



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Factores que determinan la composición y abundancia del picopláncton autotrófico en las lagunas pampeanas

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

Autor: Biol. Juliana Andrea Ospina Serna

Director de tesis: Dr. Fernando Unrein

Consejero de Estudios: Dra. Irina Izaguirre

Lugar de trabajo: Laboratorio Ecología Acuática

Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH) - Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional de San Martín

Buenos Aires, 2023

Factores que determinan la composición y abundancia del picopláncton autotrófico en las lagunas pampeanas

RESUMEN GENERAL

Los organismos planctónicos fotosintéticos $<2\mu\text{m}$, o picopláncton fototrófico (PPP), juegan un papel fundamental en la trama trófica microbiana acuática, y pueden llegar a representar una fracción muy significativa de la biomasa y la producción primaria total. En esta Tesis nos enfocamos en estudiar la relevancia de la luz, la temperatura y la depredación como determinantes de la composición y abundancia del PPP. En el Capítulo I se evaluaron los patrones de presencia y abundancia de los distintos componentes del picopláncton a nivel global principalmente en función del grado trófico, la latitud y la calidad de luz, y se comparó con lo observado en lagunas de la región pampeana. En el Capítulo II se describe el aislamiento y caracterización de tres cepas de algas picoeucariotas. Además, se compararon las tasas de crecimiento de una de estas cepas con la de una picocianobacteria también aislada de la laguna Chascomús. Estas cepas fueron sometidas a distintas condiciones de temperatura e intensidad lumínica, con el objetivo de dilucidar en qué medida las diferencias en estas condiciones pueden explicar el patrón espacio-temporal observado usualmente en esta laguna. En el Capítulo III se estimaron las tasas de depredación de cladóceros y rotíferos sobre cultivos de picocianobacterias, como así también se demostró que diferentes depredadores pueden inducir la agregación de picocianobacterias unicelulares, sin necesidad de contacto directo. Los resultados obtenidos en el marco de esta tesis contribuyen a comprender en qué medida factores tales como el grado trófico, la luz, la temperatura y la depredación afectan la estructura y la dinámica del PPP en cuerpos de agua continentales, en particular en las lagunas pampeanas. Asimismo, aporta nuevas evidencias sobre la capacidad de agregación de las picocianobacterias.

Palabras clave: picopláncton autotrófico; picocianobacterias; resistencia a depredación; agregación; lagos eutróficos someros; tasas de crecimiento; patrones globales.

Factors that determine the composition and abundance of autotrophic picoplankton in Pampean shallow lakes

ABSTRACT

The photosynthetic planktonic organisms $<2\mu\text{m}$, or phototrophic picoplankton (PPP), play a fundamental role in the microbial food web of aquatic systems, and represent a significant fraction of the total biomass and primary production. In this Thesis we focused the analyses in the relevance of factors such as light, temperature and predation as drivers of the composition and abundance of the PPP. In Chapter I the patterns of presence and abundance of the different components of picoplankton were evaluated at a global scale, mainly regarding the trophic degree, latitude and light quality, and compared with what was observed in Pampean lakes. Chapter II describes the isolation and characterization of three strains of picoeukaryotic algae. In addition, the growth rates of one picoeukaryotic strain and one picocyanobacterial strain previously isolated from Chascomús, were experimentally evaluated. These strains were studied under different conditions of temperature and light intensity with the aim of elucidating to what extent differences in these conditions explain the spatiotemporal pattern usually observed in this shallow lake. In Chapter III we estimated the predation rates of cladocerans and rotifers on picocyanobacteria cultures, and it was also demonstrated that different predators can induce the aggregation of unicellular picocyanobacteria, without the need for direct contact. The results obtained in the framework of this Thesis contribute to understand to what extent factors such as trophic degree, light, temperature and predation affect the structure and dynamics of the PPP in continental fresh water bodies, particularly in the Pampas shallow lakes. Likewise, it provides new evidence on the aggregation capacity of picocyanobacteria.

Keywords: autotrophic picoplankton; picocyanobacteria; resistance to predation; aggregation; eutrophic shallow lakes; growth rates; global patterns.

Dedicatoria

A Andrés, mi apoyo incondicional en todo este camino.

Agradecimientos

Gracias a todas las personas que fueron participes del proceso de esta tesis, todos fueron muy valiosos en este tránsito por Argentina. A mi Director, **FUnrein**, el picociano mayor que me brindó la oportunidad de aprender de este mundo microscópico, gracias por esa paciencia y toda esa transferencia horizontal de conocimiento, por esas llamadas interminables para ajustar un citómetro y por la cantidad de experimentos que soñamos hacer y no nos alcanzó el tiempo para llevarlos a cabo. A **Pau Huber**, siempre dispuesta a ayudarme en todos los aspectos de mi tesis, ¡incluso los que yo desconocía!, gracias Pauchis por darme ese toque de confianza y valor siempre a lo que te decía. A **Marce** por ponerse la 10 y ayudarme en esta última etapa con el proceso de la secuenciación, gracias mil por el esfuerzo. A **Sebas** por la disposición siempre para plantear nuevos proyectos y por la ayuda con las secuencias de mis cultivos. A todo el **Aguas Team, Horacio, Leito, Pauli, Na, Pepe, Manu**, por la compañía, el apoyo y las discusiones que pudimos armar alrededor de un mate o un café en mi caso. A **Mari Llames**, mil gracias por ese apoyo estadístico y por esas discusiones alrededor de los resultados, donde nos recordabas siempre, no olvidar el sentido biológico de todo. A **Vi** por todo, sus enseñanzas y capacitaciones citométricas, por la confianza depositada a la hora de usar el equipo y por ese apoyo emocional en este último tiempo. ¡A Mis amigos **Robertito y Marianita**, ustedes son todo lo que está bien! Me quedo corta cuando les digo que sin ustedes esto no habría sido posible. Gracias **Robertito** por hacer ameno el ambiente en el labo, por tu inmenso apoyo laboral y psicológico también, por esas entradas a la laguna a toda velocidad y por las mil y una historias que compartimos, ahora vas a tener que traer el agua calidad “A” vos!. **Marianita**, gracias mil por todo, las cenitas, las salidas, los experimentos fallidos y los exitosos también, las horas que pasamos en el citómetro y las que pasamos en cursos y reuniones, las horas de chisme contando en el micro o simplemente escuchando los mejores temas de los 90’s y 00’s, los tereres (pero los de verdad!) y los matecitos en invierno para calentar el alma ah y por supuesto, esos abrazos en los momentos justos para levantarnos.

A los amigos y compañeros queridos que deja este doctorado, jamás en mi vida pensé conocer tantas personas tan bellas, **Maricota, Ro, Estef, Nagif, Di, Melisinha** y a mi roomie la mexicana más bella **Mar**, que hicimos click! desde el primer día que tuvimos que compartir habitación en la residencia, gracias por esos años de convivencia y compañía, de ese compartir de recetas colombo-mexicanas, dietas, salidas, uno que otro trago o dos como mucho! y la interminable lista de memes que nos definen; esas lloradas y carcajadas alrededor de una peli, de un libro o de un chisme, gracias por cuidarme y avisarme a qué hora llegabas siempre.

A ese combo **chasco-colombiano, Compi, Diana, Jony, Anita, Eze** (que es argentino con corazón colombiano) y **Santiaguito** que cuando lo conocí pensé que era argentino, un amigo con un corazón enorme, claramente el más chimbita, gracias por esa compañía, por esas comidas que nos acercaban a nuestra tierrita y por esos asaditos que nos sacaron de la monotonía siempre. A **Lui Arias**, gracias por estar siempre ahí, dispuesta a escuchar, por mostrarme lo más lindo de chasco y por esas tardes de filosofía resonante que siempre teníamos, donde planeamos nuestras futuras vidas con planes b, c, d y creo que no alcanzamos a llegar al z, pero con una tarde de café muy colombiano seguro lo sacamos. La amichis **Lui Mendoza** que llegó de ultimas, pero arrasando, gracias por esas birritas, por ese humor picantoso que te caracteriza y por ese hermoso mimo que fue tenerlas como contención en momentos complicados a vos y a **Anita** también gracias.

A los amigos que me fue regalando la vida, a esos que, como yo, vienen de por allá lejos a estudiar, a soñar, a investigar, **la In y el Yeye**, gracias por los mil y un debates (polémicos o no) alrededor de una costumbre argentina o colombiana, por filosofar en el jacuzzi sobre los placeres de la vida, por enseñarme a disfrutar este camino y por recargarme siempre de amor.

A mis besties, **Kekita** que desde que la biología nos unió, hemos compartido las alegrías y decepciones de la otra como si fueran propios, a medida que pasa el tiempo me doy cuenta que no necesitamos hablar mucho para saber que estamos ahí para la otra, sin duda ese apoyo y esa admiración mutua es invaluable. ¡A **Xavier**, que desde chiquitos hemos alentado esa parte significativa del otro, él con

su arte y con la duda chispeante que lo caracteriza siempre me hace quererlo y admirarlo más!, y bueno a pesar de que no le compartía las tareas en el colegio, aprendimos a compartir la vida lejos pero nunca distantes, a los dos los amo por estar siempre ahí.

A mi familia, a **Chubis** que me acompaña en el corazón siempre, a **Mi Julia** que me dió las alas, herramientas y amor profundo para llegar hasta aquí, a mi **hermanito** incondicional, que un día me dijo que siempre se termina lo que se empieza, y bueno aquí estamos, a los dos gracias por esa combinación de amor y presión, son mi motor. A mi **Papá** por querer adentrarse cada día más y ser parte de mi vida, a **Carito, Francis, Lau, Juanjo** y mi sobri **Mari** que me ha dado la oportunidad de ser su amiguita y darle el apoyo que ella se merece, los amo inmensamente, gracias por el amor y el apoyo incondicional. Por último, pero no menos importante a mi amor **Andrés**, con quien he transitado la vida llena de aventuras y desventuras también, quien ha sido parte fundamental de todo esto porque conoce cada etapa, porque estuvo conmigo en cada risa y cada lagrima, sin él, sin su pasión por la ciencia, sin su apoyo y amor constante, esto no habría llegado a su fin, gracias por compartir la vida conmigo.

A toda la **comunidad INTECH**, a mi consejera de estudios la Dra. **Irina Izaguirre**, a la **comisión evaluadora de la UBA** y a los **jurados** de esta tesis.

Esta tesis fue financiada por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Proyecto PICT 2016-1079 Unrein) y por CONICET (Beca Interna de Finalización).

Índice

RESUMEN GENERAL.....	2
Palabras clave:	2
ABSTRACT.....	3
Dedicatoria.....	5
Agradecimientos	6
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	12
Importancia del picoplancton en las redes tróficas.....	12
El picoplancton autotrófico	14
Métodos de identificación del picoplancton autotrófico	15
Patrones globales de PPP	18
La abundancia de PPP a lo largo de un gradiente trófico	18
La contribución del PPP a lo largo de un gradiente trófico	19
Variación temporal.....	20
PE-Pcy vs. PC-Pcy	21
Pcy vs. Peuk	24
Plasticidad fenotípica en picocianobacterias.....	26
PPP en las lagunas pampeanas	28
La Laguna Chascomús	30
Objetivo general.....	34
Objetivos específicos:	34
CAPÍTULO I.....	35
ANALISIS DE LOS PATRONES DE PRESENCIA Y ABUNDANCIA DEL PICOPLANCTON A NIVEL GLOBAL.....	35
Introducción.....	36
Objetivo	45
Metodología	46
Variación temporal.....	51
Análisis de datos.....	51
Resultados y Discusión.....	53
Base de datos.....	53
PPP en función de la clorofila-a.....	61

Relación PC- y PE- Pcy con la transparencia (Kd)	70
Patrón Temporal de Pcy	72
Conclusiones.....	75
CAPÍTULO II: PARTE I.....	76
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PICOEUCARIOTAS FOTOSINTÉTICOS	76
Introducción.....	77
La separación celular.....	77
El aislamiento en medio de cultivo sólido	78
Objetivo.....	80
Materiales y Métodos	81
Resultados	84
CAPITULO II: PARTE II	94
EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ Y LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DE PICOCIANOBACTERIAS Y PICOEUCARIOTAS	94
Introducción.....	95
Objetivo.....	97
Materiales y Métodos	98
Condiciones de cultivo y diseño experimental	98
Citometría de flujo.....	100
Análisis de datos.....	101
Resultados	103
Revisión bibliográfica	107
Discusión	114
Conclusiones.....	121
CAPITULO III: PARTE I	123
DEPREDACIÓN DE ROTÍFEROS Y CLADÓCEROS SOBRE PICOCIANOBACTERIAS	123
.....	<i>Error! Marcador no definido.</i>
Introducción.....	124

Objetivo	126
Materiales y métodos	126
Condiciones de cultivos	126
Experimentos de depredación	126
Análisis de datos.....	128
Resultados	129
Discusión	130
CAPITULO III: PARTE II.....	132
EFFECTO DE DISTINTOS DEPREDADORES SOBRE LA PLASTICIDAD	
FENOTÍPICA DE LAS PICOCIANOBACTERIAS	132
Introducción.....	133
Objetivos	136
Materiales y Métodos	137
Condiciones de cultivo y aislamiento de cepas.....	137
Experimento con la comunidad planctónica natural y contacto directo presa-depredador	138
Recuento de microorganismos	139
Experimento con una cepa de Pcy (CH40) y contacto indirecto presa-depredador	143
Análisis de datos.....	144
Resultados	146
Experimento con la comunidad planctónica natural y el contacto directo presa-depredador	146
Experimento con una cepa de Pcy y con contacto indirecto presa-depredador	152
Discusión	155
Conclusiones.....	162
CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	163
Bibliografia	167

INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia del picoplancton en las redes tróficas

La estructura trófica de una comunidad hace referencia a diferentes vías por las cuales la energía es transferida y los nutrientes son ciclados a través de todos los niveles tróficos de la comunidad (Wetzel, 2001). En los sistemas acuáticos los microorganismos juegan un papel central en la captación y transferencia de materia y energía a través de las tramas trófica.

Tradicionalmente, la visión más antigua de las cadenas tróficas, sugería que la base estaba representada por el fitoplancton, el cual era consumido por los consumidores primarios como el zooplancton, mientras que los consumidores secundarios y terciarios serían los organismos más grandes como los peces que se alimentaban del zooplancton, formando así una cadena lineal. En este esquema, los microorganismos tales como las bacterias eran consideradas simplemente remineralizadoras, encargadas de convertir la materia orgánica en inorgánica y reciclar los nutrientes (Pomeroy, 1974).

Durante la década del 80', los microorganismos tomaron relevancia como grandes activadores de energía y materiales a causa de su alta tasa metabólica por unidad de área (Pomeroy, 1984). Azam et al. (1983) introducen el concepto del bucle microbiano (*microbial loop*) a través del cual, cantidades significativas de materia orgánica disuelta (MOD) son producidas o procesadas a través de organismos procariotas y eucariotas muy pequeños. La MOD liberada al medio por las algas o a través de la digestión, defecación y excreción a lo largo de toda la trama trófica (Webb & Johannes, 1967, Corner & Davies, 1971), es aprovechada por las bacterias de vida libre que la consumen y de esta forma es reincorporada a la trama trófica, la cual de otra forma se perdería (Fuhrman, 1992; Williams & Ducklow, 2019). Los flagelados heterótrofos depredan sobre bacterias heterótrofas (BH), los que a su vez son consumidos por los ciliados y zooplancton de pequeño tamaño. De esta forma se demostró que gran parte del carbono y otros nutrientes,

originalmente capturados en forma disuelta, fluyen a través de esta vía heterotrófica y se reincorporan en la red trófica distribuyéndose hacia los niveles tróficos superiores, llegando finalmente a los peces (Fig. 1). Más recientemente, se demostró que los virus también son relevantes como otro mecanismo de liberación de MOD, mediante la lisis viral de bacterias heterotróficas y cianobacterias pequeñas denominado *viral shunt* o desviación viral (Wilhelm & Matteson, 2008). La comunidad planctónica a menudo es clasificada por tamaño o por el tamaño del poro de la red que se usa para recolectar una muestra de agua. La clasificación sugerida por Sieburth et al. (1978) es la más utilizada actualmente, y divide a los organismos planctónicos de manera logarítmica en diferentes categorías: picoplancton, células de 0,2-2,0 μm de diámetro; nanoplancton, células de 2,0 a 20 μm de diámetro, y microplancton, células de 20-200 μm de diámetro (Porter et al., 1985) (Fig. 1).

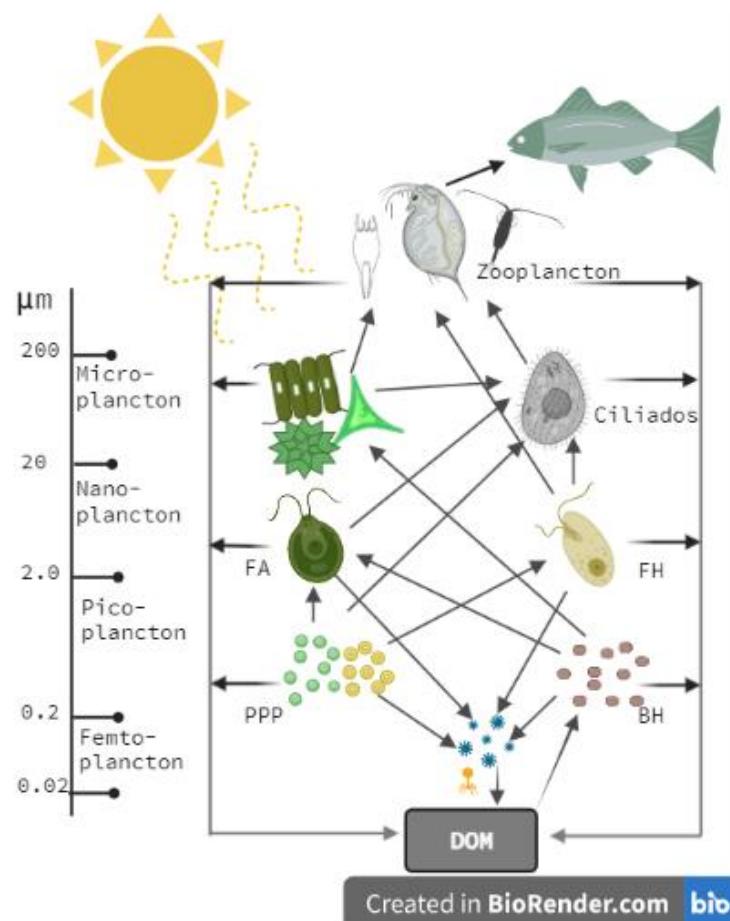


Figura 1. Diagrama de la red trófica actual y clasificación de Sieburth et al. (1978) (Izquierda). PPP: picoplancton autotrófico, BH: bacterias heterótrofas, FA: Flagelados autótrofos, FH: Flagelados heterótrofos.

El picoplancton autotrófico

Dentro del fitoplancton, el picoplancton fotosintético (o PPP, por sus siglas en inglés *photosynthetic picoplankton*) es la fracción más pequeña. Estos microorganismos son ubicuos, se encuentran en todo tipo de cuerpos de agua tanto marinos como continentales y de estado trófico variable (Stockner & Antia, 1986, Stockner, 1991; Somogyi et al., 2009; Peltomaa & Ojala, 2012; Callieri, 2017; Callieri et al., 2022), y son responsables de una gran parte de la fijación del carbono realizado por el fitoplancton. Algunas estimaciones sugieren que entre el 50 y el 70% del carbono fijado por el fitoplancton anualmente a nivel mundial es atribuido a estos microorganismos, presentando en algunos casos contribuciones de hasta el 90% de la biomasa fotoautotrófica (Craig, 1984; Porter et al., 1985; Stockner & Antia, 1986; Fahnenstiel et al., 1986; Søndergaard, 1991; Camacho et al., 2003; Callieri, 2008; Sánchez-Baracaldo et al., 2008; Camacho et al., 2009; Callieri, 2017). Además, debido a su pequeño tamaño, el PPP es depredado por los mismos depredadores que las BH (Porter et al., 1985).

El PPP está compuesto por cianobacterias cocoides, mayormente del orden Synechococcales (picocianobacterias, Pcy), y por algas eucariotas picoplanctónicas o picoeucariotas (Peuk). Las Pcy suelen separarse en dos grandes grupos dependiendo de su composición pigmentaria, pudiéndose diferenciar aquellas que tienen como pigmento accesorio dominante la ficoeritrina (PE-Pcy) o aquellas ricas en ficocianina (PC-Pcy) (Callieri, 2008). Además, en los océanos tropicales y subtropicales se pueden encontrar *Prochlorococcus* que corresponde a un género de cianobacterias exclusivamente marinas que no poseen ficobilinas, y que presentan otros pigmentos accesorios como la divinil clorofila-a y -b (Biller et al., 2015). Las Peuk son un grupo heterogéneo que abarcan diferentes linajes de

eucariotas fotosintéticos, tales como Trebouxiophyceae, Chlorophyceae, Bacillariophyceae, entre otros (Stockner & Antia, 1986; Padisák et al., 1997; Raven, 1998; Díez et al., 2001; Not et al., 2004; Metz et al., 2019).

Debido a su pequeño tamaño, las algas picoplanctónicas poseen algunas ventajas en relación a otros organismos fitoplanctónicos. Por un lado, les confiere mayor flotabilidad ya que la velocidad de hundimiento, de acuerdo a la ley de Stokes, es muy reducida (Reynolds, 1999). Por otro lado, son más eficientes en la toma de nutrientes disueltos en concentraciones muy bajas debido a su elevada relación superficie: volumen. Además, la absorción de la luz tiende a ser más eficiente en células pequeñas (Fogg, 1986; Raven, 1986; Weisse, 1993).

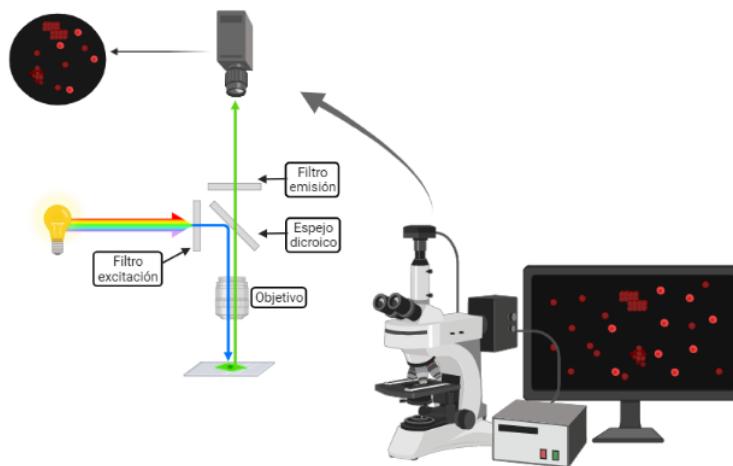
El picoplancton presenta densidades que abarcan un rango desde 10^2 a 10^8 células por mililitro. Presentando abundancias muy variables dependiendo del ambiente y cuyos promedios rondan alrededor de 10^6 BH mL $^{-1}$, 10^4 Pcy mL $^{-1}$ y 10^3 Peuk mL $^{-1}$ (Weisse, 1993; Fogg, 1995; Marshall 2002; Somogyi et al., 2009; Callieri 2010; Palfy et al., 2014; Callieri 2017; Somogyi et al., 2022).

Métodos de identificación del picoplancton autotrófico

Hasta principios de la década del '80 los recuentos de microorganismos tan pequeños como el picoplancton habían sido subestimados debido a una limitación metodológica. El advenimiento de técnicas como la microscopía de epifluorescencia y la citometría de flujo, para la enumeración de células diminutas suspendidas permitió a los investigadores cuantificar de forma más precisa estos microorganismos, incluyendo las Pcy y Peuk (Johnson & Sieburth, 1982; Chisholm et al., 1988; Weisse, 1993; Callieri, 2008).

La microscopía de epifluorescencia se basa en la excitación y emisión de luz por compuestos fluorescentes (Fig. 2), tales como algunos pigmentos fotosintéticos (e.g. clorofila-a, ficocianina, ficoeritrina), u otros colorantes utilizados para la tinción de ciertas estructuras, como el DAPI que tiñe ADN (Porter & Feig, 1980; Callieri, 2008). De esta forma, es posible identificar y cuantificar diferentes componentes del

picoplancton en base a su composición de pigmentos. La excitación con luz azul, permite observar los cloroplastos de las Peuk que fluorescen rojos debido a la autofluorescencia de la clorofila-a. Asimismo, las PE-Pcy se observan amarillas debido a la fluorescencia conjunta de diferentes ficobilinas con la clorofila-a, en tanto que las PC-Pcy se visualizan de un color rojo oscuro.



Created in BioRender.com 

Figura 2. Esquema de funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia.

La citometría de flujo fue desarrollada con el objetivo de hacer más eficiente y rápida la cuantificación de células y microorganismos en suspensión. Además de cuantificar distintos tipos de células, esta técnica permite analizar diversas propiedades celulares. El principio se basa en que las células que viajan a través de un flujo presurizado son interceptadas por una fuente de luz y éstas dispersan la luz y además emiten fluorescencia la cual es captada por diferentes detectores. Esto permite obtener información sobre el tamaño de la célula y la fluorescencia emitida ya sea por pigmentos propios de la célula (clorofila-a, ficoeritrina o ficocianina) o por sondas fluorescentes utilizadas que se adhieren a los componentes de las células (SybrGreen, Lysotracker, entre otros) (Gasol & Morán, 2015; Crosbie et al., 2003a). La principal ventaja de esta técnica es que consigue analizar una gran cantidad de

células en solo unos minutos, permitiendo así procesar muchísimas muestras en muy poco tiempo. Mientras que la principal desventaja radica en la poca resolución morfológica de las células contadas (Fig. 3).

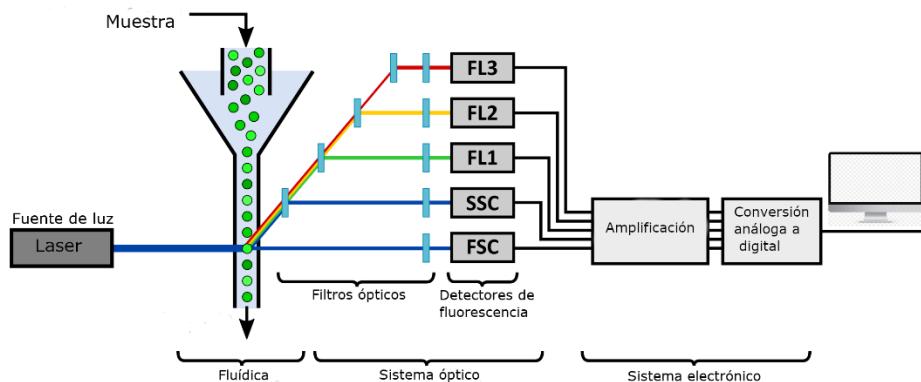


Figura 3. Esquema del funcionamiento de un citómetro. Imagen modificada de <https://www.aatbio.com/resources/assaywise/2019-8-1/fundamentals-of-flow-cytometry>.

La separación celular o *cell-sorting* por citometría de flujo es una técnica que permite seleccionar partículas individuales de interés y colectarlas en un recipiente de recolección. Esto se consigue al aplicar una ligera vibración en la boquilla que genera microgotas regulares conteniendo una célula dentro de cada gota (Ibrahim & van den Engh, 2007). Luego de pasar por el punto de intersección del láser las gotas que contienen células de la población de interés son cargadas con una carga eléctrica, posteriormente son desviadas por un campo eléctrico y finalmente son recolectadas en un vial. El uso de esta técnica ha permitido explorar nuevos protocolos para el aislamiento de microorganismos mediante la separación de poblaciones de células de un tamaño y fluorescencia específica de una forma más eficiente (Davey & Kell, 1996; Kaprelyants et al., 1996; Marie et al., 2017).

El auge de la biología molecular en la ecología microbiana durante las últimas décadas permitió ahondar en la clasificación y análisis de la diversidad del PPP, obteniendo información genética directamente de muestras ambientales. En particular, la secuenciación de los genes que codifican para el ADN ribosomal de la

subunidad pequeña del ribosoma, 16S para procariotas y 18S para eucariotas, ha permitido conocer e identificar distintos clados filogenéticos que componen las comunidades de PPP. El gen 18S ARNr está compuesto por alrededor de 1800 nucleótidos mientras que el 16S ARNr aproximadamente por 1500. Estos genes, que se encuentran universalmente distribuidos en todos los organismos, presentan regiones hipervariables de rápida evolución y otras muy conservadas lo cual permite identificar organismos a distintos niveles taxonómicos.

Patrones globales de PPP

La abundancia de PPP a lo largo de un gradiente trófico

Diversos estudios muestran que la abundancia PPP tiende a aumentar a medida que se incrementa el estado trófico. Esta tendencia fue observada tanto en el océano (Fogg, 1986; Stockner & Antia, 1986; Stockner, 1988; Bell & Kalff, 2001), como en grandes lagos (Caron et al., 1985; Stockner, 1988; Søndergaard, 1990; Callieri & Stockner, 2000), y en lagunas someras (Mózes et al., 2006; Vörös et al., 1991, 1998; Bec et al., 2011; Somogyi et al., 2022). Stockner (1991) compiló datos sobre la abundancia del PPP y características físico-químicas como temperatura, nutrientes y luz, de distintos tipos de lagos estratificados de Canadá, lago Baikal en Rusia, lagos de nueva Zelanda y lagos daneses (Burns & Stockner, 1991; Søndergaard, 1991; Stockner & Shortreed, 1991), y observó una fuerte relación positiva entre la abundancia del PPP y el estado trófico (fosforo total). Más recientemente (Callieri, 2008) adicionó datos de lagos ultraoligotróficos patagónicos (Callieri et al., 2007) a los originalmente recopilados por Vörös et al. (1998), confirmando la tendencia observada hasta ese momento. Si bien existe una gran dispersión, la abundancia promedio del PPP en ambientes más oligotróficos fluctúa alrededor de 10^4 células mL⁻¹, mientras que en los ambientes más productivos puede llegar a 10^7 células mL⁻¹. En el extremo eutrófico, sin embargo, la abundancia es mucho más variable pudiendo presentar valores $<10^4$ hasta $>10^7$ células mL⁻¹, es decir que varía en más de 3 órdenes de magnitud.

La contribución del PPP a lo largo de un gradiente trófico

Mientras que la abundancia absoluta tiende a aumentar a lo largo de un gradiente trófico, la contribución relativa del PPP a la biomasa total de fitoplancton tiende a disminuir. Søndergaard (1991) observó, en un estudio realizado en 7 lagos daneses que representaban un gradiente trófico (i.e. la concentración de clorofila varió entre 1 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$), que la contribución relativa del PPP fue más elevada en ambientes oligotróficos, disminuyendo a medida que aumentaba la productividad en los ambientes. A su vez, esta misma idea también fue desarrollada por diversos autores (Bell & Kalff, 2001; Callieri, 2008; Stockner, 1991; Stockner & Antia, 1986; Stockner & Shortreed, 1991; Vörös et al., 1991; Vörös et al. 2009; Bec et al. 2011) quienes observaron el mismo fenómeno de disminución de la contribución a la biomasa total y a la producción primaria a medida que aumenta el pH, la conductividad y, en especial, el grado trófico.

La contribución del PPP a la biomasa total de fitoplancton puede ser por lo tanto muy variable, desde menos del 1% a más del 50%. A modo de ejemplo, en 4 lagos de Alemania la contribución promedio fue de 9% (Hepperle & Krienitz, 2001), así como Søndergaard (1991) encontró una contribución promedio del PPP a la clorofila-a total de 5 a 8% en lagos meso a oligotróficos, y de manera similar para los lagos Michigan y Huron los cuales no superaron el 8% de la contribución a la biomasa total (Fahnenstiel et al., 1991). Si bien la tendencia general parece cumplirse, también se observó que en algunos ambientes muy productivos la contribución del PPP a la biomasa total puede ser muy elevada, llegando a 30% (Carrick & Schelske, 1997), o inclusive superando el 50% (Vörös et al., 1991). Stockner (1991) ya sugería hace tres décadas atrás que en ambientes extremadamente productivos y turbios la tendencia general podría revertirse. Más recientemente, (Somogyi et al., 2017) observaron que en el extremo eutrófico del gradiente la importancia relativa del PPP estaría determinada por la cantidad de material inorgánico en suspensión: a concentraciones mayores a 50 mg L^{-1} la tendencia general no se cumple, y el PPP cobra mayor relevancia de la esperada. Estos autores hipotetizan que este comportamiento del PPP en sitios altamente

turbios serían el resultado de la drástica disminución de la intensidad de luz en la columna de agua o de una reducción en la presión de depredación debida a la enorme carga de partículas inorgánicas en suspensión.

Variación temporal

La abundancia del PPP en lagos templados oligo-mesotróficos usualmente presenta un patrón temporal bimodal, con dos picos de máxima abundancia a lo largo del año relacionados con los ciclos de estratificación y mezcla de la columna de agua (Stockner et al., 2000). Por ejemplo, en el lago Constanza (Europa), se han reportado incrementos en la abundancia de PPP a medida que aumenta la temperatura del agua (Weisse & Kenter, 1991). Las PPP (dominadas generalmente por Pcy) alcanzan su primer pico en abril (primavera), seguido de un segundo pico en agosto (verano tardío), con un período intermitente de baja concentración lo cual se relaciona con una respuesta al exceso de pastoreo por parte del zooplancton (Weisse, 1988; Weisse & Kenter, 1991). Este patrón bimodal también fue reportado para el lago Maggiore, algunos lagos daneses, lago Stechlin y lagos del noreste de Inglaterra (Callieri & Piscia, 2002; Hawley & Whitton, 1991; Padisák et al., 1997; Søndergaard, 1991; Stockner et al., 2000; Vörös et al., 1998; Nwosu et al., 2021), aunque también se observó que los dos picos no siempre son claros. La variabilidad interanual estaría relacionada con las condiciones climáticas que causan diferencias en los regímenes de mezcla primaverales, y en la estabilidad de la columna de agua (Weisse, 1993).

Otros estudios como los de Fahnenstiel et al. (1991) en los lagos Huron y Michigan en Norteamérica, Pick & Agbeti (1991) en 5 lagos de oligo- a mesotróficos en Canadá, el lago Ontario (Caron et al., 2004) y en el lago mesotrófico Biwa en Japón (Nakano et al., 1996) reportaron sus máximos de abundancia del PPP en verano, mostrando también una relación directa con la temperatura.

En el caso de los lagos someros la morfometría no es un factor determinante, sino que otros factores tales como el estado trófico (Søndergaard, 1991; Stockner, 1991), la altitud, las condiciones de óxido-reducción y la presencia o no de sustancias húmicas (Callieri et al., 2012), serían más relevantes. En estos

ambientes típicamente polimicticos, se ha observado una marcada dinámica estacional dentro del PPP, donde las Pcy predominan en épocas estivales de mayor temperatura y las Peuk tienden a dominar en el invierno (Callieri, 2008; Mózes et al., 2006; Somogyi et al., 2009; Vörös et al. 2009). Las preferencias de las cianobacterias por temperaturas elevadas podrían explicar este patrón (Robarts & Zohary, 1987). Mientras que la mayor abundancia de Peuk durante el invierno, según Somogyi et al., (2009) y Vörös et al. (2009), podría sugerir que las Peuk estarían mejor adaptadas que las Pcy a condiciones de bajas intensidades de luz y temperatura.

En los lagos tropicales el PPP está dominado por Pcy y presenta un patrón estacional particular ya que siempre se encuentran en abundancias muy elevadas (10^5 - 10^6 células mL^{-1}) a lo largo de todo el año, con pequeñas variaciones relacionadas con las épocas de lluvia o sequía típicas de las regiones ecuatoriales (Peštová et al., 2008; Sarmento, 2012; Sarmento et al., 2008).

PE-Pcy vs. PC-Pcy

Como se mencionó en la descripción del PPP, las Pcy se pueden distinguir de acuerdo a su pigmento accesorio dominante: Pcy ricas en ficoeritrina (PE) o ricas en ficocianina (PC) (Ernst, 1991). La PE posee un pico de absorción en ~560 nm siendo por lo tanto muy eficiente en la absorción de la luz verde, mientras que la PC posee su máximo de absorción en ~625 nm absorbiendo eficazmente la luz naranja-roja (Callieri et al., 1996; Haverkamp et al., 2008). Como se verá más adelante, estas diferencias le otorgan a cada tipo de Pcy características únicas que les permiten ocupar nichos ecológicos distintos.

La composición espectral de la luz en los sistemas acuáticos está determinada por la atenuación de la luz debida a la molécula de agua y a los componentes particulados y disueltos en ella (Stomp et al., 2007a; Haverkamp et al., 2008; Kirk, 1994). La reducción de la intensidad de la luz debida a la absorción y refracción de ésta se conoce como atenuación vertical de la luz y se mide con el coeficiente K_d , el cual si es muy alto indica que la luz es absorbida rápidamente y el gradiente de luz vertical en el agua es más pronunciado. En tanto que la cantidad

de luz que pasa a través del agua se le conoce como transmisión de la luz. Cada longitud de onda penetra de manera diferente a través del agua, y por lo tanto tienen distinto K_d , es decir, que existe una absorción diferencial de la luz a diferentes profundidades (Lampert & Sommer, 2007). Dentro del espectro de la luz visible o PAR (de sus siglas en inglés *Photosynthetic Active Radiation*), el agua absorbe mayormente en la región del rojo (600-700 nm) permitiendo que las longitudes de onda más cortas (i.e. azul) penetren a mayor profundidad, mientras que la materia orgánica disuelta (MOD) y el seston serían los responsables de la rápida atenuación de longitudes de onda más cortas (400-500 nm) permitiendo que la luz roja tenga mayor transmisión (Fig. 4). En lagos oligotróficos donde la concentración del seston y MOD son bajas las longitudes de onda <500 nm (azul) predominan en la columna de agua, mientras que en lagos eutróficos donde la luz azul es rápidamente absorbida debida a la elevada concentración de material particulado y disuelto, las longitudes de onda predominantes en la columna de agua son >600 nm (rojo) (Stomp et al., 2007a) . En condiciones intermedias como la mayoría de los lagos mesotróficos y las zonas costeras de los océanos, las longitudes de onda predominantes en la columna de agua se encuentran alrededor de 500-600 nm (verde-amarillo).

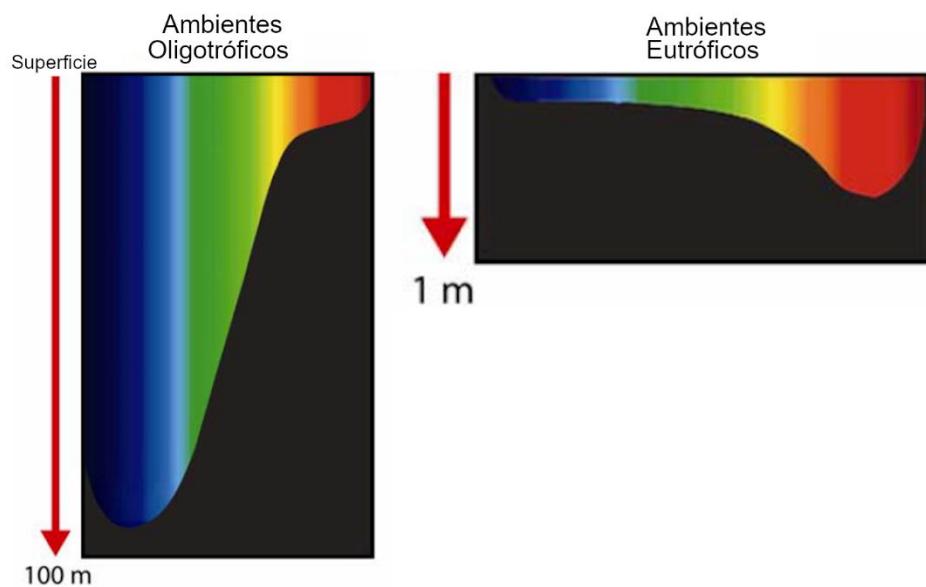


Figura 4. Absorción de luz de acuerdo al estado trófico de distintos ambientes. El esquema de la izquierda representa lagos oligotróficos profundos o el océano,

mientas que el de la derecha representa lagos pocos profundos y eutróficos. Modificado de (Stomp, 2008)

Los lagos oligotróficos claros y profundos están dominados principalmente por PE-Pcy (Callieri, 2008; Camacho et al., 2003; Pick, 1991; Stomp et al., 2007b; Vörös et al., 1998) como es el caso de los lagos subalpinos, el lago Baikal, o los lagos glaciarios de la Patagonia, en donde se encontró que las PE-Pcy forman un máximo de clorofila profundo o DCM (por sus siglas en inglés *Deep Chlorophyll Maximum*) en la base de la zona eufótica (Callieri et al., 2007; Pérez et al., 2002). Por el contrario, las PC-Pcy dominan en lagos poco profundos y eutróficos (Callieri et al., 1996; Mózes et al., 2006; Sommaruga & Robarts, 1997; Vörös et al., 1998). Este patrón está claramente relacionado a una adaptación cromática de las Pcy a las características espectrales y la calidad de la luz de los lagos (Callieri et al., 2012; Callieri & Stockner, 2000; Pick, 1991; Sommaruga & Robarts, 1997). En este sentido, las PE-Pcy dominan en sitios donde el coeficiente de extinción de la luz roja es alto, es decir que la proporción $Kd_{rojo}/Kd_{verde} > 1$, mientras que las PC-Pcy dominan en ambientes turbios con mayor concentración de partículas, donde la luz verde se extingue más rápidamente favoreciendo la penetración relativa de la luz roja a mayor profundidad, es decir $Kd_{rojo}/Kd_{verde} < 1$ (Fig. 5) (Huber et al., 2017; Stomp et al., 2007b; Vörös et al., 1998). Asimismo, evidencias experimentales demostraron que la distinta utilización del espectro lumínico permite la coexistencia de cepas de PE-Pcy y PC-Pcy en condiciones intermedias (Stomp et al., 2004, 2007b). Este patrón de coexistencia entre ambas cepas, también se ha observado en el océano (Campbell & Vaulot, 1993; Platt et al., 1983) y en ambientes de turbidez intermedia (Katano et al., 2005; Mózes et al., 2006; Pick, 1991).

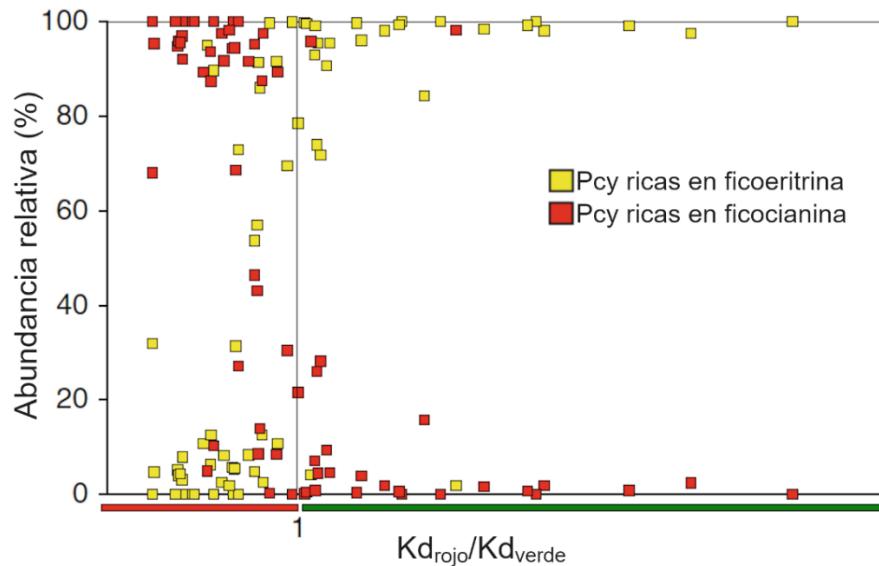


Figura 5. Abundancias relativas de PE-Pcy y PC-Pcy en diferentes sistemas de agua dulce en relación con el clima óptico expresado como la relación entre el Kd de longitudes de ondas rojas y verdes (Kd_{red}/Kd_{green}). Modificado de Callieri et al., (2012).

Pcy vs. Peuk

La diferencia más evidente que existe entre los distintos componentes del PPP es el nivel de organización interno de la célula, ya que si bien todas realizan fotosíntesis oxigénica las Pcy son procariotas y las Peuk son eucariotas. Weisse (1993) sostiene que esta diferencia a nivel estructural debería tener consecuencias a nivel ecológico, ya que comparado con las células procariotas las eucariotas deben destinar una gran fracción de su metabolismo interno a procesos de mantenimiento.

Una característica bien estudiada de las Pcy es que alcanzan las tasas máximas de crecimiento con irradiancias relativamente bajas (Callieri et al., 2005; Fogg, 1986; Jasser, 2006), además se observó que pueden crecer bajo la sombra de otros organismos fitoplanctónicos, mientras que para muchos eucariotas esto resulta desfavorable (Jasser, 2006). En relación a la calidad de luz, si bien el trabajo

llevado a cabo por Stomp et al., (2007a) muestra una clara diferenciación de nicho lumínico entre las PE-Pcy y las PC-Pcy, aun no existen estudios que incorporen a las Peuk en este gradiente lumínico. De hecho, las evidencias existentes son en cierta medida contradictorias.

Wood (1985) y Glover et al. (1986) demostraron que a longitudes de onda corta las cepas de eucariotas son fotosintéticamente más eficiente que cepas de *Synechococcus* PE-Pcy. Resultados similares fueron obtenidos más recientemente por (Luimstra et al., 2018) comparando la eficiencia fotosintética de la Chlorophyta *Chlorella sorokiniana* (Peuk) con una cepa de *Synechococcus* (Pcy). Los resultados de estos autores sugieren que la menor eficiencia de las Pcy se debe a un desbalance entre los fotosistemas I y el II (PSI y PSII por sus siglas en inglés *Photosystem I y II*), ya que el PSI contiene más moléculas de clorofila-a que el PSII al cual se asocian los complejos multiprotéicos de ficobilisomas con PC y PE. Por consiguiente, al irradiar con luz azul, los ficobilisomas asociados al PSII absorberían pocos fotones en comparación con el PSI que sí absorbería a través de la clorofila-a, produciendo así un desbalance que reprime la cadena lineal de transporte de electrones, lo que en definitiva se traduce en una menor eficiencia fotosintética. Como consecuencia de esto, ante una situación de competencia por luz, la Peuk gana en relación a la PC-Pcy cuando se irradia con luz azul (450 nm), mientras que cuando se irradia con luz roja (660 nm) se observa el patrón opuesto (Luimstra et al., 2020).

Por otro lado, y contradiciendo los resultados de Glover et al. (1986) y Luimstra et al. (2018, 2020), experimentos llevados a cabo por Somogyi et al. (2016) sugieren que a longitudes de onda más largas (690 nm) las cepas de Peuk serían más eficientes en la captación de la luz que las PC-Pcy. En concordancia con estos resultados, algunos estudios realizados en ambientes naturales apoyan la idea de que las Peuk predominarían por sobre las Pcy en sitios eutróficos y someros (Callieri, 2008; Craig, 1987; Pick & Agbeti, 1991; Schiaffino et al., 2013; Søndergaard, 1991). Estas diferencias podrían deberse tanto a diferencias en las condiciones experimentales o del tipo de organismos utilizados para representar

cada grupo. Hasta el momento no existe una explicación para estas evidencias contradictorias. Esta incógnita será parcialmente abordada en la presente Tesis.

Plasticidad fenotípica en picocianobacterias

De acuerdo al estudio polifacético realizado por Komárek et al. (2014), combinando análisis morfológicos y moleculares, las cianobacterias podrían agruparse en ocho órdenes o clados principales. En particular las Pcy se agrupan en su mayoría dentro de la familia *Synechococcaceae* perteneciente al orden *Synechococcales*, cuya característica morfológica distintiva es que poseen tilacoides parietales y la división celular es en un solo plano. Dentro de este clado se agrupan diversos géneros tales como *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, *Cyanobium* y *Cyanodictyon* (Sánchez-Baracaldo et al., 2005), aunque la validez taxonómica de estos géneros está muy cuestionada. Por ejemplo, el género *Synechococcus* de agua dulce se ha demostrado que es un género polifilético y no puede considerarse un taxón natural (Robertson et al., 2001; Urbach et al., 1998). Estudios más recientes sobre filogenia de Pcy identificaron 12 clados dentro de las *Synechococcaceae* (Huber, 2017), de los cuales 8 corresponden a clados nuevos identificados por Huber (2017). El estudio de este grupo de organismos, aun claramente subexplorado, demuestra que los ecosistemas de agua dulce son un reservorio de biodiversidad de Pcy.

Es interesante mencionar que dentro de la familia *Synechococcaceae* los géneros *Cyanodictyon* y *Anathece* son coloniales, mientras que *Cyanobium* y *Synechococcus* son unicelulares. Sin embargo, no se observa una segregación entre cepas unicelulares y celulares en el árbol filogenético (Huber, 2017). De hecho, Komárek et al. (2014) menciona que varios de estos géneros fueron descriptos originalmente en base a la forma de sus colonias y mucílago, el cual desaparece rápidamente en condiciones de cultivo, lo que estaría indicando que la presencia de mucílago es un carácter facultativo dentro de este grupo.

En ambientes naturales, las Pcy unicelulares coexisten con microagregados o colonias (CPcy) de células idénticas morfológicamente a las Pcy unicelulares pero embebidas en un mucílago. Las CPcy pueden o no tener una forma definida y se presentan en agregados de 4 a más de 50 células (Callieri & Stockner, 2000; Crosbie et al., 2003a; Komárová & Šimek, 2003; Passoni & Callieri, 2000; Stockner et al., 2000). Algunas de las CPcy más observadas en ambientes de agua dulce han sido clasificadas de acuerdo a su morfología como especies pertenecientes a los géneros *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Coelosphaerium*, *Cyanobium*, *Cyanodictium*, *Merismopedia*, entre otros (Callieri et al., 2012; Komárová, 2002; Passoni & Callieri, 2000).

Las similitudes morfológicas entre las células de Pcy y CPcy junto con las evidencias mencionadas más arriba han llevado a sugerir que muchas de las CPcy podrían ser formas transicionales de morfotipos unicelulares (Callieri et al., 2012), es decir que algunas de las especies unicelulares podrían formar agregados y viceversa. Esta plasticidad fenotípica (i.e. la capacidad de agregación de las Pcy) parecería estar estimulada por diferentes condiciones ambientales (Crosbie et al., 2003b; Komárek et al., 2014), tales como las condiciones lumínicas o la presión de pastoreo. Se ha demostrado por ejemplo que algunas cepas de Pcy tienen la capacidad de formar colonias cuando son expuestas a diferentes condiciones de radiación UV como una respuesta para evitar el fotodaño (Callieri et al., 2011). Mientras que Jezberová & Komárová, (2007) encontraron que algunas Pcy en presencia de un nanoflagelado depredador (*Ochromonas* sp.) tienden a formar agregados incrementando el tamaño efectivo del organismo para evitar la depredación. Resultados similares fueron reportados por (Callieri et al., 2016) utilizando *Poterioochromonas* sp. como depredador.

En bacterias heterótrofas también se encontró que estos cambios morfológicos pueden ser inducidos por una elevada presión del pastoreo (Corno, 2006; Hahn & Höfle, 2001; Matz et al., 2002). El desarrollo de morfotipos resistentes al pastoreo tales como filamentos, formas espiraladas o agregados, parece ser un fenómeno común en ambientes más productivos (Güde, 1989; Jürgens & Güde,

1994) y se puede encontrar en los principales grupos filogenéticos tales como alfa- y beta-Proteobacteria, y Cytophaga-Flavobacterium (Corno & Jürgens, 2006; Jürgens et al., 1999; Šimek et al., 1999; Šimek et al., 2001).

PPP en las lagunas pampeanas

En Argentina, la palabra "pampeana" define un sistema de unidades geológicas cuaternarias que se encuentran en las llanuras entre las latitudes 30 y 38°S. En la región pampeana, los depósitos arenosos fueron reformados por el viento, y gracias a una sucesión de períodos climáticos húmedos y secos se llevó a cabo el desarrollo de un importante sistema de humedales y lagos someros comúnmente denominados lagunas (Iriondo, 1989; Quirós et al., 2002). Se pueden encontrar distintos tipos de lagunas dependiendo de su geomorfología, drenaje, tipo de suelo y vegetación: muchas de ellas tienen origen por deflación eólica, otras por la acción fluvial o por embalsado natural del agua de escorrentía (Quirós et al., 2002; Quirós, 2004). En muchas lagunas el drenaje es endorreico, es decir, es interno y el agua solo puede salir por evaporación o por filtración, esto conlleva a que, en períodos muy húmedos, se produzcan periódicas inundaciones alternándose con períodos de sequía (Sosnovsky & Quirós, 2006).

Las lagunas de la región pampeana son poco profundas, térmicamente se comportan como lagos polimictos cálidos (Lewis, 1983), los cuales rara vez estratifican por más de unas horas. Tienen un tiempo de permanencia de agua y salinidad muy variables (Quirós & Drago, 1999). Su hidrología es dependiente en gran medida de las precipitaciones. Su concentración salina permite clasificarlas en ambientes subsalinos y salinos (Drago & Quiros, 1996; Ringuelet et al., 1967) y en algunos casos, como lagos de agua dulce (Quirós et al., 2002).

