunas con pH más neutral; Azul: lagunas con pH ácido. Puntos de muestreo dentro de las mismas: O: orilla, C: centro superficie, F: centro fondo, N: orilla norte, S: orilla sur.

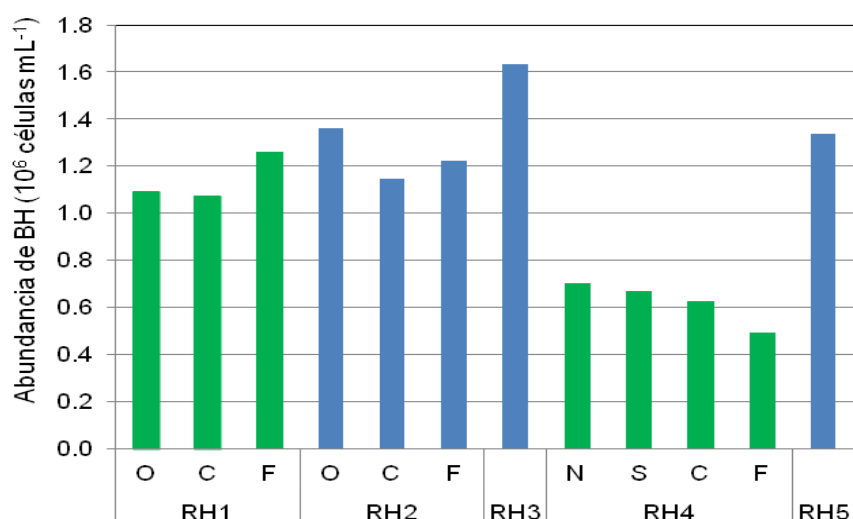
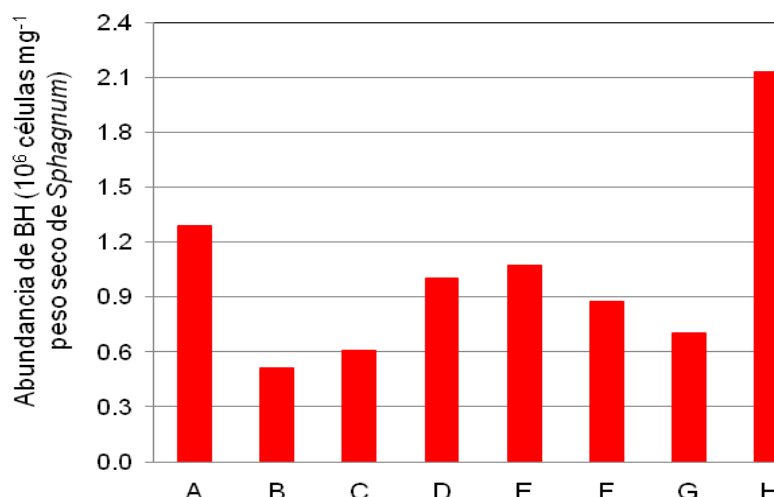


Figura 3.4: Abundancia de las bacterias heterótrofas (BH) en el agua intersticial del *Sphagnum*.**Tabla 3.2:** Correlaciones significativas entre la abundancia de las BH de las lagunas y los parámetros ambientales. Se indica el valor de r y la significancia de la prueba entre paréntesis, $n = 12$.

	Abundancia de BH
pH	-0,93 (0,001)
Dureza Total	-0,75 (0,005)
Nitrógeno Total	0,72 (0,009)
Carbono orgánico disuelto	0,60 (0,038)
E2:E3	0,81 (0,003)
a_{440}	0,74 (0,007)
SUVA₂₅₄	0,62 (0,030)
Clorofila α	-0,58 (0,049)

Los citogramas obtenidos para las distintas muestras se observan en la Figura 3.5.

En base a la matriz de parámetros citométricos (FL1, FL3 y SSC) de las BH de los puntos de la transecta se realizó un análisis de agrupamiento (Análisis de *Cluster*) utilizando el método de Ward como algoritmo de enlace (Figura 3.6). Tanto las lagunas minerotróficas (RH1 y RH4), como el agua intersticial del *Sphagnum* (A - H) mostraron patrones citométricos característicos, mientras que las lagunas ombrotroáficas (RH2, RH3 y RH5) fueron similares entre sí.

Figura 3.5: Fotos y citogramas correspondientes a las orillas de las lagunas (1-5 indica RH1-RH5) y el agua intersticial del *Sphagnum* (A-H) en verano tardío. BH: bacterias heterótrofas, ML: microesferas de latex.

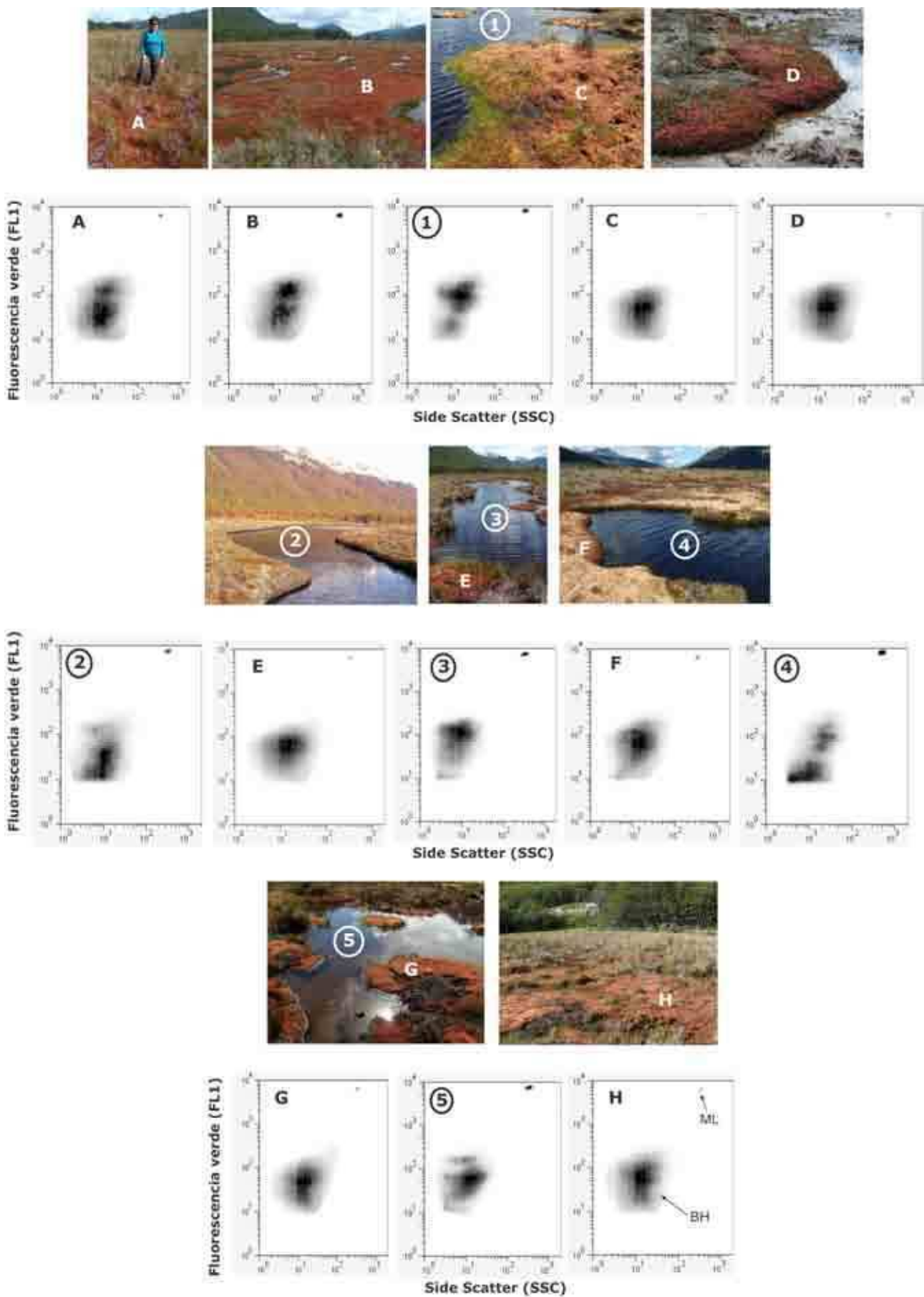
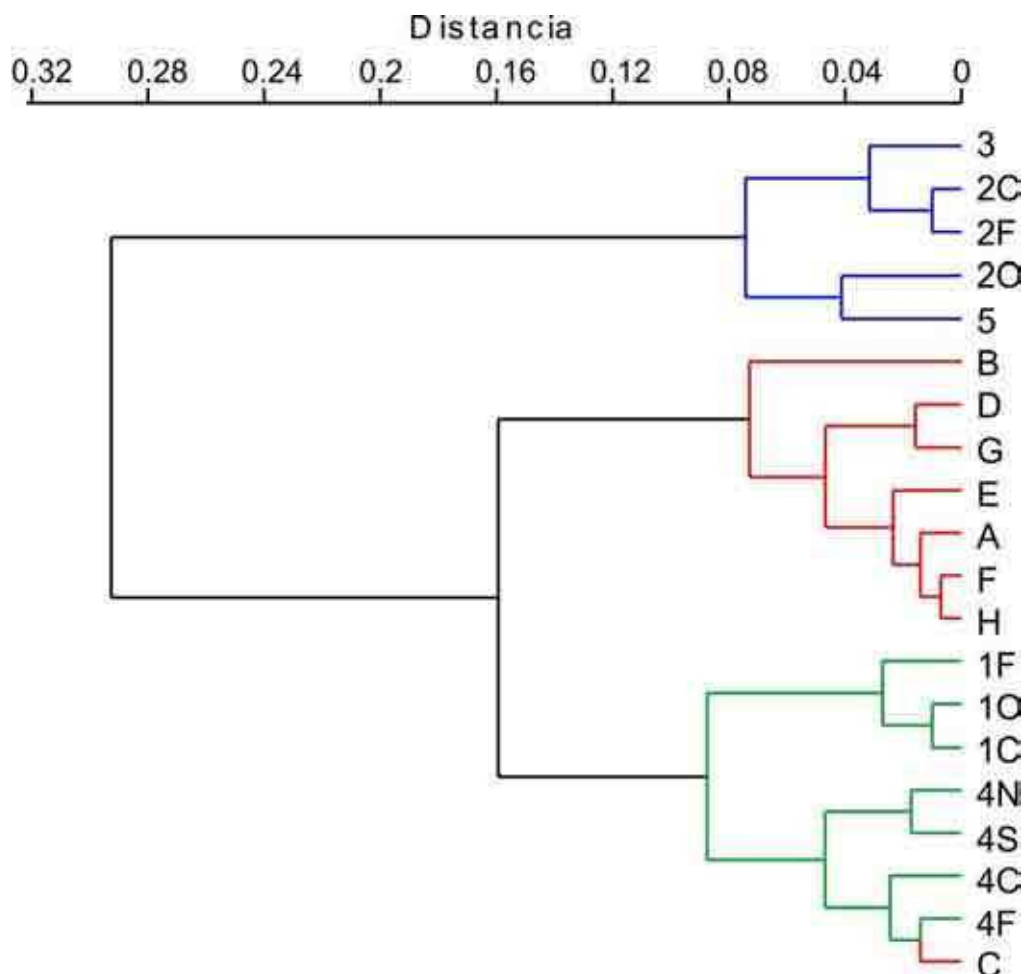


