



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Dinámica de gases de efecto invernadero en
lagunas de la llanura pampeana con distinto régimen de equilibrio**

Tesis presentada para optar por el título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires,
área de Ciencias Biológicas

Lic. Sofia Baliña

Director de Tesis: Dr. Paul A. del Giorgio

Directora Adjunta de Tesis: Dra. María Laura Sánchez

Consejera de Estudios: Dra. Irina Izaguirre

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Limnología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Fecha de Presentación: Buenos Aires, 31/10/2023

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen	4
Summary	5
Agradecimientos	6
Introducción general	7 - 14
Gases de efecto invernadero y su relación con cuerpos de agua continentales	7 - 10
Regímenes alternativos en lagos someros	11 - 12
Area de estudio: Llanura Pampeana	12 - 14
Objetivo general y específicos	15
Capítulo 1	16 - 53
Introducción	16 - 18
Métodos	18 - 34
Resultados	34 - 47
Discusión	48 - 53
Capítulo 2	54 - 68
Introducción	54 - 56
Métodos	57 - 59
Resultados	59 - 63
Discusión	63 - 68
Capítulo 3	69 - 104
Introducción	69 - 71
Métodos	71 - 82
Resultados	82 - 99
Discusión	99 - 104
Capítulo 4	105 - 120
Introducción	105 - 106

Métodos	106 - 110
Resultados	110 - 116
Discusión	116 - 119
Discusión general	120 - 124
Referencias	125 - 138
Anexo	140 - 147
Anexo Capítulo 1	140 - 142
Anexo Capítulo 3	143
Anexo Capítulo 4	144 - 147

RESUMEN

Dinámica de gases de efecto invernadero en lagunas de la llanura pampeana con distinto régimen de equilibrio

En las últimas décadas, numerosas lagunas de la llanura pampeana han virado desde un régimen de aguas claras, dominado por macrófitas sumergidas, a un régimen de aguas turbias, dominado por fitoplancton. No resulta claro, no obstante, si este cambio en el régimen puede haber generado un cambio en la dinámica de dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4), los gases de efecto invernadero (GEI) más importantes. En la presente tesis se analizó (i) la magnitud y vías de emisión de CO_2 y CH_4 ; (ii) la influencia de factores biológicos y físicos sobre el CH_4 disuelto; (iii) la producción de CH_4 en la columna de agua; y (iv) la producción de CH_4 por fitoplancton, en lagunas claras y turbias. Los resultados obtenidos indican que (i) lagunas claras y turbias presentan diferentes vías principales de emisión de GEI, pero las emisiones totales son similares entre regímenes; (ii) factores físicos, más que procesos biológicos, modulan el CH_4 disuelto; (iii) ambos regímenes presentan producción de CH_4 en la columna de agua; (iv) el fitoplancton aislado produce CH_4 . Los resultados obtenidos en la presente tesis contribuyen al entendimiento de la magnitud y dinámica de GEI en lagunas pampeanas, un tema poco estudiado en la región.

Palabras clave: Lagunas, Metano, Dióxido de Carbono, Vías de emisión, Producción Óxica de Metano, Fitoplancton, Macrófitas

SUMMARY

Greenhouse gas dynamics in shallow lakes of the Pampean Plain with different alternative regimes

In the last decades, shallow lakes from the Pampean Plain have been shifting from a clear water regime, dominated by submerged macrophytes, to a turbid water regime, dominated by phytoplankton. It is not clear, however, whether the change in the regime may have also generated a change in the dynamics of carbon dioxide (CO₂) and methane (CH₄), the most important greenhouse gases (GHGs). In this thesis, we analyzed in clear and turbid shallow lakes (i) the magnitude and pathways of CO₂ and CH₄ emissions; (ii) the influence of biological and physical factors over dissolved CH₄; (iii) CH₄ production in the water column; and (iv) CH₄ production by phytoplanktonic strains isolated from lakes. The results obtained indicate that (i) clear and turbid lakes present different main GHG emission pathways, but the total emissions in terms of Carbon are similar between regimes; (ii) physical factors, rather than biological processes, modulate dissolved CH₄; (iii) both regimes present CH₄ production in the water column; (iv) isolated phytoplanktonic strains produce CH₄. The results obtained in this thesis contribute to the understanding of the magnitude and dynamics of GHG in Pampean shallow lakes, a topic barely studied in the region until the date.

Keywords: Shallow lakes, Methane, Carbon Dioxide, Emission pathways, Oxidic Methane Production, Phytoplankton, Macrophytes

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a Paul y Laura por su generosidad al compartir su tiempo, experiencia, apoyo y constante respaldo a lo largo de todos estos años de trabajo en conjunto. Gracias por alentarme, brindarme herramientas y acompañarme tanto en un crecimiento personal como profesional. Creo que logramos establecer una gran sinergia de trabajo, con la dificultad extra de hacerlo a distancia, y lo hemos hecho en un contexto verdaderamente ameno y agradable. Fue un placer y una alegría trabajar con ustedes. En segunda instancia, quiero agradecerle a Irina, por hacer el contacto inicial con el laboratorio y por ser la consejera de la tesis. Gracias, también, por todo el apoyo y constante soporte a lo largo de estos años. En tercera instancia le agradezco a Inés, Haydée y a todos los compañeros del laboratorio de limnología en Argentina, por todas sus contribuciones y por hacer del trabajo un espacio divertido, ameno y con hermosos valores. Hace la diferencia ir a trabajar cuando sabes que te esperan compañeros así. Gracias, en especial, a todos los que me acompañaron al campo, sin su ayuda esta tesis no habría sido posible: Franco Zolezzi, Virginia Rago, Griselda Chaparro, Martin Saraceno, Cecilia Miranda, Sol Porcel, Francisco Rego y Carolina Bernal. También le quiero agradecer a los compañeros de Montreal porque hicieron de mis estadías experiencias sumamente divertidas y de mucho aprendizaje, que devinieron en un crecimiento profesional pero también en hermosas amistades. Muchas gracias a Mina Bižić, Danny Ionescu, Hans-Peter Grossart y todos los integrantes de su laboratorio por recibirme en Alemania, por todo lo aprendido y por el tiempo compartido. También le agradezco a Alice Parkes for su apoyo logístico y de laboratorio durante todo este proyecto, y a Ana Dogliotti y Angela Juárez por sus contribuciones. Gracias a mi familia por su apoyo y amor incondicional, por siempre alentarme e inculcarme los valores de perseverancia, esfuerzo y dedicación. Gracias a mi compañero de vida, Fran, por su apoyo incondicional en cada proyecto que se presentó y por brindarme siempre tanta confianza. Gracias a la familia de Fran, que ya es mi familia, por su soporte y afecto. Gracias a Rita por su compañía y cariño. Gracias a mis amigos, la familia elegida, por su incondicionalidad. Le agradezco al CONICET por otorgar una beca doctoral interna y a las entidades que otorgaron becas que permitieron realizar estadías en el exterior: Globals Affaris and Trade, Canada (ELAP scholarship); DAAD y Ministerio de Educación de Argentina (beca ALEARG), y a la Universidad de Buenos Aires (beca UBAINTE). Le agradezco a la Universidad de Buenos Aires y sus docentes por la educación de calidad brindada y a todos las fuentes de financiamiento que hicieron posible llevar adelante la tesis: BID PICT RAICES 2017-2498, Préstamo BID PICT 2015-1509, NSERC/HQ CarBBAS Industrial Research Chair y Tonolli Memorial Award, International Society of Limnology, 2019&2022.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Gases de efecto invernadero y su relación con cuerpos de agua continentales

Los gases de efecto invernadero (GEI) comprenden una variedad de compuestos, como el vapor de agua (H_2O), el óxido nitroso (N_2O), el ozono (O_3), los compuestos fluorados (gases-F), el dióxido de carbono (CO_2) y el metano (CH_4). Estas moléculas tienen la capacidad de absorber parte de la radiación que es reflejada por la tierra, generando vibraciones y posteriormente emitiendo esa radiación, que puede ser absorbida por otra molécula de GEI. Esto crea un ciclo de absorción-emisión-absorción que mantiene el calor cerca de la superficie de la tierra. Como consecuencia, los GEI mantienen la temperatura terrestre más alta de lo que sería si la única fuente de calentamiento fuese la radiación solar, un fenómeno natural que permite la existencia de la vida en la tierra y que es conocido como efecto invernadero¹. El problema ocurre cuando actividades antrópicas – tales como la quema de combustibles fósiles y el cambio en el uso de la tierra - alteran los balances naturales de estos gases. Esto conduce a un aumento de la concentración de GEI en la atmósfera y un aumento extraordinario en la temperatura global, fenómeno conocido como calentamiento global². En particular, las emisiones de CO_2 son las que más han aumentado en los últimos 30 años (Fig. 1). Si bien las emisiones de CH_4 han aumentado en una menor magnitud (Fig 1³), al tratarse de un gas con un potencial como GEI 34 veces mayor que el del CO_2 en un horizonte de 100 años² estas emisiones también contribuyen sustancialmente al calentamiento global.

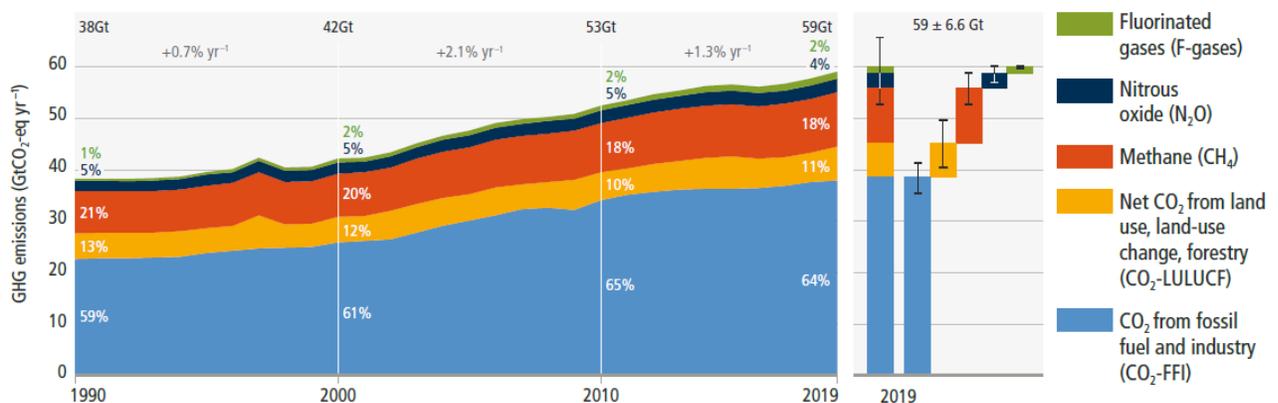


Figura 1. Esquema tomado del reporte del IPCC del año 2022. Emisiones netas globales de GEI entre 1990 – 2019 en equivalentes de CO_2 año⁻¹. Dentro de las categorías podemos ver gases fluorados (verde), N_2O (azul), CH_4 (rojo), CO_2 producto de sistemas naturales (amarillo) y CO_2 producto de quema de fósiles y de industria (celeste).

El CO₂ y el CH₄ forman parte de los balances globales de carbono debido a que poseen carbono en su estructura química. Estos balances implican la cuantificación de las emisiones de carbono producidas por fuentes y la absorción ocurrida por sumideros, lo que nos permite conocer cuánto carbono tenemos en la atmósfera y cómo éste interacciona y se distribuye en los distintos compartimentos terrestres (Fig. 2). Tradicionalmente se consideraba que la tierra, la atmósfera y los océanos eran los tres únicos compartimentos naturales activos en términos de ciclo de carbono, mientras que los cuerpos de agua continentales – ríos, arroyos, lagos y lagunas – actuaban como conductores inertes de carbono desde la tierra a los océanos. Sin embargo, desde hace unos años se sabe que los cuerpos de agua dulce actúan como grandes proveedores de CO₂⁴ y de CH₄⁵ a la atmósfera. Por ende, lejos de ser conductores inertes los cuerpos de agua continentales actúan como verdaderos reactores, donde parte del carbono que llega a los mismos es almacenado en el sistema, parte es emitido a la atmósfera y parte transportado a los océanos^{4,6}. Dentro de los sistemas de agua dulce, las lagunas –cuerpos de agua con una profundidad menor a 3 metros - son consideradas *hot spot* biogeoquímicos debido a su gran relación superficie: volumen, lo que propicia un estrecho contacto con la cuenca que los rodea, un intenso mezclado de su columna de agua y una importante influencia de los sedimentos en los procesos que ocurren en la columna de agua^{7,8}.

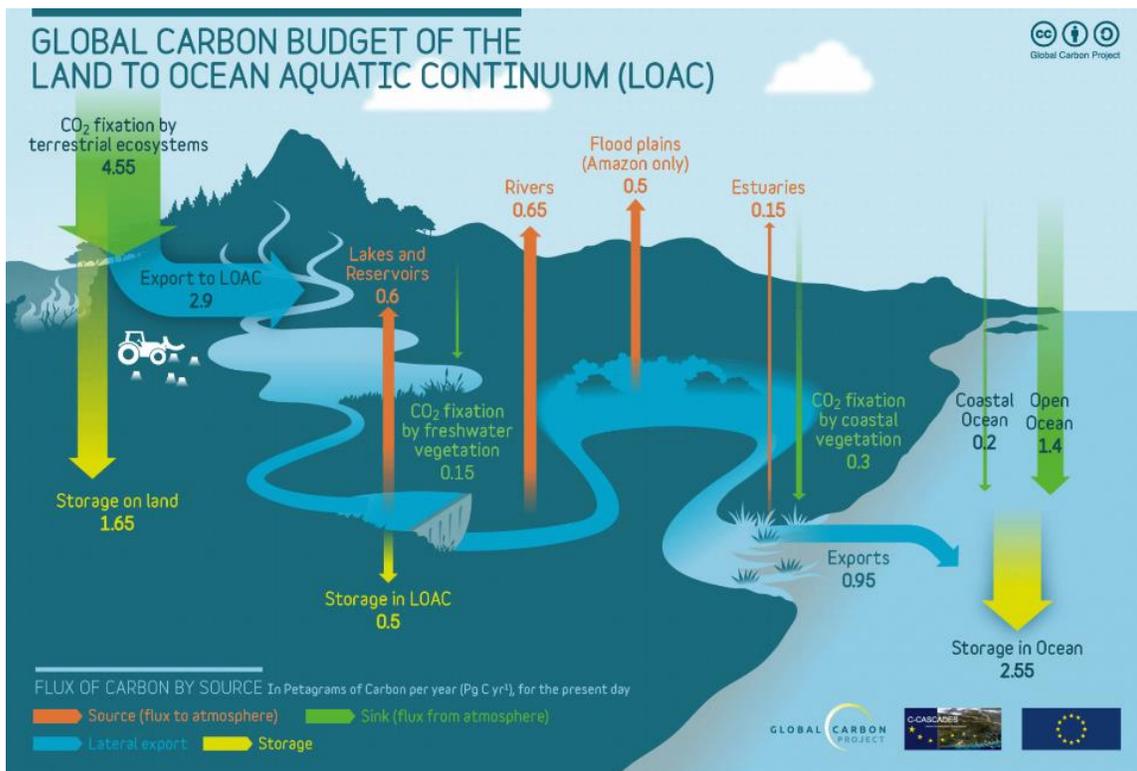


Figura 2. Esquema tomado del [Global Carbon Project](https://www.globalcarbonproject.org/). Balance global de carbono para el continuo tierra-océanos, donde se incluyen ríos, lagos, estuarios y otros cuerpos de agua dulces.

La dinámica de CO₂ y CH₄ en lagunas se encuentra influida por varios procesos que ocurren de manera simultánea en distintos hábitats (Fig. 3). Entre los ambientes que se pueden encontrar en una laguna están los sedimentos anóxicos, zonas con macrófitas sumergidas, zonas con macrófitas arraigadas emergentes y zonas de aguas abiertas. La producción de CH₄, denominada metanogénesis, ocurre principalmente en los sedimentos anóxicos mediante arqueas metanogénicas (metanogénesis clásica)⁹⁻¹¹. El CH₄ producido en los sedimentos es emitido a la atmósfera mediante tres vías principales: difusión, ebullición y a través de las macrófitas emergentes. Parte del CH₄ producido en los sedimentos se disuelve en la columna de agua y, por diferencia de concentración entre ésta y la atmósfera, es intercambiado a favor del gradiente mediante un flujo difusivo¹². La magnitud de dicho flujo depende de la diferencia de concentración entre el agua y la atmósfera y de la turbulencia en la columna de agua¹³. Por otra parte, en los casos donde hay una producción sustancial de CH₄ en los sedimentos, las moléculas de CH₄ se agregan formando burbujas que viajan por la columna de agua liberándose directamente a la atmósfera, lo cual se conoce como flujo ebulitivo de CH₄^{6,14}. Esta vía de emisión es particularmente importante en sistemas someros, donde la altura de la columna de agua no es suficiente para disolver y/u oxidar las burbujas de CH₄. Por último, las macrófitas emergentes están formadas por aerénquima, un tejido poroso que favorece su flotabilidad y les permite transportar O₂ desde la atmósfera a los sedimentos anóxicos¹⁵. Este mismo tejido permite a las macrófitas emergentes movilizar CO₂ y CH₄ desde y hacia la atmósfera, lo cual se conoce como transporte mediado por macrófitas emergentes⁵. Por otra parte, en la última década se ha reportado evidencia de producción de CH₄ en la columna de agua, independientemente de la producción de CH₄ en los sedimentos, la cual fue llamada producción óxica de metano (metanogénesis óxica, Fig. 3)¹⁶⁻¹⁹. Dicha producción parece estar relacionada con la dinámica del fitoplancton, dado que se han visto correlaciones positivas entre la producción pelágica de CH₄ y la clorofila a (Chl a)^{18,20,21}. Una posible explicación a este fenómeno es que las arqueas metanogénicas podrían alojarse en micro-nichos anóxicos asociados al fitoplancton, produciendo CH₄ de manera tradicional pero en la columna de agua²². También existe evidencia indicando que diatomeas y cianobacterias son capaces *per se* de producir CH₄, pero mediante mecanismos que todavía no han sido esclarecidos^{21,23}. Independientemente del mecanismo de producción, el CH₄ generado en la columna de agua puede ser intercambiado con la atmósfera a través de difusión en la interfaz agua: aire. Además de las mencionadas vías de producción y de emisión, parte del CH₄ presente en la columna de agua es oxidado a CO₂ mediante bacterias metanotróficas (BOM), proceso denominado metanotrofia²⁴. En gran medida, las emisiones de CH₄ están controladas por el grado de actividad de las BOM, las cuales oxidan una porción variable pero sustancial de CH₄^{25,26}. Respecto a la dinámica de CO₂, éste es consumido por los productores primarios mediante la fotosíntesis y producido mediante la respiración, modificando la concentración de CO₂ disuelta en la laguna²⁷. El CO₂ será intercambiado con la

atmósfera mediante difusión en la interfaz agua: aire y también mediante el transporte por macrófitas emergentes.

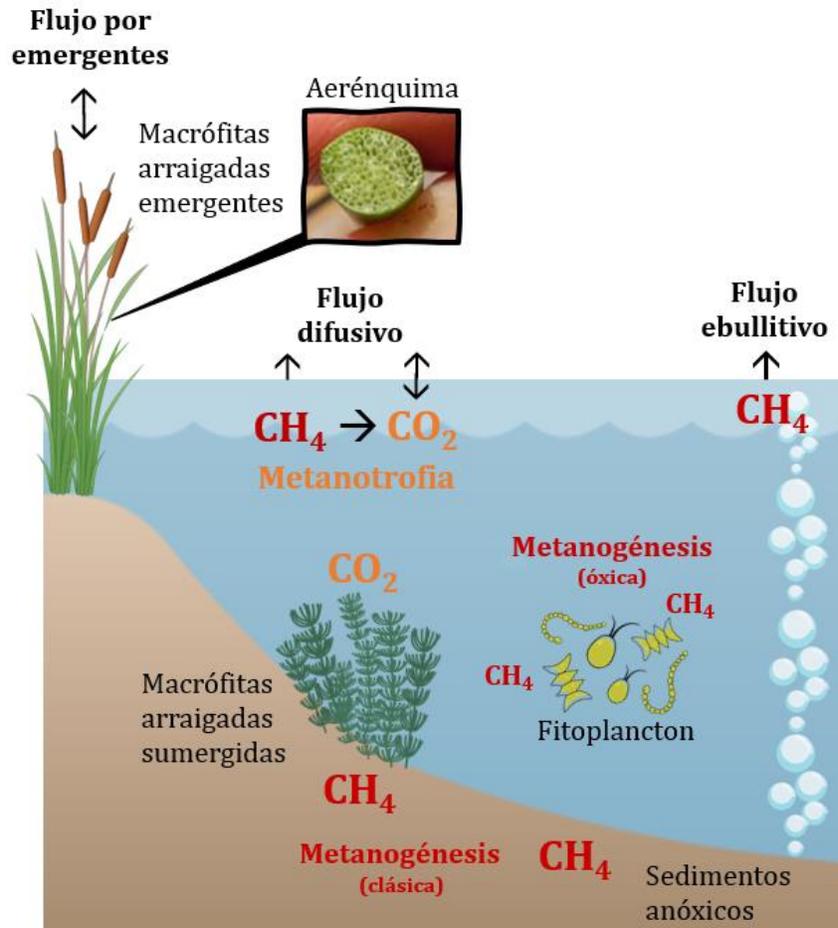


Figura 3. Esquema de una laguna, mostrando los diferentes ambientes que se encuentran en ella: sedimentos anóxicos, zonas con macrófitas sumergidas, zonas con macrófitas emergentes y la zona de aguas abiertas. Estos ambientes dan lugar a procesos relacionados con la dinámica del CH_4 y CO_2 , que ocurren de forma simultánea.

Todos los procesos mencionados ocurren de forma simultánea y tendrán mayor o menor protagonismo en una laguna dependiendo de las características de esta: si se encuentra dominada por macrófitas sumergidas, por fitoplancton, con o sin macrófitas emergentes, etc. En este sentido, se sabe que bajo ciertas condiciones ambientales, algunas lagunas pueden alternar entre un régimen de aguas turbias dominadas por fitoplancton y sin macrófitas sumergidas, y otro régimen de aguas claras dominadas por macrófitas sumergidas y una menor abundancia de fitoplancton²⁸. Estos potenciales cambios de regímenes en cuerpos de agua someros agregan una capa más de complejidad en el estudio de la dinámica de GEI, ya que no resulta fácilmente

predecible cómo todos los procesos previamente mencionados podrían combinarse en cada uno de estos regímenes y cuál sería el resultado neto.

Regímenes alternativos en lagos someros

La teoría de regímenes alternativos en lagos someros fue propuesta por Scheffer (1993)²⁸ y plantea que, dentro de un rango de nutrientes y turbidez, algunas lagunas pueden alternar entre un régimen de aguas claras dominado por macrófitas sumergidas o un régimen de aguas turbias dominado por fitoplancton (Fig. 4). En un contexto de bajos niveles de turbidez y de nutrientes, la laguna tiende a estar en un régimen de aguas claras dominado por macrófitas sumergidas. Dicho régimen se mantiene gracias a que las macrófitas sumergidas disminuyen el oleaje y la resuspensión de sedimentos, disminuyendo la turbidez; toman nutrientes de la columna de agua, que no estarán disponibles para el fitoplancton; sirven de refugio para el zooplancton, que se alimentará del fitoplancton; y pueden producir sustancias alelopáticas, que afectan negativamente el crecimiento del fitoplancton. En un escenario de concentraciones medias de nutrientes y de turbidez, la laguna se encuentra en un equilibrio inestable y puede alternar entre un régimen u otro dependiendo de factores como el nivel hidrométrico y la presencia/ausencia de macrófitas sumergidas, entre otros. Al aumentar los nutrientes aumentará la turbidez, pero en presencia de macrófitas sumergidas la turbidez se verá mitigada. Esto será así hasta que la laguna llegue a una turbidez crítica, donde las macrófitas sumergidas ya no pueden compensarla. En ese caso, las macrófitas recibirán menos radiación solar y por ende empezarán a morir. Simultáneamente, la comunidad fitoplanctónica aumentará en abundancia, aumentando aún más la turbidez en la columna de agua y reforzando la desaparición de macrófitas. Esto llevará a la laguna a un régimen estable turbio, dominado por fitoplancton.

La teoría de los regímenes alternativos ha sido revisada muchas veces en las últimas décadas y se ha propuesto, por ejemplo, que los dos regímenes alternativos son capaces de coexistir espacialmente en una misma laguna²⁹, o que dentro de un régimen turbio puede haber diferentes grupos fitoplanctónicos dominantes y esos estados pueden, a su vez, representar regímenes alternativos dentro de un régimen de aguas turbias³⁰. También se ha revisado el efecto de forzantes climáticos – tales como sequías, inundaciones, vientos, etc – y de propiedades morfológicas de la laguna – profundidad, tamaño – sobre los regímenes alternativos³¹.

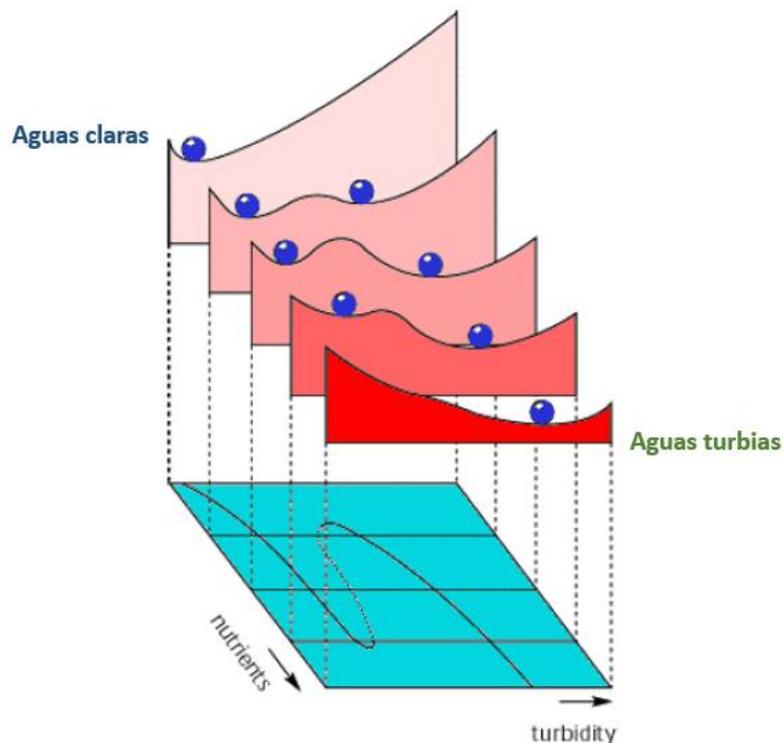


Figura 4. Esquema modificado a partir de Scheffer *et al.* (2001)³². El eje de las ordenadas es la concentración de nutrientes, mientras que el eje de las abscisas es la turbidez. La pelotita azul indica el régimen alternativo en el que se encuentra la laguna.

Area de Estudio: Llanura pampeana

La llanura pampeana (35° 32' – 36° 48' S; 57° 47' – 58° 07' W) se localiza en la región central-este de Argentina (Fig. 5), se trata de una región con una topografía plana interrumpida por dos cordones de sierras, Tandilia y Ventania, que presenta un clima templado húmedo. Desde el Noreste al Suroeste la precipitación media anual disminuye de 1000 a 400mm, mientras que la temperatura media anual varía desde 20°C a 14°C desde el Norte al Sur. En su historia geomorfológica la llanura pampeana ha atravesado períodos climáticos secos y húmedos, lo que ha dado lugar a la formación de sistemas de humedales y lagunas someras³³. El origen de las lagunas es variado, gran parte presenta su origen en procesos de deflación eólica durante el cuaternario, pero un número importante de estas han sido remodeladas por acción fluvial^{34,35}. Las lagunas pampeanas han sido caracterizadas por Quirós & Drago (1999)³⁶ como cuerpos de agua poco profundos, con tiempo de permanencia del agua y salinidad variables, naturalmente eutróficos y que no estratifican térmicamente excepto por períodos cortos de tiempo. Si bien es difícil cuantificar la cantidad exacta de lagunas en la Llanura Pampeana, se estima que hay aproximadamente 146.000 de entre 0,05 y 10ha, 200.000 de entre 0,01 y 0,05ha y 13.824 mayores a 10ha³⁴. La llanura pampeana es, además, la zona más productiva de Argentina: desde

mediados del siglo XX se han producido profundos cambios en la región como consecuencia de las actividades antrópicas, asociadas principalmente a la expansión de la agricultura, pero también a la ganadería y urbanización, lo que ha provocado un fuerte cambio en el uso de la tierra y a una fragmentación del paisaje^{33,37}.

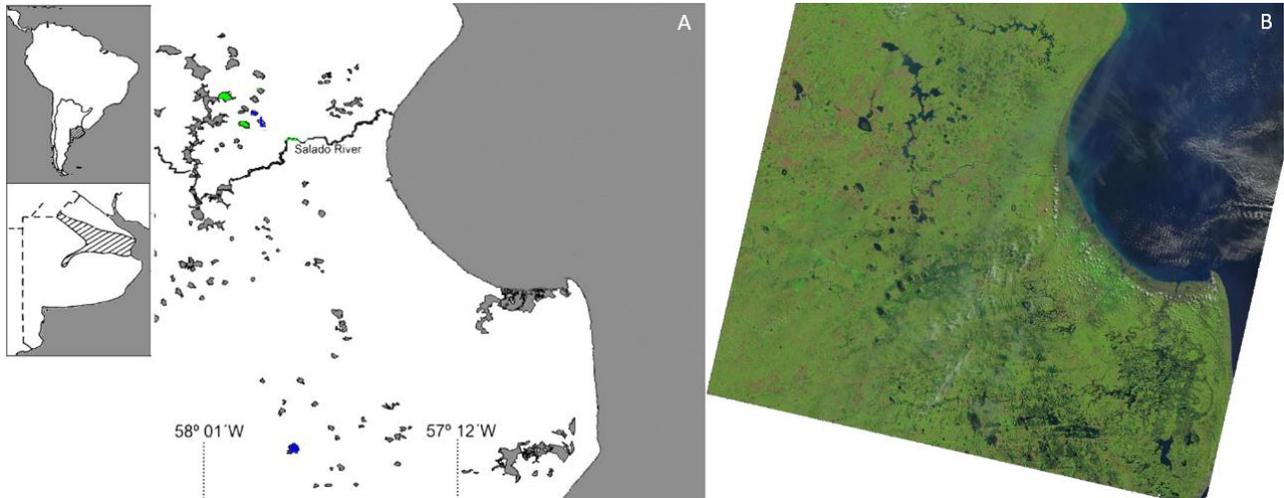


Figura 5. A) Área de estudio, B) Imagen satelital Landsat 8 OLI de la región estudiada de la Llanura Pampeana.

Las lagunas pampeanas se han clasificado en dos tipos de regímenes: lagunas claras vegetadas, dominadas por macrófitas sumergidas, baja abundancia de fitoplancton y con agua relativamente transparente; y lagunas turbias fitoplanctónicas, dominadas por fitoplancton, sin macrófitas sumergidas y con aguas turbias^{33,38}. Además, en esta región se ha descrito la existencia de un tercer régimen no incluido en el modelo de Scheffer et al. (1993), constituido por lagunas extremadamente turbias pero cuya turbidez se encuentra dada por una alta concentración de material inorgánico en suspensión, denominado turbias inorgánicas³⁸. En las últimas décadas se han realizado estudios en las lagunas de la región que han reportado cambios en el régimen alternativo de algunas lagunas pampeanas³⁹⁻⁴¹. También se han evaluado cambios en los grupos morfofuncionales de fitoplancton⁴² y de bacterias⁴¹ dependiendo del régimen alternativo en el que se encuentran, el efecto potencial de los regímenes alternativos sobre la vegetación emergente⁴³ y el efecto del ingreso de herbicidas sobre un régimen claro o turbio⁴⁴.

Las lagunas pampeanas solían existir como un mosaico de lagunas claras vegetadas y turbias fitoplanctónicas, con cambios bidireccionales en sus regímenes debido a cambios hidrológicos y a eventos climáticos³⁷. Sin embargo, la intensificación de la agricultura, el uso de fertilizantes y la erosión durante las últimas tres décadas han llevado a un aumento consistente de nutrientes, herbicidas y de carga de sedimentos en estas lagunas^{37,45,37,45-47}, lo que en consecuencia ha llevado a un cambio generalizado de regímenes claros a turbios, observado a escala regional^{40,48}. En este sentido, Sánchez et al. (2021)⁴⁹ detectó que aquellos cuerpos de agua

cercanos a regiones con mayor uso de la tierra eran más eutróficos. Actualmente, la presencia de macrófitas sumergidas, el nitrógeno total y la agricultura son los factores más influyentes sobre el régimen en el que se encuentran las lagunas⁵⁰. En comparación con otras lagunas del mundo, las lagunas pampeanas presentan mayores concentraciones de fósforo total, nitrógeno total y Chl_a y menor transparencia, lo que las ubica en un extremo hipertrófico del continuo de estados tróficos posibles⁵¹.

Respecto a la dinámica de CO₂ y CH₄ en la llanura pampeana, la mayoría de los estudios en este tema se han enfocado en el compartimento terrestre contándose con unos pocos trabajos enfocados en el compartimento acuático. Entre los estudios realizados en el compartimento terrestre, se ha analizado el impacto del ganado vacuno en las emisiones de CH₄⁵², las emisiones de CH₄ en la interfaz sedimento-atmósfera de sitios con diferentes usos de la tierra⁵³ y la dinámica de CH₄ en suelos colonizados por diferentes vegetaciones⁵⁴. En cuanto a los sistemas de agua continentales, se ha estudiado la dinámica de CO₂ en arroyos pampeanos bajo distintas condiciones de calidad de agua y uso de la tierra⁵⁵, se ha explorado la variación en las emisiones de CH₄ según forzantes climáticos en una laguna pampeana⁵⁶ y se ha explorado la dinámica de CO₂ y CH₄ en lagunas pampeanas de Uruguay⁵⁷. Teniendo en cuenta la enorme cantidad de lagunas presentes en la llanura pampeana, su gran productividad, su estado trófico en aumento y sus diversas características en términos de estado trófico y de régimen alternativo, resulta fundamental explorar las emisiones de GEI por estos sistemas, ya que deben ser considerados en un balance de carbono regional.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis de doctorado es evaluar la dinámica de CO_2 y CH_4 en lagunas de la llanura pampeana con distinto régimen de equilibrio y su rol en el balance regional de carbono.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar estacionalmente la dinámica de GEI en lagunas de la llanura pampeana que se encuentran en distinto régimen de equilibrio y determinar su rol en el balance de carbono
2. Investigar la influencia de procesos biológicos y factores físicos en la modulación de la presión parcial de CH_4 disuelto en aguas subsuperficiales de ambos regímenes
3. Estudiar la producción óxica de CH_4 y su relación con los grupos fitoplanctónicos dominantes en lagunas con distinto régimen de equilibrio
4. Explorar la producción de CH_4 por grupos fitoplanctónicos aislados de lagunas con distinto régimen de equilibrio

DINÁMICA ESTACIONAL DE GEI EN LAGUNAS DE LA LLANURA PAMPEANA BAJO DISTINTO RÉGIMEN DE EQUILIBRIO Y SU ROL EN EL BALANCE DE CARBONO

Introducción

Las lagunas desempeñan un rol fundamental en el procesamiento de nutrientes en general⁵⁸ y en el ciclo del carbono en particular⁷, lo que las convierte en emisoras clave de gases de efecto invernadero (GEI) al medio ambiente^{8,59}. Algunas de las características que explican su importancia son su alta relación superficie: volumen, el ingreso de grandes cantidades de material alóctono proveniente de las cuencas circundantes y la frecuente e intensa mezcla de la columna de agua, que conlleva a una fuerte influencia de los sedimentos en los procesos de la columna de agua. Por otra parte, algunas lagunas pueden alternar entre dos regímenes alternativos: un régimen de aguas claras, dominado por macrófitas sumergidas y con baja turbidez; y un régimen de aguas turbias, dominado por fitoplancton y con mayor turbidez²⁸. Estos dos regímenes contrastantes presentan condiciones ambientales muy diferentes que pueden afectar múltiples procesos ecológicos y biogeoquímicos de forma diferencial, incluida la dinámica de GEI. La medida en que las emisiones de CO₂ y CH₄ pueden verse afectadas por estos regímenes depende de la interacción de varios procesos y factores relacionados con el ciclo de la materia orgánica, como la producción primaria y las tasas de respiración, el almacenamiento de carbono, el metabolismo aeróbico y anaeróbico, y el efecto físico de las macrófitas sumergidas sobre la mezcla de la columna de agua⁶⁰. El resultado neto de todas estas interacciones se ha explorado en algunos casos para el CO₂, sin embargo son pocos los estudios que han evaluado el impacto de estas sobre el CH₄⁶⁰. Por lo tanto, la influencia que estos regímenes podrían tener en el balance de gas C en lagunas someras es difícil de predecir con la información existente.

La dinámica de CO₂ en una laguna es el resultado, en parte, del balance neto entre la producción primaria y la respiración del ecosistema: durante el día la producción primaria es dominante y por ende hay menos CO₂ disuelto, mientras que por la noche domina la respiración lo que produce el patrón contrario. En este sentido, varios autores han reportado una relación negativa entre el flujo difusivo diurno de CO₂ y la biomasa de los productores primarios^{27,61-63}. Sin embargo, el tipo de productor primario dominante, es decir, si son macrófitas sumergidas o fitoplancton, puede resultar en dinámicas diferentes de CO₂. En este sentido, algunos estudios

han mostrado que lagunas dominadas por macrófitas sumergidas presentaron una mayor productividad total en comparación con lagunas turbias dominadas por fitoplancton^{40,64}, lo que podría conducir a un flujo difusivo de CO₂ menor en lagunas claras en comparación con lagunas turbias. Sin embargo, en otros casos no se encontraron diferencias en la productividad neta entre regímenes alternativos, lo que implicaría que los flujos difusivos de CO₂ podrían ser similares entre regímenes⁶⁵. Con respecto a la dinámica del CH₄, también se han reportado resultados contrastantes sobre el efecto de los regímenes alternativos. Por ejemplo, hay trabajos que muestran que las macrófitas sumergidas disminuyen el flujo difusivo⁶⁶ y ebullitivo⁶⁷ de CH₄, pero hay otros estudios que indican la existencia de una correlación positiva entre la biomasa de macrófitas sumergidas y el flujo difusivo de CH₄ en varios sistemas someros^{62,68}. De manera similar, se ha reportado que no hay un efecto significativo de la biomasa de fitoplancton en las emisiones difusivas de CH₄^{62,66} mientras que otros estudios han indicado correlaciones positivas entre las emisiones difusivas de CH₄ y la concentración de Chla^{61,68}.

La producción de CH₄ (metanogénesis) en cuerpos de agua dulce ocurre principalmente en los sedimentos por arqueas metanogénicas y bajo condiciones de anoxia. Distintos factores influyen sobre este proceso, tales como las condiciones redox en los sedimentos, la tasa de ingreso de materia orgánica y la temperatura en los sedimentos⁶⁹⁻⁷². Si bien la metanogénesis *per se* depende de la temperatura, las distintas vías de emisión de CH₄ dependerán de varios factores bióticos y abióticos que dependerán o no de la temperatura. Por ejemplo, se ha reportado que la ebullición de CH₄ depende, además de la temperatura, de la profundidad de la columna de agua, de la presión hidrostática y de la turbulencia en los sedimentos^{5,73-75}. Asimismo, se ha reportado que el flujo difusivo de CH₄ dependerá, además de la temperatura, de la tasa de oxidación de CH₄ en la columna de agua^{76,77} – a mayor oxidación menor difusión –, de la turbulencia en la misma⁷⁸, de la superficie del lago, la profundidad de la columna de agua, la pendiente de la cuenca y también del estado trófico del cuerpo de agua⁷⁹. En relación a las emisiones difusivas de CO₂, la biomasa de productores primarios es un gran factor regulatorio que, a su vez, se encuentra influenciado por la estacionalidad y, por ende, por la temperatura. Además, se considera a la tasa de ingreso de materia orgánica como un gran regulador positivo de los flujos difusivos de CO₂^{80,81}.

Por otra parte, las macrófitas emergentes juegan un papel muy importante en las emisiones de GEI^{5,82,83}. Proporcionan parte del carbono necesario para producir CH₄ en los sedimentos, y además transportan CH₄ de los sedimentos a la atmósfera y O₂ de la atmósfera a los sedimentos - lo que les permite sobrevivir en sedimentos anóxicos⁸⁴. La presencia de macrófitas emergentes puede influir significativamente en el balance de C de las lagunas y el régimen en el que se encuentra la laguna pueden influir sobre la cobertura relativa de macrófitas emergentes, ya que lagunas con aguas más claras favorecen la cobertura de macrófitas emergentes

y viceversa⁸⁵. Las emisiones de GEI mediadas por macrófitas emergentes depende de la temperatura y la profundidad de la columna de agua, del estadio de crecimiento de las plantas, la intensidad de la luz que incide en las macrófitas y la densidad de cobertura de vegetación^{83,86}. Esta interacción entre regímenes alternativos y macrófitas emergentes en lagunas agrega otro plano de complejidad que debe ser tenido en cuenta a la hora de estudiar el balance de gas C.

Como se ha mencionado en la sección Área de Estudio, la Llanura Pampeana es una región con una topografía plana que presenta aproximadamente cuatrocientas mil lagunas³⁴. Hasta hace unas décadas, estos cuerpos de agua existían como un mosaico de regímenes claros y turbios, con cambios de estado bidireccionales debido a eventos hidrológicos o climáticos³⁷. No obstante, la intensificación de la agricultura durante las últimas tres décadas, de la mano de un aumento en el uso de fertilizantes y de la erosión, han incrementado la carga de nutrientes y sedimentos en estas lagunas^{37,47}, lo que ha incrementado el pasaje de lagunas desde regímenes claros a turbios^{40,48}. Sin embargo, nuestro conocimiento actual no nos permite predecir el efecto que el cambio de lagunas claras a turbias podría tener sobre el balance regional de C.

Determinar el balance de C de lagunas requiere evaluar múltiples aspectos de la dinámica de los GEI, incluyendo las concentraciones de los GEI disueltos en el agua, el flujo difusivo entre la superficie del agua y la atmósfera, los flujos mediados por macrófitas emergentes y el flujo ebullitivo de CH₄. El objetivo del presente capítulo es estudiar la dinámica estacional de CO₂ y CH₄ en lagunas de la llanura pampeana con regímenes alternativos. Como objetivos específicos se plantea (i) analizar estacionalmente la dinámica de GEI (CO₂ y CH₄) en lagunas de la llanura pampeana que se encuentran en distintos regímenes de equilibrio, (ii) estimar el balance anual de gas C (fuente o sumidero) en lagunas con regímenes alternativos y (iii) explorar posibles predictores para cada vía de emisión de CO₂ y CH₄. Para lograr estos objetivos, estudiamos estacionalmente las concentraciones de CO₂ y CH₄ en aguas superficiales, y las tres vías de emisión previamente mencionadas, en dos lagunas claras vegetadas y dos lagunas turbias fitoplanctónicas de la Llanura Pampeana, Argentina.

Métodos

El presente capítulo se llevó adelante parte en Argentina, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y parte en la Université du Québec à Montréal. Este capítulo se encuentra publicado: **Baliña, S., Sánchez, M. L., Izaguirre, I., & del Giorgio, P. A. (2022)**. Shallow lakes under alternative states differ in the dominant greenhouse gas emission pathways. *Limnology and Oceanography*, 68(1), 1-13. <https://doi.org/10.1002/lno.12243>.

1. Diseño de muestreo

Se seleccionaron cuatro lagunas de la Llanura pampeana, dos claras vegetadas y dos turbias fitoplanctónicas (Fig. 1.1). Estas lagunas se muestrearon estacionalmente en las siguientes fechas: 11 al 25 de junio de 2018 (invierno), 16 al 23 de octubre de 2019 (primavera), 3 al 7 de febrero de 2019 (verano) y 22 al 30 de abril de 2019 (otoño). Cada laguna presentó áreas cubiertas por macrófitas emergentes (ME) y áreas de aguas abiertas (AA). Para incluir esta heterogeneidad natural, se tomaron muestras en sitios ME y en sitios AA dentro de cada laguna. A su vez, para dar cuenta de toda la columna de agua, en cada sitio se tomaron muestras subsuperficiales (en los primeros 10 cm de la columna de agua) y muestras cercanas al fondo (dentro de los 30 cm cercanos a los sedimentos, usando una botella horizontal Niskin). Por lo tanto, en cada laguna y en cada temporada, se muestrearon 2 sitios (ME y AA) incluyendo en cada sitio muestras de superficie y fondo, y se obtuvieron de esta manera 4 muestras por estación y por laguna. Por lo tanto, en total se obtuvo un total de 16 muestras para analizar las concentraciones de gases disueltos y para otros parámetros químicos y biológicos de cada laguna.

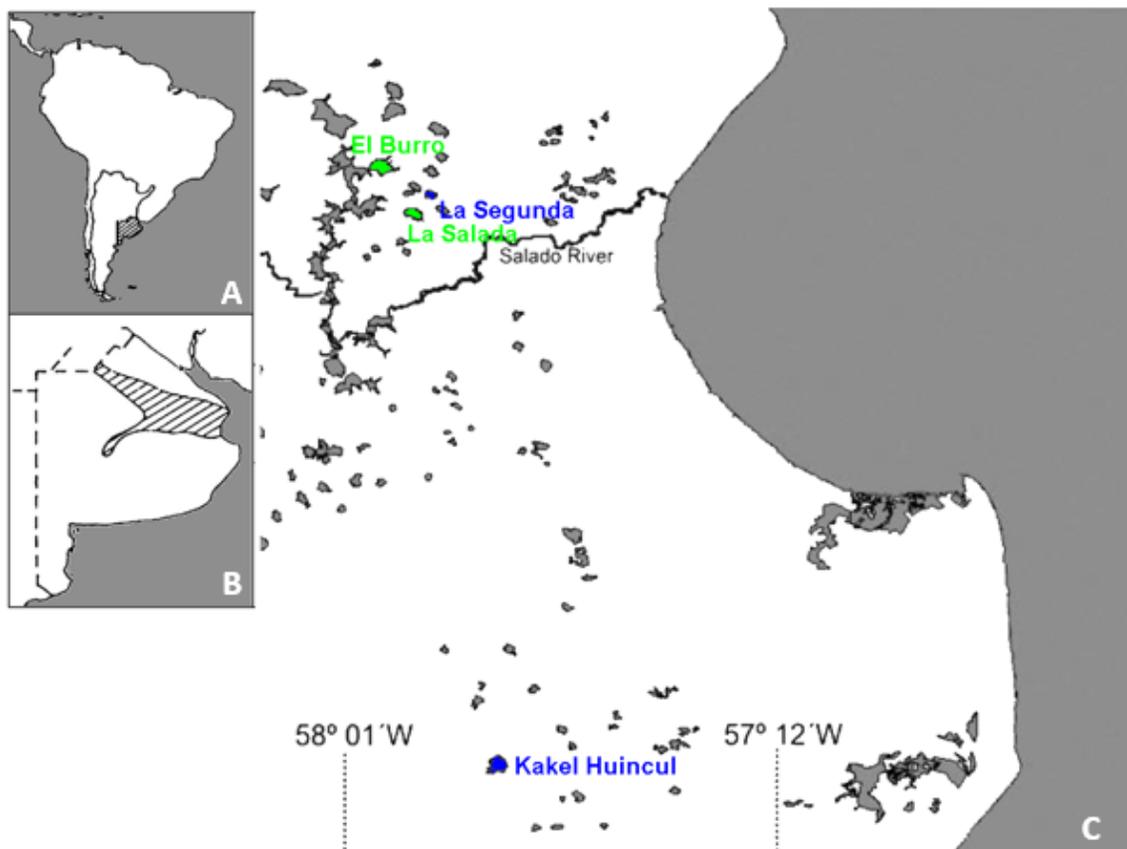


Figura 1.1. Area de estudio. A) Argentina, B) Buenos Aires, C) región de estudio. En azul se encuentran marcadas las lagunas claras vegetadas (La Segunda y Kakel Huincul) y en verde se encuentran marcadas las lagunas turbias fitoplanctónicas (El Burro y La Salada).

2. Caracterización limnológica

En cada sitio de muestreo se midieron las siguientes variables limnológicas: pH y conductividad (sensor portátil HORIBA D 54-E), y perfiles verticales de temperatura y oxígeno disuelto (sensor portátil HACH HQ30d). Además, se midió la temperatura del aire, la humedad, la presión atmosférica y la velocidad del viento (Kestrel, 4000 Pocket Weather Tracker, Nielsen-Kellerman). En cada sitio, se tomaron muestras de agua sub-superficial y cerca del fondo para determinar la turbidez, el fósforo y el nitrógeno totales (FT y NT, respectivamente), los sólidos totales en suspensión (STS), el carbono orgánico disuelto y el carbono inorgánico disuelto (COD y CID, respectivamente), la materia orgánica disuelta coloreada (MODc), la clorofila a (Chla), la abundancia y composición de la comunidad fitoplanctónica y la abundancia relativa de arqueas y bacterias.

La turbidez se midió utilizando un turbidímetro HACH 2100P. El perfil de irradiancia se obtuvo utilizando un sensor cuántico esférico sumergible Li-Cor PAR, con el cual se midió la irradiancia a distintas profundidades. El coeficiente de atenuación de la luz (K_{dPAR}) se calculó haciendo una regresión lineal entre el logaritmo natural del perfil de irradiancia y la profundidad, la pendiente de esa relación es el K_{dPAR} . Para la determinación de FT y NT, las muestras de agua fueron digeridas utilizando ácido bórico y persulfato de amonio siguiendo la metodología descrita en Valderrama (1981)⁸⁷. Posteriormente fueron analizadas con un espectrofotómetro HACH DR2800, utilizando el método de ácido ascórbico para la determinación de FT y de reducción de cadmio para NT, siguiendo métodos estándar²²⁷. Los STS se determinaron filtrando un volumen conocido de agua a través de filtros Whatman GF/F precombustionados y pesados, luego se calculó la concentración de STS como la diferencia de peso del filtro seco antes y después de la filtración²²⁸. Las concentraciones de COD y CID, junto con la materia orgánica disuelta coloreada (MODc), se midieron a partir de muestras de agua filtradas a través de un filtro de jeringa PES de tamaño de poro de 0,45 μm (Sarstedt 83.1826) en viales de vidrio de 40 ml (I-CHEM S136-0040/ Fisher 05719- 98) y sellados con septos de PTFE/goma herméticos a gases (Chromatographic Specialties C8850522M). Las concentraciones de COD y CID se analizaron utilizando un analizador de carbono total Aurora 1030 (OI Analytical), después de la acidificación con ácido fosfórico para convertir CID en CO_2 y la digestión de COD en CO_2 con persulfato de sodio. Para determinar el MODc, se midió la absorbancia de las muestras de agua a 440 nm y 690 nm usando un espectrofotómetro Ultrospec 3100 Pro (Biochrom) siguiendo a Cuthbert y del Giorgio (1992)⁸⁸. La absorbancia medida fue corregida por turbidez y convertida a unidades de m^{-1} usando la ecuación 1.1.

$$\text{MODc (m}^{-1}\text{)} = (\text{A}_{440\text{nm}} - \text{A}_{690\text{nm}}) * 2,303 * 50 \quad \text{ec. 1.1}$$

donde 2,303 corresponde a la constante Lambert-Beer y 50 está relacionado a la absorbancia de la cubeta de 2 cm.

Para estimar la Chla, se filtró un volumen conocido de agua a través de filtros Whatman GF/F y se almacenó a -20 °C. El pigmento se extrajo con etanol caliente (70°C) y se midió espectrofotométricamente a 665 y 750 nm, siguiendo las ecuaciones de Lorenzen (1967)⁸⁹. Las muestras para las determinaciones cuantitativas de fitoplancton se fijaron con solución de Lugol acidificada al 1% y se almacenaron a 4 °C hasta su recuento en un microscopio invertido Olympus CKX41 utilizando la técnica de Utermöhl (1958)⁹⁰. Los recuentos se realizaron utilizando bibliografía especializada²³²⁻²³⁴ y hasta un error de recuento de menos del 20%²²⁹.