Su morfología y ubicación en drenajes con suelos ricos en nutrientes como nitrógeno y fosforo, son algunas de las causas de su estado eutrófico natural y su alta productividad biológica (Lagomarsino et al., 2015; Quiros, 1988; Quirós et al., 2002; Sosnovsky & Quirós, 2006). Aunado a esto, la agricultura intensiva y las

descargas industriales en el sector desde hace varias décadas contribuye a aumentar estas cargas de nutrientes en las lagunas (Sosnovsky & Quirós, 2006).

Los sedimentos principales son limo arenoso, limo y limo arcilloso, con predominancia de sedimentos finos (arcillas y limos) sobre los gruesos (arenas) (Diovisalvi, et al., 2015a). Su poca profundidad favorece la interacción entre los sedimentos y la columna de agua mediante turbulencias impulsadas por el viento.

La mayoría de lagunas pampeanas muestran una marcada estacionalidad en la temperatura, sólidos suspendidos y en las propiedades ópticas (Diovisalvi, et al., 2015a; Pérez et al., 2011; Torremorell et al., 2007) y en la producción primaria (Torremorell et al., 2009). La temperatura del agua puede presentar valores desde 6°C a 25°C (Diovisalvi et al., 2015b; Lagomarsino et al., 2011). La turbidez está dada principalmente por el material en suspensión como el fitoplancton y las partículas no pigmentadas (Lagomarsino et al., 2015; Pérez et al., 2011). En un estudio de Diovisalvi et al. (2015a), donde se compararon las características bióticas y abióticas de las lagunas pampeanas con las de otros lugares del mundo, se reportaron para estas lagunas valores promedio muy elevados de fosforo total (709 $\mu\text{g L}^{-1}$), nitrógeno total (4970 $\mu\text{g L}^{-1}$) y clorofila-a (177 $\mu\text{g L}^{-1}$).

En este tipo de lagunas eutróficas sin limitación por nutrientes, los productores primarios tienden a competir por la luz (Huisman et al., 1999; Reynolds, 2006; Scheffer, 2004). La teoría de estados alternativos desarrollada por Scheffer et al., (1993) sobre lagunas someras establece que estos cuerpos de agua a menudo presentan dos estados de equilibrio posibles: un estado “claro” caracterizado por una alta transparencia, baja biomasa de fitoplancton y con macrófitas como la comunidad autotrófica dominante; y un estado “turbio” caracterizado por baja transparencia debido a una elevada abundancia de fitoplancton y a la ausencia casi total de macrófitas sumergidas. En la región pampeana se pueden encontrar lagunas en ambos estados, aunque la mayoría suelen ser turbias.

Trabajos como los de Torremorell et al. (2007) y Llames et al. (2009) demostraron que en las lagunas turbias la producción primaria fitoplanctónica y las

partículas totales en suspensión están directamente relacionadas con la radiación solar incidente en la columna de agua. La baja transparencia reduce la cantidad de radiación PAR, a niveles donde la producción primaria del fitopláncton está limitada (Allende et al., 2009; Iachetti & Llames, 2015; Torremorell et al., 2007).

El fitoplancton de estas lagunas está dominado principalmente por Cyanobacteria, Chlorophyceae y Bacillariophyceae, con especies bien adaptadas a condiciones lumínicas deficientes (Diovisalvi, et al., 2015a; Iachetti & Llames, 2015; Izaguirre et al., 2014; O'Farrell et al., 2021; Sánchez et al., 2021). En algunas ocasiones la abundancia de pequeños flagelados (e.g. Cryptophyceae, Chrysophyceae) también puede ser elevada (Allende et al., 2009; Izaguirre et al., 2012). El PPP es usualmente muy abundante, está representado mayormente por PC-Pcy y solo en algunos pocos sitios las Peuk son dominantes (Allende et al., 2009; Fermani et al., 2015; Izaguirre et al., 2014; Silvoso et al., 2011).

Tal como se planteó en la sección “Pcy vs. Peuk”, algunos autores sostienen que las Peuk deberían dominar en ambientes eutróficos y con un Kd elevado (Pick & Agbeti, 1991; Søndergaard, 1991), mientras que los experimentos llevados a cabo por Luimstra et al. (2018, 2020) sugieren que cuando el espectro lumínico está dominado por longitudes de onda más largas (i.e. rojas) las PC-Pcy le ganan competitivamente a las Peuk.

Estas contradicciones nos llevan a plantearnos bajo qué condiciones cada uno de los componentes del PPP (Peuk, PC-Pcy y PE-Pcy) domina a lo largo de un gradiente trófico y de transparencia; y si el patrón observado en las lagunas pampeanas representa una excepción al patrón global. Para abordar estos interrogantes, en el **Capítulo I** se evalúa el grado de generalización de todos los patrones de abundancia absoluta y relativa de PPP descriptos más arriba.

La Laguna Chascomús

La Laguna Chascomús ($35^{\circ}36'S$, $58^{\circ}02'W$) pertenece a una cuenca hidrográfica denominada “lagunas encadenadas del Río Salado”, cubriendo un área

de alrededor de 801 km². Este sistema incluye siete lagunas que están interconectadas por arroyos y desembocan en el Río Salado: la laguna Vitel (1305 ha), Chascomús (3014 ha), Adela/Manantiales (2098 ha), del Burro (1070 ha), Tablilla (1674 ha), Chis-Chis (1481 ha) y Las Barrancas (885 ha) (Diovisalvi et al., 2010; Torremorell et al., 2007).

Al igual que la mayoría de las lagunas de la región, la laguna Chascomús es somera (~2 m de profundidad), relativamente grande (30,1 km²), hipertrófica (clorofila-a media 250 µg L⁻¹) y turbia (profundidad media del disco de Secchi 10 cm) (Diovisalvi et al., 2010; Torremorell et al., 2007). Es una laguna altamente productiva, con una temperatura anual promedio de 15,3°C (Fermani et al., 2013; Izaguirre et al., 2015; Torremorell et al., 2009). En esta laguna la luz juega un papel fundamental ya que la fluctuación estacional de la irradiancia determina los patrones anuales de la producción primaria, sólidos totales disueltos, y por ende la transparencia del agua (Lagomarsino et al., 2011; Torremorell et al., 2009).

El ensamble del fitoplancton está compuesto principalmente por cianobacterias, clorofitas y diatomeas. En particular, está dominado por CPcy y Pcy, las cuales representan normalmente más del 60% de la biomasa total del fitoplancton, y más del 90% del PPP (Fermani et al., 2013; Huber et al., 2017; Iachetti & Llames, 2015). Se observó que la producción primaria de esta laguna está claramente limitada por luz, dado que el coeficiente de atenuación de la luz (Kd) se incrementa junto con la radiación solar incidente (Torremorell et al., 2009). Además, esta hipótesis fue comprobada mediante experimentos en mesocosmos (Llames et al., 2009).

Huber et al. (2017) observaron en un estudio bianual que las Pcy y CPcy en la laguna Chascomús presentaban sus máximos de abundancia durante los meses más fríos, y con menor irradiancia; mientras que las Peuk tienen un pico en primavera-verano. Más recientemente, Quiroga et al. (2021) analizaron mediante citometría de flujo la dinámica de las picocianobacterias (Pcy+CPcy) a lo largo de 10 años y confirmaron que durante los años con condiciones hidrológicas relativamente estables (i.e. que no hayan sido ni excesivamente secos ni

excesivamente lluviosos) los valores de máxima abundancia se registran recurrentemente durante los meses de invierno. Adicionalmente, la dinámica de las picocianobacterias se relacionó inversamente con la dinámica estacional de los rotíferos (mayormente de los géneros *Brachionus* y *Keratella*), que presentan sus mínimos de abundancia en invierno (Diovisalvi et al., 2015b), y con picos no estacionales de pequeños cladóceros (e.g. *Bosmina*). Los cladóceros no están presentes todo el tiempo, sino que son más abundantes en períodos en donde la presión de depredación de peces planctívoros es baja (Diovisalvi et al., 2015b; Sosnovsky et al., 2010). Llamativamente no se encontró relación con los flagelados heterotróficos ni con los ciliados, los cuales no presentan un patrón temporal claro (Fermani et al., 2013).

Este patrón estacional del PPP en la laguna Chascomús con máximos de Pcy en invierno y de Peuk en primavera tardía contrasta con lo usualmente observado en otros ambientes donde los máximos de Pcy se dan generalmente en épocas más cálidas, y las Peuk en épocas invernales (ver la sección “Variación temporal”). Estos resultados nos llevan a plantearnos por qué se observa este patrón temporal de Pcy y Peuk aparentemente contradictorio con la bibliografía ¿Por qué las Pcy presentan sus máximos en los meses de menor irradiancia y temperatura? ¿Cómo responden las Pcy y Peuk bajo distintas condiciones de irradiancia y temperatura?, ¿Puede la depredación por parte de los rotíferos explicar la disminución de las Pcy en verano?

Algunas de estas preguntas fueron abordadas en esta tesis. En particular en el **Capítulo II** se realizaron experimentos de crecimiento de Pcy y Peuk a distintas intensidades de la luz y temperaturas para intentar dilucidar en qué medida diferencias en estas condiciones pueden explicar el patrón espacio-temporal de Pcy y Peuk observado en la laguna Chascomús. Asimismo, realizamos experimentos de depredación con diferentes especies de rotíferos para evaluar si la disminución en la abundancia de Pcy en verano puede ser explicada por este factor (**Capítulo III**).

Por otro lado, Fermani et al., (2013) y Huber et al., (2017) observaron que la proporción de CPcy respecto al total de picocianobacterias era mayor durante

períodos en donde la abundancia de pequeños cladóceros era elevada. El estudio de largo término llevado a cabo por Quiroga et al., (2021) relacionó la abundancia de *Bosmina* con un aumento en el tamaño y contenido relativo de clorofila-a de las picocianobacterias en el citómetro de flujo, es decir con un aumento de las formas agregadas (i.e. CPcy). Huber et al. (2017) demostraron experimentalmente que la presencia de *Bosmina* induce cambios que favorecen la dominancia de las CPcy por sobre las Pcy unicelulares. Esta respuesta sugiere que la morfología agregada o colonial sería una adaptación de las Pcy contra la presión de depredación del zooplancton.

Huber et al. (2017) analizaron además la composición de Pcy y CPcy combinando *sorting* celular mediante citometría de flujo y secuenciación del gen ribosomal 16S y de la región intergénica (ITS, por sus siglas en inglés *Intergenic Spacer Region*). Estos autores encontraron que tanto las Pcy y como las CPcy pertenecían al orden Synechococcales y dentro de este al clado “*Anathece+Cyanobium*”. Como se comentó más arriba, este clado comprende tanto géneros unicelulares (*Synechococcus*, *Cyanobium*) como coloniales (*Anathece*, *Cyanodictyon*). Por otro lado, también demostraron por primera vez que el mismo genotipo puede ser encontrado tanto en forma unicelular (Pcy) como agregada (CPcy), sugiriendo la existencia de plasticidad fenotípica *in situ*.

No obstante, hasta ahora no se conocen estudios que permitan discernir si la agregación de las Pcy puede ser inducida por distintos depredadores potenciales, y si es necesario que exista un contacto directo entre el depredador y las Pcy para desencadenar la respuesta fenotípica. Estos interrogantes son abordados en el **Capítulo III.**

Objetivo general

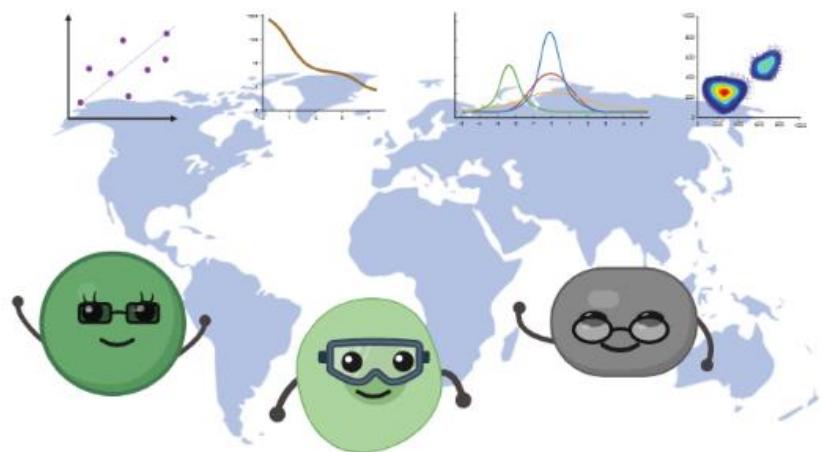
Identificar los factores que determinan la composición y abundancia del picoplancton autotrófico en las lagunas pampeanas

Objetivos específicos:

- 1- Evaluar la generalidad de los patrones de presencia y abundancia de organismos picoplanctónicos en ambientes continentales a nivel global, y comparar con lo observado en lagunas pampeanas (**Capítulo I**).
- 2- Aislar cepas de algas picoeucariotas (Peuk) de la laguna Chascomús y caracterizarlas desde el punto de vista morfológico y molecular (**Capítulo II**).
- 3- Evaluar las tasas de crecimiento *in vitro* de cepas de Pcy y Peuk aisladas de la laguna Chascomús ante diferentes condiciones de luz y temperatura (**Capítulo II**).
- 4- Evaluar el efecto de los distintos depredadores (rotíferos y cladóceros) sobre la abundancia de Pcy (**Capítulo III**).
- 5- Analizar el efecto del contacto directo de distintos organismos zooplanctónicos sobre la estructura de las comunidades naturales de Pcy-CPcy (**Capítulo III**).
- 6- Evaluar el efecto indirecto, mediado por infoquímicos producidos por diferentes depredadores (flagelados, rotíferos y cladóceros), sobre la capacidad de una cepa de Pcy para formar agregados (**Capítulo III**).

CAPÍTULO I

ANALISIS DE LOS PATRONES DE PRESENCIA Y ABUNDANCIA DEL PICOPLANCTON A NIVEL GLOBAL



Created in BioRender.com 

Introducción

El PPP cumple un papel fundamental en la trama trófica microbiana de numerosos sistemas acuáticos (Azam et al., 1983; Callieri & Stockner, 2000; Drakare, 2002; Pomeroy, 1974; Stockner & Antia, 1986; Vörös et al., 1998; Weisse, 1993) siendo ampliamente reconocida la contribución que tiene esta fracción del plancton en el flujo de carbono. El PPP se encuentra en todo tipo de ambientes acuáticos, independientemente del grado trófico. En muchos sistemas, puede llegar a representar una parte muy significativa (>50%) de la biomasa fitoplanctónica total (Callieri, 2008) y de la producción primaria total (Agawin et al., 2000; Caron et al., 1985; Stockner, 1991; Weisse, 1993). Sin embargo, su abundancia, importancia relativa y composición varía en función de diferentes variables, como por ejemplo del grado trófico (Callieri, 2008). En este sentido, y tal como se menciona en la Introducción General de esta Tesis, se han descripto algunos patrones globales en cuerpos de agua continentales que intentan describir estas relaciones:

(1) Uno de los patrones más evidentes, y ampliamente aceptados, es la relación positiva existente entre la abundancia del PPP y la clorofila-a como indicador de grado trófico (Bell & Kalff, 2001; Callieri, 2008; Somogyi et al. 2022). Esta relación predice que la abundancia de PPP es mucho mayor en ambientes eutróficos que en ambientes oligotróficos (Fig. 1.1).



Figura 1.1 (Patrón 1). La abundancia del PPP aumenta con el incremento del grado trófico (i.e. clorofila-a).

(2) Estos mismos autores evidencian que la contribución del PPP a la biomasa total de fitoplancton (%PPP) disminuye con el grado trófico (Fig. 1.2). Es decir, que la importancia relativa de las algas picoplanctónicas sería mayor en ambientes oligotróficos, a pesar de su menor abundancia. En otras palabras, las algas tienden a ser más pequeñas en ambientes donde los nutrientes son más escasos.

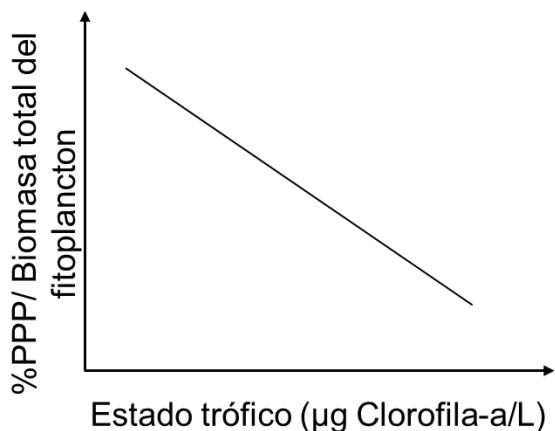


Figura 1.2 (Patrón 2). La contribución del PPP a la biomasa total del fitoplancton disminuye con el incremento del grado trófico (i.e. clorofila-a).

(3) La dinámica temporal de las PPP suele presentar los máximos de abundancia en los meses cálidos (Hawley & Whitton, 1991; Søndergaard, 1991; Stockner et al., 2000). Generalmente se puede observar un pico en verano (Caron et al., 1985; Pick & Agbeti, 1991) o dos picos, uno en primavera y otro en verano tardío (Weisse, 1988; Weisse & Kenter, 1991) (Fig. 1.3).

(4) Los distintos componentes del PPP también varían en función de distintas variables forzantes. Dentro de las Pcy, aquellas ricas en ficoeritrina (PE-Pcy) dominan en ambientes más transparentes donde el Kd es menor y el espectro de luz dominante en la columna de agua es el azul, mientras que en ambientes turbios donde las longitudes de onda más largas penetran a mayor profundidad que las

cortas están dominadas casi exclusivamente por PC-Pcy (Stomp et al., 2007b). En ambientes con condiciones intermedias ambos tipos de Pcy pueden coexistir (Fig. 1.4).

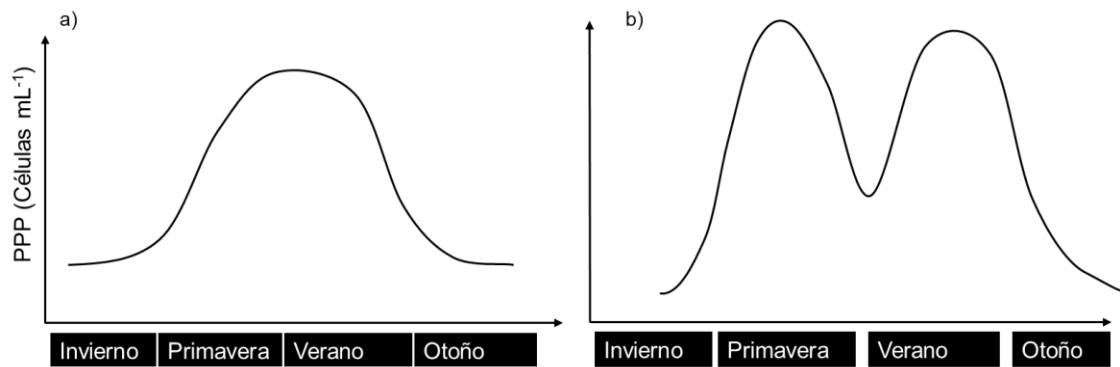


Figura 1.3 (Patrón 3). Dinámica temporal del PPP. Máximo de abundancia en meses cálidos (a), máximos de abundancia bimodal, con dos picos en primavera y verano tardío (b).

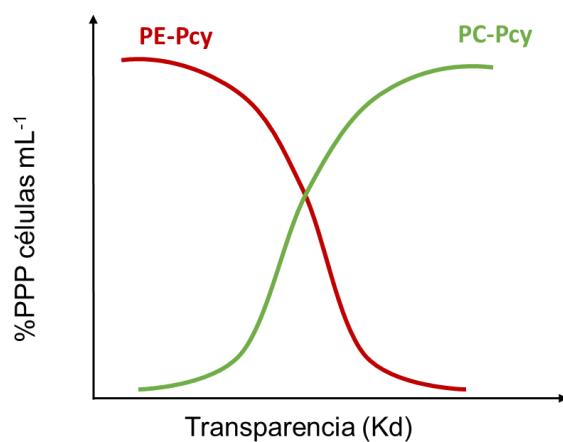


Figura 1.4 (Patrón 4). Abundancia relativa PE-Pcy y PC-Pcy en función de la transparencia.

A pesar de que todos estos patrones tienen sustento bibliográfico, en algunos casos existen ciertas discrepancias dentro de la literatura, o bien hay factores que no han sido tenidos en cuenta hasta el momento.

(a) Contrariamente a lo que se observa en el patrón de la figura 1.2, Somogyi et al. (2017) postulan que la contribución del PPP al fitoplancton total no siempre disminuye hacia ambientes eutróficos e hipereutróficos, si no que esto depende de la concentración de material particulado inorgánico en suspensión (Fig. 1.5). Por lo tanto, es esperable que el aporte del PPP a la biomasa fitoplanctónica total, así como también la abundancia absoluta, sea variable en ambientes eutróficos.

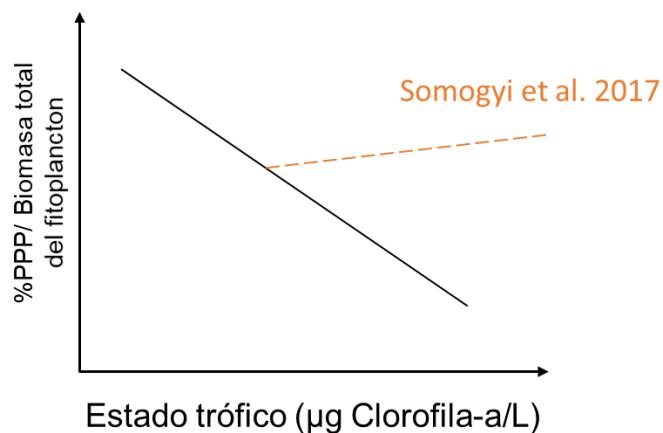


Figura 1.5 (Hipótesis 1). Modificación de la figura 1.2 según los aportes de (Somogyi et al., 2017).

(b) Por otro lado, sigue siendo una incógnita cuál es la relación del PPP con otras variables determinantes. Por ejemplo, Sarmento (2012) sugiere que la importancia del PPP en relación a la biomasa fitoplanctónica total debería aumentar hacia los trópicos. Esto se basa en la idea de que la dominancia de organismos pequeños se ve favorecida a mayores temperaturas, ya que, para los organismos más grandes, el aumento de temperatura implicaría una demanda mayor de energía en su entorno y por tanto una reducción en su biomasa (Yvon-Durocher et al., 2011).

Esta relación entre tamaño y temperatura también fue reportada en el mar por (Morán et al., 2010). Es esperable entonces que la importancia relativa y absoluta del PPP aumente con la temperatura y, por lo tanto, con la latitud (Fig. 1.6).

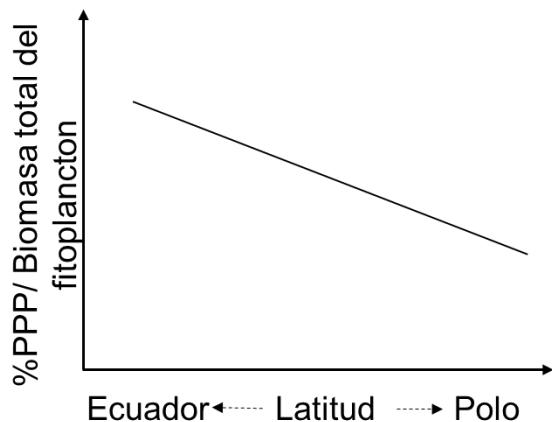


Figura 1.6 (Hipótesis 2). La contribución del PPP a la biomasa total aumenta hacia zonas más cálidas (i.e. hacia el Ecuador).

(c) Otro resultado interesante observado por Sarmento (2012) está relacionado con las BH, quienes junto con las PPP representan el picoplancton total. Comparando datos de sitios templados con ambientes tropicales, este autor observó que en ambas regiones existe una relación positiva entre las BH y la clorofila-a, relación que ha sido ampliamente descrita por numerosos autores en distintos tipos de cuerpos de agua (del Giorgio & Peters, 1993; Jeppesen et al., 1997; Vörös et al., 2008; White et al., 1991; Zinabu & Taylor, 1997). Sin embargo, si bien la pendiente es similar tanto en ambientes templados como en tropicales, la ordenada al origen de estos últimos es menor. Es decir, que a igual concentración de clorofila-a los ambientes tropicales presentan menos BH que los templados. Por lo tanto, si las BH disminuyen hacia el ecuador y las PPP aumentan, es esperable que la relación PPP/BH, y en particular la relación Pcy/BH, aumenten hacia latitudes más bajas (Fig. 1.7, 1.8).

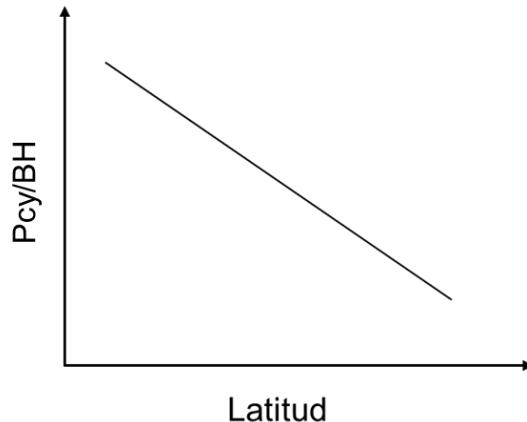


Figura 1.7 (Hipótesis 3). La relación Pcy/BH aumenta a medida que disminuye la latitud.

(d) Por otro lado, existen pocos estudios sobre la dinámica de los distintos componentes del PPP en función de la latitud, en su mayoría en el océano y algunos en agua dulce. Schiaffino et al. (2013) estudiaron diferentes cuerpos de agua dulce a lo largo de un gradiente latitudinal en la Patagonia Argentina (desde 45° 22' a 54° 52' S), donde la abundancia del PPP mostró una relación negativa con la latitud. Lin et al. (2012) en un estudio sobre patrones de distribución del picoplancton a lo largo de un gradiente latitudinal y alrededor del océano antártico, demostraron que *Prochlorococcus* y *Synechococcus* fueron los componentes del picoplancton más importantes y su distribución cambió de acuerdo a las provincias oceánicas que formaron parte del estudio. Dichos autores señalan que la distribución de *Synechococcus* alcanza un rango de latitud de entre 33°N y 50°S contribuyendo entre el 10 y 80% de la abundancia total del PPP y un 35% de la biomasa total de fitoplancton. Además, sugieren que las elevadas temperaturas registradas en las regiones ecuatoriales junto con el aporte de nutrientes provenientes de las descargas costeras, acelera el crecimiento de *Synechococcus*, presentando una correlación entre la abundancia de *Synechococcus* y la temperatura del agua.

Por otro lado, Doolittle et al. (2008) en un estudio sobre la distribución del PPP en un gradiente latitudinal (55°S – 34,8°S) en el Atlántico demuestran una

relación positiva del PPP con la temperatura a medida que la latitud decrece, siendo las Peuk el componente predominante a lo largo de todo el gradiente latitudinal, mientras que las PE-Pcy incrementaron solo cuando la temperatura aumentó. En un estudio de distribución global de PPP en el océano Flombaum et al. (2020) observaron que tanto las Peuk como las PE-Pcy presentan una relación positiva con respecto a la irradiancia y la temperatura, sin embargo, la importancia relativa de las Pcy respecto a las Peuk es mayor a medida que aumenta la temperatura y la irradiancia. Nuevamente, si trasladamos estos resultados a la latitud (ya que tanto la temperatura como la irradiancia se encuentran correlacionadas con esta variable), entonces podríamos esperar que en ambientes continentales la relación Pcy/Peuk también aumente hacia las regiones ecuatoriales (Fig. 1.8).

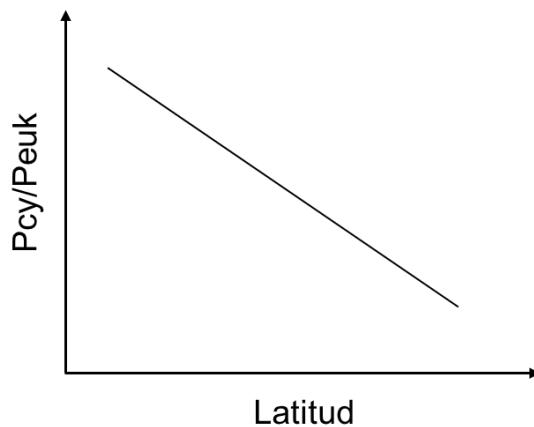


Figura 1.8 (Hipótesis 4). La relación Pcy/Peuk disminuye a medida que aumenta la latitud.

(e) Si bien la relación entre los distintos tipos de Pcy y la calidad de luz es bastante clara (Fig. 1.4), este patrón no considera a las Peuk, que en ambientes acuáticos continentales pueden ser muy importantes e inclusive dominar el PPP. En este sentido, las evidencias existentes hasta el momento son contradictorias. Algunos estudios de campo sugieren que serían más abundantes que las Pcy en ambientes eutróficos y turbios (Callieri, 2008; Craig, 1987; Pick & Agbeti, 1991; Schiaffino et al., 2013; Søndergaard, 1991). Sin embargo, en las lagunas

pampeanas las PC-Pcy predominan ampliamente en la mayoría de los ambientes (Allende et al., 2009; Fermani et al., 2015; Izaguirre et al., 2014; Silvoso et al., 2011). Por otro lado, los estudios experimentales también muestran resultados aparentemente contradictorios. Wood (1985) y Glover et al. (1986) demostraron que algunas cepas de Peuk utilizan de manera más eficiente las longitudes de onda más corta (i.e. azul) que las Pcy, lo cual sugiere que haya una dominancia en ambientes más transparentes. Mientras que experimentos llevados a cabo por Somogyi et al. (2016) sugieren que, a longitudes de onda más largas, en el extremo del espectro visible (690 nm), las cepas de Peuk ensayadas serían más eficientes en la captación de la luz que las PC-Pcy. Probablemente ambos tengan razón y dominen en ambos extremos (Fig. 1.9).

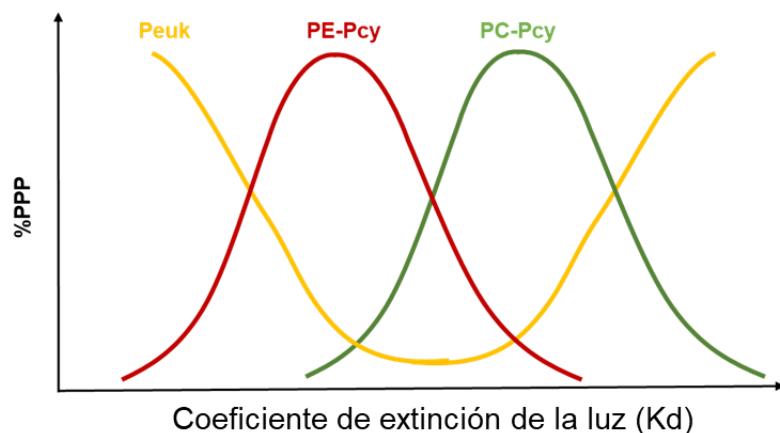


Figura 1.9 (Hipótesis 5). Las Peuk dominan ambos extremos del espectro visible.

(f) Finalmente, los patrones de variación temporal de las Pcy, con máximos en las épocas de primavera-verano (Fig. 1.3), no coinciden con lo observado en algunas lagunas pampeanas (Quiroga et al., 2021).

El **objetivo** de este capítulo es evaluar la generalidad de los patrones de presencia y abundancia de algas picoplanctónicas a nivel global, y además compararlos con lo observado en lagunas pampeanas. Para comprobar tanto los

patrones sugeridos previamente en la literatura como aquellos planteados por primera vez en esta tesis, colectamos información de datos publicados y no publicados de ambientes de agua dulce abarcando un amplio rango de condiciones ambientales y posición geográfica.

Objetivo

Evaluar la generalidad de los patrones de presencia y abundancia de organismos picoplanctónicos en ambientes continentales a nivel global, y comparar con lo observado en lagunas pampeanas.

Hipótesis

H1: El aporte relativo del PPP a la biomasa fitoplanctónica total es variable en ambientes eutróficos (Figura 1.5).

H2: La abundancia del PPP y su importancia relativa a la biomasa fitoplanctónica total aumentan hacia el Ecuador (Figura 1.6).

H3: La abundancia de las BH aumenta con el estado trófico, aunque su importancia relativa respecto al picoplancton total disminuye hacia el Ecuador.

H4: Las relaciones Pcy/BH y PPP/BH aumentan hacia el Ecuador (Figura 1.7).

H5: La relación Pcy/Peuk aumenta hacia las zonas ecuatoriales (Figura 1.8).

H6: A lo largo de un gradiente de transparencia, las Peuk dominan ambos extremos del gradiente (Figura 1.9).

Metodología

Para este trabajo se realizó una recopilación de datos de distintos artículos científicos, como así también de bases de datos que aún no han sido publicadas cedidas por diferentes investigadores. De cada proyecto y cada artículo se extrajo información sobre el ambiente estudiado: latitud, longitud, elevación, profundidad y tipo de ambiente; variables abióticas: temperatura, salinidad y/o conductividad, pH, disco de Secchi, coeficiente de extinción de la luz PAR (Kd) y/o turbidez nefelométrica, nitrógeno, fosforo; y variables bióticas: clorofila-a fitoplanctónica, porcentaje de contribución del PPP a la clorofila-a total fitoplanctónica, abundancia de PPP, PE-Pcy, PC-Pcy, Peuk y BH. En algunos casos los datos fueron extraídos directamente de los gráficos de los artículos utilizando el programa Engauge digitizer (Mark Mitchell).

Algunos de los trabajos corresponden a estudios temporales o inclusive de variación vertical. Dado que la intención era colectar datos de la mayor cantidad de ambientes distintos posibles, y con el objetivo de no dar excesivo peso a un ambiente en particular, la tabla de datos original fue filtrada de acuerdo a los siguientes criterios:

- De cada proyecto o artículo se incluyeron un máximo de cuatro muestras por ambiente tratando de cubrir la variabilidad estacional. Para esto se seleccionaron, utilizando un generador *online* de números al azar, un máximo de dos fechas correspondientes a los meses cálidos (primavera, verano) y dos a los meses fríos (otoño, invierno).
- En algunos artículos, a pesar de realizar numerosas mediciones a lo largo del tiempo únicamente se informa el valor promedio, a pesar de que se tomaron más de una muestra por ambiente. En esos casos, que corresponden solo al 12% de los datos recolectados, se utilizó el valor reportado en el artículo (Carrick & Schelske, 1997; Dittrich et al., 2004; Felföldi et al., 2009; Freitas et al., 2018; Hawley & Whitton, 1991; Hernández-Avilés et al., 2010; Huber et al., 2017; Pick, 1991; Silvoso et al., 2011;

Somogyi et al., 2017; Søndergaard, 1991; Stockner, 1991; Winder, 2009; Sarmento et al., no publicado; de Melo, no publicado).

- En aquellos sitios que fueron muestreados a diferentes profundidades, se consideró el valor promedio de la capa eufótica.
- En aquellos ambientes muestreados en más de un sitio para una misma fecha, estas muestras fueron consideradas como réplicas y por lo tanto los valores se promediaron. En algunos casos puntuales, donde la variación espacial dentro del ambiente es marcada, como por ejemplo las cuencas este y oeste del lago Balaton (Somogyi et al., 2017) se consideró a cada sitio como un ambiente diferente.

La información colectada de cada proyecto o artículo no fue homogénea, ya que no todos los trabajos contaban con datos para todas las variables requeridas. Además, en algunos casos las variables informadas para un determinado parámetro fueron diferentes, como por ejemplo el disco de Secchi y el Kd para la transparencia del agua. En estos casos fue necesario convertir los valores a una unidad común para facilitar la comparación.

Como parámetro de transparencia del agua utilizamos el Kd. En el caso de aquellos sitios donde no se contaba con el Kd, éste fue estimado en base a la profundidad del disco de Secchi, la turbidez nefelométrica o los sólidos totales en suspensión, dependiendo de la disponibilidad de datos. Para estimar el Kd se realizaron regresiones log-log de Kd vs. disco de Secchi y Kd vs. turbidez utilizando los datos colectados. En todos los casos las regresiones fueron altamente significativas con valores de R^2 elevados (Figura 1.10). Como criterio general, siempre se utilizó el valor de Kd reportado en el trabajo, si no se contaba con el Kd éste se estimó en base a la profundidad del disco de Secchi, y si no se contaba con Kd ni disco de Secchi, entonces el Kd se estimó en base a la turbidez. Sólo en un caso (Somogyi et al., 2017) el Kd fue estimado en base a los sólidos totales en suspensión (TSS) utilizando la fórmula reportada por Pérez et al., (2010): $Kd = 2,56 + 6,13 \ln TSS$.

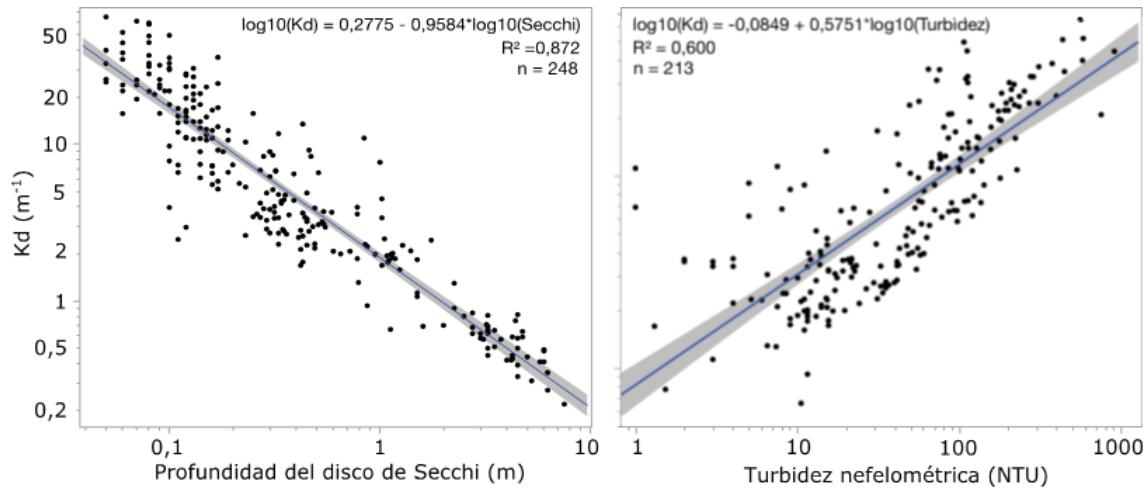


Fig. 1.10. Relación del Kd con la profundidad del disco de Secchi (a) y la turbidez nefelométrica (b). En todos los casos las variables fueron transformadas a Log10.

En la mayoría de los casos la conductividad eléctrica del agua se informó en $\mu\text{S cm}^{-1}$ o mS cm^{-1} . Sin embargo, en unos pocos casos en lugar de conductividad se cuenta con datos de sólidos disueltos totales (TDS) o salinidad en mg L^{-1} o g L^{-1} . Asumiendo que la mayoría de los sólidos predominantes son de naturaleza iónica, se utilizó un único factor de conversión estándar para convertir estas medidas de concentración de iones en conductividad eléctrica: $\mu\text{S cm}^{-1} = \text{mg L}^{-1} / 640$.

Los datos de abundancia provienen de estimaciones realizadas por citometría de flujo y por microscopía de epifluorescencia. En la mayoría de las muestras las abundancias fueron estimadas solo con uno de los dos métodos. En algunos casos contamos con ambas estimaciones para la misma muestra, en estas ocasiones se promediaron ambos valores.

Las abundancias de Pcy estimadas por ambos métodos mostraron una muy buena correlación (Figura 1.11). Las Peuk también mostraron una tendencia alrededor a la recta 1:1 aunque la dispersión de datos es visiblemente mayor que para las Pcy (Figura 1.11). Esto se debe a que en muchos casos la abundancia de Peuk es baja, y cuando ésta es estimada mediante microscopía de epifluorescencia el error de recuento suele ser elevado debido a que se encuentran pocas células por campo. Las BH presentaron una correlación positiva y menos dispersión que las

Peuk, sin embargo, las estimaciones con citometría de flujo fueron sistemáticamente menores. Más allá de esta diferencia metodológica, al relacionar la abundancia de BH con una variable significativa como la clorofila-a se observa que ambos métodos muestran la misma tendencia (Figura 1.12).

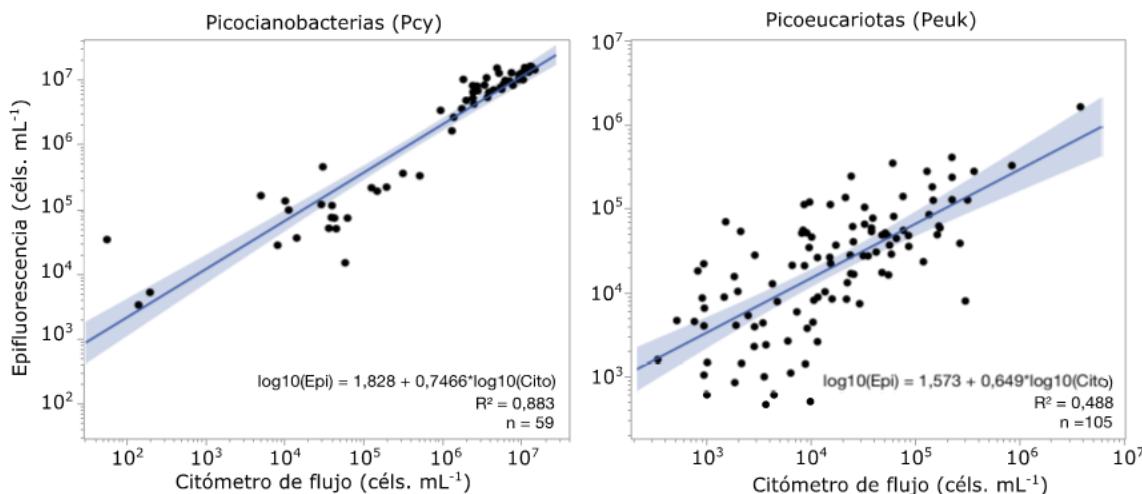


Figura 1.11. Ajustes lineales para las relaciones de abundancias estimadas con epifluorescencia y con citometría tanto para PC-Pcy (a) y Peuk (b). En todos los casos las variables fueron transformadas por Log_{10} .

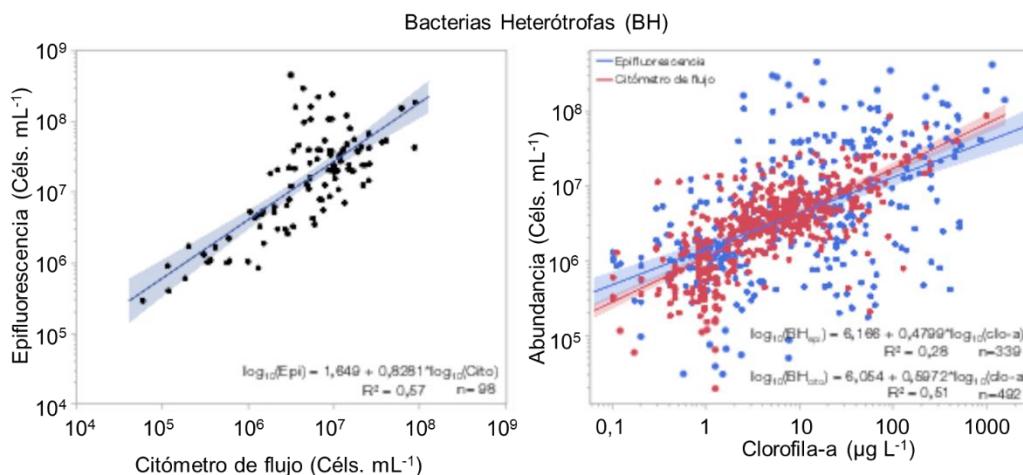


Figura 1.12. Ajustes lineales para las relaciones de abundancias estimadas con epifluorescencia y con citometría para BH. En todos los casos las variables fueron transformadas por Log_{10} .

Para convertir los valores de abundancia en biomasa se utilizaron los siguientes factores de conversión: 20 fgC célula⁻¹ para BH, 160 fgC célula⁻¹ para Pcy y 530 fgC célula⁻¹ para Peuk. Dado que los recuentos provienen de ambientes muy diferentes se tomó un criterio conservativo para establecer factores de conversión que no sobreestimen los cálculos de biomasa. Estos criterios se detallan a continuación.

La biomasa de las bacterias fue calculada utilizando la fórmula de la relación carbono-volumen derivada por Norland (1993) a partir de los datos de Simon & Azam (1989):

$$pgC.célula^{-1} = 0,12 * (\mu m^3)^{0,72}$$

Considerando un diámetro celular de 0,53 μm y una célula con forma esférica, el factor de conversión a biomasa resulta 20 fgC célula⁻¹. En la revisión realizada por Grob et al. (2007), el tamaño de 0,53 μm se encuentra dentro de los valores medios de una célula de BH.

Para Pcy se aplicó el mismo factor de conversión tanto se trate de PE-Pcy como de PC-Pcy considerando un tamaño de 1,1 μm ($0,7 \mu m^3$). Este tamaño corresponde al tamaño promedio reportado en Huber et al. (2017) y en el Capítulo III de esta Tesis. En la revisión realizada por Grob et al. (2007) el rango del volumen oscila entre 0,38 y 0,90 μm^3 célula⁻¹. La biomasa estimada utilizando la fórmula presentada por Menden-Deuer & Lessard (2000):

$$pgC.célula^{-1} = 0,216 * (\mu m^3)^{0,939}$$

resulta 154 fgC célula⁻¹, mientras que aplicando el factor de conversión de Worden et al. (2004) de 240 fgC μm^3 , resulta 160 fgC célula⁻¹. Ambos son muy similares por lo que decidimos utilizar este último valor.

Para las Peuk considerar un único factor es más complejo ya que la variación de tamaño es mayor que para los otros microorganismos. En este caso asumimos un tamaño de 1,7 μm utilizando la fórmula de Menden-Deuer & Lessard, (2000).

Resultando un factor de conversión de $530 \text{ fgC célula}^{-1}$, similar al aplicado por Stenuite et al. (2009).

Variación temporal

Para el análisis de la variación temporal de las Pcy, se colectaron datos de abundancia de Pcy de 39 series temporales de lagos provenientes de distintas regiones de Europa, Norte América y Sur América (Tabla 1.1). Se consideraron solo sitios de los cuales se contaba con al menos 16 muestras en el año y donde todas las estaciones hayan estado representadas. En base a la concentración de clorofila-a, y utilizando el criterio de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (**OECD** por sus siglas en inglés, 1982) el cual ha sido utilizado como estándar por la comunidad internacional para determinar la calidad de los cuerpos de agua, 18 de los sitios se pueden clasificar como eutróficos, 6 mesotróficos y 15 oligotróficos (Vollenweider & Kerekes, 1982) .

Análisis de datos

El análisis de datos consistió en regresiones lineales para analizar las variables físico-químicas con respecto de las biológicas como la abundancia de los diferentes representantes del picoplancton. Para evaluar la relación del picoplancton con las variables ambientales más importantes (i.e. clorofila-a, latitud, transparencia) se aplicaron modelos aditivos generalizados (GAM por sus siglas en inglés *Generalized additive models*; Wood, 2006). Cada característica del picoplancton fue ajustada individualmente: i) la abundancia del componente del PPP correspondiente (PE-Pcy, PC-Pcy, Peuk) y de BH, fue convertida a biomasa ii) clorofila-a, iii) latitud, iv) Kd. Se utilizó la familia quasipoisson (link = “log”) para los datos de abundancia para evitar la sobre dispersión de los datos y la familia gaussiana (link = “identity”) para las otras variables dependientes ajustadas como las relaciones entre distintos representantes del PPP. Para relacionar la biomasa relativa de cada grupo de PPP con el Kd se realizó el ajuste mediante una regresión

LOESS utilizando el programa estadístico JMP (versión 13.2.0 Copyright © 2016 SAS).

Resultados y Discusión

Base de datos

En total se compilaron 1126 muestras correspondientes a 666 sitios abarcando un amplio gradiente longitudinal, desde 61°N a 64°S (Fig. 1.13), y de condiciones ambientales, desde sitios ultraoligotróficos (lago Ghio, 0,11 µg clorofila-a L⁻¹; Schiaffino et al., 2013) a hipereutróficos (laguna Pehuajó, 1550 µg clorofila-a L⁻¹; Fermani et al., 2015). Esta información proviene de 16 bases de datos propias (362 sitios de estudio), algunas de ellas no publicadas, y de 32 artículos publicados (304 sitios de estudio) (Tabla 1.1).

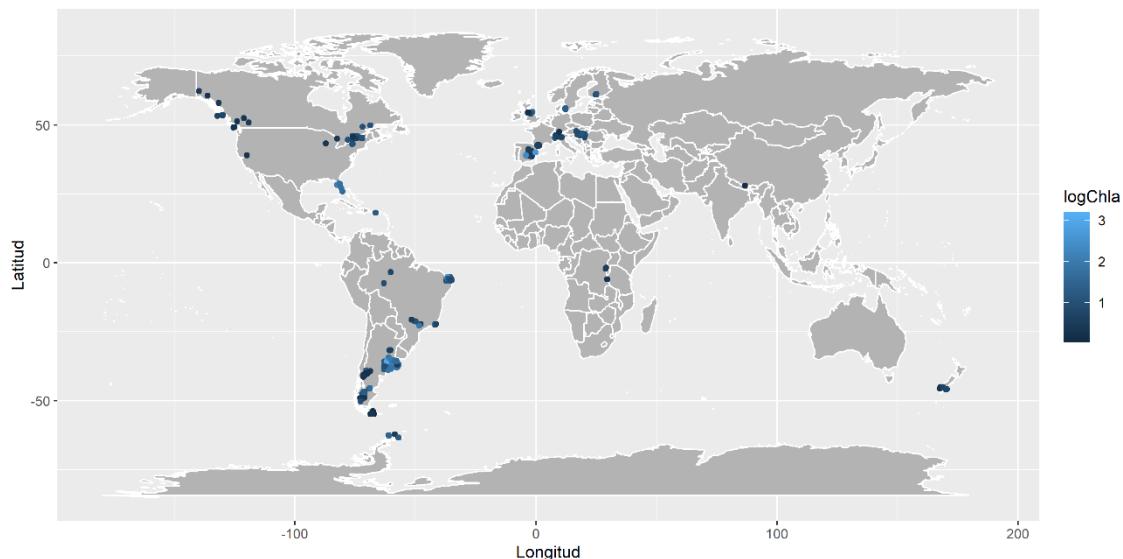


Figura 1.13. Posición geográfica de los sitios incluidos en la revisión. La intensidad del color indica la concentración de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) como indicador de grado trófico.

Tabla 1.1. Tabla con promedio y rangos de las principales variables recolectadas en este trabajo. N = cantidad de sitios muestreados. Kd = coeficiente de atenuación de la luz. Las Ecorregiones de aguadulce del mundo se clasificaron de acuerdo a <https://www.feow.org/> (Abell et al., 2008).