Figura 3.6: Análisis de agrupamiento basado en los parámetros citométricos de las BH de los puntos de la transecta: lagunas (1-5 indica RH1-RH5) y agua intersticial del *Sphagnum* (A-B). Color e identificación de los puntos de acuerdo a la Figura 3.2.



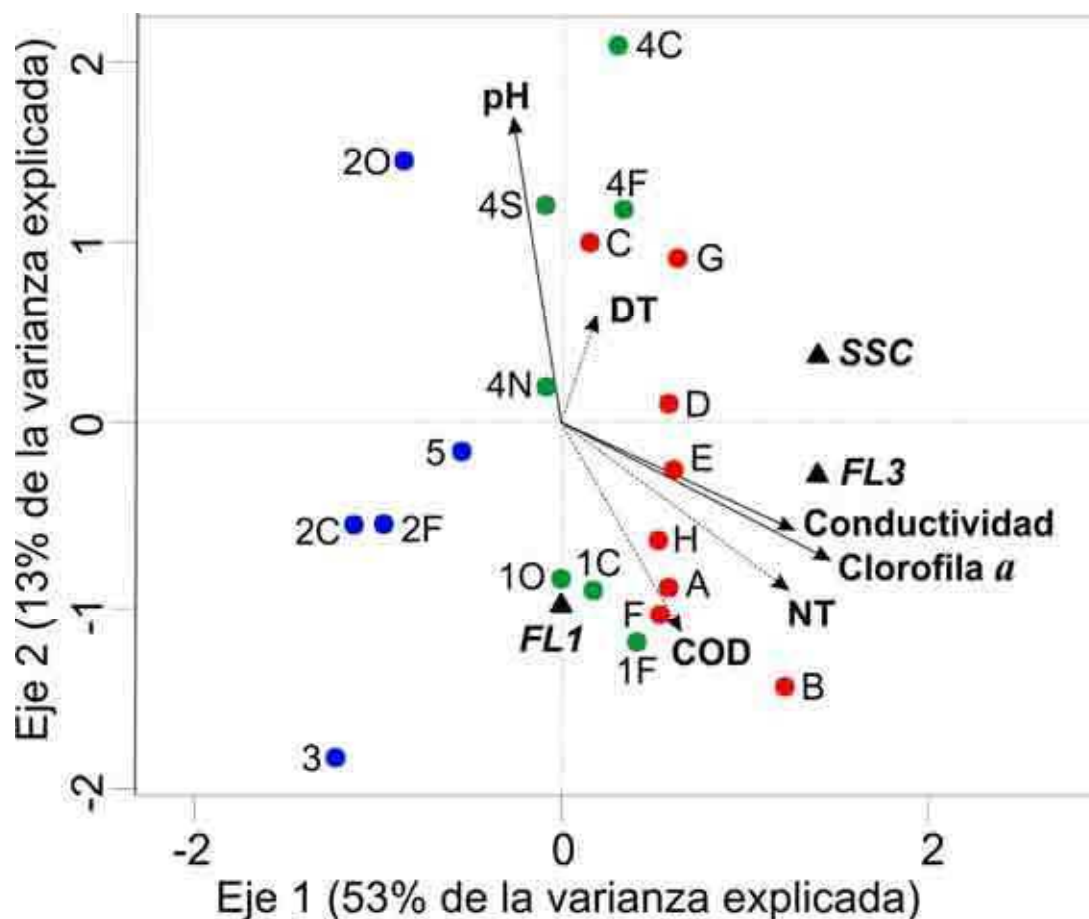
Para estudiar cómo los parámetros ambientales influyeron sobre los patrones citométricos se realizó un Análisis de Redundancia (RDA) (Figura 3.7). Los factores ambientales que explicaron significativamente la variabilidad de dichos patrones fueron: el pH, la conductividad y la clorofila *a* ($p < 0,05$; función “ordistep – selección forward” del paquete Vegan – programa R). En función de las correlaciones observadas entre los datos de citometría y las variables ambientales para las muestras de las lagunas durante el ciclo estacional octubre de 2009 - abril de 2010 (Capítulo II, Tabla 2.5), se incluyeron en el modelo las variables DT, NT y COD. El porcentaje de varianza de la relación parámetros citométricos -ambiente explicada por los dos primeros ejes fue del 66%. Tanto el modelo global como los dos primeros ejes canónicos resultaron significativos ($p \leq 0,018$; función “anova.cca” del paquete Vegan - programa R).

Las variables con mayor influencia sobre el eje 1 fueron la clorofila *a*, la conductividad y el NT (coeficientes de correlación: 0,81; 0,71 y 0,69; respectivamente); mientras que las

variables asociadas en mayor medida al eje 2 fueron el pH y la concentración del COD (coeficientes de correlación: 0,92 y -0,63; respectivamente). Las muestras del agua intersticial del *Sphagnum* (A - H) se localizaron en la mitad derecha del diagrama, caracterizadas por valores altos de conductividad, clorofila *a* y NT, donde se observaron los mayores valores de SSC. Las muestras de las lagunas minerotróficas (RH1 y RH4) se situaron en el centro del diagrama, y a su vez se dispersaron a lo largo del eje 2: las muestras de RH4 se asociaron con pH más ácidos y bajos valores de FL1. Por otro lado, los puntos de muestreo de las lagunas ombrotólicas (RH2, RH3 y RH5) se ubicaron en la mitad izquierda del diagrama, con aguas de menor conductividad y bajas concentraciones de clorofila *a* y NT, y con los menores valores de SSC.

La dispersión de los tres grupos (lagunas minerotróficas, lagunas ombrotólicas y agua intersticial del *Sphagnum*) en el eje 2 se relacionó con la variabilidad del parámetro FL1 dentro de cada grupo.

Figura 3.7: Resultado del Análisis de Redundancia (RDA), basado en la matriz de parámetros citométricos (FL1, FL3 y SSC) de las BH de los puntos de la transecta y los parámetros ambientales. Color e identificación de los puntos de acuerdo a la Figura 3.2. Las variables ambientales significativas se indican con línea continua, mientras que las no significativas con línea punteada. DT: dureza total, NT: nitrógeno total, COD: concentración del carbono orgánico disuelto.



DISCUSIÓN

La naturaleza de los ambientes acuáticos dentro de las turberas elevadas depende de la procedencia del agua que los recarga, la que determina sus características químicas (Holden, 2006; Rydin & Jeglum, 2006; Iturraspe, 2010). En Rancho Hambre existe un gradiente del estado de los cuerpos de agua desde minero- a ombrotrofico, donde las lagunas grandes y conectadas hidrológicamente, es decir con aportes de agua adicionales a las precipitaciones, presentan valores de pH y dureza total relativamente elevados –estado minerotrofico; mientras que las lagunas someras aisladas hidrológicamente, alimentadas únicamente por precipitaciones, muestran un tipo de agua relativamente menos dura y más ácida -estado ombrotrofico (Mataloni & Tell, 1996; Mataloni, 1999, González Garraza *et al.*, 2012). Las condiciones ambientales se tornan extremas en el agua intersticial del *Sphagnum*, constituyendo el microhábitat con los valores mínimos de pH dentro de la turbera (Fisher *et al.*, 1998; Mataloni, 1999; Mieczan & Siczek, 2010; Kulichevskaya *et al.*, 2011). De esta manera, sitios separados entre sí por unos pocos metros de distancia pueden diferir respecto de sus parámetros físico-químicos. En concordancia, los resultados del PCA revelan un gradiente ambiental respecto de valores de pH, conductividad y concentración de nutrientes disueltos dentro de Rancho Hambre en el verano tardío, a lo largo del cual se diferencian las lagunas minerotroficas y ombrotroficas entre sí y respecto del agua intersticial del *Sphagnum*. Estos grupos a su vez presentan una gran variabilidad interna respecto de valores de dureza total y del índice SUVA₂₅₄, lo que refleja que además existen diferencias ambientales dentro de cada tipo de microhábitat.