3. Análisis moleculares

Para explorar las comunidades de arqueas y de bacterias, se tomaron muestras de ADN ambiental de las lagunas en todas las estaciones. El DNA fue extraído de cada muestra y secuenciado utilizando primers específicos para arqueas y para bacterias. La extracción de ADN se realizó siguiendo a Zenoff *et al.* 2006¹⁹⁸. Agua de la laguna y de los mesocosmos fue filtrada mediante filtros de policarbonato de 0,2µm (Millipore) y los filtros fueron preservados a -80°C hasta la extracción de ADN. Para la extracción se utilizó un protocolo de cloroformo: etanol: se agregaron 0,75ml de buffer de lisis CTAB a medio filtro y se lo incubó por 30' a 60°C. Luego, se agregaron 0,7ml de isoamil: cloroformo y se lo mezcló por inversión, seguido de un paso de centrifugación de 10' a 14.000 rpm. La fase acuosa fue volcada a otro eppendorf, y el paso de isoamil: cloroformo se repitió dos veces más. A la fase acuosa final obtenida se le agregó el mismo volumen de isopropanol, seguido de un paso de incubación de 1 hora a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas por 30' a 14.000 rpm. El pellet obtenido se lavó con Etanol frío al 80%. Luego se dejó secar, cuidando de asegurar que todo el etanol haya sido evaporado del pellet. Luego el mismo fue resuspendido en 20µl de agua miliq autoclavada. La concentración de ADN (ng µl⁻¹) en cada muestra extraída fue medida mediante un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Todas las muestras extraídas fueron llevadas a la *plateforme de génomique* CERMO-FC, de la Université du Québec à Montréal, para secuenciación del 16S rRNA de la región V4 usando los primers A340F (5'-CCC TAC GGG GYG CAS CAG-3') y 915R (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') para arquea, y los primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') para bacteria. Se utilizó una plataforma MiSeq (PE250, Illumina, San Diego, CA, USA). Las secuencias obtenidas fueron procesadas mediante el paquete DADA2 en el entorno de R⁹¹. El procesamiento se realizó para bacterias y arqueas por separado, y en cada caso involucró los siguientes pasos: 1) se generaron e inspeccionaron gráficos de calidad de secuencias para cada una de las muestras; 2) Las

secuencias crudas se recortaron y filtraron usando la función `filterAndTrim` con los siguientes parámetros: `truncQ=2`, `rm.phix = TRUE`, `trimleft` = correspondiente al tamaño de los primers en cada caso, `trunLen` = nada para arqueas y para bacterias 240pb y 170pb para el forward y reverse, respectivamente. Para el caso de arqueas no se recortaron las mismas porque los amplicones eran largos y si se recortaban las lecturas de la secuenciación no llegaban a solapar, es decir, no se podía construir un contig; 3) se generaron modelos de error de secuenciación para las muestras, para forward y reverse por separado, usando la función `learnErrors`; 4) Se determinaron grupos de secuencias únicas, para forward y reverse por separado, considerando el modelo de error generado en el paso anterior. Se generó un data-frame que contiene la abundancia de cada secuencia única detectada; 5) se generaron amplicones por medio de la unión de las secuencias forward y reverse, con un solapamiento mínimo de 12 nucleótidos y un máximo de cero mismatch; 6) se construyeron las tablas de ASVs con las secuencias y abundancias para cada muestra; 7) se detectaron y removieron quimeras, teniendo en cuenta que un amplicón es considerado quimera si puede ser reconstruido con las partes forward y reverse de amplicones que son por lo menos 1,5 veces más abundantes; 8) se realizó la asignación taxonómica para cada ASV detectado, usando las funciones `assignTaxonomy` y `addSpecies` del paquete DADA2. El primer caso llega a nivel de género mientras que el segundo llega a nivel de especie. En todos los casos se utilizó la versión 132 de la base de datos de SILVA.

La tabla de ASVs obtenida fue luego filtrada por la ocurrencia de asignaciones no deseadas: cloroplastos, mitocondrias, eucariotas, arqueas en el dataset de bacterias y bacterias en el dataset de arqueas. Por último, se retuvieron sólo los ASVs que poseían más de 10 lecturas y que se encontraban en al menos dos muestras: el conjunto de ASVs final para bacterias fue de 3434 y para arqueas fue de 1517. A partir de estos datos se analizaron curvas de rarefacción para observar que todas las muestras lleguen a un estado asintótico, lo que indica que la profundidad de secuenciación fue suficiente para representar la diversidad y riqueza de las bacterias y/o arqueas. Para el caso de arqueas hubo tres muestras que no llegaron a una meseta: KH Sitio1 primavera, KH Sitio 2 Otoño y BU Sitio 2 Otoño, por lo que debieron ser quitadas para el resto de los análisis (Fig. S1.1). Para el caso de las bacterias, las muestras BU Sitio 1 Primavera y BU Sitio 1 Verano no llegaron a una meseta y también fueron retiradas de la base de datos para los pasos siguientes (Fig. S1.2). Una vez realizado este paso, las muestras se normalizaron al número mínimo de lecturas de una muestra (C_{min}) usando el flujo de trabajo SRS, el cual preserva las abundancias relativas de ASV después de la normalización lo más similar posible a la de los conjuntos de datos originales. Los análisis descriptivos sobre la tabla de ASV se realizaron empleando los paquetes `Phyloseq` y `Biostrings` en R88,89.

4. Dinámica de gases de efecto invernadero (GEI)

La dinámica de GEI fue estudiada estacionalmente en cada sitio de muestreo analizando las presiones parciales de CO_2 y CH_4 en el cuerpo de agua ($p\text{CO}_2$ y $p\text{CH}_4$) y su señal isotópica ($\delta^{13}\text{C}$), el flujo difusivo en la interfaz agua: aire, el flujo ebullitivo de CH_4 y los flujos mediados por macrófitas emergentes.

5. Presiones parciales de CO_2 y CH_4 en el agua y su señal isotópica

Las $p\text{CO}_2$ y $p\text{CH}_4$ en agua se determinaron utilizando la técnica de *headspace*⁹² (Fig. 1.2). Esta técnica implica llenar dos jeringas de 60 ml con 30 ml de agua y 30 ml de aire atmosférico, creando una relación 1:1 de agua: aire. Las jeringas se agitan vigorosamente durante 2 minutos para permitir el equilibrio de los gases entre el agua y el aire. Luego de alcanzado el equilibrio, los 30 ml de aire se inyectan en viales pre-evacuados de vidrio equipados con tapones de goma que no permiten el intercambio de gases con el ambiente (Exetainer, Labco), y se almacenan para su posterior análisis. También se tomaron muestras del aire atmosférico, que fueron inyectadas de la misma manera en viales pre-evacuados de vidrio (Exetainer, Labco). Se tomaron 16 muestras de agua por laguna: dos por sitio (ME o AA), incluyendo muestras de superficie y de fondo, en cada una de las cuatro estaciones del año. A su vez, cada muestra tuvo duplicados metodológicos (dos jeringas por muestra).

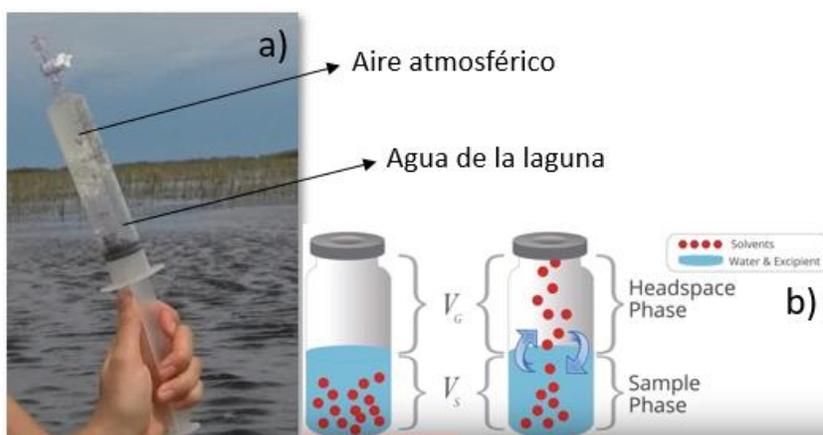


Figura 1.2. Técnica de *headspace*. a) Jeringa de 60ml utilizada en campo, la misma se llena con 30ml de aire atmosférico y 30ml de agua de la laguna. Luego se agita por 2 minutos para asegurar el intercambio de gases entre el aire y el agua b) esquema del intercambio de gases entre la fase acuosa y la fase headspace (aire) – tomada de *vuvanalytics.com*.

Para determinar la concentración y la señal isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de CO_2 y CH_4 en cada muestra de *headspace*, se utilizó un espectrómetro de masa (CRDS, Picarro G2201-i), con la ayuda de un muestreador automático (SAM, Open Autosampler)⁹³ (Figura 1.3).



Figura 1.3. Medición de las concentraciones de GEI de las muestras obtenidas a campo, utilizando un muestreador automático y un espectrofotómetro de masa.

La concentración original de CO₂ y CH₄ en el agua de la laguna se obtuvo siguiendo la ecuación 1.2, mientras que la señal isotópica original de cada GEI se obtuvo siguiendo la ecuación 1.3. Los datos isotópicos se informan en la notación estándar delta (δ) expresada en por mil (‰) en relación con el estándar Vienna Pee Dee Belemnite¹⁰. Cabe destacar que las muestras con menos de 250 ppmv de $p\text{CO}_2$ se corrigieron para el equilibrio químico del sistema de carbonato siguiendo a Koschorreck et al. (2021)⁹⁴. Los datos en ppmv se convirtieron a concentración (μM) multiplicando la presión parcial de los gases (ppmv) por la constante de Henry (solubilidad, dependiente de la temperatura)⁹⁴.

$$Pp \text{ original de GEI } (\mu\text{atm}) = (Hp\text{GEI} - Ap\text{GEI}) * W:A / (V_m) + (Hp\text{GEI} * AkH) / M_kH \quad \text{ec. 1.2}$$

Donde $Hp\text{GEI}$ es la presión parcial del gas luego de aplicar la técnica de *headspace*, es decir, lo medido por el espectrofotómetro de masa (μatm), $Ap\text{GEI}$ es la presión parcial del gas en el aire atmosférico (μatm), $W:A$ es el ratio agua:aire en la jeringa (sin unidad), V_m es el volumen molar a la temperatura de análisis (L/mol), AkH es la constante de Henry (solubilidad del gas) a la temperatura a la que se encuentra el agua luego de agitar mediante la técnica de *headspace* (M/atm) y M_kH es la solubilidad a la temperatura a la que se encontraba el agua de la laguna, en el campo (M/atm).

$$^{13}\text{C original de GEI } (\text{‰}) = (i\text{GEI después} - \alpha \text{ Fracc} * i\text{GEI antes}) / (1 - \alpha \text{ Fracc}) + \text{Fracc} \quad \text{ec. 1.3}$$

Donde $i_{GEI \text{ después}}$ es la señal isotópica del GEI luego de aplicar la técnica de *headspace* (‰), α Fracc es el parámetro de fraccionamiento del GEI en la fase gaseosa, $i_{GEI \text{ antes}}$ es la señal isotópica del gas en el aire atmosférico (‰) y Fracc es el fraccionamiento de los GEI entre la fase gaseosa y la fase acuosa.

6. Flujos difusivos y mediados por macrófitas emergentes

Los flujos difusivos en la interfaz agua-aire y los flujos de macrófitas emergentes se midieron usando una cámara flotante opaca (Volumen = 18,8 L, Área = 0,1 m²), equipada con un termómetro interno y con un dispositivo flotante (Figura 1.4a), siguiendo a Rasilo *et al.* (2015)⁹⁵. La cámara tiene una válvula principal que se cierra manualmente (válvula roja en la foto) y permite aislar una porción de la atmósfera. La cámara también cuenta con válvulas secundarias que permiten tomar muestras del aire aislado dentro de la cámara. Una vez cerrada la válvula roja, tomamos muestras del aire alojado en el interior de la cámara cada 5 minutos, durante 15 minutos (0, 5, 10 y 15 minutos). En cada medición se tomaron 2 muestras de 30 ml de aire del interior de la cámara y se inyectaron en viales de vidrio pre-evacuados de 30 ml equipados con tapones de goma (Exetainer, Labco) para su posterior análisis en un espectrómetro de masa (CRDS, Picarro G2201- i). En cada punto de tiempo también registramos la temperatura dentro de la cámara. Todas las mediciones se realizaron entre las 10:00 y las 16:00 h.

En el área de ME, además de medir el flujo de difusión aire-agua (Figura 1.4b), instalamos la cámara sobre un grupo de macrófitas emergentes (flujo sobre macrófitas, SM), con el fin de capturar el potencial flujo de GEI por parte de las plantas (Figura 1.4c). En las secciones subsiguientes nos referimos al flujo SM como flujo del hábitat con vegetación, ya que esta medición incluye tanto el flujo mediado por plantas como también el flujo difusivo del agua que rodea la vegetación. En este caso las mediciones de la cámara también duraron 15 minutos y se tomaron muestras cada 5 minutos. En promedio se realizaron 4 mediciones de flujos por laguna y por estación del año, incluyendo los flujos difusivos en los sitios ME y AA y el flujo mediado por macrófitas emergentes.

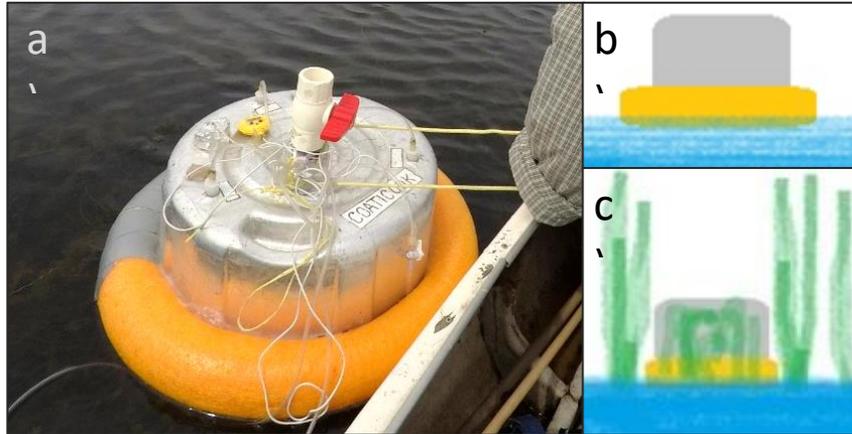


Figura 1.4. a) Cámara flotante opaca utilizada para medir el flujo difusivo en la interfaz agua:aire – tanto en el sitio con macrófitas emergentes (ME) como el sitio de aguas abiertas (AA) - y para medir el flujo mediado por las macrófitas emergentes – solo en el sitio ME. En la foto a) se muestra la medición de un flujo en la interfaz agua:aire b) esquema de cámara midiendo el flujo en la interfaz agua:aire c) esquema de cámara midiendo el flujo mediado por macrófitas emergentes + flujo difusivo en la interfaz agua:aire correspondiente al agua circundante a la vegetación.

Todos los flujos (f_{gas}) se calcularon en $mmol\ m^{-2}\ d^{-1}$ siguiendo la ecuación 1.4.

$$f_{gas} = \left(\frac{s \cdot V}{V_m \cdot A} \right) * t \quad ec. 1.4$$

Donde s es la tasa de acumulación de gas en la cámara ($ppm\ min^{-1}$); V es el volumen de la cámara (L); A es la superficie de la cámara (m^2); V_m es el volumen molar del gas a temperatura y presión ambiente ($L\ mmol^{-1}$); y t es un factor que convierte minutos a días ($1\ día = 1440\ min$)⁷⁵.

Para evitar una sobreestimación de los flujos de CH_4 difusivos y mediados por macrófitas emergentes, los datos obtenidos de cada medición fueron inspeccionados para evaluar la presencia de eventos de burbujas de CH_4 : en caso de un aumento abrupto en CH_4 durante los minutos de muestreo con la cámara o si las mediciones de la cámara no se ajustaban a una regresión lineal, se considera que un evento de ebullición de CH_4 ha ocurrido dentro de la cámara y esos datos deben ser descartados. Este no fue el caso para ninguna de las mediciones de flujos de CH_4 difusivos ni mediados por macrófitas emergentes.

Para obtener más información sobre el origen de los GEI liberados por las macrófitas emergentes, se estimó el flujo de CO_2 y CH_4 mediado por las plantas restándole al flujo de las cámaras SM, el flujo difusivo obtenido de las mediciones en la interfaz agua: aire en los sitios ME, siguiendo la ecuación 1.5.

Flujo mediado por macrófitas = Flujo SM – EM flux

ec. 1.5

7. Balances de masa isotópicos

Con el fin de estimar la señal isotópica del CO₂ y CH₄ intercambiado en la interfaz agua: aire y del emitido por las macrófitas emergentes, se realizó un balance de masa isotópico de las cámaras dispuestas sobre el agua y también de las cámaras SM, siguiendo la ecuación 1.6.

$$\delta_{final} * M_{final} = \delta_{inicial} * M_{inicial} + \delta_{agua} * M_{agua} \quad ec. 1.6$$

Donde $\delta_{inicial}$ y $M_{inicial}$ corresponden a la firma isotópica y a la masa de GEI, respectivamente, en el tiempo 0 de la cámara dispuesta sobre el agua; δ_{final} y M_{final} corresponden a la firma isotópica y la masa de GEI, respectivamente, en el tiempo final (15 minutos de dispuesta la cámara); δ_{agua} y M_{agua} corresponde a la firma isotópica de los GEI liberados por el agua (desconocido) y a la masa de GEI intercambiada por el agua (la diferencia entre M_{final} y $M_{inicial}$).

Las cámaras dispuestas sobre las macrófitas emergentes incluyen tanto la emisión de las macrófitas emergentes como la emisión difusiva del agua que rodea la vegetación emergente. Por lo tanto, para estimar la firma isotópica de los GEI emitidos por la vegetación, consideramos la firma isotópica del flujo difusivo derivado de la ecuación 6. al que se les agregó un componente asociado a los gases transportados directamente por las plantas (ecuación 1.7).

$$\delta_{final} * M_{final} = \delta_{inicial} * M_{inicial} + \delta_{agua} * M_{agua} + \delta_{planta} * M_{planta} \quad ec. 1.7$$

Donde $\delta_{inicial}$ y $M_{inicial}$ corresponden a la firma isotópica y la masa de GEI, respectivamente, en el tiempo 0 de la cámara dispuesta sobre las macrófitas emergentes; δ_{final} y M_{final} corresponden a la firma isotópica y la masa de GEI, respectivamente, al tiempo final (15 minutos de que se dispuso la cámara); $\delta_{agua} * M_{agua}$ corresponden a la firma isotópica y la masa de GEI de los GEI emitidos por el agua; y $\delta_{planta} * M_{planta}$ corresponden a la firma isotópica del GEI liberado por la planta (desconocido) y el gas GEI emitido por la planta (que se obtiene como la diferencia entre M_{final} y $M_{inicial}$ de la cámara dispuesta sobre las macrófitas emergentes, menos la masa de GEI liberada por el agua, M_{agua}).

8. Flujo ebulitivo

Los flujos de burbujas de CH₄ se midieron utilizando embudos flotantes invertidos (Fig. 1.5), colocados en la columna de agua de manera tal de que estén sumergidos pero no tocando el sedimento⁷⁵. Una vez ubicados los embudos en la columna de agua, se tomó una botella de vidrio de 2,5L que se llenó con agua de la laguna y se enroscó de manera invertida en el extremo superior del embudo. El dispositivo funciona de manera que

las eventuales burbujas de CH_4 producidas en los sedimentos suben por la columna de agua y son captadas por el embudo. Una vez en el embudo las burbujas desplazan el agua que se encuentra en la botella y son colectadas en ésta quedando acumuladas hasta su recolección.

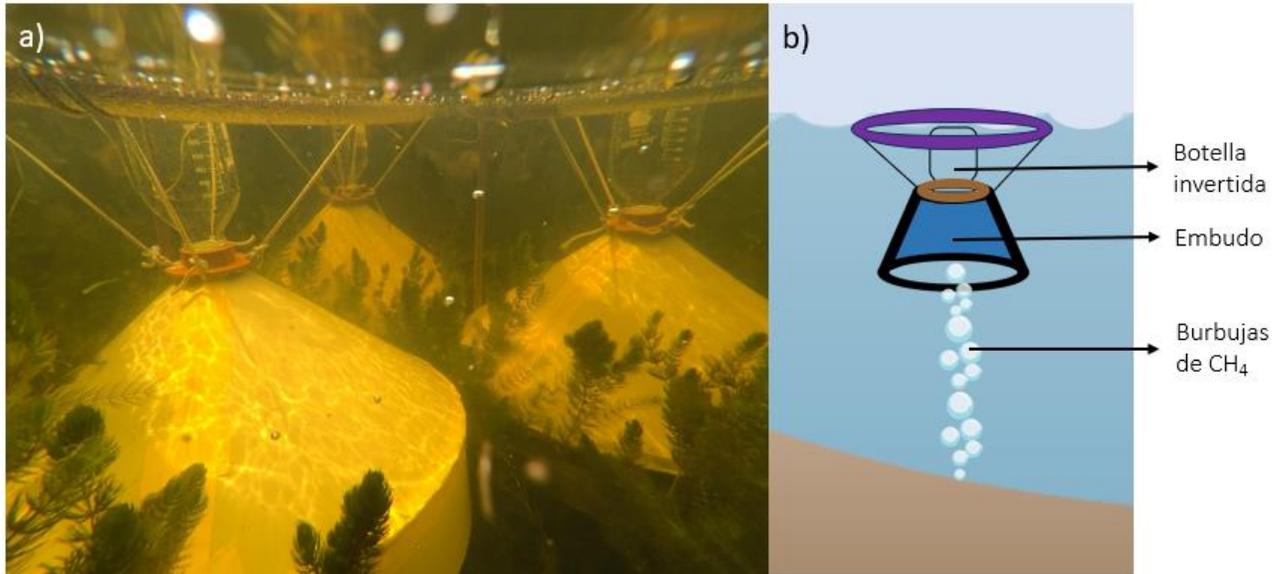


Figura 1.5. a) Embudos colocados en una laguna clara vegetada b) Esquema del funcionamiento de los embudos invertidos, donde las burbujas de metano (azul) formadas en los sedimentos suben por la columna de agua y se acumulan en la botella invertida (celeste).

En cada laguna y en cada estación del año se colocaron 6 embudos, 3 en el área ME y 3 en el área AA. La duración de la medición de la ebullición varió según la temporada, desde 48 h en verano hasta 7 días en invierno. A la hora de recolectar las muestras de los embudos, la botella invertida fue desenroscada delicadamente y antes de sacarla del agua, se le colocó una tapa a rosca con dos válvulas cerradas. Para recuperar el gas acumulado en la botella se utilizaron dos jeringas (Fig. 1.6): una jeringa que contenía agua de la laguna y la otra que estaba vacía. El agua contenida en una de las jeringas fue inyectada lentamente en la botella de manera tal de desplazar el gas acumulado hacia la segunda jeringa (vacía). El gas muestreado en esta segunda jeringa se inyectó en viales de vidrio pre-evacuados de 30 ml equipados con tapones de goma (Exetainer, Labco) para su posterior análisis en un espectrómetro de masa (CRDS, Picarro G2201-i) para determinar la concentración de CO_2 y CH_4 en las burbujas de gas colectadas. Además, se midió el volumen de agua restante en la botella para, por diferencia, calcular el volumen de gas acumulado durante la incubación.

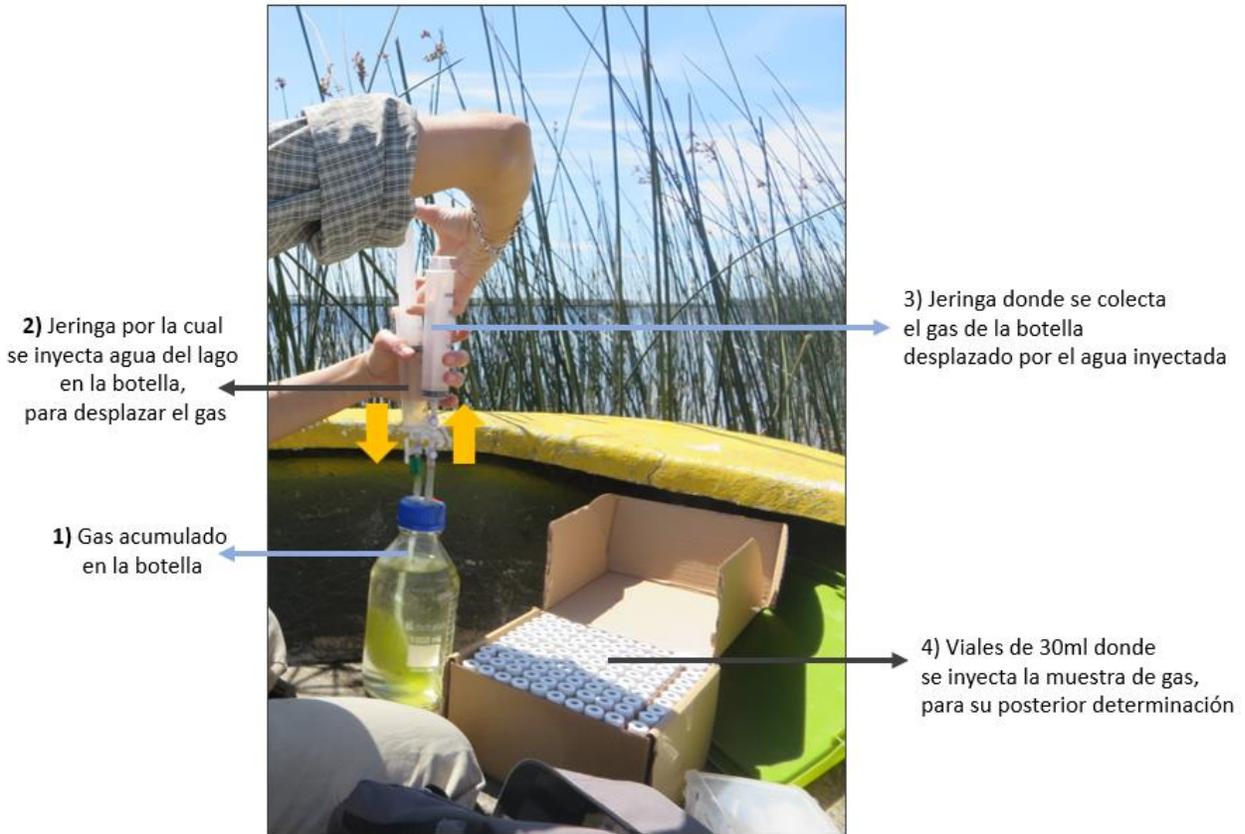


Figura 1.6. Procedimiento para muestrear el gas de las burbujas de CH₄ acumulado en la botella proveniente de cada embudo.

El flujo de ebullición se calculó en mmol m⁻² día⁻¹, siguiendo la ecuación 1.8.

$$\text{Flujo ebulitivo} = \left(\frac{\text{Gas}}{A \cdot T} \right) * 24 \quad \text{ec. 1.8}$$

Donde Gas es la concentración de CH₄ o CO₂ que se encuentra en el gas de burbujas (mmol) - que se obtiene como el volumen total de gas acumulado (L) * la concentración de CO₂ o CH₄ en el gas de burbujas (µatm) * el volumen molar de CO₂ o CH₄ (mol L⁻¹) y luego convertido de mol a mmol - A es el área del embudo (m²), T es el tiempo que se dejó el embudo (horas) y 24 corresponde a 24h.

Cabe aclarar que en invierno sólo se pudo colectar gas de un solo embudo de la laguna SG, pero este igualmente no fue suficiente para determinar la concentración de GEI. Usamos este valor de volumen de gas colectado y un promedio de pCO₂ y pCH₄ de primavera, verano y otoño en el gas de burbujas recolectado para estimar el flujo de ebullición de CO₂ y CH₄ de invierno en este embudo de SG. En el resto de los embudos de invierno en SG, y en todos los embudos de invierno en SA y BU, la acumulación de gas estuvo por debajo del umbral que permite tomar una muestra (aproximadamente 25 ml), y a todos estos embudos les hemos

asignado este umbral inferior de acumulación de gas. Para estimar el flujo de ebullición de CO_2 y CH_4 en invierno en estos embudos, también asignamos un promedio de $p\text{CO}_2$ y $p\text{CH}_4$ de primavera, verano y otoño.

Los embudos invertidos también fueron utilizados para capturar burbujas de CH_4 frescas - es decir, burbujas formadas en ese momento – con el fin de estimar la señal isotópica del CH_4 recién formado en los sedimentos. Esto se logró colocando un embudo invertido con su correspondiente botella de vidrio llena de agua y removiendo los sedimentos utilizando el remo del bote. Al remover los sedimentos varias burbujas de CH_4 fueron liberadas y las mismas fueron capturadas en la botella de vidrio (Fig. 1.7). Las muestras de las burbujas liberadas se colectaron y analizaron siguiendo la misma metodología descrita anteriormente para determinar la concentración y la firma isotópica de CO_2 y CH_4 .

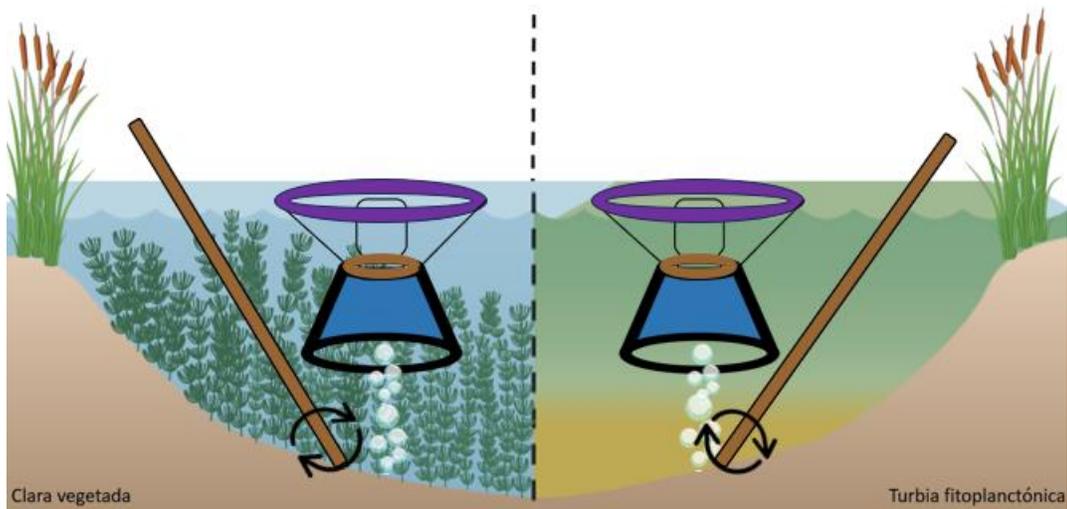


Figura 1.7. Esquema de la toma de burbujas de CH_4 frescas en las lagunas claras vegetadas y turbias fitoplanctónicas.

9. Patrones de saturación de O_2 y CO_2 con respecto a la atmósfera

Para estimar el metabolismo dominante en cada laguna y en cada estación del año, se evaluó la saturación de O_2 y de CO_2 de cada laguna respecto a la saturación de dichos gases en la atmósfera. Una laguna con un metabolismo netamente heterotrófico presentará subsaturación de O_2 , mientras que una laguna con un metabolismo netamente autotrófico presentará sobresaturación de O_2 . A su vez, dependiendo de la abundancia de organismos autotróficos o heterotróficos, la laguna podrá emitir o tomar CO_2 de la atmósfera. La combinación dará a lugar cuatro posibles escenarios: metabolismo heterotrófico y emisión de CO_2 , metabolismo heterotrófico y absorción de CO_2 ; metabolismo autotrófico y emisión de CO_2 y metabolismo autotrófico y absorción de CO_2 .

Para estimar la concentración de O₂ en la atmósfera en equilibrio con el agua, se utilizó la ecuación 1.9⁹⁶.

$$\ln C^* = A_1 + A_2 \left(\frac{100}{T} \right) + A_3 \ln \left(\frac{T}{100} \right) + A_4 \left(\frac{T}{100} \right) \quad \text{ec. 1.9}$$

Donde A1, A2, A3 y A4 corresponden a constantes de solubilidad (ml/L) teóricas (-173.43, 249.63, 143.35, -21.85, respectivamente)⁹⁶, la temperatura es la temperatura absoluta (K) y C* corresponde a la concentración de O₂ en equilibrio con una atmósfera de composición estándar saturada con vapor de agua a una presión total de 1atm (ml/L).

Una vez obtenida C*, se pueden calcular los moles de O₂ utilizando la ley de gases ideales (ecuación 1.10). Previamente es necesario convertir C* (ml/L) a volumen (L).

$$p * v = n * r * T \quad \text{ec. 1.10}$$

Donde p es la presión atmosférica (atm), v es el volumen (L), n son los moles (mol), r es la constante de los gases ideales (0,0821 L atm K⁻¹ mol⁻¹) y T es la temperatura (K). Luego este resultado se compara con los mg L⁻¹ de O₂ medidos con el oxímetro en el agua subsuperficial de la laguna.

Para estimar la concentración de CO₂ en la atmósfera en equilibrio con el agua, se utilizaron los datos de CO₂ (ppm) medidos en el aire atmosférico. Se estimó la concentración de CO₂ en el aire a partir de estos datos siguiendo la ecuación 1.11⁹⁷

$$CO_{2\text{ eq}} = CO_{2\text{ aire}} * K_h * P_{\text{atm}} \quad \text{ec. 1.11}$$

Donde CO_{2 eq} se obtiene en μmol L⁻¹, CO_{2 aire} es la presión parcial de CO₂ en la atmósfera (ppm), K_h es la solubilidad del CO₂ a la T° del agua (mol L⁻¹ atm⁻¹) y P_{atm} es la presión atmosférica (atm). Luego se compara esta concentración de CO₂ en equilibrio con la atmósfera con la concentración de CO₂ disuelta en el agua, que fue medida en campo.

10. Balance de gas C

Para evaluar el balance de gas C de cada laguna, incluimos el flujo difusivo de CO₂ y CH₄, el flujo ebullitivo de CH₄ y el flujo de CO₂ y CH₄ de los hábitats con vegetación emergente. Además, se calcularon todos estos flujos en equivalente de CO₂ (conversión de CH₄ a equivalentes en CO₂, de manera de poder unificar ambos GEI). Por otro lado, se calcularon las áreas de ME y AA en cada laguna y en cada estación del año mediante el análisis de imágenes satelitales. Se utilizaron imágenes Landsat 8 OLI (L8) que se obtuvieron del Servicio Geológico de EE. UU. (<https://earthexplorer.usgs.gov/>) cuya fecha fuera lo más cercana posible a la del muestreo de campo: 14/06/2018 para el invierno, 10/10/2018 para primavera, 09/03/2019 para verano y 21/05/2019 para otoño.

Cada imagen satelital fue procesada utilizando el programa libre ACOLITE⁹⁸, utilizando el algoritmo *Dark Spectrum Fitting* para la corrección atmosférica⁹⁹ y aplicando el algoritmo *Floating Algal Index for Turbid Waters* (FAIT)¹⁰⁰, para identificar las áreas cubiertas por macrófitas emergentes y de aguas abiertas. En simultáneo, se usó el programa libre QGIS para obtener un archivo vectorial correspondiente al polígono que cubría el área de cada laguna en cada imagen satelital en el cual se excluyeron los píxeles de la tierra circundante. Los productos obtenidos de ACOLITE (1 para cada lago y para cada estación = 16 escenas) luego fueron procesados usando el software QGIS (versión 3.10.9 con GRASS 7.8.3), donde se cortó el área de cada laguna usando el archivo vectorial creado previamente como máscara (Fig. 1.8). Se calculó el área perteneciente a las dos categorías (macrófitas y aguas abiertas) de cada una de estas escenas mediante la herramienta *r-report statistics for raster maps* (r-report, GRASS GIS 7.8.3). La clasificación de hábitats obtenida se validó mediante información obtenida en campo durante cada campaña de muestreo, es decir, áreas conocidas cubiertas por macrófitas emergentes o aguas abiertas, y mediante la observación de imágenes satelitales, donde es posible detectar áreas cubiertas por vegetación emergente.

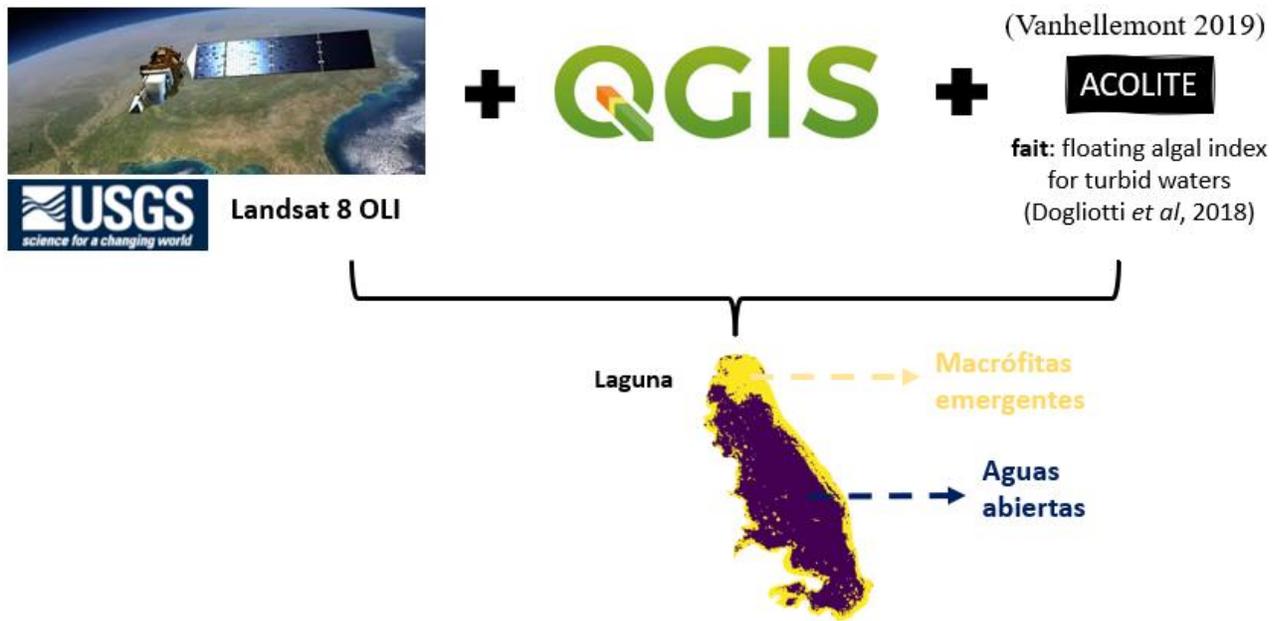


Figura 1.8. Esquema del procedimiento realizado para obtener el área de macrófitas emergentes y de aguas abiertas en cada una de las lagunas y en cada estación del año.

Luego, se calculó el balance de gas C de cada laguna como la suma de los flujos medios anuales difusivos, ebullitivos y de hábitats con macrófitas emergentes, ponderados según la proporción del área de aguas abiertas, el área total y la proporción de área con macrófitas emergentes, respectivamente. Como estos lagos son muy someros, asumimos que la ebullición ocurre en toda la superficie de la laguna. Este proceso se realizó

por separado para CO₂ y CH₄, y también para su suma como equivalentes de CO₂. Para calcular los flujos de equivalentes de CO₂, los flujos de CH₄ se convirtieron a CO₂ considerando que el CH₄ tiene un potencial de calentamiento global (GWP) de 34 por masa de gas en un horizonte temporal de 100 años¹⁰¹, y estos flujos convertidos fueron añadidos a los flujos de CO₂ medidos.

11. Análisis estadísticos

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para explorar el ordenamiento de las 4 lagunas estudiadas estacionalmente en relación a sus parámetros físicos, químicos y biológicos, con una estandarización previa de todas las variables incluidas en el análisis.

Para explorar diferencias en $p\text{CO}_2$ o $p\text{CH}_4$ entre los sitios ME y AA se utilizó un modelo lineal general mixto para lagunas claras y turbias para CO₂ y CH₄, por separado. El modelo incluyó los factores de efecto fijo Sitio (ME y AA) y Estación del año (invierno, primavera, verano y otoño), y el factor de efecto aleatorio Laguna (SG, KH, SA, BU). Dado que no hubo diferencias significativas entre los sitios para $p\text{CO}_2$ ni para $p\text{CH}_4$ para ambos regímenes (Fig. S1), no se diferenció entre los sitios en una misma laguna en el resto de los análisis. Para probar las diferencias estacionales en $p\text{CO}_2$ y $p\text{CH}_4$ entre regímenes, se aplicó nuevamente un modelo lineal general mixto con dos factores de efectos fijos, Régimen (claro y turbio) y Estación, y el factor de efecto aleatorio Laguna. Para evaluar las diferencias en la media anual de $p\text{CO}_2$ y $p\text{CH}_4$ entre regímenes, utilizamos un modelo lineal general mixto con un factor de efecto fijo, Régimen, y dos factores con efectos aleatorios, Laguna y Estación. Las diferencias en flujos difusivos, ebullitivos y de hábitat con vegetación entre regímenes se analizaron con un modelo lineal general mixto con dos factores de efectos fijos, Vía de emisión (flujo difusivo, flujo ebullitivo y flujo mediado por plantas) y Régimen, y con dos factores de efecto aleatorio, Laguna y Estación. Cuando se encontraron diferencias significativas, realizamos comparaciones post hoc.

Para explorar posibles variables predictoras de las distintas vías de emisión de ambos gases, se probaron diferentes modelos lineales mediante los siguientes pasos: primero se seleccionó la temperatura como variable explicativa para todos ellos, porque suele ser un predictor clave de la dinámica de GEI. Para el flujo difusivo de CO₂, se llevó a cabo una regresión lineal simple entre el flujo difusivo de CO₂ y la temperatura, incluyendo los datos de ambos regímenes, pero no se encontró una relación con la temperatura. Debido a esto, se dividieron los datos por régimen (claro o turbio). Las lagunas claras mostraron una relación lineal negativa entre el CO₂ y la temperatura, pero no fue así para las lagunas turbias. Por lo tanto, para las lagunas turbias se seleccionaron variables relacionadas con la producción primaria, como la abundancia de fitoplancton y el oxígeno disuelto (OD), como posibles predictores. Para el flujo de CO₂ mediado por plantas

se realizó también una regresión lineal con la temperatura. Para el CH₄ se realizó nuevamente una regresión lineal con la temperatura, incluyendo datos de ambos regímenes.

En todos los análisis se trabajó con variables respuesta de distribución Normal, por ello se probó el ajuste de los datos a los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Si los datos no se ajustaban a alguno de los supuestos, se modeló la estructura de la varianza agregando una función de varianza al modelo ya existente. Para esto se probaron tres funciones diferentes (varExp, varPower, varIdent) y se seleccionó aquella que resultó en un modelo con los criterios de información de Akaike (AIC) más bajos¹⁰². Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia del 95 % utilizando R versión 3.6.2 en el entorno RStudio versión 1.2.5019¹⁰³. Las figuras se realizaron con el paquete R ggplot2 3.3.2¹⁰⁴. Los PCA se realizaron con el paquete Vegan 2.5-6¹⁰⁵, los modelos mixtos se probaron con el paquete lmerTest 3.1-2¹⁰⁶ y los supuestos se probaron con el paquete Car 3.0-8¹⁰⁷. Si los datos no se ajustaban a los supuestos, se utilizaba el paquete nlme 3.1-142²³⁰ para modelar la heterocedasticidad. Para explorar las comparaciones post hoc, se utilizó el paquete emmeans 1.4.8²³¹.

Resultados

1. Caracterización limnológica

Las lagunas turbias presentaron mayores niveles de Chla, FT, STS y turbidez, mientras que las lagunas claras vegetadas presentaron menores niveles de las variables mencionadas, pero valores mayores de NT y mayor profundidad del disco de Secchi (Tabla 1.1). El ordenamiento basado en las variables limnológicas separó las lagunas según su régimen (Fig. 1.9). Las lagunas claras vegetadas se ubicaron en el lado derecho del biplot, con mayor TN, conductividad y DOC, mientras que las lagunas turbias fitoplanctónicas se ubicaron en el lado izquierdo del biplot, con niveles más altos de CDOM, Chla, TP y turbidez. El primer componente principal (CP1) explicó el 38,1% de la variación y las principales variables relacionadas con este eje fueron FT (loading = -0,75), turbidez (loading = -0,71), Chla (loading = -0,70), pH (loading = -0,56), CDOM (loading = -0,49), conductividad (loading = 0,80) y COD (loading = 0,68). El segundo componente principal (CP2) explicó el 17,3% de la varianza y sus principales variables fueron OD (loading = 0,60) - que fue particularmente alta en la laguna SG durante la primavera- y CID (loading = -0,55) - que fue mayor para las lagunas claras en otoño.

Las lagunas turbias tuvieron en promedio una abundancia de fitoplancton un orden de magnitud mayor que la de las lagunas claras vegetadas (Fig. 1.10). Especies pertenecientes a Chlorophyta y Cyanobacteria fueron las más dominantes de la comunidad autótrofa en las lagunas turbias y su abundancia fue mayor durante el verano y el otoño. En las lagunas claras la composición de la comunidad fitoplanctónica fue más variable,

siendo Chlorophyta, Cyanobacteria, Cryptophyta y Bacillariophyta los principales grupos taxonómicos, con abundancias mayores en verano y otoño.

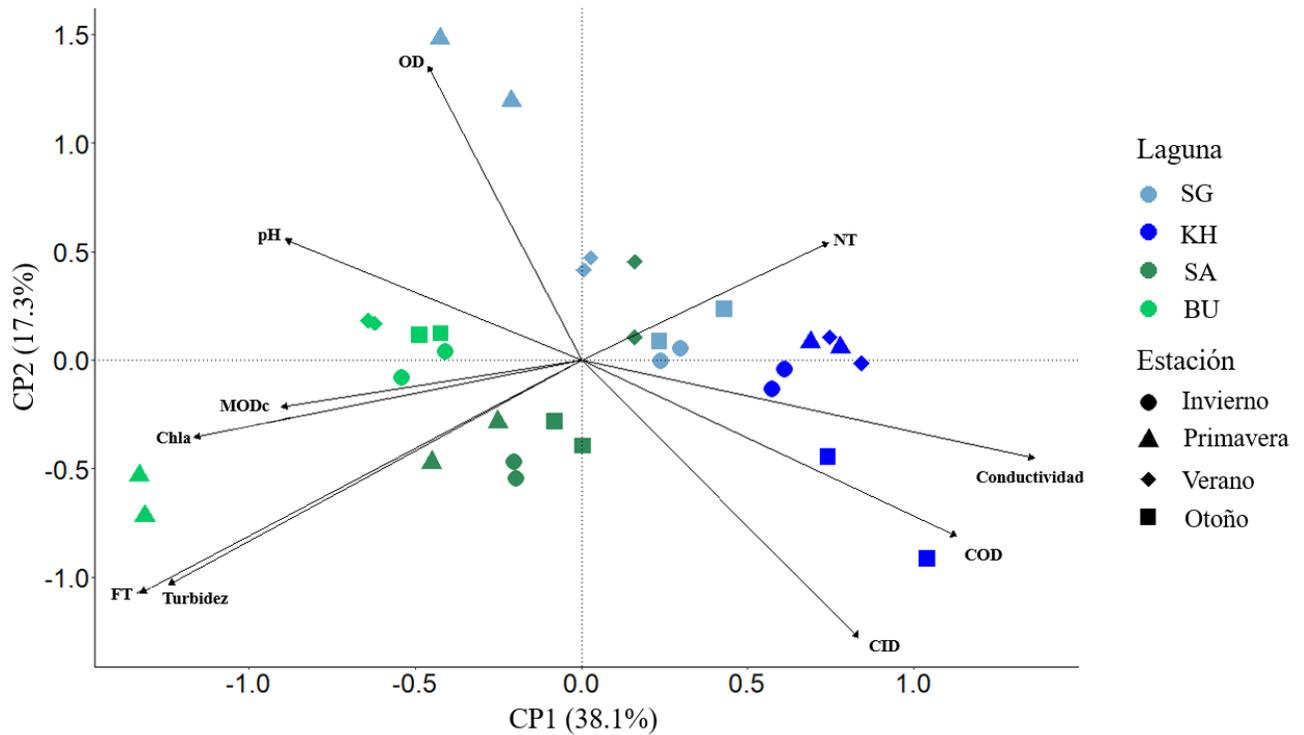


Figura 1.9. Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) para las cuatro lagunas estudiadas estacionalmente. Las variables ambientales se representan con flechas negras. En tonos de azul se muestran las lagunas claras vegetadas (Segunda: SG y Kakel Huincul: KH) y en tonos de verde se muestran las lagunas turbias fitoplanctónicas (Salada: SA y Burro: BU), mientras que el tipo de símbolo representa la estación del año. Las variables ambientales son pH, conductividad, oxígeno disuelto (OD), nitrógeno total (NT), fósforo total (FT), carbono orgánico disuelto (COD), carbono inorgánico disuelto (CID), materia orgánica disuelta coloreada (MODc), turbidez y clorofila a (Chla).

Variables	Laguna			
	La Segunda	Kakel Huincul	La Salada	El Burro
T _{agua} (°C)	18,1 (8,5 - 27,8)	18,0 (5,1 - 26,1)	19,0 (8,4 - 31,6)	19,7 (8,6 - 29,5)
pH	8,5 (7,2 - 9,4)	8,4 (7,2 - 8,9)	8,6 (8,1 - 8,9)	8,8 (8,3 - 9,2)
Conductividad (mS/cm, at 25°C)	1,1 (0,8 - 1,5)	2,6 (2,2 - 2,9)	1,1 (1 - 1,2)	0,9 (0,7 - 1)
Alcalinidad (meq/l)	4,8 (1,6 - 8,7)	6,4 (3,6 - 7,7)	6,6 (1,7 - 9,3)	4,5 (2 - 5,8)
OD (mg/l)	11,8 (6,4 - 20,5)	8,8 (6,1 - 11,9)	10,5 (8,5 - 11,8)	11,2 (8 - 13,5)
NT (µg/l)	1646 (1320 - 2340)	2215 (1550 - 3000)	1886 (540 - 3720)	1533 (972 - 2340)
FT (µg/l)	100,5 (72 - 162)	100,3 (60 - 168)	190,5 (102 - 252)	255,8 (186 - 426)
COD (mg/l)	19,7 (18,4 - 21,8)	43,4 (36,6 - 51,9)	24,4 (20,8 - 29,6)	22,9 (20,9 - 26,0)
CID (mg/l)	76,9 (45,5 - 110)	82,2 (75,4 - 90,5)	101,8 (86,5 - 113,7)	74,5 (59 - 109,7)
Prof. secchi (m)	1,2 (0,7 - 2,2)	0,9 (0,7 - 1)	0,3 (0,2 - 0,5)	0,3 (0,2 - 0,4)
K _{d,par} (m ⁻¹)	4,9 (2,6 - 9,3)	3,1 (1,6 - 5,8)	7,9 (5,8 - 9,5)	12,8 (8,1 - 17,5)
MODc (abs/cm)	2,9 (2,3 - 3,7)	2,9 (2,0 - 3,7)	2,6 (2,0 - 3,3)	3,6 (2,6 - 4,4)
STS (mg/l)	10,0 (3,3 - 28,1)	15,3 (3,6 - 38,2)	42,7 (19,8 - 65,8)	76,1 (45,5 - 186,4)
Turbidez (NTU)	1,8 (1,3 - 2,9)	2,4 (1,2 - 3,6)	51,7 (27,0 - 70,1)	47,5 (27,7 - 91,4)
Chl a (µg/l)	6,8 (3,0 - 16,1)	5,7 (2,0 - 12,2)	20,8 (10,2 - 34,7)	55,9 (14,5 - 71,9)

Tabla 1.1. Variables físicas, químicas y biológicas analizadas en las cuatro lagunas estudiadas. En cada caso se muestra el valor medio anual y entre paréntesis el mínimo y máximo registrado. OD (oxígeno disuelto), NT (nitrógeno total), FT (fósforo total), COD (carbono orgánico disuelto), CID (carbono inorgánico disuelto), Prof. Secchi (profundidad del disco de Secchi), K_{d,par} (coeficiente de atenuación de la luz), MODc (materia orgánica disuelta coloreada), STS (sólidos totales en suspensión), Chla (clorofila a).