Proyecto o artículo	País- (Ecorregión)	N	Latitud	Longitud	Clorofila-a (µg L ⁻¹)	Kd (m ⁻¹)	Células mL ⁻¹				
							PE-PCy	PC-PCy	Peuk	PPP	HB
Fernani et al. (2015)	Argentina (Drenajes Bonarenses)	40	-36,28 (-38,93; -34,48)	-60,38 (-63,09; -56,98)	253,47 (1,83 - 1549,79)	21,75 (1,30 - 74,04)	0	6,8x 10 ⁶ (1,1x 10 ³ - 7,72x 10 ⁷)	2x 10 ⁵ (0 - 1,07x 10 ⁸)	7x 10 ⁶ (6,58x 10 ³ - 7,73x 10 ⁷)	6x 10 ⁷ (1,39x 10 ⁸ - 4,21x 10 ⁸)
Sarmiento et al. (no publicado)	Brasil (Alto Paraná)	1	-22,17	-47,9	3,54 (1,63 - 7,44)	0,92 (0,81 - 1,11)	1,9x 10 ⁴ (3,64x 10 ³ - 2,8x 10 ⁴)	0	5x 10 ³ (2,38x 10 ³ - 9,07x 10 ³)	2x 10 ⁴ (1,27x 10 ⁴ - 3,16x 10 ⁴)	3x 10 ⁶ (1,5x 10 ⁶ - 4,04x 10 ⁶)
Freitas et al. (2018)	Brasil (Alto Paraná)	4	-21,49 (-22,71, -20,7)	-50,08 (-51,5; -48,48)	15,18 (0,82 - 76,31)	1,53 (0,27 - 5,72)			3x 10 ³ (1,81x 10 ² - 2,4x 10 ⁴)	4x 10 ⁴ (1,07x 10 ³ - 1,27x 10 ⁵)	5x 10 ⁶ (1,91x 10 ⁶ - 8,37x 10 ⁶)
de Melo et al. (no publicado)	Brasil (Tierras Bajas del Amazonas)	5	-3,39 (-3,49; -3,32)	-60,25 (-60,27; -60,21)	41,21 (1,03 - 242,89)	5,85 (0,95 - 16,16)		0	3,9x 10 ⁴ (9,3x 10 ² - 2,09x 10 ⁵)	9x 10 ³ (2,56x 10 ² - 7,36x 10 ⁴)	5x 10 ⁴ (1,46x 10 ³ - 2,82x 10 ⁵)
Feitosa et al. (2019)	Brasil (Tierras Bajas del Amazonas)	1	-7,35	-63,08	17,86 (7,12 - 47,17)	3,84 (1,52 - 14,49)	2,31x 10 ⁵ (5,2x 10 ⁴ - 4,4x 10 ⁵)	0	9x 10 ³ (7,5x 10 ² - 1,61x 10 ⁴)	6x 10 ³ (5,62x 10 ² - 4,59x 10 ⁵)	5x 10 ⁵ (2,1x 10 ⁴ - 6,46x 10 ⁶)
Huber et al. (2017)	Argentina (Drenajes Bonarenses)	1	-35,59	-58,03	276,77 (147,5 - 499,4)	25 (11 - 52)		0	5,13x 10 ⁶ (1,05x 10 ⁶ - 1,01x 10 ⁷)	6x 10 ⁴ (2,65x 10 ⁴ - 1,2x 10 ⁵)	5x 10 ⁶ (1,1x 10 ⁶ - 1,02x 10 ⁷)

Tabla 1.1. Continuación

Proyecto o artículo	País- (Ecorregión)	N	Latitud	Longitud	Clorofila-a (µg L ⁻¹)	Kd (m ⁻¹)	Células mL ⁻¹				
							PE-Pcy	PC-Pcy	Peuk	PPP	HB
Izaguirre et al. (no publicado)	Argentina (Patagonia)	15	-40,14 (-39,25, -40,75)	-70,18 (-68,74, -71,11)	0,80 (0,30 – 2,14)	0,71 (0,36 – 2,29)	5,98x 10 ⁴ (1,45x 10 ³ – 1,62x 10 ⁵)	0	3,17x 10 ³ (3,93x 10 ² – 9,09x 10 ³)	6,03x 10 ⁴ (1,84x 10 ³ – 1,65x 10 ⁵)	4,37x 10 ⁵ (2,71x 10 ⁵ – 6,54x 10 ⁵)
Bernal et al. (2021)	Argentina (Patagonia)	11	-47,02 (-46,74, -47,14)	-71,24 (-71,05, -71,53)	13,78 (0,51- 126,31)		2,55x 10 ⁴ (0 – 1,81x 10 ⁵)	2,43x 10 ⁴ (0 – 2,01 x 10 ⁵)	1,91x 10 ⁴ (6,08x 10 ¹ – 1,16x 10 ⁵)	6,89x 10 ⁴ (1,89x 10 ³ – 2,26x 10 ⁵)	5,79x 10 ⁶ (1,52x 10 ⁵ – 2,75x 10 ⁷)
Menezes et al. (no publicado)	Brasil (Caatinga Nororiental y Drenajes Costeros)	86	-5,94 (-6,59, -5,13)	-35,73 (-37,26; -35,01)	61,81 (0,57 – 504,89)	5,79 (0,70 – 31,13)	1,14x 10 ⁴ (0 – 1,8x 10 ⁵)	6,45x 10 ⁵ (0 – 5,44x 10 ⁶)	9x 10 ⁴ (0 – 2,98x 10 ⁶)	7x 10 ⁵ (6,4x 10 ³ – 7,32x 10 ⁶)	9x 10 ⁶ (3,02x 10 ⁴ – 1,28x 10 ⁹)
Devercelli et al. (no publicado)	Argentina (Bajo Paraná)	27	-31,71 (-31,84, -31,63)	-60,64 (-60,8, -60,47)	9,69 (0,72 – 120,47)	5,48 (0,66 – 38,44)	5,79x 10 ² (0 – 1,9x 10 ⁴)	8,74x 10 ⁴ (0 – 7,63x 10 ⁵)	2x 10 ⁴ (0 – 9,83x 10 ⁴)	1x 10 ⁵ (2,96x 10 ² – 8,61x 10 ⁵)	5x 10 ⁶ (1,26x 10 ⁶ – 2,58x 10 ⁷)
Castro Berman et al. (2020)	Argentina (Drenajes Bonarenses, Patagonia)	76	-37,73 (-41,2, -34,48)	-63,55 (-71,71, -56,98)	64,38 (1,58 – 981,06)	7,82 (0,46 – 38,44)	2,02x 10 ⁴ (0 – 5,9x 10 ⁵)	1,47x 10 ⁶ (0 – 2,4x 10 ⁷)	1x 10 ⁵ (0 – 2,74x 10 ⁶)	2x 10 ⁶ (0 – 2,4x 10 ⁷)	4x 10 ⁷ (1,04x 10 ⁶ – 3,53x 10 ⁸)
Junger et al. (no publicado)	Brasil (Fluminense, Paraíba do Sul)	20	-22,27 (-22,51, -22,16)	-41,60 (-41,91, -41,31)	15,62 (0,3 – 134,5)	5,75 (0,24 – 36,62)	1,01x 10 ⁶ (4,81x 10 ² – 1,9x 10 ⁸)	1,08x 10 ⁶ (4,81x 10 ² – 7,74x 10 ⁶)	3x 10 ⁴ (0 – 1,49x 10 ⁵)	2x 10 ⁶ (6,44x 10 ² – 2,76x 10 ⁷)	3x 10 ⁸ (1,4x 10 ⁶ – 5,09x 10 ⁹)
Gasol et al. (no publicado)	España (Iberia Oriental)	24	42,62 (42,33; 42,81)	0,92 (0,5, 1,37)	2,42 (0,2 – 11,99)	0,31 (0,11 – 1,43)	3,39x 10 ³ (0 – 5,1x 10 ⁴)	5,5x 10 ² (0 – 1,29x 10 ⁴)	1x 10 ⁴ (3,8x 10 ² – 5,83x 10 ⁴)	2x 10 ⁶ (4,4x 10 ⁵ – 5,83x 10 ⁶)	

Tabla 1.1. Continuación

Proyecto o artículo	País- (Ecorregión)	N	Latitud	Longitud	Clorofila- a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Kd (m^{-1})	Células mL^{-1}			
							PE-Pcy	PC-Pcy	Peuk	PPP
Quiroga et al. (2013)	Argentina (Patagonia)	5	-54,74	-67,82	1,31 (0,68 - 2,31)	0	0	1x 10 ⁴ (3,34x 10 ³ - 5,06x 10 ⁴)	1x 10 ⁴ (3,34x 10 ³ - 5,06x 10 ⁴)	8x 10 ⁶ (6,22x 10 ⁶ - 1,11x 10 ⁷)
Unrein et al. (no publicado)	Antártida	14	-63,14 (-63,41, -62,24)	-57,81 (-61,11, -57)	7,3 (0,16 - 55,34)	0,71 (0,13 - 1,69)	7,37x 10 ¹ (0 - 5,81x 10 ²)	0	2x 10 ⁴ (0 - 3,48x 10 ⁵)	1x 10 ⁶ (5,54x 10 ⁴ - 1,84x 10 ⁷)
Weisse (1991)	Alemania, Austria, Suiza (Europa Central y Occidental)	1	47,53	9,69	0,74	.	6,83x 10 ⁴	0	7x 10 ³	8x 10 ⁴
Allende et al. (2009)	Argentina (Drenajes Bonarenses)	10	-35,79 (-36,79, -35,53)	-57,9 (-58,12; -57,79)	44,97 (1,6 - 125,7)	30,08 (4,5 - 61,4)	0	1,06x 10 ⁸ (3,89x 10 ⁴ - 4,37x 10 ⁶)	6x 10 ⁴ (3,19x 10 ² - 3,35x 10 ⁵)	1x 10 ⁶ (3,92x 10 ⁴ - 4,55x 10 ⁶)
Belykh & Sorokovikova (2003)	Rusia (Lago Baikal)	1	51,79	104,93	.	.	8,05x 10 ⁴ (2,31x 10 ⁴ - 2,1x 10 ⁵)	0	2x 10 ³ (7,15x 10 ² - 6,5x 10 ³)	8x 10 ⁴ (2,39x 10 ⁴ - 2,17x 10 ⁵)
Burns & Stockner (1991)	Nueva Zelanda (Nueva Zelanda)	6	-45,40 (-45,87, -44,98)	168,76 (167,5, 170,5)	2,41 (0,52 - 4,68)	0,39 (0,15 - 0,99)	8,17x 10 ⁴ (2,64x 10 ³ - 2,71x 10 ⁵)	0	2x 10 ⁴ (5,88x 10 ¹ - 4,59x 10 ⁵)	1x 10 ⁵ (3,28x 10 ³ - 5,44x 10 ⁵)
Callieri et al. (2007)	Argentina (Patagonia)	-40,97 (-41,33, -40,67)	-71,60 (-71,68, -71,53)	1,08 (0,15 - 7,9)	0,12 (0,09 - 0,16)	9,63x 10 ⁴ (6,53x 10 ⁴ - 1,36x 10 ⁵)	0	7x 10 ² (0 - 4,19x 10 ³)	1x 10 ⁵ (6,53x 10 ⁴ - 1,36x 10 ⁵)	.

Tabla 1.1. Continuación

Proyecto o artículo	País- (Ecorregión)	N	Latitud	Longitud	Clorofila-a (µg L ⁻¹)	Kd (m ⁻¹)	Células mL ⁻¹				
							PE-Pcy	PC-Pcy	Peuk	PPP	HB
Camacho et al. (2003)	España (Iberia Meridional, Iberia Occidental)	51	39,73 (38,58, 41,25)	-2,55 (-4,05, -0,16)	34,46 (0,5 - 439)	4,38x 10 ⁵ (0- 5,02x 10 ⁶)	2,48x 10 ⁵ (0- 9,15x 10 ⁶)	0	7x 10 ⁵ (0- 9,15x 10 ⁶)	.	.
Carrik & Schelske (1997)	Estados Unidos (Península de Florida)	9	28,22 (25,92, 28,79)	-81,52 (-82,58, -80,29)	101,63 (37,7 - 193,1)	6,79				9x 10 ⁶ (6,5x 10 ⁵ - 1,59x 10 ⁷)	.
Contant & Pick (2013)	Canadá (St. Lawrence)	4	45,3 (45,11, 45,65)	75,26 (-75,92, -74,56)	3,02 (0,82 - 5,71)	2,49 (0,78 - 4,06)	1,89x 10 ² (1,4x 10 ¹ - 5,58x 10 ²)	3,45x 10 ³ (1,1x 10 ³ - 7,8x 10 ³)	3x 10 ² (1,18x 10 ² - 4,7x 10 ²)	4x 10 ³ (1,62x 10 ³ - 8,72x 10 ³)	.
Ditrich et al. (2004)	Suiza (Europa Central y Occidental)	1	47,01	8,44		0,28 (0,25 - 0,32)		9x 10 ³			
Fahnenstiel & Carrick (1992)	Estados Unidos (Grandes Lagos Laurentianos)	2	44,17 (43,3, 45,05)	-84,86 (-87,23, -82,49)	1,35 (1,17 - 1,53)	0,18	2,92x 10 ⁴ (2,85x 10 ⁴ - 2,99x 10 ⁴)	0	8x 10 ³ (7,11x 10 ³ - 9,82x 10 ³)	4x 10 ⁴ (3,56x 10 ⁴ - 3,97x 10 ⁴)	.
Felföldi et al. (2009)	Europa (Alto Danubio)	10	46,67 (45,52, 47,67)	19,36 (16,79, 20,62)	44,16 (2 - 120)	28,69 (4,94 - 74,04)	0	2,53x 10 ⁶ (1x 10 ³ - 1,03x 10 ⁷)	8x 10 ⁵ (5x 10 ² - 8,16x 10 ⁵)	3x 10 ⁶ (7,8x 10 ⁴ - 1,06x 10 ⁷)	.
Gerea et al. (2017)	Argentina (Patagonia)	2	-41,06 (-41,08, -41,05)	-71,43 (-71,57, -71,5)	1,01 (0,6 - 1,3)	0,47 (0,29 - 0,67)	6,76x 10 ⁴ (6,59x 10 ³ - 2,89x 10 ⁵)	3,53x 10 ³ (0 - 1,43x 10 ⁴)	9x 10 ³ (2,29x 10 ³ - 1,89x 10 ⁴)	8x 10 ⁴ (2,19x 10 ⁴ - 2,95x 10 ⁵)	1x 10 ⁶ (7,24x 10 ⁵ - 2,1x 10 ⁶)

Tabla 1.1. Continuación

Proyecto o artículo	País- (Ecoregión)	N	Latitud	Longitud	Clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	K_d (m^{-1})	Células mL^{-1}			
							PE-Pcy	PC-Pcy	PPP	HB
Hawley & Whittton (1991)	Inglaterra (Europa Central y Occidental)	10	54,48 (54,1, 54,74)	-2,86 (-3,37, -1,47)	6,44 (0,52 - 28,49)	4,08x 10 ⁴ (0 - 9,18x 10 ⁵)	0	3x 10 ³ (0 - 3,96x 10 ⁴)	4x 10 ⁴ (9,51x 10 ¹ - 9,19x 10 ⁵)	.
Hepperle & Krienitz (2001)	Alemania (Europa Central y Occidental)	4	53,33 (53,15, 53,5)	13,27 (13,02, 13,44)	.	.	2x 10 ⁴ (1,03x 10 ⁴ - 4,01x 10 ⁴)	2x 10 ⁵ (9,15x 10 ⁴ - 2,39x 10 ⁵)	.	.
Hernández-Avilés et al. (2010)	México (Lerma-Chapala)	1	40,76	73,98	.	.	.	9x 10 ⁵ (7,47x 10 ⁴ - 1,68x 10 ⁶)	.	.
Jassér & Arvola (2003)	Finlandia (Drenajes del Norte Báltico)	4	61,10 (61,01, 61,24)	24,99 (24,82, 25,13)	8,27 (5,5 - 11)	1,09 (0,64 - 1,83)	1x 10 ² (0 - 4x 10 ²)	7,35x 10 ⁴ (7,65x 10 ³ - 2,25x 10 ⁵)	5x 10 ³ (9,6x 10 ² - 9,35x 10 ³)	8x 10 ⁴ (1,7x 10 ⁴ - 2,3x 10 ⁵)
Pantoja-Agredo y Otero (2016)	Puerto Rico (Puerto Rico- Islas Vírgenes)	1	18,09	-66,58 (10,43 - 16,28)	13,35 (0,57 - 1)	0,78 (8,59x 10 ³ - 2,59x 10 ⁴)	1,72x 10 ⁴ (8,59x 10 ³ - 2,59x 10 ⁴)	0	6x 10 ³ (2,87x 10 ³ - 8,15x 10 ³)	2x 10 ⁴ (1,15x 10 ⁴ - 3,4x 10 ⁴)
Pick (1991)	Canadá (Grandes Lagos Laurentianos, Sur de la Bahía de Hudson), Nueva Zelanda (Nueva Zelanda, Mackenzie Superior)	38	-38,31 (-38,81, -38,08)	63,74 (41,92, 176,45)	39,11 (3 - 580)	1,66 (0,3 - 3,84)	3,43x 10 ⁴ (0 - 2,11x 10 ⁵)	1,27x 10 ⁴ (0 - 2,56x 10 ⁴)	9x 10 ⁴ (1x 10 ⁴ - 1,69x 10 ⁵)	.
Pick & Bérubé (1992)	Canadá (Grandes Lagos Laurentianos)	1	44,69	-78,05	.	.	.	1,47x 10 ⁵ (2,2x 10 ⁴ - 3x 10 ⁵)	0	.

Tabla 1.1. Continuación

Proyecto o artículo	País- (Ecorregión)	N	Latitud	Longitud	Clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Kd (m^{-1})	Células mL^{-1}				
							PE-Pcy	PC-Pcy	Peak	PPP	
Lavallée & Pick (2002)	Canadá (St. Lawrence, Grandes Lagos Laurentianos, Drenajes Costeros del Golfo de St. Lawrence)	50	45,06 (43,09, 49,86)	-74,46 (-78,05, -68,71)	9,81 (1,83- 68,98)	0,66 (0,22- 2,45)				9x 10^4 (1x 10^2 - 4,68x 10^5)	
Simek et al. (1996)	Europa (Alto Danubio, Europa Central y Occidental)	4	48,02 (47,2, 48,85)	12,69 (10,89, 14,49)					0	1x 10^5 (6,5x 10^4 - 1,6x 10^5)	
Sarmiento et al. (2008)	Africa (Lago Tanganica)	6	-1,92 (-2,11, -1,73)	29,07 (28,98, 29,16)	3,05 (2,15- 5,33)	0,27 (0,25- 0,30)	1,23x 10^5 (7,4x 10^4 - 1,42x 10^5)	0	5x 10^3 (1,56x 10^3 - 8,47x 10^3)	1x 10^5 (1,17x 10^5 - 1,47x 10^5)	2x 10^6 (1,25x 10^6 - 1,78x 10^6)
Schiattino et al. (2013)	Argentina (Patagonia)	32	-50,32 (-54,87, -45,37)	-70,23 (-72,93, -67,35)	5,77 (0,1- 47,01)	2,44 (0,09- 28,52)	5,51x 10^4 (0- 5,18x 10^5)	1,51x 10^5 (0- 4,63x 10^6)	8x 10^4 (9,64x 10^2 - 5,86x 10^5)	3x 10^5 (3,97x 10^3 - 5,19x 10^6)	6x 10^6 (1,77x 10^5 - 3,61x 10^7)
Silvoso et al. (2011)	Argentina (Drenajes Bonarenses)	6	-35,89 (-36,79, -35,59)	-57,86 (-58,03, -57,77)	64,34 (1,6- 334,6)	17,17 (3,4- 49,8)	0	9,81x 10^5 (7,67x 10^3 - 6,25x 10^6)	2x 10^4 (0- 1,15x 10^5)	1x 10^6 (8,3x 10^3 - 6,26x 10^6)	.
Somogyi et al. (2017)	Hungría (Alto Danubio)	8	46,93 (46,73, 47,77)	18,49 (16,72, 19,19)	31,17 (6- 121)	25,52 (2,40- 50,46)				3x 10^6 (2,3x 10^5 - 2,07x 10^7)	.
Soondergard (1991)	Dinamarca (Drenajes del Norte Báltico)	7	55,91 (55,8, 56,01)	12,28 (12,07, 12,42)	53,23 (0,5- 416,2)	1,88 (0,4- 5,72)	1,49x 10^4 (0- 1,34x 10^5)	1,08x 10^2 (0- 3,03x 10^3)	5x 10^4 (0- 6x 10^5)	7x 10^4 (0- 6x 10^5)	.

Tabla 1.1. Continuación

Proyecto o artículo	País- (Ecorregión)	N	Latitud	Longitud	Clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	K_d (m^{-1})	Células mL^{-1}				
							PE-Pcy	PC-Pcy	Peak	PPP	HB
Stenuite et al. (2009)	África (Lago Tanganyika)	1	-6	29,5	0,97 (0,82 – 1,25)	0,13 (0,10 – 0,17)	4,07x 10 ⁵ (1,2x 10 ⁵ – 9,76x 10 ⁵)	0 (1,03x 10 ³ – 3,99x 10 ⁴)	1x 10 ⁴ (1,21x 10 ³ – 1,02x 10 ⁶)	4x 10 ⁵ (1,21x 10 ⁵ – 1,02x 10 ⁶)	6x 10 ⁵ (3,61x 10 ⁵ – 9,95x 10 ⁵)
Stockner (1991)	Canadá (Costa del Pacífico de Alaska y Canadá)	13	53,27 (49,04, 62,35)	-128,13 (-139,83, -119,26)	2,12 (0,8 – 6,68)	3,13x 10 ⁴ (0 – 1,23x 10 ⁵)	2x 10 ³ (0 – 7,64x 10 ⁴)	2x 10 ⁴ (0 – 1,49x 10 ⁵)	5x 10 ⁴ (2,56x 10 ² – 2,71x 10 ⁵)		
Vörös et al. (1998)	Europa (Alto Danubio, Drenajes del Golfo de Venecia)	24	44,70 (27,92, 46,95)	18,95 (7,91, 86,78)	27,31 (0,3 – 170)	1,51 (0,19 – 6,04)					
Vörös et al. (1991)	Hungría (Alto Danubio)	7	46,94 (46,57, 47,78)	17,96 (16,71, 20,63)			1,57x 10 ⁵ (0 – 1,1x 10 ⁶)	1,07x 10 ⁶ (0 – 3,4x 10 ⁶)	0	1x 10 ⁶ (3x 10 ⁵ – 3,4x 10 ⁶)	
Winder (2009)	Estados Unidos (Lahontan)	1	39	-120	0,9 (0,4 – 1,6)	0,08 (0,07 – 0,09)	2,18x 10 ⁴ (1x 10 ³ – 3,79x 10 ⁴)	0	4x 10 ³ (2,76x 10 ³ – 6,66x 10 ³)	3x 10 ⁴ (1,41x 10 ⁴ – 4,46x 10 ⁴)	

PPP en función de la clorofila-a

La abundancia del PPP mostró una relación positiva ($P<0.0001$) con la clorofila-a (Fig. 1.14). Esto se condice con el patrón general planteado en la figura 1.1. Al comparar nuestros datos con aquellos recolectados previamente por Bell & Kalff (2001) y Callieri (2008), se observa la misma relación con pendientes muy similares (Tabla 1.2). En el extremo oligotrófico la abundancia fluctuó aproximadamente entre 10^2 y 10^5 células mL^{-1} , mientras que en el extremo eutrófico varió entre 10^4 y 10^8 células mL^{-1} .

Si bien la abundancia del PPP presenta una gran variabilidad a lo largo del gradiente latitudinal, se observa una tendencia a aumentar desde los 65° a los 40° , manteniendo luego aproximadamente el mismo valor promedio hacia el Ecuador (Fig. 1.14). Con el objetivo de analizar el efecto parcial de cada una de las variables (latitud y clorofila-a), realizamos análisis de GAM. Al extraerle el efecto del grado trófico, la tendencia observada entre la latitud y el PPP es menos evidente (Fig. 1.15; Tabla 1.3). Sin embargo, cuando solo tomamos en cuenta a las Pcy el aumento hacia las latitudes más bajas es mucho más claro (Fig. 1.15).

La contribución del PPP a la biomasa total del fitoplancton (%PPP) se contrastó con los estudios de Bell & Kalff (2001) y Callieri, (2008). Si bien los datos recolectados en el presente trabajo son relativamente pocos como para sacar una conclusión definitiva, al juntar toda la información disponible ($n=456$) se observa una clara tendencia significativa a disminuir con el grado trófico (Tabla 1.2; Fig. 1.14). Es interesante destacar que, a pesar de esta tendencia general, muchos ambientes eutróficos presentaron valores de %PPP muy altos ($>40\%$), lo cual está en línea con lo planteado por Somogyi et al. (2017). Estos autores sugieren que esto podría estar explicado por una reducción en la presión de herbivoría y por un aumento de la turbidez inorgánica. Mas recientemente Somogyi et al. (2022) sugieren que una disminución de la presión de depredación a causa del aumento de la turbidez explicaría una reducción relativa de alimentos disponibles (i.e. fitoplancton) en comparación con partículas inorgánicas no ingeribles. Cuando la concentración de sedimento suspendido excede el umbral por debajo del cual el zooplancton puede

filtrar de manera efectiva, los organismos podrían morir de inanición incluso con una gran abundancia de alimentos disponible.

El aumento de PPP, tanto en abundancia absoluta como en %PPP, hacia el Ecuador se encuentra en concordancia con lo planteado por distintos autores (Reynolds et al., 2000; Reynolds, 2006; Sarmento, 2012) que argumentan que el PPP tiene tasas de crecimiento mayores que el fitoplancton más grande a altas temperaturas. Una de las posibles consecuencias de esto es que una parte significativa del carbono fijado por el fitoplancton fluiría a través de la vía heterotrófica (i.e. bucle microbiano) en lugar de la vía clásica (i.e. fitoplancton -> zooplancton), incrementándose la cantidad de intermediarios hasta llegar al zooplancton y disminuyendo así la eficiencia trófica del sistema.

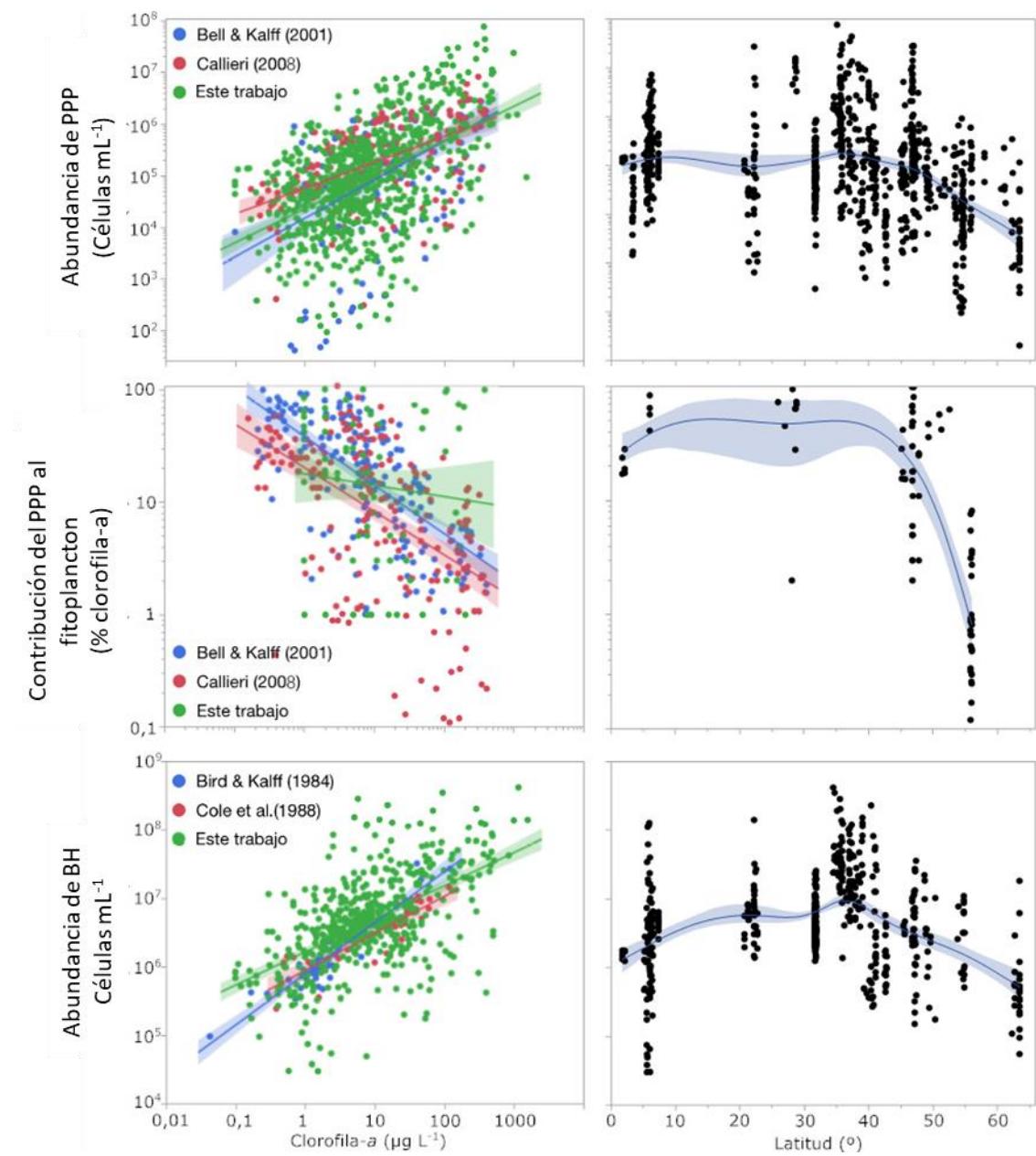


Figura 1.14. Relación entre abundancia de PPP, la contribución del PPP a la biomasa total del fitoplancton y la abundancia de BH en función de la concentración de clorofila-a y la latitud.

Tabla 1.2. Ecuaciones de regresiones realizadas para cada componente (PPP, % clorofila-a del PPP, BH). Todas las variables fueron transformadas a Log_{10} . Se observa una relación significativa cuando $P < 0.05$.

Fuente	Intercepto	Pendiente	R ²	P	n
PPP					
Bell & Kalff (2001)	4,16	0,74	0,25	<0,01	137
Callieri (2008)	4,74	0,50	0,20	<0,01	153
<i>Este trabajo</i>	4,35	0,66	0,26	<0,01	833
Todos los datos	4,37	0,66	0,26	<0,01	1123
% Clorofila-a del PPP					
Bell & Kalff (2001)	1,58	0,43	0,44	<0,01	174
Callieri (2008)	1,31	0,38	0,30	<0,01	192
<i>Este trabajo</i>	1,08	0,19	0,03	0,08	90
Todos los datos	1,39	0,38	0,22	<0,01	456
BH					
Bird & Kalff (1984)	5,89	0,74	0,85	<0,01	47
Cole et al. (1988)	5,94	0,54	0,77	<0,01	32
<i>Este trabajo</i>	6,38	0,16	0,31	<0,01	572
Todos los datos	6,16	0,51	0,36	<0,01	651

Al igual que las PPP y las Pcy, las BH también mostraron una relación positiva y significativa con la clorofila-a (Tabla 1.2; Fig. 1.14). El incremento de bacterias a medida que aumenta el grado trófico es una relación bien conocida desde hace décadas (Bird & Kalff, 1984; Cole et al., 1988; Gasol & Duarte, 2006; Li et al., 2004; Sarmento, 2012; White et al., 1991). En nuestro caso, tanto el R² como la pendiente fueron un poco menores que los trabajos previos de Bird & Kalff (1984) y Cole et al. (1988) (Tabla 1.2). Esto puede deberse a la mayor heterogeneidad de datos obtenidos en el presente estudio en relación a revisiones anteriores. En particular, a una mayor cantidad de datos provenientes de latitudes bajas que suelen

estar subrepresentados en las bases de datos, o directamente ausentes. De hecho, cuando analizamos la respuesta de las BH a la latitud, se observa que presentan un máximo a los 40° y luego su abundancia tiende a disminuir hacia el Ecuador (Fig. 1.14). El análisis de GAM arroja una tendencia similar, con un máximo en las latitudes templadas y una disminución hacia el Ecuador y hacia los polos (Fig. 15). Algunos autores observaron que la abundancia de bacterias suele ser menor en los trópicos, en comparación con ambientes templados de igual grado trófico (Segovia et al., 2016), y postulan que probablemente se deba a una mayor presión de bacterivoría en los sitios más cálidos.

La latitud es una variable que afecta indirectamente el crecimiento de los microorganismos, ya que se encuentra íntimamente relacionada con otras variables abióticas determinantes como temperatura y la irradiancia. De acuerdo a la Teoría Metabólica de la Ecología (Brown et al., 2004), temperaturas más elevadas inducen tasas metabólicas más altas, y las BH no son la excepción a esta regla. Sin embargo, si bien la producción bacteriana es mayor en los trópicos que en regiones templadas, la eficiencia de crecimiento bacteriana disminuye, es decir la proporción de carbono tomado por las bacterias que es convertido a biomasa tiende a disminuir (Amado et al., 2013). En este sentido, si bien las bacterias presentan tasas de crecimiento más elevadas a temperaturas más altas (Sarmento et al., 2010), también los protistas depredadores demandan más energía para poder satisfacer sus requerimientos, por lo tanto, consumen más bacterias. Es decir, que ambas medidas metabólicas aumentan con la temperatura, sin embargo, la pendiente de la tasa de depredación es mayor (Sarmento et al., 2010), lo que resulta en una disminución de la producción bacteriana neta y por lo tanto en menor abundancia de bacterias. De hecho, la abundancia de BH ponderada por la concentración de clorofila-a tiende a disminuir hacia el Ecuador (Fig. 1.16).

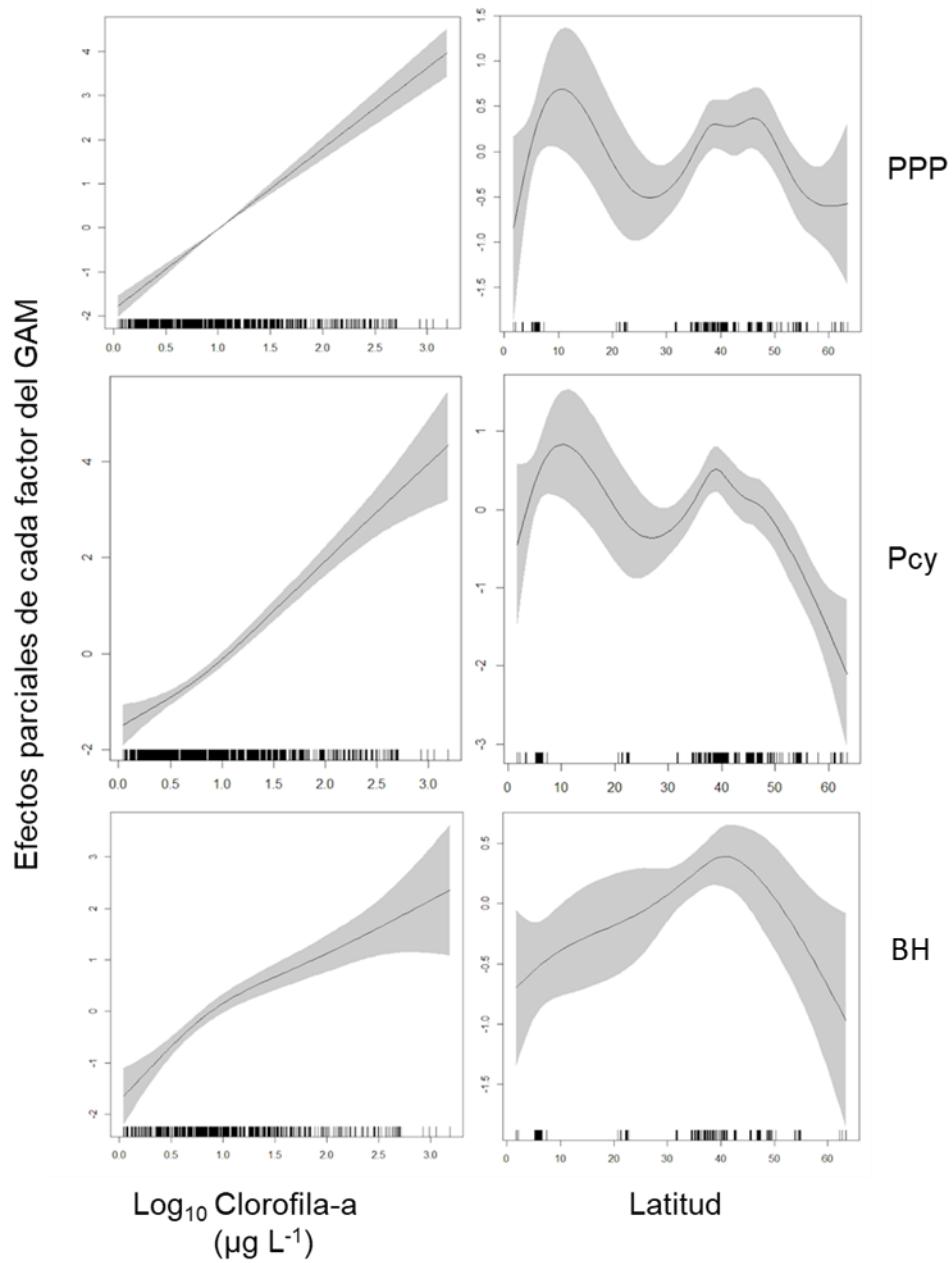


Figura 1.15. Efectos parciales de la latitud y la concentración clorofila-a sobre la biomasa (ngC mL^{-1}) de PPP, Pcy y BH aplicando modelos aditivos generalizados (GAM). Las regiones sombreadas representan intervalos de confianza del 95% de la función *smooth spline*.

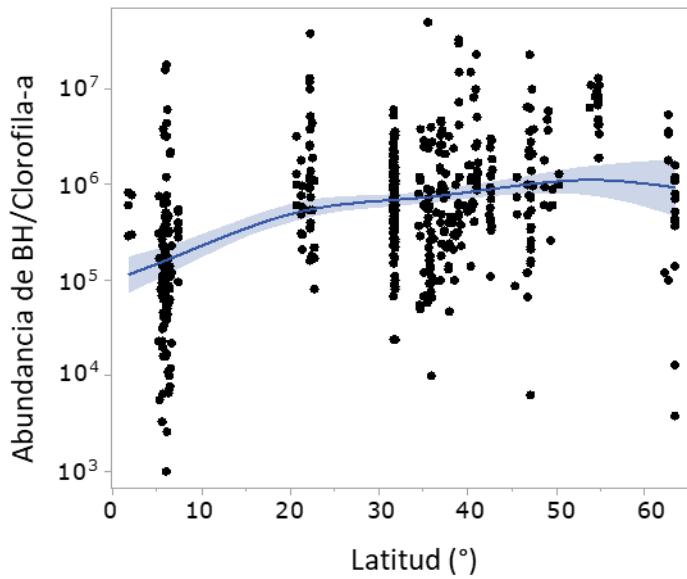


Figura 1.16. Abundancia de bacterias heterótrofas (BH, células mL^{-1}) ponderada por la concentración de clorofila-a ($\mu\text{g L}^{-1}$) con respecto a la latitud ($^{\circ}$).

Tabla 1.3. Resultados de los modelos aditivos generalizados (GAM). Para modelar la biomasa se escogió la familia quasipoisson (link='log') y se usó la distribución gaussiana para otras variables dependientes. Prok = Pcy+BH. Los asteriscos *, ** y *** denotan los valores P de cada término suavizado siendo <0,05, <0,01 y <0,001 respectivamente; ns: no significativo.

Modelo	Variables explicativas		
	Latitud	Clorofila-a	R^2
Biomasa PPP	***	***	0,13
Biomasa Pcy	***	***	0,11
Biomasa BH	**	***	0,24
PPP/BH	***	ns	0,06
%Pcy/PPP	***	**	0,17
%Pcy/Prok	***	***	0,32

En concordancia con los resultados obtenidos para cada grupo picoplancótico por separado, los análisis de GAM de las relaciones entre los componentes fototróficos y heterotróficos del picoplancton (Fig. 1.17, Tabla 1.3), muestran que existe una tendencia a aumentar la importancia relativa del PPP hacia el ecuador en relación a las BH, especialmente de las Pcy (dado que los resultados de PPP/BH y Pcy/BH fueron similares, se muestra solo los resultados del primer cociente). Por otro lado, la relación Pcy/PPP también tiende a aumentar hacia las zonas tropicales (Fig. 1.17), lo que coincide con nuestra hipótesis (Fig. 1.6) y con lo observado en el océano por Flombaum et al. (2020). Estos autores sugieren que esto podría deberse a que algunas Peuk muestran fotoinhibición a niveles elevados de irradiancias, pero mantienen tasas de crecimiento intermedias. Asimismo, otros autores han demostrado que las Peuk pueden adaptarse en respuesta a distintos niveles de irradiancia (Kulk et al., 2012; Rodríguez et al., 2005; Six et al., 2008).

El aumento de la importancia relativa de las Pcy hacia el Ecuador, tanto en relación a las BH como al PPP, tiene relevancia desde el punto de vista de la transferencia de materia y energía a través de las tramas tróficas desde los organismos más pequeños y abundantes en la base hasta los organismos más grandes y escasos en niveles superiores (Dossena et al., 2012). Un incremento de la importancia relativa de las Pcy sugiere que, en ambientes tropicales, la presión de depredación sobre las Pcy cobraría mayor relevancia que la bacterivoría (BH).

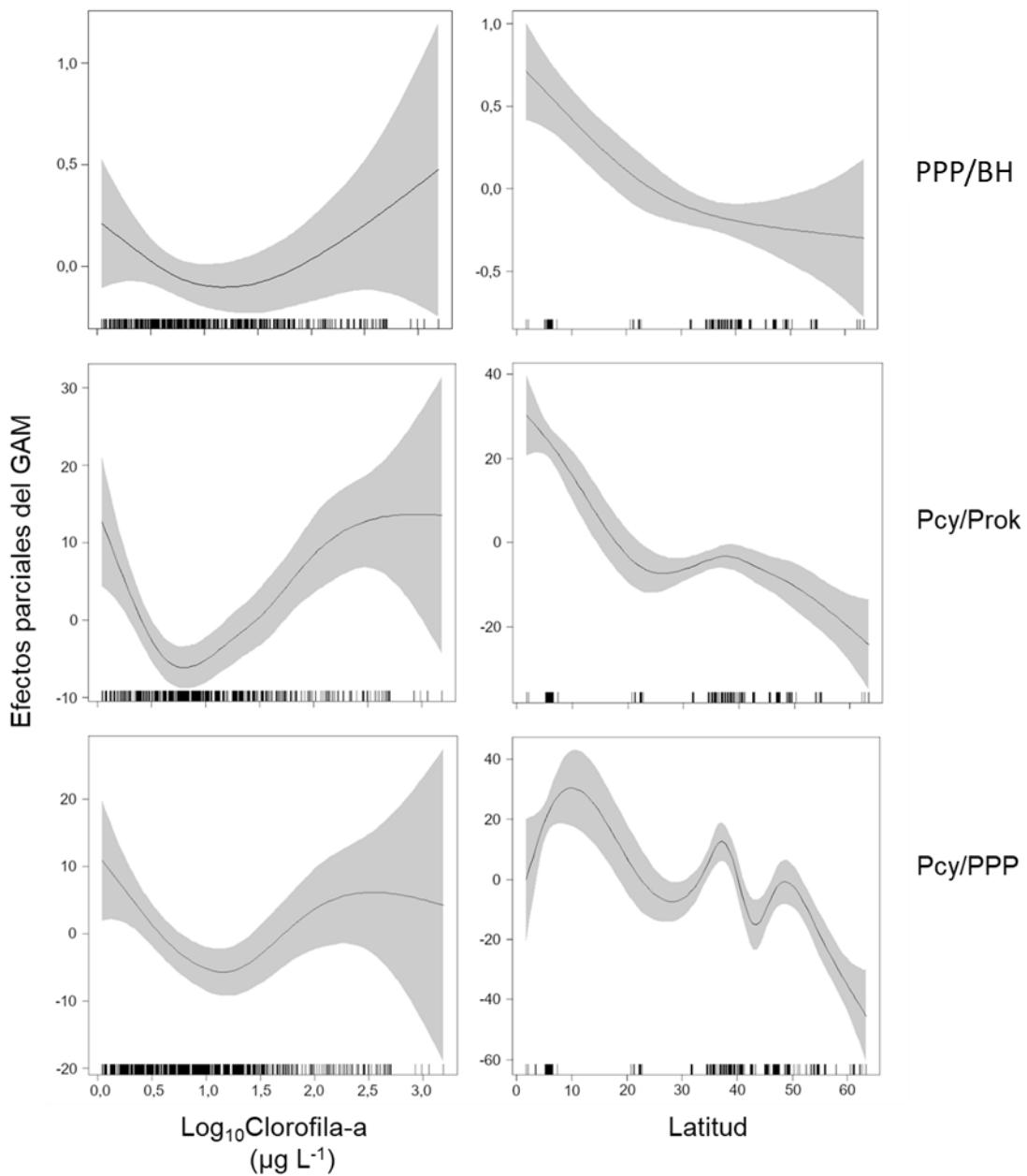


Figura 1.17. Efectos parciales de la latitud y el grado trófico (clorofila-a) sobre las contribuciones de la biomasa de distintos representantes del picoplancton aplicando GAM.

Relación PC- y PE- Pcy con la transparencia (Kd)

En este trabajo se observó que PC-Pcy y PE-Pcy responden al gradiente esperado de acuerdo a lo propuesto por Stomp et al. (2007b) donde la biomasa relativa de PC-Pcy aumenta en sitios turbios, mientras que las PE-Pcy aumentan en sitios más transparentes, es decir con menor Kd (Fig. 1.18). Las Peuk presentaron una biomasa relativa promedio de alrededor de 40% en ambientes con un $Kd < 2 \text{ m}^{-1}$ (i.e. oligo-mesotróficos), disminuyendo levemente hacia ambientes más turbios. Sin embargo, a diferencia de las PE-Pcy y PC-Pcy, y de lo planteado en la hipótesis 5 (Fig. 1.8), las Peuk están presentes a lo largo de todo el gradiente de transparencia sin mostrar una clara dominancia en ninguna condición lumínica.

Una posible explicación podría estar en la capacidad de fotoaclimatación que poseen algunas Peuk en respuesta a la irradiancia recibida. Existen básicamente dos tipos de adaptación, la tipo- n es una estrategia generalista que permite que las Peuk exploten un amplio rango de irradiancias mediante cambios en el número de centros de reacción del fotosistema II, mientras que la tipo- σ modula el tamaño de antena de la sección transversal del fotosistema II la cual confina a Peuk a un reducido rango de irradiancias (Dimier et al., 2009; Six et al., 2008). Ambas, estrategias podrían favorecer la permanencia de las Peuk a lo largo de todo el gradiente.

Otra posible explicación para el patrón observado en las Peuk es que este grupo contiene organismos muy diversos, pertenecientes no solo a especies diferentes, sino a linajes evolutivos muy distantes, y posiblemente con preferencias ambientales diferentes, y distinto aprovechamiento de la energía lumínica. Es altamente probable que distintos taxones se distribuyan de manera diferencial a lo largo de un gradiente de calidadpectral de la luz, tal como fue observado en ambientes marinos para distintos ecotipos de Pcy (Grébert et al., 2018; Holtrop et al., 2021).

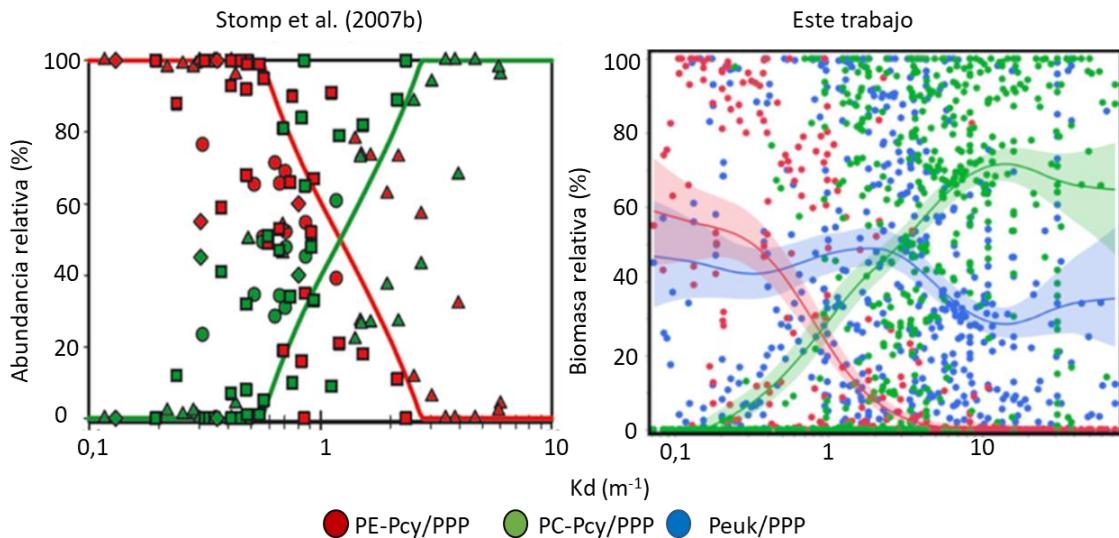


Figura 1.18. Abundancia relativa de los distintos componentes del PPP (PE-Pcy, PC-Pcy y Peuk) con respecto a la transparencia. A la izquierda el trabajo presentado por Stomp et al. (2007b) y a la derecha los datos recolectados de este trabajo transformados a biomasa. Ajuste realizado mediante LOESS.

Por otro lado, si bien existe cierta congruencia entre la transparencia y la composición espectral de la luz debajo del agua (i.e. en ambientes oligotróficos y transparentes dominan las longitudes de onda cortas dentro del PAR, mientras que en sitios eutróficos y turbios las longitudes de onda más largas), en la figura 1.18 no se está analizando estrictamente la calidad de luz sino la transparencia del agua. Sin embargo, los datos que tenemos disponibles sobre composición espectral y composición de PPP ($n=49$) muestran el mismo patrón hasta ahora observado: valores de Kd_{red}/Kd_{green} bajos (i.e. mayor proporción de luz roja) dominados por PC-Pcy, valores altos (mayor proporción de luz verde) dominados por PE-Pcy y Peuk presentes en todo el gradiente con una media de aprox. 30-40% sin una tendencia clara (Fig. 1.19).

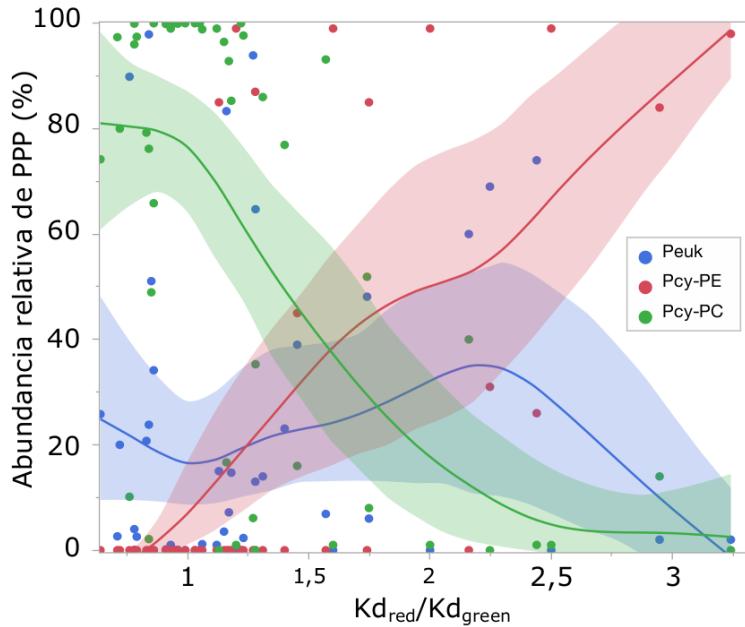


Figura 1.19. Importancia relativa de cada componente de PPP con respecto a la calidad de luz (Kd_{red}/Kd_{green}).

Patrón Temporal de Pcy

Al analizar la variación temporal de las Pcy en 39 lagos se observó en primer lugar que no todos los ambientes presentan el mismo patrón estacional. En ambientes templados del hemisferio norte los máximos de abundancia ocurren normalmente en primavera o verano, y pueden llegar a $1,8 \times 10^6$ células mL^{-1} . En algunos casos se observa un patrón bimodal, aunque siempre circunscripto a las épocas cálidas del año. Durante las épocas más frías las abundancias descienden abruptamente, inclusive llegando a ser en muchos casos indetectable.

Por otro lado, en ambientes tropicales (Sarmento, 2012) si bien existen épocas de lluvias y de sequías, las Pcy presentan fluctuaciones a lo largo del año asociadas a estos eventos, no se observa una marcada temporalidad en la abundancia de Pcy. Por el contrario, las Pcy presentan abundancias elevadas durante todo el año (entre 10^4 y 10^6 células mL^{-1}).

A diferencia de los ambientes templados del hemisferio norte, las Pcy en las lagunas pampeanas presentaron abundancias permanentemente elevadas durante todo el año (siempre $>10^6$ células mL $^{-1}$). Los máximos se registran usualmente durante los meses más fríos (Fig. 1.20). Además, estas lagunas presentan concentraciones de abundancia claramente más altas que el resto de lagunas analizadas cuyos máximos no superaron nunca 10 6 células mL $^{-1}$. Este patrón también fue observado de forma recurrente en un estudio de largo término llevado a cabo en la laguna Chascomús, donde se analizó la abundancia de las Pcy a lo largo de 10 años (Quiroga et al., 2021). Salvo aquellos años excepcionalmente lluviosos o excesivamente secos, los máximos de Pcy siempre ocurrieron en invierno.

Como se discute más adelante en el Capítulo II de esta Tesis, este patrón ocurre a pesar de que las tasas de crecimiento de las Pcy se incrementan con la temperatura. Una posible explicación a este hecho podría ser la existencia de un efecto *top-down* que impida a las Pcy alcanzar las abundancias esperables para épocas cálidas. En este sentido, los rotíferos, el componente del zooplancton más abundante de estas lagunas y que presentan tasas de depredación significativas (Capítulo III: Parte I de esta Tesis), presentan una variación estacional exactamente opuesta a las Pcy. Es decir, que los máximos de rotíferos coinciden con los mínimos de las Pcy.