Los valores de pH, conductividad y concentración de COD en los distintos microambientes en general coinciden con los reportados por Mataloni (1999) para esta misma turbera, y por Robson y colaboradores (2005) para turberas de *Sphagnum* de Tierra del Fuego, así como con los de otras turberas elevadas del mundo: EE.UU. (Fisher *et al.*, 1998), Polonia (Mieczan, 2007a; Mieczan & Siczek, 2010; Mieczan & Tarkowska-Kukuryk, 2013) y Rusia (Kulichevskaya *et al.*, 2011). Lin y colaboradores (2012) estudiaron la materia orgánica disuelta del agua intersticial de *Sphagnum* en una turbera ombrotrofica de EE.UU., observando el doble de la concentración de COD respecto de Rancho Hambre pero con una menor contribución de compuestos aromáticos a la misma (SUVA₂₅₄ = 4,6). Estos resultados reflejan que el COD en Rancho Hambre es más recalcitrante, y estaría consecuentemente menos biodisponible para ser utilizado por los microorganismos que el COD en la turbera de EE.UU. Por otra parte, la gran mayoría de las caracterizaciones de la calidad del COD en sistemas acuáticos pertenecientes a

cuencas dominadas por turberas de *Sphagnum* spp. muestran valores del índice E2:E3 cercanos a 4 (Berggren *et al.* 2007, 2009a, 2010; Lin *et al.*, 2012), incluso en la turbera de Rancho Hambre, por lo que el tamaño molecular promedio parecería ser constante en estos sistemas.

Diferentes autores han observado que las condiciones ambientales influyen sobre la diversidad de los microorganismos de turberas. Mieczan (2007b) observó una disminución de la riqueza específica de ciliados a lo largo de un gradiente de pH decreciente en turberas de Polonia, mientras que Mataloni (1999) encontró una menor riqueza específica de microalgas en el agua intersticial del *Sphagnum* en relación con los cuerpos de agua en turberas de Tierra del Fuego. Respecto de las BH de Rancho Hambre, los resultados del Análisis de *Cluster* y del RDA fueron consistentes, y se condicen con los estudios previos de microorganismos de turberas: los puntos de la transecta se agruparon en función del patrón citométrico de las BH en tres grupos: lagunas minerotróficas (RH1 y RH4), ombrotólicas (RH2, RH3 y RH5) y agua intersticial del *Sphagnum* (A - H). Las variables ambientales que explicaron significativamente la variabilidad espacial de los patrones citométricos de las BH fueron el pH, la conductividad y la clorofila *a*. Estudios previos de la comunidad de BH en turberas de EE.UU. y Rusia también sugieren que el pH, la concentración y calidad de la materia orgánica disuelta influyen sobre la abundancia, producción y composición filogenética de esta comunidad (Fisher *et al.*, 1998; Kulichevskaya *et al.*, 2011; Belova *et al.*, 2012; Fetodova *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012).

Como se discutió previamente en el *Capítulo II*, Vila-Costa y colaboradores (2012) demostraron que el patrón citométrico de la comunidad de BH está relacionado con su composición filogenética. En la turbera de Rancho Hambre, los patrones citométricos de la comunidad de BH sugieren que su composición filogenética es característica de cada microambiente (lagunas vs. agua intersticial de *Sphagnum*). Además, los resultados de este Capítulo así como los del *Capítulo II* demuestran que el estado minero- vs. ombrotófico de los cuerpos de agua determina la estructura de la comunidad de BH de Rancho Hambre, ya que estos dos grupos de lagunas presentaron patrones citométricos y composición de morfotipos bacterianos característicos. Estos resultados son coherentes con las observaciones de Mataloni & Tell (1996), Mataloni (1999) y González Garraza (2012) para el fitoplancton.

La técnica de CF demostró su gran utilidad a la hora de comparar las comunidades de BH en los distintos microhábitats dentro de la turbera de Rancho Hambre (agua intersticial de *Sphagnum* y lagunas), lo que no se podría haber logrado utilizando sólo sus

abundancias, ya que se expresan en unidades diferentes. Además, con la información adicional a la estimación de la abundancia de las BH que se obtuvo con esta técnica - parámetros FL1, FL3, SSC- se logró detectar cambios en la estructura interna de la comunidad. Cabe destacar que hasta la fecha la estructura de la comunidad bacteriana se ha estudiado principalmente utilizando técnicas moleculares (CARD-FISH o técnicas de huellas genéticas como DGGE y TRFLP). Sin embargo, los resultados de esta Tesis demuestran que la CF podría utilizarse como técnica de *fingerprinting* o “huella citométrica”. La ventaja de la CF respecto de las técnicas moleculares radica en la rapidez con la que se pueden analizar una gran cantidad de muestras. Por lo que resulta de gran interés desarrollar métodos estadísticos para comparar por ejemplo la similitud entre patrones citométricos, con el fin de utilizar toda la información contenida en los citogramas y no sólo los parámetros citométricos de la comunidad.

CONCLUSIONES GENERALES

Esta Tesis Doctoral constituye la primera caracterización de la variación espacial y temporal de la estructura de la trama trófica planctónica completa, con énfasis en las bacterias heterótrofas (BH) y los flagelados heterótrofos (FH), de lagunas de turberas. Estos resultados permitieron proponer un modelo interpretativo respecto de cómo los factores abióticos y bióticos definen la estructura de las comunidades microbianas en estos ambientes en general, y constituyen una importante base de datos para las turberas de Tierra del Fuego en particular. Además, la comunidad de BH se describe mediante un enfoque polifásico, utilizando información complementaria de las técnicas de microscopía de epifluorescencia, análisis de imágenes y citometría de flujo, dando como resultado la primera base de datos integrados de este tipo sobre las BH de turberas.

Las hipótesis planteadas al comienzo de esta Tesis fueron:

1. *La morfometría de las lagunas, así como el pH y la conductividad de sus aguas influyen sobre la dinámica estacional de los parámetros descriptores de las BH y los FH.*

Los resultados del *Capítulo I* demuestran que la conductividad fue el factor abiótico más relevante en la determinación del patrón de la abundancia, el biovolumen y la biomasa de las BH y los FH de las lagunas de Rancho Hambre. La morfometría de las lagunas también influyó sobre dicha dinámica estacional ya que determinó el patrón de variación de la temperatura del agua. Además, los resultados del *Capítulo II* revelan que la temperatura y el pH explicaron significativamente la variabilidad estacional de los patrones de composición de los morfotipos bacterianos planctónicos. De esta manera, la morfometría de las lagunas, así como el pH y la conductividad de sus aguas influyeron sobre la dinámica estacional de los parámetros descriptores de las BH y los FH.

2. *La abundancia y composición del metazooplancton regulan la abundancia de los FH de las lagunas de la turbera.*

De acuerdo con los resultados del *Capítulo I*, en primavera se observaron los menores valores de abundancia del metazooplancton, representados principalmente por los primeros estadios de desarrollo de copépodos (larvas nauplii microfiltradoras), mientras que en el verano tardío se observó un incremento en las abundancias de los estadios adultos de metazoos. En este último período se observaron además diferencias en la estructura del metazooplancton entre los cuerpos de agua someros y profundos. Estas diferencias se explicaron parcialmente en función de los patrones característicos de

variación de la temperatura, los cuales a su vez estuvieron regulados por la morfometría de los cuerpos de agua. Consecuentemente, el estudio de la comunidad de FH reveló un cambio en el tipo de regulación de la abundancia de los mismos en los dos períodos contrastantes, *bottom-up* en primavera vs. *top-down* en verano tardío, y se relacionó con cambios en la abundancia y composición del metazooplancton.

3. *Las condiciones abióticas de la turbera, en particular la gran cantidad de materia orgánica disuelta, no interfieren en el estudio de las BH mediante citometría de flujo. Además, dicho estudio es más eficiente cuando se utiliza el fijador Paraformaldehído+Glutaraldehído.*

Los resultados de los *Capítulos II y III* demuestran que se puede realizar el estudio de la comunidad de BH que habita las lagunas y el agua intersticial de *Sphagnum* utilizando citometría de flujo. Este método es particularmente valioso a la hora de comparar las BH de estos diferentes hábitats ya que brinda información adicional a la estimación de la abundancia, como son los parámetros citométricos FL1, FL3 y SSC, con los que se logra detectar cambios en la estructura interna de la comunidad. En este contexto, los resultados del *Capítulo II* demuestran que el Paraformaldehído+Glutaraldehído (P+G) es el fijador más eficiente para el estudio de las BH mediante citometría de flujo en el sistema de turbera estudiado. Por lo tanto se recomienda el uso este fijador para el estudio de los procariotas de ambientes acuáticos de turberas.

4. *Las poblaciones citométricas de BH que habitan el agua intersticial de Sphagnum difieren de aquellas que habitan los cuerpos de agua.*

Los resultados del *Capítulo III* demuestran que existen tres grupos de ambientes dentro de Rancho Hambre que poseen patrones citométricos característicos: las lagunas minerotróficas (RH1 y RH4), las lagunas ombrotóricas (RH2, RH3 y RH5) y el agua intersticial de *Sphagnum* (A - H). Además, el pH y la conductividad explicaron significativamente la variabilidad espacial de los patrones citométricos de las BH de la turbera, coincidiendo con los resultados observados en los *Capítulos I y II*, lo que demuestra que éstas son variables claves para la regulación de la estructura de las BH, confirmando hallazgos previos para otras comunidades en estos ambientes.