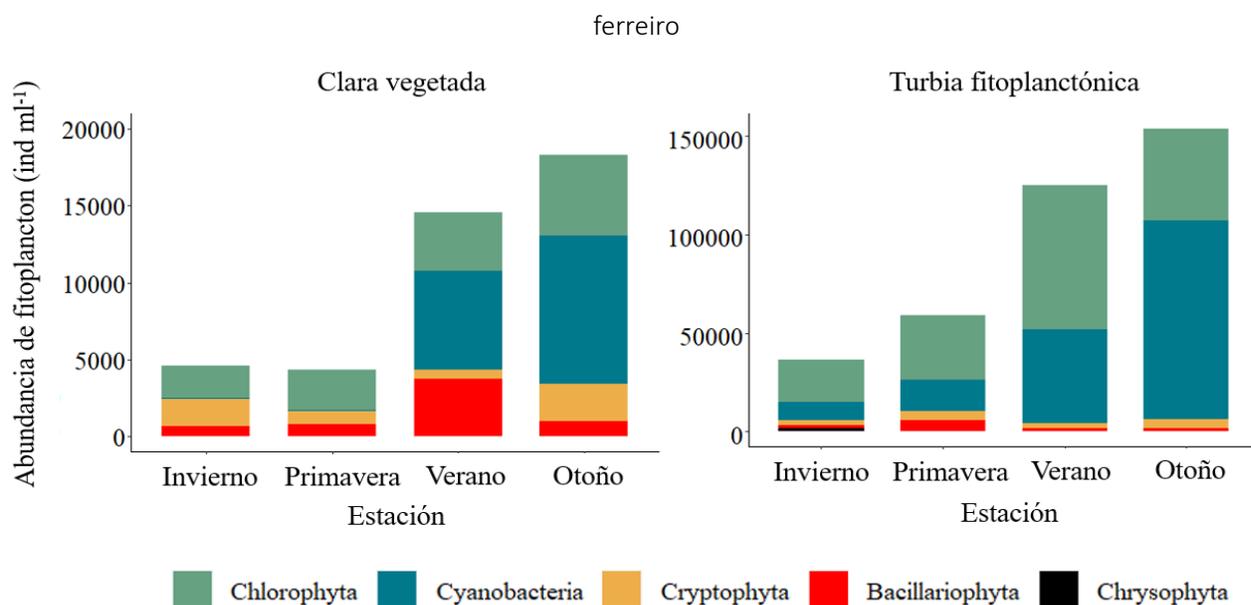


Figura 1.10. Abundancia de los principales grupos taxonómicos de la comunidad fitoplanctónica en lagunas claras vegetadas y turbias fitoplanctónicas. En colores se representan los distintos grupos fitoplanctónicos: Chlorophyta, Cyanobacteria, Cryptophyta, Bacillariophyta y Chrysophyta. Tener en consideración que hay un orden de magnitud de diferencia entre lagunas claras y turbias.

En cuanto a las comunidades microbianas, los phylum de arqueas predominantes en las cuatro lagunas fueron Euryarchaeota y Nanoarchaeota (Fig. 1.11A). Dentro del phylum Euryarchaeota se encuentran las clases Methanobacteria y Methanomicrobia, que son organismos metanogénicos, por lo que este phylum es de especial importancia. La abundancia relativa de Euryarchaeota fue de 47.7% para KH, 72.4% para SG, 68.3% para SA y 67.1% para BU. La clase Methanomicrobia fue abundante tanto en las lagunas claras KH (37.5%) y SG (52.6%), como en las lagunas turbias SA (48.8%) y BU (47.1%), mientras que la clase Methanobacteria presentó una abundancia relativa significativa solamente en la laguna SG (11.3%) y abundancias de aproximadamente 1% en el resto de las lagunas. En cuanto al phylum Nanoarchaeota, el mismo estuvo representado por una sola clase, Woesearchaeia, que posee un genoma pequeño y capacidades metabólicas limitadas, lo que sugiere que poseen un modo de vida simbiote o parasítico. Respecto a las bacterias, los phylum predominantes fueron Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia (Fig. 1.12A). El phylum Cyanobacteria fue sobretodo abundante en las lagunas turbias SA (18%) y BU (19%), mientras que su abundancia relativa fue menor en las lagunas claras KH (13%) y sobretodo en SG (4%), en concordancia con los resultados de abundancia de fitoplancton (Fig. 1.10). Vale la pena destacar que estos datos de ASV corresponden a abundancias relativas y no totales, por lo tanto no pueden utilizarse para determinar si una laguna tuvo más o menos arqueas/bacterias de un determinado grupo, sino que sirven para entender la composición relativa dentro de una laguna y compararlas entre lagunas. Dentro del phylum Proteobacteria se encuentran las clases metanotróficas Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria, es decir, que oxidan CH_4 . Este phylum presentó una abundancia relativa mayor en las lagunas claras KH (35.5%) y SG (36.7%), en comparación con las lagunas turbias SA (20.5%) y BU (22.1%). La clase Gammaproteobacteria fue la más abundante de las tres en todas las lagunas (Fig. 1.12B), observándose una tendencia de mayor abundancia relativa en las lagunas claras SG (34%) y KH (32%) en comparación con las lagunas turbias SA (17%) y BU (18%). La clase Deltaproteobacteria presentó una baja abundancia relativa en las lagunas SA (1.4%) y BU (1.5%), pero su presencia en las lagunas claras SG (0.27%) y KH (0.34%) fue directamente despreciable. Respecto a Alphaproteobacteria, esta clase presentó una abundancia relativa baja pero similar entre las cuatro lagunas (Fig. 1.12B), con valores de 3.1% para KH, 2.6% para SG, 2.7% para SA y 2.2% para BU. La clase Oxyphotobacteria corresponde al phylum Cyanobacteria donde, nuevamente, se ve

una mayor abundancia relativa en las lagunas turbias SA (18.4%) y BU (19.7%) respecto de las lagunas claras SG (3.5%) y KH (12.9%).

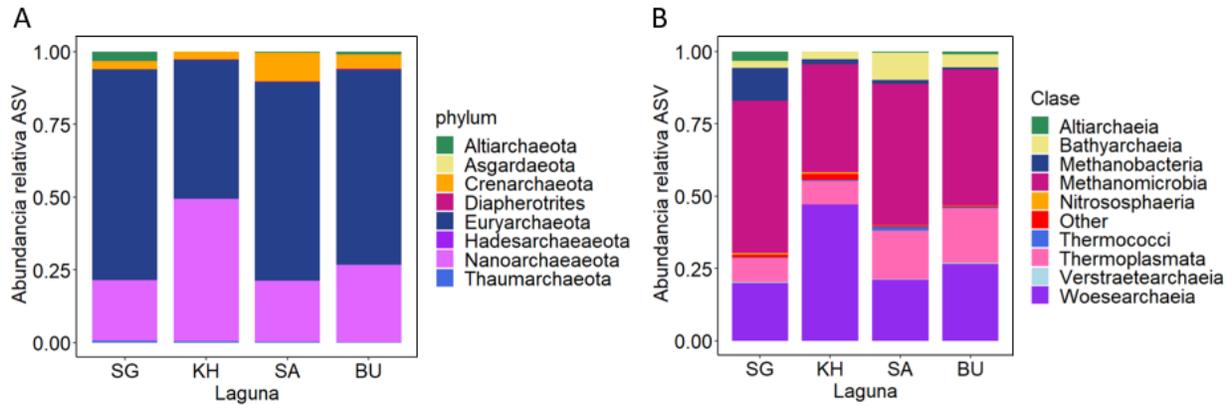


Figura 1.11. Abundancia relativa de ASV de arqueas identificados por phylum (A) y por clase (B).

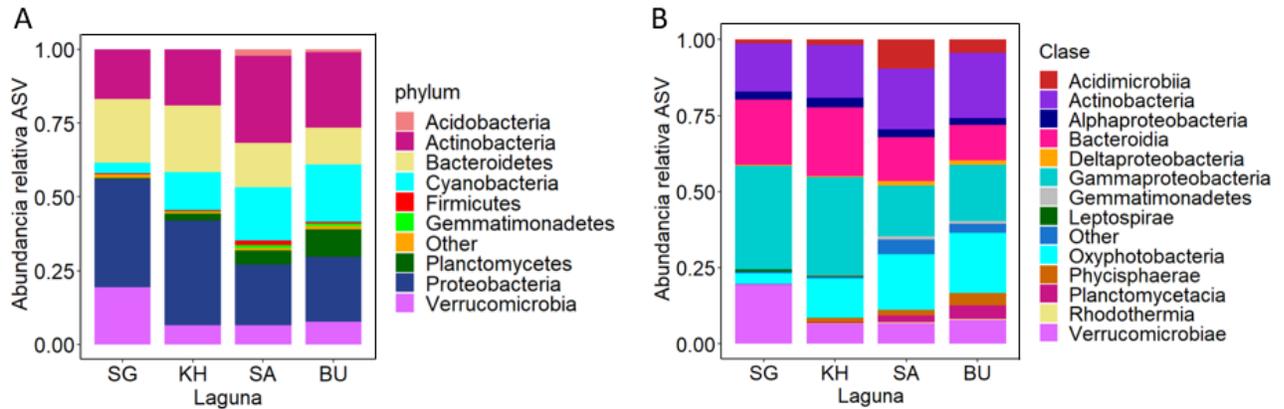


Figura 1.12. Abundancia relativa de ASV de bacterias identificados por phylum (A) y por clase (B).

2. Dinámica de GEI

2.1 Gases disueltos

La media anual de $p\text{CO}_2$ en el aire atmosférico, incluyendo todos los sitios, fue de $530,7 \pm 33,0$ ppmv, mientras que la media anual de $p\text{CH}_4$ en el aire atmosférico fue de $1,7 \pm 0,3$ ppmv. Estos valores se utilizaron para determinar si las lagunas estaban subsaturadas o sobresaturadas respecto a cada GEI, considerando que si las lagunas tenían una concentración menor que la atmosférica actuaban como sumidero y si tenían una concentración mayor que la atmosférica actuaban como emisoras.

Las lagunas estudiadas presentaron diferencias significativas en $p\text{CO}_2$ dependiendo de la estación del año y el régimen en que se encontraban (Estación*Régimen $p < 0,05$, $df = 3$, $F = 14,0$, Fig. 1.13a). En invierno, las lagunas claras estaban sobresaturadas en CO_2 mientras que las lagunas turbias estaban ligeramente

subsaturadas (prueba de Tukey, $p < 0,001$, Fig. 1.13a). Por el contrario, en primavera las lagunas claras estaban subsaturadas en CO_2 mientras que las lagunas turbias estaban sobresaturadas (prueba de Tukey, $p < 0,1$). No se encontraron diferencias entre regímenes en verano, cuando estaban subsaturados, ni en otoño, cuando ambos regímenes estaban sobresaturados en CO_2 . Las diferencias en $p\text{CO}_2$ se reflejaron en los metabolismos predominantes en cada régimen para cada estación del año (Fig. 1.14): en invierno las lagunas claras vegetadas presentaron un metabolismo heterotrófico actuando como fuente de CO_2 , en primavera y verano, por el contrario, presentaron un metabolismo autotrófico y actuaron como sumidero de CO_2 , mientras que en otoño los resultados fueron más variables. Las lagunas turbias también presentaron cambios en los metabolismos dominantes en cada estación pero a una escala menor. En invierno las lagunas estaban equilibradas con la atmósfera, en primavera presentaron un metabolismo autotrófico pero actuando como fuente de CO_2 , en verano también un metabolismo autotrófico pero esta vez actuando como sumidero de CO_2 y en otoño, por último, los datos también fueron más variables.

Las lagunas estuvieron siempre sobresaturadas en CH_4 , pero también presentaron diferencias dependiendo de la estación del año y del régimen (Estación*Régimen ($p < 0,05$, $df = 3$, $F = 9,9$, Fig. 1.13c). Las lagunas turbias tuvieron los menores niveles de $p\text{CH}_4$ en invierno, más altos en primavera, un pico en verano y luego una disminución en otoño. Las lagunas claras presentaron una tendencia similar, con valores más bajos de $p\text{CH}_4$ en invierno, un aumento en primavera, un pico marcado en verano que, a diferencia de las lagunas turbias, continuó alto en otoño. No se encontraron diferencias en $p\text{CH}_4$ entre regímenes en invierno ni en primavera, en verano no hubo diferencias significativas pero las lagunas claras presentaron una mayor variabilidad de $p\text{CH}_4$, y en otoño las lagunas claras tuvieron niveles significativamente más altos de $p\text{CH}_4$ en comparación con las lagunas turbias (prueba de Tukey, $p < 0,05$).

En relación a las medias anuales, no se encontraron diferencias en el promedio anual de $p\text{CO}_2$ entre regímenes (Fig. 1.13b), pero la media anual de $p\text{CH}_4$ fue mayor en las lagunas claras en comparación con las lagunas turbias ($p < 0,05$, $df = 1$, $F = 10,6$, Fig. 1.13d). Los valores estacionales y anuales de $p\text{CO}_2$ y $p\text{CH}_4$ pueden encontrarse en la Tabla S1.1.

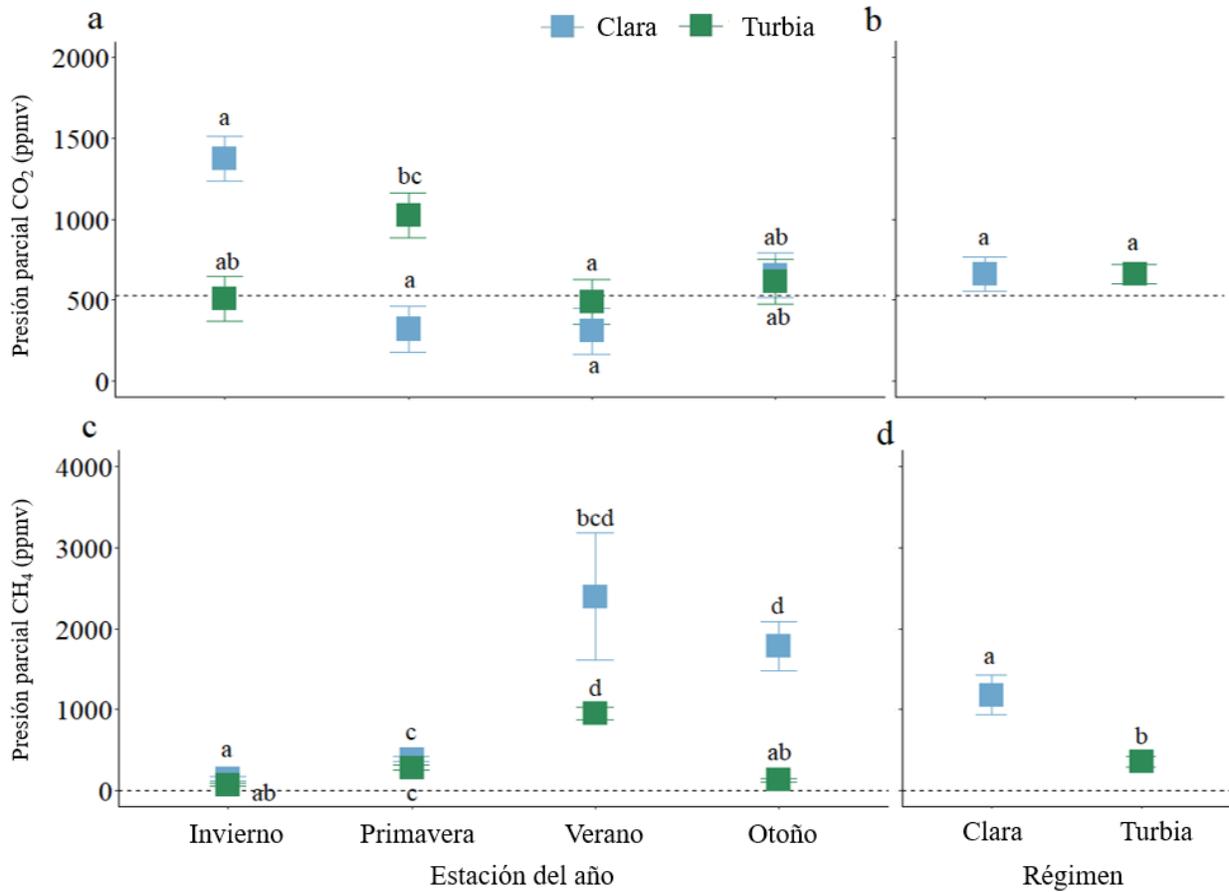


Figura 1.13. Presión parcial de CO₂ y CH₄ en el agua (ppmv), incluyendo datos estacionales (a y c, respectivamente) y promedios anuales (b y d, respectivamente). En azul se encuentran representadas las lagunas claras vegetadas, mientras que en verde se encuentran representadas las lagunas turbias fitoplanctónicas. La línea punteada en los paneles a y b representa la presión parcial atmosférica media anual de CO₂, mientras que la línea punteada en los paneles c y d representa la presión parcial atmosférica media anual de CH₄. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada panel.

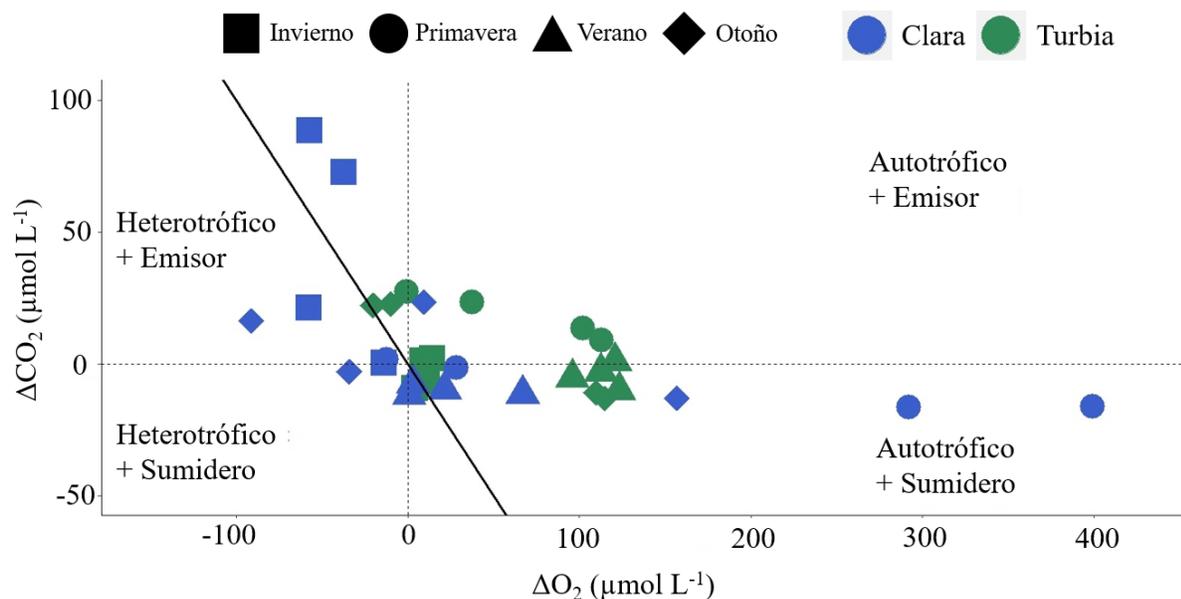


Figura 1.14. Desviaciones de O_2 disuelto ($\mu\text{mol L}^{-1}$) y CO_2 ($\mu\text{mol L}^{-1}$) respecto al equilibrio atmosférico (líneas punteadas) en lagunas claras (azul) y turbias (verdes), para las distintas estaciones del año (símbolos). El eje X representa la desviación en la concentración de O_2 disuelto en la superficie del agua con respecto a la concentración de O_2 en equilibrio con la atmósfera, mientras que el eje Y representa la desviación en la concentración de CO_2 disuelto en el agua subsuperficial respecto a la concentración de CO_2 en equilibrio con la atmósfera. La línea diagonal corresponde a una relación molar 1:1, donde cada μmol de CO_2 consumido se convertiría en un μmol de O_2 producido por producción primaria, y viceversa por respiración. Cada cuadrante representa un escenario combinado de metabolismo (autotrófico o heterotrófico) + flujo neto de CO_2 (emisor o sumidero).

2.2 Vías de emisión de GEI y sus predictores

Los cambios estacionales en pCO_2 y pCH_4 se reflejaron en los respectivos flujos difusivos, con una entrada neta de CO_2 de la atmósfera cuando las lagunas estaban subsaturadas y una emisión de CO_2 cuando las lagunas estaban sobresaturadas, y una constante emisión de CH_4 que difirió en su magnitud dependiendo de la estación del año. El patrón estacional de flujo difusivo de CO_2 difirió entre regímenes (Fig. 1.15a y b). En invierno, las lagunas claras actuaron como fuentes de CO_2 a la atmósfera mientras que las lagunas turbias actuaron levemente como sumideros. Las lagunas claras actuaron como sumidero en primavera y verano, mientras que las lagunas turbias actuaron como fuente en primavera y sumidero en verano (Fig. 1.15a). En otoño, tanto las lagunas claras como turbias actuaron nuevamente como fuentes de CO_2 . Con respecto a los flujos de CO_2 de hábitats con macrófitas emergentes, las lagunas claras y turbias presentaron patrones similares con emisiones menores en invierno, más altas en primavera y verano y luego decrecientes en otoño.

El flujo ebullitivo de CO₂ fue insignificante para ambos regímenes, representando menos del 0,5% del total de emisiones de CO₂. Anualmente, no hubo diferencias en la media de flujo de CO₂ difusivo, ebullitivo y del hábitat con macrófitas emergentes entre lagunas claras y turbias (Fig. 1.15c), pero encontramos que el flujo de CO₂ del hábitat con macrófitas emergentes fue mayor que el flujo difusivo y ebullitivo ($p = 0,001$, $gl = 2$, $F = 32,83$, Fig. 1.15c). Los valores medios estacionales y anuales de las distintas vías de emisión de CO₂ pueden encontrarse en la Tabla S1.2.

Los flujos de CH₄ difusivo, ebullitivo y del hábitat con macrófitas emergentes, tuvieron patrones similares entre lagunas claras y turbias (Fig. 1.15d y e). Las tres vías de emisión fueron más bajas en invierno, aumentaron en primavera, alcanzaron su punto máximo en verano y luego disminuyeron en otoño. Anualmente, no hubo diferencias significativas en las tres vías de emisión entre regímenes, ni entre vías de emisión, independientemente del régimen (Figura 1.15f). Los valores medios estacionales y anuales de las tres vías de emisión de CH₄ pueden encontrarse en la Tabla S1.3.

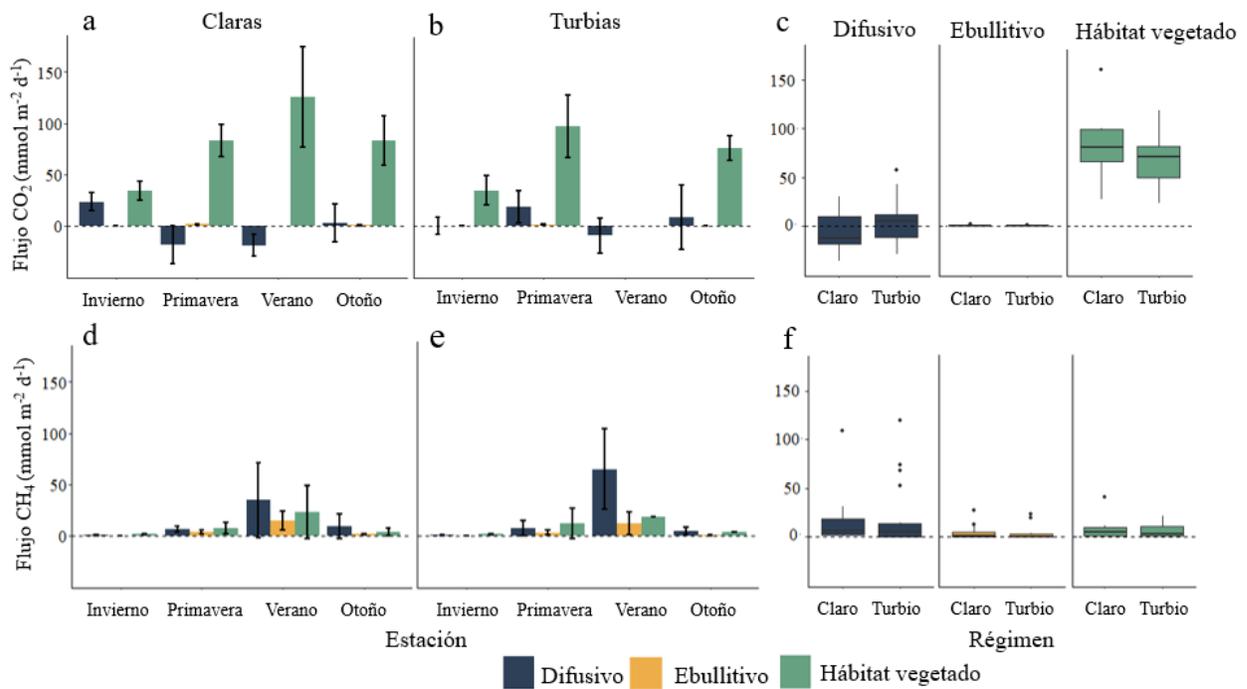


Figura 1.15. Flujos estacionales de CO₂ (a, b, c) y CH₄ (d, e, f) en lagunas claras y turbias. Los flujos se dividen en flujos difusivos (azul), flujos ebullitivos (amarillo) y flujos del hábitat con macrófitas emergente (verde). En los paneles c y f, letras diferentes indican diferencias significativas entre regímenes para cada vía de emisión, mientras que el asterisco (*) indica diferencias entre tipos de flujos para cada GEI. Para las lagunas turbias en verano no se pudieron recopilar datos sobre el flujo de hábitat con vegetación. La media ± error estándar para cada régimen y cada vía de emisión en los paneles a, b, d y e se obtuvo promediando todas las mediciones las

dos lagunas que pertenecían al mismo régimen y a una misma vía de emisión. La línea punteada indica un flujo igual a cero, valores mayores a cero implican que el lago actúa como fuente, mientras que valores menores implican que el lago actúa como sumidero.

En relación a los predictores de cada vía de emisión, encontramos una relación lineal negativa y significativa entre el flujo difusivo de CO₂ y la temperatura para lagunas claras vegetadas (Fig. 1.16a). Por el contrario, para las lagunas turbias, no hubo una relación entre el flujo difusivo de CO₂ y la temperatura (Fig. 1.16b), en cambio, encontramos una relación lineal negativa y significativa con Chl a y OD (Fig. 1.17). El flujo de CO₂ proveniente del hábitat con macrófitas emergente presentó una relación lineal positiva y significativa con la temperatura (Fig. 1.16c). Respecto al CH₄, encontramos una relación lineal positiva y significativa entre el log₁₀ del flujo difusivo (Fig. 1.16d), ebullitivo (Fig. 1.16e) y del hábitat con macrófitas emergentes (Fig. 1.16f) y la temperatura.

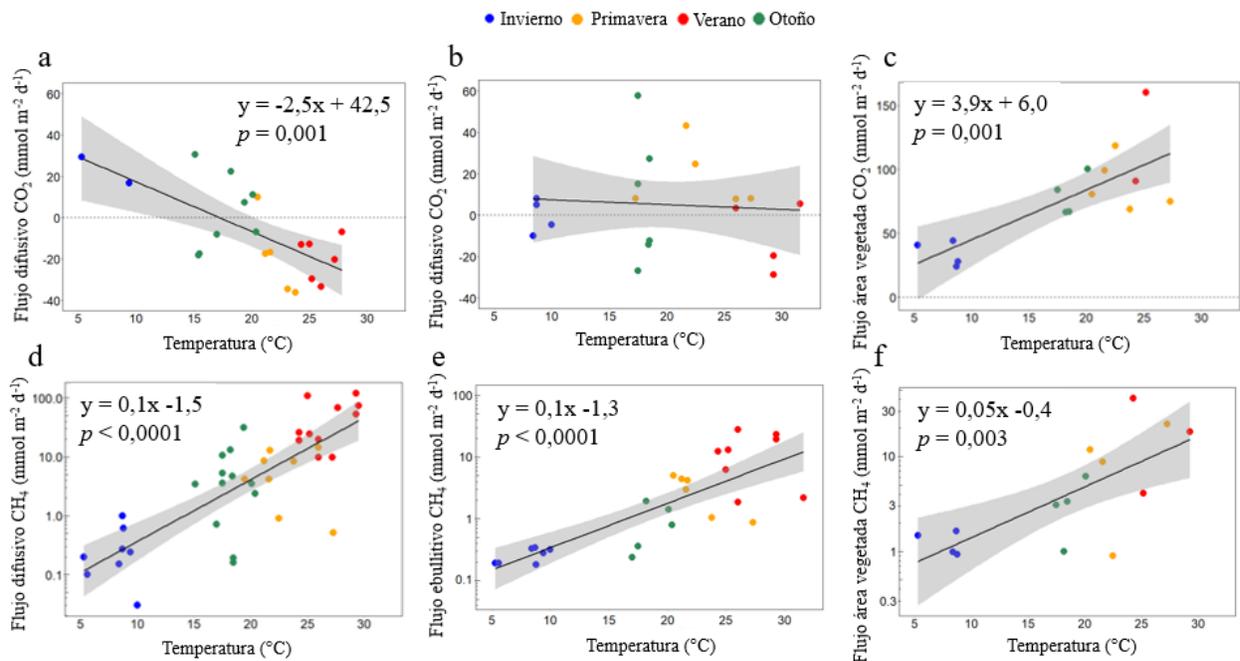


Figura 1.16. Regresiones lineales entre las distintas vías de emisión de CO₂ y CH₄, y la temperatura subsuperficial del agua. Flujo difusivo de CO₂ para lagunas claras (a) y turbias (b), y flujo de CO₂ de hábitat con macrófitas emergentes para ambos regímenes (c). Los flujos de CH₄ difusivos (d), ebullitivos (e) y del hábitat con macrófitas emergentes (f) fueron transformados aplicando log₁₀. Para todos los paneles, el color del punto representa la estación del año. En los paneles a, b y c, la línea punteada representa un flujo cero, flujos mayores implican que la laguna emite CO₂ (actúa como fuente), mientras que valores menores implican que la laguna está tomando CO₂ de la atmósfera (actúa como sumidero). El sombreado de cada gráfico corresponde al

intervalo de 95% de confianza para las predicciones de cada modelo lineal. La pendiente de regresión en el panel (b) no es significativa.

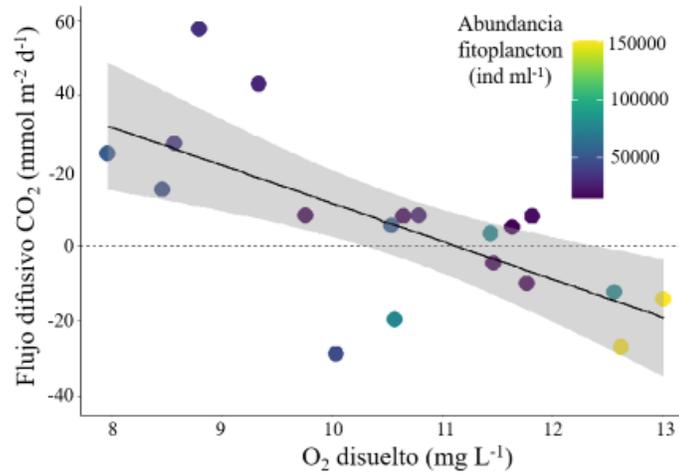


Figura 1.17. Regresión lineal múltiple entre flujo difusivo de CO_2 ($\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$), oxígeno disuelto en el agua (OD, mg l^{-1}) y la abundancia de fitoplancton (fito, ind ml^{-1}) en lagunas turbias. El color del punto indica la abundancia de fitoplancton. La ecuación correspondiente a la regresión múltiple para las lagunas turbias es la siguiente: $\text{Flujo difusivo CO}_2 = 217,9 - 2,4 \cdot 10^{-3} \text{ fito} - 18,5 \text{ DO} + 1,9 \cdot 10^{-4} \text{ fito} \cdot \text{DO}$. ($t = 1,8$, $p = 0,09$)

Contrario a lo esperado, los flujos de CO_2 mediados por macrófitas emergentes fueron mucho más altos que los flujos de CH_4 mediados por macrófitas emergentes (Fig. 1.18).

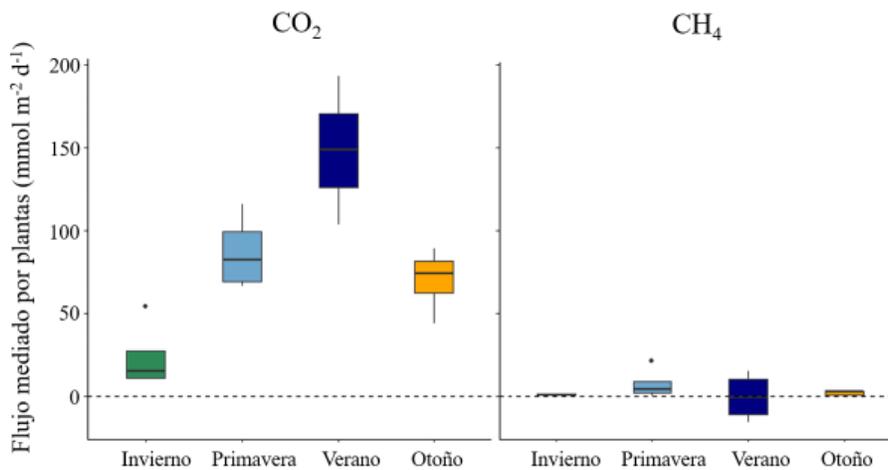


Figura 1.18. Flujos mediados por macrófitas emergentes, tanto para CO_2 como para CH_4 , en las distintas estaciones del año. La línea punteada muestra un flujo igual a cero.

Para explorar más este patrón, realizamos un balance de masa isotópico - descrito anteriormente en la sección métodos -. La señal isotópica media del CO₂ emitido por las macrófitas emergentes fue de $-26,5 \pm 9,0$ ‰, mientras que la señal isotópica media del CO₂ emitido en la interfaz agua: aire y la del CO₂ disuelto en el agua fueron $-12,5 \pm 2,5$ ‰ y $-12,6 \pm 4,1$ ‰, respectivamente (Fig. 1.19). La señal isotópica media del CH₄ emitido por las macrófitas emergentes fue de $-66,3 \pm 17,7$ ‰, en el rango de la señal isotópica del CH₄ fresco proveniente de las burbujas (media anual $-61,4 \pm 1,7$ ‰), pero considerablemente más reducido que la media de la señal isotópica del CH₄ emitido en la interfaz agua: aire ($-48,6 \pm 10,8$ ‰) y del CH₄ disuelto ($-40,1 \pm 6,0$ ‰, Fig. 1.19).

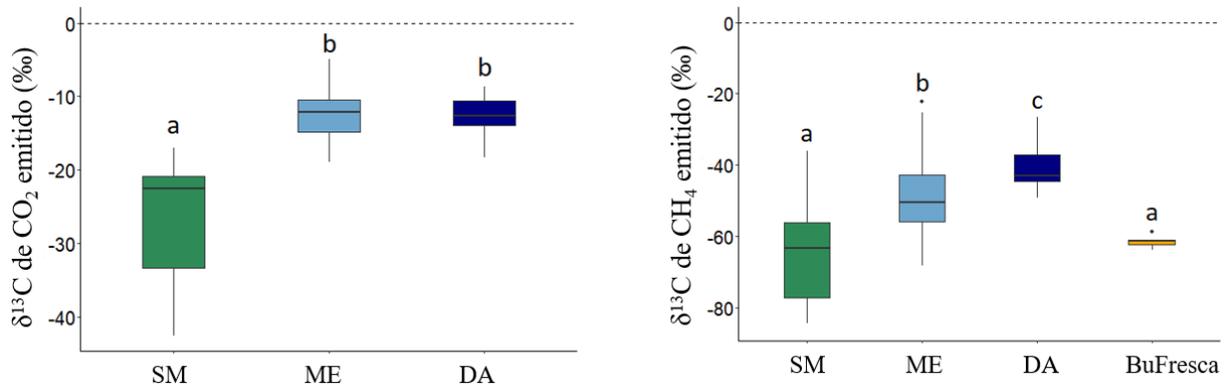


Figura 1.19. Señal isotópica del CO₂ (a) y CH₄ (b) emitido por las macrófitas emergentes (SM), por el agua rodeando las macrófitas emergentes (ME), de los GEI disueltos en el agua (DA) y de las burbujas frescas de CH₄ (BuFresca).

2.3 Balances de gas C

Las lagunas claras vegetadas presentaron una mayor proporción de área cubierta por macrófitas emergentes, mientras que las lagunas turbias presentaron un mayor porcentaje de área cubierta por aguas abiertas (Fig. 1.20). A su vez, hubo una mayor variación en la cobertura de macrófitas emergentes entre estaciones para lagunas claras (mínimo en invierno: 27,4% - máximo en verano: 99,1%) mientras que no hubo tanta variación estacional en la cobertura de aguas abiertas en lagunas turbias (96,7% - 93,7%).

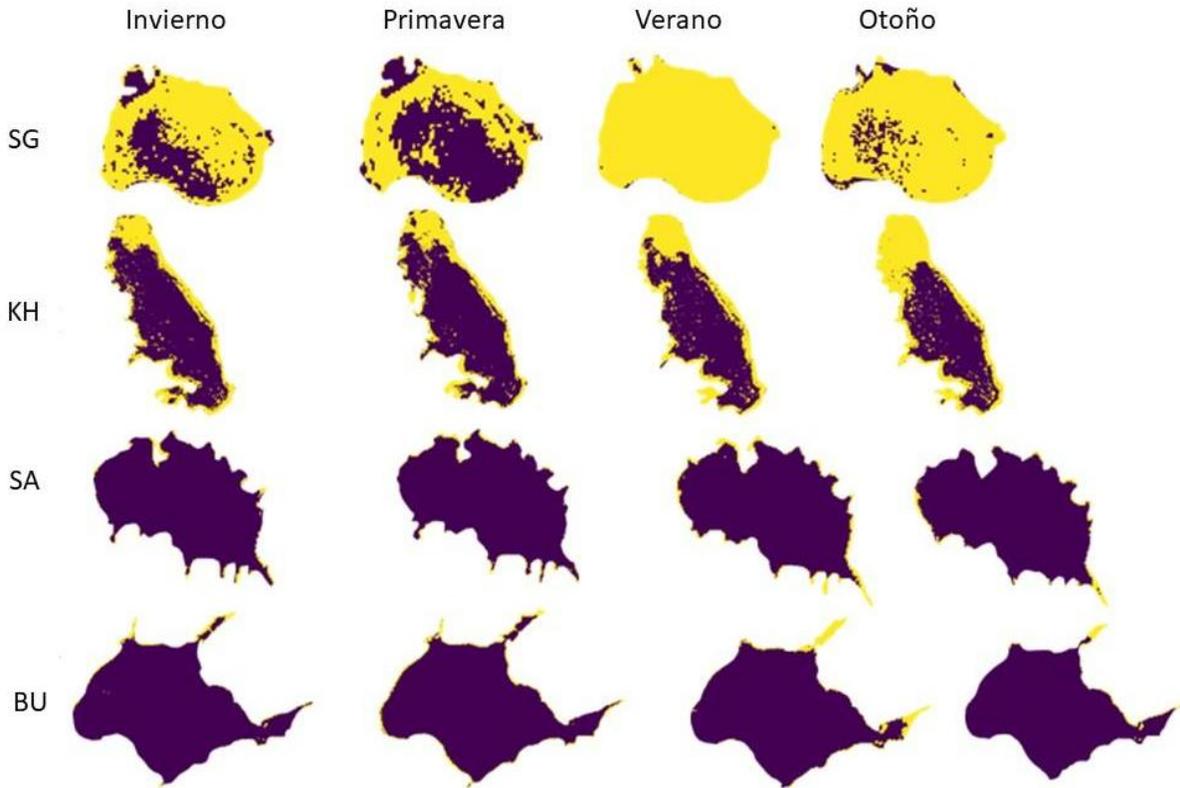


Figura 1.20. Cobertura de macrófitas emergentes (amarillo) y aguas abiertas (azul) en cada estación del año para las lagunas claras vegetadas (Segunda (SG) y Kake Huincul (KH)) y turbias fitoplanctónicas (Salada (SA) y Burro (BU)). Áreas medias anuales de cada laguna: SG: 2,8 km², KH: 19,5 km², SA: 5,5 km², BU: 10,3 km².

En promedio, las lagunas claras vegetadas presentaron 5 veces más emisiones totales de CO₂ que las lagunas turbias, mientras que las lagunas turbias presentaron un 16 % más de emisiones totales de CH₄ que las lagunas claras, lo que lleva a un balance radiativo – es decir, el flujo de gases de efecto invernadero expresado en equivalente de CO₂ - similar entre regímenes (Tabla 1.2). La contribución de las vías de emisión a las emisiones totales de CO₂ y CH₄ descritas en la Tabla 1 difirieron sustancialmente entre regímenes (Fig. 1.21) debido a las diferencias en la cobertura relativa de los hábitats asociados a cada una de estas vías (Fig. 1.20 y Tabla S1.4): en las lagunas claras las emisiones de CO₂ provinieron principalmente de los hábitats con macrófitas emergentes (95%), mientras que en las lagunas turbias el CO₂ se emitió principalmente a través de difusión en aguas abiertas (58%) y, en segundo lugar, a través de los hábitats con macrófitas emergentes (37%). Asimismo, las emisiones de CH₄ en lagunas claras provinieron principalmente de los hábitats con macrófitas emergentes (46%), seguidos de ebullición (32%) y difusión desde las aguas abiertas (2 %), mientras que en las lagunas turbias la difusión en aguas abiertas fue la principal vía de emisión de CH₄ (76%), seguida de la ebullición (22%) y, por último, de las emisiones de los hábitats con macrófitas emergentes (2%). En consecuencia, las vías que

condujeron a los flujos totales de gases de efecto invernadero en equivalentes de CO₂ también difirieron entre los regímenes: en lagunas claras, los hábitats con macrófitas emergentes fueron la vía principal (55%), seguida de la ebullición (26%) y la difusión (19%), mientras que en las lagunas turbias la principal vía de emisión fue la difusión (76%), seguida de la ebullición (21%) y, por último, de las emisiones de los hábitats con macrófitas emergentes (3%).

Tabla 1.2. Flujos medios ponderados por área (mmol m⁻² d⁻¹). Flujos medios difusivos, ebulitivos y del hábitat vegetado ponderados por la proporción del área donde ocurre cada flujo. Los valores para cada régimen y para cada vía de emisión, provienen de la media entre las dos lagunas para cada régimen (± desviación estándar para esos dos valores).

Flujos medios ponderados por área (mmol m ⁻² d ⁻¹)					
	Régimen	Difusivo	Ebulitivo	Hábitat vegetado	Total
CO ₂	Claras	-1,8 (± 0,6)	0,5 (± 0,2)	43,2 (± 18,1)	41,9 (± 19,0)
	Turbias	4,4 (± 6,8)	0,4 (± 0,0)	2,8 (± 0,4)	7,7 (± 7,3)
CH ₄	Claras	3,4 (± 3,1)	4,9 (± 7,3)	7,1 (± 8,1)	15,4 (± 18,5)
	Turbias	13,1 (± 11,7)	4,5 (± 8,0)	0,3 (± 0,0)	17,9 (± 19,8)
CO ₂ eq	Claras	40,7 (± 39,7)	61,2 (± 90,7)	131,1 (± 117,9)	233,0 (± 248,2)
	Turbias	167,1 (± 152,3)	56,2 (± 99,1)	6,7 (± 0,7)	230,0 (± 252,2)

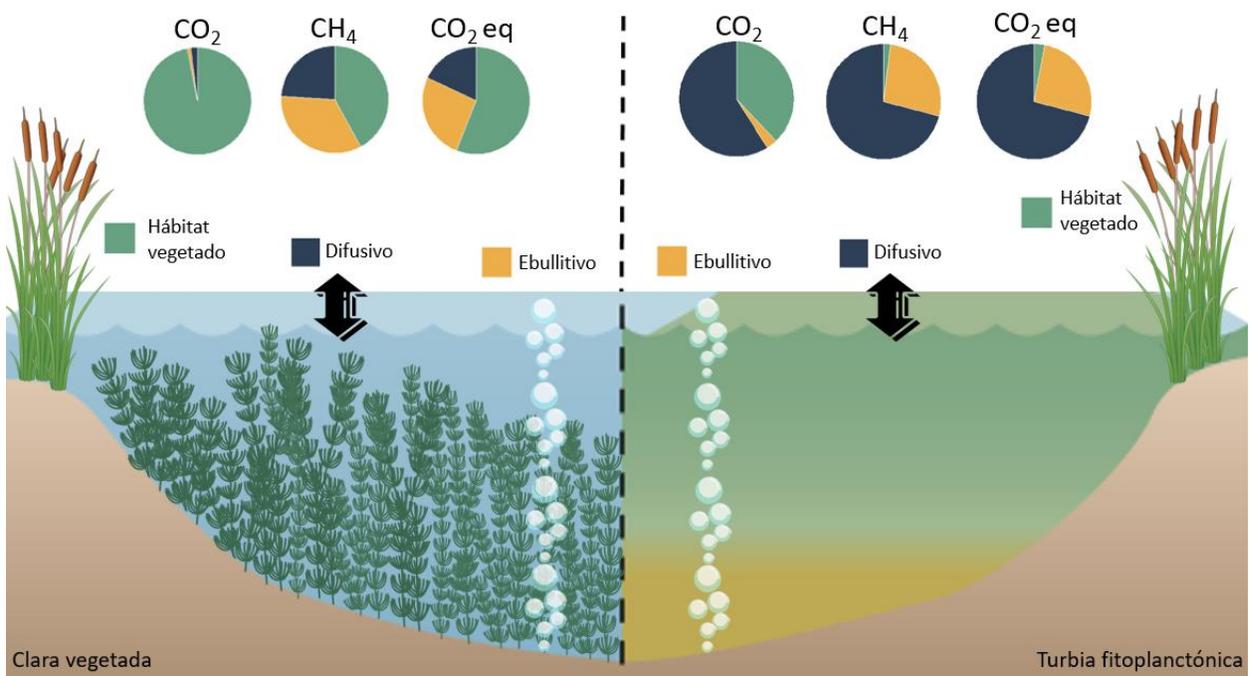


Figura 1.21. Contribución media anual de los flujos difusivos (azul), ebullitivos (amarillo) y de hábitats con macrófitas emergentes (verde) a los flujos totales de CO₂, CH₄ y equivalentes de CO₂ para lagunas claras (izquierda) y turbias (derecha).

Discusión

Las lagunas claras y turbias estudiadas presentaron características limnológicas similares a otras lagunas bajo regímenes claros y turbios pertenecientes a la región pampeana: mayores niveles de Chla, FT, STS y turbidez en lagunas turbias^{35,38,41}, y mayores niveles de COD, conductividad y transparencia en lagunas claras vegetadas³⁸. Las lagunas claras estuvieron dominadas por macrófitas sumergidas mientras que las lagunas turbias se encontraron dominadas por fitoplancton, en coincidencia con la caracterización realizada por Scheffer et al. (1993)²⁸ para ambos regímenes alternativos en lagos someros. Por ende, las lagunas seleccionadas para este estudio son una buena representación de los regímenes contrastantes que caracterizan a la Llanura Pampeana.

Las lagunas presentaron una $p\text{CO}_2$ media anual similar para ambos regímenes, pero las lagunas claras presentaron una $p\text{CH}_4$ media anual mayor que las lagunas turbias, lo que indicaría un efecto diferencial del régimen en el que se encuentra la laguna sobre la dinámica de $p\text{CH}_4$. La similitud en la media anual de $p\text{CO}_2$ entre regímenes sugiere un metabolismo neto anual de CO₂ similar entre regímenes. A pesar de que no se midió directamente la producción primaria bruta (PPB) o la respiración (R), se pudo estimar el metabolismo dominante en cada régimen y en cada estación del año explorando los patrones de saturación de CO₂ y O₂ con respecto a la atmósfera¹⁰⁸. En este sentido, las lagunas claras presentaron grandes cambios estacionales en el metabolismo dominante en cada estación del año, exhibiendo un metabolismo heterotrófico neto - es decir, R más alta que PPB - en invierno y otoño, que pasó a ser autotrófico neto - es decir, PPB más alta que R - en primavera y verano. Las lagunas turbias mostraron un patrón estacional similar en el cambio de metabolismo dominante, aunque con cambios más graduales entre estaciones del año. Estas tendencias estacionales sugieren patrones anuales medios similares en el metabolismo neto de CO₂ entre regímenes y, por lo tanto, podrían explicar la $p\text{CO}_2$ media anual similar entre lagunas claras y turbias. En concordancia con estas observaciones, Alfonso et al. (2018)¹⁰⁹ reportaron una producción ecosistémica neta (PEN) similar entre lagunas claras y turbias de la región pampeana, a pesar de las diferencias tróficas entre las lagunas.

La diferencia en la media anual de $p\text{CH}_4$ registrada entre los regímenes podría deberse a procesos biológicos, como una producción u oxidación de CH₄ diferencial entre regímenes⁶⁰, o también puede deberse a procesos físicos, como una disminución en el mezclado de la columna de agua en presencia de macrófitas sumergida, conllevando a una mayor acumulación de $p\text{CH}_4$ en las lagunas claras vegetadas¹¹⁰. Las macrófitas sumergidas

tienen un pico de crecimiento en primavera y verano seguido de una fase de descomposición que comienza a fines del verano y continúa durante el otoño y el invierno¹¹¹. El pico de $p\text{CH}_4$ en las lagunas claras se observó en verano y otoño, quizás producto de la descomposición de macrófitas sumergidas, y superó el pico de lagunas turbias. Sin embargo, el flujo difusivo de CH_4 fue similar entre regímenes. La diferencia en $p\text{CH}_4$ podría estar entonces relacionada a una menor turbulencia de la columna de agua en las lagunas claras debido a la presencia de macrófitas sumergidas¹¹⁰. Barbosa et al. (2020)¹¹² reportaron resultados similares, con una mayor $p\text{CH}_4$ en sitios con macrófitas sumergidas en comparación con sitios de aguas abiertas, probablemente relacionado con la descomposición de macrófitas sumergidas, pero también con flujos de difusión de CH_4 similares entre ellos. Si bien nosotros no detectamos diferencias en $p\text{CH}_4$ entre sitios en una misma laguna, sí encontramos diferencias entre lagunas turbias –sin macrófitas sumergidas– y lagunas claras –con macrófitas sumergidas. Al mismo tiempo, es importante destacar que las lagunas claras pueden generar una sobresaturación de O_2 disuelto que, a su vez, podría inhibir la actividad de las bacterias metanotróficas en la columna de agua¹¹³ contribuyendo a una mayor $p\text{CH}_4$ en lagunas claras vegetadas.

Los flujos difusivos de CH_4 en nuestro estudio oscilaron entre $0,03 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en invierno y $119,2 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en verano, con el 85 % de los datos en el rango de $0,03$ y $25 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Rangos similares fueron reportados para otra laguna pampeana⁵⁶, para un humedal subtropical somero de Australia¹¹⁴ y para lagunas boreales⁷⁵. Contrariamente, se reportaron valores más bajos para una planicie de inundación amazónica - incluyendo áreas de aguas abiertas, áreas con macrófitas flotantes y áreas de bosque inundado - aunque no hubo diferencias en el flujo de difusión de CH_4 entre hábitats ($0,04$ – $0,97 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ¹¹²). También se informaron valores más bajos para un lago boreal somero - incluidas áreas de aguas abiertas y áreas con vegetación sumergida y emergente⁸² ($0,24$ – $1,1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) –y valores mucho más altos para áreas litorales y pelágicas de lagunas claras y turbias en Uruguay⁵⁷ ($61,3$ – $270,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). El flujo ebulitivo de CH_4 varió desde $0,27 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en invierno hasta $27,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en verano, con una media anual de $4,7 \pm 7,5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Una media anual similar fue reportada para lagunas boreales⁷⁵ ($4,6 \pm 4,1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), para un humedal subtropical australiano¹¹⁴ ($5,5 \pm 9,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), para la zona litoral de una laguna clara vegetada y para la zona pelágica de una laguna turbia de Uruguay⁵⁷ ($5,0 \pm 0,2$ y $3,6 \pm 0,2 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, respectivamente). Sin embargo, se informó una media más baja para un conjunto de cuerpos de agua brasileños¹¹⁵ ($1,1 \pm 2,4 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), para una llanura aluvial amazónica¹¹² ($1,1 \pm 2,6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) y para el litoral sin vegetación de un lago boreal somero⁸² ($1,84 \pm 2,6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), aunque Desrosiers et al. (2022)⁸² también reporta medias más altas en las áreas colonizadas por la macrófita emergente *Typha latifolia* y la macrófita sumergida *Brasenia schreberi* ($6,81 \pm 10,8$ y $15,9 \pm 18,9 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, respectivamente). En nuestro estudio, las lagunas claras y

turbias presentaron flujos de CH₄ difusivos y ebullitivos medios anuales similares, a pesar de sus regímenes contrastantes.