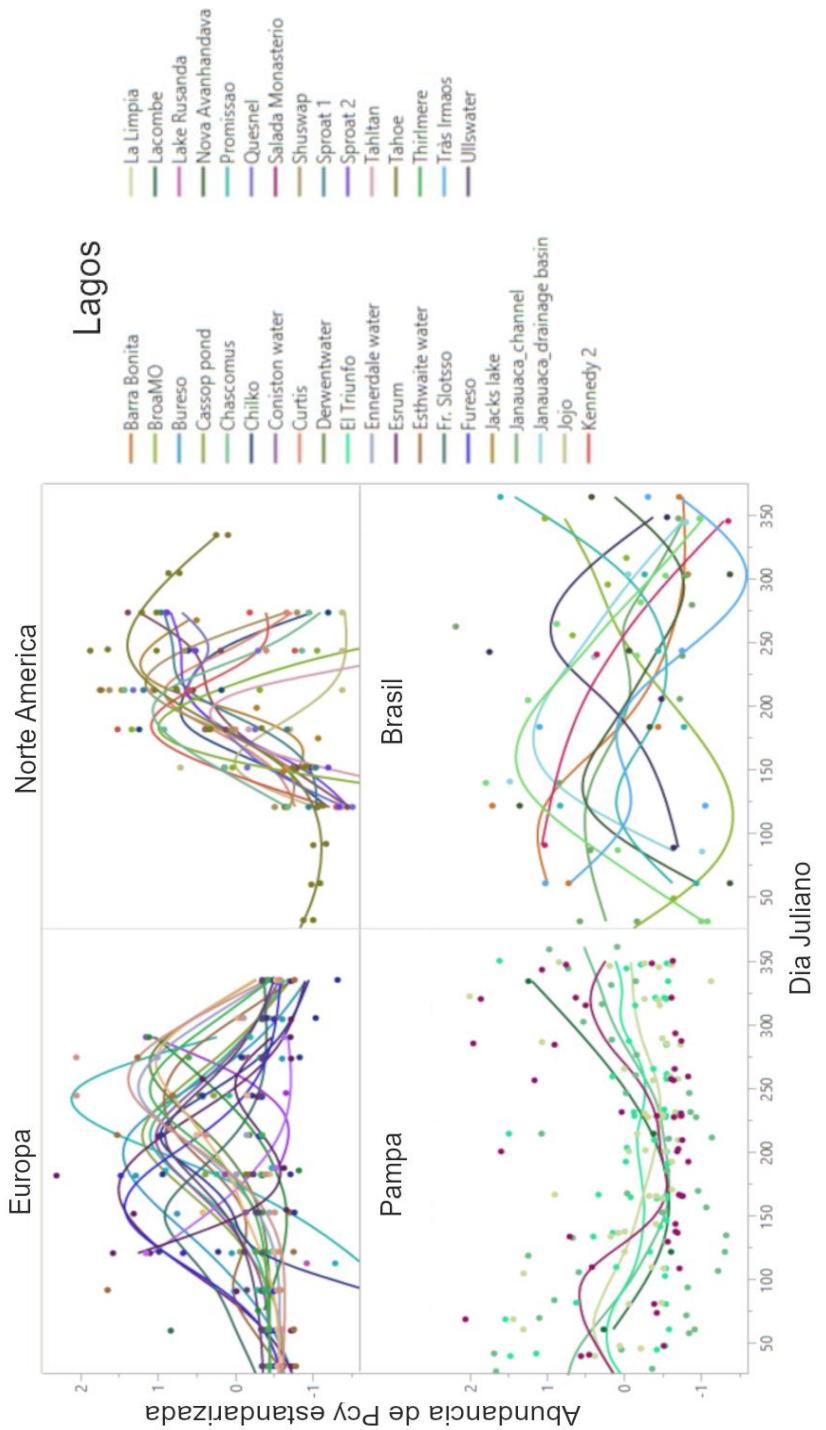


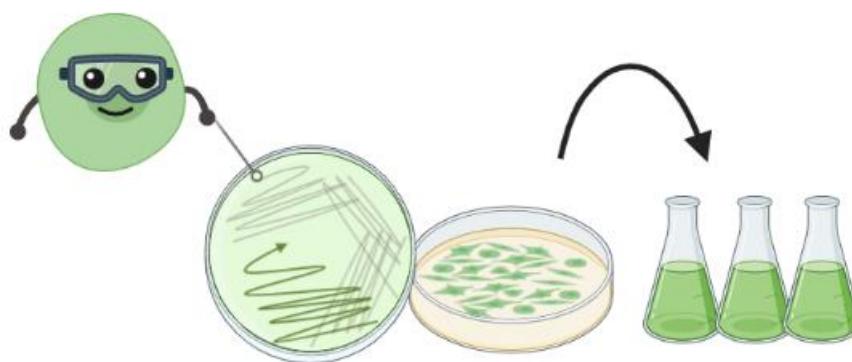
Figura 1.20. Variación temporal de la abundancia de Pcy (células mL^{-1}) estandarizada (a cada valor de abundancia se le restó el valor medio para ese ambiente y se dividió por la desviación estándar). Arriba: serie de lagos y lagunas recolectadas de la región europea y norteamericana, abajo: lagunas pampeanas y brasileras. Para una mejor visualización de los resultados, las fechas del hemisferio sur (HS) fueron corregidas para hacer coincidir los equinoccios de ambos hemisferios, de esta forma el 1-ene del HS correspondería al día 183. Se grafica la línea de tendencia para cada ambiente.

Conclusiones

- La abundancia del PPP y BH aumenta de forma directa con el grado trófico, aunque la pendiente del PPP es mayor, resultando en una mayor importancia relativa del PPP respecto a las BH en sitios más eutróficos.
- La contribución del PPP a la biomasa del fitoplancton total tiende a disminuir conforme aumenta el grado trófico, aun así, en muchos sitios eutróficos puede llegar a representar una fracción significativa (>40%) de la biomasa fitoplanctónica total.
- La importancia relativa de las Pcy se incrementa hacia el Ecuador, en función de las PPP, Peuk y de las BH.
- Dentro de las PPP, las PE-Pcy solo estuvieron presentes y dominaron ambientes más transparentes y las PC-Pcy solo en ambientes turbios. Las Peuk estuvieron presentes a lo largo de todo el gradiente de transparencia, con una abundancia relativa un poco mayor en ambientes con $Kd_{PAR} < 2 \text{ m}^{-1}$.
- La abundancia relativa de los tres componentes del PPP en función de la composición espectral de la luz (i.e. Kd_{red}/Kd_{green}), mostró un patrón similar al observado para el Kd_{PAR} : valores bajos (i.e. mayor proporción de luz roja) estuvieron dominados por PC-Pcy, valores altos (mayor proporción de luz verde) dominados por PE-Pcy, mientras que las Peuk estuvieron presentes en todo el gradiente con una media de aprox. 30-40% sin una tendencia clara.

CAPÍTULO II: PARTE I

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PICOEUCARIOTAS FOTOSINTÉTICOS



Created in BioRender.com 

Introducción

Los experimentos de laboratorio con cepas aisladas de los lagos son una herramienta muy poderosa que permite arribar a conclusiones acerca de la ecología y fisiología de estos organismos, y a su vez permite inferir acerca de su presencia en ambientes naturales. Existen distintas técnicas para aislar organismos fitoplanctónicos, entre las más empleadas se encuentran la dilución seriada, el aislamiento por separación celular mediante micropipeta, aislamiento de colonias en placas de agar, aislamiento por sonicación, *cell-sorting* por citometría de flujo, entre otros (Andersen & Kawachi, 2005). En este capítulo se abordarán dos de estas técnicas comúnmente utilizadas para el aislamiento de cultivos que son la separación celular por citometría de flujo y el cultivo en placas de agar.

La separación celular o *cell-sorting* consiste en la separación física de subpoblaciones de células de interés a partir de una muestra de agua natural. Para esto se utiliza un citómetro de flujo que separa las subpoblaciones de forma electrostática (Fig. 2.1). Primeramente, se selecciona la población que se desea separar en base a sus características de dispersión de la luz (SSC) y de fluorescencia (para más información sobre citometría de flujo ver introducción general: “Métodos de identificación del PPP”). Posteriormente, las células de interés son cargadas eléctricamente, y estas son separadas del resto, las cuales son colectadas en tubos Eppendorf o en placas de cultivo (Crosbie et al., 2003b; Marie et al., 2010).

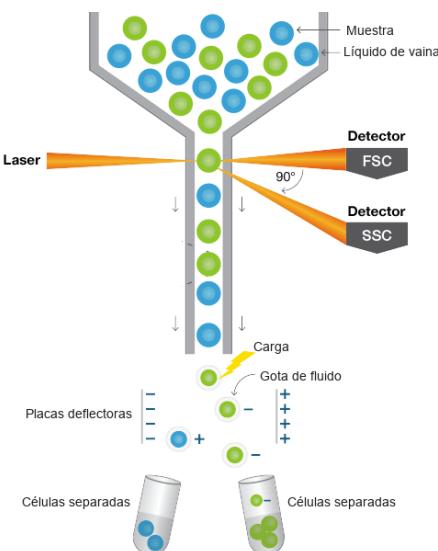


Figura 2.1. Esquema de la técnica de separación celular mediante citometría de flujo. Imagen tomada y modificada de <https://www.bio-rad.com/featured/en/flow-cytometer.html>

El aislamiento en medio de cultivo sólido es un método muy utilizado desde hace décadas para aislar algas cocoides y algas de suelo, es adecuado no solo por la facilidad de uso sino también porque se pueden establecer cultivos axénicos directamente con tratamientos adicionales. La concentración de agar por lo general varía entre 0,8 a 2%. El aislamiento se logra al esparcir la muestra sobre la superficie del agar. El ansa se carga con una pequeña cantidad de muestra y luego se extiende por todo el agar de diferentes maneras, ya sea por diseminación en medio sólido, agotamiento de ansa, dilución previa o extensión en superficie con espátula de Drigalski, entre otros (Fig. 2.2). Al principio suelen quedar demasiadas células juntas, pero a medida que aumenta la distancia entre ellas, células individuales van quedando separadas a partir de las cuales se forman colonias. Cada colonia corresponde a un cultivo crecido a partir de una sola célula. El tiempo de incubación varía desde unos pocos días para algas de agua dulce y del suelo, hasta varios meses para especies marinas (Andersen & Kawachi, 2005). Una vez que se presenten algunas colonias, se procede a aislarlas del agar removiendo con un ansa. Cuando ésta toca la colonia, algunas células van a quedar pegadas a la punta del ansa y esta es rápidamente introducida en un recipiente estéril con medio de cultivo fresco.



Figura 2.2. Cultivo de Peuk aislada de la laguna de Chascomús en medio de cultivo agarizado.

Objetivo

El objetivo de este apartado fue aislar cepas de algas picoeucariotas (Peuk) de la laguna Chascomús y caracterizarlas desde el punto de vista morfológico y molecular.

Materiales y Métodos

Para realizar los aislamientos se combinaron técnicas de separación celular por citometría de flujo y aislamiento en placas. Se recolectó agua de la laguna de Chascomús la cual fue previamente filtrada por una red de 50 μm para remover células grandes que pudieran interferir en el flujo de células del citómetro. Las muestras se tomaron en crioviales y se preservaron en frío para su posterior plaqueo en medio de cultivo agarizado. Se utilizó un citómetro de flujo FACS Aria II (Becton-Dickinson) equipado con láser azul (emisión 488nm) y láser rojo (633nm). Como fluido se utilizó PBS estéril, y previo al procesamiento de la muestra el equipo se esterilizó según el protocolo propuesto por McIntyre et al. (2010). Primeramente, se identificaron las Peuk en un gráfico FL3-SSC (Fig. 2.3). Como estándar interno se utilizó una solución de microesferas de látex fluorescentes (Fluospheres®, 1 μm yellow-green fluorescent 505/515, Molecular Probes), de tamaño y fluorescencia constante, la cual fue adicionada a cada muestra antes de ser analizada.

La población seleccionada se separó utilizando el criterio *purity precision mode* del citómetro. Las células fueron recolectadas en Eppendorfs que contenían medio de cultivo MWC (Modified Wright's Cryptophyte) (Guillard & Lorenzen, 1972). Se colectaron entre 500 y 1500 células de Peuk en cada tubo. Del procedimiento anterior, algunas de las muestras separadas se mantuvieron a 20°C, 11 μmol fotón $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un ciclo de fotoperíodo de luz-oscuridad de 12:12 h y se fue monitoreando su crecimiento mediante microscopía de epifluorescencia. Las muestras previamente aisladas por *cell sorting* y crecidas en medio líquido fueron repicadas en un flujo laminar (Biotraza BBS-V800) y bajo mechero, en placas de Petri con medio de cultivo MWC con agar 0,8%. Una vez identificadas las colonias de Peuk se procedió a traspasar a medio líquido para aumentar su densidad.

Una vez aislados, los cultivos de Peuk fueron monitoreados mediante citometría de flujo con un FACSCalibur de 4 colores (Becton Dickinson, USA). Además, fueron caracterizados morfológicamente con microscopio de campo claro y epifluorescencia Nikon Eclipse 80i. Cada cepa fue fotografiada con una cámara digital color Nikon DS-Fi1 a 1000x con una resolución de 20 pixels μm^{-1} . El tamaño

medio de cada cepa fue estimado midiendo entre 22 y 30 células, utilizando el programa de análisis de imágenes Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics). El biovolumen fue estimado aproximando la forma de las células a modelos geométricos (Hillebrand et al., 1999).

Se analizó el espectro de absorción de cada cepa utilizando un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS de doble haz. Para esto los cultivos fueron filtrados por filtros GF/F hasta que tomaron color verde. Se realizó un escaneo de cada filtro de 380 a 750 nm calibrado contra un blanco representado por un filtro GF/F donde se filtró agua destilada.

La extracción del ADN genómico de las cepas aisladas se realizó siguiendo el protocolo de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Fernández Zenoff et al., 2006). Un fragmento del gen ribosomal 18S fue amplificado mediante PCR, con primers específicos para eucariotas 528F (5'-GCGGTAATTCCAGCTCCAA-3') y EUKR (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3') (Elwood et al., 1985; Medlin et al., 1988). Las condiciones de temperatura de amplificación consistieron en una desnaturización inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, alineamiento a 54°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por un minuto, seguido de una extensión final de 72°C por un minuto, finalmente se conservó la reacción a 12°C por tiempo indefinido. El producto de PCR fue enviado a secuenciar por el método Sanger a MACROGEN (Seoul, South Korea). Para el procesamiento y ensamble de las secuencias F y R se utilizó el programa Mega11 (Tamura et al., 2021). Se analizó la similitud de las secuencias obtenidas con el banco de genes NCBI (por sus siglas en inglés “National Center for Biotechnology Information”) utilizando BLAST (Altschul et al., 1990).

Finalmente, y de acuerdo a los resultados del BLAST, se construyó un árbol filogenético del género *Choricystis*. Para esto se descargaron del NCBI las secuencias afiliadas a este género junto con otras tres secuencias de Mamiellophyceae que fueron utilizadas como *outgroup*. Las secuencias descargadas se alinearon junto con las secuencias de los cultivos utilizando MAFFT V7.511 (Katoh et al., 2018). El alineamiento fue editado con AliView (Larsson, 2014). El árbol filogenético se construyó con el software IQTree V 1.6.12 (Nguyen et al.,

2015) con la opción de detección automática del mejor modelo para el alineamiento, que resultó ser Tne+R2, de acuerdo con el criterio Bayesiano BIC. El soporte estadístico de cada rama se analizó usando 1000 bootstrap con el comando -alrt.

Resultados

Se lograron aislar tres cultivos de Peuk, los cuales fueron identificados con el código CH-P2, CH-P3 y CH-P5. Los tres cultivos se encuentran depositados en el cepario del Laboratorio de Ecología Acuática del INTECH (Fig. 2.3).



Figura 2.3. Los tres cultivos de Peuk conservados en medio líquido MWC. De cada cultivo repicado se conservan dos generaciones anteriores.

Las células de las tres cepas aisladas presentaron forma esferoide con un largo promedio $<2\mu\text{m}$ (Tabla 2.1). La cepa CH-P5 es levemente más alargada que

las otras dos cepas (Figuras 2.4, 2.5, 2.6), mientras que la señal citométrica en los tres casos es prácticamente idéntica.

Tabla 2.1. Dimensiones de los tres cultivos de Peuk aislados de la laguna Chascomús. DS= desvío estándar

	Largo (μm)		Ancho (μm)		Volumen (μm ³)		n
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	
CH-P2	1,69	0,13	0,95	0,12	0,814	0,224	30
CH-P3	1,82	0,16	0,96	0,13	0,904	0,299	28
CH-P5	1,35	0,16	0,74	0,12	0,401	0,135	22

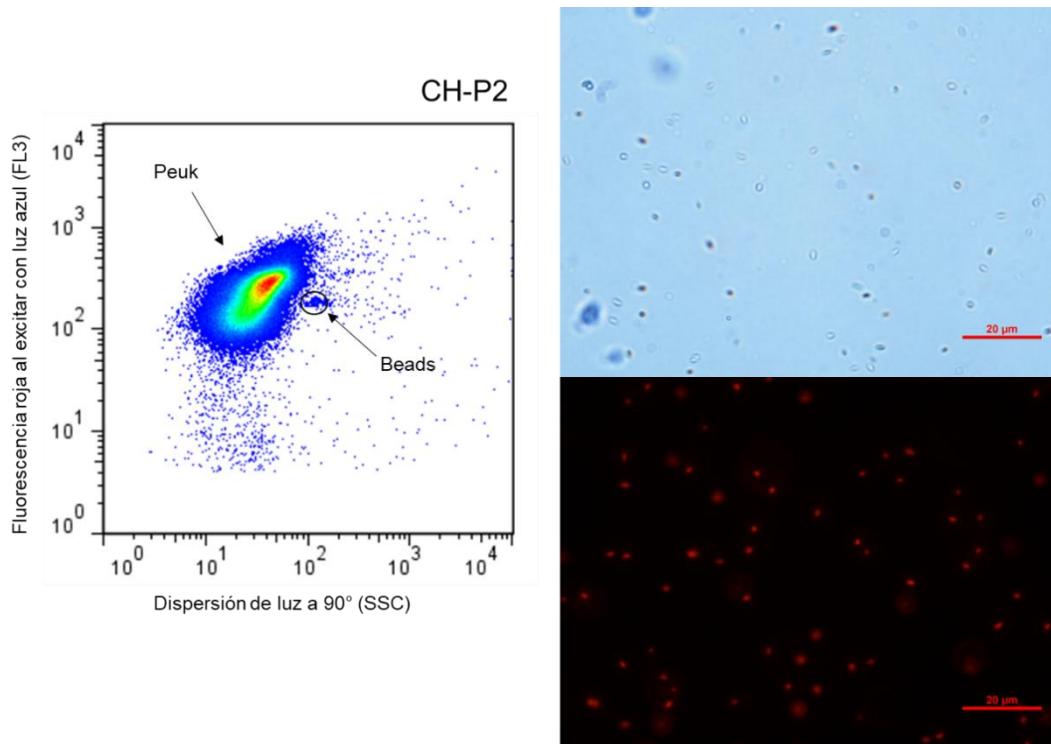


Figura 2.4. Cepa de Peuk CH-P2 observada mediante citometría de flujo, y microscopía de campo claro y epifluorescencia.

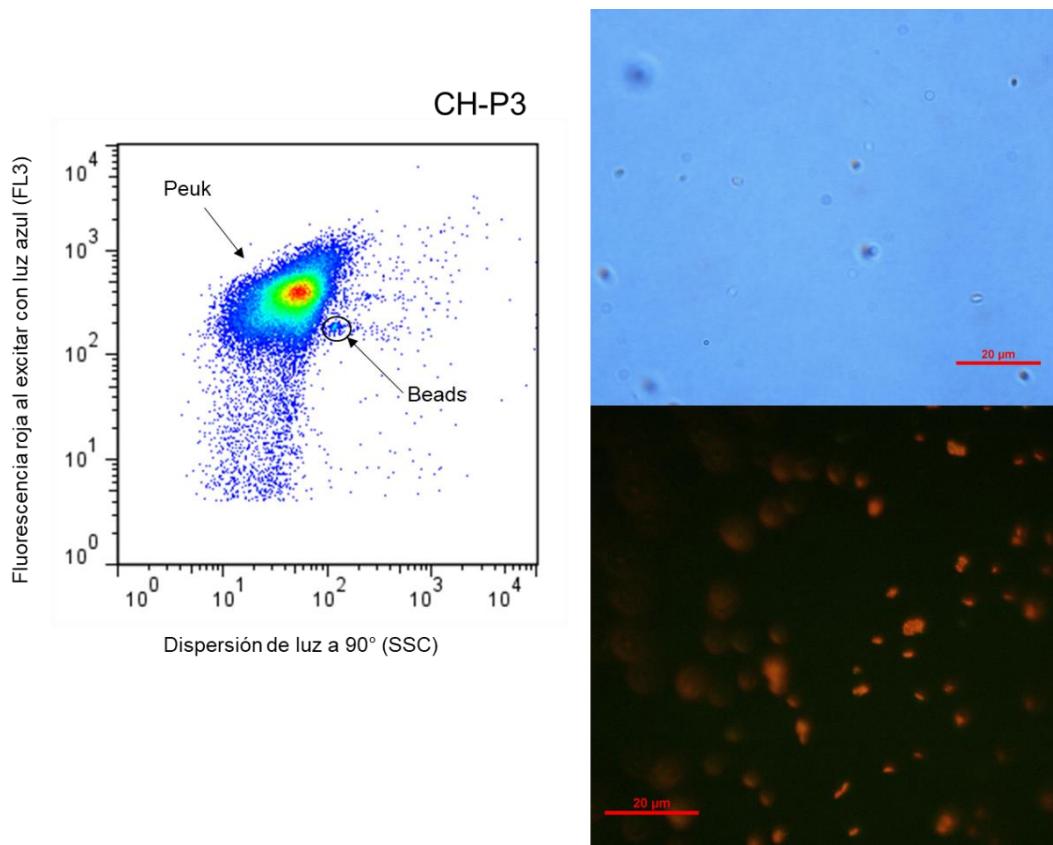


Figura 2.5. Cepa de Peuk CH-P3 observada mediante citometría de flujo, y microscopía de campo claro y epifluorescencia.

Los espectros de absorción de los tres cultivos fueron similares (Fig. 2.7), lo que sugiere que todos poseen los mismos pigmentos fotosintéticos. En particular se observan claramente los dos picos de absorción correspondientes a la clorofila-a y los dos de la clorofila-b.

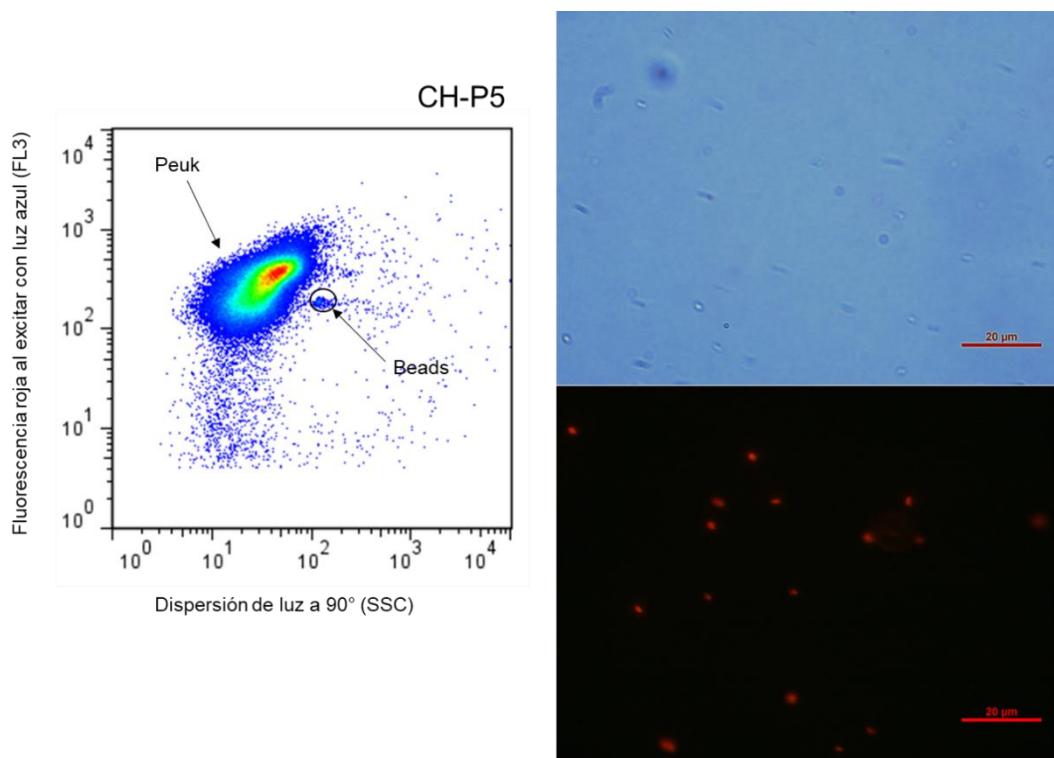


Figura 2.6. Cepa de Peuk CH-P5 observada mediante citometría de flujo, y microscopía de campo claro y epifluorescencia.

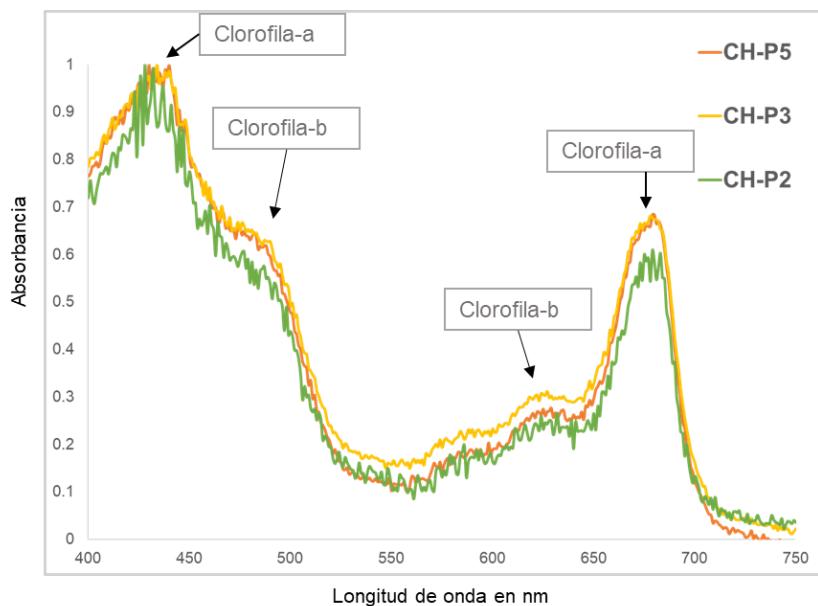


Figura 2.7. Espectro de absorción de los cultivos de Peuk aislados de la laguna de Chascomús.

De cada una de las cepas se logró secuenciar un fragmento de >1600 pb de la subunidad pequeña del gen ribosomal (ADNr 18S): 1672 bp (CH-P2), 1623 bp (CH-P3) y 1634 bp (CH-P5). Las tres secuencias de los cultivos presentan un porcentaje de similitud muy elevado entre sí >99.3% (Tabla 2.2). De hecho, el análisis de BLAST arrojó exactamente los mismos resultados para las tres secuencias, a modo de ejemplo se presenta la tabla con los taxones más cercanos para la cepa CH-P2 (Tabla 2.3) y el resumen gráfico del alineamiento con las secuencias más cercanas (Fig. 2.8).

En primer lugar, se observa que todas las cepas corresponden a la clase Trebouxiophyceae con una elevada afinidad (>99% de similitud) al género *Choricystis*. Por otro lado, es llamativo que el alineamiento con las secuencias más cercanas del gen ADNr 18S presenta una región de alrededor de 660 bp (entre las posiciones 545 y 1110 aproximadamente) que no se alinea con dicho gen. Es altamente probable que esta porción de ADN corresponda a un intrón. De acuerdo a Pröschold & Darienko (2020) la presencia de intrones en el gen ADNr 18S es común dentro de las Trebouxiophyceae, y en particular dentro de este género. Dicho intrón aparece en los tres cultivos secuenciados. Además, es interesante destacar que las diferencias encontradas entre los cultivos (Tabla 2.2) se encuentran exclusivamente en esta región, mientras que los extremos correspondientes al gen 18S propiamente dicho (las primeras 545 bases y las últimas 520 bases aproximadamente) son idénticas en los tres cultivos, lo que nos estaría indicando que las tres cepas aisladas corresponden muy probablemente a la misma especie.

Tabla 2.2. Similitud entre las tres secuencias de los cultivos.

	Nº de pares bases similares/total	% de similitud
CH-P2 vs CH-P3	1621/1630	99,45%
CH-P2 vs CH-P5	1632/1643	99,33%
CH-P3 vs CH-P5	1621/1623	99,88%

Tabla 2.3. Descripción de las secuencias más cercanos a la secuencia de la cepa CH-P2 alineados por el NCBI.

Descripción	% de cobertura	% de Identidad	Longitud secuencia	Accession number
<i>Choricystis</i> sp. NIES-4292	65%	100%	3182	LC472538.1
<i>Choricystis</i> sp. AS-29	65%	99.82%	1797	AY195972.1
Uncultured eukaryote clone 18S-Cisnes-OTE7	34%	99.45%	632	OL489760.1
Trebouxiophyceae sp. M-hakoo 311 strain	65%	99.27%	861458	CP089457.1
<i>Choricystis limnetica</i> strain SAG 251-2	65%	99.27%	2935	MT423986.1
<i>Choricystis</i> sp. AS 5-1	65%	99.27%	1791	AY195970.1
<i>Nannochloris</i> sp. SAG 251-1	65%	99.27%	1792	AB080306.1
<i>Nannochloris</i> sp.	65%	99.27%	2214	X81965.1
<i>Choricystis</i> sp. NIES-2342	65%	99.10%	1642	AB488587.1
<i>Choricystis</i> sp. Pic8/18P-11w	65%	98.90%	1797	AY197629.1

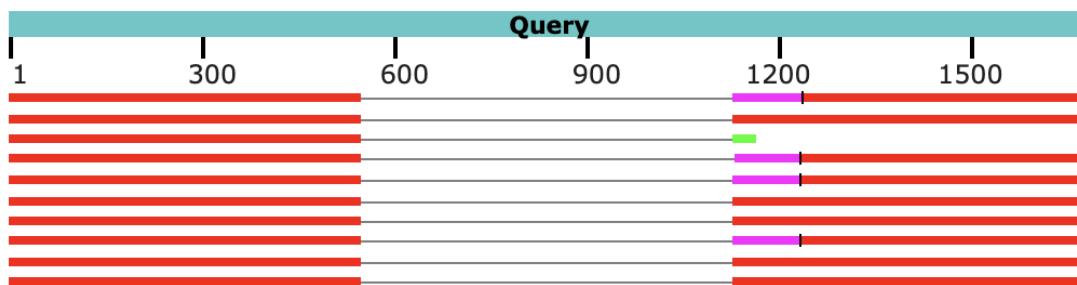


Figura 2.8. Resumen gráfico del alineamiento de las primeras secuencias del BLAT con la secuencia de la cepa CH-P2.

El árbol filogenético construido con nuestras secuencias junto con otras secuencias de *Choricystis* (Fig. 2.9) reproduce el árbol publicado por Pröschold & Darienko (2020). Estos autores, además de comparar las secuencias del gen ADNr 18S, realizaron un estudio exhaustivo del género *Choricystis* integrando información relacionada con la morfología, secuencia del gen ADNr 18S, haplotipos y estructura secundaria del ITS-2, y llegaron a la conclusión de que este género está compuesto por tres especies. En nuestro caso, las tres secuencias aparecen juntas dentro del clado correspondiente a *Choricystis krienitzii*, por lo que podemos concluir que las

cepas aisladas de la laguna Chascomús en el marco de esta Tesis corresponden a esta última especie.

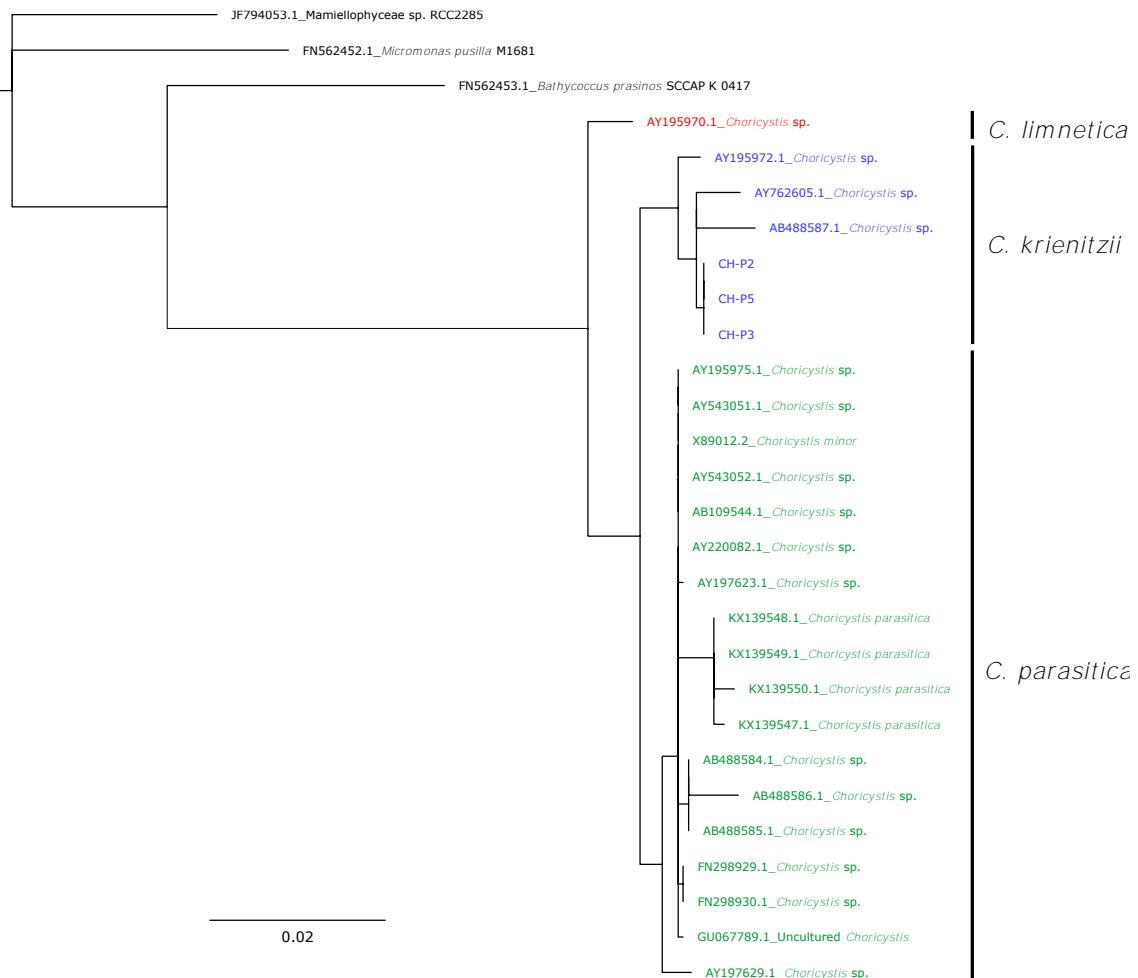


Figura 2.9. Árbol filogenético del género *Choricystis* construido con el gen ADNr 18S.

Las tres secuencias fueron incorporadas a la base de datos NCBI con los siguientes números de acceso: OQ509006 CH-P2, OQ509007 CH-P3 y OQ509008 CH-P5.

FASTA de las tres secuencias

>CH-P2

gctcgttagttggattcggcgccccctgccgtccgcctttggtgtgcactggcagggccctgctgccgggg
acgggctcctggcctcactgtccggactcggagtcggcgtggtaacttgagtaaattagagtgtcaaagcagg
cttacgctctgaatacattagcatgaaataacgcgataggactctggcctatctgtggctgtggaccggagtaat
gattaagagggacagtccggggcattcgtagttcattgtcagaggtgaaattctggattatgaaagacgaactact
gcgaaagcattgccaaggatgtttcattaatcaagaacgaaagtggggctcgaagacgattagataccgtcct
agtctcaaccataaacgatgccactagggattgggggtgtcccttgcacccccccagcaccttatgagaaat
caaagtttgggtccggggggagttatggcgaaggctgaaactaaaggaattgacggaagggcaccaccag
gcgtaaaaatgcttagccgcgtggccggagaccggcgtcgtactctggccgcgcacatggcgcggagg
cgacaccctcaaattgcggaaacgcctaaagctcgccgtaccaagcagcacattccgaaaggggctgtgg
ccgggtaacgacccaGGgTACGgttaacaaccgcgcgagatgcaccaatgggtacctgcagccaagtcc
accggcgggtcacaccgaccatggatgcagttcacagactaaatggaggtggcacagagaagaaacacaa
cttacacAAaaaacattcatcatggcactggcggttctgacgaccgttcttTGAAaGTGTttTtgttga
cggtgtggGacTtaaaaaaaaataaaaacaatgtcatAaattgcataaAtcaTttttATtttagtgcttaagata
tagtcggcccccaccgagagggtggcggcgaggaaaccggcgtcgccggggagagccgtcagcgt
cccgatagtactggcggcgcaagccgattcccgaggcctgaagtgcctggcgcacgcggaaaccagcggagc
ctgcggcttaatttgcactcaacacggaaaacttaccaggcgtccagacatagtgaggattgacagattgagagctt
tcttgattctatgggtgggtgcattggcggttcttagttgggtgccttgcagggtattccgtaacgaacgaga
cctcagccgtctaaatagtccggcttgggttcccgaggcgtactcttagaggactctcggygactagccgatgg
aagtgtgaggcgataacaggctgtgatgcccttagatgttctggccgcacgcgcgtacactgtgcaatcaac
gagcctaaccctggccgaaaggcggtaatctgtaaactgcacatcgatgggttagatttgcattttat
cttcaacgaggaatgccttagtaagcgcgattcatcagatcgcgtgattacgtccctgcccattgtacacaccgccc
tcgctccaccgattgggtgtgctggtaatgttggattggcggtgatggcggttcgcgcactctgc

>CH-P3

gctcgttagttggattcggcgccccctgccgtccgcctttggtgtgcactggcagggccctgctgccgggg
acgggctcctggcctcactgtccggactcggagtcggcgtggtaacttgagtaaattagagtgtcaaagcagg
cttacgctctgaatacattagcatgaaataacgcgataggactctggcctatctgtggctgtggaccggagtaat

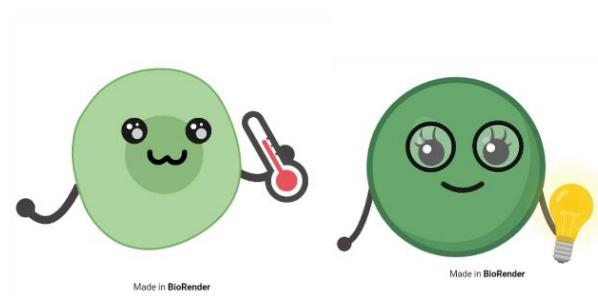
>CH-P5

gctcgtagttggattcggcgccccctgccggtccgcctttggtgtgcactggcagggtccgcctgctgccgggg
acgggctcctgggctcactgtccggactcgagtcggcgtggttacttgagtaaatttagagtgttcaaagcagg
cttacgctctgaatacattagcatgaaataacgcgataggactctggcctatctgttggctgtggaccggagtaat
gattaagagggacagtcggggcattcgtatttcattgtcagaggtgaaattcttgatttatgaaagacgaaactact
gcgaaagcattgccaaggatgtttcattaatcaagaacgaaagtggggctgaagacgattagataccgtcct
agtctcaaccataaacgatgccgactaggattgggggtgtcccttgcgtacccccccagcaccttatgagaaat
caaagtttgggtccggggagatgtgtcgcaaggctgaaacttaaggattgacggaagggcaccaccag
gcgttaaaatgcttagcgccagtggccggagaccggcgtcgtactctgccgcgcatacgccgcggagg
cgacaccctcaaattgcgggaaacgcctaaagctcgccgttaccaagcagcacattccgaaaggggctgtgg
ccggggtaacgaccaggtaacgatgcggccgttacccatgggttacctgcagccaaatgggttacctgcagccaaatgcctac

cggtcggtcacaccgaccatggatgcagttcacagactaaatggagggtggcacagaaaagaaacacaactt
acacAaaaacattcaacatggcgactggccgttcttgcacgaccgttctttgaaagtgtttgtggacgtgtgtgg
acttaaaaaaaaataaaaacaatgtcataattgcataatcattttattttagtgcttaagatatagtcggcccccaccga
gaggtggtcggcgggaggaaccggcgtcgcgcggggagagcccgctgagcgtcccgtatgtactggcg
gchgcaagccgattcccaggccctgaagtgcctggcgacgcggaccagcggagccctgcggcttaattgactc
aacacggaaaacttaccaggccagacatagtgaggattgacagattgagagctttcttgattctatgggtggtg
gtgcattggccgttcttagttgggtgggtgcctgtcaggtgattccggtaacgaacgagacctcagcctgctaaatag
tccggcttgggttctccagggtcgctgactcttagagggactctcggygactagccatggaagtgtgaggcgataac
aggctgtgatgcccttagatgttctggccgcacgcgcgtacactgatgcaatcaacgagcctaaccctggccgg
aaggccggtaatctgtgaaactgcatcgtgatggggctagattattgcaattattaaatcttcaacgaggaatgccta
gtaagcgcattcatcagatcgcgtgattacgtccctgcccattgtacacaccgcccgtcctaccgattgggtg
tgctggtaatgttgggatttg

CAPITULO II: PARTE II

EFFECTO DE LA INTENSIDAD DE LUZ Y LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO DE PICOCIANOBACTERIAS Y PICOEUCARIOTAS



Introducción

Tal y como se menciona en la introducción (ver “Patrones Globales”), en lagos templados oligo-mesotróficos la abundancia del PPP a lo largo del año suele presentar un patrón bimodal, con dos picos de abundancia en primavera y verano, dominados principalmente por Pcy (Stockner et al., 2000). Dicho patrón ha sido reportado para un amplio rango de lagos profundos y templados, y está relacionado fundamentalmente con la estratificación y las condiciones de mezcla de la columna de agua (Callieri & Piscia, 2002; Padisák et al., 1997; Søndergaard, 1991; Vörös et al., 1998; Weisse, 1988, 1993; Nwosu et al., 2021). En otros ambientes de características similares también se ha reportado un solo pico de abundancia en primavera (Fahnenstiel et al., 1991; Pick & Agbeti, 1991; Pantoja-Agreda & Otero-Morales, 2017). De acuerdo a estas evidencias, los picos máximos de abundancia de las Pcy siempre se presentan en los meses cálidos, mientras que las Peuk presentan sus picos de abundancia máxima en meses invernales (Fahnenstiel et al., 1991; Hepperle & Krienitz, 2001; Malinsky-Rushansky et al., 1995; Mózes et al., 2006; Porter et al., 1988; Søndergaard, 1991; Felföldi, 2020). Un patrón similar fue observado en el lago Kineret y en el lago somero Balaton (Malinsky-Rushansky et al., 1995). Pick & Agbeti (1991) observaron una relación positiva entre la biomasa de Peuk y el coeficiente de atenuación de la luz en ambientes oligotróficos y mesotróficos, lo que les permitiría, según estos autores, adaptarse a condiciones lumínicas desfavorables.

En lagos someros, eutróficos o hipereutróficos el PPP también presenta un patrón bimodal con un pico de abundancia generalmente en primavera (Mózes et al., 2006; Sime-Ngando, 1995; Vörös et al., 1991; Vörös et al. 2009). En estos ambientes, a menudo se observa una dinámica estacional del PPP donde las Pcy dominan en épocas de mayor temperatura y las Peuk tienden a dominar en meses más fríos (Callieri, 2008; Somogyi et al., 2009).

En las lagunas pampeanas, naturalmente eutróficas y con alta turbidez se observa una estacionalidad marcada en la temperatura, en la producción primaria y en las propiedades ópticas (Pérez et al., 2011; Torremorell et al., 2007, 2009). Debido a la baja transparencia registrada en estos ambientes turbios, la producción

primaria se encuentra limitada por luz (Allende et al., 2009; Iachetti & Llames, 2015; Torremorell et al., 2007). En estas lagunas, el PPP es muy abundante y está representado en su mayoría por Pcy, salvo en algunos pocos sitios donde pueden predominar las Peuk (Allende et al., 2009; Fermani et al., 2015; Izaguirre et al., 2014; Silvoso et al., 2011).

Contrariamente a lo observado en otros ambientes, y tal como se discutió en el Capítulo I (Fig. 1.21), en las lagunas de la región pampeana las Pcy presentan sus máximos de abundancia en los meses de invierno y las Peuk durante la primavera (Huber et al., 2017; Quiroga et al., 2021). Estos resultados nos llevan a plantearnos por qué se observa este patrón temporal de Pcy y Peuk aparentemente contradictorio con la bibliografía ¿Por qué las Pcy presentan sus máximos en los meses de menor irradiancia y temperatura? ¿Cómo responden las Pcy y Peuk bajo distintas condiciones de irradiancia y temperatura?

Para evaluar este comportamiento peculiar de las Pcy, se diseñaron una serie de experimentos en donde se evaluó simultáneamente el efecto de la luz incidente y la temperatura sobre distintos organismos picoplanctónicos fotosintéticos.

Objetivo

Evaluar las tasas de crecimiento in vitro de cepas de Pcy y Peuk aisladas de la laguna Chascomús ante diferentes condiciones de luz y temperatura.

Hipótesis

H1: Las tasas de crecimiento de las cepas de Pcy y Peuk aumentan con la intensidad lumínica y con la temperatura.

H2: A iguales condiciones de luz y temperatura, las tasas de crecimiento de las Peuk son mayores que las de las Pcy.

Materiales y Métodos

Condiciones de cultivo y diseño experimental

Para este experimento se utilizaron una cepa de Pcy y una de Peuk previamente aisladas de la laguna de Chascomús. La cepa de PC-Pcy (CH-040) utilizada en los experimentos fue aislada de la Laguna Chascomús por María Paula Huber en el marco de su Tesis doctoral (Huber, 2017) y corresponde filogenéticamente al Clado PV del género *Synechococcus* basado en información que se obtuvo de la secuenciación del gen ribosomal 16S. Este cultivo se mantuvo en el medio BG-11 (Rippka, 1988), que es específico para cianobacterias de agua dulce, a 20°C, 11 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y con fotoperíodo de luz-oscuridad de 12:12 h.

La cepa de Peuk (CH-P2) utilizada en estos experimentos, fue aislada en el marco de esta Tesis Doctoral (ver Capítulo II, Parte I). Esta cepa, al igual que la cepa CH-40 se mantuvo en medio BG-11 (Rippka, 1988 a 20°C, 11 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y con fotoperíodo de luz- oscuridad de 12:12 h.

El diseño experimental consistió en un diseño factorial de tres temperaturas diferentes (25, 20 y 15°C) y tres intensidades de luz diferentes: luz alta o LA (225 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), luz media o LM (125 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y luz baja o LB (50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Para esto se usaron dos cámaras de cultivo B.O.D. (411, Nova Etica) y una cámara de crecimiento (Jeio Tech GC-300/1000), cada una representó una temperatura diferente, y en cada una de éstas, se instalaron 2 tiras de luces LED (5630 IP20), blanco frío y blanco cálido de alta potencia (Fig. 2.10). Se utilizó un espectrómetro Ocean optics (USB2000) para medir la irradiancia, la cual fue ajustada a las intensidades respectivas de cada tratamiento con ayuda de mediasombras de distinto grosor (Figura 2.11).

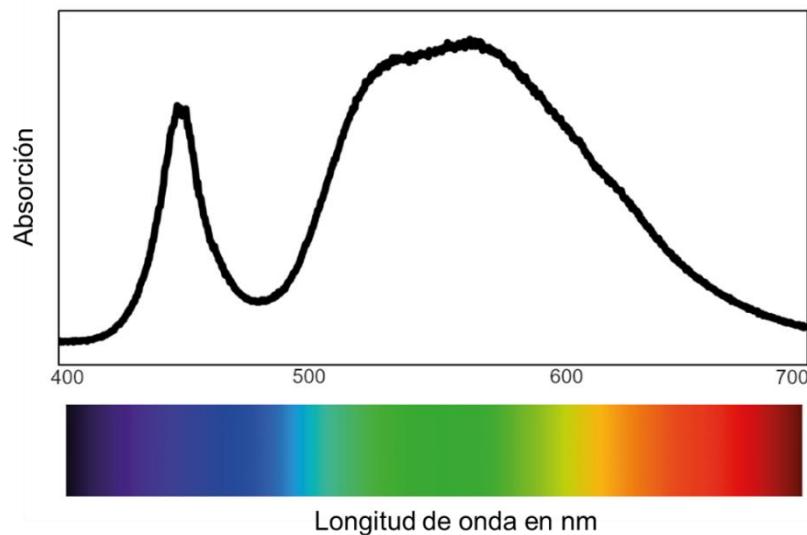


Figura 2.10. Espectro de emisión de las tiras led blanco frio y blanco cálido utilizadas en el experimento.

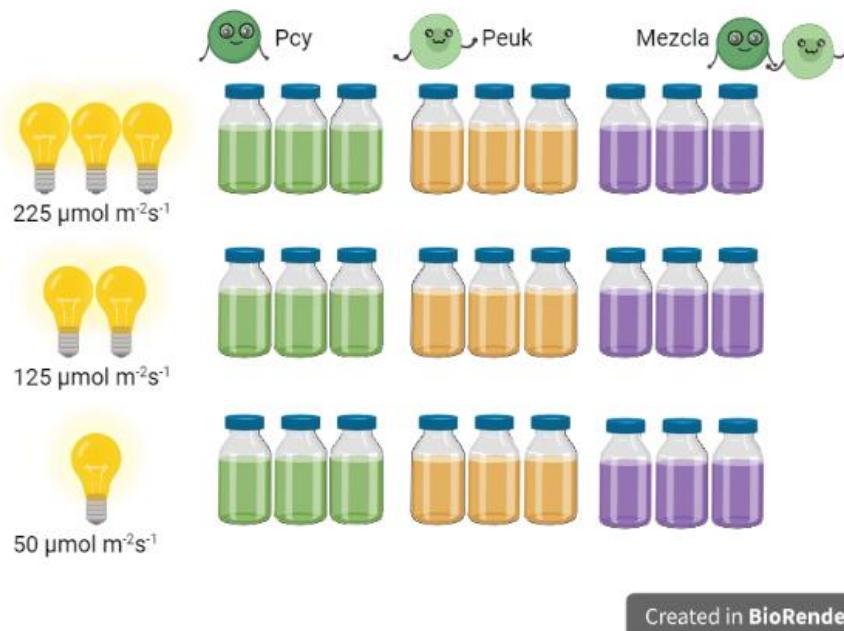


Figura 2.11. Esquema del diseño experimental. En cada cámara de cultivo se configuró una temperatura diferente. Las diferentes irradiancias requeridas fueron ajustadas en cada estante agregando mediasombra.

En cada cámara de cultivo se utilizaron 27 frascos de vidrio Schott de borosilicato (Duran) de 250 mL de capacidad con 100 mL de muestra cada uno. Para cada condición de luz y temperatura se evaluó el crecimiento de cada cepa en cultivos *batch* (sin agregado de medio de cultivo durante el experimento) creciendo sola, y en mezcla (Pcy+Peuk). Todos los ensayos se realizaron por triplicado partiendo de una densidad inicial de $\sim 2 \times 10^6$ células mL⁻¹. El inóculo provino en cada caso de un cultivo madre que se encontraba en fase de crecimiento exponencial. Para todo el diseño experimental, tanto el medio de cultivo (BG-11, Rippka, 1988) como todo el material utilizado fue previamente esterilizado. Adicionalmente, los cultivos fueron agitados manualmente para evitar la sedimentación. La abundancia de cada cepa se estimó diariamente durante 30 días utilizando un citómetro de flujo

Citometría de flujo

Para estimar la abundancia de cada cepa se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur de 4 colores (Becton Dickinson, USA) equipado con un láser estándar de iones de argón de emisión azul ($\lambda = 488$ nm) y un láser de diodo rojo ($\lambda = 635$ nm), lo cual permite adquirir hasta 6 parámetros simultáneamente: 4 fluorescencias (FL1, FL2, FL3, FL4) además de la luz dispersada en un ángulo de 90° (*side scatter*, SSC) y la dispersión de la luz hacia adelante (*forward scatter*, FSC). En particular, El FSC está relacionado con el tamaño y la morfología de las partículas, mientras que el SSC está asociado a la complejidad interna de la célula, y en partículas pequeñas, también con el tamaño. El FL3 corresponde a la fluorescencia roja luego de ser excitada con la luz azul ($\lambda = 488$ nm excitación, 670 nm LP emisión) que permite detectar la autofluorescencia de la clorofila-a. El FL4 es la fluorescencia roja luego de ser excitado con luz roja ($\lambda = 435$ nm excitación, 661/61 nm BP emisión) y corresponde a la autofluorescencia de la ficocianina. Para evitar el recuento de "dobletes", previo al recuento de las células de Pcy y Peuk se hicieron diluciones conforme iban creciendo ambas poblaciones de modo de mantener una tasa de <1500 eventos segundo⁻¹. En todos los casos las muestras se analizaron durante tres minutos a velocidad *High* (60,012 μ L min⁻¹). Las Pcy fueron identificadas en

citogramas de emisión FL3 vs. FL4 mientras que las Peuk se identificaron en citogramas FL3 vs. SSC (Fig. 2.12).