Perspectivas

La descripción de la comunidad de BH realizada en esta Tesis Doctoral utilizando información complementaria de distintas técnicas de estudio (microscopía de epifluorescencia, análisis de imágenes y citometría de flujo) constituye una valiosa aproximación al estudio de dicha comunidad en turberas de Tierra del Fuego. Sin embargo, debido a la naturaleza de la comunidad de BH, las técnicas de estudio empleadas no han permitido conocer su identidad y diversidad taxonómica. En base a esto, se elaboró un proyecto de investigación actualmente en desarrollo en colaboración con Sudáfrica (Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el MINCyT-Argentina y el DST-Sudáfrica), donde se propone utilizar técnicas moleculares de *fingerprinting* como TRFLPs (*terminal restriction fragment length polymorphism*) en combinación con pirosecuenciación con el objetivo de estudiar la composición taxonómica de la comunidad de BH de las lagunas de Rancho Hambre. Hasta ahora, las muestras tomadas en cada laguna en octubre de 2012 presentan composiciones de la comunidad bacteriana más similares entre sí que entre muestras de lagunas vecinas. De esta manera, las huellas genéticas obtenidas con TRFLPs demuestran que las comunidades bacterianas tienen una alta diversidad y son al mismo tiempo características de cada cuerpo de agua (datos no publicados). Este patrón está en vías de ser corroborado en el futuro utilizando los resultados de la pirosecuenciación, los que además revelarán cuáles son los grupos filogenéticos más representados en estas lagunas.

Por otro lado, se propone poner a prueba una hipótesis planteada en base a los resultados del *Capítulo II*: “*el morfotipo identificado como coco pequeño mediante la técnica de microscopía de epifluorescencia corresponde a partículas virales*”. En el marco de un nuevo proyecto de investigación se realizará un próximo muestreo de las turberas de Tierra del Fuego, donde se tomarán muestras en estos y otros cuerpos de agua para cuantificar virus mediante citometría de flujo. Además, se estudiarán los procariontes utilizando la técnica de deposición catalizada e hibridación *in situ* (CARD-FISH). Esta técnica permite afiliar las células teñidas con DAPI a los dominios *Bacteria* y *Archaea*, por lo que se puede determinar qué porcentaje de los objetos teñidos con DAPI son propiamente bacterias o arqueas. De esta manera, se postula que la abundancia de virus determinada mediante citometría de flujo se relacionará con el porcentaje de los objetos teñidos con DAPI que no se identificaron como eubacterias ni arqueas, y que ambos estarán fuertemente correlacionados con la abundancia de cocos pequeños.

Además, se planea desarrollar un método estadístico para comparar la similitud entre patrones citométricos de muestras de agua, con el fin de realizar una caracterización

integral de las poblaciones citométricas y utilizar la técnica de citometría de flujo de manera análoga a una técnica de *fingerprinting* o “huella citométrica”. La ventaja de la citometría de flujo respecto de las técnicas moleculares de *fingerprinting* o huella genética radica en la rapidez con la que se pueden analizar una gran cantidad de muestras.

También resulta interesante combinar la técnica de citometría de flujo con herramientas moleculares como la pirosecuenciación. En el marco del nuevo proyecto de investigación mencionado anteriormente se propone realizar una separación física de las poblaciones citométricas de BH mediante *sorting*, a partir de la cual se determinará la composición taxonómica de cada población por separado a través de su posterior pirosecuenciación.

El trabajo en conjunto con el *Center for Microbial Ecology and Genomics* de la Universidad de Pretoria (Sudáfrica) comenzó con el Programa de Cooperación Científico-Tecnológica (MINCyT –DST) y continúa en el marco del nuevo proyecto de investigación (PICT 2012). El objetivo inicial de estudiar la diversidad bacteriana de la turbera de Rancho Hambre se ha expandido a nivel regional, incluyendo además en este nuevo proyecto a la turbera de Andorra, la cual se sitúa dentro del sitio Ramsar más austral del mundo y constituye junto con el glaciar Vinciguerra la reserva de agua potable de la ciudad de Ushuaia.

BIBLIOGRAFÍA

- Ågren A., Buffam I., Berggren M. *et al.* (2008) Dissolved organic carbon characteristics in boreal streams in a forest-wetland gradient during the transition between winter and summer. *Geophysical Research-Biogeosciences*, **113**, G03031, doi: 10.1029/2007JG000674.
- Aitkenhead-Peterson J.A., McDowell W.H. & Neff J.C. (2003) Sources, production, and regulation of allochthonous dissolved organic matter to surface waters. En: *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter* (Eds. S.E.G. Findlay & R.L. Sinsabaugh), pp. 25–70. Academic Press, California, U.S.A.
- Aldous A.R. (2002) Nitrogen translocation in *Sphagnum* mosses: effects of atmospheric nitrogen deposition. *New Phytologist*, **156**, 241–253.
- Almada P., Allende L., Tell G. *et al.* (2004) Experimental evidence of the grazing impact of *Boeckella poppei* on phytoplankton in a maritime Antarctic lake. *Polar Biology*, **28**, 39–46.
- Andersen T. & Hessen D.O. (1991) Carbon, nitrogen, and phosphorus content of freshwater zooplankton. *Limnology and Oceanography*, **36**, 807–814.
- Anderson M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, **26**, 32–46.
- Anderson M.J. (2006) Distance-based tests for homogeneity of multivariate dispersions. *Biometrics*, **62**, 245–253.
- Anderson R., Kjelleberg S., McDougald D. *et al.* (2011) Species-specific patterns in the vulnerability of carbon-starved bacteria to protist grazing. *Aquatic Microbial Ecology*, **64**, 105–116.
- Andreatta S., Wallinger M.M., Piera J. *et al.* (2004) Tools for discrimination and analysis of lake bacterioplankton subgroups measured by flow cytometry in a high-resolution depth profile. *Aquatic Microbial Ecology*, **36**, 107–115.
- APHA (American Public Health Association) (1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th edn. Washington, DC.
- Asada T. & Warner B.G. (2005) Surface peat mass and carbon balance in a hypermaritime peatland. *Soil Science Society of America Journal*, **69**, 549–562.
- Auer V. (1965) The Pleistocene of Fuego-Patagonia, Part IV: Bog profiles. *Annales Acaemiae Scientiarum Fennicae*, Series A III, Geol.-Geogr. (Helsinki), **80**, 1–165.
- Azam F., Fenchel T., Field J.G. *et al.* (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**, 257–263.

- Bayly I.A.E. (1992) Fusion of the genera *Boeckella* and *Pseudoboeckella* (Copepoda) and revision of their species from South America and sub-Antarctic islands. *Revista Chilena de Historia Natural*, **65**, 17–63.
- Belova S.E., Fetodova A.V. & Dedysh S.N. (2012) Prokaryotic ultramicroforms in a Sphagnum peat bog of upper Volga catchment. *Microbiology*, **81**, 614–620.
- Benzie J.A.H. (2005) *Cladocera: The Genus Daphnia (including Daphniopsis) (Anomopoda: Daphniidae)*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Berggren M., Laudon H. & Jansson M. (2007) Landscape regulation of bacterial growth efficiency in boreal freshwaters. *Global Biogeochemical Cycles*, **21**, 1–9.
- Berggren M., Laudon H. & Jansson M. (2009a) Hydrological control of organic carbon support for bacterial growth in boreal headwater streams. *Microbial Ecology*, **57**, 170–178.
- Berggren M., Laudon H. & Jansson M. (2009b) Aging of allochthonous organic carbon regulates bacterial production in unproductive boreal lakes. *Limnology and Oceanography*, **54**, 1333–1342.
- Berggren M., Laudon H., Haei M. *et al.* (2010) Efficient aquatic bacterial metabolism of dissolved low molecular weight compounds from terrestrial sources. *The ISME Journal*, **4**, 408–416.
- Bergh Ø., Børsheim K.Y., Bratbak G. *et al.* (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467–468.
- Bergström A., Jansson M., Drakake S. *et al.* (2003) Occurrence of mixotrophic flagellates in relation to bacterioplankton production, light regime and availability of inorganic nutrients in unproductive lakes with differing humic contents. *Freshwater Biology*, **48**, 868–877.
- Bertilsson S. & Jones J.B.Jr. (2003) Supply of dissolved organic matter to aquatic ecosystems: autochthonous sources. En: *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter* (Eds. S.E.G. Findlay & R.L. Sinsabaugh), pp. 3–24. Academic Press, California, U.S.A.
- Bettarel Y., Sime-Ngando T., Amblard C. *et al.* (2000) A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 2283–2289.
- Bird D.F. & Kalff J. (1986) Bacterial grazing by planktonic algae. *Science*, **231**, 493–495.
- Bird D.F. & Kalff J. (1987) Algal phagotrophy: Regulating factors and importance relative to photosynthesis in *Dinobryon* (Chrysophyceae). *Limnology and Oceanography*, **32**, 277–284.