La temperatura subsuperficial del agua resultó un muy buen predictor para casi todas las vías de emisión de GEI. Cabe destacar, sin embargo, que la temperatura como predictora del flujo difusivo de CO₂ en lagunas claras no fue considerada como un predictor *per se*, sino que se considera un indicador indirecto de la biomasa de macrófitas sumergidas: en verano y primavera, cuando las temperaturas son mayores, es el pico de crecimiento de las macrófitas sumergidas, mientras que en otoño e invierno las temperaturas son menores pero a la vez ocurre la descomposición de las macrófitas. Para las lagunas turbias, la temperatura no resultó un buen predictor del flujo difusivo de CO₂, siendo la concentración de O₂ y la Chl_a mejores predictores. Resulta interesante que el flujo difusivo de CO₂ en ambos regímenes estaría predicho por la abundancia de productores primarios, mientras que el flujo de CO₂ de los hábitats con vegetación emergente estaría predicho por la temperatura, posiblemente debido a que cada vía de emisión se encuentra controlada por distintos procesos: mientras que el flujo difusivo de CO₂ estaría vinculado con biomasa de productores primarios, la emisión por macrófitas emergentes estaría relacionado con la actividad heterotrófica en los sedimentos. Respecto a las emisiones de CH₄, otros trabajos también han reportado una fuerte dependencia a la temperatura tanto para la vía difusiva⁷⁵, ebullitiva^{75,116,117} y mediada por macrófitas emergentes^{86,118}. Al graficar la relación lineal entre el log₁₀ del flujo difusivo de CH₄ y la temperatura, la pendiente da una idea de cuan fuerte es la dependencia del proceso con la temperatura. En particular, las vías difusiva y ebullitiva presentaron pendientes mayores en comparación con la vía de macrófitas emergentes, lo que sugiere una mayor dependencia con la temperatura. Valores similares de pendientes para difusión y ebullición de CH₄ fueron reportadas por DelSontro et al. (2016)⁷⁵ para lagunas someras de Quebec.

Las emisiones de GEI provenientes del hábitat con la macrófita emergente *Schoenoplectus californicus* fue una de las principales vías de emisión de GEI. El flujo de CH₄ de los hábitats con macrófitas emergentes representó en promedio el 33 % y el 23 % del total de CH₄ emitido en lagunas claras y turbias, respectivamente. Áreas colonizadas con *S. californicus* en un lago volcánico somero de Centroamérica emitieron en promedio menos CH₄¹¹⁹ (1,9 mmol m⁻² d⁻¹), y asimismo hábitats dominados por otra especie del mismo género (*Schoenoplectus lacustris*) presentaron menores emisiones en pequeños lagos al sur de Finlandia^{118,120} (2,2 y 2,6 mmol m⁻² d⁻¹). También se informaron flujos más bajos en áreas colonizadas por otros dos tipos de macrófitas emergentes, *Juncus kraussii* y *Phragmites australis*, en un humedal australiano¹¹⁷ (1,5 y 1,7 mmol m⁻² d⁻¹, respectivamente). Otros estudios informaron flujos más altos en humedales de EE. UU. colonizados por *Schoenoplectus acutus*¹²¹ (13,1 mmol m⁻² d⁻¹) y por macrófitas emergentes del género *Typha*^{78,122} (13,7 y 15,2 mmol m⁻² d⁻¹). Las

emisiones provenientes de hábitats con macrófitas emergentes combinan flujos difusivos y emisiones mediadas por macrófitas, por lo que en este estudio estimamos los flujos de CH₄ mediados por plantas indirectamente, extrayendo el flujo difusivo de los flujos de hábitats con macrófitas emergentes. Este mismo ejercicio fue realizado por Desrosiers *et al.* (2022)⁸², que informó grandes flujos de CH₄ mediados por macrófitas emergentes que dependieron en gran medida del tipo de macrófita, con promedios de emisiones de $30,3 \pm 30,0 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y $0,62 \pm 1,63 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para *Typha latifolia* y *Brasenia schreberi*, respectivamente. Aunque nuestros resultados sugieren que las macrófitas emergentes emiten CH₄, los flujos fueron relativamente bajos en comparación con el flujo difusivo del agua rodeando las macrófitas emergentes.

Los resultados del presente estudio sugieren un papel relevante e inesperado de *Schoenoplectus californicus* en las emisiones de CO₂, con emisiones de CO₂ diurnas y en todas las estaciones del año, incluso cuando la laguna actuaba como sumidero neto en términos de flujo difusivo de CO₂. Aunque estos resultados parecen contraintuitivos, son plausibles y están respaldados por varias líneas de evidencia. En particular, el balance de masa isotópico realizado a partir de las mediciones provenientes de las cámaras SM indica que se necesita una segunda fuente de CO₂ con una señal isotópica diferente a la del pCO₂ del agua para cerrar el balance, y esta otra fuente posiblemente sea la emisión por emergentes. Por otro lado, el flujo de CO₂ del hábitat con macrófitas emergentes presentó una relación significativa y positiva con la temperatura, a diferencia del flujo difusivo de CO₂, lo que sugiere que estas emisiones dependen de algún proceso relacionado positivamente con la temperatura, como lo es el metabolismo microbiano heterótrofo en los sedimentos. En relación con estos resultados, Bridgham *et al.* (1992)¹²³ reportaron un patrón estacional en el CO₂ producido a partir de la actividad microbiana heterótrofa en suelos de humedales, con tasas mayores en verano y menores en invierno, en coincidencia con los patrones de emisiones de CO₂ observados en los hábitats con macrófitas emergentes. La actividad microbiana heterótrofa en los sedimentos depende de la presencia de materia orgánica en los sedimentos, de la existencia de aceptores de electrones – siendo el O₂ el favorito - y de la concentración de FT y COD, los cuales mejoran la productividad del sedimento^{124,125}. Como se describió anteriormente, las lagunas pampeanas presentan naturalmente niveles muy altos de FT y COD, posiblemente debido a grandes cantidades de materia orgánica detrítica producto de la gran biomasa de productores primarios. Además, las macrófitas emergentes pueden sobrevivir en estos sedimentos anaeróbicos porque transportan O₂ – el aceptor de electrones preferido - desde la atmósfera hasta sus raíces¹⁵. Todos estos factores en conjunto podrían generar un escenario ideal para una alta actividad microbiana en los sedimentos que rodean las raíces de las macrófitas emergentes. De hecho, Feijoó *et al.* (2022)⁵⁵ también detectaron emisión diurna neta de CO₂ por macrófitas emergentes de arroyos pampeanos, lo cual fue relacionado con la actividad heterotrófica de comunidades bacterianas bénticas y epífitas, junto con un efecto de sombreado de

las macrófitas que afectaría negativamente la actividad de microalgas presentes en los sedimentos. Asimismo, Faußer et al. (2016)¹²⁶ han reportado acumulación de CO₂ en el aerénquima de diferentes macrófitas emergentes (*Phragmites australis*, *Scirpus lacustris*, *Cyperus papyrus*, *Typha latifolia*) que no pudo ser explicado por la aireación de las plantas y se relacionó con procesos biológicos ocurriendo en las zonas sumergidas de las macrófitas, tales como la respiración aeróbica y la fermentación anaeróbica. Otro posible proceso dependiente de la temperatura que ocurre en estos sedimentos y que podría explicar las altas emisiones de CO₂, es la oxidación de CH₄ a CO₂¹²⁷. El hecho de que la señal isotópica del CO₂ emitido directamente por las macrófitas emergentes estuviera en el rango de $-26,5 \pm 9,0$ ‰, que es más negativa que la mayoría de las fuentes de carbono terrestres y acuáticas¹²⁸, sugiere que al menos una parte de este CO₂ emitido podría haberse originado a partir de la oxidación de CH₄. Además, recientemente Noyce y Megonigal (2021)¹²⁹ informaron que *Schoenoplectus* tenía en promedio emisiones de CH₄ menores que *Spartina*, y lo relacionaron con una mayor oxidación de la rizósfera para *Schoenoplectus*, género al que denominaron oxidante neto de la rizósfera. En términos generales, los resultados encontrados ponen de manifiesto la relevancia de incluir flujos de CO₂ y CH₄ provenientes de hábitats con macrófitas emergentes dentro de los balances de gas C en cuerpos de agua someros. En particular, también destacan la importancia de considerar los flujos de CO₂ mediados por las macrófitas emergente como una vía de emisión significativa en lagunas someras.

Es importante destacar que todas las mediciones de flujo difusivo de CO₂ en este estudio se realizaron durante el día, pero en lagunas tan productivas como las pampeanas la actividad nocturna puede afectar profundamente estos flujos e incluso revertirlos. Si bien no hay muchos trabajos que hayan explorado emisiones nocturnas, a partir de una revisión de literatura se encontró que las emisiones nocturnas de CO₂ puede superar las emisiones diurnas en sistemas de agua dulce en distintos porcentajes (39 % Attermeyer et al. 2021¹³⁰, 27 % Gómez-Gener et al. 2021¹³¹ y 70 % Liu et al. 2016¹³²). Si aplicamos un factor de corrección por la actividad de CO₂ nocturna obtenido como la media de los porcentajes encontrados en literatura (un aumento nocturno promedio de $54,5 \pm 21,9$ %) a los flujos de CO₂ diurnos medios y ponderados por área ($-1,8 \pm 0,6$ y $4,4 \pm 6,8$ mmol m⁻² d⁻¹ para lagos claros y turbios, respectivamente), nuestras estimaciones diurnas promedio serían del orden de $-1,4 \pm 0,7$ y $5,4 \pm 7,6$ mmol m⁻² d⁻¹ para lagunas claras y turbias, respectivamente. Aunque se trata de una aproximación conservadora, proporciona una idea de la magnitud potencial del efecto nocturno sobre los flujos de difusión de CO₂ en estas lagunas someras.

La contribución de las vías de emisión al balance de gases C difirió entre regímenes: en las lagunas claras, las emisiones por parte de los hábitat con macrófitas emergentes fueron la vía dominante debido a una mayor

cobertura de macrófitas emergentes, mientras que en los lagos turbios la difusión fue la principal vía de emisión debido a una mayor área cubierta por aguas abiertas. Jeffrey et al. (2019)¹¹⁴ reportó que las emisiones del hábitat con vegetación emergente representaron el 59 % de las emisiones anuales de CH₄ en un humedal subtropical australiano, seguidas por la difusión (21%) y la ebullición (20%). Kyzviat et al. (2022)⁸³ también demostraron la importancia de incluir las emisiones de macrófitas emergentes, ya que al considerarlas las estimaciones de emisiones de CH₄ de los lagos incrementaron en más de un 21 % en una región subártico-boreal. En el presente estudio, la emisión de CH₄ del hábitat con vegetación también fue una vía muy importante en las lagunas claras (representando el 46 % de las emisiones de CH₄), pero no así para las lagunas turbias, donde solo representó el 2 % de las emisiones. En contraste, la emisión de CH₄ por difusión representó el 73% de las emisiones en lagunas turbias. Encontramos que la ebullición de CH₄ tuvo una contribución similar entre regímenes, con 32% y 25% para lagunas claras y turbias, respectivamente. Nuestros resultados muestran, además, que los flujos difusivos, ebulitivos y del hábitat con macrófitas emergentes fueron similares entre regímenes (Fig. 1.15), pero que los regímenes difirieron en la contribución relativa de estas vías al balance de gas C total (Fig. 1.21) debido a las diferencias en la cobertura de los respectivos hábitats asociados a estas vías (Fig. 1.20, Tabla S1.4). A pesar de estas diferencias fundamentales en las vías de emisión y en otros aspectos funcionales, el balance radiativo anual medio de los dos regímenes, es decir, el flujo en equivalentes de CO₂, terminó siendo comparable entre regímenes. Esto es relevante en una perspectiva más amplia, porque sugiere que los cambios de estados claros a turbios que han estado ocurriendo en las lagunas pampeanas debido a las presiones climáticas y antrópicas pueden no haber alterado fundamentalmente el forzamiento radiativo regional general, aunque este punto debe ser más explorado. Además, nuestros resultados afirman el papel principal de las macrófitas emergente en la dinámica del CH₄, pero también destacan su papel en los flujos de CO₂, tanto como productores primarios que absorben el CO₂ atmosférico como también como conductores de CO₂ desde los sedimentos a la atmósfera.

INFLUENCIA DE PROCESOS BIOLÓGICOS Y FACTORES FÍSICOS EN LA MODULACIÓN DEL CH₄ DISUELTO EN LAGUNAS CLARAS VEGETADAS Y TURBIAS FITOPLANCTÓNICAS

Introducción

Las macrófitas sumergidas juegan un papel fundamental en el mantenimiento de los regímenes de equilibrio de aguas claras al prevenir la resuspensión de sedimentos, absorber nutrientes de la columna de agua y brindar refugio al zooplancton, entre otros^{28,32,133}. A su vez, las macrófitas sumergidas pueden afectar procesos vinculados con la dinámica de carbono - como la producción primaria total del ecosistema, las tasas de sedimentación de materia orgánica y los niveles de oxígeno en la columna de agua – los cuales afectan las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI)⁶⁰. Sin embargo, no resulta claro el efecto que el régimen alternativo en el que se encuentra una laguna – es decir, dominado por macrófitas sumergidas o por fitoplancton – podría tener sobre la producción, consumo y/o emisión de CH₄⁶⁰. Por un lado, las macrófitas sumergidas podrían estimular la metanogénesis al proporcionar materia orgánica lábil en los sedimentos^{134,135}, pero también se ha reportado que el carbono derivado del fitoplancton puede promover la producción de CH₄^{136,137}. Del mismo modo, los regímenes alternativos podrían tener un efecto diferencial sobre la oxidación del CH₄ (MOX), ya que la actividad de las bacterias oxidantes de CH₄ (BOM) depende principalmente de la concentración de O₂ y de la penetración de la luz en la columna de agua, donde menores concentraciones de O₂ en combinación con una reducción de la luz parecen favorecer la actividad metanotrófica¹³⁸. En este sentido, tanto la vegetación sumergida como el fitoplancton pueden generar altas concentraciones de O₂ y también pueden disminuir, de distinta manera, la penetración de la luz en la columna de agua^{110,139}. Al mismo tiempo, se ha demostrado que la vegetación sumergida disminuye la turbulencia inducida por el viento en la columna de agua^{110,140}, lo que podría disminuir el intercambio de gases con la atmósfera en los regímenes claros vegetados. Por lo tanto, no se puede predecir *a priori* el efecto neto que los procesos biológicos (metanogénesis y metanotrofia) y los factores físicos (intercambio de gases con la atmósfera) vinculados con la presencia de macrófitas o de fitoplancton podrían tener sobre la dinámica de CH₄.

Gran parte de las emisiones de GEI ocurren mediante un flujo difusivo de gases entre el agua y la atmósfera, que depende del gradiente de concentración del gas y de su velocidad de intercambio. La velocidad de intercambio (K) es un parámetro que indica la profundidad de la columna de agua que se equilibra con la presión atmosférica por unidad de tiempo, donde a mayor K habrá mayor intercambio de gases entre el agua y la atmósfera. K no es comparable entre CO_2 y CH_4 debido a las diferencias químicas que existen entre ambos gases, pero es posible estimar una velocidad de intercambio estandarizada (K_{600}) que considera estas diferencias y que, en teoría, debería ser similar entre CO_2 y CH_4 . No obstante, varios trabajos han registrado un desacople entre $K_{600}\text{CH}_4$ y $K_{600}\text{CO}_2$, donde los $K_{600}\text{CH}_4$ son considerablemente mayores que los $K_{600}\text{CO}_2$ ¹⁴¹⁻¹⁴³. Esta diferencia en K_{600} se ha atribuido a la presencia de microburbujas de CH_4 . Las microburbujas de CH_4 se pueden caracterizar como una vía de emisión híbrida entre el flujo ebulitivo y el flujo difusivo^{5,144}, porque por un lado dependen de la concentración de CH_4 en la laguna pero también dependen de la turbulencia en la columna de agua para producirse (Fig. 2.1)¹⁴¹⁻¹⁴³. Cuando las microburbujas de CH_4 están presentes en un cuerpo de agua, generan un flujo adicional de CH_4 a la atmósfera que produce un aumento del $K_{600}\text{CH}_4$ medido y el desacople entre las velocidades de intercambio de CH_4 y CO_2 ^{141,142,144}.

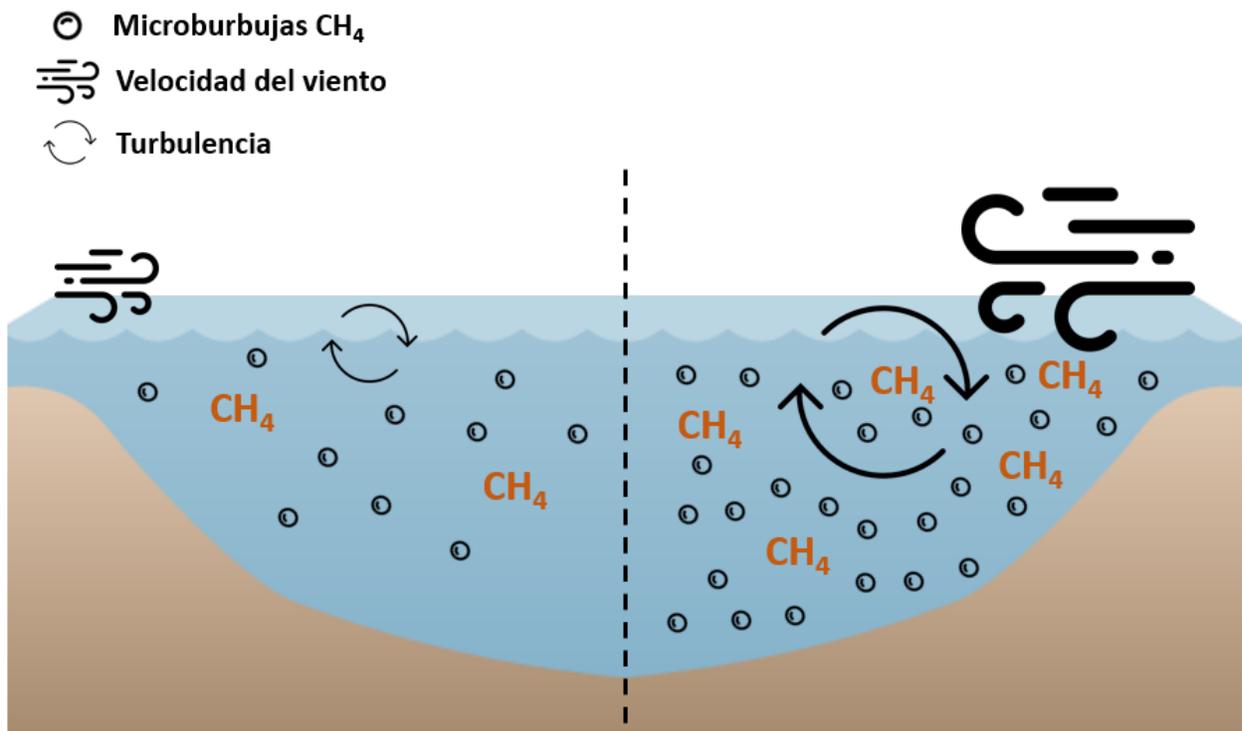


Figura 2.1. Esquema representando dos posibles escenarios en cuanto a la producción de microburbujas de CH_4 . El tamaño del símbolo representa la magnitud del proceso. Izquierda: laguna con una baja $p\text{CH}_4$, baja velocidad del viento y, por ende, baja turbulencia en la columna de agua, lo que conlleva a una menor

formación de microburbujas de CH₄. Derecha: laguna con una mayor pCH₄, mayor velocidad del viento y, por ende, mayor turbulencia, lo que conlleva a una mayor formación de microburbujas de CH₄.

Las emisiones de CH₄ en cuerpos de agua están controladas en gran medida por la actividad de las BOM, que oxidan una parte sustancial del total de CH₄ producido antes de que éste se emita. Las tasas de oxidación de CH₄ dependen de la estratificación de la columna de agua^{145,146}, penetración de la luz¹⁴⁷ y la concentración de materia orgánica disuelta¹³⁸, que afectan la disponibilidad de los sustratos de las BOM (O₂ y CH₄). El grado de metanotrofia en un cuerpo de agua se verá reflejado en la señal isotópica del CH₄ disuelto, dado que la actividad de las BOM sobre el CH₄ disponible produce un fraccionamiento isotópico (α): las bacterias prefieren los isótopos estables más livianos ¹²C-CH₄, dejando un pool de CH₄ disponible enriquecido en el isótopo estable más pesado ¹³C-CH₄ (ecuación 2.1). En consecuencia, los isótopos estables de CH₄ son utilizados para rastrear el grado de metanotrofia en un lago, ya que la señal isotópica permite identificar si el CH₄ es recientemente producido – señal más negativa – u oxidado – señal menos negativa¹⁰.

$$\delta_x = \left[\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{est}}} - 1 \right] 10^3 (\text{‰}) \quad \text{ec. 2.1}$$

Donde δ_x es la señal isotópica, R_{muestra} es la relación entre isótopos estables (¹³C/¹²C) para la muestra relativa a la relación entre isótopos para el estándar R_{aest} (que suele ser el estándar de Vienna Pee Dee Belemnite), expresado en por mil (‰)¹⁰.

La media de pCH₄ en el agua es, entonces, el resultado del balance neto entre las tasas de entrada de CH₄ a la columna de agua – lo cual incluye producción y movimientos laterales –, la oxidación de CH₄ dentro de la columna de agua y el flujo de salida a la atmósfera^{129,148}. Como se mostró en el Capítulo 1, las lagunas claras vegetadas estudiadas presentaron una media anual de pCH₄ mayor que las lagunas turbias fitoplanctónicas, mientras que los flujos difusivos medios anuales de CH₄ fueron similares entre regímenes. Las diferencias observadas entre las medias de pCH₄ podrían deberse a un efecto biológico – como resultado de diferencias en el ingreso de CH₄ y/o de oxidación de CH₄ entre regímenes – y/o deberse a un efecto físico – producto de diferencias en el intercambio de gases con la atmósfera entre regímenes. El objetivo del presente Capítulo es evaluar cuál o cuáles son los factores biológicos y físicos que influyen en las diferencias de pCH₄ media anual registradas entre lagunas claras y turbias de la pampa. Como factores biológicos se estudiarán los patrones de oxidación de CH₄ entre regímenes y se analizarán potenciales diferencias en el ingreso neto de CH₄ entre regímenes. Como factores físicos se explorarán las diferencias en K₆₀₀CH₄ entre regímenes, analizando también la posible presencia de microburbujas de CH₄ en estos sistemas, mediante la comparación de K₆₀₀CH₄ vs K₆₀₀CO₂.

Métodos

Este trabajo se encuentra publicado: **Baliña, S., Sanchez, M. L., & del Giorgio, P. A. (2022).** Physical Factors and Microbubble Formation Explain Differences in CH₄ Dynamics Between Shallow Lakes Under Alternative States. *Frontiers in Environmental Science*, 10, 892339. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.892339>

1. Diseño de muestreo

El diseño de muestreo fue explicado en el Capítulo 1 (páginas 16 - 17).

2. GEI disueltos en el agua y su señal isotópica

La presión parcial de CO₂ y CH₄ disueltos en el agua junto con sus señales isotópicas fueron obtenidas como fue detallado en el Capítulo 1 (páginas 19 - 20)

3. Señal isotópica de burbujas frescas de CH₄

La señal isotópica de burbujas de CH₄ provenientes del sedimento se obtuvo utilizando un embudo invertido (área = 0,3 m²) atado a un dispositivo flotante que se colocó en el agua. Se llenó una botella de vidrio con agua de la laguna, que se enroscó de manera invertida al cuello del embudo. Una vez armado el dispositivo para coleccionar las burbujas, se removieron los sedimentos con un remo provocando la liberación de burbujas frescas – es decir, recientemente formadas – que subieron por la columna de agua y se acumularon en la botella de vidrio. Se tomaron dos muestras de aire de 30 ml del aire en la botella y se inyectó este aire en viales de vidrio pre-evacuados de 30 ml (Exetainer, Labco) para su posterior análisis en un espectrómetro de masa (CRDS, Picarro G2201-i). Se determinó la firma δ¹³C-CH₄ de la misma forma que para los gases disueltos. Para una descripción más detallada del dispositivo colector ver página 24 del Capítulo 1.

4. Flujos difusivos

Los flujos difusivos fueron medidos utilizando cámaras de intercambio como fue explicado en el Capítulo 1 (páginas 21 - 22).

5. Velocidad de intercambio derivada de los flujos difusivos

La velocidad de intercambio de gases (K) es una tasa equivalente a la profundidad de la columna de agua que se equilibra con la atmósfera por unidad de tiempo¹⁴¹. Este parámetro se obtuvo a partir de los flujos difusivos y de la diferencia entre el gas disuelto en el agua y la atmósfera siguiendo la ecuación 2.2:

$$k = \frac{\text{Flujo gas}}{Kh * \Delta p_{Gas}} \quad \text{ec. 2.2}$$

Donde Flujo gas es el flujo difusivo de CH₄ o CO₂ determinado mediante la ecuación 1.4 (mmol m⁻² d⁻¹), Kh es la constante de Henry correspondiente a cada gas corregido para la presión atmosférica y la temperatura del

agua, y Δp_{Gas} es la diferencia entre la presión parcial del gas respectivo en el agua (P_w) y la presión parcial del gas en equilibrio con la atmósfera (P_{eq}), es decir, $\Delta p_{\text{Gas}}(\text{ppmv}) = P_w - P_{\text{eq}}$. Este K se calculó tanto para el CH_4 como para el CO_2 .

Para poder comparar las K_{CH_4} y K_{CO_2} , estas se estandarizaron a un número de Schmidt de 600, siguiendo la ecuación 2.3:

$$K_{600} = \frac{k_{\text{CO}_2 \text{ o } \text{CH}_4}}{(Sc_{\text{CO}_2 \text{ o } \text{CH}_4} / 600)^{-n}} \quad \text{ec. 2.3}$$

Donde Sc es el número de Schmidt de un gas dado a una temperatura dada¹⁴⁹ y n es un valor que depende de la velocidad del viento. Usamos un valor de $n = 2/3$ para velocidades de viento ambientales $< 3,7 \text{ m s}^{-1}$ y de $n = 1/2$ para velocidades de viento ambientales $> 3,7 \text{ m s}^{-1}$ ¹⁵⁰.

6. Estimación de la fracción de oxidación en la columna de agua (F_{ox})

Para explorar las posibles diferencias en la oxidación de CH_4 entre regímenes, se realizaron balances de masa isotópicos utilizando dos modelos diferentes: un modelo abierto de estado estacionario (ecuación 2.4¹⁵¹) y un modelo cerrado de estado no estacionario (ecuación 2.5¹⁵²). Estos modelos estiman una fracción de oxidación (F_{ox}) en base a diferentes supuestos. El primer modelo (ecuación 2.4) asume un sistema de estado estacionario, es decir asume que las variables que definen el comportamiento del sistema no cambian en el tiempo. El segundo modelo (ecuación 2.5) considera que el cuerpo de agua no está en un estado estacionario sino que asume que se encuentra en algún punto de tiempo arbitrario dentro de un gran experimento de incubación¹³⁸.

$$F_{\text{ox}} = \frac{(\delta^{13}\text{C}_{\text{CA}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{fuente}})}{(\alpha - 1) * 1000} \quad \text{ec. 2.4}$$

$$\ln(1 - F_{\text{ox}}) = \frac{(\ln(\delta^{13}\text{C}_{\text{fuente}} + 1000) - \ln(\delta^{13}\text{C}_{\text{CA}} + 1000))}{(\alpha - 1)} \quad \text{ec. 2.5}$$

$\delta^{13}\text{C}_{\text{fuente}}$ es la señal isotópica de la fuente de CH_4 , en este caso la señal isotópica de las burbujas frescas de CH_4 ; $\delta^{13}\text{C}_{\text{CA}}$ es la firma isotópica del CH_4 dentro de la columna de agua; y α es el factor de fraccionamiento isotópico relacionado con la oxidación del CH_4 microbiano. Usamos un valor de $\alpha = 1,021$ siguiendo a Coleman et al. (1981)¹⁵³ y Thottathil et al. (2018)¹³⁸. Además, también calculamos F_{ox} utilizando valores de $\alpha = 1,005$ y $\alpha = 1,031$ para abarcar todo el rango de valores posibles de α ^{10,154,155}.

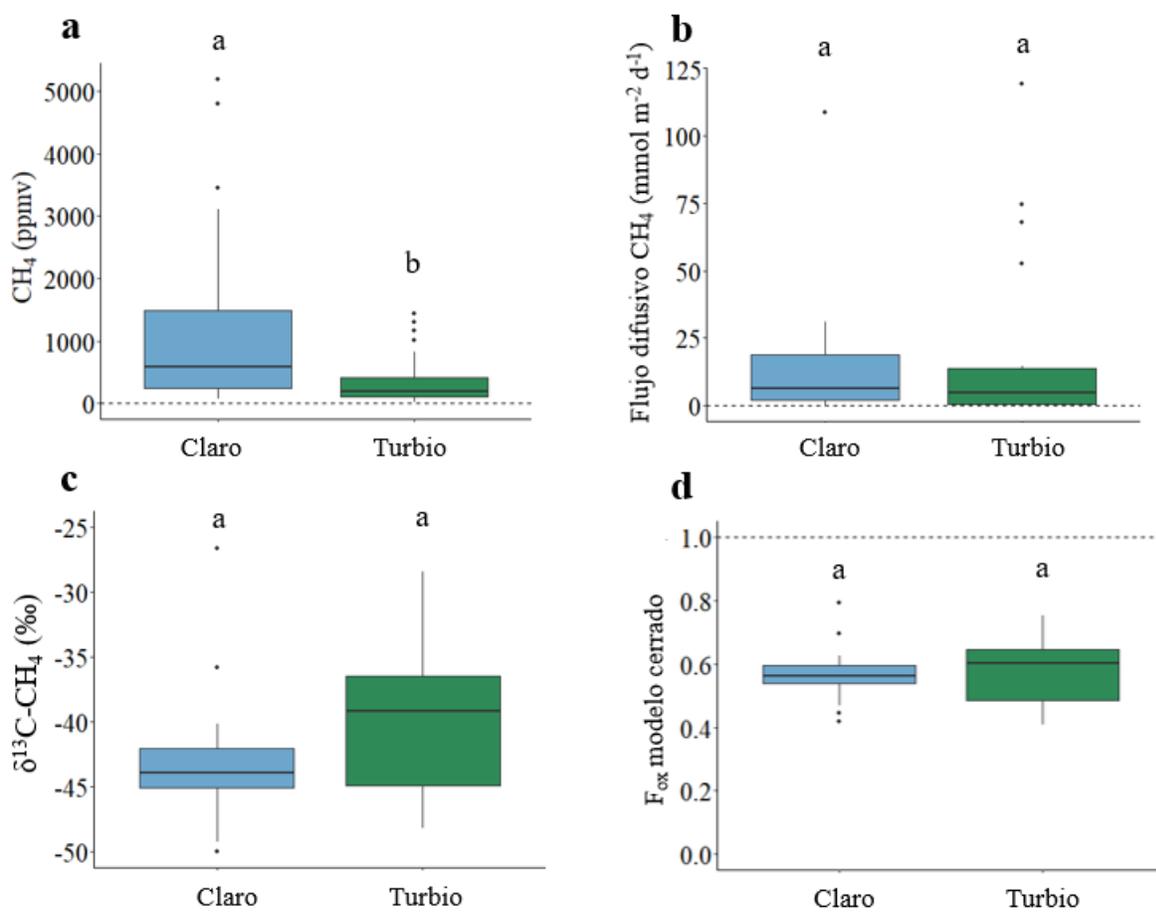
7. Análisis estadísticos

Para explorar las diferencias en la media anual de $F_{\text{ox}} \text{ CH}_4$ entre regímenes, se utilizó un modelo lineal generalizado mixto con un factor fijo Régimen (claro o turbio) y los factores aleatorios Estación (Invierno, Verano, Otoño y Primavera) y Laguna (SG, KH, SA, BU). Dado que F_{ox} es una fracción, se usó la distribución Beta, que tiene un dominio fijo entre 0 y 1. Por otra parte, se analizaron diferencias entre $K_{600} \text{ CO}_2$ y $K_{600} \text{ CH}_4$

usando un modelo lineal general mixto con el factor de efecto fijo Gas (CO_2 o CH_4) y los factores de efectos aleatorios Estación y Laguna. Para evaluar diferencias entre $K_{600} \text{CO}_2$ y $K_{600} \text{CH}_4$ entre regímenes se utilizó un modelo lineal general mixto con el factor fijo Régimen y los factores aleatorios Estación y Laguna. Finalmente, para explorar las relaciones entre $K_{600} \text{CH}_4$ vs viento, $K_{600} \text{CH}_4$ vs $p\text{CH}_4$ y $K_{600} \text{CO}_2$ vs viento, se realizaron regresiones lineales simples para cada régimen, incluyendo en todos los casos los factores aleatorios Estación y Laguna. Para cada modelo se probaron los supuestos correspondientes. Para el modelo de F_{ox} , se analizó la distribución de los residuos estandarizados frente a los valores predichos para explorar la homogeneidad de las varianzas. Para el resto de los modelos, los residuos fueron probados para ajustarse a los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. El modelo que tenía como variable respuesta a F_{ox} se realizó utilizando el paquete `glmmTMB`¹⁵⁶. El resto de los modelos se realizaron utilizando el paquete `lmerTest` 3.1-2¹⁰⁶. La normalidad se comprobó con el paquete `Stats` 3.6.2¹⁵⁷ y la homogeneidad de las varianzas se comprobó explorando la relación entre los residuos estandarizados frente a los valores predichos y también con el paquete `Car` 3.0-8¹⁰⁷. Si no se cumplía la homogeneidad de varianzas, se modeló la heterocedasticidad mediante tres funciones diferentes: `varIdent`, `varPower` y `varExp`¹⁰² utilizando el paquete `nlme` 3.1-142²¹⁹. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia del 95 % utilizando R versión 3.6.2 en el entorno RStudio versión 1.2.5019¹⁰³. Las figuras se graficaron con el paquete `ggplot2` 3.3.2¹⁰⁴.

Resultados

Las lagunas claras vegetadas presentaron una media anual de $p\text{CH}_4$ tres veces mayor que las lagunas turbias fitoplanctónicas ($1181,7 \pm 1375,8$ ppmv y $358,9 \pm 390,4$ ppmv, respectivamente) ($p = 0,002$, $df = 1$, $F = 10,6$; Fig. 2.2a). No obstante, los regímenes presentaron flujos difusivos de CH_4 medios anuales similares ($14,4 \pm 24,2$ y $19,9 \pm 33,5$ mmol $\text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$, respectivamente, Fig. 2.2b). La media anual de $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ para el CH_4 disuelto en la columna de agua fue similar entre regímenes (Fig. 2.2c) y la señal isotópica se corresponde con un CH_4 oxidado, en comparación con la señal isotópica del CH_4 fresco proveniente de los sedimentos (Tabla 2.1). La fracción media anual de oxidación de CH_4 (F_{ox}) - obtenida usando el modelo cerrado de estado no estacionario y asumiendo un fraccionamiento promedio (α) de 1,021 - también fue muy similares entre lagunas claras y turbias (promedio $0,57 \pm 0,09$ y $0,58 \pm 0,11$, respectivamente, figura 2.2d). Cabe mencionar que el modelo abierto de estado estacionario no resultó apropiado para estos sistemas, ya que en varios casos estimó valores de F_{ox} superiores a 1 (Fig. 2.3), un resultado similar al de otros estudios donde se utilizó el modelo abierto de estado estacionario^{24,138,158}. Por otra parte, usando $\alpha = 1,005$ obtuvimos valores de F_{ox} incongruentes para los modelos cerrado y abierto, mientras que usando $\alpha = 1,031$ obtuvimos valores de F_{ox} lógicos para los modelos cerrado y abierto que estaban en el rango de los resultados obtenidos con α de 1,021 (Fig. 2.4).



Figura

2.2. (a) Media anual de $p\text{CH}_4$ disuelto en agua superficial (ppmv), (b) flujo difusivo medio anual de CH_4 ($\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$), (c) firma isotópica media anual de CH_4 (‰) y (d) (F_{ox}) obtenido con el modelo cerrado no estacionario, en lagunas claras vegetadas (azul) y turbias fitoplanctónicas (verde). Letras diferentes señalan diferencias significativas entre regímenes dentro de cada panel. La línea punteada en el panel (a) corresponde a la presión parcial anual media de CH_4 en la atmósfera (1,71 ppmv), en el panel (b) corresponde a un flujo difusivo de CH_4 cero y en el panel (d) corresponde a una oxidación del 100%.

Tabla 2.1. Señal isotópica media anual de burbujas frescas de $\text{CH}_4 \pm$ desviación estándar para ambos regímenes.

$\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$	Media anual \pm desvío estándar
Claro vegetado	$-62,21 \pm 0,14$
Turbio fitoplanctónico	$-59,81 \pm 1,11$

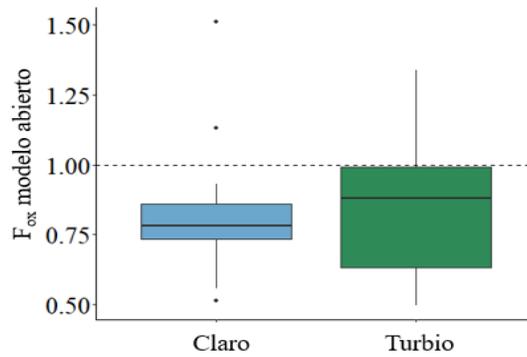


Figura 2.3. Fracción de oxidación (F_{ox}) obtenida usando $\alpha = 1,02$ y un modelo abierto de estado estacionario.

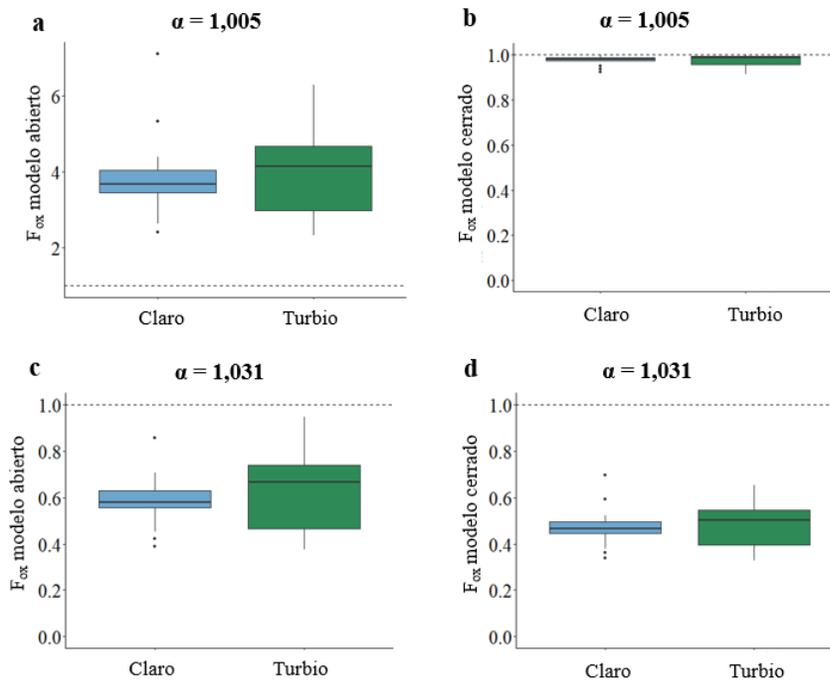


Figura 2.4. Fracción de oxidación (F_{ox}) obtenida usando (a) $\alpha = 1,005$ para el modelo abierto de estado estacionario, (b) $\alpha = 1,005$ para el modelo cerrado de estado no estacionario, (c) $\alpha = 1,031$ para el modelo abierto de estado estacionario y (d) $\alpha = 1,031$ para el modelo cerrado de estado no estacionario. Las lagunas claras vegetadas están en azul mientras que las lagunas turbias fitoplanctónicas se encuentran en verde. La línea punteada corresponde a un $F_{ox} = 1 = 100\%$ oxidación.

El rango de $K_{600} CO_2$ y $K_{600} CH_4$ obtenido fue muy amplio (de 0,3 a 59,8 $m d^{-1}$) y, aunque el 32% de las observaciones de ambos valores fueron similares, hubo una alta proporción de puntos que se desviaron significativamente de la relación esperada 1:1 (Fig. 2.5). La mayor parte de los puntos que se desviaron corresponden a las lagunas turbias fitoplanctónicas (Fig. 2.5). El $K_{600} CH_4$ medio anual incluyendo datos de ambos regímenes ($12,7 \pm 15,1 m d^{-1}$) fue significativamente mayor (6,4 veces) que el $K_{600} CO_2$ medio anual

incluyendo datos de ambos regímenes ($1,98 \pm 1,43 \text{ m d}^{-1}$), ($p < 0,0001$, $gl = 1$, $F = 19,7$; Fig. 2.6a). También hubo diferencias analizando los patrones de intercambio de gases en cada régimen por separado: el $K_{600} \text{ CH}_4$ medio anual fue 3 veces mayor en lagunas turbias ($19,3 \pm 18,9 \text{ m d}^{-1}$) que en lagunas claras ($6,7 \pm 7,0 \text{ m d}^{-1}$) ($p = 0,0092$, $df = 1$, $F = 7,5$, Fig. 2.6b), mientras que la media anual de $K_{600} \text{ CO}_2$ fue similar entre lagunas claras y turbias ($2,0 \pm 1,5 \text{ m d}^{-1}$ y $2,0 \pm 1,4 \text{ m d}^{-1}$, respectivamente, Fig. 2.6c).

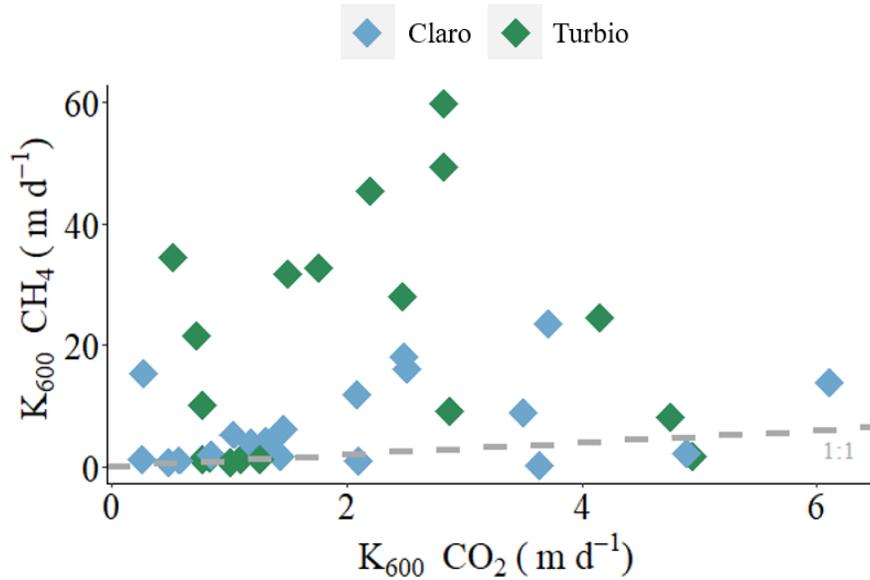


Figura 2.5. Regresión lineal entre $K_{600} \text{ CH}_4$ (m d^{-1}) y $K_{600} \text{ CO}_2$ (m d^{-1}). La línea punteada representa la relación 1:1 esperada entre las velocidades de intercambio estandarizadas. Los diamantes azules corresponden a las lagunas claras vegetadas y los diamantes verdes corresponden a las lagunas turbias fitoplanctónicas.

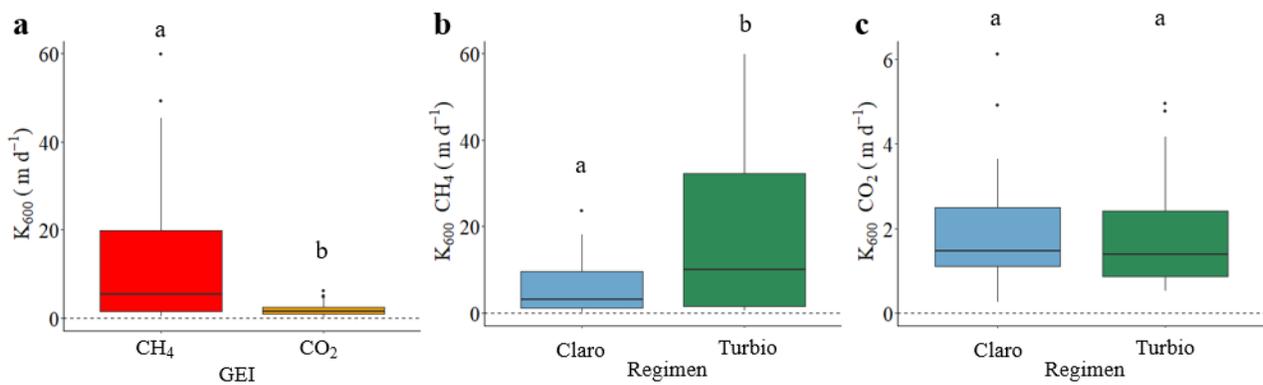


Figura 2.6. (a) $K_{600} \text{ CH}_4$ y $K_{600} \text{ CO}_2$ para ambos regímenes, (b) $K_{600} \text{ CH}_4$ para lagunas claras y turbias por separado y (c) $K_{600} \text{ CO}_2$ para lagunas claras y turbias por separado. Letras diferentes señalan diferencias significativas dentro de cada panel. La línea punteada en los tres paneles corresponde a una velocidad de intercambio cero.

Se detectó una relación positiva significativa entre $K_{600} \text{ CO}_2$ y la velocidad del viento (Fig. 2.7a) y también entre $K_{600} \text{ CH}_4$ y la velocidad del viento (Fig. 2.7b) en lagunas turbias, pero estas relaciones no fueron significativas para lagunas claras. Cabe señalar que las relaciones observadas en las lagunas turbias entre $K_{600} \text{ CH}_4$ y $K_{600} \text{ CO}_2$ con la velocidad del viento difirieron significativamente entre sí: la pendiente de la relación viento vs. $K_{600} \text{ CH}_4$ ($4,9 \pm 1,9$) fue un orden de magnitud mayor que la de viento vs. $K_{600} \text{ CO}_2$ ($0,4 \pm 0,1$). Con respecto a la relación de los K_{600} con la presión parcial de los GEI disueltos, $p\text{CO}_2$ se relacionó débil y negativamente con $K_{600} \text{ CO}_2$ tanto en lagunas claras como turbias (Fig. 2.7c). Del mismo modo, se registró una relación negativa débil (pero no significativa) entre $p\text{CH}_4$ ambiental y $K_{600} \text{ CH}_4$ en lagunas claras vegetadas; mientras que hubo una fuerte relación positiva significativa entre $p\text{CH}_4$ y $K_{600} \text{ CH}_4$ en lagunas turbias fitoplanctónicas (Fig. 2.7d).

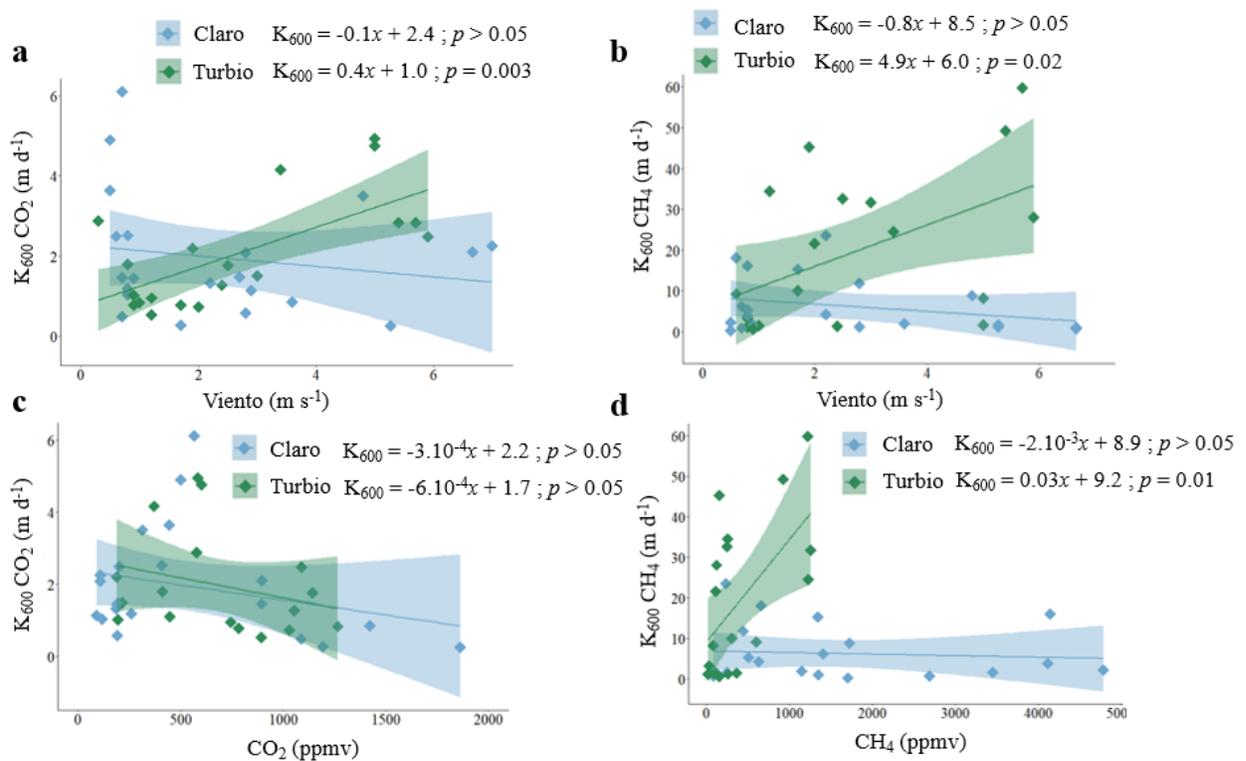


Figura 2.7. Regresiones lineales entre (a) velocidad del viento vs $K_{600} \text{ CH}_4$, (b) velocidad del viento vs $K_{600} \text{ CO}_2$, (c) $p\text{CH}_4$ vs $K_{600} \text{ CH}_4$ y, (d) $p\text{CO}_2$ vs $K_{600} \text{ CO}_2$. Los diamantes azules corresponden a las lagunas claras vegetadas, mientras que los diamantes verdes corresponden a las lagunas turbias fitoplanctónicas. La sombra corresponde al error estándar de los respectivos modelos lineales y los valores de p corresponden a la significancia de la pendiente de cada modelo de regresión.

Discusión

En el presente capítulo se exploró la influencia de procesos biológicos y factores físicos en la dinámica de CH_4 en las lagunas claras vegetadas y turbias fitoplanctónicas de la llanura pampeana. Se analizó la señal isotópica

del CH₄ fresco y del CH₄ presente en la columna de agua, para estimar el grado de metanotrofia en cada régimen. También se analizó el flujo difusivo de CH₄ entre la atmósfera y el agua en cada régimen, combinando ambos procesos biológicos – oxidación y difusión – para estimar el grado de ingreso de CH₄ en lagunas claras y turbias. Asimismo se calculó la velocidad de intercambio de CH₄ y CO₂, con el fin de explorar la relación física entre estas velocidades de intercambio y la velocidad del viento, y también con la concentración de dichos gases en el agua. Por último, se compararon las velocidades de intercambio de CO₂ y CH₄ para evaluar la presencia de microburbujas de CH₄.

La ¹³C-CH₄ del agua en lagunas claras vegetadas y turbias fitoplanctónicas se encontró entre -50‰ y -25‰, lo cual se corresponde con un CH₄ enriquecido – es decir, oxidado -. Estos valores, en conjunto con los porcentajes de oxidación registrados (alrededor de 57%), implican la existencia de una alta actividad metanotrófica en los dos regímenes estudiados. En coincidencia con estos valores, otros autores han reportado rangos comparables de δ¹³C-CH₄ para un lago somero subtropical de Australia¹¹⁴ (-53‰ y -39‰) y para lagos boreales someros⁸² (-60‰ y -35‰). Respecto a los valores de F_{ox}, Desrosiers et al. (2021)⁸² reportó rangos más amplios para diferentes tipos de hábitat dentro de un lago boreal somero, también obtenidos utilizando un modelo de estado no estacionario, con valores que oscilaron entre el 34% y el 56% en hábitats dominados por *Brasenia* y *Typha* y hasta el 31% en áreas de aguas abiertas. Por su parte, otros autores informaron distintos rangos de valores de F_{ox} para cuerpos de agua subtropicales¹¹⁴ (15% - 36%), tropicales¹⁵⁸ (34% - 100%), boreales²⁴ (57% - 75%) y templados¹³⁸ (2% - 97%). Es decir que existe una alta variabilidad en valores de F_{ox}, tanto dentro de distintos hábitats de un sistema acuático como entre distintos sistemas acuáticos, lo cual destaca la complejidad en la regulación de la oxidación del CH₄. Teniendo en cuenta el amplio rango de valores posibles en distintos sistemas acuáticos, es llamativa la similitud en la media anual de F_{ox} entre los regímenes claro y turbio a pesar de las condiciones ambientales contrastantes que presentan. Esto podría estar indicando que las diferencias existentes entre regímenes se complementan, llevando a un patrón de oxidación de CH₄ similar entre lagunas claras vegetadas y turbias fitoplanctónicas.