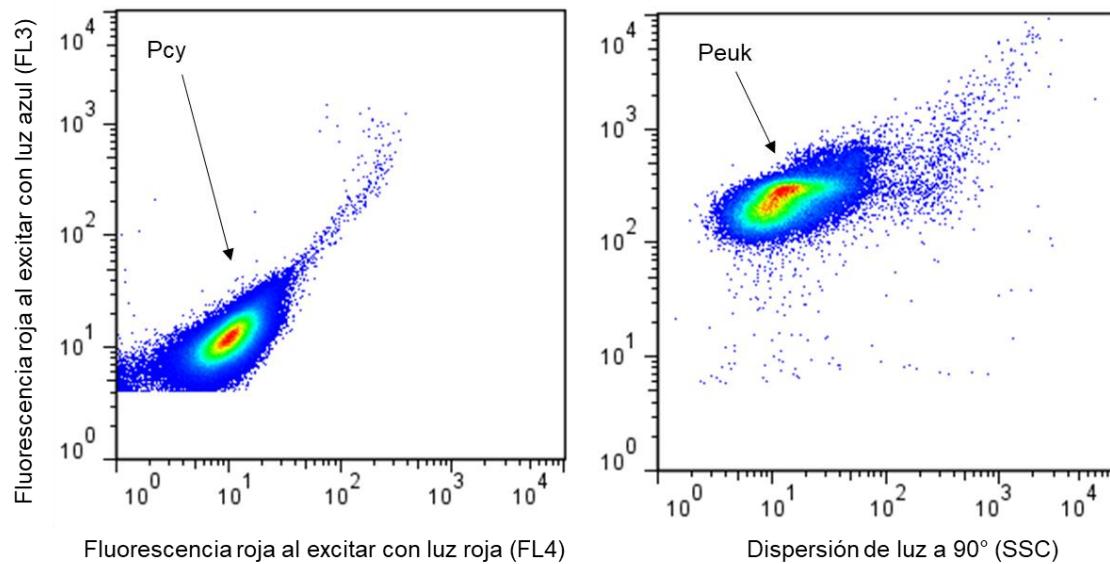


Figura 2.12. Ejemplo de un citograma donde se observan las poblaciones de picocianobacterias (Pcy) y picoeucariotas (Peuk). Datos tomados de esta tesis.

Las muestras procesadas fueron analizadas con el programa FlowJo 7.6. La abundancia de ambas cepas fue calculada siguiendo la metodología propuesta por Gasol & Morán (2015). Para el cálculo de la densidad se consideraron las diluciones y la velocidad de la muestra para convertir el número de eventos en abundancia (cel. mL⁻¹).

Análisis de datos

El crecimiento de cada una de las réplicas a lo largo del tiempo de incubación se ajustó a una curva de crecimiento logística con el programa estadístico PAST (Hammer et al., 2001), utilizando la siguiente ecuación:

$$y = \frac{\alpha}{1 + be^{cx}}$$

donde α es la capacidad de carga de la población (cel. mL^{-1}), b es un parámetro que permite conocer qué tanto se aleja α de la abundancia inicial de la población, c es la tasa de crecimiento (d^{-1}) y x el tiempo (d).

Para comparar las tasas de crecimiento de cada cepa en los distintos tratamientos se realizaron ANOVAs de dos factores (luz, temperatura) con el programa de análisis estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2020). Para todos los cálculos se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad cuando correspondió. Cuando el ANOVA fue significativo ($P<0,05$) se buscaron diferencias significativas entre los tratamientos mediante comparaciones *post-hoc* usando el test de Tukey.

Resultados

Experimentos de tasa de crecimiento

Se observó un crecimiento positivo en todos los tratamientos cuando las cepas de Pcy (Fig. 2.13) y Peuk (Fig. 2.14) crecieron solas. Lamentablemente el tratamiento de 15°C de Pcy tuvo que ser descartado por un inconveniente logístico durante el experimento. En líneas generales, las tasas de crecimiento fueron más altas a mayor temperatura (25°C), y las de Peuk tendieron a ser mayores que las de Pcy (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Valor promedio de las tasas de crecimiento (d^{-1}) de las distintas cepas crecidas individualmente bajo diferentes condiciones de luz y temperatura al cabo de 30 días.

Cepa	Irradiancia ($\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Temperatura (°C)		
		25	20	15
Pcy	225	0,25	0,15	
	125	0,23	0,12	
	50	0,20	0,17	
Peuk	225	0,60	0,16	0,20
	125	0,44	0,28	0,18
	50	0,35	0,11	0,16

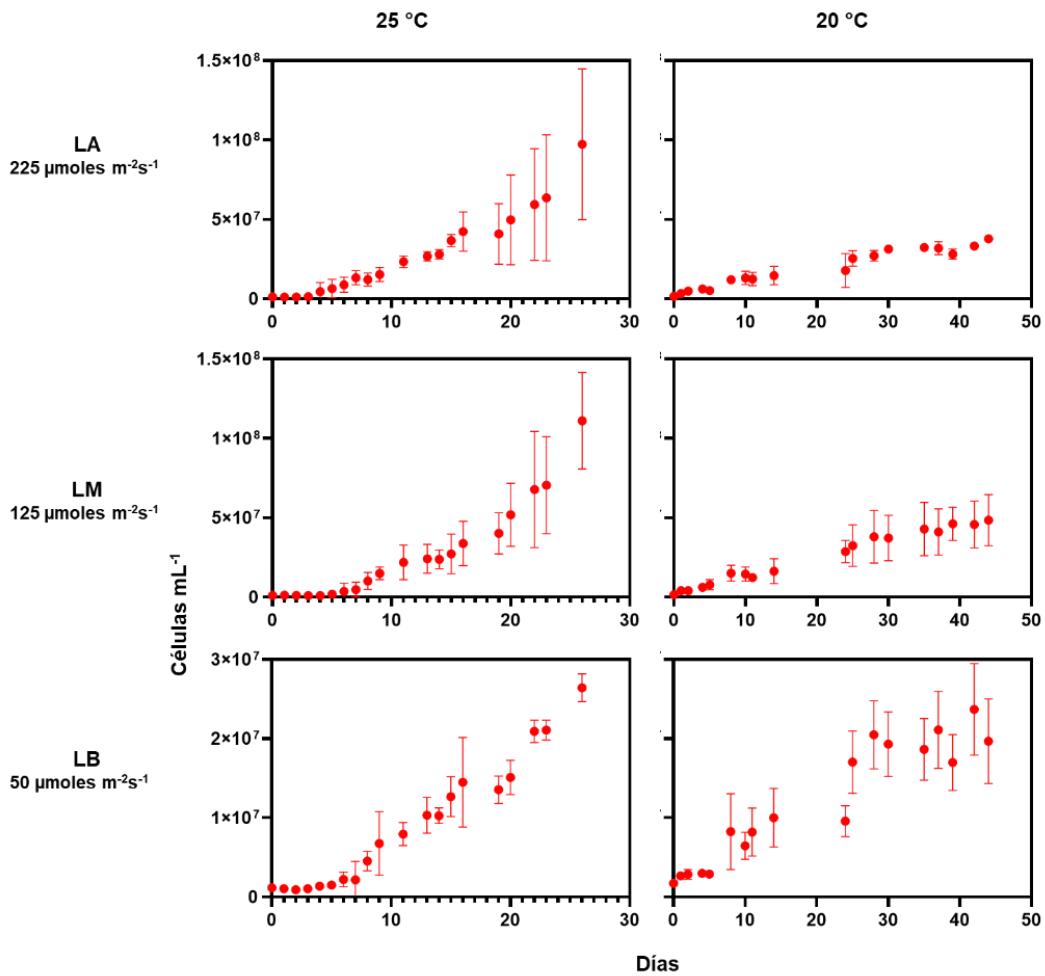


Figura 2.13. Curvas de crecimiento de Pcy a 25 y 20°C, y a tres intensidades de Luz diferentes: Luz Alta (LA), Luz Media (LM) y Luz Baja (LB). Las barras indican el desvío estándar.

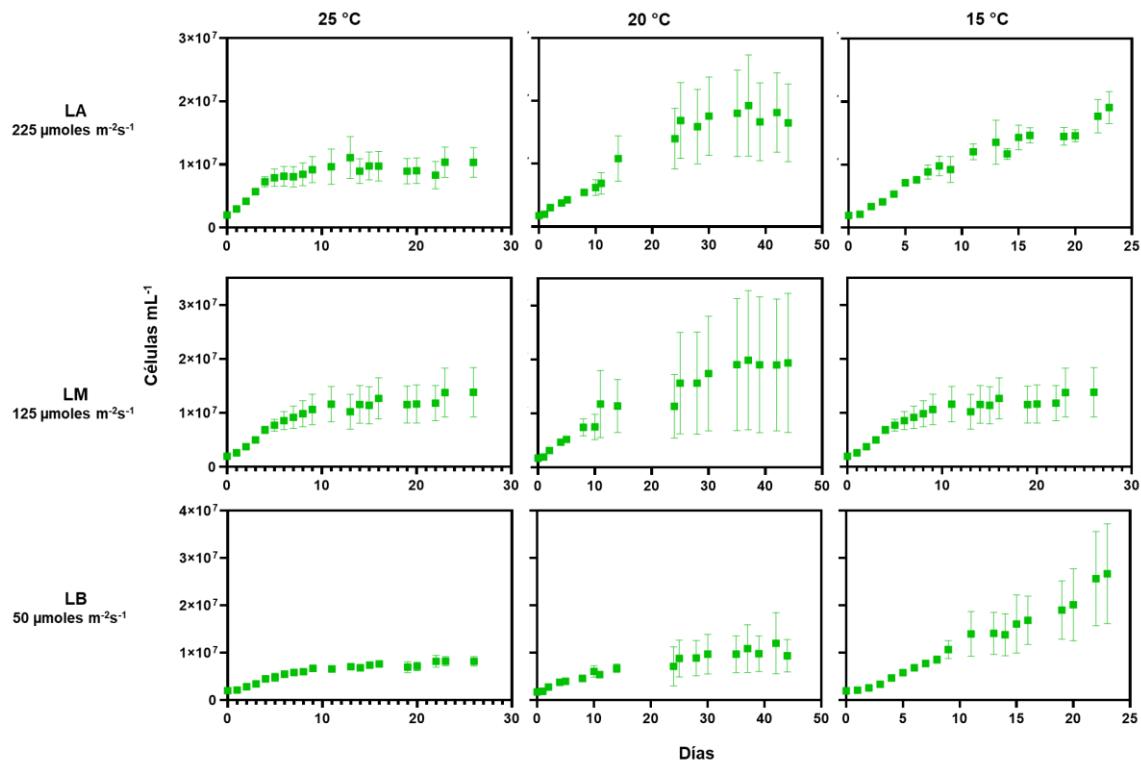


Figura 2.14. Curvas de crecimiento de Peuk a 25, 20 y 15°C, y a tres intensidades de Luz diferentes: Luz Alta (LA), Luz Media (LM) y Luz Baja (LB). Las barras indican el desvío estándar.

La tasa de crecimiento de Pcy (Fig. 2.15) varió significativamente entre temperaturas ($P<0,05$), siendo mayor a 25°C ($0,23\pm0,02\text{ d}^{-1}$) que a 20°C ($0,14\pm0,02\text{ d}^{-1}$). Con respecto a la intensidad de luz, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0,05$).

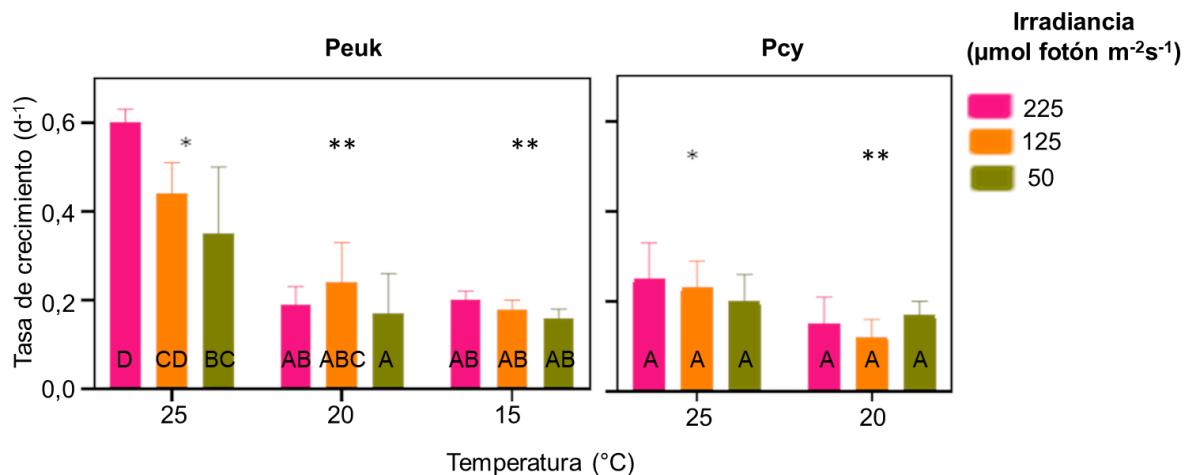


Figura 2.15. Tasas de crecimiento de la cepa de picocianobacterias (Pcy) y de picoeucariotas (Peuk) a distintas temperaturas (25, 20 y 15°C) y distintas intensidades de luz (225, 125 y 50 μ moles fotón $m^{-2} s^{-1}$). El asterisco (*) y (***) representan diferencias significativas ($P<0,05$) entre temperaturas, para ambas cepas 25°C fue diferente de las demás temperaturas. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre intensidades de luz,

Las tasas de crecimiento de las Peuk también mostraron diferencias significativas entre temperaturas ($P<0,0001$), siendo 25°C la temperatura que presentó diferencias con respecto a 20 y 15°C (Fig. 2.15). Las dos temperaturas más bajas no mostraron diferencias significativas entre sí. La tasa media de crecimiento para 25°C (promediando las tres irradiancias) fue de $0,46\pm0,02 d^{-1}$ mientras que para 20 y 15°C fue de $0,19\pm0,02 d^{-1}$ y $0,18\pm0,02 d^{-1}$, respectivamente. En cuanto a las distintas intensidades de luz se encontraron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento (promedio) a LA y LM ($0,32\pm0,02 d^{-1}$ y $0,30\pm0,02 d^{-1}$) con respecto a LB ($0,21\pm0,02 d^{-1}$).

Al disponer ambas cepas juntas se observó que las Pcy desplazaron a las Peuk en condiciones de LA y LM, mientras que, en la intensidad lumínica más baja (LB), predominaron las Peuk por sobre las Pcy (Fig. 2.16). A 25°C si bien las Peuk

dominaron durante los primeros días de incubación, éstas fueron reemplazadas por las Pcy en LA y LM.

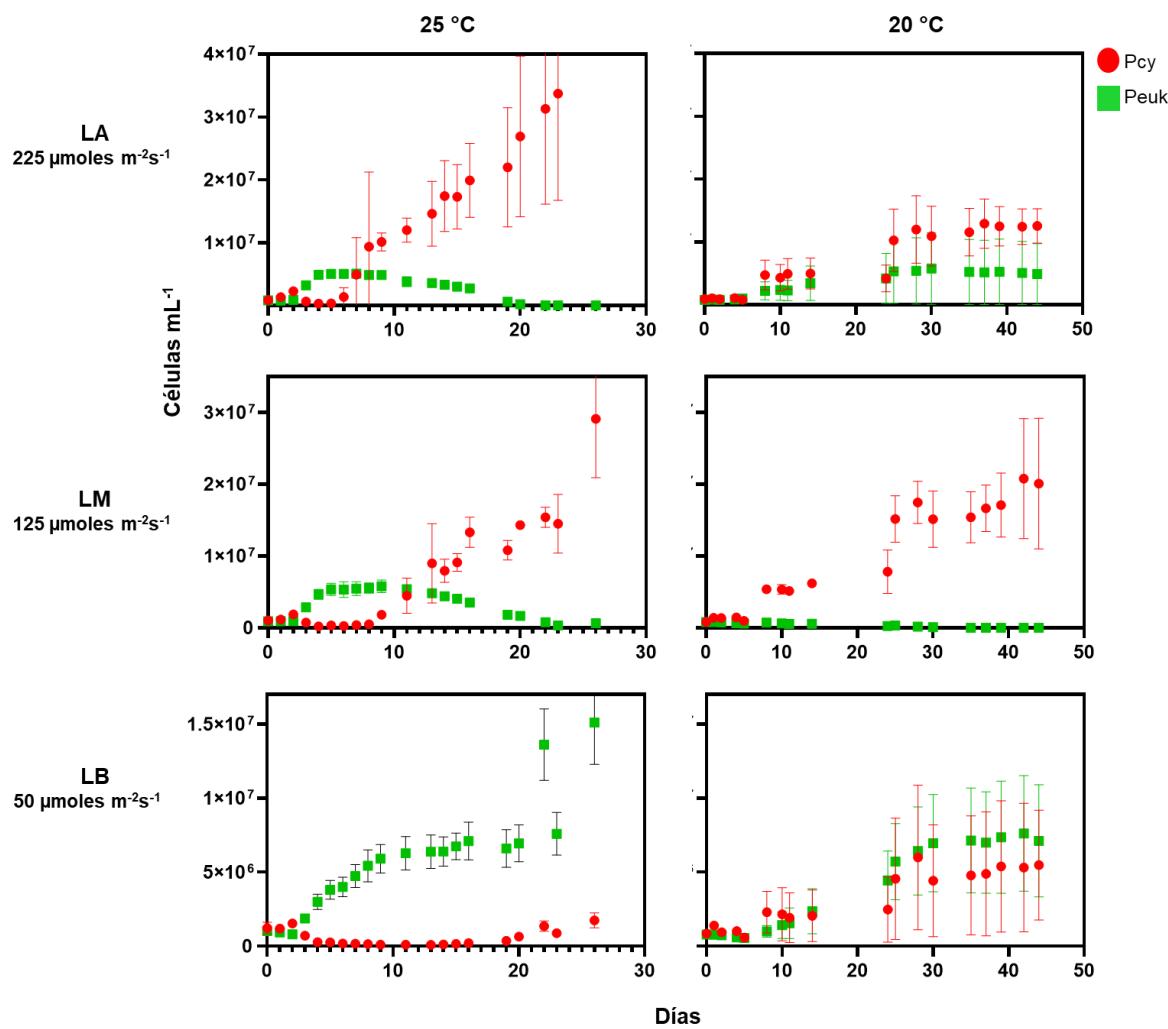


Figura 2.16. Curvas de crecimiento de la mezcla de picocianobacterias (Pcy) y Picoeucariotas (Peuk) a 25 y 20°C. Para cada temperatura se establecieron 3 intensidades de Luz: Luz Alta (LA), Luz Media (LM) y Luz Baja (LB).

Revisión bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica de tasas de crecimiento de Pcy y Peuk para contrastar con los resultados de los experimentos realizados en esta Tesis (Tablas 2.5 y 2.6).

Tabla 2.5. Tasas de crecimiento calculadas en este trabajo para picocianobacteria (Pcy) y recopiladas de la literatura. Temp. = temperatura.

Temp °C	Irradiancia μmoles m ⁻² s ⁻¹	Cepa o especie	Tasa d ⁻¹	Fuente
25	225	CH040	0,34	Este trabajo
25	225	CH040	0,22	Este trabajo
25	225	CH040	0,19	Este trabajo
25	125	CH040	0,25	Este trabajo
25	125	CH040	0,27	Este trabajo
25	125	CH040	0,16	Este trabajo
25	50	CH040	0,26	Este trabajo
25	50	CH040	0,21	Este trabajo
25	50	CH040	0,14	Este trabajo
20	225	CH040	0,10	Este trabajo
20	225	CH040	0,13	Este trabajo
20	225	CH040	0,22	Este trabajo
20	125	CH040	0,07	Este trabajo
20	125	CH040	0,11	Este trabajo
20	125	CH040	0,16	Este trabajo
20	50	CH040	0,14	Este trabajo
20	50	CH040	0,19	Este trabajo
20	50	CH040	0,17	Este trabajo
20	28	WH7803	0,90	Hauschild et al., 1991
20	28	48B66	0,67	Hauschild et al. 1991
20	28	<i>Synechococcus leopoliensis</i>	0,98	Hauschild et al. 1991
20	28	WH5701	0,78	Hauschild et al. 1991
20	28	Green Bay	0,62	Hauschild et al. 1991
20	10	BO8801	0,40	Moser et al., 2009
20	10	MW100C3	0,23	Moser et al. 2009
20	100	BO8801	0,42	Moser et al. 2009
20	100	MW100C3	0,90	Moser et al. 2009
20	20	<i>Synechococcus</i>	0,56	Callieri et al., 1996
20	20	<i>Synechococcus</i>	0,31	Callieri et al. 1996
15	6	WH7803	0,10	Campbell & Carpenter, 1986
20	21	WH7803	0,32	Campbell y Carpenter 1986
25	6	WH7803	0,22	Campbell y Carpenter 1986

25	55	WH7803	0,90	Campbell y Carpenter 1986
20	6	WH8107	0,25	Campbell y Carpenter 1986
25	6	WH8107	0,29	Campbell y Carpenter 1986
25	21	WH8107	0,54	Campbell y Carpenter 1986
25	55	WH8107	0,70	Campbell y Carpenter 1986
25	6	WH8012	0,47	Campbell y Carpenter 1986
25	21	WH8012	0,75	Campbell y Carpenter 1986
25	55	WH8012	1,02	Campbell y Carpenter 1986
25	55	WH8108	0,76	Campbell y Carpenter 1986
20	25	ALMO 03	0,49	Jacquet et al., 2001
20	25	ROS 04	0,33	Jacquet et al. 2001
20	25	WH 7803	0,17	Jacquet et al. 2001
20	25	WH 8103	0,48	Jacquet et al. 2001
20	80	PCC 6301 <i>Synechococcus elongatus</i>	0,30	Lürling et al., 2013
25	80	PCC 6301 <i>Synechococcus elongatus</i>	0,67	Lurling et al. 2013
27,5	80	PCC 6301 <i>Synechococcus elongatus</i>	0,64	Lurling et al. 2013
30	80	PCC 6301 <i>Synechococcus elongatus</i>	0,72	Lurling et al. 2013
32,5	80	PCC 6301 <i>Synechococcus elongatus</i>	0,82	Lurling et al. 2013
35	80	PCC 6301 <i>Synechococcus elongatus</i>	0,91	Lurling et al. 2013
18	80	A15-37	0,13	Pittera et al., 2014
20	80	A15-37	0,48	Pittera et al. 2014
22	80	A15-37	0,72	Pittera et al. 2014
26	80	A15-37	0,91	Pittera et al. 2014
28	80	A15-37	0,88	Pittera et al. 2014
30	80	A15-37	1,05	Pittera et al. 2014

32	80	A15-37	1,70	Pittera et al. 2014
34	80	A15-37	1,71	Pittera et al. 2014
35	80	A15-37	1,13	Pittera et al. 2014
18	80	M16.1	0,44	Pittera et al. 2014
20	80	M16.1	0,66	Pittera et al. 2014
24	80	M16.1	1,03	Pittera et al. 2014
28	80	M16.1	1,58	Pittera et al. 2014
30	80	M16.1	1,80	Pittera et al. 2014
32	80	M16.1	2,04	Pittera et al. 2014
34	80	M16.1	1,91	Pittera et al. 2014
35	80	M16.1	1,27	Pittera et al. 2014
16	80	WH7803	0,15	Pittera et al. 2014
18	80	WH7803	0,51	Pittera et al. 2014
20	80	WH7803	0,80	Pittera et al. 2014
22	80	WH7803	0,94	Pittera et al. 2014
26	80	WH7803	1,20	Pittera et al. 2014
28	80	WH7803	1,31	Pittera et al. 2014
30	80	WH7803	1,58	Pittera et al. 2014
32	80	WH7803	2,31	Pittera et al. 2014
34	80	WH7803	2,51	Pittera et al. 2014
35	80	WH7803	0,61	Pittera et al. 2014
16	80	ROS8604	0,26	Pittera et al. 2014
18	80	ROS8604	0,39	Pittera et al. 2014
20	80	ROS8604	0,58	Pittera et al. 2014
22	80	ROS8604	0,68	Pittera et al. 2014
24	80	ROS8604	0,73	Pittera et al. 2014
26	80	ROS8604	0,83	Pittera et al. 2014
30	80	ROS8604	0,55	Pittera et al. 2014
12	80	MVIR-16-2	0,27	Pittera et al. 2014
14	80	MVIR-16-2	0,57	Pittera et al. 2014
16	80	MVIR-16-2	0,68	Pittera et al. 2014
18	80	MVIR-16-2	0,77	Pittera et al. 2014
20	80	MVIR-16-2	0,86	Pittera et al. 2014
22	80	MVIR-16-2	1,02	Pittera et al. 2014
26	80	MVIR-16-2	0,81	Pittera et al. 2014
10	80	MVIR-18-1	0,24	Pittera et al. 2014
12	80	MVIR-18-1	0,34	Pittera et al. 2014
14	80	MVIR-18-1	0,38	Pittera et al. 2014
16	80	MVIR-18-1	0,44	Pittera et al. 2014
18	80	MVIR-18-1	0,60	Pittera et al. 2014
20	80	MVIR-18-1	0,71	Pittera et al. 2014
22	80	MVIR-18-1	0,82	Pittera et al. 2014
24	80	MVIR-18-1	0,81	Pittera et al. 2014

25	80	MVIR-18-1	0,60	Pittera et al. 2014
20	80	<i>Synechococcus</i> CCMP1334	0,32	Fu et al., 2007
24	80	<i>Synechococcus</i> CCMP1334	0,66	Fu et al. 2007

Tabla 2.6. Tasas de crecimiento calculadas en este trabajo para picoeucariotas (Peuk) y recopiladas de la literatura. Temp. = temperatura.

Temp °C	Irradiancia μmoles m ⁻² s ⁻¹	Cepa o especie	Tasa d ⁻¹	Fuente
25	225	CH-P2	0,63	Este trabajo
25	225	CH-P2	0,58	Este trabajo
25	225	CH-P2	0,60	Este trabajo
25	125	CH-P2	0,36	Este trabajo
25	125	CH-P2	0,50	Este trabajo
25	125	CH-P2	0,46	Este trabajo
25	50	CH-P2	0,18	Este trabajo
25	50	CH-P2	0,47	Este trabajo
25	50	CH-P2	0,38	Este trabajo
20	225	CH-P2	0,16	Este trabajo
20	225	CH-P2	0,13	Este trabajo
20	225	CH-P2	0,20	Este trabajo
20	125	CH-P2	0,34	Este trabajo
20	125	CH-P2	0,15	Este trabajo
20	125	CH-P2	0,36	Este trabajo
20	50	CH-P2	0,10	Este trabajo
20	50	CH-P2	0,10	Este trabajo
20	50	CH-P2	0,14	Este trabajo
20	225	CH-P2	0,23	Este trabajo
20	225	CH-P2	0,23	Este trabajo
20	225	CH-P2	0,19	Este trabajo
20	125	CH-P2	0,18	Este trabajo
20	125	CH-P2	0,18	Este trabajo
20	125	CH-P2	0,22	Este trabajo
20	50	CH-P2	0,13	Este trabajo
20	50	CH-P2	0,22	Este trabajo
20	50	CH-P2	0,34	Este trabajo
15	225	CH-P2	0,20	Este trabajo
15	225	CH-P2	0,19	Este trabajo
15	225	CH-P2	0,22	Este trabajo
15	125	CH-P2	0,18	Este trabajo
15	125	CH-P2	0,21	Este trabajo
15	125	CH-P2	0,16	Este trabajo

15	50	CH-P2	0,17	Este trabajo
15	50	CH-P2	0,14	Este trabajo
15	50	CH-P2	0,18	Este trabajo
20	25	<i>Bathycoccus prasinus</i>	0,23	Jacquet et al., 2001
20	25	<i>Bolidomonas pacifica</i>	0,91	Jacquet et al. 2001
20	25	<i>Micromonas pusilla</i>	0,37	Jacquet et al. 2001
20	25	<i>Pelagomonas calceolata</i>	0,50	Jacquet et al. 2001
20	25	<i>Pycnococcus provasolii</i>	0,51	Jacquet et al. 2001
20	25	<i>Pelagomonas calceolata</i>	0,35	Dimier et al., 2009
20	60	<i>Pelagomonas calceolata</i>	0,30	Dimier et al. 2009
22	20	<i>Ostreochoccus RCC365</i>	0,64	Rodríguez et al., 2005
22	85	<i>Ostreochoccus RCC365</i>	1,04	Rodriguez et al. 2005
22	180	<i>Ostreochoccus RCC365</i>	1,15	Rodriguez et al. 2005
22	400	<i>Ostreochoccus RCC365</i>	1,08	Rodriguez et al. 2005
22	800	<i>Ostreochoccus RCC365</i>	0,86	Rodriguez et al. 2005
22	5	<i>Ostreochoccus RCC501</i>	0,02	Rodriguez et al. 2005
22	20	<i>Ostreochoccus RCC501</i>	0,56	Rodriguez et al. 2005
22	85	<i>Ostreochoccus RCC501</i>	1,08	Rodriguez et al. 2005
22	180	<i>Ostreochoccus RCC501</i>	1,10	Rodriguez et al. 2005
22	400	<i>Ostreochoccus RCC501</i>	1,15	Rodriguez et al. 2005
22	800	<i>Ostreochoccus RCC501</i>	0,91	Rodriguez et al. 2005
22	5	<i>Ostreochoccus OTH95</i>	0,06	Rodriguez et al. 2005
22	20	<i>Ostreochoccus OTH95</i>	0,64	Rodriguez et al. 2005
22	85	<i>Ostreochoccus OTH95</i>	0,96	Rodriguez et al. 2005
22	180	<i>Ostreochoccus OTH95</i>	1,16	Rodriguez et al. 2005

22	400	<i>Ostreochoccus</i> OTH95	1,12	Rodriguez et al. 2005
22	800	<i>Ostreochoccus</i> OTH95	1,00	Rodriguez et al. 2005
22	5	<i>Ostreochoccus</i> RCC141	0,12	Rodriguez et al. 2005
22	20	<i>Ostreochoccus</i> RCC141	0,68	Rodriguez et al. 2005
22	85	<i>Ostreochoccus</i> RCC141	0,80	Rodriguez et al. 2005
22	180	<i>Ostreochoccus</i> RCC141	0,89	Rodriguez et al. 2005
22	400	<i>Ostreochoccus</i> RCC141	0,53	Rodriguez et al. 2005
22	5	<i>Ostreochoccus</i> RCC143	0,21	Rodriguez et al. 2005
22	20	<i>Ostreochoccus</i> RCC143	0,72	Rodriguez et al. 2005
22	85	<i>Ostreochoccus</i> RCC143	0,70	Rodriguez et al. 2005
22	180	<i>Ostreochoccus</i> RCC143	0,55	Rodriguez et al. 2005
22	400	<i>Ostreochoccus</i> RCC143	0,21	Rodriguez et al. 2005
22	20	<i>Ostreochoccus</i> RCC420	0,60	Rodriguez et al. 2005
22	85	<i>Ostreochoccus</i> RCC420	0,99	Rodriguez et al. 2005
22	180	<i>Ostreochoccus</i> RCC420	1,12	Rodriguez et al. 2005
22	400	<i>Ostreochoccus</i> RCC420	1,05	Rodriguez et al. 2005
22	800	<i>Ostreochoccus</i> RCC420	0,73	Rodriguez et al. 2005

Los valores de tasas de crecimiento obtenidos en este capítulo se encuentran dentro del rango de aquellos reportados en la literatura (Tablas 2.5 y 2.6). Además, la tasa de crecimiento de Pcy muestra una relación lineal significativa con la temperatura (Fig. 2.17). En el caso de las Peuk si bien la relación también resultó significativa, el ajuste es muy débil ($R^2 = 0,18$), y además el rango de temperaturas para el cual se posee información es muy acotado (15-25°C).

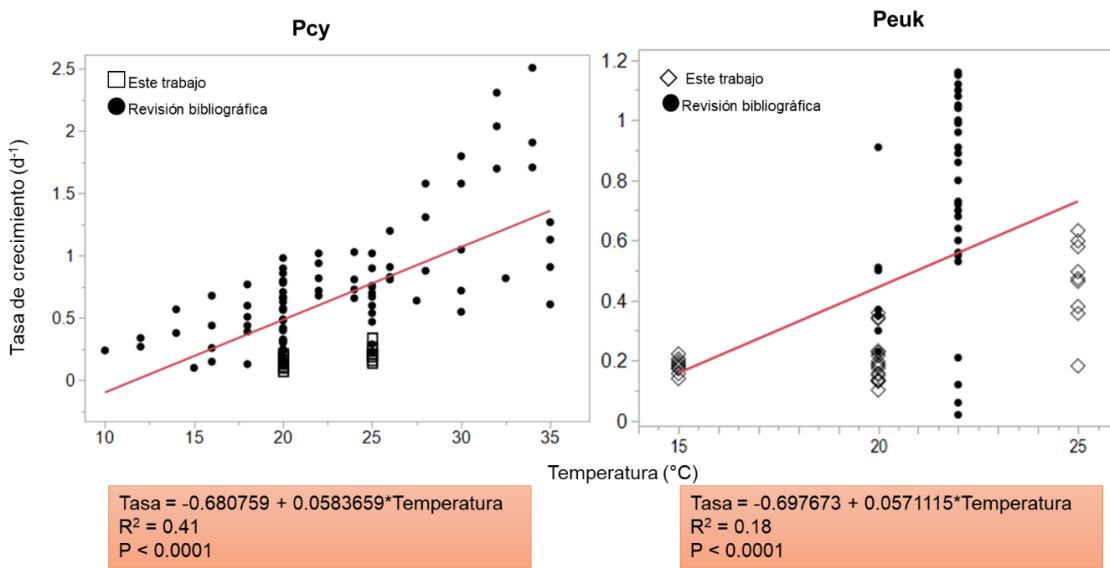


Figura 2.17. Relación lineal entre las tasas de crecimiento de Pcy y Peuk en función de la temperatura.

Discusión

En este capítulo se analizó el efecto de distintas condiciones de temperatura y niveles de irradiancia sobre la tasa de crecimiento de una cepa de Pcy y de una de Peuk. Los valores aquí calculados se hallan dentro del rango de valores reportados previamente en la literatura (Tablas 2.5 y 2.6), que para Pcy varían entre 0,07 y 2,51 d^{-1} (10-35 $^{\circ}C$), y para Peuk entre 0,06 y 1,16 d^{-1} (15-25 $^{\circ}C$). Lamentablemente los pocos datos publicados sobre Peuk pertenecen mayormente a cepas marinas.

Tanto para Pcy como para Peuk, las tasas calculadas en nuestros experimentos mostraron una relación directa con la temperatura, con valores máximos registrados a 25 $^{\circ}C$. Las distintas intensidades de luz solo tuvieron un efecto significativo en las Peuk, en donde las tasas aumentaron en los experimentos sometidos a mayor irradiancia; mientras que en la cepa de Pcy no se observaron diferencias entre las tres irradiancias ensayadas (50, 125 y 225 $\mu\text{moles fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La relación positiva de las tasas de crecimiento con la temperatura está en

concordancia con la teoría metabólica de la ecología (Brown et al. 2004), y es soportada por numerosos trabajos que presentan la misma relación aquí reportada (Campbell & Carpenter, 1986; Fu et al., 2007; Hauschild et al., 1991; Jacquet et al., 2001; Lürling et al., 2013; Moser et al., 2009; Pittéra et al., 2014; Rodríguez et al., 2005). En general, la tasa de crecimiento aumenta de manera lineal con la temperatura hasta un valor óptimo y luego tiende a disminuir, esto fue observado para muchas especies de algas afiliadas a linajes muy distintos, incluidas cepas de *Synechococcus* (Reynolds, 1994).

Algunos trabajos demostraron la capacidad de adaptación térmica o flexibilidad térmica para algunas cepas de Pcy. Estudios realizados con dos cepas de *Synechococcus* aisladas de sitios tropicales demostraron que éstas pueden crecer a temperaturas de hasta 2°C con tasas de crecimiento bajas de 0,13 d⁻¹ (Paulsen et al., 2016). Experimentos de estrés térmico realizados con cepas de *Synechococcus* marinos aisladas del trópico, de latitudes medias y del círculo polar, observaron que las cepas del trópico fueron incapaces de crecer a temperaturas muy bajas, mientras que las cepas aisladas cerca del círculo polar mostraron preferencia por temperaturas de entre 10 y 12°C; sin embargo, ninguna de las dos cepas pudo aclimatarse a temperaturas mayores a 25°C (Pittéra et al., 2014). Más allá de su capacidad para crecer a diferentes temperaturas o de las adaptaciones fisiológicas particulares de cepas aisladas de diferentes ambientes, la tendencia a aumentar la tasa con la temperatura (al menos hasta 25°C) parece ser una tendencia general para las Pcy (Fig. 2.17).

En relación a la luz, las tasas de crecimiento de Pcy no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Una explicación plausible es que las intensidades ensayadas hayan estado todas por encima del coeficiente de saturación de luz (I_k), lo que estaría indicando que se trata de una cepa adaptada a bajas intensidades lumínicas. En concordancia con nuestros resultados, estudios de actividad fotosintética con tres cepas distintas de PC-Pcy mantenidas a 10 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (en nuestro caso se mantuvieron a 11 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mostraron que la tasa de fijación de CO₂ satura (I_k) cuando la intensidad lumínica alcanza 3 – 72 $\mu\text{mol fotón}$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Callieri et al., 2005; Moser et al., 2009), consecuentemente, a intensidades más elevadas del I_k la tasa de crecimiento permanece constante.

Contrariamente, la cepa de Peuk mostró una respuesta positiva al aumento de la intensidad lumínica lo que estaría indicando que muy posiblemente presente un I_k más alto. La respuesta a los tratamientos de luz estuvo sin embargo condicionada por la temperatura, ya que a valores $<20^\circ\text{C}$ la diferencia de tasas de crecimiento no fue tan marcada.

Más allá de la interacción existente entre la luz y la temperatura, ambas cepas siempre presentaron tasas de crecimiento positivas, aun con niveles relativamente bajos de intensidades lumínicas. Es decir, que estarían bien adaptadas a las condiciones de elevada turbidez prevalentes en la laguna Chascomús, de donde fueron aisladas. Células más pequeñas suelen ser más eficientes para captar luz en condiciones de poca irradiancia que células de mayor tamaño (Schwaderer et al., 2011). Esta adaptación a bajas intensidades podría estar relacionada, al menos en el caso de las cianobacterias, con su capacidad para regular la cantidad de pigmentos accesorios, fenómeno que se conoce como adaptación cromática (Schwaderer et al., 2011). Este fenómeno fue corroborado en nuestro laboratorio con la cepa CH40 crecida en diferentes condiciones de luz, donde se observó que cuando el cultivo era crecido en condiciones de bajas intensidades se incrementaba la señal del FL3 en el citómetro (F. Unrein obs. pers.), es decir que la población incrementa la concentración de clorofila por célula para contrarrestar la poca energía lumínica recibida. Como se discutió en el Capítulo I de esta Tesis, las Peuk también poseen la capacidad de fotoaclimatación (Hancke et al., 2008; Kulk et al., 2012; Six et al., 2008; Stramski et al., 2002).

Por otro lado, la capacidad de consumir materia orgánica disuelta mediante la osmotrofía, también le podría permitir a las Pcy y Peuk complementar sus requerimientos energéticos, y así sobrevivir en condiciones de luz limitante (Cottrell & Kirchman, 2009; Palenik et al., 2003; Yelton et al., 2016). En particular, para las Pcy existe evidencia de que un flujo constante de remineralización de nutrientes podría sugerir un mutualismo entre estas y las bacterias reforzando la dominancia de las Pcy (Christie-Oleza et al., 2017).

Desde el punto de vista comparativo, a iguales condiciones de luz y temperatura, la tasa de crecimiento de la cepa de Peuk siempre fue mayor que la cepa de Pcy. En concordancia con estos resultados, al mezclar ambas cepas (Fig. 2.16) durante los primeros días de incubación las Peuk siempre incrementaron su abundancia más rápidamente que las Pcy. Sin embargo, en los tratamientos LA y LM se observó un claro desplazamiento competitivo por parte de las Pcy sobre las Peuk luego de varios días de incubación, el cual ocurrió más rápidamente a 20°C que a 25°C. En condiciones de LB, las Peuk dominaron a 25°C (aunque se intuye un aparente resurgimiento de Pcy luego de dos semanas de incubación); mientras que a 20°C ambas cepas coexistieron.

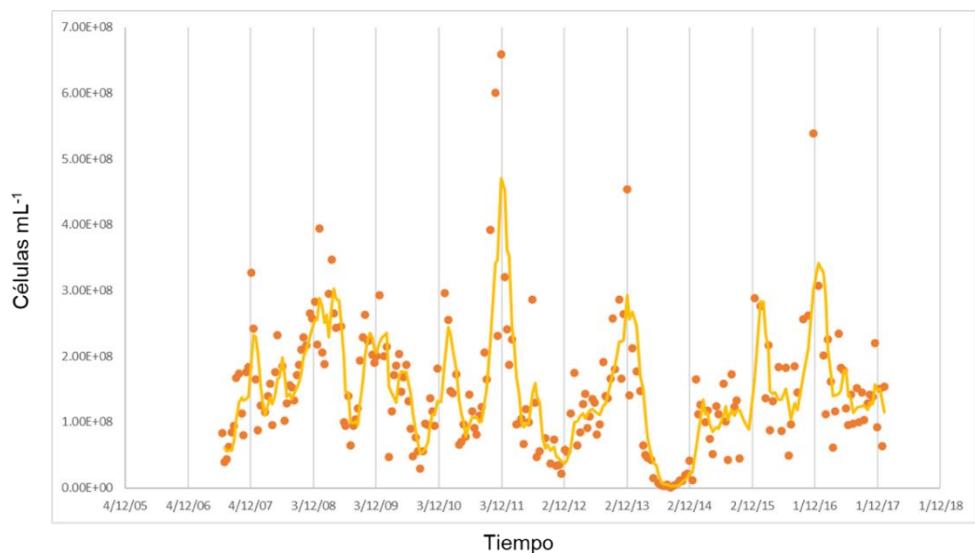
El desplazamiento de las Peuk por parte de Pcy cuando éstas están establecidas y creciendo activamente en el cultivo podría explicarse ya sea porque están más adaptadas a crecer en condiciones de un cultivo *batch* avanzado (i.e. menor disponibilidad de nutrientes disueltos y menor penetración de la luz debida al autosombreado) o quizás también por un efecto alelopático. Existen evidencias sobre el efecto negativo de filtrados de un cultivo de *Synechocystis* sp. sobre distintas microalgas (Barreiro Felpeto et al., 2018) y de *Synechococcus* sobre distintos cultivos de cianobacterias y microalgas (Bubak et al., 2020), aunque este efecto puede variar de acuerdo a las especies (Śliwińska-Wilczewska et al., 2018).

Estudios realizados sobre la dinámica de PPP en la región pampeana (Fermani et al., 2013; Quiroga et al., 2021; Capítulo I de esta Tesis) muestran que las Pcy usualmente presentan sus mayores abundancias en los meses invernales, en contraste con las Peuk cuya mayor abundancia se observa en meses más cálidos (primavera o principio del verano).

Si bien la capacidad de las Pcy para crecer en condiciones de baja intensidad de luz y temperatura puede explicar por qué éstas picoalgas se encuentran presentes de manera abundante en invierno, esto no explica por qué su abundancia disminuye a medida que las condiciones se tornan más óptimas. Un aumento en la tasa de pérdida (e.g. depredación) durante los períodos de primavera-verano podría explicar este patrón. De acuerdo a esta hipótesis, si la tasa de depredación fuese mayor que la tasa de crecimiento, entonces la tasa de crecimiento neta sería

negativa, y en consecuencia la abundancia tendería a disminuir a lo largo del tiempo.

En la laguna Chascomús se cuenta con una serie temporal de abundancia de Pcy y variables abióticas de 10 años consecutivos (Quiroga et al., 2021). Además, se sabe que existe una relación positiva entre la tasa de crecimiento de las Pcy y la temperatura (Fig. 2.17). Utilizando esta información se estimó la tasa de crecimiento teórica (r) para cada una de las fechas de muestreo, asumiendo que ésta depende solo de la temperatura. Dado que se cuenta con muestreos quincenales, para cada intervalo de tiempo se multiplicó la tasa de crecimiento media del intervalo (r_n, r_{n+1}) multiplicado por la abundancia inicial del intervalo (A_n) y por la cantidad de días ($T_{n+1}-T_n$) (generalmente 15 días). Este cálculo permite estimar la abundancia teórica que tendrían las Pcy 15 días después (A_{n+1} teórica), asumiendo que no existen pérdidas (e.g. mortandad por depredación). La diferencia entre esta abundancia teórica (A_{n+1} teórica) y la abundancia real (A_{n+1} real), representaría las células que se perdieron durante ese período (T_n-T_{n+1}) (Fig. 2.18)



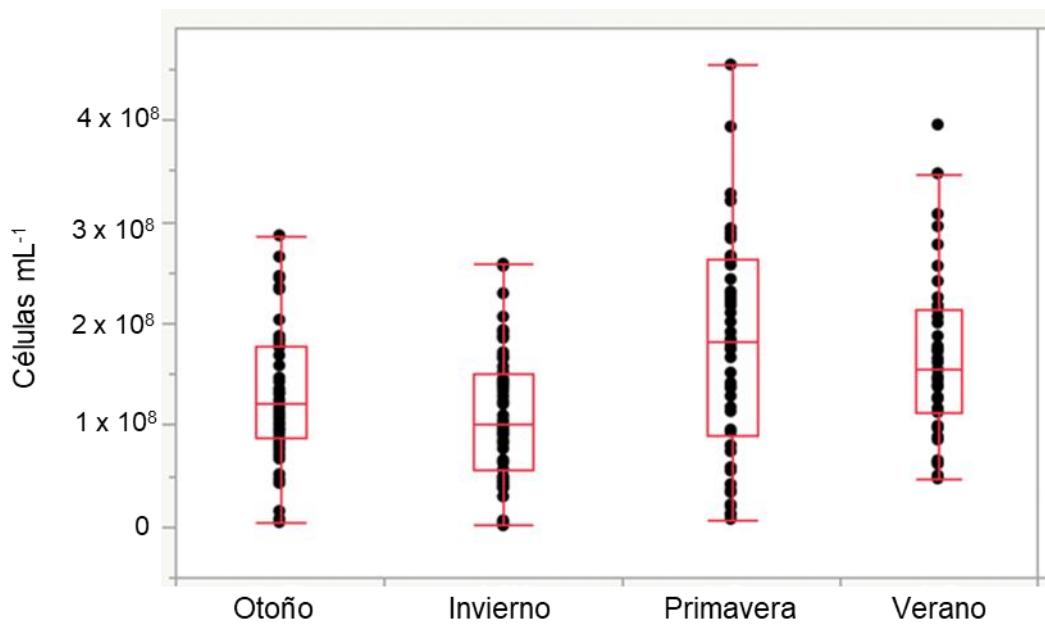


Figura 2.18. Diferencia entre la abundancia real de Pcy en la laguna de Chascomús a lo largo de 10 años y la abundancia teórica estimada de Pcy, asumiendo que no existe tasas de pérdida.

Más allá de que estos cálculos se basan en numerosas suposiciones, y que posiblemente disten de los valores reales, este ejercicio nos permite observar que hay diferencias entre la abundancia teórica y la abundancia real siendo significativamente mayor en primavera y menor en invierno ($P<0.05$) (Fig. 2.18). En definitiva, esta diferencia se podría vincular con un aumento en la tasa de pérdida durante el período primaveral.

Esta mayor tasa de pérdida podría estar relacionada con un aumento de la presión de depredación ejercida durante los meses más cálidos por el zooplancton (Sarmento et al., 2010), debido a incrementos en las tasas de crecimiento y reproductivas (Brown et al., 2004; Malzahn et al., 2016). Además de los flagelados heterótrofos que depredan sobre las Pcy (Paulsen et al., 2016), en la laguna Chascomús los rotíferos presentan abundancias muy elevadas y un patrón prácticamente espectral al de las Pcy (Diovisalvi et al., 2015b; Quiroga et al., 2021). Esto, sumado a que se demostró que *in vitro* pueden alcanzar tasas de depredación de hasta $9918 \text{ Pcy rotífero}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Capítulo III: Parte I), posicionan a los rotíferos como

uno de los posibles responsables de la disminución de Pcy durante los meses donde la tasa de crecimiento es mayor. Asimismo, la infección y/o lisis viral también podrían contribuir a modificar la dinámica de las Pcy en los meses más cálidos (Sandaa & Larsen, 2006). En este sentido, estudios preliminares de dinámica de virus en la laguna Chascomús (Unrein et al., 2018) indican que la abundancia de VLP (*virus like particle*) fluctúa entre 3 y $7 \cdot 10^8$ VLP mL⁻¹, y que eventualmente podría ser una posible causa de muerte de Pcy.

Un aspecto no explorado en este capítulo, pero de relevancia para la selección de algas picoplanctónicas en ambientes naturales, y que podría explicar en parte las diferencias encontradas entre Pcy y Peuk, es la calidad de luz dentro de la columna de agua (e.g. Stomp et al., 2007a). Como se comentó anteriormente las longitudes de onda que penetran a mayor profundidad en los ambientes turbios como la laguna Chascomús, son las longitudes de onda más largas correspondientes al rojo dentro del espectro visible (600-700 nm). Experimentos realizados por Luimstra et al., (2020), donde comparan una cepa de *Synechococcus* sp. (PC-Pcy) con una *Chlorella sorokiniana* (Peuk), concluyen que en luz roja cercana al pico de la ficocianina (660 nm) las PC-Pcy son competitivamente mejores. Mientras que Somogyi et al. (2016) sugieren que en longitudes de onda más largas del rojo (690 nm), las Peuk serían comparativamente más eficientes en la captación de la luz que las PC-Pcy. En concordancia con estos estudios, los experimentos llevados a cabo recientemente por Bernát et al. (2021) con *Cyanobium gracile* (PC-Pcy) demostraron que la eficiencia fotosintética fue máxima en las longitudes de onda en el rango 596-663 nm, pero presentaron una drástica disminución en la tasa de crecimiento y de transporte de electrones cuando esta cepa era crecida con luz de 687 nm. De acuerdo a estos autores, esto se debe a un desacople parcial del complejo antena con el PSII. Estas evidencias parecerían sugerir la existencia de una segregación de nicho lumínico entre las PC-Pcy y Peuk en el extremo rojo del espectro electromagnético, con preferencias lumínicas que varían en el orden de pocos nanómetros y que podrían influir en la dominancia de una u otra en los ambientes acuáticos.

Finalmente, otro aspecto muy poco estudiado y que también sería interesante abordar en un futuro, es la fluctuación diaria en la intensidad de luz recibida por las algas. En las lagunas someras y turbias, la profundidad de la capa fótica es relativamente baja respecto a la profundidad de la laguna, e.g. la laguna Chascomús tiene una profundidad media de 1,9 m y una zona eufótica de aproximadamente 30 cm. Es decir que alrededor del 85% de la columna de agua se encuentra en completa oscuridad. Debido a las condiciones polimícticas de la laguna, la turbulencia del agua ocasiona que las algas pasen la mayor parte del tiempo en oscuridad y sólo durante períodos muy cortos experimentan altas intensidades lumínicas. Esto no suele ser considerado en los diseños experimentales clásicos que se basan en iluminar los cultivos con una intensidad de luz media de forma constante. Aun cuando la energía total recibida por las algas fuese la misma, la forma en que ésta es entregada (poca luz de manera constante o mucha en cortos períodos de tiempo) puede tener efectos sobre la fotoinhibición y la capacidad fotosintética, y consecuentemente sobre el crecimiento poblacional de los diferentes organismos.

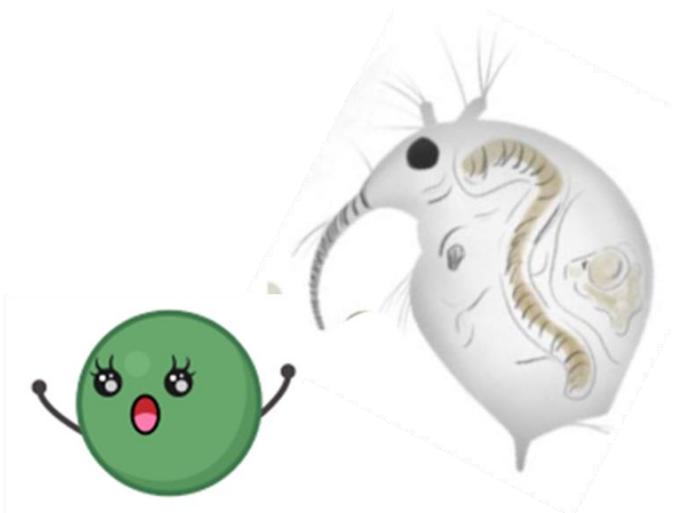
Conclusiones

- Se lograron aislar tres cepas de Peuk combinando las técnicas *cell sorting* por citometría de flujo y posteriormente plaqueo en agar.
- Las tres cepas aisladas corresponden a la especie *Choricystis krienitzii*.
- Las tasas de crecimiento de las cepas de Pcy y Peuk estuvieron positivamente relacionadas con la temperatura de incubación.
- Ambas cepas siempre presentaron tasas de crecimiento positivas, incluso con niveles relativamente bajos de intensidades lumínicas. Sugiriendo que estarían bien adaptadas a las condiciones de elevada turbidez prevalentes en la laguna Chascomús, de donde fueron aisladas.
- Las tasas de crecimiento de las Peuk fueron mayores a intensidades de luz más elevadas, mientras que las Pcy no mostraron diferencias entre los

tratamientos LA, LM y LB. Probablemente esto se debe a que todas las intensidades ensayadas se encontraban por encima del I_k de esta cepa.