- Boëchat, I.G., Weithoff, G., Krüger, A. *et al.* (2007) A biochemical explanation for the success of mixotrophy in the flagellate *Ochromonas* sp. *Limnology and Oceanography*, **52**, 1624–1632.
- Boenigk J. & Arndt H. (2002) Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 465–480.
- Boltovskoy A. (1984) Relación huésped-parásito entre el quiste de *Peridinium willei* y el oomicete *Aphanomyopsis peridiniella* n. sp. *Limnobios*, **2**, 635–645.
- Boltovskoy A. & Urrejola R. (1977) Dos nuevas especies del género *Keratella* (Rotatoria) de Tierra del Fuego, Argentina. *Limnobios*, **1**, 181–187.
- Bonarelli G. (1917) Tierra del Fuego y sus turberas. *Anales del Ministerio de Agricultura de la Nación. Sección Geología, Mineralogía y Minería*. Tomo XII (3), 1–119. Buenos Aires.
- Borics G., Tóthmérész B., Grigorszky I. *et al.* (2003) Algal assemblage types of bog-lakes in Hungary and their relation to water chemistry, hydrological conditions and habitat diversity. *Hydrobiologia*, **502**, 145–155.
- Børsheim K.Y. & Bratbak G. (1987) Cell volume to cell carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from seawater. *Marine Ecology Progress Series*, **36**, 171–175.
- Børsheim K.Y., Bratbak G. & Heldal M. (1990) Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 352–356.
- Bottrell H.H., Duncan A., Gliwicz Z.M. *et al.* (1976) A review of some problems in zooplankton production studies. *Norwegian Journal of Zoology*, **24**, 419–456.
- Bouvier T., del Giorgio P.A. & Gasol J.M. 2007. A comparative study of cytometric characteristics of high and low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, **9**, 2050–2066.
- Brussaard C.P.D. (2004) Optimization of Procedures for Counting Viruses by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1506–1513.
- Buffoni C., Sabbione N.C., Connon G. *et al.* (2009) Localización de hipocentros y determinación de su magnitud en Tierra del Fuego y zonas aledañas. *Geoacta*, **34**, 75–86.
- Bullock G.R. (1984) The current status of fixation for electron microscopy: a review. *Aquatic Microbial Ecology*, **10**, 283–298.
- Callieri C. (2008) Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*, **1**, 1–28.

- Callieri C., Karjalainen S.M. & Passoni S. (2002). Grazing by ciliates and heterotrophic nanoflagellates on picocyanobacteria in Lago Maggiore, Italy. *Journal of Plankton Research*, **24**, 785–796.
- Callieri C. & Pinolini M.L. (1995) Picoplankton in Lake Maggiore, Italy. *International Revue der gesamten Hydrobiologie*, **80**, 491–501.
- Carpenter S.R., Cole J.J., Pace M.L. *et al.* (2005) Ecosystem subsidies: terrestrial support of aquatic food webs from ^{13}C addition to contrasting lakes. *Ecology*, **86**, 2737–2750.
- Clymo, R.S. (1964) The origin of acidity in *Sphagnum* bogs. *The Bryologist*, **67**, 427–431.
- Cook K.B., Bunker A., Hay S. *et al.* (2007) Naupliar development times and survival of the copepods *Calanus helgolandicus* and *Calanus finmarchicus* in relation to food and temperature. *Journal of Plankton Research*, **29**, 757–767.
- Cooper D.J., Wolf E.C., Colson, C. *et al.* (2010) Alpine Peatlands of the Andes, Cajamarca, Peru. *Arctic, Antarctic and Alpine Research*, **42**, 19–33.
- Cosandey, F. (1964) La tourbière des Tenasses sur Vevey. *Matér. Levé géobot. de la Suisse*, **45**, 1–324.
- Cottrell M.T. & Suttle C.A. (1991). Wide-spread occurrence and clonal variation in viruses which cause lysis of a cosmopolitan eukaryotic marine phytoplankter, *Micromonas pusilla*. *Marine Ecology Progress Series*, **78**, 1–9.
- Coveney M.F. & Wetzel R.G. (1995) Biomass, production and specific growth rate of bacterioplankton and coupling to phytoplankton in an oligotrophic lake. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1187–1200.
- Craig S.R. (1987) The distribution and contribution of picoplankton to deep photosynthetic layers in some meromictic lakes. *Acta Academiae Aboensis*, **47**, 55–81.
- Danilov, R.A. & Ekelund, N.G.A. (2001) Phytoplankton communities at different depths in two eutrophic and two oligotrophic temperate lakes at higher latitude during the period of ice cover. *Acta Protozoologica*, **40**, 197–201.
- Dedysh S.N., Pankratov T.A., Belova, S.E. *et al.* (2006) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic *Sphagnum* peat bog. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 2110–2117.
- del Giorgio P.A. & Davis J. (2003) Patterns in dissolved organic matter lability and consumption across aquatic ecosystems. En: *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter* (Eds. S.E.G. Findlay & R.L. Sinsabaugh), pp. 399–424. Academic Press, California, U.S.A.

- del Giorgio P.A. & Gasol J.M. (2008) Physiological structure and single cell activity in marine bacterioplankton. En: *Microbial ecology of the oceans, Second Edition* (Ed. D.L. Kirchman), pp 243–298. Willey, New York.
- Demetraki-Paleolog A. (2010) Planktonic rotifers communities of different types of peat-bog reservoirs and wetlands of Poleski National Park (Eastern Poland). *Teka Komisji Ochrony i Kształtowania Środowiska Przyrodniczego*, **7**, 67–79.
- Domaizon I., Viboud S. & Fontvieille D. (2003) Taxon specific and seasonal variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy - importance of mixotrophy. *FEMS Microbiology Ecology*, **46**, 317–329.
- Druvietis I., Sprinģe G., Briede A. *et al.* (2010) A Comparative Assessment of the Bog Aquatic Environment of the Ramsar Site of Teiči Nature Reserve and North Vidzeme Biosphere Reserve, Latvia. En: *Mires and Peat* (Ed. M. Kļaviņš), pp. 19–40. University of Latvia Press, Rīga.
- Dumont H.J., van de Velde I. & Dumont S. (1975) The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia*, **19**, 75–97.
- Fermani P., Diovisalvi N., Torremorell A. *et al.* (2013) The microbial food web structure of a hypertrophic warm-temperate shallow lake, as affected by contrasting zooplankton assemblages. *Hydrobiologia*, **714**, 115–130.
- Fetodova A.V., Belova S.E., Kulichevskaya I.S. *et al.* (2012) Molecular identification of filterable bacteria and archaea in the water of acidic lakes of northern Russia. *Microbiology*, **81**, 281–287.
- Finlay B.J. & Guhl B.E. (1992) Plankton sampling - freshwater. En: *Protocols in protozoology* (Eds J.J. Lee & A.T. Soldo), pp. B–1.1. Society of Protozoology, Allen Press, Lawrence, KS.
- Fisher M.M., Graham J.M. & Graham L.E. (1998) Bacterial abundance and activity across sites within two northern Wisconsin *Sphagnum* bogs. *Microbial Ecology*, **36**, 259–269.
- Flöder S., Hansen T. & Ptacnik R. (2006) Energy-dependent bacterivory in *Ochromonas minima* –A strategy promoting the use of substitutable resources and survival at insufficient light supply. *Protist*, **157**, 291–302.
- Foissner W. & Berger H. (1996) A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydro- biologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology*, **35**, 375–482.

- Foissner W., Berger H., Blatterer H. *et al.* (1995) *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems – Band IV: Gymnostomates, Loxodes, Suctorina*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft, München.
- Foissner W., Berger H. & Kohmann F. (1992) *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft, München.
- Foissner W., Berger H. & Kohmann F. (1994) *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft, München.
- Foissner W., Berger H. & Schaumburg J. (1999) *Identification and ecology of limnetic plankton ciliates*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft, München.
- Foissner W., Blatterer H., Berger H. *et al.* (1991) *Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea*. Informationsberichte des Bayer, Landesamtes für Wasserwirtschaft, München.
- Fuhrman J.A. & Noble R.T. (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawaters. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1236–1242.
- Gasol J.M. (1994) A framework for the assessment of top-down vs. bottom-up control of heterotrophic nanoflagellate abundance. *Marine Ecology Progress Series*, **113**, 291–300.
- Gasol J.M. & del Giorgio P.A. (2000) Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, **64**, 197–224.
- Gasol J.M., Zweifel U. L., Peters F. *et al.* (1999) Significance of Size and Nucleic Acid content Heterogeneity as measured by Flow Cytometry in Natural Planktonic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4475–4483.
- Gilbert D., Amblard C., Bourdier G. *et al.* (1998) The microbial loop at the surface of a peatland: structure, function and impact of nutrient input. *Microbial Ecology*, **35**, 83–93.
- Gilbert D. & Mitchell E.A.D. (2006) Microbial diversity in *Sphagnum* peatlands. En: *Peatlands: Evolution and Records of Environmental and Climatic Changes* (Eds I.P. Martini, A. Martínez Cortizas & W. Chesworth), pp. 289–320. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.

- González Garraza, G. (2012) *Fracciones de tamaño del fitoplancton de las lagunas de la turbera de Rancho Hambre (Tierra del Fuego): caracterización y relación con los factores bióticos y abióticos*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- González Garraza G., Mataloni G., Iturraspe, R. *et al.* (2012) The limnological character of bog pools in relation to meteorological and hydrological features. *Mires and Peat*, **10**, Article 07, 1–14.
- Górniak A., Grabowska M., Jekatierynczuk-Rudczyk E. *et al.* (2003) Long-term variations of phytoplankton primary production in a shallow, polyhumic reservoir. *Hydrobiologia*, **506-509**, 305–310.
- Graham J. M., Kent A.D., Lauster G.H. *et al.* (2004) Seasonal dynamics of phytoplankton and planktonic protozoan communities in a northern temperate humic lake: diversity in a dinoflagellate dominated system. *Microbial Ecology*, **48**, 528–540.
- Greaves M.P., Weatley R.E., Shepherd H. *et al.* (1973) Relationships between microbial populations and adenosine triphosphate in a basin peat. *Soil Biology & Biochemistry*, **5**, 685–687.
- Grootjans A., Iturraspe R., Lanting A. *et al.* (2010) Ecohydrological features of some contrasting mires in Tierra del Fuego, Argentina. *Mires & Peat*, **6**, 01–15.
- Grossart H.P., Jezbera J., Hornák K. *et al.* (2008) Top-down and bottom-up induced shifts in bacterial abundance, production and community composition in an experimental divided humic lake. *Environmental Microbiology*, **10**, 635–652.
- Hammer Ø., Harper D.A.T. & Ryan P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4**, 1–9.
- Hillebrand H., Dürselen C.D., Kirschtel D. *et al.* (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, **35**, 403–424.
- Holden J. (2006) Peatland hydrology. En: *Peatlands: Evolution and records of environmental and climate changes* (Eds. I.P. Martini, A. Martínez Cortizas & W. Chesworth), pp. 319–346. Elsevier, Amsterdam.
- Holland A., Duivenvoorden L.J. & Kinnear S.H.W. (2013) Naturally acidic waterways: conceptual food webs for better management and understanding of ecological functioning. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwaters Ecosystems*, doi: 10.1002/aqc.2267
- Irénée-Marie F.I.C. (1939) *Flore Desmidiale de la Region de Montreal*. Laprairie, Canada.
- Iturraspe R. (2010) *Las Turberas de Tierra del Fuego y el Cambio Climático Global*. Fundación Humedales / Wetlands International, Buenos Aires, Argentina.