Como se ha mencionado en el Capítulo 1, tanto las lagunas claras como las turbias presentaron variaciones estacionales en pCH₄, pero las medias anuales de pCH₄ fueron muy diferentes para cada régimen. Suponiendo que dichas medias anuales reflejen una presión parcial media de estado estacionario para cada régimen – es decir, que no varía año a año –, entonces la cantidad de CH₄ intercambiada en la interfase agua-aire a lo largo del año estaría dada por el CH₄ que ingresa a la columna de agua (producción de CH₄ en sedimentos, agua e ingresos laterales) menos el CH₄ oxidado. Teniendo en cuenta que la media anual de F_{ox} y la media anual de flujo difusivo fueron similares entre regímenes, podemos inferir que la entrada media anual de CH₄ sería

comparable entre regímenes. En este sentido, la producción de CH₄ en los sedimentos depende principalmente de la temperatura, la concentración de oxígeno y la cantidad y tipo de materia orgánica^{76,159}. Se sabe que la materia orgánica derivada tanto de macrófitas como del fitoplancton favorece la metanogénesis^{134,160}, pero no se ha podido determinar si la dominancia de una u otra fuente de materia orgánica podría afectar diferencialmente el ciclo de carbono y la metanogénesis a nivel ecosistémico, ya que son pocos los estudios que han evaluado este impacto⁶⁴. Por ende, es plausible inferir que ambos regímenes tengan ingresos similares de CH₄ a nivel ecosistémico, a pesar de no haber medido explícitamente la producción de CH₄ en los sedimentos. Independientemente de la producción de CH₄ en sedimentos, varios autores han demostrado que también existe producción de CH₄ en la columna de agua^{19,20,22}. Si bien hay estudios que han explorado posibles señales isotópicas para este CH₄ sintetizado en la columna de agua^{21,161}, hasta la fecha no hay información precisa sobre cuál podría ser la señal isotópica del CH₄ pelágico. Por este motivo no se pudo incluir esta fuente de producción pelágica de CH₄ en el balance de masa isotópico del presente estudio. No obstante, consideramos que para el objetivo de este estudio es suficiente incluir solamente la fuente de producción de CH₄ en los sedimentos.

Respecto a las velocidades de intercambio registradas, K₆₀₀ CH₄ fue 6,4 veces mayor que K₆₀₀ CO₂. En línea con estos resultados, otros autores han reportado K₆₀₀ CH₄ en promedio 1,8 veces mayor que K₆₀₀ CO₂ en dos lagos boreales¹⁶², 2,3 veces mayor en un embalse hidroeléctrico canadiense y lagos boreales¹⁴¹, 2,5 veces mayor en un lago oligotrófico de Alemania¹⁴², y 2,5 veces mayor en un embalse tropical de Brasil¹⁶³. En todos los casos, las diferencias entre las velocidades de intercambio de CH₄ y CO₂ fueron atribuidas a la presencia de microburbujas de CH₄, que dan como resultado un K₆₀₀ CH₄ mayor que el ocasionado solamente por el intercambio difusivo^{141,144} generando un desacople entre K₆₀₀ CH₄ y K₆₀₀ CO₂^{141,142}. Teniendo en cuenta estos antecedentes, los resultados encontrados en el presente estudio indicarían que en las lagunas pampeanas también se registra la presencia de microburbujas de CH₄. Además, observamos que las lagunas turbias presentaron K₆₀₀ CH₄ mayores que las lagunas claras, lo que sugiere una formación diferencial de microburbujas de CH₄ entre regímenes. Se ha propuesto que las microburbujas de CH₄ se producen como producto de la combinación de sobresaturación de CH₄ y turbulencia en la columna de agua^{141,142,164}. Aunque las lagunas claras presentaron una media anual de pCH₄ mayor que las lagunas turbias, la media anual de pCH₄ registrada fue alta en ambos regímenes e incluso mayor que en otros sistemas donde se reportaron microburbujas de CH₄¹⁴¹⁻¹⁴³. Por ende, tanto las lagunas claras como las turbias podrían presentar microburbujas de CH₄ en términos de la cantidad de CH₄ presente en la columna de agua. Por el contrario, la turbulencia de la columna de agua podría ser sustancialmente distinta entre regímenes: - como lo demuestra la relación diferente que existe entre K₆₀₀ CO₂ y la velocidad del viento- en lagunas claras vegetadas la

vegetación sumergida tendería a limitar la turbulencia en la columna de agua, mientras que en lagunas turbias fitoplanctónicas la ausencia de vegetación sumergida permitiría una mayor turbulencia^{110,140}. Esta diferencia podría ocasionar una mayor formación de microburbujas de CH₄ en lagunas turbias, explicando las diferencias observadas entre los K₆₀₀ de ambos regímenes.

La mayoría de los modelos para constantes de intercambio en lagos han reportado la existencia de una relación positiva entre K₆₀₀ y la velocidad del viento^{150,165,166} y, en presencia de microburbujas de CH₄, también se ha reportado una relación positiva entre K₆₀₀CH₄ y pCH₄¹⁴¹. En las lagunas turbias, tanto K₆₀₀CO₂ como K₆₀₀CH₄ se relacionaron positivamente con la velocidad del viento pero de forma diferente (en términos de pendiente), lo que implica la presencia de microburbujas de CH₄. En las lagunas claras vegetadas, por el contrario, ni K₆₀₀CH₄ ni K₆₀₀CO₂ se relacionaron significativamente con el viento, sin embargo, K₆₀₀CH₄ fue mayor que K₆₀₀CO₂ lo que también indica la formación de microburbujas de CH₄ en estas lagunas. La relación positiva y esperada entre K₆₀₀CH₄ y pCH₄ en lagunas turbias fitoplanctónicas es consistente con un patrón de formación de microburbujas inducida por el viento, que se intensifica al aumentar la sobresaturación de CH₄. La ausencia de esta relación en lagunas claras podría indicar que esta interacción entre el viento y el pCH₄ se ve suprimida en ambientes con vegetación sumergida. Por otra parte, K₆₀₀CO₂ se relacionó débil y negativamente con pCO₂ en ambos regímenes de manera similar – en términos de su pendiente. Esta relación negativa es la esperada considerando el rol modulador que la velocidad de intercambio tiene sobre las concentraciones de gases ambientales: a mayor velocidad de intercambio, habrá mayor intercambio con la atmósfera y eso llevará a una menor presión parcial del GEI en el agua, lo cual ha sido reportado para lagos¹⁶⁷ y ríos¹⁶⁸. En las lagunas turbias fitoplanctónicas, entonces, la combinación de viento y pCH₄ estaría determinando los valores registrados de K₆₀₀CH₄. Sin embargo, en lagunas claras vegetadas el intercambio de gases está en gran medida desacoplado del viento y, bajo esta circunstancia, se establece una relación recíproca entre pCH₄ y K₆₀₀. Por un lado, la velocidad de intercambio estaría ocasionando mayores pCH₄ porque las macrófitas sumergidas limitan el intercambio entre el agua y la atmósfera. Por otro lado, pCH₄ también parece influir en K₆₀₀CH₄, porque mayores pCH₄ estarían conllevando a K₆₀₀CH₄ mayores a través de la formación de microburbujas. Por lo tanto, en las lagunas claras vegetadas la vegetación sumergida parecería influir doblemente en la dinámica de GEI: directamente al modular el efecto del viento en la turbulencia de la columna de agua y, por ende, en la velocidad de intercambio de gases, pero también indirectamente al alterar la dinámica de formación de microburbujas y de intercambio de CH₄.

Otros estudios han descripto un fuerte impacto de las macrófitas en el intercambio de gases en lagunas. Kosten et al. (2016)¹⁶⁹ reportaron una menor velocidad de intercambio de CH₄ en presencia de vegetación

flotante en comparación con sitios de aguas abiertas, donde el mayor $p\text{CH}_4$ detectado debajo de la vegetación flotante fue en parte explicado por un K menor. Asimismo, Barbosa et al. (2020)¹¹² informaron que hábitats vegetados y de aguas abiertas en un lago de llanura aluvial tropical tenían flujos difusivos de CH_4 similares, pero que los hábitats con macrófitas sumergidas tenían mayor $p\text{CH}_4$, lo que estaba relacionado con un K mayor en los sitios de aguas abiertas. Martinsen et al. (2020)¹⁷⁰ observaron, en un lago pequeño y somero, un $K\text{CO}_2$ menor cuando las macrófitas sumergidas eran más abundantes y relacionaron esta observación con un efecto negativo de la vegetación en el mezclado de la columna de agua. En nuestro caso, la media anual de $K_{600}\text{CO}_2$ no difirió entre regímenes pero, como se señaló anteriormente, la relación entre $K_{600}\text{CO}_2$ y el viento difirió notablemente entre regímenes. Un desacople casi total entre velocidad de intercambio y la velocidad del viento se ha reportado en numerosos estudios realizados en cuerpos de agua pequeños¹⁷¹⁻¹⁷³, donde los modelos basados en el viento^{13,174,175} no explicaron adecuadamente los patrones observados en el intercambio de gases y donde otros factores - como la convección - tuvieron una mayor influencia en las velocidades de intercambio de gases. En las lagunas turbias fitoplanctónicas del presente estudio, la velocidad del viento fue un buen predictor de $K_{600}\text{CO}_2$ y $K_{600}\text{CH}_4$, pero en lagunas claras vegetadas la vegetación sumergida parece desacoplar esta relación, por lo que el uso de la velocidad del viento no sería un buen predictor de las velocidades de intercambio en estos sistemas.

Considerando todo lo previamente discutido, podemos deducir que los resultados del presente estudio implican un ingreso medio anual de CH_4 a la columna de agua comparable entre regímenes, inferido por la similitud en los flujos difusivos medios anuales de CH_4 y en la F_{ox} de CH_4 media anual. También se observó que la media anual de $p\text{CH}_4$ en lagunas claras vegetadas fue 3 veces mayor que en lagunas turbias fitoplanctónicas, mientras que la media anual de $K_{600}\text{CH}_4$ en lagunas turbias fue 3 veces mayor que en lagunas claras. Adicionalmente, la mayor $K_{600}\text{CH}_4$ en lagunas turbias presentó una relación positiva con el viento y con $p\text{CH}_4$, mientras que no se encontraron estas relaciones en las lagunas claras vegetadas. Por lo tanto, la mayor $p\text{CH}_4$ en lagunas claras vegetadas podría explicarse por su menor $K_{600}\text{CH}_4$ y también por la ausencia de una relación entre $K_{600}\text{CH}_4$ y el viento, lo que sugiere una menor formación de microburbujas de CH_4 . Estos patrones parecerían estar mayormente vinculados con un efecto físico producido por la vegetación sumergida sobre la mezcla de la columna de agua en lagunas claras vegetadas: una reducción de la turbulencia de la columna de agua conduciría a una menor velocidad de intercambio y también a una reducción de la formación de microburbujas de CH_4 , lo que en consecuencia ocasiona una mayor $p\text{CH}_4$ en la columna de agua (Fig. 2.8). Además, mientras que $p\text{CO}_2$ está controlado por $K_{600}\text{CO}_2$, como se esperaba, $p\text{CH}_4$ parece estar controlado diferencialmente según el régimen: en lagunas claras $p\text{CH}_4$ estaría controlada principalmente por el intercambio de gases, pero además $K_{600}\text{CH}_4$ está en cierta medida también influido por $p\text{CH}_4$, debido a la

formación de microburbujas. En las lagunas turbias fitoplanctónicas, $p\text{CH}_4$ parece influir en $K_{600} \text{CH}_4$ a través de la formación de microburbujas de CH_4 impulsadas por el viento, pero también hay un control del $K_{600} \text{CH}_4$ sobre el $p\text{CH}_4$ (Fig. 2.8). Por lo tanto, los procesos físicos más que los biológicos parecen estar controlando las diferencias observadas en la media anual de $p\text{CH}_4$ entre lagunas claras vegetadas y turbias fitoplanctónicas.

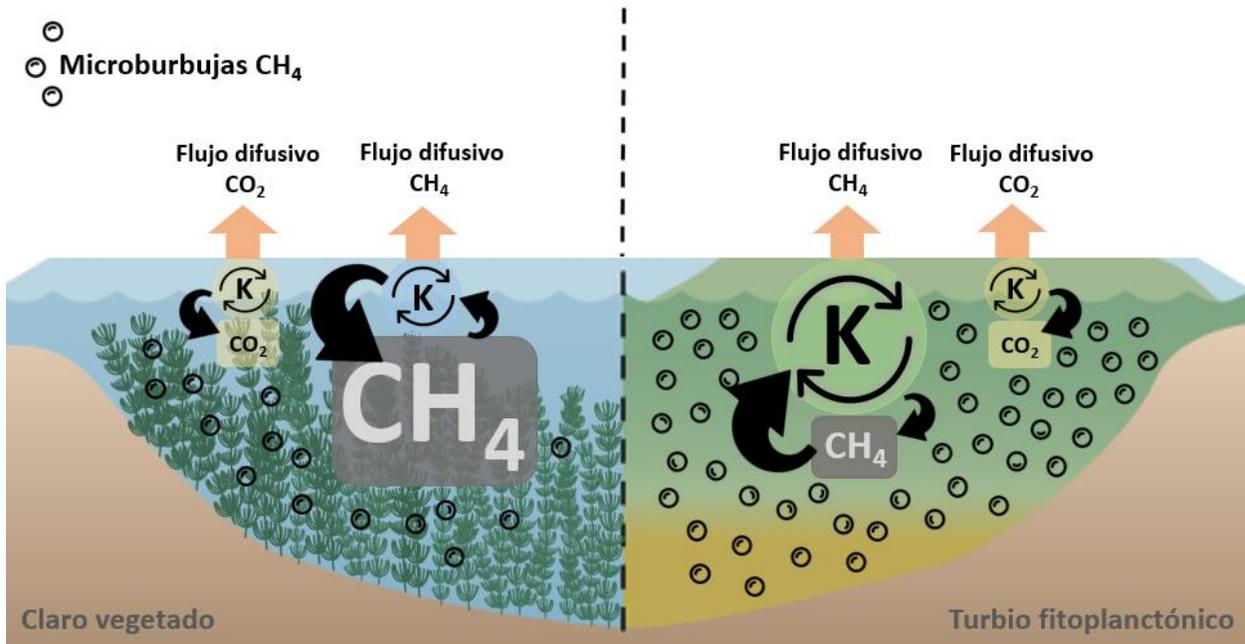


Figura 2.8. Esquema conceptual de los resultados observados y posibles mecanismos que los expliquen. El tamaño de las flechas y de las letras indica la magnitud del proceso y/o de la concentración. Los regímenes presentaron un flujo difusivo medio anual de CO_2 , $p\text{CO}_2$ y $K_{600} \text{CO}_2$ similares. También presentaron un flujo difusivo medio anual de CH_4 similar, pero las lagunas claras vegetadas presentaron una media anual de $p\text{CH}_4$ mayor que las lagunas turbias. Esta diferencia en el $p\text{CH}_4$ medio anual entre regímenes puede relacionarse con los menores valores de $K_{600} \text{CH}_4$ medio anual registrados en las lagunas claras, donde la vegetación sumergida podría estar reduciendo la turbulencia inducida por el viento y por ende, la formación de microburbujas de CH_4 .

PRODUCCIÓN ÓXICA DE METANO Y SU CONTRIBUCIÓN A LAS EMISIONES TOTALES DE METANO EN LAGUNAS DE LA LLANURA PAMPEANA

Introducción

El paradigma tradicional de producción de metano (CH_4) en sistemas acuáticos indica que el CH_4 es producido únicamente por arqueas metanogénicas bajo condiciones anóxicas, a través de la vía hidrogenotrófica o acetoclástica (Conrad 2005, 2009). Este concepto se deriva del hecho de que las arqueas metanogénicas no pueden tolerar el O_2 porque desestabiliza su complejo enzimático F420-hidrogenasa, que participa como transportador de electrones en la metanogénesis¹⁷⁶. Sin embargo, varios estudios han observado una supersaturación de CH_4 en aguas superficiales de sistemas marinos (p. ej., ^{177,178}) y continentales (p. ej., ^{16,22}), que no puede ser sostenida únicamente por la metanogénesis en los sedimentos. La contraposición entre la teoría y las observaciones generaron la denominada “paradoja del CH_4 ”, que motivó a investigadores a cuestionarse la posible existencia de metanogénesis en la columna de agua. Esta fue denominada producción óxica de metano (POM), considerando que ocurre en la columna de agua pero no necesariamente ocurre bajo condiciones óxicas, como argumenta Tang et al. (2016)¹⁴³. En las últimas dos décadas numerosos estudios reportaron la existencia de POM en sistemas acuáticos, tanto bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas, y mediada por distintos mecanismos¹⁷⁹. Las evidencias de POM desafían el paradigma tradicional de metanogénesis en sistemas acuáticos y, teniendo en cuenta que los ecosistemas acuáticos contribuyen en un 53 % al total de emisiones globales de CH_4 ⁵⁹, resulta esencial comprender la magnitud y significancia de POM en el ciclo del CH_4 en sistemas acuáticos continentales.

Varios autores han reportado producción aeróbica de CH_4 como subproducto de la descomposición de metilfosfonatos (MPn) por heterótrofos aeróbicos, tanto en aguas marinas^{177,180} como continentales¹⁸¹⁻¹⁸³. De manera similar, se ha informado que la desmetilación aeróbica y anaeróbica del dimetilsulfoniopropionato (DMSP) conduce a la producción de metanotiol en aguas marinas, con la consiguiente liberación de CH_4 ¹⁷⁸. También se ha indicado que el metabolismo aeróbico de la metilaminas (MeA) es una fuente de metanogénesis en lagos¹⁸⁴, e incluso se propuso que todas las células vivas pueden producir CH_4 mediante un mecanismo común desencadenado por hierro libre y especies reactivas del oxígeno¹⁸⁵. También hay evidencia

creciente de una relación positiva entre POM y las comunidades fitoplanctónicas, tanto a escala ecosistémica como experimental¹⁷⁹. Por otra parte, Grossart et al. (2011)²² detectaron arqueas metanogénicas en la columna de agua que se encontraban en micro nichos anóxicos proporcionados por el fitoplancton, produciendo CH₄ de la forma tradicional pero en la columna de agua. Asimismo, varios trabajos han indicado una relación positiva entre POM y producción primaria a escala ecosistémica^{20,21,161,186}, lo que indicaría un vínculo directo entre la actividad de productores primarios y POM. En línea con estas observaciones, se ha demostrado experimentalmente que las diatomeas, las criptofitas¹⁹, las cianobacterias^{23,187}, las haptofitas y algunas especies de microalgas marinas¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ producen CH₄, y esta producción depende de la exposición a la luz y a la temperatura^{23,190}. Pérez-Coronel y Beman (2022)¹⁹¹ exploraron la existencia de POM utilizando incubaciones experimentales de agua dulce y encontraron producción de CH₄ tanto por cianobacterias como por degradación de MPn. En este sentido, como destaca Donis et al. (2017)¹⁹², la evidencia parece indicar que existen múltiples fuentes de POM y estas pueden estar actuando en simultáneo, y/o variar entre sistemas, como también depender de la exposición a la luz y/o del estado trófico del cuerpo de agua.

Independientemente del mecanismo involucrado, el debate también se centra en cuál sería la tasa de POM a escala ecosistémica y si ésta contribuiría significativamente a las emisiones totales de CH₄ de sistemas acuáticos continentales. Para responder a estas preguntas, algunos autores realizaron balances de masa de lagos^{18,19,161,192} y de mesocosmos²⁰, mientras que otros realizaron incubaciones experimentales^{16,19,22,191,192}. Las tasas de metanogénesis reportadas varían desde ~0,01 μM d⁻¹ a ~0,52 μM d⁻¹, en ambos casos tratándose de lagos templados estratificados¹⁸, lo que destaca la enorme variabilidad en tasas de POM incluso en ecosistemas similares. La contribución de POM al total de emisiones de CH₄ se ha explorado en algunos lagos templados durante períodos estratificados, donde la POM proveniente de la capa de mezcla superficial representó hasta aproximadamente el 90% de las emisiones de CH₄ a la atmósfera, dependiendo del lago^{18,19,192}. Cabe señalar que hasta el momento POM y su contribución a las emisiones totales de CH₄ han sido explorados solamente en sistemas templados estratificados, por lo que realizar más estudios en otros tipos de sistemas es sumamente necesario para tener una mejor comprensión de la significancia de POM en la dinámica del CH₄.

Otra fuente de debate en la comunidad científica es la señal isotópica derivada del CH₄ producido por POM, dado que no se sabe si la misma sería distinta a la señal del CH₄ producido por metanogénesis clásica¹⁷⁹. Utilizando balances de masa isotópicos, Thottathil et al. (2022)¹⁸ informaron valores para cuatro lagos canadienses que estuvieron enriquecidos en comparación con la fuente de CH₄ en los sedimentos: -38,0 ± 1,4 ‰ hasta -63,6 ± 2,2 ‰. En línea con esto, Klintzsch et al. (2023)¹⁸⁷ exploraron la señal isotópica del CH₄ producido directamente por diferentes cultivos fitoplanctónicos y los valores oscilaron entre -19,3 ± 0,9 ‰

para *Synechococcus sp.* a $-54,5 \pm 1,6$ ‰ para *Prochlorococcus marinus*. Si bien hasta el momento son pocos los estudios realizados, la evidencia parece indicar que la señal derivada de POM estaría enriquecida respecto de la metanogénesis clásica.

En el presente capítulo, nuestro objetivo fue detectar y cuantificar POM mediante experimentos a campo en tres lagunas eutróficas, polimícticas y templadas de la Llanura Pampeana, Buenos Aires, Argentina, que presentan distinta abundancia y composición de fitoplancton. La hipótesis planteada es H) existe producción de CH₄ en los mesocosmos de las lagunas Pampeanas estudiadas, mientras que la predicción asociada es P) la concentración de CH₄ disuelto en los mesocosmos de las lagunas Pampeanas estudiadas será mayor que la esperada si solo existiera oxidación y difusión de CH₄.

Métodos

1. Area de estudio

Los experimentos a campo se llevaron a cabo en tres lagunas localizadas en la Llanura Pampeana de Buenos Aires, Argentina. Las lagunas estudiadas fueron La Salada (SA), El Burro (BU) y La Segunda (SG), las cuales ya fueron descritas y estudiadas en los capítulos anteriores (Fig. 3.1). Como se ha mencionado, estas lagunas son someras (menos de tres metros de profundidad), polimícticas y naturalmente eutróficas o hipereutróficas. SA y BU se encuentran en un régimen fitoplanctónico turbio - dominado por fitoplancton, con alta turbidez y sin macrófitas sumergidas -, mientras que SG se encuentra en un régimen vegetado claro - dominado por macrófitas sumergidas, con baja biomasa fitoplanctónica y baja turbidez. Además de diferir en la abundancia fitoplanctónica, las lagunas claras y turbias difieren en la composición de la comunidad fitoplanctónica: las lagunas turbias suelen presentar comunidades menos diversas, frecuentemente dominadas por Chlorophyta y/o Cyanobacteria, mientras que las lagunas claras tienden a presentar comunidades más diversas, conformadas por Chlorophyta, Cyanobacteria, Cryptophyta, Bacillariophyta y Chrysophyta^{38,193,194}. Independientemente de su estado turbio o claro, estas lagunas presentaron distintas abundancias y composiciones de fitoplancton.

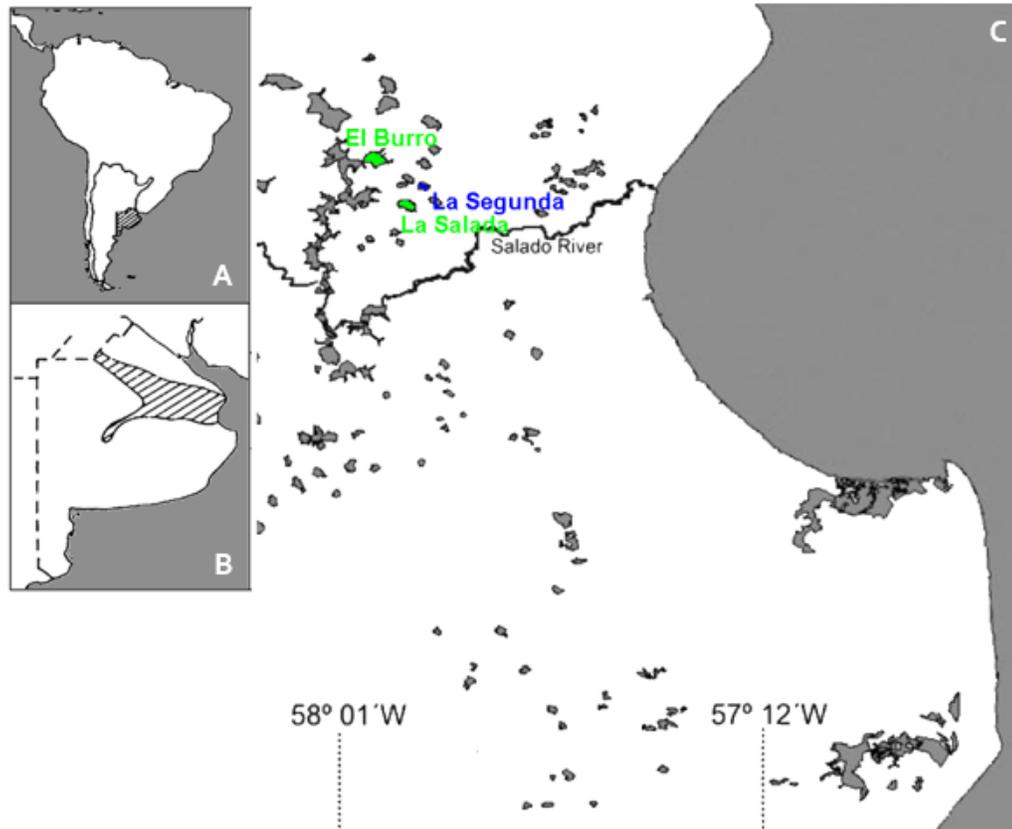


Figura 3.1. A) Argentina, B) Buenos Aires, C) Area de estudio. Se realizaron experimentos a campo en las lagunas turbias El Burro y La Salada (verde) y en la laguna clara vegetada La Segunda (azul).

2. Diseño experimental

Los experimentos a campo se realizaron entre el 25 de enero y el 6 de febrero del año 2021. En cada laguna se colocaron tres (SA) o cuatro (SG y BU) mesocosmos, uno al lado del otro. Los mismos se construyeron con el mismo material polietileno utilizado por Bogard et al. (2014)²⁰, que permite el paso de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) pero no de los gases disueltos (Fig. 3.2). Las dimensiones de cada mesocosmos eran de 0,8 m de profundidad y 1 m de ancho. Se encontraban cerrados en el fondo para excluir la producción de CH₄ en los sedimentos y abiertos en la superficie para permitir el muestreo de estos. Además, tenían un dispositivo flotante, una barrera de protección transparente de 0,1 m para evitar que el agua del lago ingresara al mismo y se encontraban anclados en los sedimentos para evitar que se movieran (Fig. 3.2). La profundidad promedio de las lagunas al momento de los experimentos fue de 1,34 m, 0,90 m y 0,88 m para SA, SG y BU, respectivamente.

Los mesocosmos se llenaron con agua de la laguna mediante el siguiente procedimiento: se tomó agua a 0,2 m por debajo de la interfaz agua: aire utilizando una bomba Proactive Pump II (Water Spout 2®, Proactive

Environmental Products[®]). En uno de sus extremos, la bomba tomaba el agua de la laguna con una velocidad de 4 gal min^{-1} , mientras estaba conectada a una batería que proporcionaba la energía, y en el otro extremo estaba conectada a un tubo plástico que tenía una roseta para dispersar el agua. Esta roseta se utilizó para degasificar el agua que venía de la laguna y de esta manera disminuir la concentración de CH_4 con la que se iniciaba el experimento para poder detectar más fácilmente cambios en su concentración. Luego de ser degasificada, y previo al llenado de los mesocosmos, el agua se filtró a través de una red de $55 \mu\text{m}$ de poro para excluir el micro y meso-zooplancton. El llenado de cada mesocosmo tomó aproximadamente 20min. En el caso de la laguna SG, no se colocaron macrófitas sumergidas dentro de los mesocosmos, dado que el objetivo era evaluar la producción de CH_4 por la comunidad fitoplanctónica.

Una vez instalados todos los mesocosmos, se colocaron sensores de alta frecuencia de O_2 y T° (miniDO₂T, Precision Measurement Engineering, Inc.[®]) dentro de cada uno de ellos y también en la laguna. Los miniDOT se ubicaron a 0,4 m de profundidad, tanto en los mesocosmos como en la laguna, y para evitar que se movieran se ataron a varillas ubicadas entre los mesocosmos. Estos dispositivos midieron temperatura ($^\circ\text{C}$), oxígeno disuelto (mg L^{-1}) y saturación de oxígeno (%) cada 5 minutos a lo largo de todo el experimento.

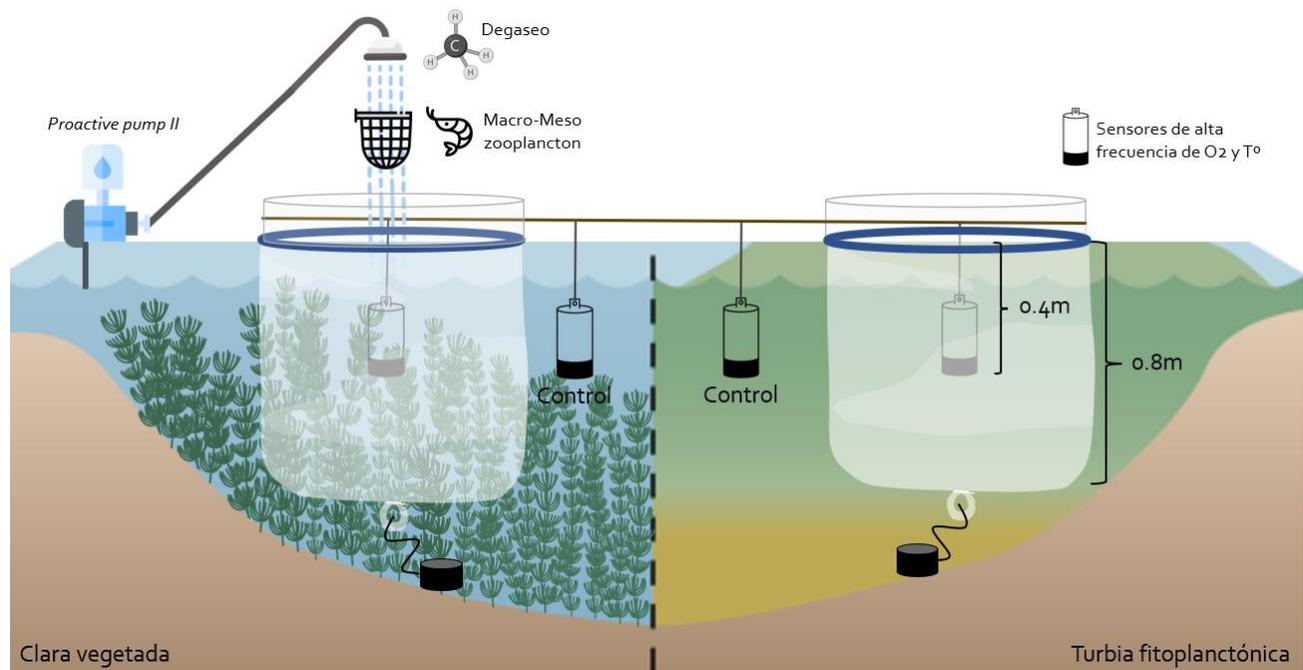


Figura 3.2. Esquema del diseño experimental en una laguna clara vegetada (izquierda) y turbia fitoplanctónica (derecha). Con la bomba se llenaron los mesocosmos. El agua fue degasada y se filtró el macro y meso-zooplancton antes de ingresar al mesocosmo. Tanto dentro de los mesocosmos como en la laguna, se colocaron sensores de alta frecuencia de O_2 y T° .

Los mesocosmos se instalaron en SA entre los días 25 de enero y 28 de enero, en SG entre 29 de enero y 5 de febrero y en BU entre 2 de febrero y 6 de febrero, del año 2021. Por lo tanto, en SA se dejaron por tres días, en SG por siete días y en BU por cuatro días. Las diferencias en los días del experimento entre lagunas se debieron a cuestiones logísticas y meteorológicas. La descripción detallada de los parámetros muestreados según el día puede verse en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Descripción del muestreo dependiendo el día del experimento.

Parámetros limnológicos	Instalación (T0)	24hs luego T0	Final del experimento	Días intermedios
Disco secchi		✓	✓	
Perfil de O ₂ y T	✓	✓	✓	✓
pH	✓	✓	✓	✓
Turbidez		✓	✓	
STS		✓	✓	
FT y NT		✓	✓	
COD, CID, MODC		✓	✓	
Perfil irradiancia	✓	✓	✓	
Chla		✓	✓	
Fitoplancton		✓	✓	
AND ambiental		✓	✓	
CO ₂ and CH ₄ disuelto	✓	✓	✓	✓
CO ₂ and CH ₄ isotopos	✓	✓	✓	✓
Flujo difusivo CO ₂ y CH ₄		✓	✓	
Incubaciones MOX		✓		
Parámetros atmosféricos	Instalación (T0)	24hs luego T0	Final del experimento	Días intermedios
T ^º	✓	✓	✓	✓
Presión	✓	✓	✓	✓
Humedad	✓	✓	✓	✓
Velocidad viento	✓	✓	✓	✓

3. Variables limnológicas

Los perfiles de O₂ y T^º, la turbidez, los sólidos totales en suspensión (STS), el fósforo total (FT), nitrógeno total (NT), carbono orgánico e inorgánico disuelto (COD, CID, respectivamente), clorofila a (Chla) y la abundancia de fitoplancton fueron analizados siguiendo los mismos métodos ya detallados en el Capítulo 1 (págs. 19 y 20). La presión atmosférica, la humedad relativa y la velocidad del viento fueron medidos utilizando un Kestrel (Kestrel, 4000 Pocket Weather Tracker®, Nielsen-Kellerman®).

La tasa de producción primaria bruta (PPB) y la tasa de respiración (R) fueron estimadas a partir de las mediciones de los miniDOT utilizando el paquete StreamMetabolizer en el ambiente de R studio¹⁹⁶, una descripción más detallada se encuentra en la sección 9.

4. GEI: gases disueltos, isótopos y flujos difusivos

El CO₂ y CH₄ disueltos en el agua fueron medidos mediante la técnica de headspace, siguiendo los mismos métodos detallados en el Capítulo 1 (págs. 21 y 22) y utilizando la ecuaciones 1.2 y 1.3. Las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro de masa (Picarro G2201-i) para obtener las presiones parciales (ppmv) de los GEI y sus ¹³C-CH₄ and ¹³C-CO₂. Los valores originales de ppmv y de ¹³C-CH₄ and ¹³C-CO₂ fueron calculados siguiendo a Soued and Prairie (2020)¹⁹⁵ y, posteriormente, ppmv fue convertida a μM siguiendo a Koschorreck et al. (2021)⁹⁴.

Los flujos difusivos de CO₂ y CH₄ en la interfaz agua: aire se midieron utilizando una cámara flotante opaca, siguiendo los métodos descritos en el Capítulo 1 (págs. 23 y 24) y la ecuación 1.4.

Las velocidades de intercambio (K) fueron calculadas utilizando los datos de gases disueltos y los flujos difusivos, como ya se describió en el capítulo 2 (página 53), mediante la ecuación 2.2. Los valores obtenidos de K fueron estandarizados a un número de Schmidt de 600 (página 53), mediante la ecuación 2.3.

Asumiendo que los mesocosmos se encuentran completamente mezclados – lo cual es posible teniendo en cuenta su baja profundidad – se puede expresar K₆₀₀ como una constante de evasión (K_{eva}) al dividir K₆₀₀ por la profundidad del mesocosmo (0,8m) siguiendo la ecuación 3.1.

$$K_{eva} = \frac{K_{600 CH4}}{prof} \quad ec. 3.1$$

Donde K_{eva} es la constante de evasión de CH₄ (hr⁻¹), K_{600 CH4} es la velocidad estandarizada de intercambio para CH₄ obtenida mediante la ec. 3 y *prof* es la profundidad del mesocosmo (0.8m). K_{eva} será posteriormente utilizado para los balances de masa de los mesocosmos.

5. Tasa de oxidación de CH₄

Las bacterias metanotróficas oxidan una porción sustancial del total de CH₄ producido antes de ser emitido^{138,196}, por lo que es crucial cuantificar este proceso. Para estimar la tasa de oxidación de CH₄ (MOX) se suelen realizar incubaciones experimentales en oscuridad, dado que en ausencia de luz no habría POM y solamente ocurre respiración y oxidación de CH₄^{113,197}. Por tanto, se realizaron incubaciones experimentales en oscuridad con agua de la laguna y de los mesocosmos, por separado. Para ello, 24hs luego de haber instalado los mesocosmos, se llenó un bidón de 5L con agua de la laguna y otro con agua de los mesocosmos,

evitando que queden burbujas de aire dentro del bidón. Los bidones fueron llevados al laboratorio y cada uno de ellos fue usado para llenar 8 erlenmeyers de 500ml, también asegurando no dejar ninguna burbuja de aire dentro de los erlenmeyers. Todos los erlenmeyers fueron cerrados con un tapón de silicona y cinta de teflón, para evitar el intercambio de gases entre el agua y la atmósfera. Cada set de 8 erlenmeyers fue colocado dentro de una conservadora con agua a una temperatura similar a la de las lagunas, y tapados para asegurar que los frascos estuvieran en oscuridad (Fig. 3.3). Posteriormente, se midió por duplicado la concentración de CO_2 y CH_4 junto con $^{13}\text{C-CH}_4$ and $^{13}\text{C-CO}_2$ de dos erlenmeyers, lo cual fue considerado como el tiempo cero de la incubación. Luego se tomaron muestras de dos erlenmeyers – cada uno también por duplicado - cada 24hs durante 72hs, obteniendo un total de 4 tiempos por duplicado (Fig. 3.4).



Figura 3.3. Incubación de los erlenmeyers dentro de la conservadora. Cada uno de ellos contenía agua de la laguna o de los mesocosmos y estaba cerrado con un tapón de silicona y cinta teflón para evitar el intercambio de GEI con el aire atmosférico.

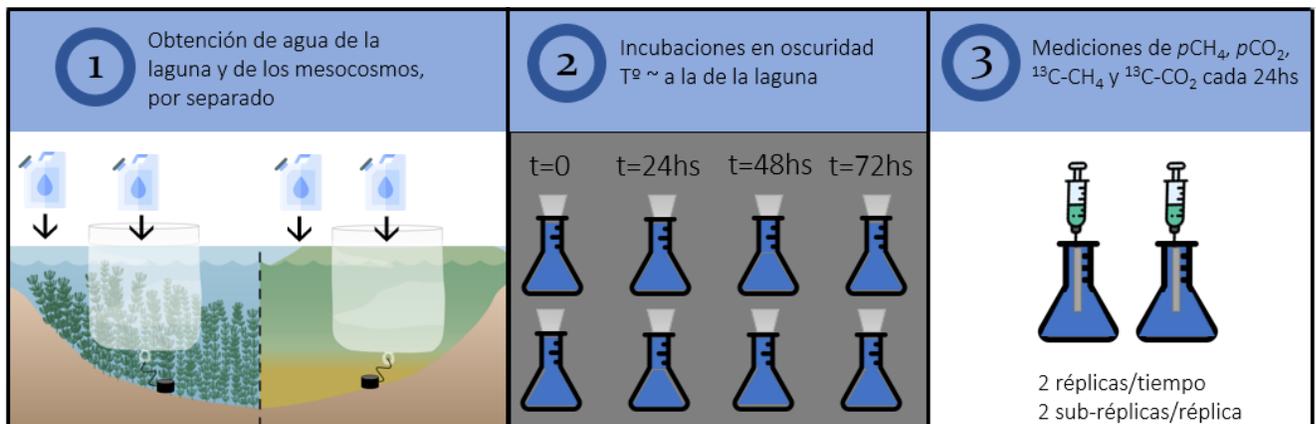


Figura 3.4. Esquema de las incubaciones en oscuridad para estimar la tasa de oxidación de CH_4 utilizando agua de cada laguna y de los mesocosmos.

Dado que la oxidación de CH₄ a través de organismos metanotrofos sigue un decaimiento de tipo exponencial, la constante de oxidación (K_{oxi} , hr⁻¹) se obtiene como la pendiente de la regresión entre Ln (CH₄) (μM) Vs. Tiempo (hr). K_{oxi} se utilizará posteriormente utilizada para el cálculo de los balances de masa (ver sección 6). Para el caso de la laguna BU, hubo un punto que no se correspondía bien con el resto y se decidió extraerlo. Por ende, SG y SA presentan una regresión con cuatro puntos, mientras que BU presenta una regresión con tres puntos.

6. Balances de masa de los mesocosmos

Para estimar la tasa de POM de cada laguna, se realizaron balances de masa de los mesocosmos. Dado que los mesocosmos estaban cerrados en el fondo y que los gases no atravesaban el material plástico con el que estaban fabricados, se considera que cualquier fuente de producción de CH₄ detectada debe provenir del interior de los mesocosmos. Por lo tanto, el cambio de CH₄ observado en los mesocosmos entre dos puntos de tiempo consecutivos será el resultado del potencial CH₄ producido, menos el CH₄ oxidado y el CH₄ difundido a la atmósfera (ecuación 3.2). Si no hubiera ninguna fuente de producción de CH₄ dentro de los mesocosmos, luego de cierto tiempo la concentración de CH₄ en los mismos se equilibraría con la presión atmosférica.

$$\Delta CH_4 = POM - (MOX + EVA) \quad ec.3.2$$

Donde ΔCH_4 es el cambio de CH₄ observado en los mesocosmos entre dos tiempos consecutivos, *POM* es la producción óxica de CH₄, *MOX* es la tasa de oxidación de CH₄ y *EVA* es la tasa de evasión de CH₄ a la atmósfera.

El componente POM de la ecuación 3.2 no puede ser medido directamente, pero puede ser estimado indirectamente a partir del resto de los componentes del balance de masa, que sí fueron medidos: la concentración de CH₄ fue medida en los mesocosmos a cada tiempo; MOX se obtiene a partir de las incubaciones en oscuridad de CH₄ (sección 5); y EVA se obtiene a partir de las cámaras de intercambio (sección 4). Los datos de concentración de CH₄ disuelto a cada tiempo permiten obtener una curva empírica temporal del comportamiento del CH₄ en cada mesocosmos. Esta curva puede luego ser comparada con curvas teóricas que predigan cuál debería ser la concentración de CH₄ en los mesocosmos a cada tiempo si solo actuaran procesos de pérdida de CH₄ por oxidación (ecuación 3.3), por evasión (ecuación 3.4) o ambos (ecuación 3.5). Para construir estas curvas teóricas, se calculó por un lado la constante de oxidación K_{oxi} a partir del MOX, y por otro lado la constante de evasión K_{eva} a partir del flujo difusivo. Si la curva empírica es mayor que la curva teórica incluyendo pérdida de CH₄ por oxidación y por evasión (ec. 8) entonces habría más CH₄ del esperado, proporcionando evidencia de POM.

$$[CH_4_t] = [CH_4_{t0}] * \exp^{(-K_{oxi}*t)} \quad ec. 3.3$$

$$[CH_4_t] = [CH_4_{t0}] * \exp^{(-K_{eva}*t)} \quad ec. 3.4$$

$$[CH_4_t] = [CH_4_{t0}] * \exp^{-(K_{oxi}+K_{eva})*t} \quad ec. 3.5$$

Donde $[CH_4_t]$ corresponde a la concentración de CH_4 modelada a un determinado tiempo t (μM), $[CH_4_{t0}]$ corresponde a la concentración empírica de CH_4 a tiempo 0 del experimento a campo (μM), K_{oxi} corresponde la constante de oxidación (hr^{-1}) – la constante de oxidación mencionada en la sección 5 - K_{eva} corresponde a la constante de evasión (hr^{-1}) – la constante de evasión mencionada en la sección 4 – y t corresponde a un determinado tiempo (hr).

El balance de masa de la ecuación 3.2 puede ser resuelto de varias formas, pero en este caso se decidió usar una aproximación por integrales: se calculó el área debajo de la curva obtenida a partir de la ec.8, que incluye $[CH_4 \text{ oxidado} + \text{difundido}]$; y el área debajo de la curva observada, que incluye $[CH_4 \text{ producido} - (\text{oxidado} + \text{difundido})]$. Para integrar la curva observada, dado que no proviene de una ecuación conocida, utilizamos una aproximación de estimación por fragmento calculando el área de cada polígono y luego sumándolos (Fig. 3.5). Mientras que la integral de la ecuación 3.5 resultó en la ecuación 3.6.

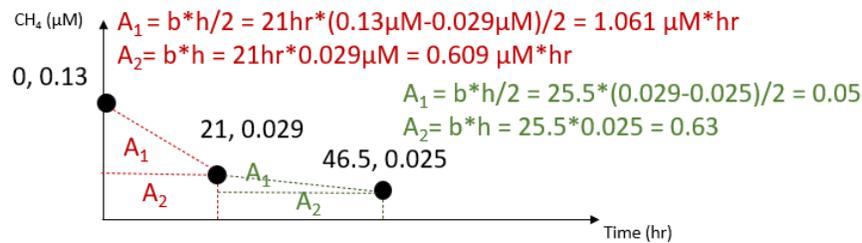


Figura 3.5. Esquema de cómo se resolvió la integral de la curva empírica por estimación de fragmentos.

$$CH_4_t = \left(\frac{CH_4_i}{K_{(oxi+eva)}} \right) * [1 - e^{(-K_{oxi+eva} * Tf)}] \quad ec. 3.6$$

Donde CH_4_i es la concentración de CH_4 en los mesocosmos al iniciar el experimento (μM), $K_{(oxi+eva)}$ son las constantes de evasión y oxidación sumadas (hr^{-1}) y Tf es el tiempo al final del experimento (hr).

El resultado de la integral de cada curva indica la cantidad total de CH_4 (μM) debajo de esa curva: en el caso de la curva observada la cantidad total de CH_4 incluye $[CH_4 \text{ producido} - (\text{oxidado} + \text{difundido})]$, mientras que en la curva teórica la cantidad total de CH_4 incluye $[CH_4 \text{ oxidado} + \text{difundido}]$. Si restamos el CH_4 obtenido de la curva teórica al CH_4 acumulado en la curva observada, obtenemos una estimación del CH_4 producido por OMP. Si luego dividimos ese valor por el tiempo total del experimento (hr), obtenemos una tasa de POM en $\mu M \text{ hr}^{-1}$, que luego puede ser convertida a $\mu M \text{ d}^{-1}$.

Posteriormente, evaluamos las incertidumbres de POM aplicando la propagación de error simple mediante la ecuación 3.7.

$$\sigma_{POM} = \sqrt{(\sigma A)^2 + (\sigma B)^2 + (\sigma C)^2 + \dots} \quad ec.3.7$$

Donde σ_{POM} es la incertidumbre asociada a POM y $\sigma A, \sigma B, \sigma C$, etc. son las incertidumbres asociadas a cada uno de los componentes del balance de masa de la ec.5. La incertidumbre del flujo difusivo de CH₄ y de MOX se estimó como el error estándar de las múltiples mediciones de cada componente en cada laguna. De manera similar, la incertidumbre del CH₄ empírico disuelto se estimó como el error estándar de las mediciones realizadas a cada tiempo.

7. Contribución de POM a las emisiones totales de CH₄ (OMC, por sus siglas en inglés *Oxic methane contribution*)

Para estimar la contribución de POM al total de emisiones de la laguna, comparamos la tasa de POM de cada laguna con el flujo difusivo de CH₄ de la laguna (ecuación 3.8). Para ello, fue necesario convertir el flujo de POM desde unidad volumétrica (μM d⁻¹) a unidad de superficie (mmol m⁻² d⁻¹), teniendo en cuenta que los mesocosmos tenían un volumen de 628L y una superficie de intercambio de 0,785 m².

$$OMC (\%) = \frac{(POM * 100)}{FL} \quad ec.3.8$$

Donde *OMC* es la contribución de POM al total de las emisiones del lago (%), *POM* es la tasa de producción de CH₄ dentro del mesocosmos en unidades de superficie (mmol m⁻² d⁻¹) y *FL* es el flujo difusivo de CH₄ promedio de la laguna (mmol m⁻² d⁻¹).

8. Balance de masa isotópico de los mesocosmos

El objetivo principal de un balance de masa isotópico es corregir por el fraccionamiento isotópico que generan determinados procesos sobre la señal observada a campo. Por ejemplo, en la oxidación de CH₄ por bacterias metanotróficas las mismas prefieren oxidar moléculas con isótopos livianos (¹²C) frente a pesados (¹³C), lo que genera una acumulación de isótopos pesados en el pool de CH₄ restante: a esto se le llama fraccionamiento isotópico y cada proceso relacionado con la dinámica del CH₄ genera un fraccionamiento distinto. Por lo tanto, para estimar ¹³C-CH₄ del CH₄ producido por POM, realizamos un balance de masa isotópico que involucró dos pasos. Primero, corregimos ¹³C- CH₄ medida en los mesocosmos a cada tiempo por el fraccionamiento isotópico producto de la oxidación y de la evasión de CH₄, de manera tal de eliminar el efecto de fraccionamiento isotópico que generan estos dos procesos. Posteriormente, estos valores ya corregidos por

fraccionamiento isotópico fueron a su vez corregidos por la $^{13}\text{C-CH}_4$ del agua que se utilizó para llenar los mesocosmos al inicio del experimento.

Para la primer corrección, fue necesario calcular el factor de fraccionamiento de oxidación (α_{ox}) de cada laguna utilizando información obtenida a partir de las incubaciones en oscuridad. Se graficó $\text{Ln}(\text{CH}_4)$ vs $\text{Ln}(\text{}^{13}\text{C-CH}_4 + 1000)$, y se utilizó la pendiente de dicha ecuación para calcular α_{ox} mediante la ecuación 3.9. Esto fue realizado para cada laguna por separado.

$$\alpha_{ox} = \frac{\text{pendiente}}{1 + \text{pendiente}} \quad \text{ec. 3.9}$$

Como factor de fraccionamiento isotópico de evasión (α_{eva}) se utilizó el valor 1,0008, obtenido por bibliografía¹⁹⁸. Posteriormente, $^{13}\text{C-CH}_4$ medida a cada tiempo en los mesocosmos fue corregida mediante la ecuación 3.10.

$$\delta\text{CH}_4_{corr} = \frac{\text{Evasion}}{\text{Evasion} + \text{MOX}} * (\delta\text{CH}_4_{amb} - (\alpha_{eva})) + \frac{\text{MOX}}{\text{Evasion} + \text{MOX}} * (\delta\text{CH}_4_{amb} - (\alpha_{oxi})) \quad \text{ec. 3.10}$$

Donde δCH_4_{corr} corresponde a $^{13}\text{C-CH}_4$ corregida por el fraccionamiento producto de la oxidación y evasión de CH_4 , *Evasion* y *MOX* corresponden a las tasas de evasión y oxidación para cada tiempo ($\mu\text{M d}^{-1}$), δCH_4_{amb} corresponde a $^{13}\text{C-CH}_4$ en el mesocosmo a cada tiempo (‰), α_{oxi} y α_{eva} corresponden a los factores de fraccionamiento por oxidación y evasión, respectivamente, y se encuentran en permil ($\alpha_{eva}(\text{permil}) = (\alpha_{eva} - 1) * 1000$).

Una vez corregida por oxidación y evasión, δCH_4_{corr} fue corregida por la $^{13}\text{C-CH}_4$ del agua de la laguna que se utilizó para llenar los mesocosmos, siguiendo la ecuación 3.11.

$$\delta\text{CH}_4_{POM} = \frac{(\text{CH}_4_{zero} * \delta\text{CH}_4_{zero}) + (\text{CH}_4_{Tx} * \delta\text{CH}_4_{corr Tx})}{(\text{CH}_4_{zero} + \text{CH}_4_{Tx})} \quad \text{ec. 3.11}$$

Donde δCH_4_{POM} corresponde a la $^{13}\text{C-CH}_4$ de POM (‰), CH_4_{zero} es la concentración de CH_4 al tiempo cero del experimento (μM), δCH_4_{zero} es la $^{13}\text{C-CH}_4$ del CH_4 al tiempo cero del experimento (‰), CH_4_{Tx} es la concentración de CH_4 a un tiempo t del experimento (μM) y $\delta\text{CH}_4_{corr Tx}$ es la $^{13}\text{C-CH}_4$ del CH_4 a ese tiempo t, que ya fue corregida por oxidación y evasión (‰).