CAPITULO III: PARTE I

DEPREDACIÓN DE ROTÍFEROS Y CLADÓCEROS SOBRE PICOCIANOBACTERIAS



Introducción

El zooplancton herbívoro afecta la estructura y dinámica de las comunidades fitoplanctónicas (Sterner, 1989). Puede impactar en las tramas tróficas directamente a través de la depredación sobre los componentes de la misma, o bien indirectamente, mediando el suministro de nutrientes a las bacterias a través de la herbivoría y por consiguiente la liberación de carbono orgánico disuelto (Jurgens & Jeppesen, 2000). El zooplancton está compuesto mayormente por copépodos, cladóceros y rotíferos. Cada uno depreda de forma diferencial sobre distintos tipos de presas, seleccionando principalmente (aunque no únicamente) por el tamaño y la forma. Por ejemplo, mientras que los copépodos calanoideos y ciclopoides son eficientes seleccionando presas de forma activa, como ciliados planctónicos (Burns & Gilbert, 1993), los grandes cladóceros filtradores como *Daphnia* depredan sobre prácticamente toda la trama trófica microbiana, desde ciliados hasta bacterias y algas picoplanctónicas (Porter et al., 1988).

Las picocianobacterias y las bacterias heterótrofas forman la base de la red trófica microbiana. Generalmente se considera que los nanoflagelados y pequeños ciliados son sus principales depredadores. Sin embargo, las Pcy también puede ser una presa importante para el zooplancton que se alimenta por filtración como los nauplii, cladóceros pequeños o rotíferos (Jasser & Callieri, 2017). Este hecho suele ser subestimado o considerado de poca importancia (Callieri et al., 2012). Inclusive algunos consideran que el pastoreo sobre el picoplancton es ineficiente o intermitente (Kiørboe, 2011; Pace et al., 1990) dado que las cianobacterias son consideradas como no palatables o menos favorables pues su valor nutricional teóricamente es bajo (Work & Havens, 2003) . A pesar de esto, hay estudios como el de Vaqué & Pace, (1992) que encontraron que los cladóceros podían llegar a ser mayores depredadores de bacterias que los protistas.

Mientras que los grandes cladóceros como *Daphnia* tienen la habilidad de ingerir partículas de un amplio rango de tamaño (Burns, 1968; DeMott, 1986), los cladóceros pequeños como *Bosmina* prefieren presas más chicas, de entre 1,5 y 5 μm de tamaño (Geller & Müller, 1981; Ross & Munawar, 1981; Schenone et al.,

2021). De igual manera, rotíferos del género *Keratella* también tienen preferencias por partículas de ~0.5–2 μm (Ooms-Wilms, 1997; Ronneberger, 1998). Por lo tanto, las Pcy se encontrarían dentro del rango de preferencia de presas de *Bosmina* y *Keratella*.

En lagos someros y eutróficos la abundancia de bacterias y picocianobacterias suele ser muy elevada (Hwang & Heath, 1999). En estos ambientes el zooplancton está dominado por rotíferos y en menor medida por cladóceros pequeños (Haberman & Haldna, 2014; Pejler, 1983; Stamou et al., 2019). En particular en la laguna Chascomús los rotíferos están dominados por *Keratella tropica*, *Brachionus havanaensis* y *B. caudatus*, y en conjunto presentan una dinámica temporal marcada recurrente, con mínimos en invierno y máximos en verano (Diovisalvi et al., 2015b). En tanto que las Pcy muestran un patrón temporal especular al de los rotíferos, con máximos en invierno (Huber et al., 2017b; Quiroga et al., 2021).

Las cuestiones que surgen de esta introducción y del capítulo anterior son las siguientes: ¿puede el zooplancton presente en la laguna depredar sobre las Pcy? ¿Cuál podría ser el impacto de esta depredación en dicho componente del plancton? Y, por último, ¿podría este impacto explicar, al menos parcialmente, la dinámica observada en las Pcy?

Objetivo

Evaluar las tasas de depredación de distintas especies de rotíferos y cladóceros sobre un cultivo de Pcy.

Hipótesis

Tanto los rotíferos como los cladóceros tienen la capacidad de consumir Pcy de manera activa.

Materiales y métodos

Condiciones de cultivos

Para los experimentos realizados en este Capítulo se utilizó la cepa de Pcy CH-40 aislada de la laguna de Chascomús (Huber, 2017). En el Capítulo II Parte II de la Tesis se brindan más detalles de esta cepa.

El zooplancton utilizado en los experimentos también fue aislado previamente de la laguna Chascomús. Para esto se seleccionaron manualmente varios individuos de *Keratella tropica* (rotífero), *Brachionus havanaensis* (rotífero), *Brachionus caudatus* (rotífero) y *Bosmina huaroniensis* (cladócero), los cuales fueron transferidos a Erlenmeyers de 500 mL con medio cultivo de agua dulce sintético con una dureza moderada (ver Tabla 6 en Weber, 1993, en adelante mencionado como medio EPA por sus siglas en inglés, *Environmental Protection Agency* de EEUU). Todos los cultivos se alimentaron con *Chlamydomonas* sp. cultivadas en medio para algas de agua dulce MWC (*Modified Wright's Cryptophyte*) (Guillard & Lorenzen, 1972) y mantenidos a 21°C.

Experimentos de depredación

Se realizaron numerosos experimentos individuales para estimar la tasa de filtración *in vitro* de las cuatro especies de zooplancton arriba mencionadas sobre

un cultivo de Pcy. Solo en una ocasión se realizó un experimento en bloque, con las tres especies de rotíferos en paralelo, partiendo exactamente de las mismas condiciones experimentales.

Para cada experimento se estableció un tratamiento con zooplancton (**CZ**): con el rotífero *K. tropica* (**CZ_{kt}**), con el rotífero *B. havanaensis* (**CZ_{bh}**), con el rotífero *B. caudatus* (**CZ_{bc}**) y con el cladócero *Bosmina* sp. (**CZ_{bos}**); y un tratamiento control el cual no contenía zooplancton (**SZ**). Para cada experimento se utilizaron 10 tubos de vidrio de 10 mL, 5 correspondieron al tratamiento **CZ** y 5 al control **SZ** respectivo. Los 10 tubos se llenaron con 10 mL del cultivo de Pcy en fase de crecimiento exponencial (aprox. 1×10^6 células mL⁻¹).

Los rotíferos fueron apartados del cultivo original 4 horas antes de comenzar el experimento y fueron colocados en medio de cultivo fresco sin ningún tipo de alimentación. A cada réplica (10 mL) de cada tratamiento **CZ** se le agregaron 50 rotíferos (5000 individuos L⁻¹ densidad final). En el caso del experimento con *Bosmina* sp., a éstas se les retiró el alimento 24 horas antes de comenzar. En cada tubo de 10 mL se agregaron 10 individuos de *Bosmina* sp. para alcanzar una abundancia de 1000 individuos L⁻¹. Las abundancias de individuos que fueron seleccionadas en cada caso corresponden a las abundancias máximas registradas en la laguna (Huber et al., 2017).

Los tubos fueron dispuestos en una rueda de zooplancton para evitar la sedimentación. Esta rueda consiste en un círculo de acrílico que gira a baja velocidad (~2 rpm), en donde se disponen los tubos de vidrio correspondientes a las unidades experimentales. La rueda permaneció girando ininterrumpidamente durante las 48 horas que duró el experimento a 20°C, 11 µmol fotón m⁻² s⁻¹ de intensidad lumínica y con un fotoperíodo luz-oscuridad de 12:12 h. Se tomaron muestras para estimar la abundancia de Pcy por citometría de flujo al inicio (**T₀**) y al final del experimento (**T_f**). Se colectaron 1,6 mL de muestra de cada unidad experimental en crioviales de 2 mL de capacidad, y se fijaron con 160 µL de P+G (1% paraformaldehido y 0.05% glutaraldehido, concentración final). Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su posterior

análisis. La abundancia de Pcy fue estimada mediante citometría de flujo con un citómetro (FACSCalibur, Becton Dickinson, U.S.A) de 4 colores (para ver más detalles ir a “*Materiales y Métodos: citometría de flujo*” del Capítulo II de esta Tesis). Para el análisis en el citómetro, las muestras fueron diluidas previamente en una proporción 1:10 (i.e. 100 μ L de muestra en 900 μ L de PBS).

Para cada experimento se calculó la tasa de pastoreo (G) y la tasa de filtración (F) para cada especie de zooplancton basados en la siguiente ecuación (Frost 1972; en Zhou et al., 2009):

$$G = \frac{V}{n} \times \frac{\ln(SZ) - (\ln CZ)}{t} \times \frac{CZ - T0}{\ln CZ - \ln T0}$$

$$F = \frac{V}{n} \times \frac{\ln SZ - \ln CZ}{t}$$

donde V es el volumen (mL), n el número de rotíferos agregados en cada unidad experimental, t es el tiempo de duración del experimento (hs), SZ es la concentración final de Pcy (cels. mL^{-1}) en el tratamiento control sin zooplancton, CZ es la concentración final de Pcy en el tratamiento que contenía zooplancton y $T0$ es la concentración inicial de Pcy.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía o un análisis no paramétrico dependiendo de cada caso, con el programa de análisis estadístico Infostat (di Rienzo et al., 2020), con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. Para los cálculos se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Resultados

La abundancia de Pcy a T_f disminuyó significativamente ($P<0.05$) en todos los tratamientos que contenían zooplancton (CZ) con respecto a los controles respectivos sin zooplancton (SZ) (Tabla 3.1; Figura 3.1). Para aquellas especies en donde se realizó más de un experimento, se observó que en general las tasas de pastoreo (G) fueron más variables que las tasas de filtración (F). Las tasas de filtración de *Bosmina* sp. fueron considerablemente más elevadas ($28 \mu\text{L ind.}^{-1} \text{h}^{-1}$) que la de los rotíferos ($1,1 - 8,6 \mu\text{L ind.}^{-1} \text{h}^{-1}$). Entre los rotíferos, *B. caudatus* ($6,47 \mu\text{L ind.}^{-1} \text{h}^{-1}$) presentó en promedio los valores más elevados, seguido por *K. trópica* ($3,45 \mu\text{l ind.}^{-1} \text{h}^{-1}$) y *B. havanaensis* ($3,15 \mu\text{l ind.}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Tabla 3.1. Abundancias promedio de picocianobacterias (células mL^{-1}) al inicio del experimento (T_0) y al finalizar (T_f) en el control sin zooplancton (SZ) y en el tratamiento con zooplancton (CZ). En paréntesis se indica el desvío estándar. En todos los casos $n=5$. El experimento realizado en bloque está indicado con *.

Especie	Células mL^{-1}		
	T_f		
	T_0	SZ	CZ
<i>K. tropica</i> *	3×10^6 ($7,6 \times 10^4$)	$3,2 \times 10^6$ ($1,4 \times 10^5$)	$2,5 \times 10^6$ ($7,2 \times 10^5$)
<i>K. tropica</i>	$4,9 \times 10^4$ (1×10^4)	$2,6 \times 10^3$ ($1,7 \times 10^3$)	9×10^2 ($8,7 \times 10^2$)
<i>K. tropica</i>	$2,8 \times 10^5$ ($9,4 \times 10^3$)	$5,2 \times 10^4$ ($2,5 \times 10^4$)	$1,6 \times 10^4$ ($4,8 \times 10^3$)
<i>B. caudatus</i> *	3×10^6 ($7,6 \times 10^4$)	$3,2 \times 10^6$ ($1,4 \times 10^5$)	$1,1 \times 10^6$ ($1,1 \times 10^5$)
<i>B. caudatus</i>	$2,8 \times 10^6$ ($1,7 \times 10^5$)	$2,6 \times 10^6$ ($4,3 \times 10^5$)	$3,2 \times 10^5$ ($1,3 \times 10^5$)
<i>B. havanaensis</i> *	3×10^6 ($7,6 \times 10^4$)	$3,2 \times 10^6$ ($1,4 \times 10^5$)	$1,5 \times 10^6$ ($3,2 \times 10^5$)
<i>B. havanaensis</i>	$4,7 \times 10^5$ ($5,4 \times 10^4$)	$4,5 \times 10^5$ ($5,2 \times 10^4$)	$2,1 \times 10^5$ ($3,3 \times 10^4$)
<i>Bosmina</i> sp.	$8,3 \times 10^5$ ($3,5 \times 10^5$)	$7,5 \times 10^5$ ($1,2 \times 10^5$)	$1,9 \times 10^5$ ($4,5 \times 10^4$)

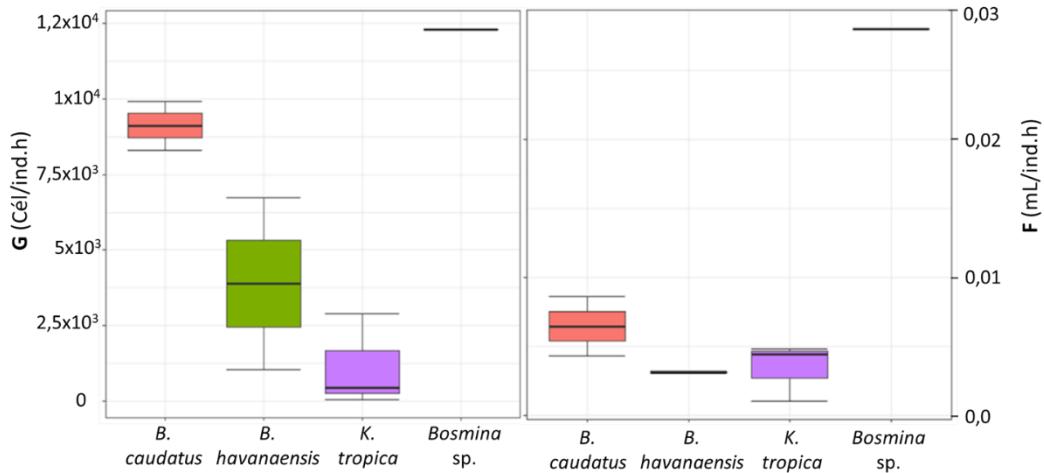


Figura 3.1. Tasas de pastoreo (G) y de filtración (F) de todos los componentes del zooplancton estudiados sobre las picocianobacterias.

Discusión

Muchos autores consideran que el consumo de bacterias y picocianobacterias por parte del zooplancton no es intencional, sino que es mayormente incidental (e.g. Work & Havens, 2003). Sin embargo, en el presente trabajo las abundancias finales de Pcy en todos los tratamientos ensayados fueron significativamente menores que los controles, lo que demuestra que todas las especies de zooplancton aquí estudiadas fueron capaces de ingerir Pcy de manera activa.

Las tasas calculadas no son despreciables, si no que, por el contrario, indican que el impacto del zooplancton sobre las Pcy podría ser muy relevante. A modo de ejemplo, si consideramos que los rotíferos en primavera-verano pueden alcanzar abundancias de más de 5000 ind. L⁻¹ (Diovisalvi et al., 2015b) y que la abundancia media de las Pcy es de aproximadamente 6×10^6 Céls. mL⁻¹, a partir de las tasas obtenidas en estos experimentos los rotíferos serían capaces de consumir entre el 3 y el 10 % de las Pcy en un solo día. Es decir, que no solo los protistas (flagelados y ciliados, heterótrofos y mixótrofos) consumen Pcy, sino que también los rotíferos

y cladóceros de pequeño tamaño tienen la capacidad de ingerir Pcy e impactar de manera significativa sobre su dinámica.

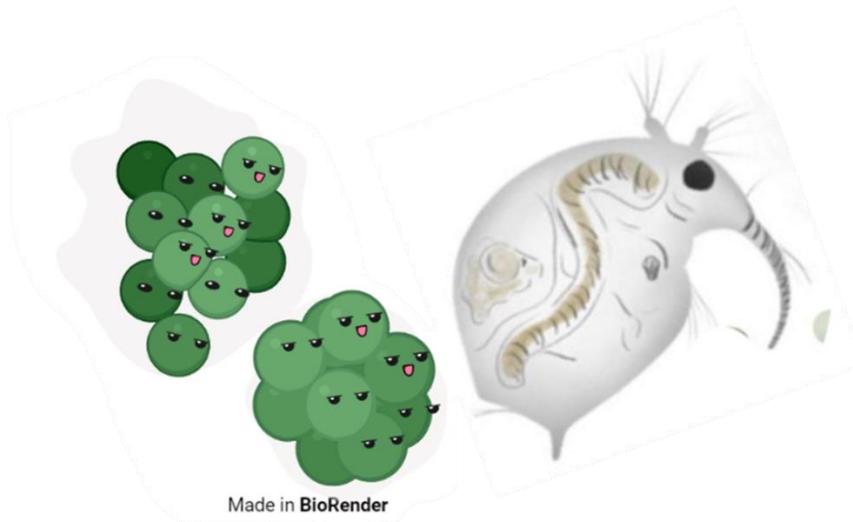
Nuestros resultados concuerdan con lo planteado por Hwang & Heath (1999) quienes mencionan que los rotíferos son importantes depredadores de bacterias y del picoplancton autotrófico en lagos eutróficos. Kim et al. (2000) utilizan microesferas del tamaño de las bacterias para demostrar que los rotíferos del género *Brachionus*, *Conochilus* y cladóceros como *Bosmina longirostris* serían los principales consumidores de presas picoplanctónicas. Asimismo, se encontró que algunos rotíferos como *Keratella quadrata* y *Polyarthra dolicoptera* se alimentan de partículas que están en el rango de 0,5 a 3 μm (Callieri, 2008). Además, existen evidencias del consumo de Pcy por parte de algunas especies del género *Keratella* (Burns & Stockner, 1991; Caron et al., 1985; Stockner & Shortreed, 1989). También se han observado Pcy en el intestino de distintos cladóceros como *Eubosmina*, *Daphnia* y *Ceriodaphnia*, entre otros (Burns & Stockner, 1991; Geller & Müller, 1981; Stockner & Antia, 1986). Asimismo, un trabajo reciente comprobó que los cladóceros de pequeño tamaño no solo predan efectivamente sobre el picoplancton, sino que éstos son su tamaño de presa preferido (Schenone et al., 2022).

Los resultados de este capítulo confirman la hipótesis acerca de la capacidad de las diferentes especies de rotíferos y cladóceros para consumir Pcy. Sin embargo, aún resta estudiar el efecto a distintas temperaturas para dilucidar en qué medida las tasas de depredación varían en relación a los cambios estacionales.

Por otro lado, también es importante mencionar que la presión de herbivoría sobre las Pcy puede estimular la agregación de células favoreciendo la formación de colonias, que actuarían como un mecanismo de defensa contra la depredación (Stal, 2017). Este tema será abordado en mayor profundidad en la segunda parte de este Capítulo.

CAPITULO III: PARTE II

EFFECTO DE DISTINTOS DEPREDADORES SOBRE LA PLASTICIDAD FENOTÍPICA DE LAS PICOCIANOBACTERIAS



Este capítulo fue publicado en el siguiente artículo:

Ospina-Serna Juliana, Huber Paula, Odriozola Mariana, Fermani Paulina & Unrein Fernando. 2020. *Picocyanobacteria aggregation as a response of predation pressure: The direct contact is not necessary*. FEMS Microbiology Ecology, 96(10): 1-10, fiaa153. DOI: 10.1093/femsec/fiaa153.

Introducción

Tal y como se mencionó en la Introducción general, las picocianobacterias pueden encontrarse en la naturaleza tanto en forma unicelulares (Pcy) como embebidas dentro de una vaina muscilaginosa formando agregados de microcolonias o colonias (CPcy) y entre estos dos extremos se puede observar una serie de morfotipos con células agregadas y distintas formas (Callieri et al., 2012; Padisák et al., 1997; Passoni & Callieri, 2000). Algunos estudios sugieren que ciertos géneros de CPcy como por ejemplo *Aphanathece*, *Aphanocapsa* o *Cyanodictyon*, podrían tener etapas unicelulares en su ciclo de vida (Komárová y Šimek 2003), y que las microcolonias podrían ser una transición entre morfotipos unicelulares y coloniales (Callieri et al., 2012). En algunos sistemas de agua dulce se observó que los picos de máxima abundancia de CPcy suelen ocurrir simultáneamente con picos de Pcy (Callieri et al., 2012; Crosbie et al., 2003a; Fahnstiel & Carrick, 1992; Mózes et al., 2006)

Existen evidencias que sugieren que la capacidad de las Pcy para agregarse formando colonias estaría relacionado con las condiciones ambientales (Huber et al., 2017; Jezberová & Komárová, 2007; Komárek et al., 2014). Dentro de las variables ambientales que inducirían esta respuesta fenotípica, las condiciones de luz en el agua y la depredación se han identificado como los factores más importantes. Por ejemplo Crosbie et al. (2003b) observaron un aumento en la formación de microcolonias en ambientes pobres de nutrientes y transparentes, y atribuyeron su formación a la producción de muscílago por parte de las Pcy como un mecanismo de protección contra el daño fotoquímico. Callieri et al. (2011) demostraron que algunas cepas de Pcy forman colonias al ser expuestas a diferentes condiciones de radiación UV, probablemente como estrategia para prevenir el fotodaño. Por otro lado, Jezberová & Komárová, (2007) y Callieri et al., (2016) demostraron que la presencia de un flagelado bacterívoro puede inducir el desarrollo de colonias, como adaptación para escapar de la depredación.

También se ha observado que la presión de depredación ejercida por los protistas (i.e. flagelados, ciliados) induce cambios morfológicos en bacterias

heterótrofas, al igual que para las picocianobacterias (Corno & Jürgens, 2006). Hahn & Höfle (2001) aportan evidencias sobre la formación de filamentos y agregados de las bacterias en respuesta a la depredación. De manera experimental, Matz et al. (2002) y Corno (2006) demostraron que bacterias como *Pseudomonas* sp y *Flectobacillus* sp. forman microcolonias y filamentos, respectivamente, al ser expuestas a un flagelado bacterívoro como *Ochromonas* sp. El desarrollo de morfotipos resistentes a la depredación, como filamentos, en forma de espiral o agregado, parece ser un fenómeno común para bacterias heterótrofas en ambientes productivos (Güde, 1989; Jürgens & Güde, 1994). De hecho, los principales grupos filogenéticos como alfa- y beta-proteobacteria, y *Cytophaga-Flavobacterium* poseen dicha capacidad (Corno & Jürgens, 2006; Jürgens et al., 1999; Šimek et al., 1999, 2001).

La mayoría de los estudios que analizan los cambios fenotípicos como respuesta a la presión de depredación del zooplancton se han centrado en el efecto de los grandes cladóceros como *Daphnia* spp. (Jürgens, 1994; Jürgens & Matz, 2002; Sherr & Sherr, 1987; Šimek et al., 1995). Sin embargo, se sabe que los rotíferos y los pequeños cladóceros, que generalmente dominan en los sistemas eutróficos, también podrían depredar partículas de tamaño similar a una bacteria (Hwang & Heath, 1999; Schenone et al., 2022; Work & Havens, 2003). En consecuencia, teóricamente también podrían inducir cambios morfológicos en las Pcy.

En las lagunas eutróficas de la región pampeana, *Daphnia* spp. está prácticamente ausente debido a la alta densidad de peces zooplancitívoros (Colautti et al., 2015). Por lo tanto, el zooplancton está dominado por rotíferos y, en ciertos períodos, por pequeños cladóceros pertenecientes a los géneros *Bosmina* y *Moina* (Diovisalvi et al., 2015c; Diovisalvi et al., 2015b). Como ya se mencionó en la Introducción General en el apartado “PPP en lagunas pampeanas”, las picocianobacterias dominan la biomasa del fitoplancton en muchas lagunas de esta región, mientras que la proporción de células que forman colonias (CPcy) oscila entre 0 y 80% (Fermani et al., 2015; Huber et al., 2017; Izaguirre et al., 2014).

Llamativamente, los valores más altos se asociaron con períodos donde la abundancia de *Bosmina* sp. fue elevada (Fermani et al., 2015; Huber et al., 2017; Quiroga et al., 2021). Además, Huber et al. (2017) demostraron que algunos genotipos de picocianobacterias pueden encontrarse *in situ* al mismo tiempo como Pcy y como CPcy, lo cual confirma la plasticidad fenotípica de las picocianobacterias. Estos mismos autores comprobaron experimentalmente que el tamaño de las colonias de Pcy aumentan en presencia de *Bosmina* sp., sin embargo, no hay evidencia acerca del papel de los rotíferos en la estructura fenotípica de la comunidad de Pcy.

Otra incógnita que surge a partir de estos estudios es si la formación de agregados en Pcy puede inducirse sin contacto directo entre presas y depredadores, es decir, si es mediado por infoquímicos. Existen evidencias que sugieren que algunas bacterias heterótrofas pertenecientes a Bacteroidetes y alfa-Proteobacterias pueden detectar señales químicas difusibles secretadas por protistas depredadores y responden formando filamentos no palatables o microcolonias (Blom et al., 2010; Corno & Jürgens, 2006). Por lo tanto, se podría esperar la misma respuesta para las Pcy.

Objetivos

- 1- *Analizar el efecto del contacto directo de distintos organismos zooplanctónicos sobre la estructura de las comunidades naturales de Pcy-CPcy.*
- 2- *Evaluar el efecto indirecto, mediado por infoquímicos producidos por diferentes depredadores (flagelados, rotíferos y cladóceros), sobre la capacidad de una cepa de Pcy para formar agregados.*

Hipótesis

H1: Todos los depredadores potenciales pueden estimular la formación de colonias en Pcy unicelulares, aunque *Bosmina* sp. generaría una respuesta más marcada.

H2: El contacto directo presa-depredador no es necesario para inducir la agregación de Pcy unicelulares en colonias.

Materiales y Métodos

Se realizaron dos experimentos en donde fueron expuestas (i) una comunidad planctónica natural en contacto directo con diferentes organismos zooplanctónicos, y (ii) una cepa de Pcy aislada en contacto indirecto con los depredadores mediante la adición de medio condicionado. Tanto la comunidad planctónica natural como la cepa de Pcy fueron colectadas de la laguna Chascomús cuya descripción se detalla en la introducción general (ver “PPP en lagunas pampeanas”)

Condiciones de cultivo y aislamiento de cepas

La cepa de Pcy (CH-040) utilizada en los experimentos fue previamente aislada de la laguna Chascomús y corresponde filogenéticamente al Clado PV del género *Synechococcus* basado en información que se obtuvo de la secuenciación del gen ribosomal 16S (Huber, 2017). Se mantuvo en el medio BG-11 (Rippka, 1988), específico para cianobacterias de agua dulce, a 20°C, 11 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un ciclo de fotoperíodo de luz-oscuridad de 12:12 h.

El zooplancton utilizado en los experimentos también fue aislado previamente de esta laguna. Varios individuos de *Keratella tropica* (rotífero), *Brachionus havanaensis* (rotífero) y *Bosmina huaroniensis* (cladócero) fueron seleccionados manualmente y transferidos a un Erlenmeyer de 500 mL que contenía medio cultivo de agua dulce sintético con una dureza moderada (ver Tabla 6 en Weber, 1993, en adelante mencionado como medio EPA por sus siglas en inglés, *Environmental Protection Agency of United States*). Todos los cultivos se alimentaron con *Chlamydomonas* sp., cultivado en medio para algas de agua dulce MWC (*Modified Wright's Cryptophyte*) (Guillard & Lorenzen, 1972).

El flagelado mixotrófico *Ochromonas tuberculata* (CCAP 933/27) se obtuvo de la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (<https://www.ccap.ac.uk/>) y fue mantenido en medio MWC a 20°C, 18 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y ciclo de fotoperíodo de 12:12 h luz-oscuridad. Existen registros que demuestran la capacidad fagocítica de esta cepa mixotrófica (Parry et al., 2001). Este cultivo no era axénico y la

abundancia de las bacterias fluctuó entre 2 y 5×10^6 células mL^{-1} . Considerando que muchos crisófitos mixotróficos no sobreviven en completa oscuridad (Caron et al., 1993; Keller et al., 1994), optamos por mantener el cultivo con poca intensidad de luz ($18 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Bajo estas condiciones (poca luz y elevada concentración de bacterias), y usando FLB (bacterias marcadas fluorescentemente), se estimó una tasa de bacterivoría de alrededor de 1 bacteria flagelado $^{-1}$ h^{-1} (Costa et al., 2022), que debería ser suficiente para permitir la producción potencial de infoquímicos.

Experimento con la comunidad planctónica natural y contacto directo presa-depredador

El experimento consistió en cuatro tratamientos: **Control**, que contenía solo agua previamente filtrada por una red de $45 \mu\text{m}$ (es decir, con todas las comunidades planctónicas excepto zooplancton); **CZ** o con zooplancton, contenía agua filtrada a la que se adicionó una mezcla de zooplancton representativo de las condiciones naturales en la fecha de muestreo; **Bos**, con adición de *Bosmina huaroniensis*; y **Kt**, con adición de *Keratella tropica*.

El agua fue recolectada de la laguna Chascomús el 31 de octubre 2017, y se prefiltró a través de una red de $45 \mu\text{m}$ para eliminar el zooplancton. Se llenaron 16 tubos de vidrio de 10 mL hasta la parte superior con agua de la laguna prefiltrada: 5 correspondieron al Control, 5 para el tratamiento CZ, 3 para Bos y 3 para el tratamiento Kt. Para el tratamiento Bos, cada tubo de vidrio fue llenado con 10 individuos de *B. huaroniensis* para alcanzar una abundancia de 1000 ind. L^{-1} , mientras que para el tratamiento con Kt, se agregaron 50 individuos de *K. tropica* para alcanzar una abundancia de 5000 ind. L^{-1} . Estos valores corresponden aproximadamente a la abundancia máxima registrada de cladóceros y rotíferos en la laguna (Diovisalvi et al., 2015b; Fermani et al., 2013; Huber et al., 2017). Estos individuos fueron manualmente aislados del cultivo inicial y mantenidos sin ningún tipo de alimento durante 24 horas antes del experimento. Los tubos correspondientes al tratamiento CZ se llenaron con un concentrado de zooplancton de la laguna Chascomús. En promedio, cada unidad experimental contenía 14

cladóceros (*Bosmina longirostris* y *B. huaroniensis*), 47 rotíferos (*K. tropica*, *Keratella americana* y *Filinia* sp.) y 7 copépodos (calanoideos y ciclopoideos). La concentración de cladóceros fue un poco mayor a lo reportado para el tratamiento Bos, mientras que la concentración final de rotíferos fue muy similar a la abundancia en el tratamiento Kt.

Todos los tubos de vidrio se incubaron en una rueda de plancton a 2,5 rpm para evitar la sedimentación, durante 6 días a 20°C, 18 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y fotoperiodo 12:12 horas luz-oscuridad. Las muestras para recuento de abundancia de Pcy, flagelados heterótrofos y ciliados se recolectaron al comenzar (T_0) y al finalizar (T_f) el experimento. El tiempo final fue seleccionado en base a experimentos previos donde se observó una clara respuesta después de este tiempo de incubación sin mortalidad de zooplancton (Huber et al., 2017). Solo los tiempos iniciales y finales fueron muestreados dado que muestrear en tiempos intermedios podría haber eliminado organismos del zooplancton, modificando el número de herbívoros durante el experimento y, en consecuencia, alterando los resultados.

Se recolectaron dos tipos de muestras en cada tiempo: muestras conservadas con P+G (concentraciones finales 1% de paraformaldehído + 0,05% de glutaraldehído) y muestras fijadas con una solución de lugol acidificado al 1%.

Recuento de microorganismos

La abundancia de picocianobacterias fue estimada por microscopía de epifluorescencia. Las muestras conservadas con P+G se filtraron a través de un filtro de policarbonato de tamaño de poro de 0,22 μm siguiendo el procedimiento estándar de tinción con 4.6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Porter & Feig, 1980). Todas las muestras se diluyeron (1:30) con agua de la laguna prefiltrada por 0,22 μm debido a la gran cantidad de organismos y material particulado en suspensión. Como se describe en Fermani et al. (2013) a partir de esta dilución se tomaron alícuotas para la enumeración de picocianobacterias y flagelados heterotróficos, el volumen de las alícuotas se ajustó de acuerdo a la concentración de material particulado proveniente de la muestra, para las picocianobacterias se usaron 1,2 mL que corresponde a un volumen de 40 μL de la muestra original y para las muestras

de flagelados heterotróficos se utilizaron 3 mL (correspondientes a 100 μl de la muestra original). En ambos casos, las diluciones se llevaron a un volumen final de 5 mL, donde se agregaron 50 μl de DAPI (0,5 mg mL^{-1}), fueron dejadas en oscuridad por 10 minutos y posteriormente, estas muestras fueron filtradas mediante filtros de policarbonato negro de 25 mm de diámetro (MSI), el tamaño de poro del filtro usado para picocianobacterias fue de 0,2 μm y 0,8 μm para los flagelados. Estos filtros fueron montados sobre portaobjetos con una gota de aceite de inmersión de baja fluorescencia (Immersol 518 F) y almacenado a -20°C hasta su inspección al microscopio. Las picocianobacterias se observaron bajo excitación de luz verde a un aumento de 1000X en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i equipado con una lámpara HBO 50W y un conjunto de filtros de excitación de luz verde (BP 510–560 nm, FT 565 nm, LP 590 nm), excitación de luz azul (BP 450–490 nm, FT 500 nm, LP 515 nm), y UV (BP 340–380 nm, FT 400 nm, BP 435–485).

Se identificaron diferentes morfotipos de picocianobacterias en función del número, la forma y el tamaño de las células y las colonias siguiendo el criterio de Huber et al. (2017), basado en Komárek et al. (1999, 2014) y Komárek & Johansen (2015) (Tabla 3.2). El recuento de epifluorescencia fue realizado para determinar la abundancia (células mL^{-1}) de las Pcy, microcolonias y tricomas cortos. Se aceptó entre 10-15 % de error en la estimación de la entidad más frecuente, y se calculó de la siguiente manera:

$$e = \left[\left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) * \frac{t(\alpha, 1 - n)}{X} \right] * 100$$

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

En estas mismas muestras se estimó además el número de células por colonia de *Aphanocapsa*-like, *Cyanodictyon* sp. y *Eucapsis* sp. El tamaño de las células fue estimado mediante análisis de imágenes de epifluorescencia siguiendo la técnica de Massana et al. (1997) y usando el software de procesamiento de imágenes Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics).

Tabla 3.2. Características morfológicas de los morfotipos de picocianobacterias dominantes en la Laguna Chascomús. La clasificación de CPcy está basada en Huber et al. (2017).

Morfotipo		Descripción	Tamaño de la colonia	Forma de la célula	Dimensión de la célula
Pcy	Unicelulares			Esférica	$1,07 \pm 0,30 \mu\text{m}$ (n = 100 células)
CPcy	Microcolonias	Agregados sin una forma definida	Usualmente de 3-9 células	Esférica	$1,02 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (n = 100 células)
	Tricomas cortos	Tricomas	4-12 células	Cilíndrica	$1,27 \times 1,06 \pm 0,05 \mu\text{m}$ (n = 100 células)
	<i>Cyanodictyon</i> sp.	Mucílago fino y difuso, células redondas, con orden aparente	Promedio $25,5 \times 16,2 \mu\text{m}^a$ ($9,0 \times 12,0$ – $49,3 \times 20,8 \mu\text{m}$) 14-30 células	Esférica	$1,16 \pm 0,20 \mu\text{m}$ (n = 100 células)
	<i>Aphanocapsa-like</i>	Mucílago denso y definido, células redondas, colonias esféricas	Promedio $10,8 \times 9,2 \mu\text{m}^a$ ($4,8 \times 3,8$ – $24,8 \times 18,6 \mu\text{m}$) 7-15 células	Esférica	$1,20 \pm 0,04 \mu\text{m}$ (n = 100 células)
	<i>Eucapsis</i> sp.	Colonias cúbicas, las células suelen organizarse en grupos de cuatro células.	Promedio $27,6 \times 13,2 \mu\text{m}^a$ ($9,8 \times 9,5$ – $60,8 \times 25,6 \mu\text{m}$) 10-78 células	Esférica	$1,17 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (n = 100 células)

El número de colonias por mililitro de los tres principales morfotipos (*Aphanocapsa-like*, *Cyanodictyon* sp. y *Eucapsis* sp.) (Tabla 3.2) se estimó siguiendo el método de Utermöhl (1958). Para esto las muestras fueron fijadas,

como ya se mencionó más arriba, con una solución de lugol acidificado (1% concentración final). En este caso, cada muestra fue previamente diluida en una proporción 1:50 por su alto contenido de partículas suspendidas, de esta dilución se colocaron 10 mL en cámaras de sedimentación y se dejaron sedimentar durante 24 horas. Las muestras sedimentadas fueron analizadas a 400x utilizando un microscopio Nikon Eclipse T100. Primeramente, se realizó un barrido de todo el fondo de la cámara con un aumento bajo para analizar la uniformidad de la distribución del fitoplancton, luego se contaron campos al azar. Se aceptó error de recuento de <20% en la estimación del organismo más frecuente en la muestra (Venrick, 1978).

El número de células por mililitro de los diferentes morfotipos de CPcy fue estimado multiplicando las colonias por mililitro (estimadas con el microscopio invertido) por el número de células por colonia (estimado por microscopía de epifluorescencia).

Los flagelados heterótrofos se cuantificaron a un aumento de 1000x excitando la muestra con radiación ultravioleta y con luz azul. La luz azul permite diferenciar los organismos heterótrofos de los autótrofos debido a la autofluorescencia de la clorofila-a que fluyece rojo. Se contó un mínimo de 100 flagelados por muestra.

Los ciliados se contaron en las muestras fijadas con lugol acidificado. La alta concentración de material particulado presente en el agua de la laguna dificultó el recuento mediante microscopio invertido, por esta razón se optó por el método de microscopía de epifluorescencia para cuantificarlos. De esta manera, se blanquearon 6 mL de submuestras con unas gotas de tiosulfato y se fijaron con formalina al 2% (Macek et al., 2008). Posteriormente, fueron teñidos entre 0,5 y 1 mL de cada muestra con DAPI, y se filtraron por medio de filtros de policarbonato negro (MSI) de tamaño de poro de 2 μm (Sherr & Sherr, 1993). Los filtros se montaron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, y se examinaron a un aumento de 1000X utilizando un microscopio de epifluorescencia

bajo luz azul y excitación UV (Fermani et al., 2013). Se contaron un mínimo de 400 campos por muestra.

La abundancia de zooplancton *in situ* del tratamiento CZ en T_0 se determinó vertiendo 50 L de agua del lago a través de una red de 45 μm y esta muestra filtrada se conservó en formalina al 4%. Los rotíferos se contaron bajo un microscopio óptico en una celda de conteo Sedgwick-Rafter de 1 mL. Los cladóceros se identificaron con un microscopio de disección o lupa, en una cámara de recuento Bogorov de 5 mL. El zooplancton de todos los tratamientos se contó al T_f para evaluar la tasa de supervivencia. La abundancia del zooplancton se expresó como número de individuos por litro.

Experimento con una cepa de Pcy (CH40) y contacto indirecto presa-depredador

Con el objetivo de evaluar el efecto indirecto de los distintos depredadores sobre las Pcy, se realizó un experimento donde se utilizaron exudados de los mismos depredadores sobre estas (Medio condicionado, MC). Para este experimento la cepa de Pcy CH40 se mantuvo con medio BG-11 (Rippka, 1988; Stanier et al., 1971) en un cultivo semicontinuo en fase de crecimiento exponencial con el fin de minimizar el número de células agrupadas. El experimento se realizó por triplicado utilizando recipientes de vidrio de 10 mL de capacidad. Se llenaron un total de 18 tubos de vidrio con 8 mL de cultivo de Pcy y 2 mL de medio condicionado (para los diferentes tratamientos) o medio de cultivo (para los controles), estableciendo la abundancia inicial de Pcy en $\sim 2 \times 10^6$ células mL^{-1} .

Se establecieron cuatro tratamientos con medio condicionado (MC). Para ello, el cultivo en el que creció cada depredador se filtró mediante un filtro de membrana de 0,22 μm (BiofilTM). El filtrado obtenido fue analizado por citometría de flujo para confirmar la ausencia de microorganismos. Los cultivos utilizados contenían *B. huaroniensis* (Bos) con una abundancia inicial de $1,2 \times 10^3$ individuos L^{-1} , *K. tropica* (Kt) con 3×10^3 ind. L^{-1} , *B. havanaensis* (Bh) con 3×10^3 ind. L^{-1} y *O. tuberculata* (Och) con 3.8×10^7 células L^{-1} . Además, se incluyeron dos controles diferentes. Uno con la adición de medio BG-11, el medio utilizado para cultivar las

Pcy (Control-BG11), y otro con la adición de medio modificado EPA, el medio utilizado para el cultivo de zooplancton (Control-EPA).

Además de *Bosmina*, que tiene un impacto sobre la dinámica Pcy-CPcy (Huber et al., 2017), y los rotíferos, que dominan el zooplancton en la laguna (Diovisalvi et al., 2015b), también fue incluido un protista mixótrofo dado que generalmente se consideran los principales bacterívoros en lagunas. Por lo tanto, se decidió utilizar *Ochromonas* ya que estos se alimentan de Pcy e inducen un cambio en su morfología cuando se cultivan juntos (Jezberová & Komárová, 2007).

Se tomaron muestras (1 mL) al inicio del experimento (T_0) y después de 24, 48 y 96 horas de incubación para determinar la abundancia de picocianobacterias. En cada ocasión, el volumen eliminado se reemplazó con medio condicionado o medio de cultivo fresco según se trate de un tratamiento o del control.

Los tubos de vidrio se colocaron en una rueda de plancton (descrita anteriormente) utilizando las mismas condiciones de luz y temperatura que en el primer experimento. Se contaron las picocianobacterias (Pcy y CPcy) usando microscopía de epifluorescencia. El procesamiento de las muestras fue similar al experimento descrito anteriormente; la única diferencia fue que la dilución utilizada fue diferente dependiendo de los cambios en la abundancia de picocianobacterias en el transcurso del tiempo del experimento.

Análisis de datos

La mayoría de los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico Infostat (di Rienzo et al., 2020), que se conecta al entorno R a través de una interfaz integrada. En el experimento con comunidades naturales, para comparar todos los tratamientos con el Control, se realizó ya sea un ANOVA de una vía o una prueba de Kruskal-Wallis, dependiendo de si los datos para el análisis eran paramétricos o no paramétricos. Para este experimento se planeó un diseño desbalanceado porque se aumentó el número de réplicas en CZ, y por lo tanto también en el Control, para controlar la varianza.

Cuando los resultados de ANOVA o Kruskal-Wallis mostraron que las variaciones eran significativas ($P<0,05$), se probaron las diferencias significativas entre los tratamientos mediante comparaciones *post hoc* usando una prueba de Tukey. Para el segundo experimento, se ejecutó un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) analizando dos tipos de efectos, es decir, el efecto de los tratamientos sobre las Pcy y el efecto del tiempo sobre los tratamientos.

Resultados

Experimento con la comunidad planctónica natural y el contacto directo presa-depredador

Al inicio del experimento (T_0) la abundancia de picocianobacterias era de $1,3 \times 10^7$ células mL^{-1} , de las cuales el 34% se encontraban en formas unicelulares (Pcy) y el resto formaban diferentes tipos de agregados (CPcy) (Fig. 3.2 a, Tabla 3.2): el 62% correspondió a diferentes tipos de colonias y microcolonias y el 4% a tricomas cortos. Las Pcy y CPcy presentaban una morfología celular muy similar bajo el microscopio, todas ricas en ficocianina (PC-Pcy), sin aerotopos (vesículas de gas) y con tamaños de célula casi idénticos de $1,07 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Tabla 3.2). Entre las CPcy, se identificaron tres morfotipos principales: *Cyanodictyon* sp. con una abundancia inicial de 6×10^6 células mL^{-1} , *Aphanocapsa*-like con $4,8 \times 10^5$ células mL^{-1} y *Eucapsis* sp. con $1,3 \times 10^5$ células mL^{-1} . Se observaron microcolonias, sin una morfología colonial definida ($3,6 \times 10^5$ células mL^{-1}), también se identificaron otros agregados con una morfología celular bastante similar, como *Merismopedia* sp. ($1,2 \times 10^5$ células mL^{-1}) y *Rhabdoderma* sp. ($1,4 \times 10^5$ células mL^{-1}).

Después de 6 días de incubación (T_f) el número total de células de picocianobacterias no disminuyó con respecto a la abundancia inicial ($9,2 \times 10^6$ células mL^{-1}). La abundancia de Pcy fue significativamente menor ($P < 0,05$) en todos los tratamientos ($\sim 1,5 \times 10^6$ células mL^{-1}) en comparación con el Control ($3,5 \times 10^6$ células mL^{-1}), mientras que la abundancia de células CPcy fue significativamente mayor (Fig. 3.2b; Fig. 3.3). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes depredadores (CZ, Bos, Kt). La abundancia relativa de células Pcy y CPcy mostró la misma tendencia. Las Pcy aumentaron levemente en el Control (39%), mientras que en los tratamientos que contenían zooplancton disminuyó significativamente ($P < 0,05$), alcanzando 21, 14 y 9% en CZ, Bos y Kt, respectivamente en relación con el control (Fig. 3.2a). Con respecto a las células que forman colonias o agregados (CPcy), hubo una leve disminución (no significativa) en el Control del 59% en T_0 al 53% en T_f . Por el contrario, se observó

un aumento significativo ($P<0,05$) en la abundancia de CPcy en todos los tratamientos con zooplancton: 69% en CZ, 78% en Bos y 82% en Kt.

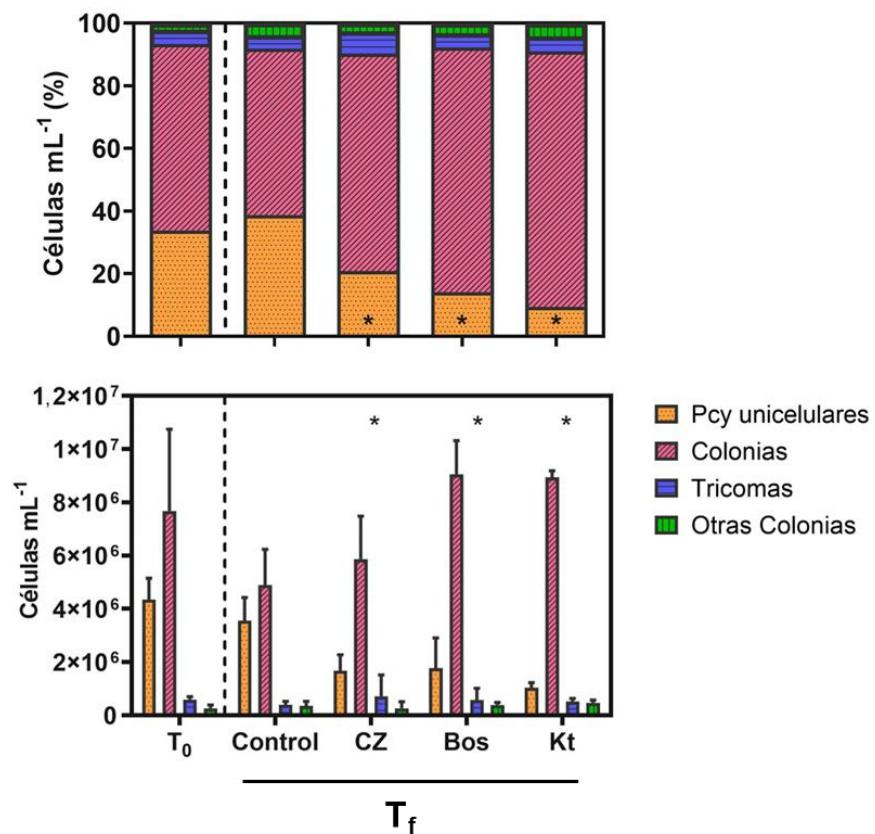


Figura 3.2. Contribución relativa (a) y abundancia absoluta (b) de morfotipos de picocianobacterias al inicio (T_0) y después de seis días de incubación (T_f) en el experimento con la comunidad planctónica natural. CZ: con zooplancton; Bos: *Bosmina huaroniensis*; Kt: *Keratella tropica*. Las colonias incluyen microcolonias, *Aphanocapsa*-like, *Eucapsis* sp. y *Cyanodictyon* sp. Otras Colonias: *Merismopedia* sp. y *Rhabdoderma* sp. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$).

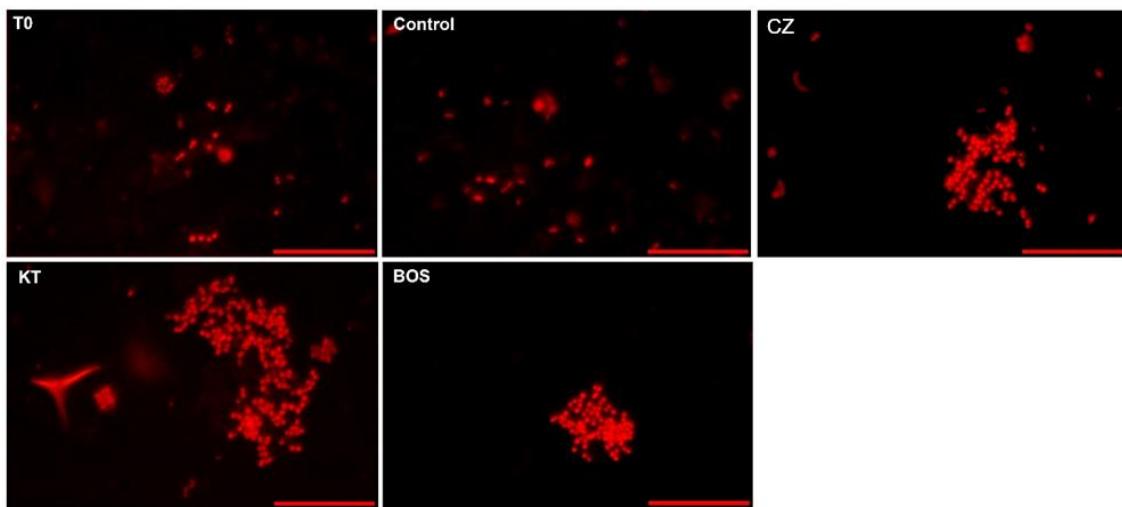


Figura 3.3. Micrografías de epifluorescencia bajo excitación con luz verde que muestran ejemplos de morfotipos de picocianobacterias al inicio del experimento (T_0) y después de seis días de incubación (T_f) en el experimento con la comunidad natural: CZ: con zooplancton; BOS: *Bosmina huaroniensis*; KT: *Keratella tropica*. Las barras rojas indican una escala de 20 μm .

Las diferencias en los morfotipos de CPcy entre tratamientos se observaron principalmente en *Aphanocapsa*-like (Fig. 3.4). En el tratamiento Bos, la abundancia aumentó significativamente al duplicar el número de colonias por mL ($P<0,05$). Por otro lado, las microcolonias tendieron a disminuir en todos los tratamientos en comparación con T_0 . El número de células por colonia no varió significativamente entre los tratamientos en la mayoría de los morfotipos de CPcy ($P>0,05$), microcolonias (promedio de 4,5 células colonia $^{-1}$), tricomas cortos (promedio de 4,3 células colonia $^{-1}$) y *Cyanodictyon* sp. (promedio de 22,5 células colonia $^{-1}$).

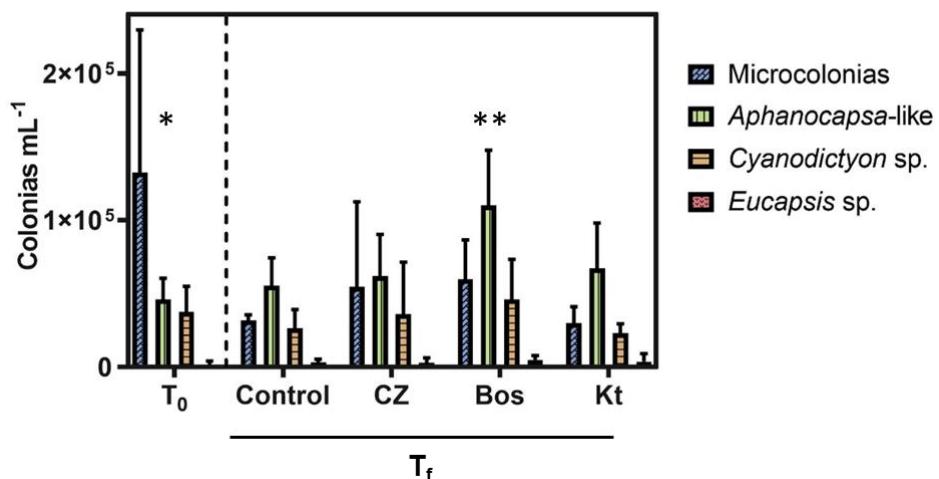


Figura 3.4. Abundancia de los principales morfotipos de CPcy al inicio (T_0) y después de seis días de incubación (T_f) en el experimento con la comunidad planctónica natural. CZ: con zooplancton; Bos: *Bosmina huaroniensis*; Kt: *Keratella tropica*. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$).