- Iturraspe R. & Roig C. (2000) Aspectos hidrológicos de turberas de *Sphagnum* de Tierra del Fuego, Argentina. En: *Conservación de ecosistemas a nivel mundial con énfasis en las turberas de Tierra del Fuego, Disertaciones y Conclusiones* (Eds. A. Coronato & C. Roig), pp. 85–93. Ushuaia, Argentina.
- Iturraspe R. & Urciuolo A. (2000) Clasificación y caracterización de las cuencas hídricas de Tierradel Fuego. En: *Acta del XVIII Congreso Nacional del Agua* (Ed. Comité Permanente de los Congresos Nacionales del Agua), 17 pp., CDRom. Santiago del Estero, Argentina.
- Iturraspe R. & Urciuolo A. (2004) Les tourbieres de la Terre de Feu en Argentine: un patrimoine naturel très menacé. *Geocarrefour*, **79**, 143–152.
- Iturraspe R., Urciuolo A., Strelin J., Iturraspe R., Camargo S. & Pacheco J. (2009) El retroceso del Glaciar Vinciguerra como respuesta al cambio climático en los Andes de Tierra del Fuego, Argentina. En: *Glaciares, nieves y hielos de América Latina. Cambio climático y amenazas*. (Eds. C.D. López Arena & J. Ramírez Cadena), pp. 61–76. Ingeominas, Bogotá, Colombia.
- Izaguirre I., Allende, L. & Marinone, M.C. (2003) Comparative study of the planktonic communities of three lakes of contrasting trophic status at Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Journal of Plankton Research*, **25**, 1079–1097.
- Izaguirre I., Mataloni G., Vinocur A. *et al.* (1993) Temporal and spatial variations of phytoplankton from Boeckella Lake (Hope Bay, Antarctic Peninsula). *Antarctic Science*, **5**, 137–141.
- Izaguirre I., Vinocur, A., Mataloni, G. *et al.* (1998) Phytoplankton communities in relation to trophic status in lakes from Hope Bay (Antarctic Peninsula). *Hydrobiologia*, **369/370**, 73–87.
- Jansson M., Bergström A.K., Drakake S. *et al.* (2001) Nutrient limitation of bacterioplankton and phytoplankton in humic lakes in northern Sweden. *Freshwater Biology*, **46**, 653–666.
- Johnson L. C. & Damman A.W.H. (1991) Species-controlled *Sphagnum* decay on a south Swedish raised bog. *Oikos*, **61**, 234–242.
- Jones R.I. (1992) The influence of humic substances on lacustrine planktonic food chains. *Hydrobiologia*, **229**, 73–91.
- Jones R.I. (2000) Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biology*, **45**, 219–226.

- Joosten H. & Clarke D. (2002) *Wise use of mires and peatlands. Background and principles including a framework for decision-marking*. International Mire Conservation Group and International Peat Society, Finland.
- José de Paggi S. & Paggi J.C. (1995) Determinación de la Abundancia y Biomasa Zooplanctónica. En: *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio* (Eds. E.C. Lopretto & G. Tell), pp. 315–321. Vol. 1. Ediciones Sur, La Plata, Argentina.
- Jürgens K. (1994) impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs – a review. *Marine Microbial Food webs*, **8**, 295–324.
- Jürgens K. & Massana R (2008) Protistan grazing on marine bacterioplankton. En: *Microbial ecology of the oceans, Second Edition* (Ed. D.L. Kirchman), pp 383–441. Willey, New York.
- Jürgens K. & Matz C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 413–434.
- Jürgens K., Wickham S.A., Rothhaupt K.O. *et al.* (1996) Feeding rates of macro- and microzooplankton on heterotrophic nanoflagellates. *Limnology and Oceanography*, **41**, 1833–1839.
- Kahl A. (1930) Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). 1. Allgemeiner Teil und Prostomata. En: *Die Tierwelt Deutschlands 18* (Ed. F. Dahl), pp. 1–180. Gustav Fischer, Jena.
- Kahl A. (1931) Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). 2. Holotricha außer den im 1. Teil behandelten Prostomata. En: *Die Tierwelt Deutschlands 21* (Ed. F. Dahl), pp. 181–398. Gustav Fischer, Jena.
- Kahl A. (1932) Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). 3. Spirotricha. En: *Die Tierwelt Deutschlands 21* (Ed. F. Dahl), pp. 399–650. Gustav Fischer, Jena.
- Kahl A. (1935) Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). 4. Peritricha und Chonotricha; Nachtrag I. En: *Die Tierwelt Deutschlands 30* (Ed. F. Dahl), pp. 651–886. Gustav Fischer, Jena.
- Keskitalo, J. & Eloranta, P. (1999) *Limnology of Humic Waters*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Klimaszyk, P. & Kuczynska-Kippen, N. (2006) Peat-bog pool (Wielkopolski National Park) as a habitat of specific communities of zooplankton. *Acta Agrophysica*, **7**, 375–381.

- Komárek J. & Anagnostidis K. (1999) Cyanoprokaryota. 1. Chroococcales. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Eds H. Ettl, G. Gärtner, H. Heynig & D. Mollenhauer), pp. 1–548. Vol. 19/1. G. Fischer Verlag, Jena.
- Komárek J. & Anagnostidis K. (2005) Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Eds B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Schagerl), pp. 1–759. Vol. 19/2. G. Fischer-Verlag, Jena.
- Komárek J. & Fott B. (1983) Chlorophyceae, Chlorococcales. En: *Das Phytoplankton des Süßwassers* (Eds H.J. Elster & W. Ohle), pp. 1–1044. Vol. 16/7. Nägeli & Obermiller, Stuttgart.
- Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1986) Bacillariophyceae. 1. Naviculaceae. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Eds H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer), pp. 1–876. Vol. 2/1. G. Fischer-Verlag, Jena.
- Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1988) Bacillariophyceae. 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Eds H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer), pp. 1–596. Vol. 2/2. G. Fischer-Verlag, Jena.
- Krammer K. & Lange-Bertalot H. (1991) Bacillariophyceae. 3. Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. En: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* (Eds H. Ettl, J. Gerloff, H. Heynig & D. Mollenhauer), pp. 1–576. Vol. 2/3. G. Fischer-Verlag, Jena.
- Kuczynska-Kippen N. (2008) Spatial distribution of zooplankton communities between the Sphagnum mat and open water in a dystrophic lake. *Polish Journal of Ecology*, **56**, 57–64.
- Kulichevskaya S., Belova S.E., Komov V.T. et al. (2011) Phylogenetic composition of bacterial communities in small boreal lakes and ombrotrophic bogs of the upper Volga Basin. *Microbiology*, **80**, 549–557.
- Langenheder, S., Lindström, E.S. & Tranvik, L.J. (2006) Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 212–220.
- Lara, E., Mitchell, E. A. D., Moreira, D. et al. (2011) High diverse and seasonally dynamic protist community in a pristine peat bog. *Protist*, **162**, 14–32.
- Lebaron P., Servais P., Baudoux A.C. et al. (2002) Variations of bacterial specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, **28**, 131–140.
- Legendre P. & Legendre L. (1998) *Numerical Ecology*. Elsevier Science, Amsterdam.

- Lemarchand K., Parthuisot N., Catala P. *et al.* (2001) Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water. *Aquatic Microbial Ecology*, **25**, 301–309.
- Lenzeweger R. (1993) Beitrag zur Kenntnis der Desmidiaceenflora von Feuerland (Argentinien). *Archiv für Protistenkunde*, **143**, 143–152.
- Lepistö, L. & Holopainen, A.L. (2003) Occurrence of Cryptophyceae and katablepharids in boreal lakes. In: Naselli-Flores, L., Padisák, J., Dokulil, M.T. (eds.), *Phytoplankton and Equilibrium Concept: The Ecology of Steady-State Assemblages*. *Hydrobiologia*, Vol. 502. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, pp. 307–314.
- Li W.K.W. (1997) Cytometric diversity in marine ultraphytoplankton. *Limnology and Oceanography*, **42**, 874–880.
- Li W.K.W. & Dickie P.M. (2001) Monitoring phytoplankton, bacterioplankton and viroplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by flow cytometry. *Cytometry*, **44**, 236–246.
- Li W.K.W., Jellett J.F. & Dickie P.M. (1995) DNA distribution in planktonic bacteria stained with TOTO or TO-PRO. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1485–1495.
- Lin X., Green S., Tfaily M.M. *et al.* (2012) Microbial community structure and activity linked to contrasting biogeochemical gradients in bog and fen environments of glacial lake Agassiz peatland. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 7023–7031.
- Lindsay, R. A., Charman, D. J., Everingham F. *et al.* (1988) *The Flow Country. The Peatlands of Caithness and Sutherland*. Nature Conservancy Council, Peterborough.
- Loeblich III, A.R. (1984) Dinoflagellate physiology and biochemistry. In: Spector, D.L.(ed.), *Dinoflagellates*. Academic Press, New York, pp. 299–342.
- Lynn D.H. (2008) *The ciliated protozoa. Characterization, classification, and guide to the literature*. Springer, Ontario.
- Macek M., Šimek K. & Bittl T. (2001) Conspicuous peak of oligotrichous ciliates following winter stratification in a bog lake. *Journal of Plankton Research*, **23**, 353–363.
- MacLennan M.M., Arnott S.E. & Strecker A.L. (2012) Differential sensitivity of planktonic trophic levels to extreme summer temperatures in boreal lakes. *Hydrobiologia*, **680**, 11–23.
- Marie D., Brussaard C.P.D., Thyrhaug R. *et al.* (1999a) Enumeration of Marine Viruses in Culture and Natural Samples by Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 45–52.