9. Metabolismo ecosistémico

Con el objetivo de estimar las tasas de producción primaria bruta (PPB), respiración ecosistémica (RE) y producción neta ecosistémica (PNE), se colocaron sensores de alta frecuencia de O_2 y T^9 (miniDO₂T, Precision Measurement Engineering, Inc.®) en la laguna y los mesocosmos. En la laguna – control – se colocó un solo sensor y luego se colocó un sensor en cada uno de los mesocosmos, en todos los casos a 0,4m del pelo de

agua. Las mediciones de O₂ y T⁹ ocurrieron cada 5 minutos, entre tres a siete días, dependiendo de la laguna. Las tasas de metabolismo ecosistémico fueron calculadas basándose en un modelo diurno de O₂ de sistema abierto¹⁹⁹, donde los cambios en la concentración de O₂ son función de PPB, RE y el intercambio de O₂ en la interfaz agua: aire (K_{O2}), siguiendo la ecuación 3.12²⁰⁰.

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{GPP}{Z_{epi}} + \frac{ER}{Z_{epi}} + K_{O_2}(O_{2\ sat} - O_2) \quad ec. 3.12$$

Donde Z_{epi} es la profundidad del epilimnion, pero en nuestro caso sería la profundidad del mesocosmo (0,8m). $O_{2\ sat}$ es la concentración teórica de O₂ en saturación, considerando la temperatura y presión atmosférica *in situ*. O_2 es la concentración medida empíricamente en el agua. Una descripción detallada de las ecuaciones del modelo puede verse en Hall & Hotchkiss (2017)²⁰⁰.

Las estimaciones de PPB y RE se realizaron por máxima verosimilitud utilizando la ecuación 3.12 y el paquete StreamMetabolizer de R²⁰¹. Luego se calculó la producción primaria neta (PPN) como PPB – RE. Se obtuvo un valor de PPB, RE y PPN por día, en cada caso. Para los datos de la laguna, se calculó el promedio diario de cada uno de los parámetros proveniente de ese único sensor colocado, por lo que la variabilidad asociada a esta media corresponde a la variabilidad entre días para ese mismo sensor. Para los datos de los mesocosmos, se calculó una media diaria para cada mesocosmos y luego se calculó el valor medio de estas medias, por lo que el desvío entre estos datos refleja la variabilidad entre mesocosmos.

10. Predictores de POM

En base a estudios previos sobre predictores de POM en cuerpos de agua^{18,23,202}, se exploraron como posibles variables predictoras a la Chla (µg L⁻¹), a la abundancia de fitoplancton (ind ml⁻¹), el fósforo total (mg L⁻¹), la turbidez (NTU) y el carbono orgánico disuelto (mg L⁻¹).

11. Análisis moleculares

Para explorar las comunidades de arqueas y de bacterias, se tomaron muestras de ADN ambiental de las lagunas y de los mesocosmos al inicio y al final de los experimentos (Tabla 1). El ADN fue extraído de cada muestra y secuenciado utilizando primers específicos para arqueas y para bacterias, mediante la misma metodología descripta para el Capítulo 1 (páginas 19 – 21).

11.1. Extracción de ADN y secuenciación

La extracción de ADN se realizó siguiendo a Zenoff *et al.* 2006²⁰³. Agua de la laguna y de los mesocosmos fue filtrada mediante filtros de policarbonato de 0,2µm (Millipore) y los filtros fueron preservados a -80°C hasta la extracción de ADN. El protocolo de extracción es el mismo que el detallado para el Capítulo 1 (página 19-20). Todas las muestras extraídas fueron llevadas a la *plateforme de génomique* CERMO-FC, de la Université

du Québec à Montréal, para secuenciación del 16S rRNA de la región V4 usando los primers A340F (5'-CCC TAC GGG GYG CAS CAG-3') y 915R (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') para arquea, y los primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') para bacteria. Se utilizó una plataforma MiSeq (PE250, Illumina, San Diego, CA, USA).

11.2. Análisis bioinformáticos

Las secuencias obtenidas fueron procesadas mediante el paquete DADA2 en el entorno de R⁹¹. El procesamiento realizado fue el mismo que el detallado para el Capítulo 1 (páginas 20 – 21). La tabla de ASVs obtenida fue luego filtrada por la ocurrencia de asignaciones no deseadas: cloroplastos, mitocondrias, eucariotas, arqueas en el dataset de bacterias y bacterias en el dataset de arqueas. Por último, se retuvieron sólo los ASVs que poseían más de 10 lecturas y que se encontraban en al menos dos muestras: el conjunto de ASVs final para bacterias fue de 4343 y para arqueas fue de 1969. A partir de estos datos se analizaron curvas de rarefacción en las que se observó que todas las muestras llegaron al estado asintótico, lo que indica que la profundidad de secuenciación fue suficiente para representar la diversidad y riqueza (Fig. S3.1). Para el caso de bacterias, todas las muestras llegaron a un estado asintótico. Para el caso de arqueas, hubo que quitar las muestras SGM4Tf y BUCTf porque no llegaron a una meseta (Fig. S3.1). Luego, las muestras se normalizaron al número mínimo de lecturas de una muestra (Cmin) usando el flujo de trabajo SRS, el cual preserva las abundancias relativas de ASV después de la normalización lo más similar posible a la de los conjuntos de datos originales. Los análisis descriptivos sobre la tabla de ASV se realizaron empleando los paquetes Phyloseq y Biostrings.

Resultados

1. Características limnológicas y comunidad fitoplanctónica

Tanto los mesocosmos como las lagunas presentaron pH levemente alcalino (Tabla 3.2), lo cual concuerda con los resultados estacionales observados en el capítulo 1 (página 34). La temperatura del agua fue mayor en SA que en SG y BU (Tabla 3.2). El agua en los mesocosmos de la laguna SG presentó mayor transparencia, menor concentración de NT, FT y de sólidos en suspensión y menor abundancia de fitoplancton, que la de los mesocosmos de las lagunas SA y BU. Esto era de esperarse, dado que SG es una laguna de aguas claras mientras que SA y BU son lagunas de aguas turbias. Entre SA y BU, los mesocosmos de BU presentaron niveles de turbidez y de STS mucho mayores que los de SA (Tabla 3.2). Los mesocosmos de SA presentaron una mayor concentración de Chla, pero los mesocosmos de BU presentaron una mayor abundancia de fitoplancton, lo cual puede deberse al tipo de fitoplancton presente en cada laguna (por ejemplo, organismos con menor volumen presentan menos Chla pero pueden ser más abundantes, reflejado en menores niveles de Chla pero

mayor abundancia). Los niveles de COD y CID fueron similares entre todas las lagunas y mesocosmos (Tabla 3.2). En promedio, el O₂ disuelto y el % de saturación de O₂ fue similar entre la laguna y los mesocosmos para SA y BU, pero no así para SG, dónde la laguna presentó mayores niveles que los mesocosmos. A su vez, los mesocosmos de SA y BU presentaron mayor concentración de O₂ disuelto y % de saturación de O₂ que los mesocosmos de SG, probablemente debido a que los mesocosmos de SG presentaron menor biomasa fitoplanctónica (Tabla 3.2).

La composición de la comunidad fitoplanctónica difirió entre las tres lagunas estudiadas (Fig. 3.6). SG presentó una comunidad menos abundante pero más diversa que SA y BU. En líneas generales, no hubo diferencias en la estructura del fitoplancton entre el control (laguna) y los mesocosmos al inicio (T0) en ninguna de las tres lagunas. En otras palabras, el llenado de los mesocosmos parecería no haber afectado la composición de la comunidad fitoplanctónica. Tampoco se detectaron cambios en la composición de la comunidad fitoplanctónica entre el inicio (T0) y el final (TF) del experimento, tanto para el control como para los mesocosmos, en las tres lagunas (Fig. 3.6). En SG se encontraron organismos pertenecientes a las divisiones Chlorophyta, Cryptophyta, Cyanobacteria, Chrysophyta y Bacillariophyta. Los principales géneros encontrados fueron *Chlamydomonas* sp. y *Didymocysts* sp. (Chlorophyta), *Cryptomonas* sp. (Cryptophyta) y *Coelosphaerium* sp. (Cyanobacteria). En SA se vio casi una completa dominancia de Chlorophyta que fue principalmente producto de *Scenedesmus linearis* (representando un 52-68% de la abundancia total), seguido de *Oocystis* sp., *Eutetramorus* sp. y *Cosmarium* sp. En cuanto a BU, se observó una dominancia de Chlorophyta y Cyanobacteria. Dentro de Chlorophyta se encontraron individuos pertenecientes a los géneros *Monoraphidium* sp, *Oocystis* sp, y *Scenedesmus* sp., mientras que *Planktolyngbya* sp., *Geitlerinema* sp. y *Anabaenopsis* sp fueron los géneros dominantes de Cyanobacteria.

En cuanto al metabolismo, la mayor diferencia entre mesocosmos (tratamiento) y laguna (control) se vio para la laguna SG (Tabla 3.2). En esta laguna había fitoplancton y macrófitas sumergidas, mientras que dentro de los mesocosmos sólo había fitoplancton, por ende es de esperarse que los mesocosmos presenten una PPN menor que la laguna. De hecho, mientras la laguna SG presentó un metabolismo autotrófico, los mesocosmos de SG presentaron un metabolismo heterotrófico – producto de una menor biomasa de productores primarios. En cuanto a SA y BU, tanto la laguna como los mesocosmos presentaron un metabolismo autotrófico, lo cual era de esperarse: tanto en la laguna como en los mesocosmos los productores primarios fueron el fitoplancton y, como se vio al analizar la estructura del fitoplancton, la instalación de los mesocosmos no afectó la composición de la comunidad fitoplanctónica, por lo que no se esperaban grandes diferencias en el metabolismo entre los mesocosmos y la laguna para estas dos lagunas.

Tabla 3.2. Valores medios \pm desvío estándar para los mesocosmos (M) y la laguna (L). Tº del agua, pH y saturación de O₂ se midieron cada vez que se realizaron mediciones de GEI, mientras que Turbidez, STS, Kd, Profundidad eufótica, COD, CID, FT, NT, Chla y Fitoplancton se midieron al inicio y al final del experimento. Tº del agua y saturación de O₂ (%) corresponden a los valores subsuperficiales. Solidos totales en suspensión (STS), COD (carbono orgánico disuelto), CID (carbono inorgánico disuelto), FT (fósforo total), NT (nitrógeno total) Chla (clorofila a). NA: no hay dato. La profundidad del disco de Secchi no se registró en SG porque las macrófitas sumergidas tapan el disco y no permiten realizar una medición certera. Los valores de producción primaria bruta (PPB), respiración y producción primaria neta (PPN) corresponden a la media diaria proveniente de un solo miniDOT, en el caso de la laguna, y a la media diaria de todos los minDOTs colocados, en el caso de los mesocosmos.

Parámetros	SG		SA		BU	
	M	L	M	L	M	L
Tratamiento						
Kd (m ⁻¹)	1,86 \pm 0,42		4,37 \pm 0,08		8,53 \pm 1,93	
Secchi (m)	NA		0,38 \pm 0,05		0,19 \pm 0,01	
Tº del agua (ºC)	23,02 \pm 3,17	22,86 \pm 3,23	27,78 \pm 2,22	27,85 \pm 2,12	23,08 \pm 1,70	22,71 \pm 1,71
pH	9,3 \pm 0,17	9,41 \pm 0,07	9,46 \pm 0,02	9,41 \pm 0,04	9,15 \pm 0,03	9,06 \pm 0,06
O ₂ disuelto (mg L ⁻¹)	7,73 \pm 0,49	10,86 \pm 5,13	10,01 \pm 1,68	10,21 \pm 2,72	10,99 \pm 0,96	11,13 \pm 1,13
Saturación O ₂ (%)	90,18 \pm 10,23	128,79 \pm 67,43	128,37 \pm 27,14	131,68 \pm 41,13	127,79 \pm 13,39	128,69 \pm 16,72
Turbidez (NTU)	2,48 \pm 0,78	2,10 \pm 0,33	46,45 \pm 10,27	46,15 \pm 7,55	94,53 \pm 8,84	107,25 \pm 12,75
STS (mg L ⁻¹)	2,31 \pm 0,56	3,60 \pm 0,73	24,35 \pm ,46	22,85 \pm 3,35	55,50 \pm 2,96	53,79 \pm 0,21
Kd (1 m ⁻¹)	1,86 \pm 0,42		4,37 \pm 0,08		8,53 \pm 1,93	
Prof. Eufótica (m)	2,6 \pm 0,6		1,03 \pm 0,05		0,56 \pm 0,11	
COD (mg L ⁻¹)	38,86 \pm 0,51	38,01 \pm 1,28	44,12 \pm 0,08	43,12 \pm 0,39	36,59 \pm 0,55	36,14 \pm 0,36
CID (mg L ⁻¹)	98,58 \pm 3,64	96,79 \pm 3,44	108,65 \pm 4,23	108,88 \pm 0,67	81,21 \pm 3,97	83,69 \pm 0,08
FT (µg L ⁻¹)	82,50 \pm 19,38	75,00 \pm 9,00	180,00 \pm 44,90	183 \pm 39	259,50 \pm 33,91	288 \pm 0,00
NT (µg L ⁻¹)	2175 \pm 417	2370 \pm 330	2310 \pm 475	1920 \pm 0	2400 \pm 983	2850 \pm 570
Chla (µg L ⁻¹)	2,45 \pm 0,93	6,58 \pm 1,41	117,14 \pm 22,72	126,12 \pm 0,71	87,09 \pm 17,55	127,46 \pm 4,74
Fitoplancton (ind mL ⁻¹)	1364,75 \pm 463,05	2572,50 \pm 399,50	113906,25 \pm 18905,78	73287,50 \pm 4104,50	148524,43 \pm 32870,87	78454,00 \pm 15270,00
PPB (g m ⁻² d ⁻¹)	0,47 \pm 0,05	14,09 \pm 0,32	13,86 \pm 0,72	14,50 \pm 2,24	6,23 \pm 0,08	7,55 \pm 0,12
Respiración (g m ⁻² d ⁻¹)	0,59 \pm 0,05	13,17 \pm 0,40	9,66 \pm 0,52	12,70 \pm 1,95	3,30 \pm 0,11	3,90 \pm 0,18
PPN (g m ⁻² d ⁻¹)	-0,21 \pm 0,20	0,92 \pm 3,39	4,21 \pm 1,61	1,79 \pm 4,01	2,93 \pm 1,59	3,66 \pm 1,56

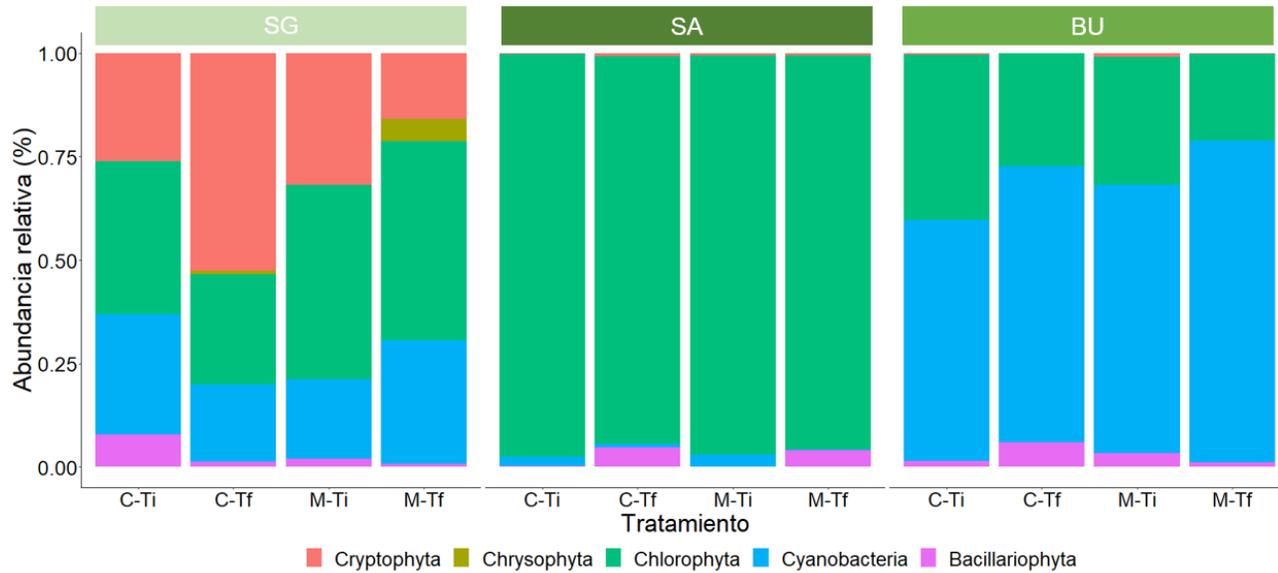


Figura 3.6. Abundancia relativa de la comunidad fitoplanctónica en SG, BU y SA. Las primeras dos columnas corresponden a la abundancia relativa en la laguna al inicio (C-Ti) y final (C-Tf) del experimento, mientras que las últimas dos columnas corresponden a la abundancia relativa promedio en los mesocosmos al inicio (M-Ti) y final (M-Tf) del experimento.

2. GEI: gases disueltos, isótopos y flujos difusivos

2.1 CH₄ disuelto y ¹³C-CH₄

En todos los casos, la concentración inicial de CH₄ en los mesocosmos fue menor que en la laguna, lo cual indica que el proceso de desgaseo previo al llenado de los mesocosmos fue exitoso (Fig. 3.7 a, c y e). En las lagunas SA y SG se observó una tendencia decreciente de CH₄ disuelto con el tiempo, tanto en la laguna como en los mesocosmos (Fig. 3.7 a y c). Esto probablemente se relacione con el hecho de que hubo lluvias en algunos de los días de los experimentos realizados en SA y SG, lo cual contribuyó a una mayor pérdida de CH₄. En el caso de BU, tanto para la laguna como para los mesocosmos se observó una disminución inicial en CH₄ seguida de concentraciones relativamente constantes (Fig. 3.7 e). En relación a los valores isotópicos de CH₄, en SA y BU los valores fueron siempre negativos y se modificaron de un rango entre -20‰ y -40‰ (Fig. 3.7 d y f). En SG, este mismo patrón se observa para la laguna, pero para los mesocosmos se ve un gran aumento en la señal isotópica a las 120hs, que luego se vuelve negativa a las 150hs.

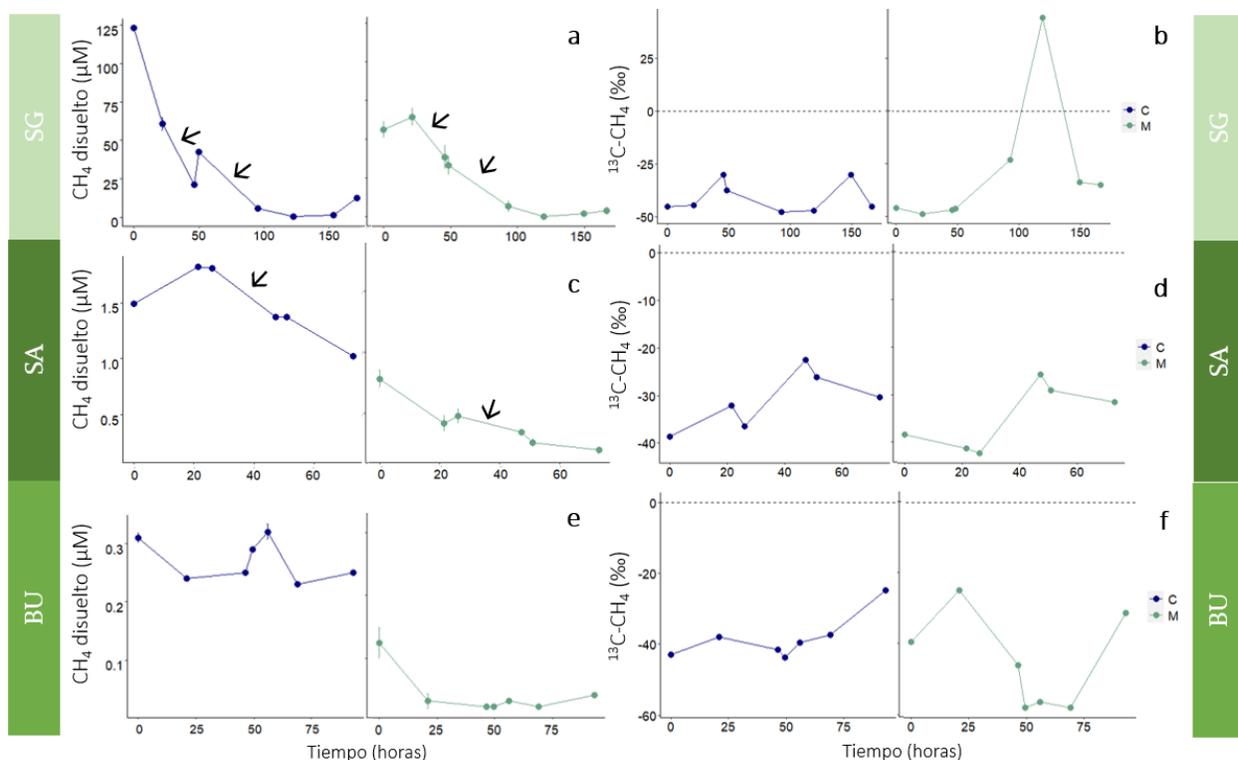


Figura 3.7. CH₄ disuelto (μM) y ¹³C-CH₄ (‰) medidos empíricamente en la laguna (Control, C, azul) y en los mesocosmos (M, verde) de SG (a y b), SA (c y d) y BU (e y f). Notar que el eje X (tiempo) difiere entre las lagunas. La línea punteada en los gráficos b, d y f corresponde a un valor isotópico de cero, para diferenciar valores positivos y negativos más fácilmente. Las flechas en los paneles a y c corresponden a eventos de lluvia registrados durante los experimentos. Las barras de error corresponden al desvío estándar asociado a todas las mediciones correspondientes a cada tiempo.

2.2 Flujo difusivo CH₄ y K₆₀₀ CH₄

Los flujos difusivos fueron mayores en la laguna que en los mesocosmos, para las tres lagunas. Esto tiene sentido teniendo en cuenta que los mesocosmos fueron degaseados y tenían menor concentración de CH₄. Los flujos difusivos medios de la laguna fueron de $24,70 \pm 15,59$, $21,57 \pm 19,51$ y $0,54 \pm 0,07$ mmol m⁻² d⁻¹ para SG, SA y BU, respectivamente. Los flujos mayores en SG se relacionan con una concentración de CH₄ disuelto dos órdenes de magnitud mayor que para las otras dos lagunas (Fig. 3.8). En cuanto a los mesocosmos, los flujos difusivos medios fueron de $0,62 \pm 0,38$, $0,24 \pm 0,06$ y $0,02 \pm 0,002$ mmol m⁻² d⁻¹ para SG, SA and BU, respectivamente. En BU se pudo rescatar un solo flujo difusivo porque las concentraciones de CH₄ en el agua – y consecuentemente los flujos difusivos de CH₄ – eran muy bajos, lo que ocasiona mediciones de flujos con muchísimo error que tuvieron que ser descartadas. En cuanto a las velocidades de intercambio, éstas también fueron mayores para la laguna que para los mesocosmos en todos los casos. Los K₆₀₀ de la laguna fueron de

0,68 ± 0,13, 2,02 ± 0,15 y 1,57 ± 0,45 m día⁻¹ para SG, SA y BU respectivamente. En cuanto a los mesocosmos, los valores obtenidos fueron de 0.13 ± 0.03, 1.19 ± 0.35 y 0.62 ± NA m día⁻¹ para SG, SA y BU respectivamente. También se calcularon las constantes de evasión (K_{eva}) promedio para los mesocosmos de cada laguna. Las K_{eva} obtenidas fueron de 0,13, 1,19 y 0,62 m día⁻¹ para SG, SA y BU, respectivamente.

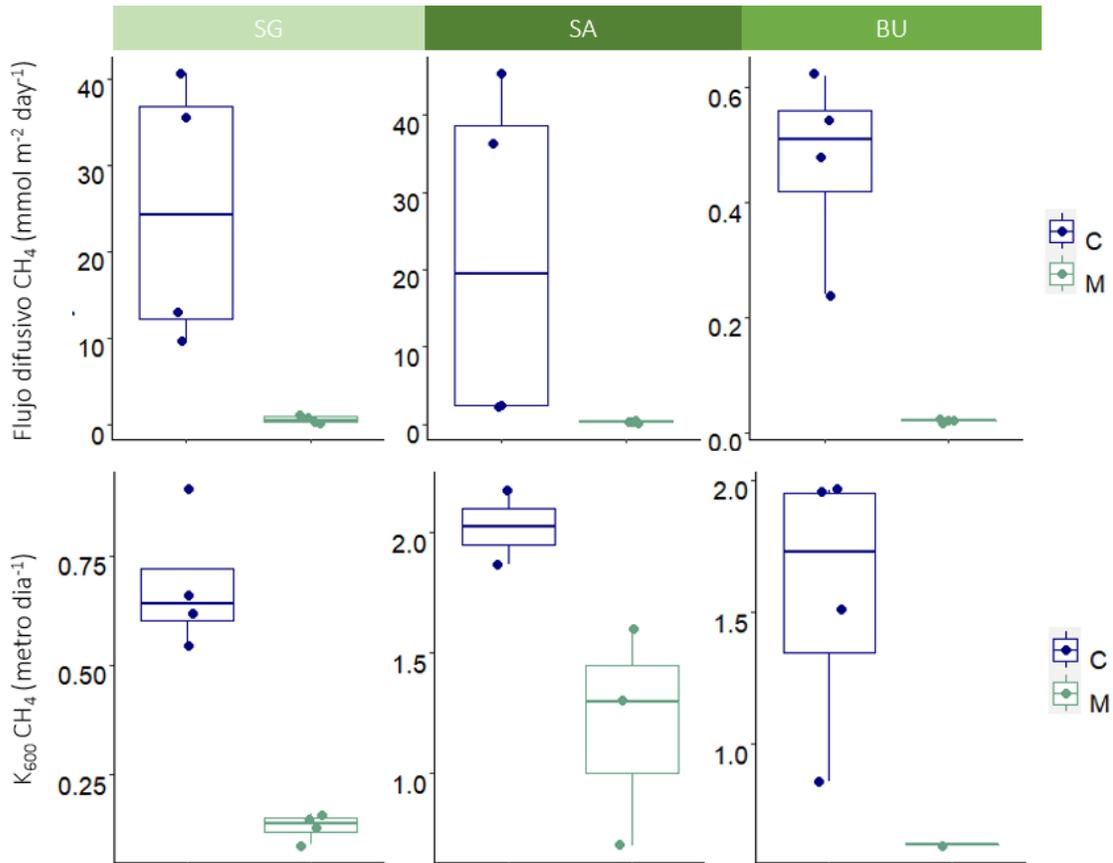


Figura 3.8. Flujo difusivo de CH₄ (mmol m⁻² d⁻¹) en la interfaz agua: aire y sus respectivas velocidades de intercambio (K_{600} , m d⁻¹) para la laguna (control, C, azul) y los mesocosmos (M, verde) para BU, SA y SG. La línea dentro del gráfico de cajas corresponde a la mediana. Cada punto corresponde a un dato.

3. Tasas de oxidación de CH₄

En las tres lagunas se observó una disminución de CH₄ asociado a un enriquecimiento de ¹³C-CH₄, lo cual indica oxidación de CH₄ (Fig. 3.9). El CO₂ medido en los erlenmeyers es el resultado del CO₂ producido por oxidación de CH₄ y además por respiración de los organismos presentes. En las incubaciones se vio que el CO₂ se mantuvo constante – lo cual resulta llamativo - o aumentó (Fig. 3.9).

A partir de la regresión entre Ln (CH₄) vs Tiempo (Fig. 3.10) se obtuvieron las K_{oxi} (Tabla 3.3). La laguna BU presentó la mayor K_{oxi} , seguida de SA y por último SG, con una tasa de oxidación dos órdenes de magnitud

menor que las lagunas turbias. En cuanto a los mesocosmos, SG presentó la mayor K_{oxi} , seguida de SA y por último BU. En BU y SA la tasa de oxidación registrada en los mesocosmos fue menor que la registrada en la laguna, lo cual tiene sentido teniendo en cuenta que los mesocosmos tenían menos CH_4 disuelto. Para la laguna SG se observó lo opuesto, los mesocosmos presentaron una K_{oxi} mayor que la laguna.

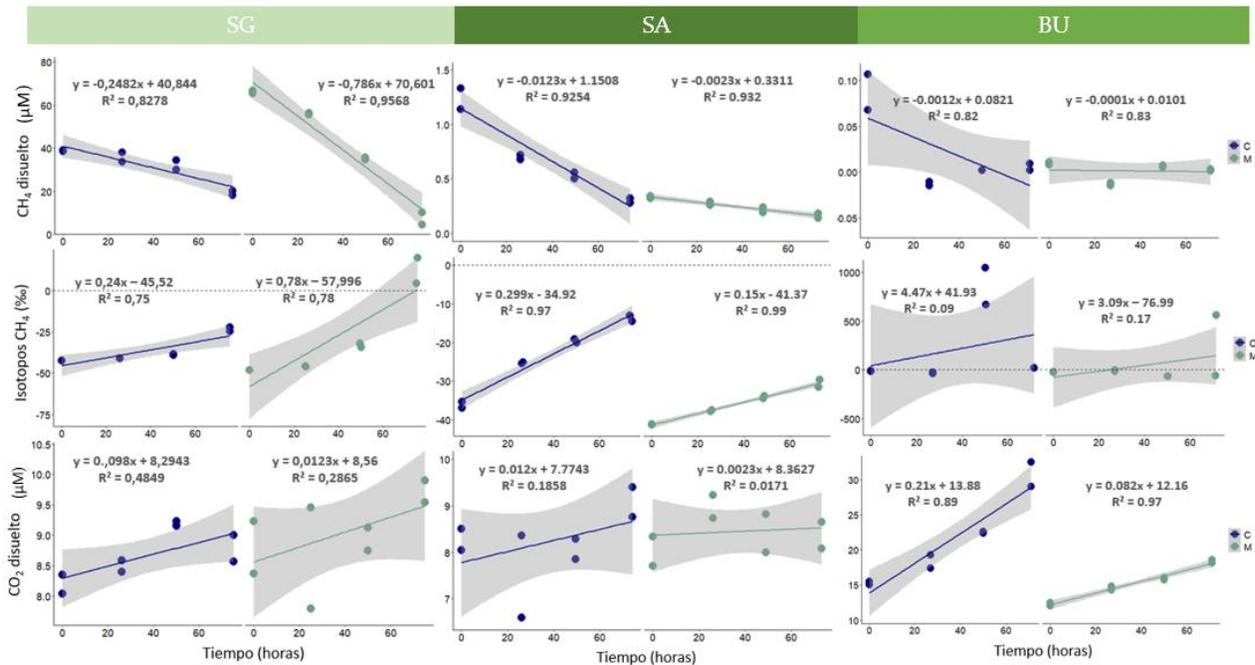


Figura 3.9. Resultados de las incubaciones en oscuridad para la laguna clara vegetada La Segunda (SG) y las lagunas turbias fitoplanctónicas La Salada (SA) y El Burro (BU). Incubaciones realizadas con agua de la laguna (Control, C, azul) e incubaciones con agua de los mesocosmos (M, verde). De arriba hacia abajo: CH_4 disuelto ($\mu M L^{-1}$), valores isotópicos de CH_4 (%) y CO_2 disuelto ($\mu M L^{-1}$). La sombra gris corresponde al error estándar.

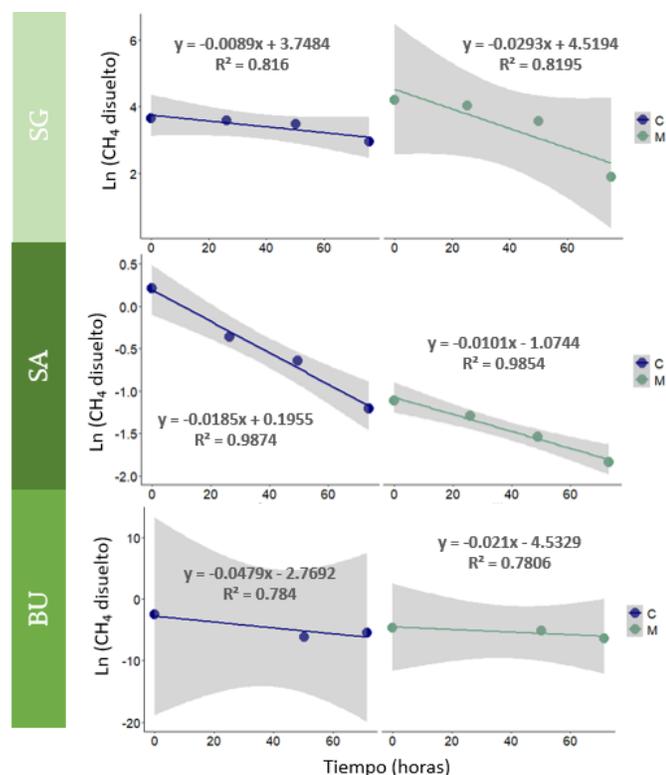


Figura 3.10. Regresiones entre $\ln(\text{CH}_4)$ (μM) Vs. Tiempo (hr) para las lagunas SG, SA y BU, tanto para las incubaciones realizadas con agua de la laguna (Control, C, en azul), como para las incubaciones realizadas con agua de los mesocosmos (M, verde). La pendiente de cada regresión es la tasa instantánea de oxidación (K_{oxi} , hr^{-1}). La sombra gris corresponde al error estándar.

Tabla 3.3. Tasas instantáneas de oxidación (K_{oxi}) para las incubaciones realizadas con agua de la laguna y de los mesocosmos, para las lagunas SG, SA y BU.

K_{oxi} (hr^{-1})	Laguna	Mesocosmo
SG	-0,009	-0,029
SA	-0,018	-0,010
BU	-0,048	-0,021

4. OMP, $^{13}\text{C}\text{-CH}_4$ OMP, OMC y predictores de POM

4.1 Curva empírica y teóricas

A partir de las ecuaciones 6, 7 y 8 se construyeron las curvas teóricas, que se compararon con la curva observada (Fig. 3.11). En SA y BU, si solamente se considera MOX como fuente de pérdida de CH_4 , las concentraciones predichas son mayores que las obtenidas. Mientras que para SG, al menos en la primer parte

del set de datos, la concentración predicha que incluye sólo MOX es mayor que la concentración empírica. Si se considera únicamente la pérdida de CH₄ por evasión, solo en SA se predice una concentración menor que la medida, mientras que en BU y SG la concentración predicha es mayor que la medida. Al considerar tanto MOX como evasión, en casi todos los puntos (salvo el punto de 21hs en BU y de 119,5hs en SG) la concentración empírica es mayor que la predicha, indicando que hay más CH₄ del esperado si no hubiera producción de CH₄ y hubiera pérdida por MOX y evasión.

Es importante destacar que en SG se iniciaron los experimentos con una concentración de CH₄ de 56,96 µM, dos órdenes de magnitud mayores que la de SA (0,82 µM) y BU (0,13 µM). Recién a partir de las 93,1hs en SG se detectaron concentraciones un orden de magnitud menores (7,03 µM) y, por lo tanto, más comparables con las de SA y BU. Por este motivo se decidió utilizar los datos de SG a partir de las 93,1hs y hasta 166,6hs, considerando las 93,1hs como el tiempo cero del nuevo set de datos, y eso es lo que se grafica en el panel derecho de SG (Fig. 3.11).

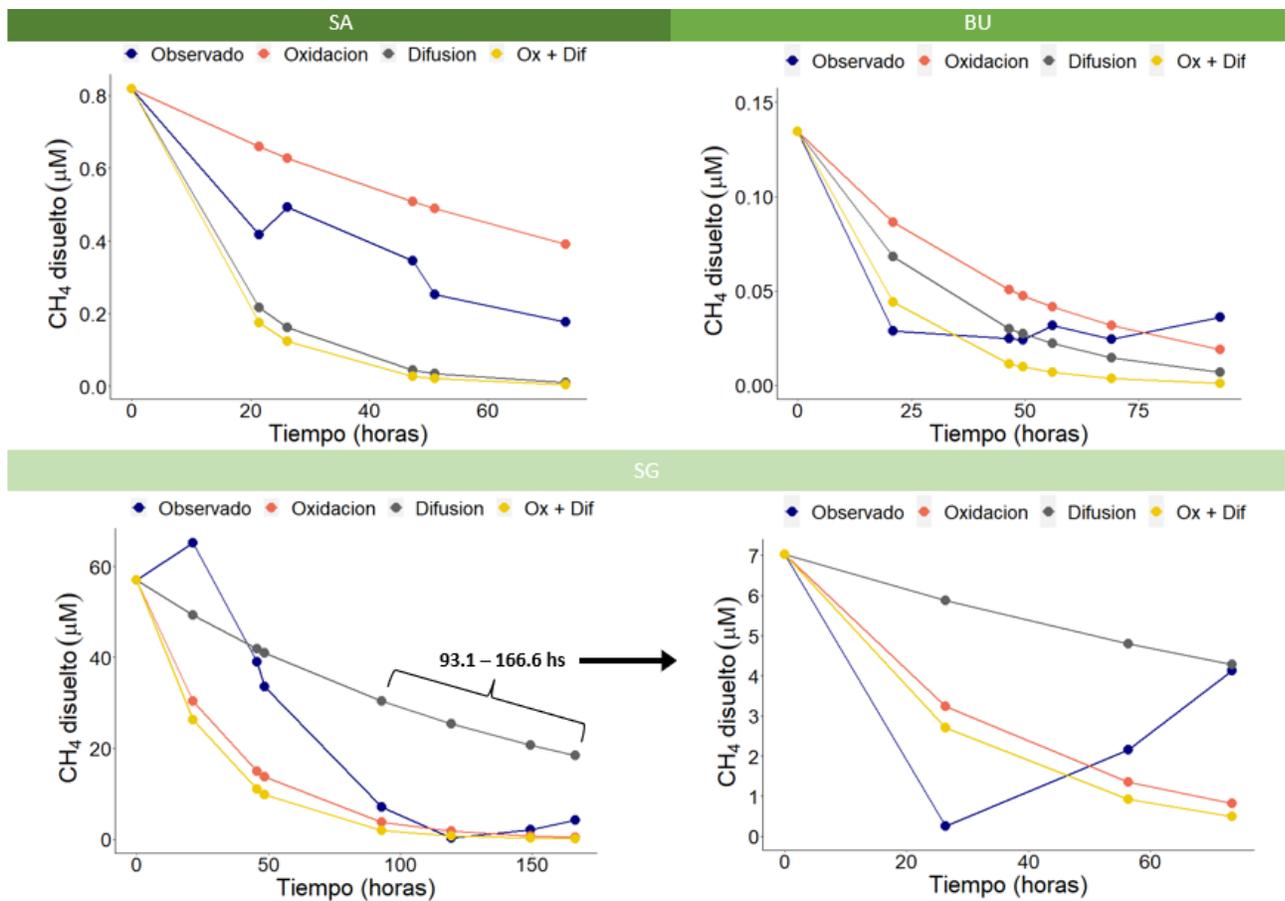


Figura 3.11. Curva empírica de CH₄ disuelto en los mesocosmos de cada laguna (Observado, azul) y curvas teóricas de CH₄ disuelto asumiendo que no hubiera POM y hubiera pérdida de CH₄ solamente por oxidación

(Oxidación, naranja), solamente por difusión (Difusión, gris) o por oxidación + evasión (Ox + Dif, amarilla). Notar que las concentraciones de CH₄ en SA y BU se encuentran en órdenes de magnitud comparables, pero la concentración de CH₄ en SG es dos órdenes de magnitud mayor. Para SG se exhibe en el panel izquierdo el total de datos recabados durante el experimento, mientras que a la derecha se hizo un subset a partir de las 93,1hs, donde la concentración de CH₄ comienza a ser más comparable a la de SA y BU.

4.2 POM y OMC

Dado que los experimentos en SG iniciaron con concentraciones de CH₄ tanto más altas que en SA y BU, se decidió estimar la tasa de POM en SG utilizando los datos partir de 93,1hs para realizar estimaciones de POM utilizando concentraciones de CH₄ más comparables entre las tres lagunas. Las tasas de POM y la contribución de POM al total de producción de CH₄ en cada laguna (OMC) se encuentran expresados en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tasa de POM ($\mu\text{M día}^{-1}$ y $\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$) y OMC al flujo difusivo de CH₄ (%) para cada laguna.

	SG	SA	BU
POM ($\mu\text{M d}^{-1}$)	2,89 ± 2,53	6,16 ± 0,22	0,32 ± 0,04
POM ($\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	2,31 ± 0,96	4,94 ± 0,52	0,25 ± 0,01
OMC (%)	9,37 ± 3,89	29,63 ± 3,13	46,47 ± 2,22

4.3 ¹³C-CH₄ POM

Para realizar los balances de masa isotópicos primero fue necesario calcular el factor de fraccionamiento por oxidación (α_{ox}). Primeramente se obtuvo la pendiente de la regresión entre $\ln(\text{Ch}_4)$ y $\ln(13\text{C-CH}_4+1000)$ (Fig. 3.12) y luego se calculó α_{ox} mediante la ecuación 3.9. Los α_{ox} obtenidos de los mesocosmos fueron de 1.017, 1.028 y 1.212 para SA, SG y BU, respectivamente. α_{ox} de BU fue demasiado alto y el R² de esta regresión no fue tan bueno (0.83) como el de SA (0.99) y SG (0.99). Esto se debe a que en los mesocosmos de BU la concentración de CH₄ fue muy baja, lo que trae dificultades metodológicas para medir correctamente ¹³C-CH₄. De hecho, un punto de la regresión de BU tuvo que ser descartado porque no se pudo obtener el correspondiente valor de ¹³C-CH₄. Dada esta situación, se decidió usar el α_{ox} de SA para BU, dado que ambas lagunas son turbias fitoplanctónicas.

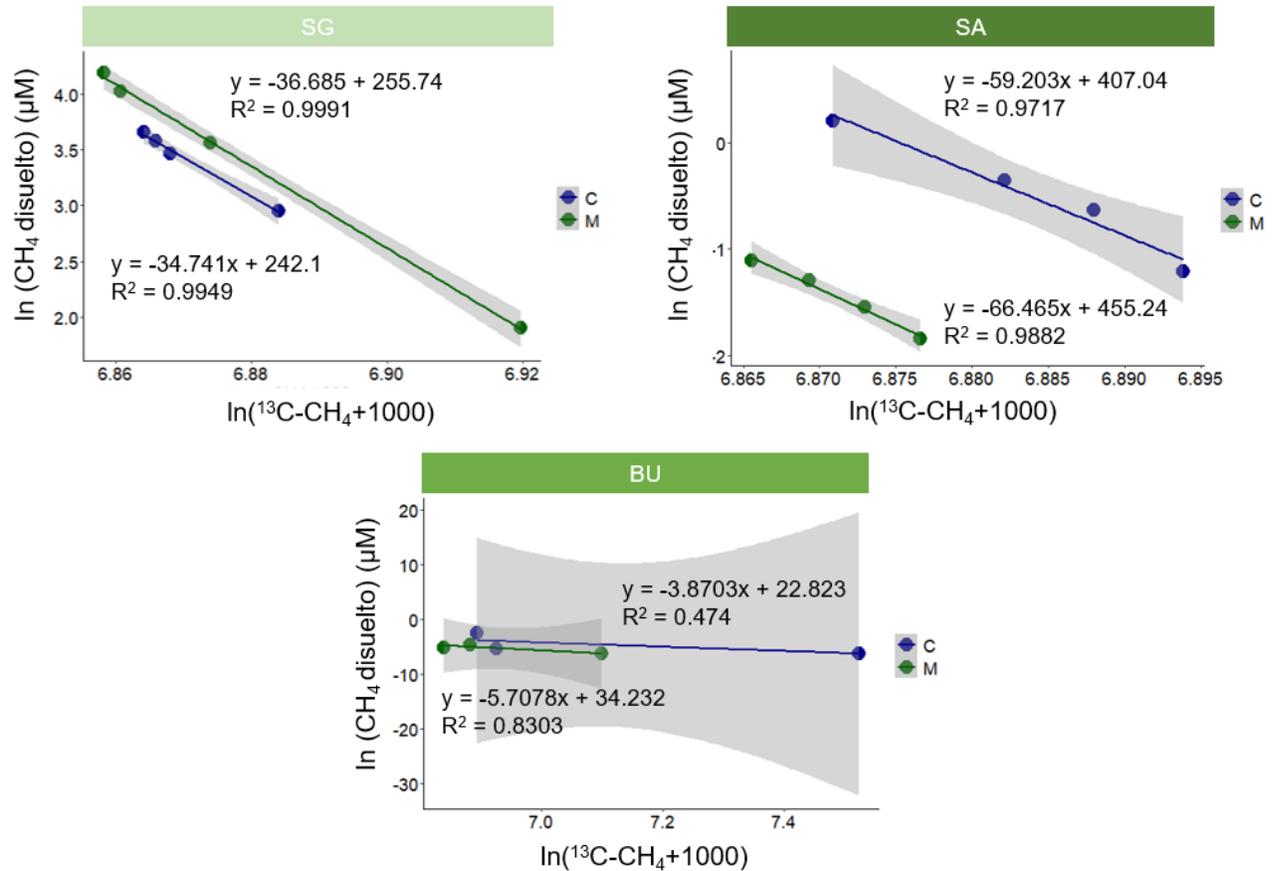


Figura 3.12. Regresión entre $\ln(\text{CH}_4 \text{ disuelto})$ vs $\ln(^{13}\text{C}-\text{CH}_4+1000)$ con los datos provenientes de las incubaciones de MOX. La pendiente de cada regresión fue utilizada para obtener el α_{ox} en cada caso.

La señal isotópica del CH_4 producido por POM resultó, para todas las lagunas, enriquecida respecto al CH_4 producido en los sedimentos ($\sim -60\%$, pág. 41 capítulo 1), lo que indica que este proceso genera un CH_4 con una señal distinta a la de la metanogénesis clásica (Tabla 3.5). Por otra parte, la señal en SG resultó enriquecida respecto a la de SA y BU.

Tabla 3.5. Valores isotópicos ($\%$) derivados del CH_4 producido por POM en los mesocosmos de SG, SA y BU.

Laguna	$^{13}\text{C}-\text{CH}_4 \text{ OMP } (\%)$
SG	$-22,84 \pm 7,40$
SA	$-40,66 \pm 0,56$
BU	$-42,12 \pm 1,32$

5. Predictores de POM

Primeramente se exploró la correlación entre POM y Chla, dado que varios estudios indican que la principal fuente de POM es el fitoplancton (Fig. 3.13A). No se encontró relación entre ambos parámetros, siendo la laguna BU la que se desvió de la tendencia. Dado que las lagunas difirieron mucho en la concentración de CH₄ disuelto al iniciar los experimentos, se probó relativizar la tasa de POM por la concentración media de CH₄ disuelto en cada laguna, y luego correlacionarlo con la Chla (Fig. 3.13B). En este caso se observó una correlación positiva entre ambas variables.

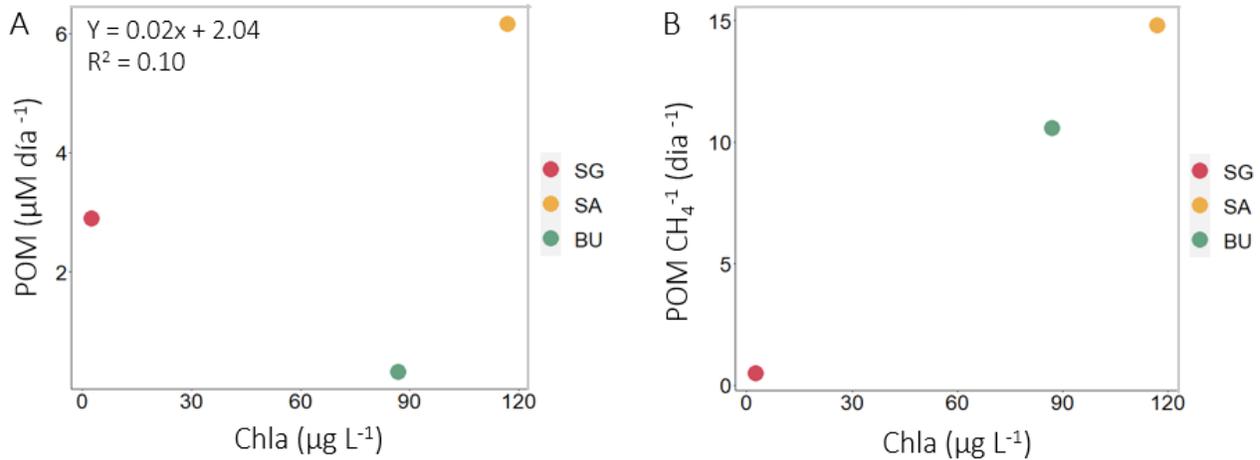


Figura 3.13. Correlación entre POM y Chla (A) y entre POM relativizado por la concentración media de CH₄ (POM CH₄⁻¹) y Chla (B), para las tres lagunas estudiadas.

También se exploró la relación entre POM y fósforo total pero no se encontró una relación entre estos parámetros (Fig. 3.14A), lo cual era de esperarse teniendo en cuenta que el fósforo no es un limitante en estas lagunas. Tampoco se encontró una relación entre POM y turbidez (Fig. 3.14B), que podría ser otro factor que afecte la producción óxica de CH₄. Por último, se exploró la relación entre POM y carbono orgánico disuelto, dado que el mismo determina el C disponible para consumo pero, además, puede afectar a la penetración de la luz en el cuerpo de agua. Se detectó una relación positiva entre estos dos parámetros (Fig. 3.14C).

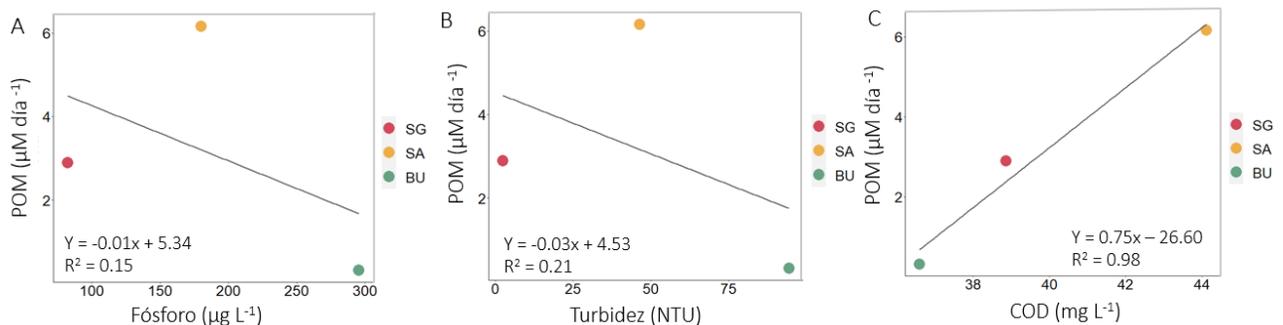


Figura 3.14. A) regresión entre POM y fósforo total, B) regresión entre POM y turbidez y C) regresión entre POM y carbono orgánico disuelto.

Finalmente, se compararon los datos de estas tres lagunas pampeanas con una base de datos global, comparando la relación entre POM y Chla incluyendo otros estudios que hayan estudiado POM utilizando métodos similares (balances de masa de lagos o de mesocosmos) (Fig. 3.15). Si bien, como se mencionó previamente, la laguna BU se desvía bastante de las lagunas SA y SG, se observa una tendencia global de aumento de POM al aumentar la Chla. Los datos de las lagunas pampeanas quedan en el extremo superior, mientras el resto de los datos – todos correspondientes a lagos templados del hemisferio norte que estratifican – quedan en el extremo inferior.

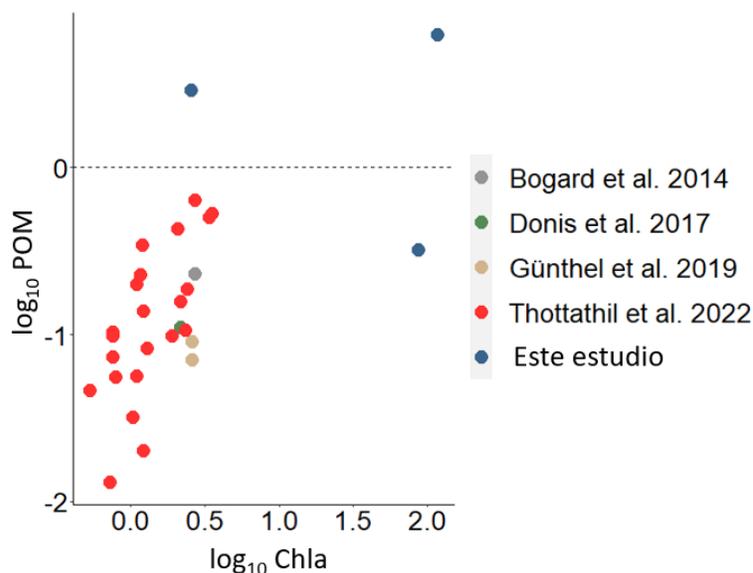


Figura 3.15. Relación entre $\log_{10}(\text{POM})$ y $\log_{10}(\text{Chla})$ incluyendo datos de distintos estudios. Se decidió utilizar el \log_{10} por las grandes diferencias en POM y Chla entre lagos.