Aphanocapsa-like aumentó significativamente ($P<0,05$) de 8,1 células colonia⁻¹ en T_0 a más de 11 células colonia⁻¹ en Kt, CZ y Bos en T_f (Fig. 3.5). Se observaron diferencias significativas en el tamaño colonial promedio de *Eucapsis* sp. En CZ ($P<0,05$) disminuyó a 11,4 células colonia⁻¹ y en Bos alcanzó 67,8 células colonia⁻¹.

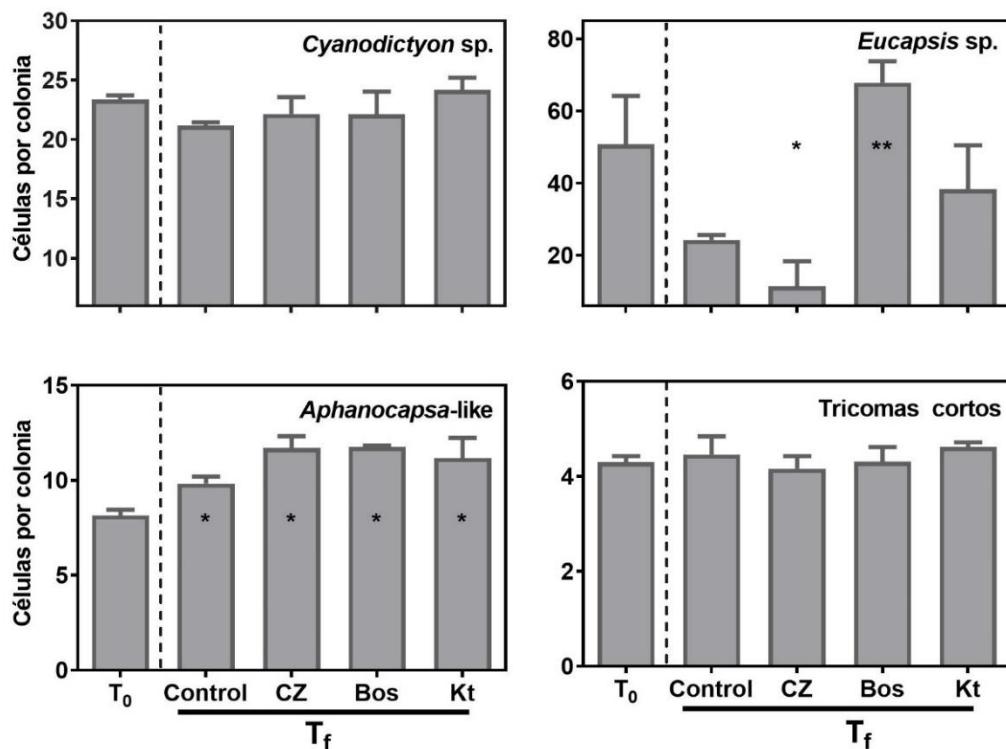


Figura 3.5. Número de células por colonia de los principales morfotipos de CPcy al inicio (T_0) y después de seis días de incubación (T_f) en el experimento con la comunidad planctónica natural. CZ: con zooplancton: Bos: *Bosmina huaroniensis*; Kt: *Keratella tropica*. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). En cuadro *Eucapsis* sp. los asteriscos (*) y (**) indican diferencias significativas entre los tratamientos CZ y Bos.

La abundancia de flagelados heterótrofos al inicio del experimento fue de 5.2×10^4 flagelados mL^{-1} . No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos y Control en T_f (Fig. 3.6a). La abundancia inicial de ciliados fue de $12 \text{ ciliados mL}^{-1}$. Al final del experimento, la abundancia fue significativamente mayor en el Control (promedio: $102 \text{ ciliados mL}^{-1}$) en comparación con los otros tratamientos ($P < 0.05$) (Fig. 3.6b). La comunidad de zooplancton en el lago estuvo representada principalmente por pequeños cladóceros (*B. longirostris* y *B.*

huaroniensis) y rotíferos (*K. tropica*, *K. Americana*, *B. havanaensis* y *Brachionus caudatus*), mientras que los copépodos fueron el grupo menos abundante (tabla 3.3). Al final del experimento, la supervivencia del zooplancton fue ~75% para Bos y ~100% para tratamientos con Kt.

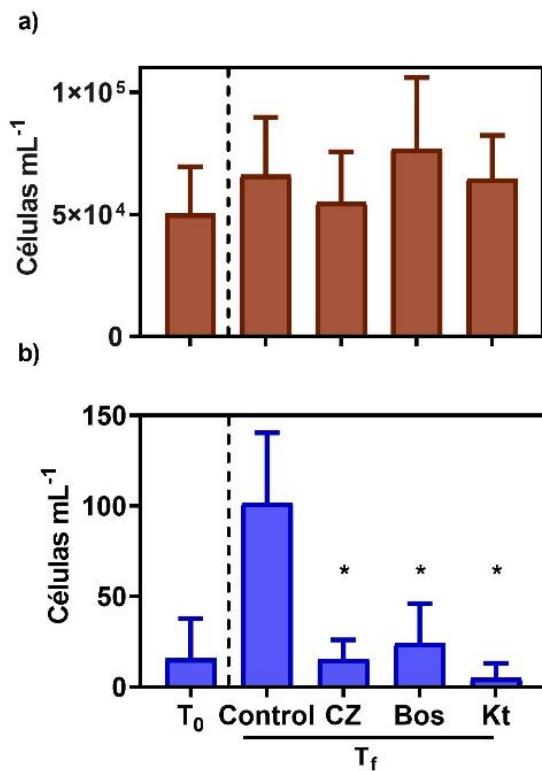


Figura 3.6. Abundancia de flagelados (a) y ciliados (b) al inicio (T_0) y después de seis días de incubación (T_f) en el experimento con la comunidad planctónica natural. CZ: con zooplancton; Bos: *Bosmina huaroniensis*; Kt: *Keratella tropica*. Las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0,05$).

Tabla 3.3. Abundancia de zooplancton (individuos L^{-1}) al inicio del experimento *in situ* (T_0) y en los diferentes tratamientos en el experimento con la comunidad natural. CZ: con zooplancton; Bos: *Bosmina huaroniensis*; Kt: *Keratella tropica*.

Zooplancton	<i>In situ</i>	CZ	Bos	Kt
Cladóceros <i>(Alona sp., Moina sp., Bosmina longirostris, B. huaroniensis)</i>	60	1420	734	
Rotíferos <i>(Brachionus caudatus, B. havanaensis, Filinia, Keratella americana, K. tropica)</i>	685	4700		5600
Copépodos <i>(Calanoideos, ciclopoideos)</i>	38	760		

Experimento con una cepa de Pcy y con contacto indirecto presa-depredador

El número total de células (Pcy + CPcy) al comienzo del experimento fue de $1,7 \times 10^8$ células mL^{-1} . La abundancia de picocianobacterias aumentó de 2 a 3 veces en todos los tratamientos que contenían medio condicionado (MC) y permaneció constante en los controles. Al comienzo del experimento, aproximadamente el 20% de las células se encontraban agregadas. Sin embargo, este porcentaje disminuyó a 11 y 14% en Control-BG11 y Control-EPA, respectivamente, después de 4 días de incubación (Figs. 3.7 y 3.8). Las diferencias entre los controles no fueron significativas en ningún momento ($P>0,05$). Por el contrario, los cuatro tratamientos que contenían MC aumentaron significativamente el porcentaje de células agregadas (Fig. 3.7), así como el tamaño de las colonias (Fig. 3.8). Después de un día de incubación, las CPcy superaron el 40% en todos los casos. A las 48 h de incubación, hubo una ligera disminución en la mayoría de los tratamientos con medio condicionado, aunque siempre se encontraron diferencias significativas respecto a los Controles ($P<0,05$) a lo largo del curso del experimento (24, 48 y 96 h). No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre los distintos

tratamientos con MC. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de muestreo ($P>0,05$).

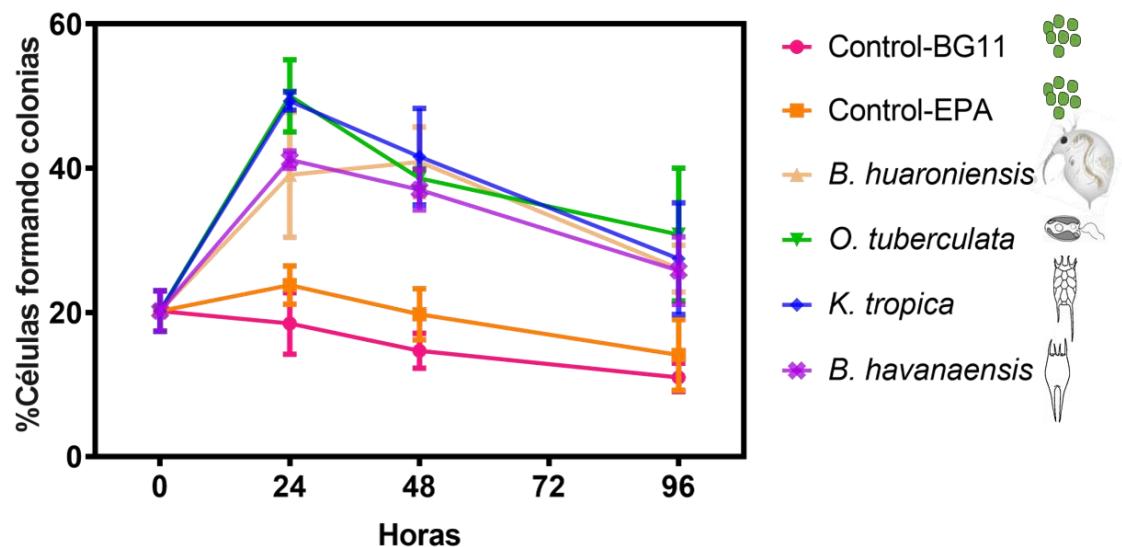


Figura 3.7. Porcentaje de células de picocianobacterias que forman agregados en cada tratamiento y controles a lo largo de los cuatro días de incubación en el experimento con medio condicionado. Las barras indican la desviación estándar.

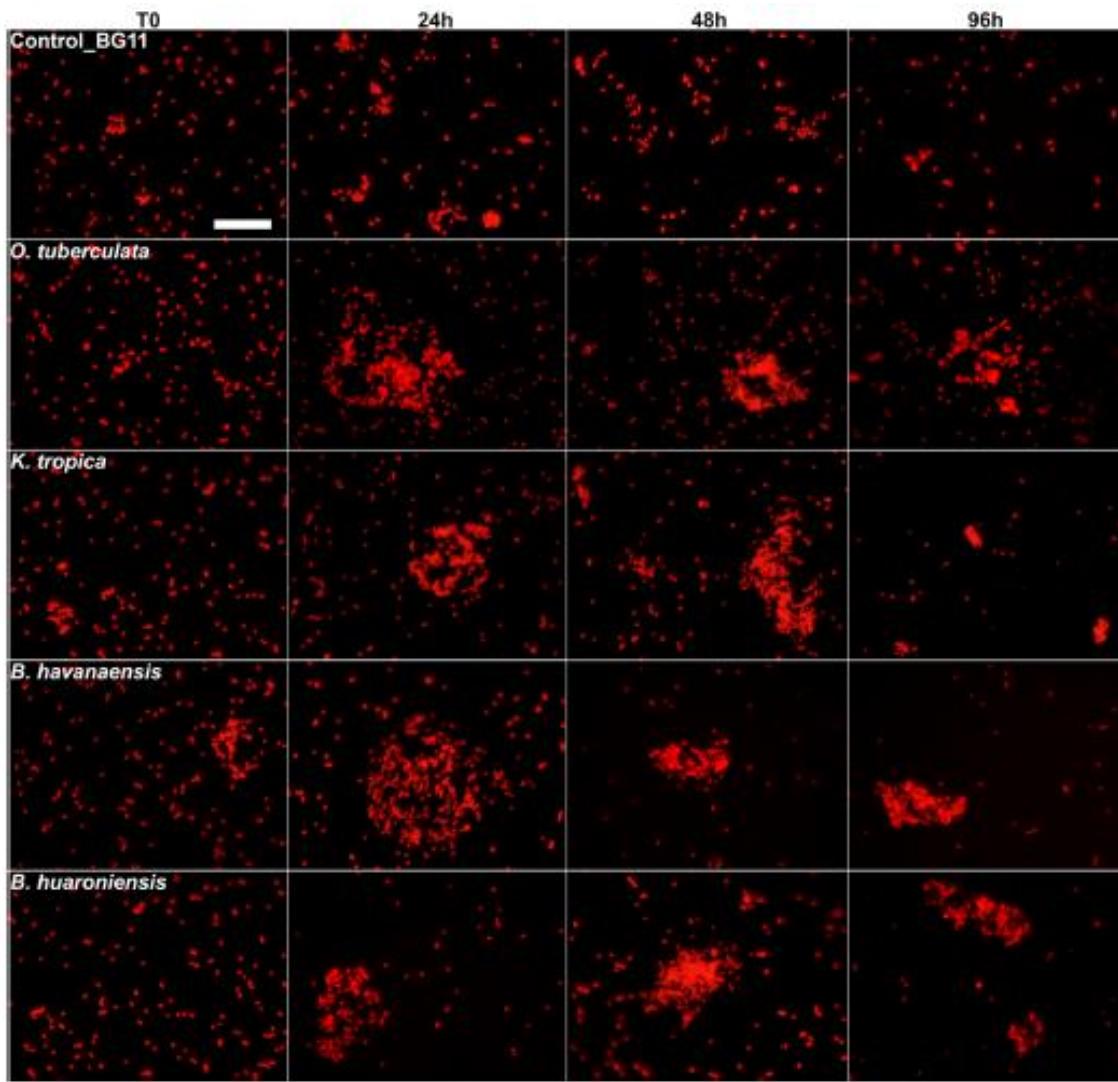


Figura 3.8. Micrografías de epifluorescencia bajo excitación con luz verde de la cepa a Pcy en cada tratamiento y a diferentes tiempos de incubación (T0, 24, 48 y 96 horas) en el experimento con medio condicionado. La barra blanca indica una escala de 20 μ m.

Discusión

Existen evidencias que demuestran que la agregación de microorganismos unicelulares ofrece protección contra los depredadores (Pernthaler, 2005; Stal, 2017). Por ejemplo, algunos eucariotas como el alga verde *Scenedesmus* (Verschoor et al., 2004), así como también diferentes grupos de bacterias heterótrofas, forman microcolonias (Matz et al., 2004) o agregados (Blom et al., 2010; Corno et al., 2013) como mecanismo de defensa para evitar la depredación. En picocianobacterias, Jezberová & Komárová, (2007) y Callieri et al., (2016) demostraron que el desarrollo de agregados podría ser estimulado por la presencia de una Chrysophyceae mixotrófica. Sin embargo, en estos últimos experimentos, las presas y los depredadores se colocaron en el mismo contenedor experimental.

En el presente trabajo, pudimos confirmar experimentalmente el efecto de agregación de picocianobacterias unicelulares en colonias como estrategia de defensa contra los depredadores y además demostramos que el contacto directo entre presa y depredador no es necesario para estimular la agregación de Pcy en CPcy, confirmando la hipótesis H2. Además, nuestros resultados sugieren que diferentes depredadores tanto representantes del zooplancton (rotíferos y pequeños cladóceros) como nanoflagelados podrían desencadenar la misma respuesta.

Algunas cianobacterias coloniales como *Microcystis aeruginosa* generalmente crecen como células individuales en condiciones de cultivo, en lugar de crecer formando colonias como suele encontrarse en los ambientes naturales. Sin embargo, se ha demostrado que sus células se agregan cuando son tratadas con la toxina microcistina producida por la misma especie (Sedmak & Eleršek, 2006), con células de *Microcystis* rotas (Becker, 2010) o con medio de cultivo de *Daphnia* envejecido (Becker, 2010). Por el contrario, experimentos con el alga verde *Scenedesmus obliquus* y el rotífero *Brachionus calyciflorus* demostraron que la inducción de la formación de colonias en *S. obliquus* ocurre a través de sustancias químicas que son liberadas durante el pastoreo, y no a través de sustancias químicas producidas por un depredador o una presa solamente (Verschoor et al., 2007). En nuestro caso, la respuesta se observó utilizando medio condicionado de

diferentes organismos de zooplancton que se alimentaban de *Chlamydomonas* sp., o en el caso de *O. tuberculata* cuya cepa fue mantenida en un medio de cultivo no axénico, es decir que se alimentaba de bacterias. Por lo tanto, esto sugiere que los infoquímicos no provienen de células de Pcy rotas. De acuerdo con nuestros resultados, Corno & Jürgens, (2006) demostraron que una cepa de *Flectobacillus* (Bacteroidetes) puede detectar señales químicas disueltas secretadas por protistas depredadores y responder formando filamentos no palatables. Curiosamente, esta respuesta de cambios fenotípicos pudo ser inducida cuando el flagelado depredaba sobre *Flectobacillus* y también sobre *Pseudomonas putida* (Proteobacteria). Algunos estudios que abordan el papel de *Daphnia* en la formación de colonias de diferentes algas sugieren que la evolución de infoquímicos en esta respuesta fenotípica podría ser una señal orgánica no volátil con un peso molecular bajo (van Holthoorn et al., 2003; von Elert & Franck, 1999). Del mismo modo, Yasumoto et al. (2005, 2008) estudiaron mediante cromatografía, el infoquímico liberado por *Daphnia* en presencia de *Scenedesmus* y encontraron ocho tipos diferentes de sulfatos alifáticos. Sin embargo, hasta la fecha no existen pruebas de que estos productos químicos sean liberados por dafnídos vivos y por otros depredadores como rotíferos o flagelados. Son necesarios más estudios para desentrañar la composición exacta de las señales químicas responsables de la inducción de defensa de cada especie en particular.

La mayoría de los experimentos realizados para evaluar la plasticidad fenotípica de bacterias y picocianobacterias en respuesta al pastoreo se han centrado en protistas, en particular en flagelados. Esto se debe a que los flagelados heterótrofos y mixótrofos se consideran comúnmente los principales depredadores de picoplancton en la columna de agua (Pernthaler, 2005; Sherr & Sherr, 2002), mientras que el efecto del zooplancton de mayor tamaño generalmente se subestima o se considera de importancia secundaria (Callieri et al., 2012), a pesar de que el picoplancton está dentro del tamaño de presa preferido por el zooplancton pequeño. Algunos estudios antiguos mostraron que *Bosmina* se alimenta de presas $<19\text{ }\mu\text{m}$ (Burns, 1968; Gliwicz, 1969). En particular, algunas estimaciones indicaron que estos pequeños cladóceros prefieren presas de entre 1,5 y $\sim 5\text{ }\mu\text{m}$ (Geller & Müller,

1981; Ross & Munawar, 1981). Además, diferentes especies del rotífero *Keratella* parecen preferir partículas de ~0,5–2 μm (Ooms-Wilms, 1997; Ronneberger, 1998). Por lo tanto, las Pcy y las microcolonias pequeñas de pocas células estarían dentro del rango de tamaño de presa preferido por *Bosmina* y *Keratella*.

En este trabajo se evaluó el efecto de un rotífero (*K. tropica*) y un pequeño cladócero (*B. huaroniensis*) sobre una comunidad natural dominada por Pcy y CPcy. A pesar de que el volumen utilizado en el primer experimento pudo haber limitado el comportamiento normal de *Bosmina*, aun así, se observó un claro efecto sobre la agregación de Pcy, ya que la abundancia de Pcy unicelular disminuyó y la abundancia de células CPcy aumentó con la presencia de diferentes organismos zooplanctónicos (Fig. 4.1). Estos resultados concuerdan con trabajos previos (Huber et al., 2017b; Quiroga et al., 2021) acerca del efecto de *Bosmina*, y sugieren además que los rotíferos también podrían desencadenar la misma respuesta. Si bien esto podría explicarse por un consumo más rápido de las Pcy, favoreciendo así la dominancia de las CPcy, no encontramos diferencias en el número total de células de picocianobacterias (Pcy + CPcy) entre el tiempo inicial y el final. Además, Huber et al. (2017) analizando la porción del ADN correspondiente al gen 16S y al ITS (espaciador transcripto interno) demostraron que varios genotipos de picocianobacterias pueden encontrarse *in situ* tanto como células individuales (Pcy) como formando colonias (CPcy). Un efecto indirecto, mediado a través de una cascada trófica, también podría ser una explicación plausible de la agregación. Sin embargo, los resultados del segundo experimento mostraron que el medio condicionado que provenía del cultivo de *Bosmina* también inducía la agregación en una cepa de Pcy. En conjunto, estos resultados indican que el pastoreo del zooplancton podría inducir la agregación *in situ* de Pcy.

Se ha observado que, en los lagos eutróficos poco profundos, la abundancia de rotíferos y pequeños cladóceros puede ser notablemente alta (Jurgens & Jeppesen, 2000; Sommaruga, 1995). En la laguna Chascomús se han registrado en algunas ocasiones más de 5000 rotíferos L^{-1} y 1000 cladoceros L^{-1} (Diovisalvi et al., 2015b; Fermani et al., 2013; Huber et al., 2017). En particular, Huber et al. (2017)

registraron un aumento significativo en el número de células por colonia de *Cyanodictyon* sp. (de 20 a 70 células colonia⁻¹) seguido a un pico de cladóceros (>1000 ind. L⁻¹). En consonancia con esto, un estudio de citometría de flujo de 10 años de la dinámica de las picocianobacterias en la misma laguna (Quiroga et al., 2021) mostró un aumento de la fluorescencia roja (i.e, la clorofila) y la dispersión de la luz (i.e. el tamaño) durante los períodos de alta abundancia de *Bosmina*, que pueden estar asociados con una mayor abundancia de CPcy. En base a estos resultados, era esperable que *Bosmina* indujera una respuesta más marcada que otros depredadores como los rotíferos. Sin embargo, contrariamente a nuestra hipótesis H1, encontramos que la presencia de todos los depredadores estudiados afectó de manera similar la proporción de CPcy en una comunidad natural.

Estudios llevados a cabo por Verschoor et al. (2004) demostraron que el tamaño de la colonia de *S. obliquus* aumenta con la concentración de infoquímicos producida de *B. calyciflorus*. Siguiendo esta idea, especulamos que la falta de diferencias entre los depredadores utilizados en nuestro estudio podría deberse a una concentración muy alta de sustancias infoquímicas en todos los tratamientos, probablemente superior a la que comúnmente se puede registrar en la laguna. Desafortunadamente, la naturaleza de estas señales químicas, cómo son liberadas y detectadas por las picocianobacterias, así como las dosis necesarias para desencadenar una respuesta, aún no están claras.

Además de los flagelados y el zooplancton, los ciliados de pequeño tamaño (<30 µm) también son importantes herbívoros de picoplancton en lagunas eutróficas (Beaver & Crisman, 1989; Šimek et al., 2000, 2019). En la laguna Chascomús, la abundancia de ciliados fluctúa desde casi indetectable hasta >1000 ind. mL⁻¹ (Fermani et al., 2013) y generalmente está dominado por especies de tamaño relativamente pequeño (10–20 µm) representadas principalmente por *Halteria* spp., *Urothichia* sp. y Tintinnidos (Fermani, com. pers.). En nuestro experimento se observaron solo unos pocos taxones de *Halteria*. Se sabe que en ambientes altamente productivos este género es capaz de depredar una media de 40 Pcy ciliado⁻¹ mL⁻¹ (Zingel et al., 2007) y de 1-3 × 10³ bacterias ciliado⁻¹ h⁻¹ (Šimek et al.,

2001). Si bien no se realizaron experimentos para confirmar el efecto de los ciliados sobre la agregación de picocianobacterias, dado que esta respuesta fenotípica fue confirmada para predadores pertenecientes a linajes muy diferentes (i.e. crisofita, rotífero y cladócero), es probable que los ciliados también tengan la capacidad de inducir la misma respuesta.

En el experimento que se utilizó toda la comunidad planctónica natural, la abundancia de flagelados no difirió entre T_0 y T_f en ninguno de los tratamientos, mientras que los ciliados aumentaron en el Control de 12 a 102 ciliados mL^{-1} al final del experimento. Este incremento podría ser explicado por la ausencia de zooplancton en el Control. A pesar de esto, la proporción de CPcy prácticamente no cambió entre T_0 y T_f . Es decir, que los flagelados y ciliados pudieron mantener una proporción bastante constante de CPcy a lo largo del experimento. Esto sugeriría que los ciliados no tienen el mismo efecto en la agregación de Pcy que los otros depredadores analizados, o bien que el aumento en la abundancia de ciliados en el Control no fue lo suficientemente alta como para impactar significativamente en la estructura del ensamble Pcy-CPcy.

Las interacciones tróficas entre el zooplancton, ciliados, flagelados y el picoplancton son muy complejas. Todos estos depredadores pueden alimentarse de picoplancton, pero a su vez también pueden ingerir otros depredadores (por ejemplo, los rotíferos pueden consumir flagelados). En este punto de la discusión es importante mencionar que a pesar de que no pudimos desentrañar toda esta complejidad, el efecto del zooplancton en la estructura de las picocianobacterias es evidente: la alta abundancia de *Bosmina* y *Keratella* resultó en una mayor proporción de CPcy. No se puede descartar que esta respuesta pueda ser consecuencia de múltiples interacciones tróficas indirectas, y probablemente la agregación de Pcy podría ser estimulada indirectamente a través de un efecto en cascada. Sin embargo, los resultados del experimento con medio condicionado sugieren que el zooplancton también puede inducir la agregación de picocianobacterias mediada por infoquímicos. Por lo tanto, es probable que ambos mecanismos estén operando simultáneamente en sistemas naturales.

La respuesta de los diferentes morfotipos de CPcy varió entre tratamientos. La abundancia de colonias de *Aphanocapsa*-like aumentó cuando se añadió *Bosmina*, mientras que *Eucapsis* sp. aumentó su número de células por colonia. Estos resultados parecen contrastar con los obtenidos previamente por (Huber et al., 2017), quienes observaron la respuesta más evidente en *Cyanodictyon* sp. Sin embargo, es preciso mencionar que, durante su experimento, la abundancia de morfotipos similares a *Aphanocapsa* y *Eucapsis* sp. fue muy bajo (<20% de la CPcy), lo que imposibilita la detección de una respuesta clara para estos dos morfotipos. Es muy probable que esta aparente discrepancia entre los experimentos se explique por las diferencias en la abundancia inicial de los principales morfotipos de CPcy, los cuales cambian a lo largo del ciclo anual, y que, en el momento de este experimento, *Aphanocapsa*-like era dominante.

Finalmente, otro punto a considerar es que los experimentos de este capítulo se llevaron a cabo con cepas de Pcy no axénicas. Yang et al. (2006) probaron el efecto inductor de colonias en un cultivo axénico de *M. Aeruginosa* cuando fue depredado por el flagelado *Ochromonas* y observaron una respuesta relativamente débil. Cruz & Neuer (2019) compararon el crecimiento de dos cepas de picocianobacterias marinas (*Synechococcus* y *Prochlorococcus*) en condiciones axénicas y no axénicas, y demostraron que las bacterias heterótrofas mejoran la agregación en ambas cepas. Esta evidencia sugiere que las bacterias heterótrofas juegan un papel clave en la agregación de picocianobacterias. Por lo tanto, los estudios que se lleven a cabo en el futuro deberían contemplar no solo la interacción trófica depredador-presa, sino también las interacciones que involucran a las comunidades procariotas asociadas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan nuevas evidencias sobre la capacidad de agregación de picocianobacterias unicelulares. Se demostró por primera vez que depredadores de diferentes linajes podrían inducir la agregación de picocianobacterias unicelulares y que el contacto directo entre presas y depredadores no es necesario. A partir de nuestro diseño experimental, pudimos

responder algunas preguntas claves para comprender mejor la plasticidad fenotípica en las picocianobacterias, como las planteadas por Stal (2017): ¿Qué hace que las picocianobacterias formen agregados? ¿Hay infoquímicos involucrados en la agregación de Pcy? ¿Quién los produce? Los resultados obtenidos en este trabajo también abren nuevas preguntas sobre si diferentes depredadores producen las mismas moléculas infoquímicas o si durante su historia evolutiva las picocianobacterias han desarrollado diferentes capacidades para detectarlas.

Conclusiones

- Se demostró que distintas especies de rotíferos (*B. caudatus*, *B. havanaensis*, *K. tropica*) y cladóceros (*Bosmina* sp.) son capaces de consumir activamente Pcy.
- Se confirmó experimentalmente que el efecto de agregación de picocianobacterias unicelulares en colonias, resulta una estrategia de defensa contra los depredadores y que puede ser estimulado por la presencia de flagelados, rotíferos y cladóceros.
- El contacto directo entre presa y depredador no es necesario para estimular la agregación de Pcy en CPcy, ya que éste sería desencadenado por un infoquímico disuelto en el agua que no provendría de células de Pcy rotas.

CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

El estudio de los patrones globales del PPP nos permitió corroborar y conocer la relación de este con distintas variables fisicoquímicas a lo largo de un gradiente latitudinal. La abundancia del PPP y de las BH mostraron una relación positiva con el aumento de la clorofila-a lo cual condice con numerosos estudios previos.

Se observó un **aumento de la importancia relativa de las Pcy hacia el Ecuador en relación a las BH y al PPP**, esto implica una mayor importancia de las Pcy, y por lo tanto mayor relevancia de la herbívora por sobre la bacterivoría, en términos de transferencia de energía dentro de las tramas tróficas microbianas. Una consecuencia de esto es que gran parte del carbono fijado por el fitoplancton fluiría a través de la vía heterotrófica (e.g. bucle microbiano) en lugar de la vía clásica (e.g. fitoplancton -> zooplancton), incrementándose la cantidad de intermediarios hasta llegar al zooplancton y probablemente disminuyendo así la eficiencia trófica del sistema en latitudes más bajas.

Asimismo, se observó que existe una tendencia general de **aumento del PPP hacia el Ecuador y una disminución en la importancia relativa de Peuk (Peuk/PPP)**. La tendencia de Peuk a disminuir hacia estas zonas más cálidas coincide con lo observado en el océano.

En este trabajo se observó que la abundancia relativa de PC-Pcy aumenta en sitios turbios, y las PE-Pcy en sitios más transparentes (Stomp et al., 2007). Las Peuk presentaron una abundancia relativa promedio de alrededor de 40% en ambientes con transparencia o $K_d < 2 \text{ m}^{-1}$ (i.e. oligo-mesotróficos), disminuyendo levemente hacia ambientes más turbios. Sin embargo, a diferencia de las PE-Pcy y PC-Pcy, **las Peuk están presentes a lo largo de todo el gradiente de transparencia sin mostrar una clara dominancia en ninguna condición lumínica.** En parte, esto podría deberse a que las Peuk son un grupo muy heterogéneo que contiene organismos muy diversos pertenecientes a especies, e incluso linajes evolutivos, muy diferentes. Es altamente probable que distintos Peuk

ocupen distintos nichos lumínicos a lo largo de todo el gradiente espectral de la luz, tal como fue observado en ambientes marinos para distintos ecotipos de Pcy (Holtrop et al., 2020; Grébert et al., 2018).

Los datos disponibles sobre composición espectral y abundancia de PPP muestran el mismo patrón hasta ahora observado: valores de Kd_{red}/Kd_{green} bajos (i.e. mayor proporción de luz roja) dominados por PC-Pcy, valores altos (mayor proporción de luz verde) dominados por PE-Pcy y las Peuk presentes en todo el gradiente con una media de aprox. 30-40% sin una tendencia clara.

La variación temporal de las Pcy analizada en numerosos ambientes no muestra un único patrón. En ambientes templados del hemisferio Norte los máximos de abundancia ocurren usualmente en primavera-verano, con descensos abruptos hacia el invierno donde las Pcy son casi imperceptibles. En ambientes tropicales no se observa una temporalidad tan marcada en la abundancia de Pcy, presentando abundancias elevadas durante todo el año. **A diferencia de los ambientes templados arriba mencionados, las Pcy en las lagunas pampeanas presentan valores de abundancia elevados durante todo el año, con máximos durante el invierno.** Una posible explicación es que haya un efecto *top-down* que impida a las Pcy alcancen sus máximos esperables para las épocas más cálidas. En línea con esta idea los rotíferos, el componente del zooplancton más abundante de la laguna y que presentan tasas de depredación significativas, presentan una variación estacional exactamente opuesta a las Pcy, es decir, que los máximos de rotíferos coinciden con los mínimos de las Pcy.

Mediante la combinación de técnicas *cell sorter* por citometría de flujo y aislamiento en placa se lograron **aislar de la laguna Chascomús tres cepas de Peuk**. La caracterización molecular del gen ADNr 18S indica que todas las cepas corresponden a la especie ***Choricystis krienitzii***.

Las tasas de crecimiento tanto de Pcy como de Peuk estimadas presentaron una relación directa con la temperatura lo cual está en concordancia con numerosos trabajos previos que analizaron esta relación. **Las distintas intensidades de luz solo tuvieron un efecto significativo en las Peuk**, en donde

las tasas aumentaron en los experimentos sometidos a mayor irradiancia. **En la cepa de Pcy no se observaron diferencias entre las tres irradiancias ensayadas posiblemente debido a que** dichas irradiancias se encontraban por encima del coeficiente de saturación de luz (I_k), lo cual estaría indicando que se trata de una cepa adaptada a bajas intensidades lumínicas, en concordancia con la poca disponibilidad de luz registrada en la laguna de Chascomús.

La relación positiva entre las tasas de crecimiento de las Pcy y la temperatura contrastan con el patrón observado usualmente en la laguna, donde las Pcy presentan su máximo de abundancia en los meses invernales. Esto podría estar relacionado con una mayor presión de herbivoría a partir de primavera por parte del zooplancton, especialmente de rotíferos. En este sentido, pudimos demostrar que **distintas especies de rotíferos (*B. caudatus*, *K. trópica*, *B. havanaensis*) y cladóceros (*Bosmina* sp.) fueron capaces de ingerir Pcy de manera activa**. Este resultado es particularmente relevante puesto que muchos autores consideran que el consumo de Pcy o de bacterias es más incidental que intencional (Work & Havens, 2003). Las tasas de consumo aquí calculadas indican además que el impacto del zooplancton sobre las Pcy podría ser relevante en lagunas someras como las pampeanas. Sin embargo, aún resta por estudiar el efecto del zooplancton a distintas temperaturas para dilucidar en qué medida las tasas de depredación varían en relación a los cambios estacionales de la temperatura.

Por otro lado, **la presencia de todos los depredadores estudiados (rotíferos, cladóceros) afectó de manera similar la proporción de CPcy en una comunidad natural**, corroborando que las Pcy pueden agregarse formando colonias como una estrategia para evitar la depredación.

Además, se demostró que **no es necesario el contacto directo entre Pcy y sus depredadores puesto que éste estaría inducido por infoquímicos o señales químicas disueltas**. Además, nuestros resultados sugieren que diferentes depredadores pertenecientes a distintos linajes podrían desencadenar la misma respuesta. No obstante, sería necesario realizar más estudios para desentrañar la composición exacta de las señales químicas responsables de la inducción de

defensa de cada especie en particular. Todos estos resultados aquí presentados, destacan el papel central del zooplancton como estructurador de las Pcy.

Dentro de las proyecciones futuras un aspecto que consideramos valdría la pena profundizar es el efecto de la calidad de luz dentro de la columna de agua sobre la dinámica de Pcy y Peuk. Es posible que las diferencias observadas entre ambas cepas estén asociadas, no solo con la intensidad de luz, sino también con la calidad de luz incidente, es decir, con las longitudes de onda del espectro electromagnético que están disponible debajo del agua en estos ambientes tan turbios. En este sentido, el uso diferencial de la luz disponible por parte de las distintas algas podría determinar su éxito en un ambiente natural.

Asimismo, otro aspecto que sería interesante explorar, es la fluctuación diaria en la intensidad de luz recibida por las algas. Puesto que, en las lagunas someras y turbias, la profundidad de la capa eufótica es baja respecto a la profundidad del cuerpo de agua (e.g. en la laguna Chascomús la capa eufótica es de aprox. 30 cm y la profundidad media de 1,9 m), la mayor parte de la columna de agua (>80%) nunca recibe luz. Debido a las condiciones polimícticas del cuerpo de agua, las algas pasan la mayor parte del tiempo en oscuridad y sólo durante períodos muy cortos experimentan altas intensidades lumínicas. Aun cuando la energía total recibida por las algas fuese la misma, la forma en que ésta es entregada puede tener efectos importantes sobre la fotoinhibición y la capacidad fotosintética, y consecuentemente sobre el crecimiento poblacional de los diferentes organismos.

Bibliografía

Abell, R., Thieme, M. L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Contreras Balderas, S., Bussing, W., Stiassny, M. L. J., Skelton, P., Allen, G. R., Unmack, P., Naseka, A., Ng, R., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., Higgins, T. J. ... Petry, P. (2008). Freshwater Ecoregions of the world: A new map of Biogeographic units for freshwater Biodiversity conservation. *BioScience*, 58(5) 403–414. <https://doi.org/10.1641/B580507>

Agawin, N. S. R., Duarte, C. M. & Agustí, S. (2000). Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 591–600. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.3.0591>

Allende, L., Tell, G., Zagarese, H., Torremorell, A., Pérez, G., Bustingorry, J., Escaray, R. & Izaguirre, I. (2009). Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia*, 624(1), 45–60. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9665-9>

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Amado, A. M., Meirelles-Pereira, F., Vidal, L. O., Sarmento, H., Suhett, A. L., Farjalla, V. F., Cotner, J. B. & Roland, F. (2013). Tropical freshwater ecosystems have lower bacterial growth efficiency than temperate ones. *Frontiers in Microbiology*, 4, 167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00167>

Andersen, R. A. & Kawachi, M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. En R. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques* (pp. 83–100). Elsevier Academic Press.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L. & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>

Barreiro Felpeto, A., Sliwinska-Wilczewska, S., Złoch, I. & Vasconcelos, V. (2018). Light-dependent cytolysis in the allelopathic interaction between picoplanktic and filamentous cyanobacteria. *Journal of Plankton Research*, 40(2), 165–177. <https://doi.org/10.1093/plankt/fby004>

Beaver, J. R. & Crisman, T. L. (1989). The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. *Microbial Ecology*, 17(2), 111–136. <https://doi.org/10.1007/BF02011847>

Bec, B., Collos Yves, S. P., Vaquer, A., Lautier, J., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Laugier, T. (2011). Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquatic Microbial Ecology*, 63(1), 29-45. <https://doi.org/10.3354/ame01480>

Becker, S. (2010). Biotic factors in induced defence revisited: Cell aggregate formation in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is triggered by spent *Daphnia* medium and disrupted cells. *Hydrobiologia*, 644(1), 159–168. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0109-y>

Bell, T. & Kalff, J. (2001). The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. *Limnology and Oceanography*, 46(5), 1243–1248. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.5.1243>

Belykh, O. I. & Sorokovikova, E. G. (2003). Autotrophic picoplankton in Lake Baikal: abundance, dynamics, and distribution. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 6(3), 251-261. <https://doi.org/10.1080/14634980301489>

Berman, M. C., Llames, M. E., Minotti, P., Fermani, P., Quiroga, M. V., Ferraro, M. A., Metz, S. & Zagarese, H. E. (2020). Field evidence supports former experimental claims on the stimulatory effect of glyphosate on picocyanobacteria communities. *Science of the Total Environment*, 701, 134601. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134601>

Bernal, M. C., Lu, L., Sabio y García, C., Sánchez, M. L., Vera, M. S., Porcel, S., Sinistro, R., Li, Z. & Izaguirre, I. (2021). Spatial variation of picoplankton communities along a cascade reservoir system in Patagonia, Argentina. *Journal of Limnology*, 80(3). <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2021.2027>

Bernát, G., Zavřel, T., Kotabová, E., Kovács, L., Steinbach, G., Vörös, L., Prášil, O., Somogyi, B. & Tóth, V. R. (2021). Photomorphogenesis in the Picocyanobacterium *Cyanobium gracile* includes increased phycobilisome abundance under blue light, phycobilisome decoupling under near far-red light, and wavelength-specific photoprotective strategies. *Frontiers in Plant Science*, 12, 612302. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.612302>

Biller, S. J., Berube, P. M., Lindell, D. & Chisholm, S. W. (2015). *Prochlorococcus*: the structure and function of collective diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 13–27. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3378>

Bird, D. F. & Kalff, J. (1984). Empirical relationships between bacterial abundance and chlorophyll concentration in fresh and marine waters. *Canadian Journal of*

Fisheries and Aquatic Sciences, 41(7), 1015–1023. <https://doi.org/10.1139/f84-118>

Blom, J. F., Horňák, K., Šimek, K. & Pernthaler, J. (2010). Aggregate formation in a freshwater bacterial strain induced by growth state and conspecific chemical cues. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2486–2495. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02222.x>

Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M. & West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85(7), 1771–1789. <https://doi.org/10.1890/03-9000>

Bubak, I., Śliwińska-Wilczewska, S., Głowacka, P., Szczerba, A. & Moźdżen, K. (2020). The importance of allelopathic *Picocyanobacterium Synechococcus* sp. On the abundance, biomass formation, and structure of phytoplankton assemblages in three freshwater lakes. *Toxins*, 12(4), 259. <https://doi.org/10.3390/toxins12040259>

Burns, C. W. (1968). The relationship between body size of filter-feeding Cladocera and the maximum size of particle ingested. *Limnology and Oceanography*, 13(4), 675–678. <https://doi.org/10.4319/lo.1968.13.4.0675>

Burns, C. W. & Gilbert, J. J. (1993). Predation on ciliates by freshwater calanoid copepods: rates of predation and relative vulnerabilities of prey. *Freshwater Biology*, 30(3), 377–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1993.tb00822.x>

Burns, C. W. & Stockner, J. G. (1991). Picoplankton in six New Zealand Lakes: Abundance in relation to season and trophic state. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 523–536. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760405>

Callieri, C. (2008). Picophytoplankton in freshwater ecosystems: The importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*, 1(1), 1–28. <https://doi.org/10.1608/frj-1.1.1>

Callieri, C. (2017). *Synechococcus* plasticity under environmental changes. *FEMS Microbiology Letters*, 364(23), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx229>

Callieri, C., Amalfitano, S., Corno, G. & Bertoni, R. (2016). Grazing-induced *Synechococcus* microcolony formation: experimental insights from two freshwater phylotypes. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), fiw154. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw154>

Callieri, C., Amicucci, E., Bertoni, R. & Vörös, L. (1996). Fluorometric characterization of two *Picocyanobacteria* strains from lakes of different underwater light quality. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 81(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/iroh.19960810103>

Callieri, C., Cronberg, G. & Stockner, J. G. (2012). Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. En B. A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (pp. 229–269). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_8

Callieri, C., Lami, A. & Bertoni, R. (2011). Microcolony formation by single-cell *Synechococcus* strains as a fast response to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7533–7540. <https://doi.org/10.1128/AEM.05392-11>

Callieri, C., Modenutti, B., Queimaliños, C., Bertoni, R. & Balseiro, E. (2007). Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: Differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology*, 41(4), 511–523. <https://doi.org/10.1007/s10452-007-9125-z>

Callieri, C., Moro, S., Caravati, E., Crosbie, N. D. & Weisse, T. (2005). Strain-specific photosynthetic response of freshwater picocyanobacteria. *SIL Proceedings*, 1922-2010, 29(2), 777–782. <https://doi.org/10.1080/03680770.2005.11902784>

Callieri, C. & Piscia, R. (2002). Photosynthetic efficiency and seasonality of autotrophic picoplankton in Lago Maggiore after its recovery. *Freshwater Biology*, 47(5), 941–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2002.00821.x>

Callieri, C. & Stockner, J. (2000). Picocyanobacteria success in oligotrophic lakes: fact or fiction?. *Journal of Limnology*, 59(1), 72-76. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2000.72>

Callieri, C., Cabello-Yeves, P. J., & Bertoni, F. (2022). The “Dark Side” of Picocyanobacteria: Life as We Do Not Know It (Yet). *Microorganisms*, 10(3), 546. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10030546>

Camacho, A., Miracle, M. R. & Vicente, E. (2003). Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. *Archiv Für Hydrobiologie*, 157(3), 321–338. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2003/0157-0321>

Camacho, A., Picazo, A., Miracle, M. R. & Vicente, E. (2009). Spatial distribution and temporal dynamics of picocyanobacteria in a meromictic karstic lake. *Algological Studies*, 109(1), 171–184. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0109-0171>

Campbell, L. & Carpenter, E. J. (1986). Diel patterns of cell division in marine *Synechococcus* spp. (Cyanobacteria): use of the frequency of dividing cells technique to measure growth rate. *Marine Ecology Progress Series*, 32, 139–148. <https://doi.org/10.3354/meps032139>

Campbell, L. & Vaulot, D. (1993). Photosynthetic picoplankton community structure in the subtropical North Pacific Ocean near Hawaii (station ALOHA). *Deep Sea*

Research Part I: Oceanographic Research Papers, 40(10), 2043–2060.
[https://doi.org/10.1016/0967-0637\(93\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0967-0637(93)90044-4)

Caron, D. A., Pick, F. R. & Lean, D. R. S. (1985). Chroococcoid cyanobacteria in Lake Ontario: vertical and seasonal distributions during 1982. *Journal of Phycology*, 21(1), 171–175. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1985.00171.x>

Caron, D. A., Sanders, R. W., Lira, E. L., Marrasé, C., Amaral, L. A., Whitney, S., Aoki, R. B. & Porter, K. G. (1993). Light-dependent phagotrophy in the freshwater mixotrophic chrysophyte *Dinobryon cylindricum*. *Microbial Ecology* 25, 93-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00182132>

Carrick, H. J. & Schelske, C. L. (1997). Have we overlooked the importance of small phytoplankton in productive waters?. *Limnology and Oceanography* 42(7), 1613-1621. <https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.7.1613>

Chisholm, S. W., Olson, R. J., Zettler, E. R., Goericke, R., Waterbury, J. B. & Welschmeyer, N. A. (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 334, 6180, 340–343. <https://doi.org/10.1038/334340a0>

Christie-Oleza, J. A., Sousoni, D., Lloyd, M., Armengaud, J. & Scanlan, D. J. (2017). Nutrient recycling facilitates long-term stability of marine microbial phototroph-heterotroph interactions. *Nature Microbiology*, 2, 17100. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.100>

Colautti, D., Baigún, C., Llompart, F., Maiztegui, T., Garcia de Souza, J., Solimano, P., Balboni, L. & Berasain, G. (2015). Fish assemblage of a Pampean shallow lake, a story of instability. *Hydrobiologia*, 752(1), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2062-7>

Cole, J. J., Findlay, S. & Pace, M. L. (1988). Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series*, 43, 1–10. <https://doi.org/10.3354/meps043001>

Contant, J., & Pick, F. R. (2013). Picophytoplankton during the ice-free season in five temperate-zone rivers. *Journal of plankton research*, 35(3), 553-565. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbt013>

Corner, E. D. S. & Davies, A. G. (1971). Plankton as a factor in the nitrogen and phosphorus cycles in the sea. *Advances in marine Biology*, 9, 1971, 101-204. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60342-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60342-9)

Corno, G. (2006). Effects of nutrient availability and *Ochromonas* sp. predation on size and composition of a simplified aquatic bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(3), 354–363. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00185.x>

Corno, G. & Jürgens, K. (2006). Direct and indirect effects of protist predation on population size structure of a bacterial strain with high phenotypic plasticity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 78–86. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.78-86.2006>

Corno, G., Villiger, J. & Pernthaler, J. (2013). Coaggregation in a microbial predator-prey system affects competition and trophic transfer efficiency. *Ecology*, 94(4), 870–881. <https://doi.org/10.1890/12-1652.1>

Costa, M. R. A., Sarmento, H., Becker, V., Bagatini, I. L. & Unrein, F. (2022). Phytoplankton phagotrophy across nutrients and light gradients using different measurement techniques. *Journal of Plankton Research*, 44(4), 507–520. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbac035>

Cottrell, M. T. & Kirchman, D. L. (2009). Photoheterotrophic microbes in the arctic ocean in summer and winter. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 4958–4966. <https://doi.org/10.1128/AEM.00117-09>

Craig, S. R. (1984). Productivity of algal picoplankton in a small meromictic lake. *SIL Proceedings*, 1922-2010, 22(1), 351–354. <https://doi.org/10.1080/03680770.1983.11897314>

Craig, S. R. (1987). The distribution and contribution of picoplankton to deep photosynthetic layers in some meromictic lakes. *Acta Academiae Aboensis*, 47, 55–81.

Crosbie, N. D., Teubner, K. & Weisse, T. (2003a). Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 33(1), 53–66. <https://doi.org/10.3354/ame033053>

Crosbie, N. D., Pöckl, M. & Weisse, T. (2003b). Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2), 361–370. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00167-2)

Cruz, B. N. & Neuer, S. (2019). Heterotrophic bacteria enhance the aggregation of the marine picocyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1864. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01864>

Davey, H. M. & Kell, D. B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological Reviews*, 60(4), 641-696. <https://doi.org/10.1128/mr.60.4.641-696.1996>

del Giorgio, P. A. & Peters, R. H. (1993). The influence of DOC on the bacteria-chlorophyll relationship in lakes. *SIL Proceedings*, 1922-2010, 25(1), 359–362. <https://doi.org/10.1080/03680770.1992.11900134>

DeMott, W. R. (1986). The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. *Oecologia*, 69(3), 334–340. <https://doi.org/10.1007/BF00377053>

di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, Y. C. (2020). *InfoStat versión 2020*. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>

Díez, B., Pedrós-Alió, C. & Massana, R. (2001). Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2932–2941. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2932-2941.2001>

Dimier, C., Brunet, C., Geider, R. & Raven, J. (2009). Growth and photoregulation dynamics of the picoeukaryote *Pelagomonas calceolata* in fluctuating light. *Limnology and Oceanography*, 54(3), 823–836. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.3.0823>

Diovisalvi, N., Berasain, G., Unrein, F., Colautti, D., Fermani, P., Llames, M. E., Torremorell, A. M., Lagomarsino, L., Pérez, G., Escaray, R., Bustingorry, J., Ferraro, M. & Zagarese, H. E. (2010). Chascomús: estructura y funcionamiento de una laguna pampeana turbia. *Ecología Austral*, 20(2), 115–127.

Diovisalvi, N., Bohn, V. Y., Piccolo, M. C., Perillo, G. M. E., Baigún, C. & Zagarese, H. E. (2015a). Shallow lakes from the Central Plains of Argentina: an overview and worldwide comparative analysis of their basic limnological features. *Hydrobiologia* 752(1), 5–20. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1946-x>

Diovisalvi, N., Rennella, A. M. & Zagarese, H. E. (2015c). Rotifer dynamics in three shallow lakes from the Salado river watershed (Argentina): The potential modulating role of incident solar radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 14(11), 2007–2013. <https://doi.org/10.1039/c5pp00125k>

Diovisalvi, N., Salcedo Echeverry, G. E., Lagomarsino, L. & Zagarese, H. E. (2015b). Seasonal patterns and responses to an extreme climate event of rotifers community in a shallow eutrophic Pampean lake. *Hydrobiologia*, 752(1), 125–137. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-1909-2>

Dittrich, M., Kurz, P. & Wehrli, B. (2004). The role of autotrophic picocyanobacteria in calcite precipitation in an oligotrophic lake. *Geomicrobiology Journal*, 21(1), 45–53. <https://doi.org/10.1080/01490450490253455>

Doolittle, D. F., Li, W. K. W. & Wood, A. M. (2008). Wintertime abundance of picoplankton in the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Nova Hedwigia* 133(1), 147–160.