- Marie D., Partensky F. & Vaultot D. (1996) Application of the novel DNA dyes YOYO-1, YOPRO-1 and Picogreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1649–1655.
- Marie D., Partensky F., Vaultot D. *et al.* (1999b) Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. En: *Current protocols in cytometry* (Eds. J.P.E.A. Robinson), supl. 10., pp. 11.11.1–11.11.15. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Marker A.F.H., Crowther C.A. & Gunn R.J.M. (1980) Methanol and acetone as solvents for estimating chlorophyll-a and phaeopigments by spectrophotometry. *Ergebnisse der Limnologie*, **14**, 52–69.
- Massana R., Gasol J.M., Björnsten P.K. *et al.* (1997) Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Scientia Marina*, **61**, 397–407.
- Mataloni, G. (1991) Remarks on the distribution and ecology of some desmids from Tierra del Fuego (Argentina). *Nova Hedwigia*, **53**, 433–443.
- Mataloni, G. (1995a) Ecological notes on some interesting desmids from Tierra del Fuego (Argentina) peat bogs. *Nova Hedwigia*, **60**, 135–144.
- Mataloni, G. (1995b) *Cyanodictyon reticulatum* (Lemm.) Geitler and *Alternantia geitleri* Schiller (Chlorococcales). Two rare species from Tierra del Fuego (Argentina) peat bogs. *Cryptogamic Botany*, **5**, 1–4.
- Mataloni, G. (1997) *Flora algal de las turberas de Tierra del Fuego*. Contribución del Instituto Antártico Argentino No. 467. Instituto Antártico Argentino, Buenos Aires.
- Mataloni G. (1999) Ecological studies on algal communities from Tierra del Fuego peat bogs. *Hydrobiologia*, **391**, 157–171.
- Mataloni G. & Tell G. (1996) Comparative analysis of the phytoplankton communities of a peat bog from Tierra del Fuego (Argentina). *Hydrobiologia*, **325**, 101–112.
- Mataloni, G., Tesolín, G., Sacullo, F. *et al.* (2000) Factors regulating summer phytoplankton in a highly eutrophic Antarctic lake. *Hydrobiologia*, **432**, 65–72.
- Matz C. & Jürgens K. (2005) High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 921–929.
- McQueen, C.B. (1995) Niche breadth and overlap of *Sphagnum* species in Costa Rica. *Tropical Bryology*, **11**, 119–127.
- Mieczan T. (2007a) Seasonal patterns of testate amoeba and ciliates in three peatbogs: relationship to bacteria and flagellates (Poleski National Park, Eastern Poland). *Ecology & Hydrobiology*, **7**, 295–305.

- Mieczan, T. (2007b) Relationships among ciliated protozoa and water chemistry in small peat-bog reservoirs (Łęczna-Włodawa Lakeland, eastern Poland). *Oceanological and Hydrobiological Studies*, **36**, 77–86.
- Mieczan, T. (2007c) Planktonic ciliates in peat ponds of different acidity (E Poland). *EJPAU Biology*, **10**, article 20, 1–10. <http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue4/art-20.html>
- Mieczan, T. (2010a) Vertical micro-zonation of testate amoebae and ciliates in Peatlands waters in relation to potential food resources and grazing pressure. *International Review of Hydrobiology*, **95**, 86–102.
- Mieczan, T. (2010b) Vertical microzonation of testate amoebae and ciliates in peatbog waters in relation to physical and chemical parameters. *Polish Journal of Ecology*, **58**, 729–740.
- Mieczan T. & Siczek D. (2010) Horizontal distribution of ciliated protozoa between the Sphagnum mat and open water zone in shallow peat bog pools. *Teka Kom. Kszt. Srod. Przyr. – OL PAN*, **7**, 260–271.
- Mieczan T. & Tarkowska-Kukuryk M. (2013) Diurnal dynamics of the microbial loop in Peatlands: structure, function and relationships to environmental parameters. *Hydrobiologia*, **717**, 189–201.
- Mitchell E.A.D., Buttler A., Grosvernier Ph., *et al.* (2000) Relationships among testate amoebae (Protozoa), vegetation and water chemistry in five *Sphagnum*-dominated peatlands in Europe. *New Phytologist*, **145**, 95–106.
- Mitchell E.A.D., Gilbert D., Buttler A. *et al.* (2003) Structure of microbial communities in *Sphagnum* peatlands and effect of atmospheric carbon dioxide enrichment. *Microbial Ecology*, **46**, 187–199.
- Monfort P. & Baleux B. (1992) Comparison of flow cytometry and epifluorescence microscopy for counting bacteria in aquatic ecosystems. *Cytometry*, **13**, 188–192.
- Monger B.C. & Landry M.R. (1993) Flow cytometric analysis of marine bacteria with Hoechst 33342. *Marine Ecology Progress Series*, **59**, 905–911.
- Moore P.D. & Bellamy D.J. (1974) *Peatlands*. Elek Science, London.
- Moran M.A. & Covert J.S. (2003) Photochemically mediated linkages between dissolved organic matter and bacterioplankton. En: *Aquatic ecosystems: interactivity of dissolved organic matter* (Eds. S.E.G. Findlay & R.L. Sinsabaugh), pp. 243–262. Academic Press, California, U.S.A.

- Müller H. & Geller W. (1993) Maximum growth rates of aquatic ciliated Protozoa: the dependence on body size and temperature reconsidered. *Archiv fuer Hydrobiologie*, **126**, 315–327.
- Noble R.T. & Fuhrman J.A. (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, **14**, 113–118.
- Norland S. (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria. En: *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (Eds. P. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr & J.J. Cole), pp. 303–307. Lewis Publishing, Boca Raton, Florida.
- Nusch E.A. (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch Hydrobiology Beih Ergebn Limnol*, **14**, 14–36.
- Orlova-Bienkowskaja M.Y. (1998) A revision of the cladoceran genus *Simocephalus* (Crustacea: Daphniidae). *Bulletin of the Natural History Museum: Zoology*, **64**, 1–62.
- Paggi J.C. (1979) Revisión de las especies argentinas del género *Bosmina* Baird agrupadas en el subgénero *Neobosmina* Lieder (Crustacea: Cladocera). *Acta Zoológica Lilloana*, **35**, 137–162.
- Paggi J.C. (1995) Crustacea Cladocera. En: *Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio* (Eds. E.C. Lopretto & G. Tell), pp 909–951, Vol. 3. Ediciones Sur, La Plata, Argentina.
- Paul A., Dziallas C., Zwirnmann E., et al. (2012) UV irradiation of natural organic matter (NOM): impact on organic carbon and bacteria. *Aquatic Sciences*, **74**, 443–454.
- Paul J.H., Jiang S.C. & Rose J.B. (1991) Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2197–2204.
- Pernthaler J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 537–546.
- Pernthaler J. & Amann R. (2005) Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **69**, 440–461.
- Pernthaler A., Pernthaler J. & Amann R. (2002) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3094–3101.
- Pernthaler A., Pernthaler J. & Amann R. (2004) Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms. En: *Molecular Microbial Ecology Manual Second Edition* (Eds. G.A. Kowalchuk, F.J. de Bruijn, I.M. Head, et al.), pp 711–726, Vol. 3.11. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

- Peuravuori J. & Pihlaja K. (1997) Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*, **337**, 133–149.
- Pick F.R. & Agbeti D.M. (1991) The seasonal dynamic and composition of photosynthetic picoplankton communities in temperate lakes in Ontario, Canada. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 565–580.
- Porter K.G. & Feig Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, **25**, 943–948.
- Posch T., Franzoi J., Prader J. *et al.* (2009) New image analysis tool to study biomass and morphotypes of three major bacterioplankton groups in an alpine lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **54**, 113–126.
- Pose M. & Izaguirre I (1998) *Sucesión estival de las poblaciones fitoplanctónicas en el lago Boeckella (Bahía Esperanza, Península Antártica)*. Contribución del Instituto Antártico Argentino No. 449. Instituto Antártico Argentino, Buenos Aires.
- Putt M. & Stoecker D.K. (1989) An experimentally determined carbon - volume ratio for marine oligotrichous ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnology and Oceanography*, **34**, 1097–1103.
- Rabassa J., Corontato A., Heusser C.J. *et al.* (2006). The peatlands of Argentine Tierra del Fuego as a source for paleoclimatic and paleoenvironmental information. En: *Peatlands: Evolution and records of environmental and climate changes* (Eds. I.P. Martini, A. Martínez Cortizas & W. Chesworth), pp. 129–144. Elsevier, Amsterdam.
- Rabassa J., Coronato A. & Roig C. (1996) The peatbogs of Tierra del Fuego, Argentina. En: *Global Peat Resources* (Ed. E. Lappalainen), pp. 261–266. International Peat Society Publisher, Jyskä, Finland.
- Reid J.W. (1985) Chave de identificação e lista de referências bibliográficas para as espécies continentais sulamericanas de vida livre da ordem Cyclopoida (Crustacea Copepoda). *Boletim de Zoologia, Universidade de São Paulo*, **9**, 17–143.
- Reynolds C. (2006) *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, New York.
- Roberts E.C., Legrand C., Steinke M. *et al.* (2011) Mechanism underlying chemical interactions between predatory planktonic protists and their prey. *Journal of Plankton Research*, **33**, 833–841.
- Robson T.M., Pancotto V.A., Scopel A.L. *et al.* (2005) Solar UV-B influences microfaunal community composition in a Tierra del Fuego peatland. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**, 2205–2215.
- Roig C. (2004) Antecedentes sobre turberas en Tierra del Fuego. En: *Los turbales de la Patagonia. Bases para su inventario y la conservación de su biodiversidad* (Eds. D.E