6. Análisis moleculares

Es importante tener en cuenta que estas son abundancias relativas para cada laguna, pero no informan sobre la abundancia total de arqueas metanogénicas y, por ende, no pueden ser comparadas en términos totales entre lagunas

6.1. Arqueas

Los principales Phylum de arqueas fueron Nanoarchaeota y Euryarchaeota (Fig. 3.16), siendo Euryarchaeota el único que incluye arqueas metanogénicas. Resultados similares fueron reportados en el capítulo 1 (páginas 36 y 37, Fig. 1.12). En los mesocosmos de SA se observa una mayor abundancia relativa de Euryarchaeota ($0,53 \pm 0,15$) respecto a la de Nanoarchaeota ($0,45 \pm 0,14$), Por el contrario, en los mesocosmos de SG se

detecta una mayor abundancia relativa del Phylum Nanoarchaeota ($0,91 \pm 0,04$) respecto de Euryarchaeota ($0,08 \pm 0,04$). Finalmente, en los mesocosmos de BU hubo una abundancia importante - aunque no mayor - de Euryarchaeota ($0,25 \pm 0,10$), respecto a Nanoarchaeota ($0,72 \pm 0,11$). Es importante destacar que en las siguientes cuatro muestras de BU no se detectaron arqueas y, por lo tanto, no se muestran en las figuras: laguna (control) al tiempo inicial del experimento, mesocosmos réplica 1 al tiempo inicial, mesocosmos réplica 2 al tiempo final y mesocosmos réplica 3 al tiempo inicial.

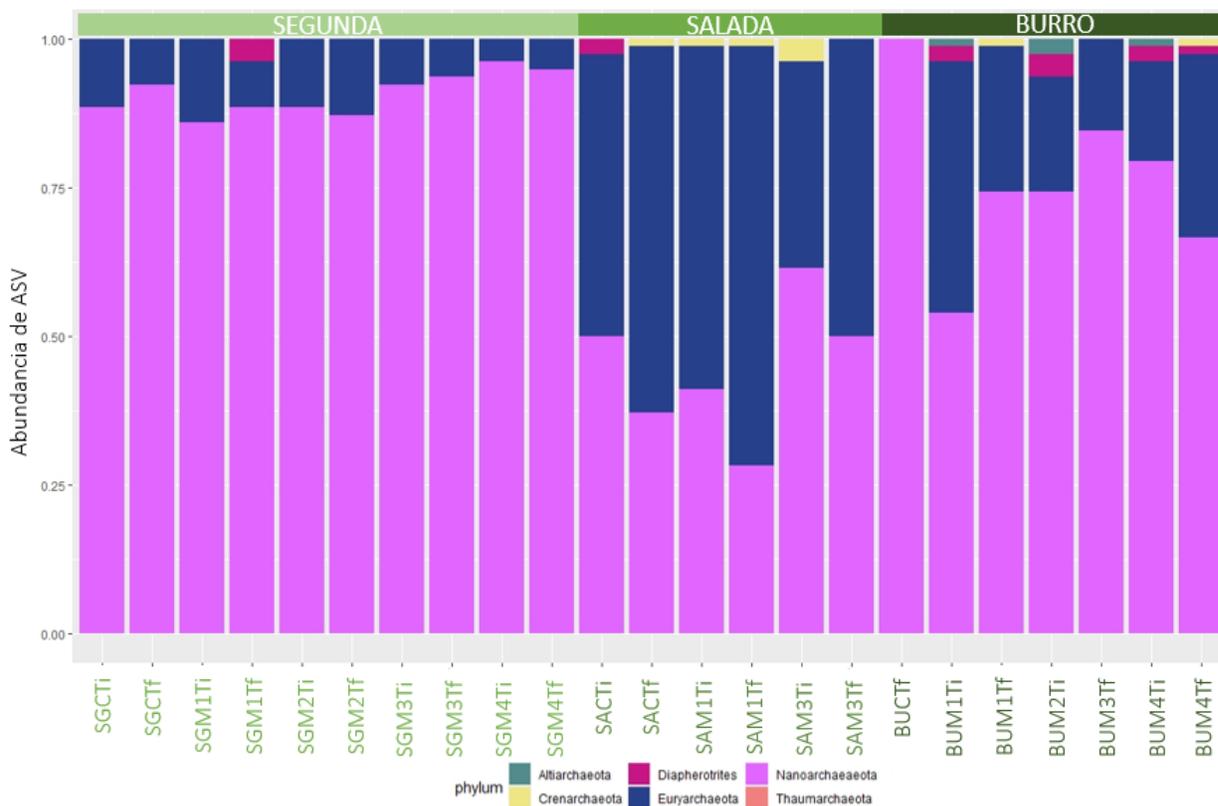


Figura 3.16. Abundancia relativa de ASV de arqueas, distinguiendo con color por Phylum. De izquierda a derecha y en tono creciente de color verde se ordenan las lagunas: SG, SA y BU. Con “C” se indica el control (laguna) mientras que con “M” se indica el tratamiento (mesocosmos). “Ti” corresponde a tiempo inicial del experimento mientras que “Tf” corresponde al tiempo final del experimento. Los números al lado de cada “M” corresponde a la réplica de mesocosmo.

El Phylum Euryarchaeota estuvo representado principalmente por tres clases: Methanomicrobia, Methanobacteria y Thermoplasmata (Fig. 3.17). Las primeras dos clases, como su nombre lo indica, incluyen arqueas metanogénicas. Methanobacteria solamente se detectó en SG, con una abundancia relativa promedio en los mesocosmos de $0,06 \pm 0,01$. Methanomicrobia se detectó en las tres lagunas con una abundancia relativa promedio en los mesocosmos decreciente entre SA ($0,28 \pm 0,09$), BU ($0,17 \pm 0,08$) y SG ($0,05 \pm 0,02$).

Respecto al Phylum Nanoarchaeota, este fue representado en todas las lagunas únicamente por la clase Woesearchaeia. Se trata de una clase con un genoma pequeño y capacidades metabólicas limitadas, lo que sugiere que poseen un modo de vida simbiote o parasítico.

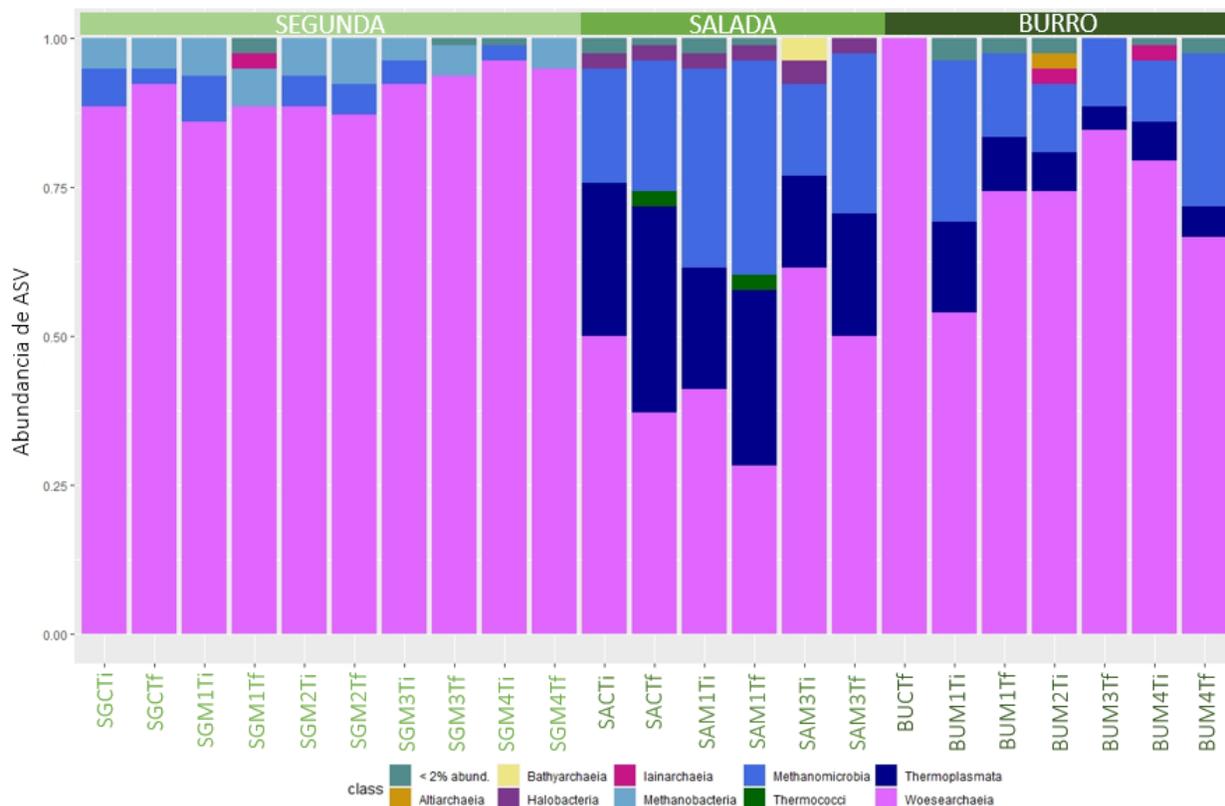


Figura 3.17. Abundancia relativa de ASV de arqueas, distinguiendo con color por clase. De izquierda a derecha y en tono creciente de color verde se ordenan las lagunas: SG, SA y BU. Con “C” se indica el control (laguna) mientras que con “M” se indica el tratamiento (mesocosmos). “Ti” corresponde a tiempo inicial del experimento mientras que “Tf” corresponde al tiempo final del experimento. Los números al lado de cada “M” corresponde a la réplica de mesocosmo.

6.2. Bacterias

Los Phylum predominantes de bacterias fueron Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Verrumicrobia (Fig. 3.18). Resultados similares fueron reportados en el capítulo 1 (páginas 36 y 37, Fig. 1.12). Proteobacteria contiene organismos metanotrofos, es decir, que oxidan CH_4 , y este Phylum fue principalmente abundante en los mesocosmos de SG ($0,54 \pm 0,13$), seguido de SA ($0,24 \pm 0,02$) y de BU ($0,13 \pm 0,02$). En SG predominó Proteobacteria tanto en los mesocosmos como en la laguna, seguido de Bacteroidetes y Actinobacteria. Es interesante notar que en SG Verrumicrobia no fue detectado en la laguna ni al inicio ni al final del experimento, ni tampoco al tiempo inicial en los mesocosmos, pero su abundancia

relativa fue mayor al tiempo final en todos los mesocosmos, indicando un aumento de este Phylum al final de los experimentos en SG. En SA se detectó una comunidad con abundancias relativas similarmente distribuidas entre cuatro Phylum: Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes y Actinobacteria. En esta laguna no se observan diferencias de abundancias relativas entre la laguna y los mesocosmos ni tampoco entre inicio y final de cada mesocosmos. Respecto a BU, se observa una clara dominancia de Cyanobacteria, lo cual concuerda con los resultados de abundancia relativa de fitoplancton reportados en la sección 1. Además, se observa principalmente abundancia de Planctomycetes y Proteobacteria y, como en SA, no se detectan patrones de abundancia disimiles entre la laguna y los mesocosmos ni entre tiempos en cada mesocosmos.

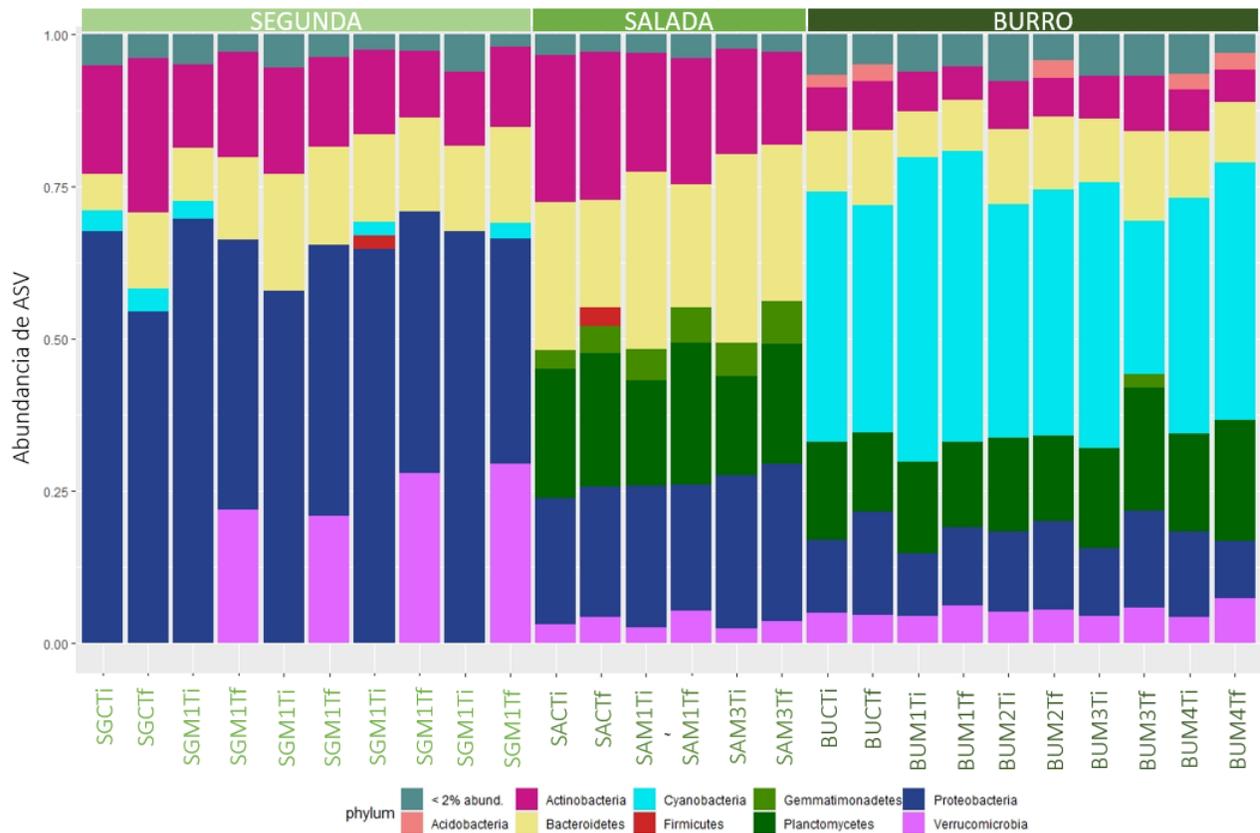


Figura 3.18. Abundancias relativas de ASV de bacterias para las tres lagunas estudiadas, diferenciando los Phylum predominantes por color. Aquellos Phylum con una abundancia menor al 2% se unificaron bajo el nombre <2% abund. De izquierda a derecha y en tono creciente de color verde se ordenan las lagunas: SG, SA y BU. Con “C” se indica el control (laguna) mientras que con “M” se indica el tratamiento (mesocosmos). “Ti” corresponde a tiempo inicial del experimento mientras que “Tf” corresponde al tiempo final del experimento. Los números al lado de cada “M” corresponde a la réplica de mesocosmos.

Proteobacteria fue el Phylum con mayor diversidad de clases (Fig. 3.19), representado por Alphaproteobacteria (Alpha-P), Deltaproteobacteria (Delta-P) y Gammaproteobacteria (Gamma-P). La clase

Delta-P solamente se encontró en SG, con una abundancia relativa promedio en los mesocosmos de $0,05 \pm 0,01$. En SG también se detectaron Alpha-P y Gamma-P, con una abundancia relativa en los mesocosmos de $0,07 \pm 0,01$ y $0,47 \pm 0,14$, respectivamente. En SA y BU se detectó Gamma-P seguida de Alpha-P, con abundancias relativas promedio en los mesocosmos de $0,17 \pm 0,01$ y $0,05 \pm 0,01$ en SA y $0,08 \pm 0,01$ y $0,04 \pm 0,01$ en BU, respectivamente. El Phylum Bacteroidetes estuvo mayormente representado por las clases Bacteroidia y Rhodothermia: Bacteroidia se detectó en las tres lagunas, con una abundancia mayor en SA, seguida de SG y BU, mientras que Rhodothermia solamente se detectó a una abundancia mayor al 3% en el mesocosmos 3 de BU, al tiempo final del experimento. El Phylum Planctomycetes estuvo representado por las clases Phycisphaera y Planctomycetacia, que se detectaron con una abundancia mayor al 3% solamente en las lagunas turbias SA y BU. Tanto SA como BU presentaron Planctomycetacia, mientras que BU presentó además Phycisphaera, la cual no fue detectada en SA. El Phylum Firmicutes presentó una sola clase dominante, Bacilli, que se detectó con una abundancia mayor al 3% solamente en la laguna SA al final de los experimentos. Por último, los Phylum Gemmatimonadetes y Verrumicrobia presentaron una sola clase dominante en cada caso: Gemmatimonadetes y Verrumicrobiae, respectivamente. La clase Gemmatimonadetes se detectó solamente en la laguna y mesocosmos de BU. Verrumicrobiae se detectó en todas las muestras de BU, en la laguna SA y en los mesocosmos de SA al tiempo final y, como se mencionó previamente, en los mesocosmos de SG al tiempo final.

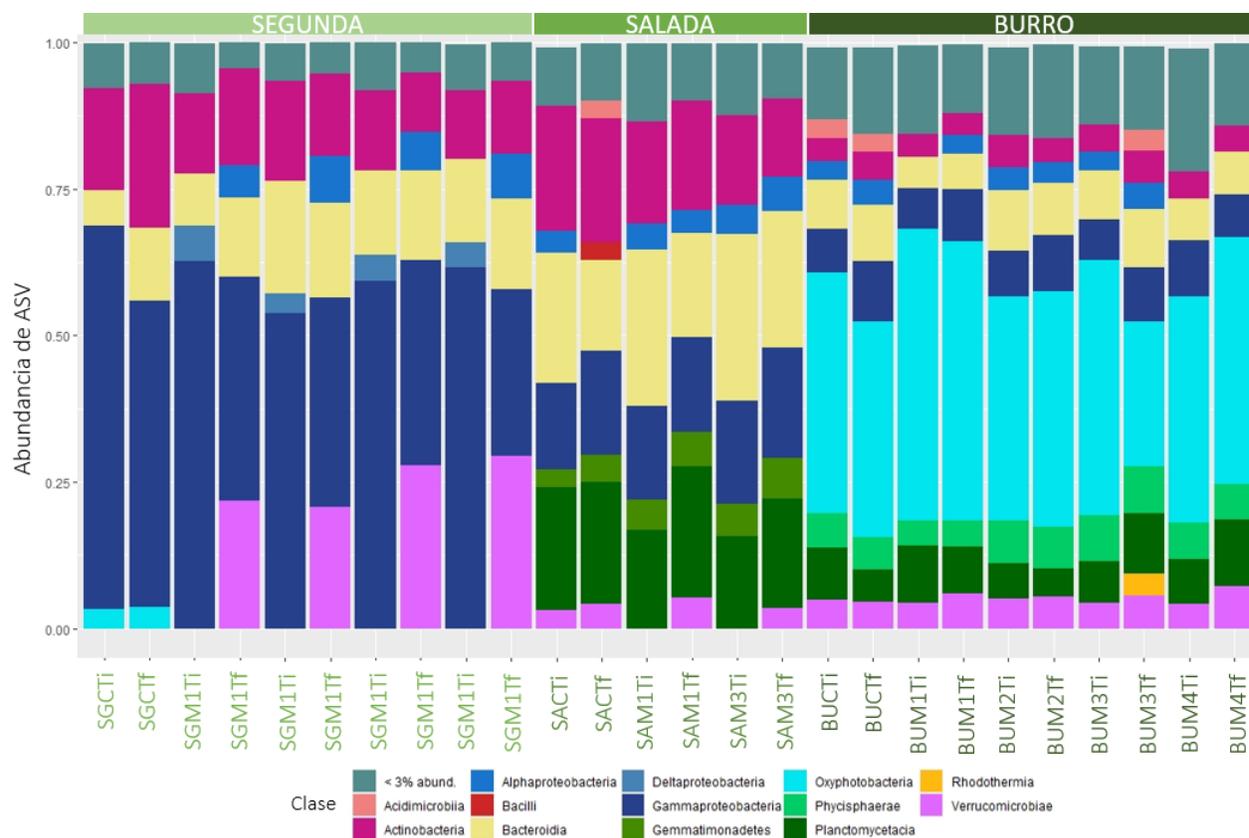


Figura 3.19. Abundancias relativas de ASV de bacterias para las tres lagunas estudiadas, identificando las clases principales por color. Aquellas clases con una abundancia menor al 3% se unificaron bajo el nombre <3% *abund.* De izquierda a derecha y en tono creciente de color verde se ordenan las lagunas: SG, SA y BU. Con “C” se indica el control (laguna) mientras que con “M” se indica el tratamiento (mesocosmos). “Ti” corresponde a tiempo inicial del experimento mientras que “Tf” corresponde al tiempo final del experimento. Los números al lado de cada “M” corresponde a la réplica de mesocosmos.

Discusión

Los resultados de los balances de masa proveen evidencia de POM diurna en las tres lagunas, con tasas de producción altas comparadas con literatura. Donis et al. (2017)¹⁹² reportaron una tasa de POM de $0,11 \pm 0,06 \mu\text{M día}^{-1}$ para el lago Hallwil en Suiza, estimado mediante un balance de masa de todo el lago. Utilizando una metodología similar, Günthel et al. (2019)¹⁹ y Hartmann et al. (2020)¹⁶¹ reportaron tasas de POM para el lago Stechlin, Alemania, de $0,07 \pm 0,07$ y $0,15 \pm 0,21 \mu\text{M día}^{-1}$, respectivamente. Bogard et al. (2014)²⁰ realizaron un balance de masa de mesocosmos en el lago Cromwell en Canadá, y reportaron una tasa de POM de $0,23 \pm 0,01 \mu\text{M día}^{-1}$. Dentro de las tres lagunas de este estudio, SA presentó la tasa de POM más alta ($6,16 \pm 0,22 \mu\text{M día}^{-1}$), y mucho mayor a las tasas reportadas hasta el momento en literatura. SG le siguió ($2,89 \pm 2,53 \mu\text{M}$

día⁻¹), también con una magnitud de POM alta en comparación con lagos del hemisferio norte y, por último, la tasa de BU ($0,32 \pm 0,04 \mu\text{M día}^{-1}$) fue más comparable a lo reportado en bibliografía.

El fitoplancton pareciera ser uno de los principales responsables de POM y la producción de CH₄ por estos organismos parecería estar vinculada a la fotosíntesis. Esta suposición se basa en observaciones experimentales que han demostrado la existencia de una asociación entre la producción primaria y la producción de CH₄^{21,23,161} y que también han detectado una disminución drástica de la producción de CH₄ al inhibir la producción primaria, en cultivos de cianobacterias²³. Debido a esto, se esperaba detectar una relación positiva entre POM y Chla y/o entre POM y PPB a escala ecosistémica, pero no fue el caso: si bien las lagunas SA y SG parecen seguir una relación positiva entre POM y Chla y también entre POM y PPB, la laguna BU – con su alta biomasa fitoplanctónica y alta PPB, pero menor tasa de POM - se aleja bastante de la tendencia. Para explicar esta desviación a lo esperado se analizaron varios factores. Inicialmente se pensó en otras vías de producción de CH₄ que podrían estar afectando la POM medida, conllevando a un desacople entre POM y Chla. Una de ellas es la producción de CH₄ como subproducto de la descomposición de metil fosfatos en el proceso de obtención de fósforo, la cual es muy poco plausible porque estas lagunas cuentan con mucho fósforo (Tabla 3.2). Otra opción es la producción de CH₄ por arqueas metanogénicas. Sabemos que todos los mesocosmos presentaron arqueas metanogénicas (Fig. 3.18), pero no podemos comparar abundancias entre lagunas ni determinar si estaban activas, solo podemos decir que hipotéticamente en todas las lagunas podría haber producción por arqueas. También se pensó en el efecto de la turbidez, porque si bien SA y BU son muy turbias, BU lo fue mucho más (Tabla 3.2). Para explorar si la turbidez de BU podría estar limitando la penetración de la luz en los mesocosmos y, por ende, limitando la POM, se calculó la profundidad eufótica (es decir, la profundidad a la que llega el 1% de la luz que incide en la superficie de los mesocosmos) en cada laguna utilizando el K_d (Tabla 3.2). La profundidad eufótica en los mesocosmos de SA fue de 1m, mientras que en los mesocosmos de BU fue de 0,5m, indicando que la luz penetró hasta el fondo de los mesocosmos de SA pero no así de BU. Para explorar el potencial efecto que esto podría tener sobre la tasa de POM en BU, recalculamos su POM pero considerando que los mesocosmos tenían 0,5m de profundidad, en vez de 0,8. La tasa de POM obtenida fue de $0,45 \mu\text{M d}^{-1}$, un 25% mayor que al considerar el total del volumen del mesocosmos ($0,34 \mu\text{M d}^{-1}$), pero aún baja comparada con las tasas de POM de SG y SA. No obstante y más allá de todas estas potenciales explicaciones, al comparar la tasa de POM de BU (Tabla 3.4) con el flujo difusivo promedio de la laguna (Fig. 3.8) se observa que la tasa de POM obtenida tiene en realidad mucho sentido: la tasa de POM fue baja ($0,25 \pm 0,01 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) pero también lo fue el flujo promedio de CH₄ de la laguna ($0,47 \pm 0,14 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), por lo que no se podría haber obtenido una tasa de POM mucho más alta. Esto indica que la tasa de POM es baja porque el flujo difusivo es muy bajo, porque la laguna posee muy poco CH₄

disuelto. Esto resulta sumamente llamativo, porque se trata de una laguna eutrófica, productiva, con mucho fitoplancton, que ya fue estudiada en otras estaciones del año y tenía concentraciones considerables de CH₄ (Tabla Supl. 1), pero que por alguna razón tiene muy poco CH₄. Este resultado indica que la tasa de POM obtenida es lógica y que, por motivos no claros, esta laguna tenía muy poco CH₄, lo cual a su vez destaca el hecho de que mucho fitoplancton no necesariamente implica una alta tasa de POM.

Para contrarrestar las limitaciones producto de comparar únicamente tres lagunas, se decidió incluir también otros estudios donde se haya explorado POM mediante balances de masa de lagos o de mesocosmos. Todos los estudios encontrados corresponden a cuerpos de agua oligotróficos estratificados del hemisferio norte. Al incluir las lagunas pampeanas dentro de este contexto global, se observó una tendencia general de un aumento de POM asociado a un aumento de Chla. En líneas generales, las lagunas pampeanas ocupan el extremo superior – con mayores tasas de POM y mayores abundancias de fitoplancton – y el resto de los lagos se ubican en el extremo inferior. Para explorar estas diferencias latitudinales en mayor profundidad, se tomó la regresión propuesta por Thottathil et al. (2022)¹⁸ entre POM y Chla para lagos Boreales de Canadá y se aplicaron las concentraciones de Chla de nuestras lagunas. Siguiendo esta regresión, las lagunas pampeanas deberían tener tasas de POM de 0,35, 18,21 y 13,52 $\mu\text{M d}^{-1}$ para SG, SA y BU, respectivamente. Es notable que ni siquiera la laguna SA – con sus 118 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Chla – presentó una tasa de POM tan alta como la que predice la ecuación propuesta por Thottathil et al. 2022¹⁸, sugiriendo que la regulación de POM en lagunas pampeanas posiblemente difiera sustancialmente a la de sistemas estratificados oligotróficos.

Donis et al. (2017)¹⁹² reportó que POM contribuyó en un 90% al total de emisiones de CH₄ en un lago mesotrófico y estratificado de Suiza. Asimismo, Ordoñez et al. (2023)²⁰² reportó que POM contribuyó entre ~30% y 90% a las emisiones totales de CH₄ en cuatro lagos suizos, dependiendo del lago y de la estación del año. En un lago oligotrófico y estratificado del norte de Alemania POM contribuyó en un 64% en la cuenca norte y 50% en la cuenca sur, producto de diferencias en la morfometría de cada cuenca¹⁹. En Canadá, Thottathil et al. (2022)¹⁸ reportó que POM contribuyó entre un 44% y 77% en 5 lagos oligotróficos estratificados, dependiendo de la estación del año. En este estudio, las lagunas SG, SA y BU contribuyeron en un $9,37 \pm 3,89$, $29,63 \pm 3,13$ y $45,91 \pm 3,81$ %, respectivamente, a las emisiones difusivas de CH₄. Teniendo en cuenta que estos son cuerpos de agua eutróficos y con altas abundancias de fitoplancton, *a priori* se esperaría una mayor contribución de POM a la producción total de CH₄ en comparación con cuerpos de agua oligotróficos. Sin embargo, este no fue el resultado obtenido, lo cual puede deberse a que 1) en las lagunas pampeanas el componente de metanogénesis clásica también es muy significativo, 2) no necesariamente una

gran abundancia de fitoplancton conlleva a una alta producción óxica de CH₄ y, consecuentemente, esto no se refleja en una mayor contribución al total de emisiones de CH₄.

Además de la producción de CH₄ por el fitoplancton *per se*^{19,23,161}, también se ha propuesto la existencia de metanogénesis clásica en la columna de agua. Por ejemplo, Grossart et al. (2011)²² encontró arqueas metanogénicas produciendo CH₄ de manera tradicional en la columna de agua de un lago de Alemania, pero viviendo en micro nichos anóxicos asociados al fitoplancton. Similarmente, Bogard et al. (2014)²⁰ explicó la POM detectada en mesocosmos colocados en un lago boreal de Canadá como el resultado de metanogénesis acetoclástica. La suposición subyacente es que la materia orgánica derivada del fitoplancton podría ser la principal fuente de acetato, que será convertido posteriormente en CH₄ por metanógenos localizados en la columna de agua. Las clases Methanomicrobia y Methanobacteria incluyen arqueas metanogénicas^{205,206} y todas las lagunas de este estudio presentaron arqueas metanogénicas, ya sea de la clase Methanobacteria (solamente SG) o de la clase Methanomicrobia (las tres lagunas). La mayor abundancia de arqueas metanogénicas se detectó en SA (28%), seguida de BU (17%) y SG (11%). Aunque las abundancias no pueden ser comparadas en términos totales entre lagunas, informan sobre la composición de la comunidad de arqueas en cada laguna y el grado de importancia de estos organismos para cada sistema. Teniendo en cuenta que en todos los mesocosmos de las tres lagunas se detectaron arqueas metanogénicas, potencialmente podría haber existido metanogénesis clásica en la columna de agua de las tres lagunas. Sabemos que SA presentó la mayor tasa de POM y una alta abundancia de fitoplancton, y a esto se le suma una abundancia relativa del 28% de Methanomicrobiales. Si bien presencia no indica actividad, es posible que al menos parte de las arqueas metanogénicas estuvieran conviviendo en micro nichos anóxicos asociados a *Scenedesmus linearis*, la principal especie de fitoplancton encontrada en SA, produciendo CH₄ de la forma tradicional en la columna de agua. En BU el porcentaje de methanomicrobiales fue de 17% y la comunidad fitoplanctónica se vio principalmente representada por la cianobacteria *Planktolyngbya* sp. Este también es un organismo multicelular que cuentan con mucílago²²², por lo que también potencialmente podrían alojar arqueas metanogénicas. De todos modos, la POM medida en BU fue la menor de las tres lagunas, por lo que no todas estas arqueas estaban activas o su abundancia en términos totales no fue significativa, aunque su abundancia relativa sí lo fuera. En SG, las clases Methanobacteria y Methanomicrobia representaron el 6% y 5% del total de arqueas en los mesocosmos, respectivamente, siendo SG la única laguna que presentó organismos de la clase Methanobacteria. SG presentó una tasa de POM intermedia entre SA y BU, y una comunidad fitoplanctónica menos abundante, diversa y sin una clara dominancia, pero esto no descarta asociaciones entre arqueas y fitoplancton. Es importante destacar que tanto las methanomicrobiales como las methanobacterias consumen CO₂ y reducen H₂ o formiato en el proceso de producción de CH₄, es decir, producen CH₄ únicamente por la vía

hidrogenotrófica²⁰⁵. El neto de CH₄ medido es el resultado del CH₄ producido pero también del consumido, por lo que el patrón de bacterias metanotróficas es también fundamental para comprender la dinámica de CH₄. El Phylum Proteobacteria, el cual contiene clases de organismos metanotrofos²⁰⁵, se detectó en todas las lagunas y fue principalmente abundante en SG (54%), seguido de SA (24%) y de BU (13%). Dentro de este Phylum las clases metanotróficas detectadas fueron: Gamma-P - con un 47% en SG, 17% en SA y 8% en BU – seguida de Alpha-P – con un 7% en SG, 5% en SA y 4% en BU – y de Delta-P, que solamente se detectó en SG en un 5%. Si bien presencia no implica actividad, en este caso sabemos que estas bacterias oxidantes de metano (BOM) se encontraban activas por los resultados obtenidos de las tasas de oxidación de CH₄ a partir de las incubaciones en oscuridad (0,03, 0,01 y 0,02 μM d⁻¹ para SG, SA y BU, respectivamente). La actividad de las BOM se ve afectada por distintos factores ambientales, donde mayores concentraciones de CH₄, menores concentraciones de O₂ y menor disponibilidad de luz favorecen la metanotrofia¹³⁸. SG fue la laguna con mayor concentración de CH₄ disuelto - dos órdenes de magnitud mayor que para las otras dos lagunas -, seguida de SA y por último BU, lo cual seguramente puede estar favoreciendo la abundancia de BOM en SG. Entre SA y BU, es difícil distinguir cómo el CH₄, O₂ y luz pueden combinarse para determinar el patrón de oxidación, porque son lagunas con características ecológicas similares (Tabla 3.2). De todas formas, como se mencionó varias veces, que la abundancia relativa sea mayor en una laguna no indica que lo sea en términos totales, por lo que no es posible comparar las abundancias relativas entre lagunas ni compararlas directamente con las tasas de oxidación estimadas. Lo que es importante destacar a partir de estos datos es que hubo BOM en todas las lagunas, que estas fueron responsables de las tasas de oxidación estimadas y que su abundancia relativa fue distinta entre lagunas.

Otros mecanismos para explicar POM proponen que el fitoplancton puede proveer metilfosfonatos que al ser de-metilados por organismos heterótrofos en el proceso de adquisición de fósforo liberan CH₄¹⁸⁶. Pérez-coronel & Beman (2022)¹⁹¹ proponen que tanto la degradación de metilfosfonatos como también la producción de CH₄ asociada al metabolismo de productores primarios explicaron POM en un lago de USA, con lo cual puede no ser solamente un mecanismo el responsable de POM, sino un conjunto de ellos. Finalmente, hay evidencia experimental que sugiere que todas las células son capaces de producir CH₄ a partir de radicales metilados, producidos a partir de estrés oxidativo¹⁸⁵. Las condiciones que afectan los niveles de las especies reactivas de oxígeno, de hierro ferroso y de donantes de grupos metilos en las células, modulan la producción de CH₄ por esta vía¹⁸⁵. Para explorar el o los procesos responsables de POM en las lagunas pampeanas, realizamos balances de masa isotópicos para derivar δ¹³C-CH_{4-POM}. En primer lugar, las estimaciones indican que el CH₄ producido por POM (-23‰ a -42‰, Tabla 3.5) se encuentra enriquecido respecto de δ¹³C-CH₄ medido en los sedimentos (-60‰, Tabla 2.1, pág. 56). En segunda instancia, δ¹³C-CH_{4-POM} fue mucho más

enriquecida de lo que se espera por metanogénesis por arqueas (entre -110 y -50‰ ¹⁰) con lo cual, si bien se detectaron arqueas metanogénicas en los mesocosmos, estas no necesariamente estarían aportando al POM. Thottathil et al. (2022)¹⁸ realizó una aproximación similar para explorar $\delta^{13}\text{C-CH}_4\text{-POM}$ de 5 lagos templados boreales y encontró que las señales variaron entre -38‰ y -63‰ , dependiendo del lago. Los autores proponen que la metanogénesis clásica no se corresponde con $\delta^{13}\text{C-CH}_4\text{-POM}$ obtenidas y que la descomposición de metilfosfonatos tampoco podría ser una explicación porque el sistema presenta suficiente fósforo. Considerando que, además, ellos detectaron una relación positiva entre POM y Chla, los autores concluyen que la producción de CH_4 por organismos autótrofos es la explicación más plausible. En línea con esto, Klintzsch et al. (2023)¹⁸⁷ exploraron $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ de CH_4 producido directamente por aislamientos fitoplanctónicos (en particular, de haptofitas y cianobacterias) y encontraron que los valores oscilaron entre $-19,3\text{‰}$ y $-54,5\text{‰}$, similar a lo reportado por Thottathil et al. (2022)¹⁸ y en este estudio. En las lagunas pampeanas, la producción de CH_4 por descomposición de metilfosfonatos no resulta una explicación plausible porque presentan niveles altos de fósforo, como se mencionó previamente. Además, la $\delta^{13}\text{C-CH}_4\text{-POM}$ obtenida no se corresponde con metanogénesis por arqueas metanogénicas, ni tampoco con la señal medida en los sedientos. La explicación más plausible para POM en estas lagunas, entonces, sería la producción de CH_4 por medio de autótrofos. De todos modos, no es posible descartar en su totalidad las otras vías de producción.

Cabe destacar que el estudio de la producción óxica de CH_4 en sistemas acuáticos ha adquirido una gran relevancia en los últimos años, pero las investigaciones se han centrado en lagos estratificados del hemisferio norte¹⁷⁹. Por tanto, este trabajo representa uno de los primeros estudios realizados en lagos someros eutróficos y del hemisferio sur. En este capítulo realizamos experimentos a campo para explorar POM en lagunas pampeanas donde, a través de balances de masa contemplando fuentes y sumideros de CH_4 , analizamos la magnitud y significancia de POM. Nuestras estimaciones indican que todas las lagunas presentan POM, con tasas entre $0,3$ y $6,1 \mu\text{M día}^{-1}$, por lo que no se rechaza la hipótesis propuesta. En todas las lagunas se detectaron arqueas metanogénicas, por lo que potencialmente podrían estar produciendo CH_4 en la columna de agua. No obstante, los balances de masa isotópicos indican que la principal fuente de producción de este CH_4 sería el fitoplancton, dado que la señal isotópica derivada está enriquecida respecto a la señal de la metanogénesis por arqueas. Además, se detectó que la contribución de POM al total de emisiones de CH_4 puede llegar hasta el 50%. Los resultados obtenidos indican que el fitoplancton sería la fuente principal de POM, pero que no necesariamente se relaciona de forma lineal la abundancia de este con la tasa de POM. El presente trabajo contribuye al entendimiento del ciclo del CH_4 en sistemas acuáticos en general, y destacan la relevancia de POM en lagunas someras en particular desde una aproximación experimental a escala de campo.

PRODUCCIÓN DE METANO POR FITOPLANCTON DE LAGUNAS PAMPEANAS

Introducción

La producción óxica de CH₄ (POM) es cada vez más aceptada como parte del ciclo del CH₄ en sistemas acuáticos. Diversos estudios reportaron producción de CH₄ en la columna de agua de sistemas acuáticos^{16,18,22,202}, incluyendo los resultados presentados en el capítulo anterior de esta tesis. No resulta claro, sin embargo, a través de que mecanismos y mediante qué organismos ocurre dicha producción. Como se mencionó en el capítulo anterior, hay evidencia de producción de CH₄ por descomposición de metilfosfonatos mediante bacterias heterotróficas¹⁸³, por procesos relacionados con estrés oxidativo¹⁸⁵, por presencia de arqueas metanogénicas en micro nichos anóxicos en la columna de agua²² y también por producción de CH₄ por cianobacterias²³, haptofitas y microalgas marinas^{187,190}. La producción de CH₄ por fitoplancton parecería ser una de las vías de producción más relevantes, aunque no quedan claros los mecanismos involucrados en dicha metanogénesis. Bižić et al. (2020)²³ detectaron producción de CH₄ por géneros de cianobacteria provenientes de suelo, de ambientes marinos y de agua dulce, y observaron que la misma estaba vinculada de forma positiva con la producción primaria. Esta idea de una asociación entre la producción primaria y POM se basa en un aumento de CH₄ asociado a un aumento de O₂ en las horas de luz y una anulación de la producción de CH₄ al inhibir la fotosíntesis mediante compuestos químicos²³. No se conoce hasta la fecha, no obstante, el mecanismo molecular detrás de esta producción.

En el capítulo 3 de esta tesis se presentó evidencia que sustenta la existencia de POM en tres lagunas pampeanas de la Llanura Pampeana y los análisis de isótopos indicaron que la producción de CH₄ por organismos autotróficos es la vía más plausible de producción. Sin embargo, los resultados obtenidos no son suficientes para determinar si el fitoplancton se encuentra produciendo CH₄ y, por ende, contribuyendo a la POM medida. Para profundizar en esto, en este capítulo se realizaron experimentos controlados para evaluar el rol del fitoplancton en la POM. Por lo tanto, los objetivos del presente capítulo son 1) analizar la producción de CH₄ por los grupos fitoplanctónicos aislados de las tres lagunas analizadas en el capítulo 3, 2) estimar la tasa de producción de cada grupo de organismos, en caso de que produzca CH₄ y 3) explorar la relación entre producción de CH₄ y producción primaria. La hipótesis de este trabajo es que H) Los organismos

fitoplanctónicos aislados de las lagunas pampeanas contribuyen a la POM medida a campo y la predicción que P) Los organismos fitoplanctónicos aislados de las lagunas pampeanas producen CH₄.

Métodos

El presente capítulo se llevó adelante parte en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (sección 1) y parte en el *Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries*, Alemania (secciones 2 a 4).

1. Aislamiento de organismos fitoplanctónicos y cultivos enriquecidos

El día 5 de mayo del 2022 se colectaron 5L de agua de las lagunas SA, BU y SG, filtrando por una red de 25 µm para excluir el macro y meso zooplancton. El agua fue llevada al laboratorio, dónde previamente se habían preparado placas de Petri con distintos medios de cultivo agarizado: BBM, BBM + vitamina, BBM + extracto de suelo y BG11 (detalle en Supl. 4.1). Las placas fueron sembradas mediante la técnica de pulverizado sobre medio agarizado²³⁵, sembrándose en total 3 placas por tipo de medio de cultivo y por laguna (48 placas en total). Una vez sembradas, las cajas de Petri fueron colocadas bajo condiciones controladas entre 23 – 25°C y un fotoperíodo 12hs luz: 12hs oscuridad y fueron revisadas semanalmente para detectar el crecimiento de colonias bajo lupa. Una vez detectada una colonia, la misma retirada de la placa mediante un anza bajo esterilidad, fue colocada en un portaobjetos e identificada bajo microscopio óptico invertido utilizando bibliografía especializada²³²⁻²³⁴. Posteriormente, esta colonia fue repicada en una segunda caja de Petri o en un tubo flauta con el mismo medio de cultivo agarizado, con el objetivo de aislarla y aumentar su densidad. Estos repicados fueron mantenidos bajo las mismas condiciones controladas de luz y temperatura que las placas de Petri madre. De las tres lagunas se pudieron aislar 13 géneros de fitoplancton en total, pertenecientes a las Divisiones Chlorophyta, Cyanobacteria y Bacillariophyta. Además, parte del agua traída de las lagunas fue utilizada para generar medios enriquecidos, que fueron repicados una vez por semana colocando mitad del volumen de cultivos enriquecidos y mitad de volumen de medio BG11 nuevo. Todos los aislamientos y los cultivos enriquecidos fueron llevados a Alemania en medio de cultivo líquido BG11.

2. Experimentos en espectro de masa (Membrane Inlet Mass Spectrometer, MIMS)

Una vez en Alemania, los cultivos fueron repicados en nuevo medio de cultivo líquido BG11 y se dejaron aclimatando por una semana a una temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 15hs luz: 9 hs oscuridad. Una vez pasado el período de aclimatación, se comenzó con los experimentos en el MIMS. Los experimentos realizados se basaron en el trabajo de Bižić et al. (2020)²³, que fue llevado a cabo en la misma institución y utilizando el mismo espectro de masa.

Los experimentos se realizaron utilizando un MIMS (*Bay Instruments*, MD, EE. UU.) que consiste en una estación de bombeo *Pfeiffer Vacuum HiCube 80 Eco Turbo* conectada a un espectrómetro de masas de fuente de iones de haz cruzado QMG 220 M1, PrismaPlus, C-SEM, (*Pfeiffer Vacuum*, Alemania) (Fig. 4.1). Este tipo de espectro de masa presenta una membrana semipermeable y fina que es afín a moléculas pequeñas y no polares, como lo son el O_2 y el CH_4 . Por ende, es especialmente útil para medir concentraciones de estos dos gases disueltos en muestras líquidas, como un cultivo. Cada cultivo medido es colocado en una cámara de 3,5 ml que se encuentra rodeada de una cámara exterior llena de agua, conectada a un baño termostático para controlar su temperatura. La cámara de cultivo tiene por debajo un agitador magnético para evitar la formación de gradientes de concentración y está, además, expuesta a un fotoperíodo de 15hs luz: 9 hs oscuridad (el mismo que se usaba para aclimatar los cultivos). En su extremo superior, la cámara de cultivo presenta dos tubos capilares de acero: uno de ellos toma cultivo y lo envía al espectro de masa para su medición, mientras que el otro devuelve el cultivo ya medido a la cámara, creando un sistema cerrado para el líquido. Este circuito se logra mediante el bombeo por una bomba peristáltica (*Minipuls 3, Gilson*) (Fig. 4.2). El líquido tomado de la cámara de cultivo a través del capilar entra en contacto con la membrana fina y semipermeable (membrana de silicona *microbore* semipermeable de 8 mm de largo, *Silastic, DuPont*) por la cual atraviesan los gases presentes en el cultivo, que se colectan en otro tubo. Este tubo colector pasa luego por una trampa de frío, para que cualquier remanente de líquido se congele y no ingrese al MIMS. Una vez pasado este punto, los gases ingresan al MIMS, donde las moléculas son ionizadas, luego son aceleradas por un campo eléctrico, son desviadas por un campo magnético y finalmente son colectadas por un detector. Esta medición se realiza cada 12 segundos y los datos son recabados en una computadora conectada al MIMS. Es importante destacar que este sistema genera un circuito cerrado para los líquidos, pero no así para los gases, por lo que hay pérdidas mínimas pero constantes de gases a la atmósfera.

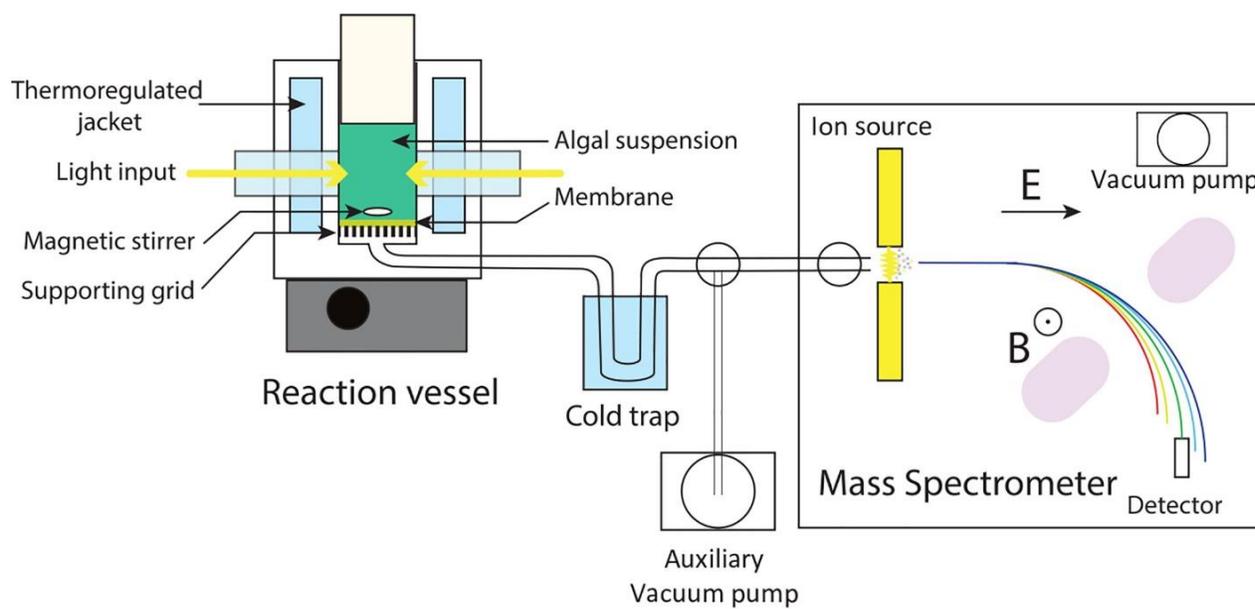


Figura 4.1 Esquema mostrando la disposición de los distintos dispositivos utilizados para el experimento y del MIMS (espectro de masa, *Mass Spectrometer*)²⁰⁷. Los gases disueltos en la muestra biológica – en este caso un cultivo de fitoplancton – pasan a través de una membrana fina, semipermeable y afín a moléculas no polares, hacia un tubo conectado a una trampa de frío, para proteger al espectro de masa de cualquier posible presencia de agua en el tubo. Luego de este paso los gases entran al espectro de masa, donde son ionizados. Las moléculas ionizadas son aceleradas por un campo eléctrico (E), desviadas por un campo magnético (B) y colectadas por un detector. Esta medición se realiza cada 12 segundos, mientras hay una constante circulación del cultivo entre la cámara de cultivo y el detector del espectro.

Al inicio de cada experimento, se transfirieron 3,5 ml del cultivo a la cámara de cultivo y se utilizó un volumen igual para determinación de Chla y extracción de ADN. Para determinar la Chla, 3,5ml de cultivo se filtraron a través de un filtro Whatman GF/F y el mismo se guardó a -20°C hasta extracción y determinación. La extracción se realizó utilizando acetona como solvente de extracción. Cada filtro se colocó en un tubo, se agregó acetona y los tubos se dejaron por 24 horas a 4°C y oscuridad, para luego medir la absorbancia bajo las longitudes de onda 750 nm y 665 nm en un espectrómetro Hitachi. La extracción de ADN se detalla en la sección 4. Las determinaciones de Chla y la extracción de ADN también se realizaron al final de los experimentos para todos los cultivos, pero en este caso filtrando 1,5ml para cada caso.

El régimen de luz: oscuridad para los experimentos fue de luz desde las 7:00hs hasta las 21:00hs y oscuridad desde las 21:00hs hasta las 7:00am, es decir, 15hs luz: 9hs oscuridad. La intensidad de la luz utilizada fue de $400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada experimento duró por lo menos 72hs, de modo de contar con tres ciclos de luz: oscuridad. La medición en el MIMS se realizó para cada cultivo dos veces, y en algunos se realizó tres veces,

de manera tal de contar con réplicas de mediciones para cada género. Como controles negativos se utilizaron agua miliq, medio de cultivo BG11 y los cultivos autoclavados, que previamente a medirlos fueron degaseados mediante burbujeo, para evitar una supersaturación de CH₄ en los controles.