Dossena, M., Yvon-Durocher, G., Grey, J., Montoya, J. M., Perkins, D. M., Trimmer, M. & Woodward, G. (2012). Warming alters community size structure and

ecosystem functioning. *Proceedings of the Royal Society B*. 279(1740), 3011–3019. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0394>

Drago, E. & Quiros, R. (1996). The hydrochemistry of the inland waters of Argentina: a review. *International Journal of Salt Lake Research*, 4(4), 315–325. <https://doi.org/10.1007/BF01999115>

Drakare, S. (2002). Competition between picoplanktonic cyanobacteria and heterotrophic bacteria along crossed gradients of glucose and phosphate. *Microbial Ecology*, 44(4), 327–335. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-1013-4>

Elwood, H. J., Olsen, G. J. & Sogin, M. L. (1985). The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Molecular Biology and Evolution*, 2(5), 399–410. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040362>

Ernst, A. (1991). Cyanobacterial picoplankton from Lake Constance. I. Isolation by fluorescence characteristics. *Journal of Plankton Research*, 13(6), 1307–1312. <https://doi.org/10.1093/plankt/13.6.1307>

Fahnenstiel, G. L. & Carrick, H. J. (1992). Phototrophic picoplankton in lakes Huron and Michigan: abundance, distribution, composition, and contribution to biomass and production. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(2), 379–388. <https://doi.org/10.1139/f92-043>

Fahnenstiel, G. L., Carrick, H. J., Rogers, C. E. & Sicko-Goad, L. (1991). Red fluorescing phototrophic picoplankton in the Laurentian Great Lakes: what are they and what are they doing? *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 603–616. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760411>

Fahnenstiel, G. L., Sicko-Goad, L., Scavia, D. & Stoermer, E. F. (1986). Importance of Picoplankton in Lake Superior. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(1), 235–240. <https://doi.org/10.1139/f86-028>

Feitosa, I. B., Huszar, V. L. M., Domingues, C. D., Appel, E., Paranhos, R., Almeida, R. M., Branco, C. W. C., Bastos, W. R. & Sarmento, H. (2019). Plankton community interactions in an Amazonian floodplain lake, from bacteria to zooplankton. *Hydrobiologia*, 831, 55–70. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3855-x>

Felföldi T. (2020). Microbial communities of soda lakes and pans in the Carpathian Basin: a review. *Biologia futura*, 71(4), 393–404. <https://doi.org/10.1007/s42977-020-00034-4>

Felföldi, T., Somogyi, B., Márialigeti, K. & Vörös, L. (2009). Characterization of photoautotrophic picoplankton assemblages in turbid, alkaline lakes of the

Carpathian Basin (Central Europe). *Journal of Limnology*, 68(2), 385. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2009.385>

Fermani, P., Diovisalvi, N., Torremorell, A., Lagomarsino, L., Zagarese, H. E. & Unrein, F. (2013). The microbial food web structure of a hypertrophic warm-temperate shallow lake, as affected by contrasting zooplankton assemblages. *Hydrobiologia*, 714(1), 115–130. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1528-3>

Fermani, P., Torremorell, A., Lagomarsino, L., Escaray, R., Unrein, F. & Pérez, G. (2015). Microbial abundance patterns along a transparency gradient suggest a weak coupling between heterotrophic bacteria and flagellates in eutrophic shallow Pampean lakes. *Hydrobiologia*, 752(1), 103–123. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2019-x>

Fernández Zenoff, V., Siñeriz, F. & Farías, M. E. (2006). Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7857–7863. <https://doi.org/10.1128/AEM.01333-06>

Flombaum, P., Wang, W. L., Primeau, F. W. & Martiny, A. C. (2020). Global picophytoplankton niche partitioning predicts overall positive response to ocean warming. *Nature Geoscience*, 13(2), 116–120. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0524-2>

Fogg, G. E. (1986). Review Lecture - Picoplankton. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B.*, 228, 1250, 1–30. <https://doi.org/10.1098/rspb.1986.0037>

Fogg, G. E. (1995). Some comments on picoplankton and its importance in the pelagic ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology*, 9(1), 33–39. <https://doi.org/10.3354/ame009033>

Freitas, R., Vieira, H. H., de Moraes, G. P., de Melo, M. L., Vieira, A. A. H. & Sarmento, H. (2018). Productivity and rainfall drive bacterial metabolism in tropical cascading reservoirs. *Hydrobiologia*, 809(1), 233–246. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3472-0>

Fu, F. X., Warner, M. E., Zhang, Y., Feng, Y. & Hutchins, D. A. (2007). Effects of increased temperature and CO₂ on photosynthesis, growth, and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 43(3), 485–496. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00355.x>

Fuhrman, J. (1992). Bacterioplankton roles in cycling of organic matter: the microbial food web. En P.G. Falkowski, A.D. Woodhead, K. Vivirito (Eds.), *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea* (1° Ed., Vol. 43, pp. 361–383). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0762-2_20

Gasol, J. M. & Duarte, C. M. (2006). Comparative analyses in aquatic microbial ecology: how far do they go? *FEMS Microbiology Ecology*, 31(2), 99–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00675.x>

Gasol, J. M. & Morán, X. A. G. (2015). Flow cytometric determination of microbial abundances and its use to obtain indices of community structure and relative activity. En T.J. McGenity, K.N. Timmis, B. Nogales (Eds.) *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. (pp. 159–187). Springer. https://doi.org/10.1007/8623_2015_139

Geller, W. & Müller, H. (1981). The filtration apparatus of Cladocera: Filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia*, 49(3), 316–321. <https://doi.org/10.1007/BF00347591>

Gerea, M., Pérez, G. L., Unrein, F., Soto Cardenas, C., Morris, D. & Queimalinos, C. (2017). CDOM and the underwater light climate in two shallow North Patagonian lakes: evaluating the effects on nano and microphytoplankton community structure. *Aquatic sciences*, 79(2), 231–248. <https://doi.org/10.1007/s00027-016-0493-0>

Gliwicz, Z. M. (1969). Studies on the feeding of pelagic zooplankton in lakes with varying trophy. *Ekologia Polska*, 17A, 663–708.

Glover, H. E., Campbell, L. & Prézelin, B. B. (1986). Contribution of *Synechococcus* spp. to size-fractioned primary productivity in three water masses in the Northwest Atlantic Ocean. *Marine Biology*, 91(2), 193–203. <https://doi.org/10.1007/BF00569435>

Grébert, T., Doré, H., Partensky, F., Farrant, G. K., Boss, E. S., Picheral, M., Guidi, L., Pesant, S., Scanlan, D. J., Wincker, P., Acinas, S. G., Kehoe, D. M. & Garczarek, L. (2018). Light color acclimation is a key process in the global ocean distribution of *Synechococcus* cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(9), E2010–E2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717069115>

Grob, C., Ulloa, O., Claustre, H., Huot, Y., Alarcón, G. & Marie, D. (2007). Contribution of picoplankton to the total particulate organic carbon concentration in the eastern South Pacific. *Biogeosciences*, 4(5), 837–852. <https://doi.org/10.5194/bg-4-837-2007>

Güde, H. (1989). The role of grazing on bacteria in plankton succession. En U. Sommer (Ed.), *Plankton Ecology* (pp. 337–364). Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience, Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74890-5_9

Guillard, R. R. L. & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide c. *Journal of Phycology*, 8(1), 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x>

Haberman, J. & Haldna, M. (2014). Indices of zooplankton community as valuable tools in assessing the trophic state and water quality of eutrophic lakes: long term study of Lake Võrtsjärv. *Journal of Limnology*, 73(2), 61–71. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.828>

Hahn, M. W. & Höfle, M. G. (2001). Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(2), 113–121. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00098-2)

Hammer, D. A. T., Ryan, P. D., Hammer, Ø., & Harper, D. A. T. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1). URL http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Hancke, K., Hancke, T. B., Olsen, L. M., Johnsen, G. & Glud, R. N. (2008). Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production, pulse-amplitude-modulated fluorescence, and ¹⁴C assimilation. *Journal of Phycology*, 44(2), 501–514. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00487.x>

Hauschild, C. A., McMurter, H. J. G. & Pick, F. R. (1991). Effect of spectral quality on growth and pigmentation of picocyanobacteria. *Journal of Phycology*, 27(6), 698–702. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00698.x>

Haverkamp, T., Acinas, S. G., Doeelman, M., Stomp, M., Huisman, J. & Stal, L. J. (2008). Diversity and phylogeny of Baltic Sea picocyanobacteria inferred from their ITS and phycobiliprotein operons. *Environmental Microbiology*, 10(1), 174–188. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01442.x>

Hawley, G. R. W. & Whitton, B. A. (1991). Seasonal changes in chlorophyll-containing picoplankton populations of ten lakes in Northern England. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 545–554. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760407>

Hepperle, D. & Krienitz, L. (2001). Systematics and ecology of chlorophyte picoplankton in German Inland waters along a nutrient gradient. *International Review of Hydrobiology*, 86(3), 269–284. [https://doi.org/10.1002/1522-2632\(200106\)86:3<269::AID-IROH269>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1522-2632(200106)86:3<269::AID-IROH269>3.0.CO;2-7)

Hernández-Avilés, J. S., Macek, M., Alcocer, J., López-Trejo, B. & Merino-Ibarra, M. (2010). Prokaryotic picoplankton dynamics in a warm-monomictic saline lake: Temporal and spatial variation in structure and composition. *Journal of Plankton Research*, 32(9), 1301–1314. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbq047>

Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollingher, U. & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403–424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>

Holtrop, T., Huisman, J., Stomp, M., Biersteker, L., Aerts, J., Grébert, T., Partensky, F., Garczarek, L. & Woerd, H. J. V. (2021). Vibrational modes of water predict spectral niches for photosynthesis in lakes and oceans. *Nature Ecology and Evolution*, 5(1), 55–66. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01330-x>

Huber, P. (2017). *Las picocianobacterias de lagunas pampeanas: diversidad fenotípica y molecular, y su rol en las tramas tróficas planctónicas*. [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad Nacional San Martín.

Huber, P., Diovisalvi, N., Ferraro, M., Metz, S., Lagomarsino, L., Llames, M. E., Royo-Llonch, M., Bustingorry, J., Escaray, R., Acinas, S. G., Gasol, J. M. & Unrein, F. (2017). Phenotypic plasticity in freshwater picocyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 19(3), 1120–1133. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13638>

Huisman, J., Jonker, R. R., Zonneveld, C. & Weissing, F. J. (1999). Competition for Light between Phytoplankton Species: Experimental Tests of Mechanistic Theory. *Ecology*, 80(1), 211–222. <https://doi.org/10.2307/176991>

Hwang, S. & Heath, R. (1999). Zooplankton bacterivory at coastal and offshore sites of Lake Erie. *Journal of Plankton Research*, 21(4), 699–719. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.4.699>

Iachetti, C. M. & Llames, M. E. (2015). Light limitation helps stabilize the phytoplankton assemblage steady-state in a temperate and highly turbid, hypertrophic shallow lake (Laguna Chascomús, Argentina). *Hydrobiologia*, 752(1), 33–46. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2045-8>

Ibrahim, S. F. & van den Engh, G. (2007). Flow cytometry and cell sorting. En A. Kumar, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, (Eds.) *Cell Separation. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 106, pp. 19–39). Springer. https://doi.org/10.1007/10_2007_073

Iriondo, M. (1989). Quaternary lakes of Argentina. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 70(1–3), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(89\)90081-3](https://doi.org/10.1016/0031-0182(89)90081-3)

Izaguirre, I., Allende, L., Escaray, R., Bustingorry, J., Pérez, G. & Tell, G. (2012). Comparison of morpho-functional phytoplankton classifications in human-impacted shallow lakes with different stable states. *Hydrobiologia*, 698(1), 203–216. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1069-1>

Izaguirre, I., Sánchez, M. L., Schiaffino, M. R., O'Farrell, I., Huber, P., Ferrer, N., Zunino, J., Lagomarsino, L. & Mancini, M. (2015). Which environmental factors

trigger the dominance of phytoplankton species across a moisture gradient of shallow lakes? *Hydrobiologia*, 752(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2007-1>

Izaguirre, I., Unrein, F., Modenutti, B. & Allende, L. (2014). Photosynthetic picoplankton in Argentina lakes. *Advances in Limnology*, 65, 343–357. <https://doi.org/10.1127/1612-166X/2014/0065-0050>

Jacquet, S., Partensky, F., Lennon, J. F. & Vaulot, D. (2001). Diel patterns of growth and division in marine picoplankton in culture. *Journal of Phycology*, 37(3), 357–369. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037003357.x>

Jasser, I. (2006). The relationship between autotrophic picoplankton (APP) - the smallest autotrophic component of food web and the trophic status and the depth of lakes. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 6(1–4), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S1642-3593\(06\)70128-8](https://doi.org/10.1016/S1642-3593(06)70128-8)

Jasser, I. & Arvola, L. (2003). Potential effects of abiotic factors on the abundance of autotrophic picoplankton in four boreal lakes. *Journal of Plankton Research*, 25(8), 873–883. <https://doi.org/10.1093/plankt/25.8.873>

Jasser, I. & Callieri, C. (2017). Picocyanobacteria. The Smallest Cell-Size Cyanobacteria. En J. Meriluoto, L. Spoof, G. A. Codd (Eds.). *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* (pp. 19–27). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch3>

Jeppesen, E., Erlandsen, M. & Søndergaard, M. (1997). Can simple empirical equations describe the seasonal dynamics of bacterioplankton in lakes: an eight-year study in shallow hypertrophic and biologically highly dynamic Lake Søbygård, Denmark. *Microbial Ecology*, 34, 11–26. <https://doi.org/10.1007/s002489900030>

Jezberová, J. & Komárová, J. (2007). Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers. *Environmental Microbiology*, 9(7), 1858–1862. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01311.x>

Johnson, P. W. & Sieburth, J. M. (1982). *In-situ* morphology and occurrence of eukaryotic phototrophs on bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceans waters. *Journal of Phycology*, 18(3), 318–327. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1982.tb03190.x>

Jürgens, K. (1994). Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs - A review. *Marine Microbial Food Webs*, 8(1–2), 295–324.

Jürgens, K. & Güde, H. (1994). The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Marine Ecology Progress Series*, 112(1–2), 169–188. <https://doi.org/10.3354/meps112169>

Jürgens, K. & Jeppesen, E. (2000). The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 22(6), 1047–1070. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.6.1047>

Jürgens, K. & Matz, C. (2002). Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1–4), 413–434. <https://doi.org/10.1023/A:1020505204959>

Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S. & Amann, R. (1999). Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1241–1250. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.1241-1250.1999>

Kaprelyants, A. S., Mukamolova, G. v, Davey, H. M. & Kell, D. B. (1996). Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* by flow cytometry and cell sorting. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1311–1316. <https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1311-1316.1996>

Katano, T., Nakano, S., Ueno, H., Mitamura, O., Anbutsu, K., Kihira, M., Satoh, Y., Drucker, V. & Sugiyama, M. (2005). Abundance, growth and grazing loss rates of picophytoplankton in Barguzin Bay, Lake Baikal. *Aquatic Ecology*, 39(4), 431–438. <https://doi.org/10.1007/s10452-005-9000-8>

Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. (2018). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Keller, M. D., Shapiro, L. P., Haugen, E. M., Cucci, T. L., Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (1994). Phagotrophy of fluorescently labeled bacteria by an oceanic phytoplankter. *Microbial Ecology*, 28(1), 39–52. <https://doi.org/10.1007/BF00170246>

Kim, H.W., Hwang, S.J. & Joo, G.J. (2000). Zooplankton grazing on bacteria and phytoplankton in a regulated large river (Nakdong River, Korea). *Journal of Plankton Research*, 22(8), 1559–1577. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.8.1559>

Kiørboe, T. (2011). How zooplankton feed: mechanisms, traits and trade-offs. *Biological Reviews* 86(2), 311–339. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00148.x>

Kirk, J. T. O. (1994). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems* (2º Edición, pp. 401), Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511623370>

Komárek, J. & Johansen, J. R. (2015). Coccoid Cyanobacteria. En J. D. Wehr, R. G. Sheath, J. P. Kociolek, (Eds.). *Freshwater Algae of North America: Ecology and*

Classification (pp. 75–133). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00003-7>

Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. & Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86(4), 295–335.

Komárek, J., Kopecký, J. & Cepák, V. (1999). Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. *Cryptogamie Algologie*, 20(3), 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0181-1568\(99\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S0181-1568(99)80015-4)

Komárková, J. (2002). Cyanobacterial picoplankton and its colonial formations in two eutrophic canyon reservoirs (Czech Republic). *Archiv für Hydrobiologie* 154(4), 605–623. <https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/154/2002/605>

Komárková, J. & Šimek, K. (2003). Unicellular and colonial formations of picoplanktonic cyanobacteria under variable environmental conditions and predation pressure. *Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie* 109, 327–340. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2003/0109-0327>

Kulk, G., de Vries, P., van de Poll, W. H., Visser, R. J. W. & Buma, A. G. J. (2012). Temperature-dependent growth and photophysiology of prokaryotic and eukaryotic oceanic picophytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 466, 43–55. <https://doi.org/10.3354/meps09898>

Lagomarsino, L., Diovisalvi, N., Bustingorry, J., Escaray, R. & Zagarese, H. E. (2015). Diel patterns of total suspended solids, turbidity, and water transparency in a highly turbid, shallow lake (Laguna Chascomús, Argentina). *Hydrobiologia*, 752(1), 21–31. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2013-3>

Lagomarsino, L., Pérez, G. L., Escaray, R., Bustingorry, J. & Zagarese, H. E. (2011). Weather variables as drivers of seasonal phosphorus dynamics in a shallow hypertrophic lake (Laguna Chascomús, Argentina). *Fundamental and Applied Limnology*, 178(3), 191–201. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2011/0178-0191>

Lampert, W. & Sommer, U. (2007). *Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams* (2° Edición, pp. 324). Oxford University Press, Oxford.

Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>

Lavallée, B. F. & Pick, F. R. (2002). Picocyanobacteria abundance in relation to growth and loss rates in oligotrophic to mesotrophic lakes. *Aquatic Microbial Ecology*, 27(1), 37–46. <https://doi.org/doi:10.3354/ame027037>

Lewis Jr., W. M. (1983). A Revised classification of lakes based on mixing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(10), 1779–1787. <https://doi.org/10.1139/f83-207>

Li, W. K. W., Head, E. J. H. & Glen Harrison, W. (2004). Macroecological limits of heterotrophic bacterial abundance in the ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 51(11), 1529–1540. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2004.06.012>

Lin, L., He, J., Zhao, Y., Zhang, F. & Cai, M. (2012). Flow cytometry investigation of picoplankton across latitudes and along the circum Antarctic Ocean. *Acta Oceanologica Sinica*, 31(1), 134–142. <https://doi.org/10.1007/s13131-012-0185-0>

Llames, M. E., Lagomarsino, L., Diovisalvi, N., Fermani, P., Torremorell, A. M., Perez, G., Unrein, F., Bustingorry, J., Escaray, R., Ferraro, M. & Zagarese, H. E. (2009). The effects of light availability in shallow, turbid waters: A mesocosm study. *Journal of Plankton Research*, 31(12), 1517–1529. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp086>

Luimstra, V. M., Schuurmans, J. M., Hellingwerf, K. J., Matthijs, H. C. P. & Huisman, J. (2020). Blue light induces major changes in the gene expression profile of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Physiologia Plantarum*, 170(1), 10–26. <https://doi.org/10.1111/ppl.13086>

Luimstra, V. M., Schuurmans, J. M., Verschoor, A. M., Hellingwerf, K. J., Huisman, J. & Matthijs, H. C. P. (2018). Blue light reduces photosynthetic efficiency of cyanobacteria through an imbalance between photosystems I and II. *Photosynthesis Research*, 138(2), 177–189. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0561-5>

Lürling, M., Eshetu, F., Faassen, E. J., Kosten, S. & Huszar, V. L. M. (2013). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*, 58(3), 552–559. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02866.x>

Macek, M., Pestová, D. & Martínez-Pérez, M. E. (2008). Dinámica temporal y espacial de la comunidad de ciliados en un lago monomictico cálido Alchichica (Puebla, México). *Hidrobiologica*, 18(1), 25–35.

Malinsky-Rushansky, N., Berman, T. & Dubinsky, Z. (1995). Seasonal dynamics of picophytoplankton in Lake Kinneret, Israel. *Freshwater Biology*, 34(2), 241–254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1995.tb00884.x>

Malzahn, A. M., Doerfler, D. & Boersma, M. (2016). Junk food gets healthier when it's warm. *Limnology and Oceanography*, 61(5), 1677–1685. <https://doi.org/10.1002/lo.10330>

Marie, D., le Gall, F., Edern, R., Gourvil, P. & Vaulot, D. (2017). Improvement of phytoplankton culture isolation using single cell sorting by flow cytometry. *Journal of Phycology*, 53(2), 271–282. <https://doi.org/10.1111/jpy.12495>

Marie, D., Shi, X. L., Rigaut-Jalabert, F. & Vaulot, D. (2010). Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(2), 165–178. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00842.x>

Marshall, H.G. (2002). Autotrophic picoplankton: Their presence and significance in marine and freshwater ecosystems. *Journal of Science*, 53(1), 13-33.

Massana, R., Gasol, J. M., Bjørnsen, P. K., Blackburn, N., Hagström, Å., Hietanen, S., Hygum, B. H., Kuparinen, J. & Pedrós-Alió, C. (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(3), 397–407.

Matz, C., Bergfeld, T., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2004). Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environmental Microbiology*, 6(3), 218–226. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00556.x>

Matz, C., Deines, P. & Jürgens, K. (2002). Phenotypic variation in *Pseudomonas* sp. CM10 determines microcolony formation and survival under protozoan grazing. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00906.x>

McIntyre, C. A., Flyg, B. T. & Fong, T. C. (2010). Fluorescence-Activated Cell Sorting for CGMP Processing of Therapeutic Cells. *BioProcess International*, 8(6), 44–53.

Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S. & Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2), 491–499. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90066-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90066-2)

Menden-Deuer, S. & Lessard, E. J. (2000). Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography* 45(3), 569–579. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.3.0569>

Metz, S., Singer, D., Domaizon, I., Unrein, F. & Lara, E. (2019). Global distribution of Trebouxiophyceae diversity explored by high-throughput sequencing and phylogenetic approaches. *Environmental Microbiology*, 21(10), 3885–3895. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14738>

Morán, X. A. G., López-Urrutia, Á., Calvo-Díaz, A. & LI, W. K. W. (2010). Increasing importance of small phytoplankton in a warmer ocean. *Global Change Biology*, 16(3), 1137–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01960.x>

Moser, M., Callieri, C. & Weisse, T. (2009). Photosynthetic and growth response of freshwater picocyanobacteria are strain-specific and sensitive to photoacclimation. *Journal of Plankton Research*, 31(4), 349–357. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbn123>

Mózes, A., Présing, M. & Vörös, L. (2006). Seasonal dynamics of picocyanobacteria and picoeukaryotes in a large shallow lake (Lake Balaton, Hungary). *International Review of Hydrobiology*, 91(1), 38–50. <https://doi.org/10.1002/iroh.200510844>

Nakano, S.-I., Tanaka, K., Sono, T., Wakabayashi, T., Ichise, S., Yamanaka, S., Kaneda, E., Yada, M., Naitoh, M., Kawabe, K., Maehata, K., Fujiwara, N., Maeda, N., Nomura, K. & Nakanishi, M. (1996). Seasonal changes in horizontal distribution of algal picoplankton in Lake Biwa with special reference to water temperature, nutrient levels and heterotrophic flagellates. *Japanese Journal of Limnology* 57(1), 49–55. <https://doi.org/10.3739/rikusui.57.49>

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Norland, S. (1993). The relationship between biomass and volume of bacteria. In P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, & J. J. Cole (Eds.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (pp. 303–307). Lewis Publishing. <https://doi.org/10.1201/9780203752746>

Not, F., Latasa, M., Marie, D., Cariou, T., Vaulot, D. & Simon, N. (2004). A single species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4064–4072. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4064-4072.2004>

Nwosu, E.C., Roeser, P., Yang, S., PinkerNeil, S., Ganzert, L., Dittmann, E., Brauer, A., Wagner, D. & Liebner, S. (2021) Species-Level Spatio-Temporal Dynamics of Cyanobacteria in a Hard-Water Temperate Lake in the Southern Baltics. *Frontiers in Microbiology*, 12:761259. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.761259>

O'Farrell, I., Sánchez, M. L., Schiaffino, M. R., Izaguirre, I., Huber, P., Lagomarsino, L. & Yema, L. (2021). Human impacted shallow lakes in the Pampean plain are ideal hosts for cyanobacterial harmful blooms. *Environmental Pollution*, 288, 117747. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117747>

Ooms-Wilms, A. L. (1997). Are bacteria an important food source for rotifers in eutrophic lakes? *Journal of Plankton Research*, 19(8), 1125–1141. <https://doi.org/10.1093/plankt/19.8.1125>

Pace, M. L., McManus, G. B. & Findlay, S. E. G. (1990). Planktonic community structure determines the fate of bacterial production in a temperate lake. *Limnology and Oceanography*, 35(4), 795–808. <https://doi.org/10.4319/lo.1990.35.4.0795>

Padisák, J., Krienitz, L., Koschel, R. & Nedoma, J. (1997). Deep-layer autotrophic picoplankton maximum in the oligotrophic Lake Stechlin, Germany: Origin, activity, development and erosion. *European Journal of Phycology*, 32(4), 403–416. <https://doi.org/10.1080/09670269710001737349>

Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F. W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E. E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E. A. & Waterbury, J. (2003). The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*, 424(6952), 1037–1042. <https://doi.org/10.1038/nature01943>

Pálffy, K., Felföldi, T., Mentes, A. et al. (2014). Unique picoeukaryotic algal community under multiple environmental stress conditions in a shallow, alkaline pan. *Extremophiles* 18, 111–119. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0602-0>

Pantoja-Agreda, F. & Otero-Morales, E. (2017). Autotrophic picoplankton assemblages in subtropical reservoir: temporal and vertical dynamics in abundance and biomass. *Journal of Freshwater Ecology*, 32(1), 17–28. <https://doi.org/10.1080/02705060.2016.1230894>

Parry, J. D., Heaton, K., Drinkall, J. & Jones, H. L. J. (2001). Feasibility of using GFP-expressing *Escherichia coli*, coupled with fluorimetry, to determine protozoan ingestion rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(1), 11–17. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00783.x>

Passoni, S., & Callieri, C. (2000). Picocyanobacteria single forms, aggregates and microcolonies: survival strategy or species succession?. *SIL Proceedings*, 1922-2010, 27(4), 1879–1883. <https://doi.org/10.1080/03680770.1998.11901567>

Paulsen, M. L., Doré, H., Garczarek, L., Seuthe, L., Müller, O., Sandaa, R. A., Bratbak, G. & Larsen, A. (2016). *Synechococcus* in the Atlantic Gateway to the Arctic Ocean. *Frontiers in Marine Science*, 3, 191. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00191>

Pejler, B. (1983). Zooplanktic indicators of trophy and their food. *Hydrobiologia*, 101(1-2), 111–114. <https://doi.org/10.1007/BF00008662>

Peltomaa, E. & Ojala, A. (2012). Meteorological drivers of the dynamics of autotrophic picoplankton. *Freshwater Biology*, 57: 1005–1016. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02761.x>

Pérez, G. L., Llames, M. E., Lagomarsino, L. & Zagarese, H. (2011). Seasonal variability of optical properties in a highly turbid lake (Laguna Chascomús, Argentina). *Photochemistry and Photobiology*, 87(3), 659–670. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00907.x>

Pérez, G. L., Queimaliños, C. P. & Modenutti, B. E. (2002). Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *Journal of Plankton Research*, 24(6), 591–599. <https://doi.org/10.1093/plankt/24.6.591>

Pérez, G. L., Torremorell, A., Bustingorry, J., Escaray, R., Pérez, P., Diéguez, M. & Zagarese, H. (2010). Optical characteristics of shallow lakes from the Pampa and Patagonia regions of Argentina. *Limnologica*, 40(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2008.08.003>

Pernthaler, J. (2005). Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(7), 537–546. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1180>

Peštová, D., Macek, M. & Elena Martínez Pérez, M. (2008). Ciliates and their picophytoplankton-feeding activity in a high-altitude warm-monomictic saline lake. *European Journal of Protistology*, 44(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2007.04.004>

Pick, F. R. (1991). The abundance and composition of freshwater picocyanobacteria in relation to light penetration. *Limnology and Oceanography*, 36(7), 1457–1462. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.7.1457>

Pick, F. R. & Agbeti, M. (1991). The seasonal dynamics and composition of photosynthetic picoplankton communities in temperate lakes in Ontario, Canada. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 565–580. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760409>

Pick, F. R. & Bérubé, C. (1992). Diel cycles in the frequency of dividing cells of freshwater picocyanobacteria. *Journal of Plankton Research*, 14(8), 1193–1198. <https://doi.org/10.1093/plankt/14.8.1193>

Pittera, J., Humily, F., Thorel, M., Gruliois, D., Garczarek, L. & Six, C. (2014). Connecting thermal physiology and latitudinal niche partitioning in marine *Synechococcus*. *ISME Journal*, 8(6), 1221–1236. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.228>

Platt, T., Rao, D. & Irwin, B. (1983). Photosynthesis of picoplankton in the oligotrophic ocean. *Nature*, 301(5902), 702–704. <https://doi.org/10.1038/301702a0>

Pomeroy, L. R. (1974). The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*, 24(9), 499–504. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/1296885>

Pomeroy, L. R. (1984). Microbial processes in the sea: diversity in nature and science. En J. E. Hobbie, & P. J. I. Williams (Eds.), *Heterotrophic Activity in the Sea* (Vol. 15, pp. 1–23). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9010-7_1

Porter, K. G. & Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25(5), 943–948. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943>

Porter, K. G., Paerl, H., Hodson, R., Pace, M., Priscu, J., Riemann, B., Scavia, D. & Stockner, J. (1988). Microbial interactions in lake food webs. En S. R. Carpenter (Ed.). *Complex Interactions in Lake Communities* (pp. 209–227). https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3838-6_13

Porter, K. G., Sherr, E. B., Sherr, B. F., Pace, M. & Sanders, R. W. (1985). Protozoa in Planktonic Food Webs. *The Journal of Protozoology*, 32(3), 409–415. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb04036.x>

Pröschold, T. & Darienko, T. (2020). *Choricystis* and *Lewiniosphaera* gen. nov. (Trebouxiophyceae Chlorophyta), two different green algal endosymbionts in freshwater sponges. *Symbiosis*, 82(3), 175-188. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00711-x>

Quiroga, M. V., Unrein, F., González Garraza, G., Küppers, G., Lombardo, R., Marinone, M. C., Menu Marque, S., Vinocur, A. & Mataloni, G. (2013). The plankton communities from peat bog pools: structure, temporal variation and environmental factors. *Journal of Plankton Research*, 35(6), 1234-1253. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbt082>

Quiroga, M. V., Huber, P., Ospina-Serna, J., Diovisalvi, N., Odriozola, M., Cueto, G. R., Lagomarsino, L., Fermani, P., Bustingorry, J., Escaray, R., Zagarese, H. & Unrein, F. (2021). The dynamics of picocyanobacteria from a hypereutrophic shallow lake is affected by light-climate and small-bodied zooplankton: A 10-year cytometric time-series analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(5), fiab055. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab055>

Quiros, R. (1988). Relationships between air temperature, depth, nutrients and chlorophyll in 103 Argentinian lakes. *SIL Proceedings*, 1922-2010, 23(2), 647–658. <https://doi.org/10.1080/03680770.1987.11899688>

Quirós, R. & Drago, E. (1999). The environmental state of Argentinean lakes: An overview. *Lakes & Reservoirs: Science, Policy and Management for Sustainable Use*, 4(1–2), 55–64. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1770.1999.00076.x>

Quirós, R. N. (2004). Sobre la Morfología de las Lagunas Pampeanas. En *Documento de trabajo del área de Sistemas de Producción Acuática* (Documento N°3). Departamento de Producción Animal, Facultad Agronomía,

Universidad de Buenos Aires. URL
<https://www.agro.uba.ar/users/quiros/Working/LaMorfologia.pdf>

Quirós, R., Rennella, A. M., Boveri, M. B., Rosso, J. J. & Sosnovsky, A. (2002). Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12(2), 175–185.

Raven, J. A. (1986). Physiological consequences of extremely small size for autotrophic organisms in the sea. En T. Platt & W. K. W. Li (Eds.), *Photosynthetic Picoplankton* (Vol. 214, pp. 1–70). Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Science.

Raven, J. A. (1998). The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: The picophytoplankton. *Functional Ecology*, 12(4), 503–513.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00233.x>

Reynolds, C., Reynolds, S. N., Munawar, I. F. & Munawar, M. (2000). The regulation of phytoplankton population dynamics in the world's largest lakes. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3(1), 1–21.
[https://doi.org/10.1016/S1463-4988\(99\)00066-4](https://doi.org/10.1016/S1463-4988(99)00066-4)

Reynolds, C. S. (1994). The role of fluid motion in the dynamics of phytoplankton in lakes and rivers. En P. S. Giller, A. G. Hildrew, & D. G. Raffaelli (Eds.), *Aquatic Ecology. Scale, Pattern and Process* (pp. 141–187). Blackwell Science, Oxford.

Reynolds, C. S. (1999). Modelling phytoplankton dynamics and its application to lake management. *Hydrobiologia*, 395, 123–131.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1017039900307>

Reynolds, C. S. (2006). *The Ecology of Phytoplankton* (pp. 535). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145>

Ringuelet, R. A., Saubián, A., Glavérie, E. & Ilhero, S. (1967). Limnología química de las lagunas Pampasicas (Provincia de Buenos Aires). *Physis*, XXVII(74), 201–221.

Rinke, C., Lee, J., Nath, N., Goudeau, D., Thompson, B., Poulton, N., Dmitrieff, E., Malmstrom, R., Stepanauskas, R. & Woyke, T. (2014). Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nature Protocols*, 9(5), 1038–1048.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.067>

Rippka, R. (1988). Isolation and Purification of Cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, 167(C), 3–27. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67004-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2)

Robarts, R. D. & Zohary, T. (1987). Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand*

Journal of Marine and Freshwater Research, 21(3), 391–399.
<https://doi.org/10.1080/00288330.1987.9516235>

Robertson, B. R., Tezuka, N. & Watanabe, M. M. (2001). Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 861–871. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-861>

Rodríguez, F., Derelle, E., Guillou, L., le Gall, F., Vaultot, D. & Moreau, H. (2005). Ecotype diversity in the marine picoeukaryote *Ostreococcus* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Environmental Microbiology*, 7(6), 853–859. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00758.x>

Ronneberger, D. (1998). Uptake of latex beads as size-model for food of planktonic rotifers. En E. Wurdak, R. Wallace, H. Segers, (Eds.) *Rotifera VIII: A Comparative Approach* (Vol. 134, pp. 445–449). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4782-8_57

Ross, P. E. & Munawar, M. (1981). Preference for nanoplankton size fractions in Lake Ontario zooplankton grazing. *Journal of Great Lakes Research*, 7(1), 65–67. [https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(81\)72027-6](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(81)72027-6)

Sánchez, M. L., Schiaffino, M. R., Graziano, M., Huber, P., Lagomarsino, L., Minotti, P., Zagarese, H. & Izaguirre, I. (2021). Effect of land use on the phytoplankton community of Pampean shallow lakes of the Salado River basin (Buenos Aires Province, Argentina). *Aquatic Ecology*, 55(2), 417–435. <https://doi.org/10.1007/s10452-021-09835-8>

Sánchez-Baracaldo, P., Handley, B. A. & Hayes, P. K. (2008). Picocyanobacterial community structure of freshwater lakes and the Baltic Sea revealed by phylogenetic analyses and clade-specific quantitative PCR. *Microbiology*, 154(11), 3347–3357. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019836-0>

Sánchez-Baracaldo, P., Hayes, P. K. & Blank, C. E. (2005). Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology*, 3(3), 145–165. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2005.00050.x>

Sandaas, R. A. & Larsen, A. (2006). Seasonal variations in virus-host populations in Norwegian coastal waters: Focusing on the cyanophage community infecting marine *Synechococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4610–4618. <https://doi.org/10.1128/AEM.00168-06>

Sarmento, H. (2012). New paradigms in tropical limnology: The importance of the microbial food web. *Hydrobiologia*, 686(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1011-6>

Sarmento, H., Montoya, J. M., Vázquez-Domínguez, E., Vaqué, D. & Gasol, J. M. (2010). Warming effects on marine microbial food web processes: How far can we go when it comes to predictions?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365(1549), 2137–2149. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0045>

Sarmento, H., Unrein, F., Isumbiso, M., Stenuite, S., Gasol, J. M. & Descy, J. P. (2008). Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biology*, 53(4), 756–771. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01939.x>

Scheffer, M. (2004). *Ecology of Shallow Lakes* (Vol. 22, pp. 357). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3154-0>

Scheffer, M., Hosper, S. H., Meijer, M.-L., Moss, B. & Jeppesen, E. (1993). Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(8), 275–279. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90254-M](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90254-M)

Schenone, L., Balseiro, E. & Modenutti, B. (2022). Light dependence in the phototrophy–phagotrophy balance of constitutive and non-constitutive mixotrophic protists. *Oecologia*, 200, 295–306. <https://doi.org/10.1007/S00442-022-05226-4>

Schenone, L., Modenutti, B., Martyniuk, N., Bastidas Navarro, M., Laspoumaderes, C. & Balseiro, E. (2021). Modelling key variables for understanding the effects of grazing and nutrient recycling by zooplankton on the freshwater microbial loop. *Freshwater Biology*, 66(12), 2322–2337. <https://doi.org/10.1111/fwb.13835>

Schiaffino, M. R., Gasol, J. M., Izaguirre, I. & Unrein, F. (2013). Picoplankton abundance and cytometric group diversity along a trophic and latitudinal lake gradient. *Aquatic Microbial Ecology*, 68(3), 231–250. <https://doi.org/10.3354/ame01612>

Schwaderer, A. S., Yoshiyama, K., de Tezanos Pinto, P., Swenson, N. G., Klausmeier, C. A. & Litchman, E. (2011). Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 56(2), 589–598. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.2.0589>

Sedmak, B. & Eleršek, T. (2006). Microcystins induce morphological and physiological changes in selected representative phytoplankton. *Microbial Ecology*, 51(4), 508–515. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9045-9>

Segovia, B. T., Domingues, C. D., Meira, B. R., Lansac-Toha, F. M., Fermani, P., Unrein, F., Lobão, L. M., Roland, F., Velho, L. F. M. & Sarmento, H. (2016). Coupling between heterotrophic nanoflagellates and bacteria in fresh waters: Does latitude make a difference? *Frontiers in Microbiology*, 7, 114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00114>

Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (1987). High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates. *Nature*, 325, 710–711. <https://doi.org/10.1038/325710a0>

Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (1993). Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. En P. Kemp, B. F. Sherr & E. B. Sherr (Eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (1° Edición, pp. 207–212). Lewis Publishers.

Sherr, E. B. & Sherr, B. F. (2002). Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81(1–4), 293–308. <https://doi.org/10.1023/A:1020591307260>

Sieburth, J. M., Smetacek, V. & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*, 23(6), 1256–1263. <https://doi.org/https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.6.1256>

Silvoso, J., Izaguirre, I. & Allende, L. (2011). Picoplankton structure in clear and turbid eutrophic shallow lakes: a seasonal study. *Limnologica*, 41(3), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2010.10.001>

Šimek, K., Bobková, J., Macek, M., Nedoma, J. & Psenner, R. (1995). Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: a study at the species and community level. *Limnology and Oceanography*, 40(6), 1077–1090. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.6.1077>

Šimek, K., Macek, M., Pernthaler, J., Straškrabová, V. & Psenner, R. (1996). Can freshwater planktonic ciliates survive on a diet of picoplankton?. *Journal of Plankton Research*, 18(4), 597–613. <https://doi.org/10.1093/plankt/18.4.597>

Šimek, K., Grujčić, V., Nedoma, J., Jezberová, J., Šorf, M., Matouš, A., Pechar, L., Posch, T., Bruni, E. P. & Vrba, J. (2019). Microbial food webs in hypertrophic fishponds: Omnivorous ciliate taxa are major protistan bacterivores. *Limnology and Oceanography*, 64(5), 2295–2309. <https://doi.org/10.1002/lno.11260>

Šimek, K., Jürgens, K., Nedoma, J., Comerma, M. & Armengol, J. (2000). Ecological role and bacterial grazing of *Halteria* spp.: small freshwater oligotrichs as dominant pelagic ciliate bacterivores. *Aquatic Microbial Ecology*, 22(1), 43–56. <https://doi.org/10.3354/ame022043>

Šimek, K., Kojecáká, P., Nedoma, J., Hartman, P., Vrba, J. & Dolan, J. R. (1999). Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography*, 44(7), 1634–1644. <https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.7.1634>

Šimek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M. G., Hornák, K., Dolan, J. R., Nedoma, J., Mašín, M. & Amann, R. (2001). Changes in bacterial community composition

and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2723–2733. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2723-2733.2001>

Sime-Ngando, T. (1995). Population dynamics of autotrophic picoplankton in relation to environmental factors in a productive lake. *Aquatic Sciences*, 57(2), 91–105. <https://doi.org/10.1007/BF00877378>

Simon, M. & Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 51, 201–213. <https://doi.org/10.3354/meps051201>

Six, C., Finkel, Z. v., Rodriguez, F., Marie, D., Partensky, F. & Campbell, D. A. (2008). Contrasting photoacclimation costs in ecotypes of the marine eukaryotic picoplankter *Ostreococcus*. *Limnology and Oceanography*, 53(1), 255–265. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.1.0255>

Śliwińska-Wilczewska, S., Maculewicz, J., Felpeto, A. B., & Latała, A. (2018). Allelopathic and bloom-forming picocyanobacteria in a changing world. *Toxins*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxins10010048>

Sommaruga, R. (1995). Microbial and classical food webs: a visit to a hypertrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 17(4), 257–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00150.x>

Sommaruga, R. & Robarts, R. D. (1997). The significance of autotrophic and heterotrophic picoplankton in hypertrophic ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*, 24(3), 187–200. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00436.x>

Somogyi, B., Felföldi, T., Vanyovszki, J., Ágyi, Á., Márialigeti, K. & Vörös, L. (2009). Winter bloom of picoeukaryotes in Hungarian shallow turbid soda pans and the role of light and temperature. *Aquatic Ecology*, 43(3), 735–744. <https://doi.org/10.1007/s10452-009-9269-0>

Somogyi, B., Felföldi, T., V.-Balogh, K., Boros, E., Pálffy, K. & Vörös, L. (2016). The role and composition of winter picoeukaryotic assemblages in shallow Central European great lakes. *Journal of Great Lakes Research*, 42(6), 1420–1431. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2016.10.003>

Somogyi, B., Pálffy, K., Balogh, K. V., Botta-Dukát, Z., & Vörös, L. (2017). Unusual behaviour of phototrophic picoplankton in turbid waters. *PLoS ONE*, 12(3), e0174316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174316>

Somogyi, B., Felföldi, T., Boros, E., Szabó, A., & Vörös, L. (2022). Where the Little Ones Play the Main Role-Picophytoplankton Predominance in the Soda and Hypersaline Lakes of the Carpathian Basin. *Microorganisms*, 10(4), 818. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040818>

Søndergaard, M. (1990). Picophytoplankton in Danish lakes. *SIL Proceedings, 1922-2010*, 24(1), 609–612. <https://doi.org/10.1080/03680770.1989.11898810>

Søndergaard, M. (1991). Phototrophic picoplankton in temperate lakes: seasonal abundance and importance along a trophic gradient. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 505–522. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760404>

Sosnovsky, A., José Rosso, J. & Quirós, R. (2010). Trophic interactions in shallow lakes of the Pampa plain (Argentina) and their effects on water transparency during two cold seasons of contrasting fish abundance. *Limnetica*, 29(2), 233–246. <https://doi.org/10.23818/limn.29.19>

Sosnovsky, A. & Quirós, R. (2006). El estado trófico de pequeñas lagunas pampeanas, su relación con la hidrología y el uso de la tierra. *Ecología Austral*, 16(2), 115–124. URL https://ojs.ecologiaaustral.com.ar/index.php/Ecologia_Austral/article/view/1436

Stal, L. J. (2017). Gregarious cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 19(6), 2105–2109. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13739>

Stamou, G., Katsiapi, M., Moustaka-Gouni, M. & Michaloudi, E. (2019). Trophic state assessment based on zooplankton communities in Mediterranean lakes. *Hydrobiologia*, 844(1), 83–103. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3880-9>

Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171–205. <https://doi.org/10.1128/mmbr.35.2.171-205.1971>

Stenuite, S., Tarbe, A. L., Sarmento, H., Unrein, F., Pirlot, S., Sinyinza, D., Thill, S., Lecomte, M., Leporcq, B., Gasol, J. M. & Descy, J. P. (2009). Photosynthetic picoplankton in Lake Tanganyika: biomass distribution patterns with depth, season and basin. *Journal of Plankton Research*, 31(12), 1531–1544. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp090>

Sterner, R. W. (1989). The Role of Grazers in Phytoplankton Succession. In: U. Sommer, (Ed.) *Plankton Ecology* (1° Edición, pp. 107–170). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74890-5_4

Stockner, J., Callieri, C. & Cronberg, G. (2000). Picoplankton and other non-bloom-forming cyanobacteria in lakes. En B. A. Whitton, M. Potts (Eds.) *The Ecology of Cyanobacteria* (1° Edición, pp. 195–231). Springer. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_7

Stockner, J. G. (1988). Phototrophic picoplankton: an overview from marine and freshwater ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 33(4, part 2), 765–775. <https://doi.org/10.4319/lo.1988.33.4part2.0765>

Stockner, J. G. (1991). Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: the view from the summit. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 483–492. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760402>

Stockner, J. G. & Antia, N. J. (1986). Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(12), 2472–2503. <https://doi.org/10.1139/f86-307>

Stockner, J. G. & Shortreed, K. S. (1989). Algal picoplankton production and contribution to food-webs in oligotrophic British Columbia lakes. *Hydrobiologia*, 173(2), 151–166. <https://doi.org/10.1007/BF00015525>

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. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 581–601. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760410>

Stomp, M. (2008). *Colourful coexistence: a new solution to the plankton paradox*. [Tesis de doctorado, University of Amsterdam]. URL <https://hdl.handle.net/11245/1.292451>

Stomp, M., Huisman, J., de Jongh, F., Veraart, A. J., Gerla, D., Rijkeboer, M., Ibelings, B. W., Wollenzien, U. I. A. & Stal, L. J. (2004). Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature*, 432, 104–107. <https://doi.org/10.1038/nature03044>

Stomp, M., Huisman, J., Stal, L. J. & Matthijs, H. C. P. (2007a). Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. *The ISME Journal*, 1(4), 271–282. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.59>

Stomp, M., Huisman, J., Vörös, L., Pick, F. R., Laamanen, M., Haverkamp, T. & Stal, L. J. (2007b). Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecology Letters*, 10(4), 290–298. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01026.x>

Stramski, D., Sciandra, A. & Claustre, H. (2002). Effects of temperature, nitrogen, and light limitation on the optical properties of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography*, 47(2), 392–403. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0392>

Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Torremorell, A., Bustigorry, J., Escaray, R. & Zagarese, H. E. (2007). Seasonal dynamics of a large, shallow lake, laguna Chascomús: The role of light limitation

and other physical variables. *Limnologica*, 37(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.09.002>

Torremorell, A., Llames, M. E., Pérez, G. L., Escaray, R., Bustingorry, J. & Zagarese, H. (2009). Annual patterns of phytoplankton density and primary production in a large, shallow lake: the central role of light. *Freshwater Biology*, 54(3), 437–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02119.x>

Unrein, F., Quiroga, M. V. & Malits, A. (2018). Dinámica estacional del virioplancton de las lagunas pampeanas. *Congreso Argentino de Limnología (CAL8)*, 94–95.

Urbach, E., Scanlan, D. J., Distel, D. L., Waterbury, J. B. & Chisholm, S. W. (1998). Rapid Diversification of Marine Picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Molecular Evolution*, 46(2), 188–201. <https://doi.org/10.1007/PL00006294>

Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *SIL Communications*, 1953-1996, 9(1), 1–38. <https://doi.org/10.1080/05384680.1958.11904091>

van Holthoorn, F. L., van Beek, T. A., Lürling, M., van Donk, E. & de Groot, A. (2003). Colony formation in *Scenedesmus*: A literature overview and further steps towards the chemical characterisation of the *Daphnia* kairomone. *Hydrobiologia*, 491, 241–254. <https://doi.org/10.1023/A:1024414515222>

Vaqué, D. & Pace, M. L. (1992). Grazing on bacteria by flagellates and cladocerans in lakes of contrasting food-web structure. *Journal of Plankton Research*, 14(2), 307–321. <https://doi.org/10.1093/plankt/14.2.307>

Venrick, E. (1978). How many cells to count? En A. Sournia (Ed.), *Phytoplankton Manual* (pp. 167–180). United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. URL <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000030788>

Verschoor, A. M., van der Stap, I., Helmsing, N. R., Lürling, M. & van Donk, E. (2004). Inducible colony formation within the Scenedesmaceae: Adaptive responses to infochemicals from two different herbivore taxa. *Journal of Phycology*, 40(5), 808–814. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.04007.x>

Verschoor, A. M., Zadereev, Y. S. & Mooij, W. M. (2007). Infochemical-mediated trophic interactions between the rotifer *Brachionus calyciflorus* and its food algae. *Limnology and Oceanography*, 52(5), 2109–2119. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.5.2109>

Vollenweider, R. A. & Kerekes, J. (1982). *Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control* (pp.154). OECD Cooperative programme on monitoring inland waters (Eutrophication control). URL <http://lakes.chebucto.org/TPMODELS/OECD/OECD1982.pdf>

von Elert, E. & Franck, A. (1999). Colony formation in *Scenedesmus*: grazer-mediated release and chemical features of the infochemical. *Journal of Plankton Research*, 21(4), 789–804. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.4.789>

Vörös, L., Callieri, C., V-Balogh, K. & Bertoni, R. (1998). Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia*, 369–370, 117–125. <https://doi.org/10.1023/A:1017026700003>

Vörös, L., Gulyás, P. & Németh, J. (1991). Occurrence, dynamics and production of picoplankton in Hungarian shallow lakes. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 617–629. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760412>

Vörös, L., Somogyi, B. & Boros, E. (2008). Birds cause net heterotrophy in shallow lakes. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 54(Suppl.1), 23–34. URL http://actazool.nhmus.hu/54/Suppl1/azh54_S1_Voros.pdf

Vörös, L., Mózes, A. & Somogyi, B. (2009). A five-year study of autotrophic winter picoplankton in Lake Balaton, Hungary. *Aquatic Ecology* 43, 727–734 <https://doi.org/10.1007/s10452-009-9272-5>

Webb, K. L. & Johannes, R. E. (1967). Studies of the release of dissolved free amino acids by marine zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 12(3), 376–382. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.3.0376>

Weber, C. I. (1993). *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms* (4º Edición, pp. 197). Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.

Weisse, T. (1988). Dynamics of autotrophic picoplankton in Lake Constance. *Journal of Plankton Research* 10(6), 1179–1188. <https://doi.org/10.1093/plankt/10.6.1179>

Weisse, T. (1993). Dynamics of Autotrophic Picoplankton in Marine and Freshwater Ecosystems. En J.G. Jones, (Eds.). *Advances in Microbial Ecology* (Vol. 13, pp. 327–370). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2858-6_8

Weisse, T. & Kenter, U. (1991). Ecological characteristics of autotrophic picoplankton in a prealpine lake. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 76(4), 493–504. <https://doi.org/10.1002/iroh.19910760403>

Wetzel, R. G. (2001). *Limnology, Lake and River Ecosystems* (3º Edición, pp. 1006). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02112-6>

White, P. A., Kalff, J., Rasmussen, J. B. & Gasol, J. M. (1991). The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate

in freshwater and marine habitats. *Microbial Ecology*, 21(2), 99–118. <https://doi.org/10.1007/BF02539147>

Wilhelm, S. W. & Matteson, A. R. (2008). Freshwater and marine virioplankton: A brief overview of commonalities and differences. *Freshwater Biology*, 53(6), 1076–1089. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01980.x>

Williams, P. J. L. B. & Ducklow, H. W. (2019). The microbial loop concept: A history, 1930–1974. *Journal of Marine Research*, 77, 23–81.

Winder, M. (2009). Photosynthetic picoplankton dynamics in Lake Tahoe: temporal and spatial niche partitioning among prokaryotic and eukaryotic cells. *Journal of Plankton Research*, 31(11), 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp074>

Wood, A. M. (1985). Adaptation of photosynthetic apparatus of marine ultraphytoplankton to natural light fields. *Nature*, 316(6025), 253–255. <https://doi.org/10.1038/316253a0>

Wood, S. N. (2006). *Generalized Additive Models* (1° Edición, pp.406). Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/9781420010404>

Worden, A. Z., Nolan, J. K. & Palenik, B. (2004). Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: The importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography*, 49(1), 168–179. <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.1.0168>

Work, K. A. & Havens, K. E. (2003). Zooplankton grazing on bacteria and cyanobacteria in a eutrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 25(10), 1301–1306. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg092>

Yang, Z., Kong, F., Shi, X. & Cao, H. (2006). Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. *Hydrobiologia*, 563(1), 225–230. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-0008-9>

Yasumoto, K., Nishigami, A., Aoi, H., Tsuchihashi, C., Kasai, F., Kusumi, T. & Ooi, T. (2008). Isolation and absolute configuration determination of aliphatic sulfates as the *Daphnia* kairomones inducing morphological defense of a phytoplankton - Part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(1), 129–132. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.129>

Yasumoto, K., Nishigami, A., Yasumoto, M., Kasai, F., Okada, Y., Kusumi, T. & Ooi, T. (2005). Aliphatic sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: Isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters*, 46(28), 4765–4767. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.05.027>

Yelton, A. P., Acinas, S. G., Sunagawa, S., Bork, P., Pedrós-Alió, C. & Chisholm, S. W. (2016). Global genetic capacity for mixotrophy in marine picocyanobacteria. *ISME Journal*, 10(12), 2946–2957. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.64>

Yvon-Durocher, G., Montoya, J. M., Trimmer, M. & Woodward, G. (2011). Warming alters the size spectrum and shifts the distribution of biomass in freshwater ecosystems. *Global Change Biology*, 17(4), 1681–1694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02321.x>

Zhou, W., Tang, X., Qiao, X., Wang, Y., Wang, R. & Feng, L. (2009). Ingestion of *Brachionus plicatilis* under different microalgae conditions. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27(3), 473–479. <https://doi.org/10.1007/s00343-009-9208-x>

Zinabu, G. M. & Taylor, W. D. (1997). Bacteria-chlorophyll relationships in Ethiopian lakes of varying salinity: are soda lakes different?. *Journal of Plankton Research*, 19(5), 647-654. <https://doi.org/10.1093/plankt/19.5.647>

Zingel, P., Agasild, H., Nõges, T. & Kisand, V. (2007). Ciliates are the dominant grazers on pico- and nanoplankton in a shallow, naturally highly eutrophic lake. *Microbial Ecology*, 53(1), 134–142. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9155-4>