- Blanco & V. de la Balze), pp. 33–44. Fundación Humedales / Wetlands International, Buenos Aires, Argentina.
- Roig C. & Collado L. (2004) Los turbales patagónicos. Ventana No. 6 – Carbajal Tierra Mayor. En: *Los turbales de la Patagonia. Bases para su inventario y la conservación de su biodiversidad* (Eds. D.E Blanco & V. de la Balze), pp. 62–65. Fundación Humedales / Wetlands International, Buenos Aires, Argentina.
- Roig C. & Roig F.A. (2004) Consideraciones generales. En: *Los Turbales de la Patagonia, bases para su inventario y la conservación de su biodiversidad* (Eds. D.E. Blanco & V.M. de la Balze), pp. 5–21. Fundación Humedales / Wetlands International, Buenos Aires, Argentina.
- Rossa D.C., Bonecker C.C. & Fulone L.J. (2007) Biomassa de rotíferos em ambientes dulcícolas: revisão de métodos e fatores influentes. *Interciencia*, **32**, 220–226.
- Rothhaupt K.O. (1996) Laboratory experiments with a mixotrophic chrysophyte and obligate phagotrophic and phototrophic competitors. *Ecology*, **77**, 716–724.
- Ruttner-Kolisko A. (1974) *Plankton rotifers: Biology and taxonomy*. Die Binnengewässer 26, Suppl., E. Schweizerbart, Stuttgart.
- Ruttner-Kolisko A. (1977) Suggestions for biomass calculations of plankton rotifers. *Archiv für Hydrobiologie–Beiheft Ergebnisse der Limnologie*, **8**, 71–76.
- Rydin H. & Jeglum J.K. (2006) *The biology of peatlands*. Oxford University Press, Oxford.
- Salcher M.M., Hofer J., Horňák K. et al. (2007) Modulation of microbial predator-prey dynamics by phosphorus availability: growth patterns and survival strategies of bacterial phylogenetic clades. *FEMS Microbiology Ecology*, **60**, 40–50.
- Schiaffino M.R., Gasol J.M., Izaguirre I. et al. (2013) Picoplankton abundance and cytometric group diversity along a trophic and latitudinal lake gradient. *Aquatic Microbial Ecology*, **68**, 231–250.
- Sekiguchi H., Kawachi M., Nakayama T. et al. (2003) A taxonomic re-evaluation of the Pedinellales (Dictyochophyceae), based on morphological, behavioural and molecular data. *Phycologia*, **42**, 165–182.
- Shannon S.P., Chrzanowski T.H. & Grover J.P. (2007) Prey food quality affects flagellate ingestion rates. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**, 66–73.
- Sharma B.K. & Bhattarai S. (2005) Hydrobiological analysis of a peat bog with emphasis on its planktonic diversity and population dynamics in Bumdeling Wildlife Sanctuary, eastern Bhutan. *Limnology*, **6**, 183–187.
- Sharp J.H., Peltzer E.T., Alperin M.J. et al. (1993) DOC procedures subgroup report. *Marine Chemistry*, **41**, 37–49.

- Sherr B.F. & Sherr E.B. (1991) Proportional distribution of total numbers, biovolume, and bacterivory among size classes of 2-20 μm nonpigmented marine flagellates. *Marine Microbial Food Webs*, **5**, 227–237.
- Sherr E.B., Sherr B.F. & McDaniel J. (1991) Clearance rates of $< 6 \mu\text{m}$ fluorescently labelled algae (FLA) by estuarine protozoa: potential grazing impact of flagellates and ciliates. *Marine Ecology Progress Series*, **69**, 81–92.
- Simek K., Macek M., Pernthaler J. *et al.* (1996) Can freshwater planktonic ciliates survive on a diet of picoplankton? *Journal of Plankton Research*, **18**, 597–613.
- Simon M. & Azam F. (1989) Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, **51**, 201–213.
- Smirnov N.N. (1992) *The Macrothricidae of the world. Guides to the identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World*. Vol. 1. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands.
- Sommer U. & Sommer F. (2006) Cladocerans versus copepods: the cause of contrasting top–down controls on freshwater and marine phytoplankton. *Oecologia*, **147**, 183–194.
- Søndergaard M., Jensen L. & Ertebjerg G. (1991) Picoalgae in Danish coastal waters during summer stratification. *Marine Ecology Progress Series*, **79**, 139–149.
- Staley J.T. & Konopka A. (1985) Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **39**, 321–346.
- Stoecker D.K. (1999) Mixotrophy among dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **46**, 397–401.
- Stockner J.G. & Shortreed K.S. (1991) Autotrophic picoplankton: community composition abundance and distribution across a gradient of oligotrophic British Columbia and Yukon Territory lakes. *International Revue der gesamten Hydrobiologie*, **76**, 581–601.
- Tadonlécé R.D., Pinell-Alloul B., Bourbonnais N. *et al.* (2004) Factors affecting the bacteria-heterotrophic nanoflagellate relationship in oligo-mesotrophic lakes. *Journal of Plankton Research*, **26**, 681–695.
- Tadonlécé R.D., Planas D. & Lucotte M. (2005) Microbial food webs in boreal humic lakes and reservoirs: ciliates as a major factor related to the dynamics of the most active bacteria. *Microbial Ecology*, **49**, 325–341.

- ter Braak C.J.F. & Smilauer P. (2002) *CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for canonical community ordination (version 4.5)*. Microcomputer Power, New York.
- Troussellier M., Courties C., Lebaron P. *et al.* (1999) Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiology Ecology*, **29**, 319–330.
- Unrein F., Izaguirre I., Massana R. *et al.* (2005) Nanoplankton assemblages in maritime Antarctic lakes: characterisation and molecular fingerprinting comparison. *Aquatic Microbial Ecology*, **40**, 269–282.
- Unrein F., Massana R., Alonso-Sáez L. *et al.* (2007) Significant year-round effect of small mixotrophic flagellates on bacterioplankton in an oligotrophic coastal system. *Limnology and Oceanography*, **52**, 456–469.
- Urabe J., Gurung T.B., Yoshida T. *et al.* (2000) Diel changes in phagotrophy by *Cryptomonas* in Lake Biwa. *Limnology and Oceanography*, **45**, 1558–1563.
- Utermöhl H. (1958) Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, **9**, 1–38.
- Vaulot D., Courties C. & Partensky F. (1989) A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry*, **10**, 629–636.
- Venrick E.L. (1978) How many cells to count? En: *Phytoplankton Manual* (Ed. A. Sournia), pp. 167–180. UNESCO, Paris.
- Verhoeven J.T.A. & Liefveld W.M. (1997) The ecological significance of organochemical compounds in *Sphagnum*. *Acta Botanica Neerlandica*, **46**, 117–130.
- Vigna S. (1993) Chrysophyta escamosas (Synurophyceae) de una turbera de Tierra del Fuego (Argentina). *Darwiniana*, **32**, 299–302.
- Vila-Costa M., Gasol J.M., Sharma S. *et al.* (2012) Community analysis of high- and low-nucleic acid-containing bacteria in NW Mediterranean coastal waters using 16S rDNA pyrosequencing. *Environmental Microbiology*, **14**, 1390–1402.
- Visscher J. (1949) *Veenvorming*. Noorduijn's Wetenschappelijke Reeks, No. 33. J. Noorduijn en Zoon N.V., Gorinchem, The Netherlands.
- Voigt M. & Koste W. (1978) *Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas. Überordnung Monogononta*. Bd. I, Textband II. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Wang Y., Hammes F., Boon N. *et al.* (2009) Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. *The ISME Journal*, **3**, 889–902.

- Weishaar J.L., Aiken G.R., Bergamaschi B.A. *et al.* (2003) Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental Science Technology*, **37**, 4702–4708.
- Weller D.L.M. (1977) Observations on the diet and development of *Pseudoboeckella poppei* (Calanoida, Centropagidae) from an antarctic lake. *British Antarctic Survey Bulletin*, **45**, 77–92.
- West W. & West G.S. (1904, 1905, 1908, 1912, 1922) *A monograph of the British Desmidiaceae*. Vol. I-V. Ray Society, London.
- White P.A., Kalff J., Rasmussen J.B. *et al.* (1991) The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitat. *Microbial Ecology*, **21**, 99–118.
- Wilbert N. (1975) Eine verbesserte Technik der Protargolimprägation für Ciliaten. *Mikrokosmos*, **64**, 171–179.
- Yacubson S. (1963): Desmidiáceas de Lapataia (Tierra del Fuego). *Comunicaciones del Museo Argentino de Ciencias Naturales - Hidrobiología*, **1**, 157–178.
- Yentsch C. M., Horan P. K., Muirhead K. *et al.* (1983) Flow cytometry and cell sorting. A technique for analysis and sorting of aquatic particles. *Limnology and Oceanography*, **28**, 1275–1280.
- Zar J.H. (2010) *Biostatistical analysis*. 5th Edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New York.
- Zubkob M.V. & Tarran G.A. (2008) High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature*, **455**, 224–226.