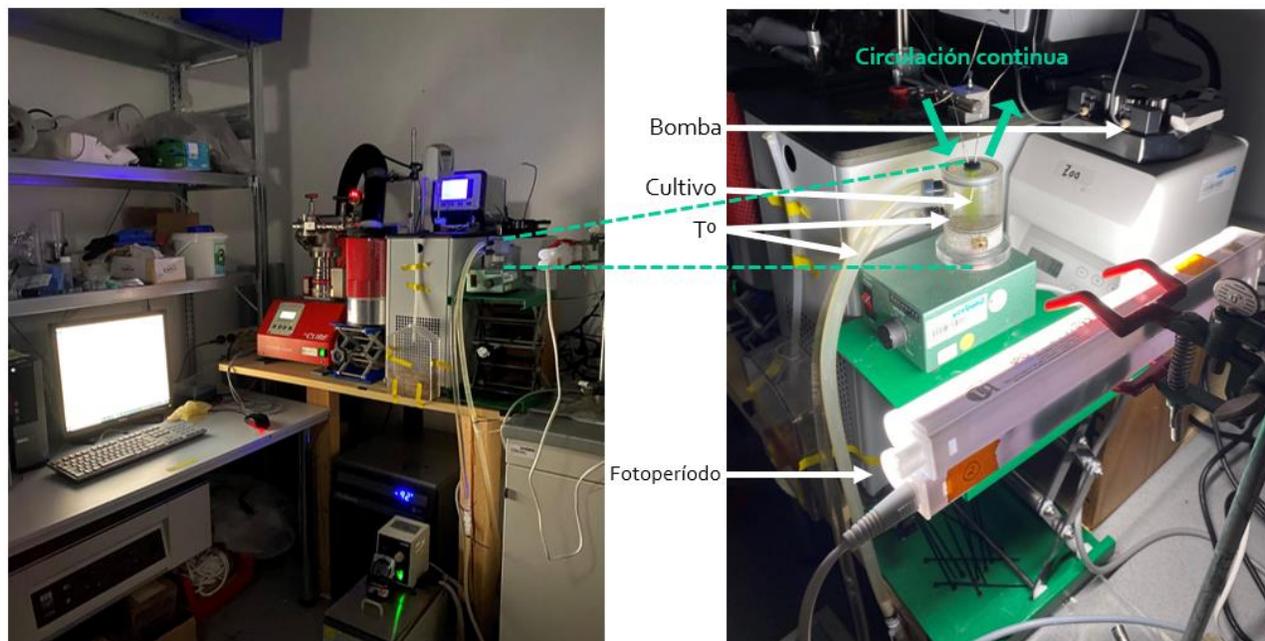


Figura 4.2. MIMS. Izquierda: Vista general de los dispositivos utilizados para llevar adelante los experimentos. Derecha: Cámara de cultivo donde se colocaba el cultivo a medir (Cultivo), cámara externa con agua conectada a un baño termostático (Tº), tubos capilares por los que circulaba continuamente el cultivo (Circulación continua), bomba peristáltica que continuamente bombeaba cultivo (Bomba) y luz conectada a un fotoperíodo de 15hs luz:9hs oscuridad (Fotoperíodo).

Es importante mencionar que si bien se llevaron a Alemania 25 muestras distintas – entre aislamientos y cultivos enriquecidos –, el tiempo no alcanzó para realizar experimentos con todos ellos. Se priorizó medir los aislamientos por sobre los cultivos enriquecidos y también se priorizó medir menos aislamientos más veces, que más aislamientos pero solamente realizando una medición. Cabe destacar que algunas mediciones hubo que repetirlas por problemas relacionados con el espectro de masa: cortes de luz, actualizaciones de la computadora que reiniciaban el sistema y dejaban de medir, etc. Por lo tanto, la cantidad de experimentos realizados en verdad fue mayor, pero mediciones que contaran con más de 72hs continuas fueron únicamente las siete mencionadas.

3. Tasas de metanogénesis

Los cálculos de concentración de O₂ y CH₄ disueltas en cada uno de los experimentos se realizaron siguiendo a Bižić et al. (2020)²³. Las tasas de metanogénesis se calcularon utilizando la función Savitzky-Golay del paquete

signal (<http://r-forge.r-project.org/projects/signal/>). Primeramente se hizo un suavizado de la concentración de CH₄, considerando un polinomio de grado 2 y 2001 iteraciones por punto suavizado. Luego se calculó la primera derivada de este suavizado, que corresponde a la tasa de metanogénesis, considerando también un polinomio de grado 2 y 2001 iteraciones por punto estimado. Posteriormente se corrigió esta tasa por la pérdida física del MIMS: el MIMS se trata de un circuito cerrado en cuanto a líquidos pero no en cuanto a gases, por lo que hay una pérdida mínima constante de CH₄ a la atmósfera. Esta pérdida física dependerá de la concentración de CH₄ en el cultivo utilizado, dado que a mayor CH₄ disuelto en el cultivo habrá mayor pérdida a la atmósfera. Para caracterizar la pérdida física de CH₄ se utilizó la información obtenida de a partir de las mediciones de los cultivos autoclavados (controles) y se obtuvo una relación entre la concentración inicial de CH₄ en el cultivo y la pérdida de CH₄ medida: dado que son cultivos muertos no hay oscilaciones en la concentración de CH₄, sino que hay una disminución de este en el tiempo producto de la pérdida física (Supl. 4.2, Fig. S4.1). De esta forma se obtuvo una relación lineal entre concentración inicial de CH₄ disuelto y pérdida física de CH₄, y utilizando esta relación se estimó la pérdida física esperada para cada cultivo teniendo en cuenta su concentración de CH₄ al inicio del experimento. Luego de corregir por la pérdida física, se relativizó la tasa al tiempo entre cada medición del MIMS (12 segundos) y se convirtieron las unidades desde nM a μM y de segundo a hora (μM hora⁻¹). Por último, las tasas fueron relativizadas a la biomasa de fitoplancton, obteniéndose finalmente tasas de metanogénesis en μM hora⁻¹ g Chla⁻¹.

4. Análisis moleculares

De todos los cultivos se extrajo ADN al inicio y al final de los experimentos, con el fin de detectar la presencia de arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas. Las extracciones de ADN se realizaron siguiendo el protocolo de Nercessian et al. (2005)²⁰⁸. Luego de extraer el ADN, se realizaron PCR con primers específicos para arqueas metanogénicas y bacterias metanotróficas. Para arqueas metanogénicas se utilizaron primers para el gen *mcrA* (mlas-modF 5'-GGYGGTGMGGDTTCACMCARTA-3', *mcrAR* 5'-CGTTCATBGCGTAGTTVGGRTAGT-3', producto de ~450nt), que codifica para la metil coenzima reductasa M, vinculado con la producción de CH₄ y por ende biomarcador de arqueas metanogénicas²⁰⁹. Para bacterias metanotróficas se utilizaron primers para el gen *pmoA* (A189F 5'-GGNGACTGGGACTTCTGG-3', mb661R 5'-CCGGMGCAACGTCYTTACC-3') que codifica para una subunidad de la enzima pMMO, vinculada con la oxidación de CH₄ y por ende biomarcador de metanotrofos²¹⁰. Con estos primers se realizaron PCR utilizando *HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, USA)*. Para el gen *mcrA* la PCR tuvo las siguientes condiciones: 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s y 72°C por 30s, luego de lo cual se realizó un paso final de elongación de 5min a 72°C. Para el gen *pmoA* la PCR tuvo las siguientes condiciones: 94°C for 3 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min y 72°C por 1min, luego de lo cual se realizó un paso

final de elongación de 5min a 72°C. Luego de la amplificación, los productos de PCR fueron chequeados en un gel de agarosa al 2% para determinar si la amplificación fue exitosa y determinar si había arqueas y/o bacterias presentes en las muestras.

Resultados

1. Experimentos con MIMS y tasas de metanogénesis

En los tres meses de la estadía de investigación se realizaron experimentos con 4 aislamientos de Chlorophyta (*Scenedesmus linearis*, *Scenedesmus quadricauda*, *Monoraphidium circinale*, *Oocystis lacustris*) y 3 aislamientos de Cyanobacteria (*Phormidium sp.*, *Leptolyngbya sp.*, *Pseudoanabaena sp.*).

A modo ilustrativo, se muestran los resultados de CH₄ disuelto, O₂ disuelto y tasa de metanogénesis para un género de Cyanobacteria (*Leptolyngbya sp.*, Fig. 4.3) y un género de Clorophyta (*Oocystis lacustris*, Fig. 4.4). Todos los aislamientos analizados, tanto de Chlorophyta como de Cyanobacteria, estaban vivos y en buen estado al realizar los experimentos. Esto se evidencia por los cambios en la concentración de O₂, asociados a la producción primaria. Todos los cultivos analizados presentaron evidencia de producción de CH₄. Los picos de CH₄ se asociaron a las horas de luz, seguidos de disminuciones en las horas de oscuridad. De hecho, al solapar el comportamiento del O₂ junto con el de CH₄, se puede observar cómo los picos de CH₄ siguen a los picos de O₂ (Fig. 4.3A y Fig. 4.4A). A partir de las variaciones de CH₄ en el tiempo se calculó la tasa de metanogénesis, la cual fue variable en el tiempo, con picos en las horas de luz y disminuciones en las horas de oscuridad (Fig. 4.3B y Fig. 4.4B).

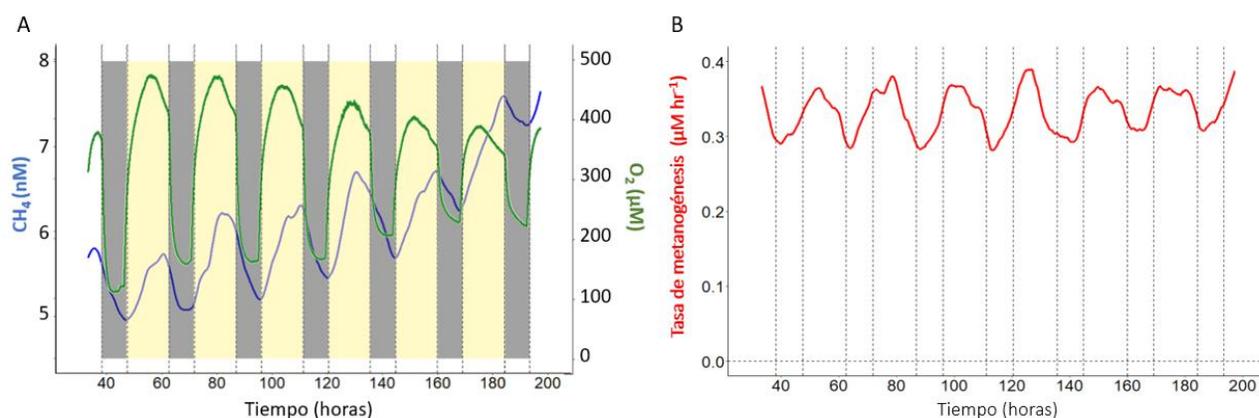


Figura 4.3. Resultados de MIMS (A) y tasa de metanogénesis calculada a partir de las variaciones de la concentración de CH₄ (B) para *Leptolyngbya sp.* Las columnas amarillas corresponden a las horas de luz, mientras que las columnas grises corresponden a las horas de oscuridad.

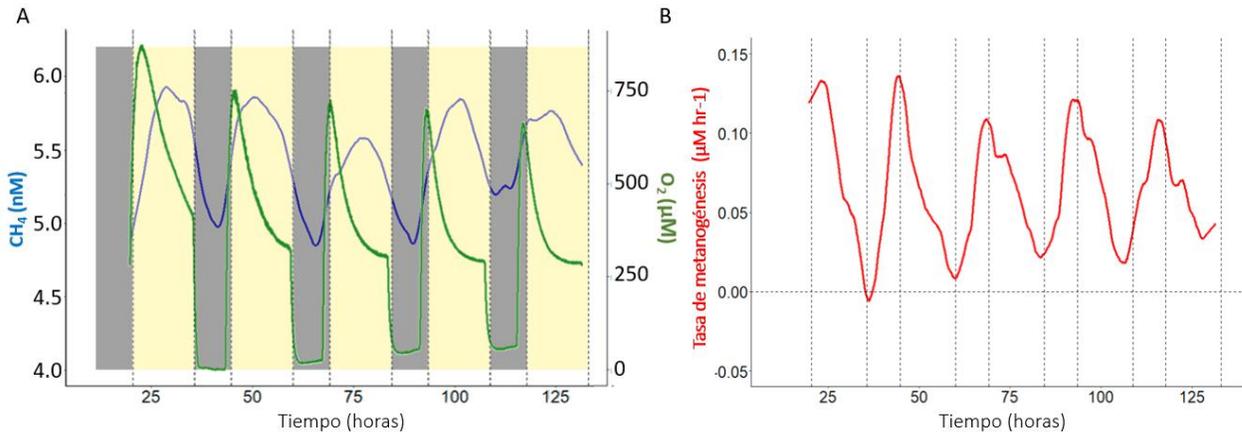


Figura 4.4. Resultados de MIMS (A) y tasa de metanogénesis calculada a partir de las variaciones de la concentración de CH₄ (B) para *Oocystis lacustris*. Las columnas amarillas corresponden a las horas de luz, mientras que las columnas grises corresponden a las horas de oscuridad.

A partir de las variaciones en las tasas de metanogénesis se calculó el valor medio para cada réplica de cultivo medido, obteniendo una media y un desvío estándar para cada género analizado (Fig. 4.5). Las medias y desvíos provienen de dos mediciones para *Scenedesmus linearis*, *Phormidium sp.*, *Pseudoanabaena sp.* y *Oocystis lacustris*, y de tres mediciones para *Monoraphidium circinale*, *Scenedesmus quadricauda* y *Leptolyngbya sp.* Todas las tasas de metanogénesis se encuentran en el rango de 0 – 0,4 µM hora⁻¹ g Chla⁻¹, y no se observan diferencias entre Cyanobacteria y Chlorophyta.

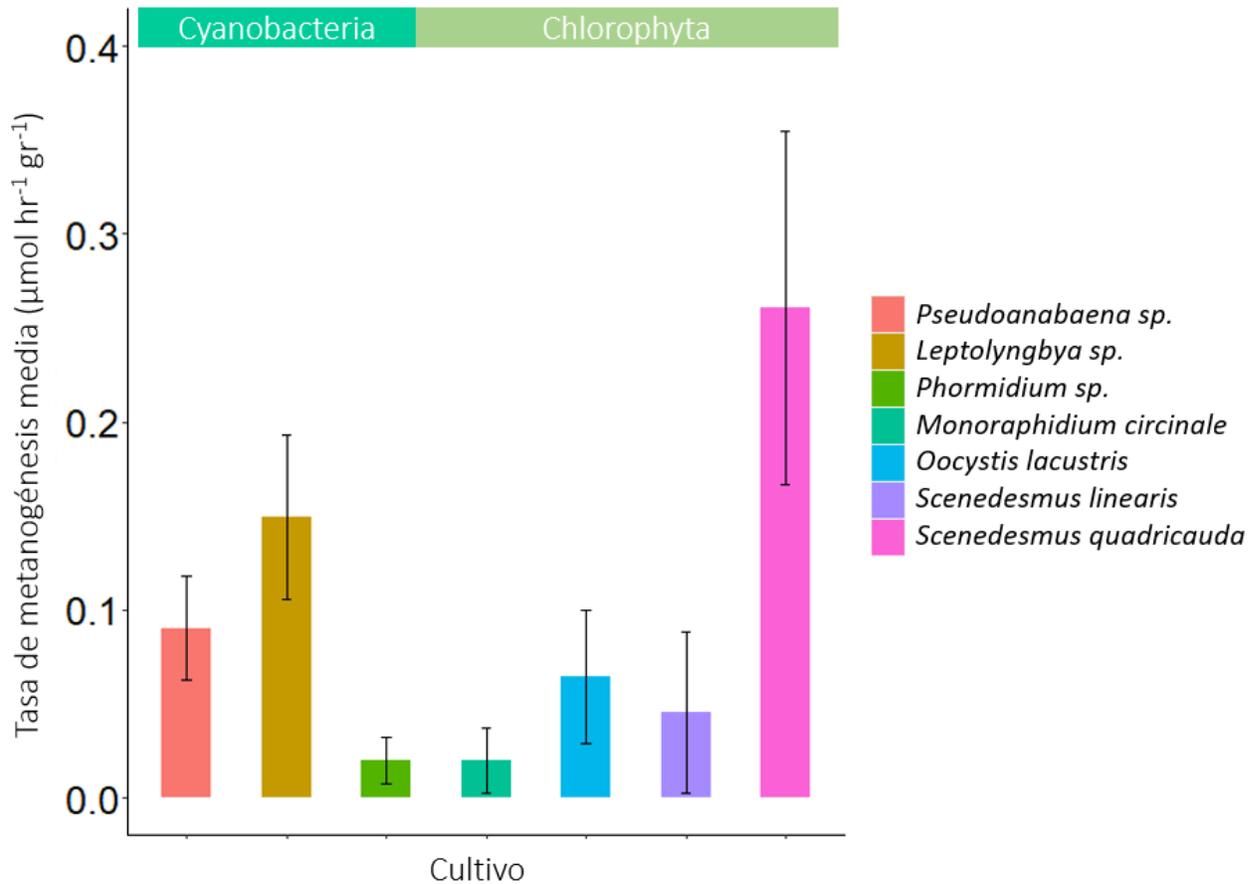


Figura 4.5. Tasas de metanogénesis media de todos los cultivos analizados en el MIMS, distinguiendo entre Cyanobacteria y Chlorophyta.

Los valores medios representados en la Fig. 4.5 se compararon con datos previamente publicados. Para eso se tomó la información presentada por Bižić et al. (2020)²³, donde se hace una recopilación de tasas de metanogénesis medidas para distintos organismos, y se sumaron las mediciones realizadas en este capítulo (Fig. 4.6). Las tasas obtenidas para cianobacterias y clorofitas de las lagunas Pampeanas están en el orden de magnitud reportado por Bižić et al. (2020)²³ para cianobacterias de agua dulce, de suelos y algunas especies marinas.

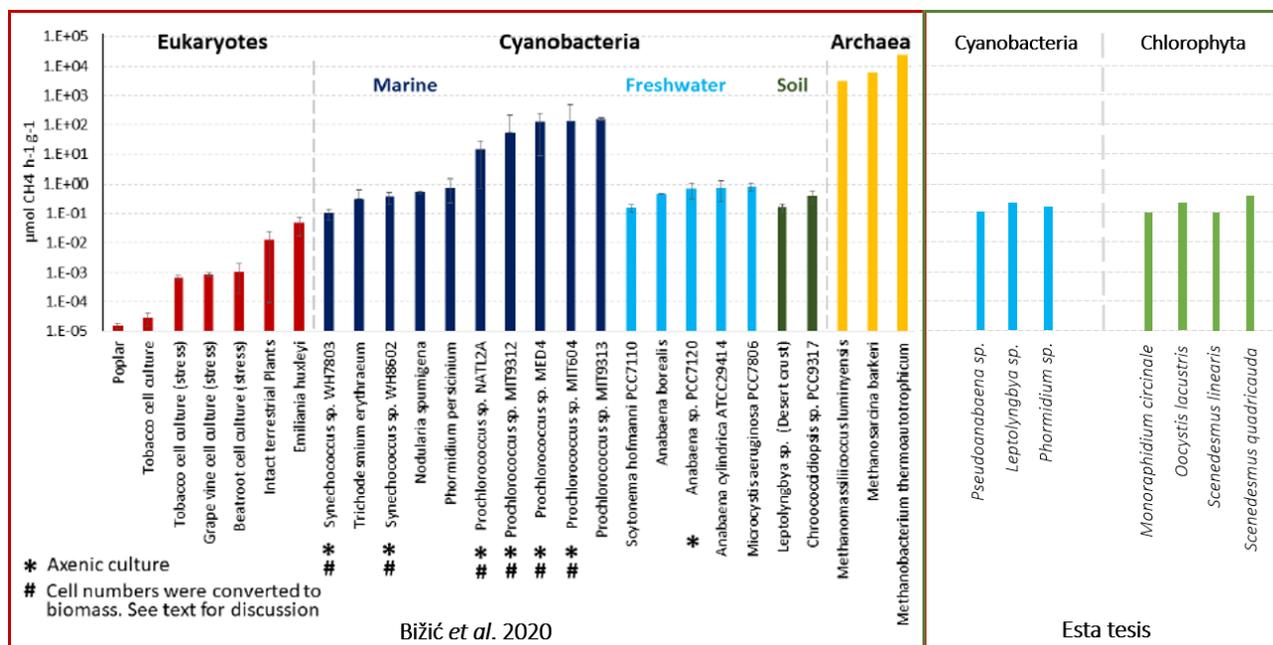


Figura 4.6. Tasas de metanogénesis de los géneros de Cyanobacteria y Chlorophyta medidos en las lagunas pampeanas (izquierda) comparados con los datos publicados por Bižić et al. (2020) (derecha).

2. Controles

Como controles se utilizaron agua miliq (Fig. 4.7), BG11 (Fig. 4.8) y cultivos autoclavados (Supl. 4.3, Fig. S4.2). La medición de agua miliq indica oscilaciones pequeñas, propias de las mediciones del espectro, pero se ve una concentración constante tanto de CH₄ como de O₂ en el tiempo. Respecto a BG11, el degaseo realizado previo a la medición no fue suficiente para disminuir la supersaturación de CH₄ en el líquido, motivo por el cual se observa tanto para CH₄ como para O₂ una disminución de ambos gases en el tiempo. Las mediciones de los cultivos autoclavados presentaron comportamientos similares a BG11, debido a que en esos casos tampoco fue suficiente el degaseo previo realizado a la medición. No obstante, tanto para BG11 como para los cultivos autoclavados, no se ven aumentos y disminuciones de la concentración de CH₄ ni de O₂ asociados a horas de luz y oscuridad, como sí se ven en los resultados reportados en la sección 1.

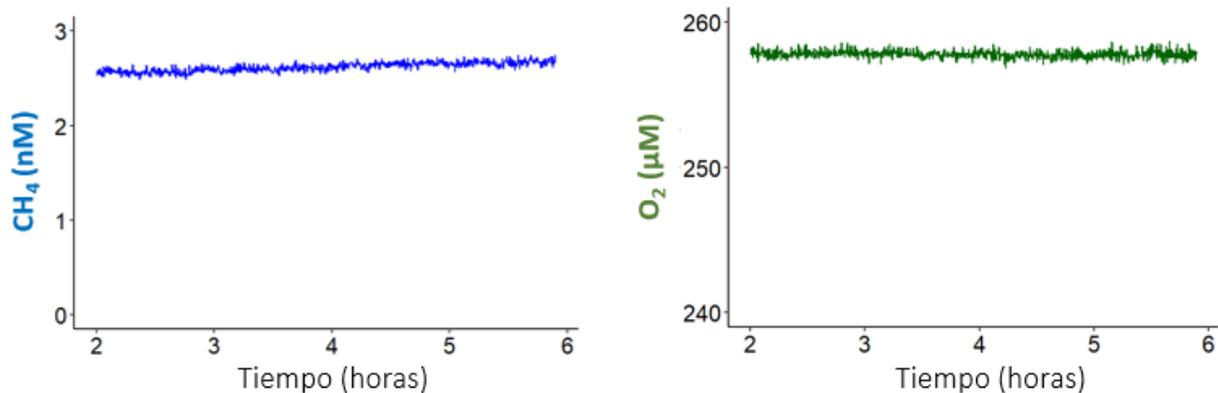


Figura 4.7. Agua miliq, autoclavada, a 25°C, medida en MIMS. Se observa una concentración constante de ambos gases en el tiempo.

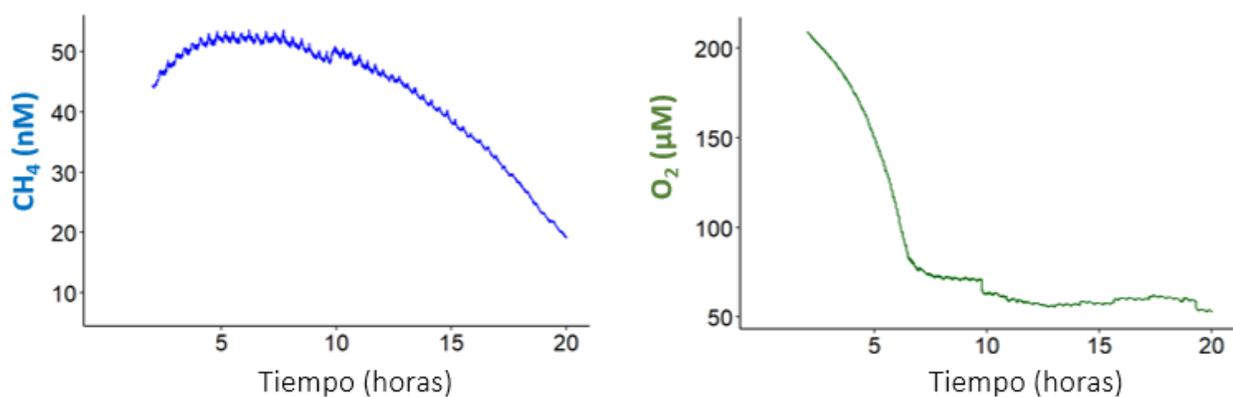


Figura 4.8. Medio de cultivo BG11 autoclavado, a 25°C, previamente degaseado, medido en el MIMS.

3. Análisis moleculares

No se detectó presencia de arqueas metanogénicas ni de bacterias metanotróficas en ninguno de los cultivos analizados (Fig. 4.9). Cabe destacar que del cultivo *Oocystis lacustris* no se llegó a extraer ADN antes de finalizar la etapa de investigación, por lo que para este cultivo en particular no se tienen estos resultados. Los controles positivos detectaron presencia de arqueas y bacterias, respectivamente, y en el control negativo no se detectan bandas, como lo esperado.

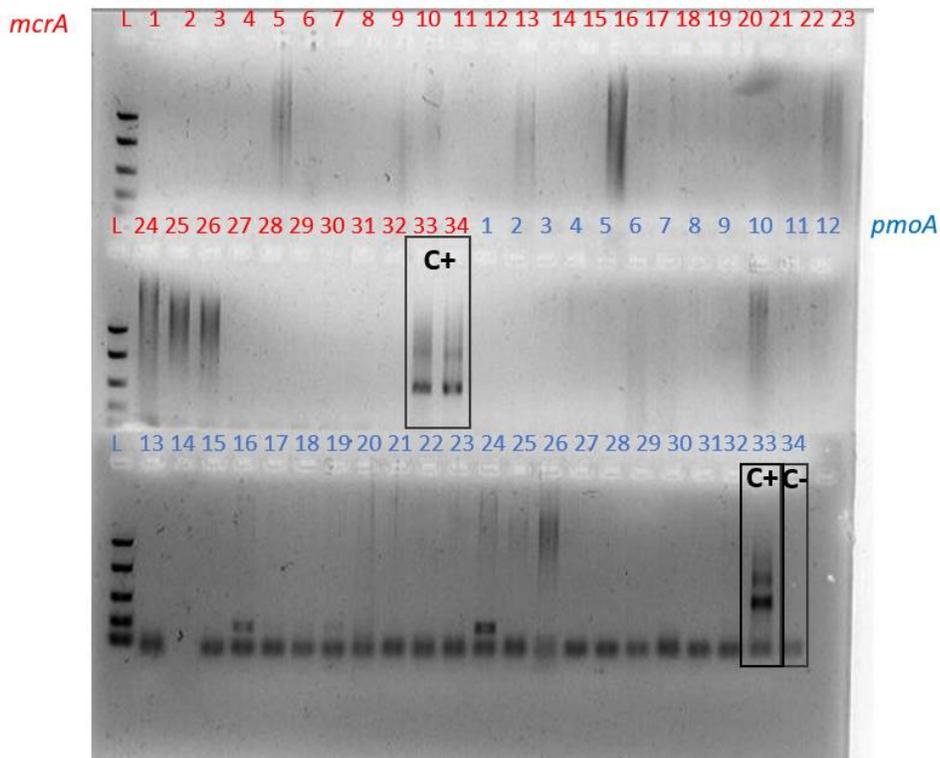


Figura 4.9. Gel de agarosa revelado, donde se observan los resultados de las PCR realizadas para detectar presencia de arqueas metanogénicas (gen *mcrA*, rojo) y de bacterias metanotróficas (gen *pmoA*, azul). En rojo: L significa Ladder, calles N°1 a N°28 corresponden a muestras de *Scenedesmus linearis* (1 – 3), *Phormidium sp.* (4 – 7), *Monoraphidium sp.* (8 – 11, 27 y 28), *Scenedesmus quadricauda* (12 – 15), *Phormidium sp.* + *Pseudoanabaena sp.* (16 – 19, 24), *Leptolyngbya sp.* (20 – 23, 25 y 26), extracto de agua de lago pensadas como control positivo para *pmoA*, extracto de suelo pensado como control positivo para *mcrA* pero que no funcionó (31 y 32), control positivo para *mcrA* que funcionó, proveniente de un extracto de arqueas metanogénicas (33 y 34). En azul: L proviene de Ladder, calles N°1 a N°28 corresponden a lo mismo que para *mcrA*, extracto de agua de lago pensadas como control positivo para *pmoA* que no funcionó (29 y 30), extracto de suelo pensado como control positivo para *mcrA* pero que no funcionó (31 y 32), control positivo para *pmoA* que funcionó, proveniente de un extracto de bacterias metanotróficas (33) y control negativo (productos para PCR sin muestra, 34).

Discusión

En todos los cultivos de fitoplancton analizados se observaron aumentos de la concentración de CH₄ en las horas de luz, seguidos de disminuciones en las horas de oscuridad. Los controles negativos, por el contrario, no presentaron variaciones en la concentración de CH₄ ni de O₂ asociados a cambios en el fotoperíodo, indicando que los cambios detectados en las mediciones de los cultivos deben ser necesariamente producto

de la actividad de organismos vivos presentes en los cultivos. Los resultados moleculares indican que no había arqueas metanogénicas ni bacterias metanotróficas en ningún cultivo: los aislamientos fueron realizados utilizando un medio de cultivo que beneficia el crecimiento de fitoplancton, pero no fue pensado para mantener arqueas ni bacterias, que tienen otros requerimientos^{211,212}. Por lo tanto, es plausible que a lo largo de los repiques realizados desde el aislamiento de los organismos hasta su medición, tanto arqueas metanogénicas como bacterias metanotróficas se hayan perdido – es decir, no hayan sido seleccionados. La ausencia de arqueas indica que el aumento del CH₄ es necesariamente producto de la actividad del fitoplancton, y la ausencia de bacterias indica que en ninguno de los cultivos hubo consumo biológico de CH₄ y que las disminuciones de este estarían también relacionadas con la actividad del fitoplancton. Los resultados de las mediciones en el MIMS muestran que la metanogénesis ocurre tanto en las horas de luz como en las horas de oscuridad, lo que se evidencia por una tasa de producción positiva todo el tiempo. No obstante, la tasa es mayor en las horas de luz y disminuye en las horas de oscuridad, sugiriendo la existencia de distintos mecanismos de metanogénesis durante el día y la noche. En las horas de luz, se observa una relación positiva entre la producción primaria y la metanogénesis, donde los picos de CH₄ siguen a los picos de O₂, indicando una metanogénesis que utiliza como sustrato productos de la fotosíntesis²³. Durante las horas de oscuridad, la tasa de metanogénesis sigue siendo positiva pero es menor y, teniendo en cuenta que durante la noche no hay actividad fotosintética, esto podría estar vinculado con una metanogénesis a partir de productos de la fotosíntesis que fueron almacenados durante el día²³. Es importante destacar que, si bien hay evidencias de una asociación entre la fotosíntesis y la metanogénesis, no es posible aseverarlo solamente con los resultados obtenidos en este capítulo. Para esto se debería haber, por ejemplo, interrumpido la fotosíntesis mediante compuestos químicos y observado el efecto sobre la producción de CH₄. Otras posibles vías de producción de CH₄ por parte de los cultivos fitoplanctónicos podrían ser la fijación de nitrógeno (solamente para las cianobacterias fijadoras de nitrógeno)²¹³, la fermentación de compuestos almacenados²¹⁴ y/o la desmetilación de metilfosfonatos para adquirir fósforo^{215,216}. Respecto a la fijación de nitrógeno, este mecanismo no es posible ya que ninguno de los cultivos de cianobacterias analizados correspondía a la clase *Nostoc*, por lo que no fijan nitrógeno. Respecto a la fermentación, es sabido que la misma puede producir, entre otros compuestos, acetato e hidrógeno, que pueden ser posteriormente utilizados como sustrato para la metanogénesis por vía clásica – es decir, mediante la metil coenzima reductasa, codificada por el gen *mcrA*²¹⁴. Sin embargo, en ningún cultivo se detectó este gen, por lo que la producción de CH₄ por esta vía no es tampoco plausible. Por otra parte, la desmetilación de metilfosfonatos tendría sentido en un ambiente con baja concentración de fósforo, pero los cultivos se encontraban en medio de cultivo BG11, que cuenta con suficiente fósforo, con lo cual esta vía de producción no estaría favorecida. Por ende, nuestros resultados

apoyan una producción de CH₄ por parte del fitoplancton, como fue propuesto por Bižić et al. (2020)²³, Klintzsch et al. (2020)¹⁹⁰ y Klintzsch et al. (2023)¹⁸⁷ siendo, además, el primer trabajo que reporta producción de CH₄ por organismos pertenecientes a la división Chlorophyta.

Varios trabajos han reportado que la producción de CH₄ por fitoplancton se ve afectada por la exposición a la luz y a la temperatura, pero no resulta claro cómo variaciones en estos parámetros podrían afectar la metanogénesis. Klintzsch et al. (2020)¹⁹⁰ exploraron los efectos de modificaciones en la temperatura, intensidad lumínica y duración de las horas de luz sobre las tasas de producción de CH₄ de tres especies de microalgas marinas¹⁸⁹. Los autores reportaron que la tasa de producción de CH₄ aumentó un 210% cuando la temperatura aumentó desde 10°C a 21,5°C, mientras que un aumento mayor en la temperatura (hasta 23,8°C) provocó una reducción en la tasa de producción de CH₄. La intensidad lumínica presentó siempre un efecto positivo: cuando la misma aumentó desde 30 hasta 2670 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ la producción de CH₄ aumentó en un orden de magnitud, y el aumento fue aún mayor cuando una mayor intensidad lumínica se combinó con un aumento en la duración de las horas de luz. Sin embargo, las altas intensidades lumínicas y el aumento en las horas de luz afectaron negativamente la tasa de crecimiento de las algas, indicando cierto desacople entre la producción primaria y la producción de CH₄. Los autores calcularon, además, la energía de activación de la producción de CH₄ (es decir, la energía necesaria para iniciar la producción de CH₄) por estos organismos y la misma se encuentra en el rango de procesos metabólicos, por lo que no se trataría de un proceso abiótico. En nuestro caso, trabajamos con una temperatura media mayor - ya que estos organismos provienen de sistemas templados -, una intensidad lumínica intermedia (400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$) y un fotoperíodo con mayor cantidad de horas de luz que las utilizadas por Klintzsch et al. (2020)¹⁹⁰, pero es importante considerar que las tasas medidas podrían haber diferido en gran medida si hubiéramos modificado la temperatura de exposición, la intensidad de la luz y las horas de exposición. Los resultados obtenidos por Klintzsch et al. (2020)¹⁸⁶, sumados a los de esta tesis, destacan la importancia de las condiciones ambientales sobre las tasas de metanogénesis por parte de fitoplancton y ayudan a comprender un poco más el mecanismo detrás de la misma: es un proceso metabólico que depende de la temperatura y la luz, tanto su intensidad como sus horas de exposición, pero no queda del todo clara su relación con la producción primaria. Sin duda son necesarios más estudios que aborden el estudio del mecanismo detrás de la metanogénesis por fitoplancton.

Es importante destacar que los resultados obtenidos experimentalmente se limitan a las condiciones utilizadas y que en el campo estas condiciones serían distintas y mucho más diversas. No obstante, esto no implica que los datos no puedan ser aplicados una escala mayor de complejidad para, por ejemplo, explorar su potencial relevancia a escala ecosistémica. Este ejercicio ha sido realizado por Bižić et al. (2020)²³, Günthel et al. (2020)²¹, Klintzsch et al. (2019)¹⁸⁹ donde a partir de mediciones experimentales de producción de CH₄ por fitoplancton

se estimó la relevancia de este proceso a escala de ecosistema. Si bien hacer este ejercicio demuestra las dificultades de extrapolar datos de laboratorio a escalas mayores, todas las estimaciones reportadas demuestran que la contribución del fitoplancton a la producción óxica de CH₄ no es despreciable. En esta tesis contamos con una ventaja que estos otros trabajos no han tenido, porque realizamos mediciones a campo en el Capítulo 3 para estimar POM pero luego además realizamos mediciones experimentales del fitoplancton de estas mismas lagunas. Las tasas de metanogénesis promedio para cada cultivo fueron entre 0,02 – 0,26 $\mu\text{mol hr}^{-1} \text{ g Chla}^{-1}$, con una media general de $0,09 \pm 0,04 \mu\text{mol hr}^{-1} \text{ g Chla}^{-1}$. Si tomamos las concentraciones medias de Chla obtenidas a campo para SG (2,45 $\mu\text{g L}^{-1}$), BU (87,09 $\mu\text{g L}^{-1}$) y SA (117,14 $\mu\text{g L}^{-1}$) podemos multiplicarlas por la tasa media de metanogénesis obtenida para el fitoplancton ($0,09 \pm 0,04 \mu\text{mol hr}^{-1} \text{ g Chla}^{-1}$), y luego convertir horas a días, obteniendo una tasa de metanogénesis en $\mu\text{M día}^{-1}$ correspondiente solamente a la porción fitoplanctónica. Luego podemos comparar esta tasa de metanogénesis fitoplanctónica con la POM medida a campo, para saber qué proporción de la POM medida a campo podría potencialmente provenir del fitoplancton. Haciendo este ejercicio, obtenemos que el porcentaje de POM proveniente del fitoplancton sería del 0,19%, 60,66% y 4,24% para SG, BU y SA, respectivamente. Los porcentajes difieren bastante y son mayores para BU, la laguna donde se detectó menor POM, mayor abundancia de fitoplancton (representado sobre todo por cianobacterias) y una abundancia relativa de arqueas metanogénicas baja (Capítulo 3, páginas 92-94). El menor porcentaje corresponde a SG, lo cual tiene sentido ya que es la laguna con menor abundancia de fitoplancton. Por otra parte, SA presentó un porcentaje intermedio aunque su valor fue bajo. Esta laguna tiene una alta abundancia de fitoplancton, y a la vez presenta una alta abundancia relativa de arqueas metanogénicas, por lo que la POM medida podría potencialmente también provenir de las arqueas además del fitoplancton. Como se mencionó, la comparación entre mediciones experimentales y estimaciones a campo es limitada, pero sirven para evaluar si los órdenes de magnitud obtenidos en un caso y en el otro son comparables, como en este caso.

Los resultados de este capítulo resultan una valiosa contribución a la escasa, pero contundente, bibliografía que demuestra una dual importancia del fitoplancton en el metabolismo del CH₄: no solamente proveen materia orgánica a los sedimentos que puede ser utilizada por arqueas metanogénicas para generar CH₄^{136,137}, sino que además son ellos mismos productores de CH₄. Esta última característica tiene una gran importancia en un contexto de calentamiento global, donde se observan y se prevén floraciones de fitoplancton más frecuentes y de mayor duración, producto del aumento en la temperatura y la eutroficación^{217–219}. La incorporación del fitoplancton como nueva vía de producción de CH₄ ha revolucionado nuestro entendimiento del ciclo del CH₄ en sistemas acuáticos, por lo que los próximos esfuerzos deberían dirigirse en profundizar el entendimiento del mecanismo detrás de la producción de CH₄ por el fitoplancton.

DISCUSIÓN GENERAL

La importancia de cualquier tipo de ecosistema en un proceso o ciclo es el producto de la relación entre la extensión de su área y la intensidad del/los proceso/s en ese ecosistema⁷. En los cuerpos de agua someros esta relación es enorme, producto de un gran contacto entre el cuerpo de agua y el área circundante y un frecuente mezclado de la columna de agua⁸. Como consecuencia, los lagos someros desempeñan un papel inmenso en el ciclo global de Carbono (C) que se ve reflejado, por ejemplo, en sus altas emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) a la atmósfera²²⁰. El mecanismo más estudiado de emisión de GEI es el flujo difusivo entre la atmósfera y el agua, pero en los últimos años se ha identificado además el flujo ebullitivo de CH₄ y la emisión de GEI a través de macrófitas emergentes como dos vías de emisión fundamentales en cuerpos de agua dulce, que en muchos casos hasta superan el flujo difusivo⁵. El flujo ebullitivo es particularmente relevante en cuerpos de agua someros ya que su baja profundidad no es suficiente para que las burbujas de CH₄ generadas en los sedimentos sean disueltas y/u oxidadas antes de llegar a la superficie, por lo que en estos sistemas la ebullición ocurre en toda la superficie - contrario a lo que pasa en sistemas profundos, donde solamente hay ebullición en las zonas litorales⁵. Similarmente, en sistemas someros se favorece el crecimiento de macrófitas emergentes⁸⁵, que también tienen un rol fundamental en las emisiones de GEI. Además, en algunas regiones los lagos someros pueden encontrarse bajo distintos regímenes alternativos – claro vegetado o turbio fitoplanctónico²⁹ – que pueden potencialmente presentar diferentes dinámicas y metabolismos de C y, por lo tanto, distintas emisiones de GEI. Si bien se ha estudiado el efecto que el régimen puede tener sobre la dinámica de CO₂ y de CH₄, este parece ser muy variable y sistema-dependiente, por lo que es muy difícil predecirlo⁶⁰. En el primer capítulo de esta tesis se analizaron estacionalmente las tres vías de emisión de GEI: difusión, ebullición y emisión por macrófitas emergentes, y luego se combinaron estos datos con información satelital para crear una huella de C de cada régimen. En primera instancia, los resultados obtenidos indicaron que tanto lagunas claras como turbias tuvieron una huella de C similar en términos de equivalentes de CO₂. En segunda instancia, evidenciaron la importancia de las macrófitas emergentes no solamente en la emisión de CH₄, sino también en la emisión de CO₂. En tercera y última instancia, la información recabada en este capítulo se suma a la base de datos global de emisiones de GEI de lagunas con regímenes alternativos, aportando al entendimiento de la dinámica de GEI en estos sistemas tan complejos y particulares. Este trabajo significa un primer estudio integral de emisiones de GEI de lagunas pampeanas de Argentina, donde se incluye tanto CO₂ como CH₄ y se estudian todas las vías de emisión en su conjunto de forma estacional. Hasta la fecha se encuentran publicados algunos trabajos sumamente interesantes sobre emisiones de GEI en cuerpos de agua

pampeanos, donde se estudió uno de los dos GEI o alguna de las vías de emisión^{55,56,221}, pero sin duda son necesarios más estudios para comprender el rol de los cuerpos de agua dulce de la Llanura Pampeana en el ciclo de C.

La dinámica de CO₂ es compleja, pero está en mayor medida controlada por la producción primaria y respiración del ecosistema²⁷. La dinámica de CH₄, por el contrario, depende de muchos procesos biológicos y factores físicos que pueden combinarse de diversas maneras, como son la metanogénesis en los sedimentos, la oxidación de CH₄ en la columna de agua, la formación de microburbujas de CH₄, la difusión a la atmósfera y la velocidad de intercambio, entre otros²⁵. Varios trabajos han reportado que el gas CH₄ tiene la particularidad de formar microburbujas en aquellos casos donde hay una supersaturación de CH₄ y una alta turbulencia, producto de su baja solubilidad en el agua^{141,142}. La formación de microburbujas, además de resultar un fenómeno que no ocurre en cualquier sistema, afecta la emisión de CH₄ a través de difusión. Por otra parte, en sistemas que poseen vegetación sumergida – como las lagunas claras vegetadas – estos organismos proveen una capa más de complejidad al sistema, porque afectan procesos biológicos, como la producción y oxidación de CH₄, pero también tienen un efecto físico, disminuyendo la turbulencia en la columna de agua¹¹⁰. En este sentido, a partir de los resultados obtenidos en el segundo capítulo de esta tesis sumamos a las lagunas pampeanas a la lista de lugares donde se han detectado microburbujas de CH₄, aportando al entendimiento del mecanismo por el cual son formadas. Los resultados reportados indican una fuerte influencia de la vegetación sumergida en la determinación de la concentración de CH₄ disuelto, debido a que su presencia parece disminuir la turbulencia en la columna de agua, conllevando a una menor velocidad de intercambio y una acumulación de CH₄ en la columna de agua. Tanto las microburbujas de CH₄ como la velocidad de intercambio son conceptos que se encuentran en constante revisión y entendimiento, el primero porque no siempre ocurre y no se entiende del todo los factores que lo regulan, y el segundo porque es sumamente variable - depende del viento, de la morfología del cuerpo de agua y además es afectado en los casos donde hay presencia de microburbujas de CH₄^{141,222–224}. Los resultados de la presente tesis aportan al entendimiento del comportamiento de CH₄ en lagunas pampeanas en particular, pero también contribuyen significativamente al entendimiento de la física de CH₄ en general.

La producción óxica de metano (POM) es una vía de metanogénesis recientemente propuesta, que ocurre en la columna de agua y que tiene una gran relevancia para el entendimiento del ciclo del CH₄. Como hemos mencionado en el capítulo 3, entender este proceso es de suma importancia porque para poder mitigar emisiones de CH₄ en cuerpos de agua, primero es fundamental comprender cómo es que el mismo se produce^{191,202,225,226}. En esta tesis realizamos el primer estudio de POM en sistemas someros templados, dado

que hasta el momento todos los estudios fueron realizados en sistemas oligotróficos profundos y estratificados. El diseño experimental fue pensado de manera tal de contar con una base de datos sólida, para posteriormente estimar las tasas de POM. Asimismo, el balance de masa aplicado para determinar la tasa de POM en cada laguna fue planteado y delineado especialmente para este trabajo, lo que le da un valor en sí mismo. Los resultados indican que existe POM en las tres lagunas estudiadas, con un rango amplio de valores. Al comparar estas tasas de POM con datos globales se observa un aumento de POM al aumentar la Chla, pero de todas formas la Chla no parece ser el único factor influyente. La turbidez, la intensidad lumínica, la temperatura y las horas de luz parecen ser también factores determinantes para la POM¹⁹⁰. La relación de POM con la composición fitoplanctónica no resulta fácil de interpretar con los resultados obtenidos: analizar posibles predictores de POM con tres lagunas presenta limitaciones, y no es posible sumar información de otros trabajos para explorar esta relación porque los trabajos publicados no analizaron la composición de la comunidad fitoplanctónica. Futuros estudios al respecto deberían sumar más lagunas a esta base de datos, tanto para mejorar las estimaciones de las tasas de POM como para poder explorar mejor la relación con la composición fitoplanctónica.

Los experimentos a campo realizados para explorar POM fueron profundizados al aislar organismos fitoplanctónicos provenientes de las mismas lagunas donde se hicieron los experimentos. No solamente la existencia y relevancia de POM en sistemas continentales se encuentra en proceso de debate y aceptación en la comunidad científica, sino que también lo está la idea de producción de CH₄ por fitoplancton. El principal motivo por el cual este concepto genera conflictos es que no se entiende el mecanismo detrás de dicha producción. Algunos trabajos indican que está relacionada con la producción primaria^{21,23} mientras que otros indican que se trata sin duda de un proceso metabólico, que depende de la temperatura y de la exposición a la luz, pero que podría estar desacoplado de la fotosíntesis¹⁹⁰. En el capítulo 4 de la tesis pudimos corroborar que tanto organismos pertenecientes a la división Chlorophyta como Cyanobacteria producen CH₄ y que, *a priori*, no parece haber diferencias en las tasas de POM entre un grupo y el otro. Es importante destacar que este es el primer trabajo que reporta producción de CH₄ por organismos de la división Chlorophyta, lo que amplía la lista de organismos capaces de producir CH₄. Si bien con este estudio no podemos aportar resultados que ayuden a comprender el mecanismo detrás de la metanogénesis por fitoplancton, lo que sí podemos indicar es que efectivamente ésta se relaciona de manera positiva con la luz y que disminuye en las horas de oscuridad. Aunque las condiciones experimentales difieren de las condiciones a campo, con los resultados obtenidos también pudimos demostrar que el fitoplancton se encontraba aportando a la POM medida a campo. De hecho, a partir de los resultados de los capítulos 3 y 4 es posible hacer el ejercicio de combinar el trabajo a campo con la evidencia experimental para evaluar la contribución de POM a las emisiones totales de

CH₄(OMC) incluyendo, a su vez, la contribución del fitoplancton a la POM medida a campo (Fig. 5.1). Al realizar este ejercicio se evidencia un aumento de OMC al aumentar la abundancia de fitoplancton, que va de la mano con una mayor contribución del fitoplancton a POM en lagunas con mayor abundancia fitoplanctónica. Estos resultados tienen sentido considerando que el fitoplancton parece ser uno de los principales responsables de POM en sistemas acuáticos. El resto de la contribución a POM puede, por ejemplo, provenir de arqueas metanogénicas, que fueron detectadas en todos los mesocosmos de las tres lagunas pampeanas.

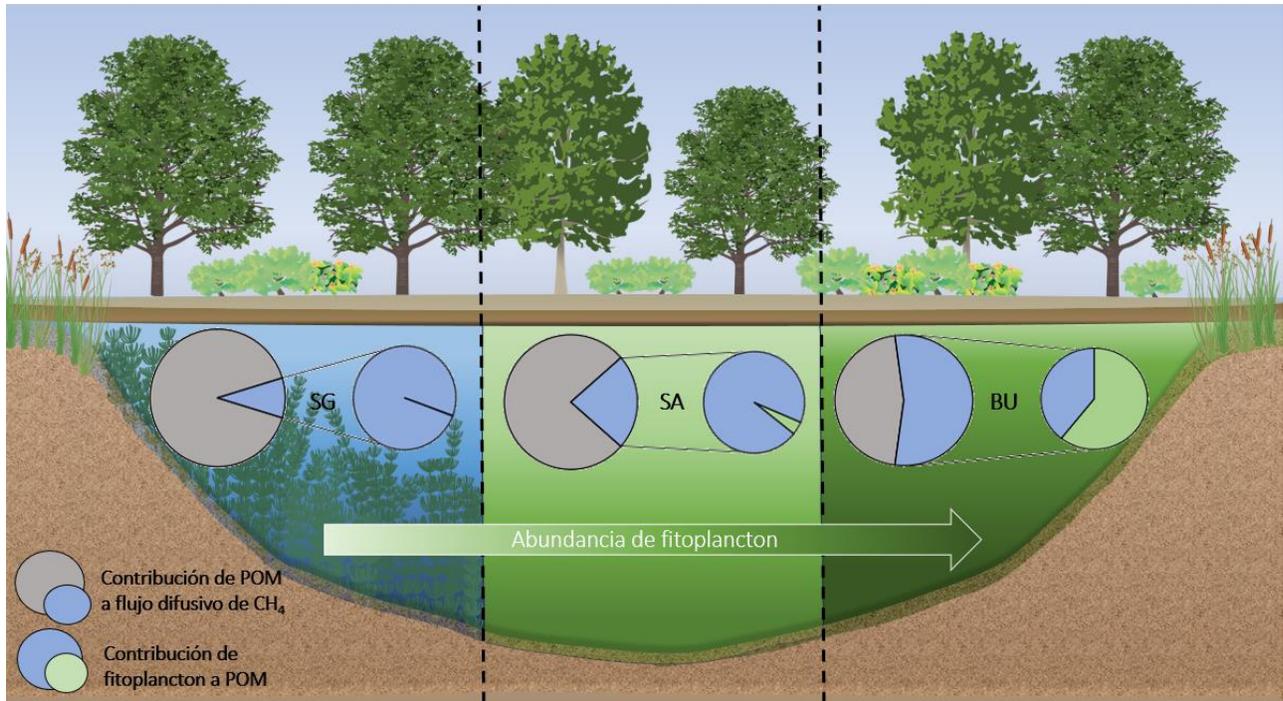


Figura 5.1. Esquema conceptual indicando la contribución de POM (azul) al flujo difusivo total de cada laguna (gris) y la contribución de la producción de CH₄ por fitoplancton (verde) a la POM medida a campo (azul). Las lagunas se ordenan desde menor a mayor abundancia de fitoplancton, de izquierda a derecha.

Esta tesis de doctorado aporta al entendimiento de la dinámica de CO₂ y CH₄ en lagunas pampeanas en particular, pero también de sistemas someros en general: tanto lagunas claras vegetadas como turbias fitoplanctónicas actúan como fuente de GEI a la atmósfera en términos anuales, emitiendo CO₂ y CH₄ mediante difusión – aunque para el caso del CO₂ en primavera y verano actúan como sumidero – mediante ebullición y mediante macrófitas emergentes; la dinámica de CH₄ entre regímenes se ve significativamente afectada por la física de estas lagunas, donde la menor velocidad de intercambio en lagunas claras vegetadas, producto de las macrófitas sumergidas, conlleva a una mayor concentración de CH₄ en las mismas; las lagunas pampeanas, independientemente de su régimen, presentan producción óxica de metano en la columna de agua; y los organismos fitoplanctónicos perteneciente a las divisiones Chlorophyta y Cyanobacteria, los dos grupos más

representadas en las lagunas Pampeanas, producen CH_4 (Fig. 5.2). Para abordar estos objetivos se emplearon diversas aproximaciones que integraron tanto trabajo de campo como experimentación en laboratorio. Se llevaron a cabo mediciones exhaustivas de todas las vías de emisiones de GEI, así como análisis limnológicos, de estructura del fitoplancton, de composición de arqueas y bacterias, de metabolismo y de isótopos. Además, se realizaron experimentos en el entorno natural, asociadas con incubaciones experimentales. De esta manera, hemos realizado una contribución integral al conocimiento actual sobre el papel de las lagunas pampeanas en el ciclo del C a nivel regional y global, aportando datos que pueden ser utilizados en los modelos de predicción de cambio climático a nivel global.

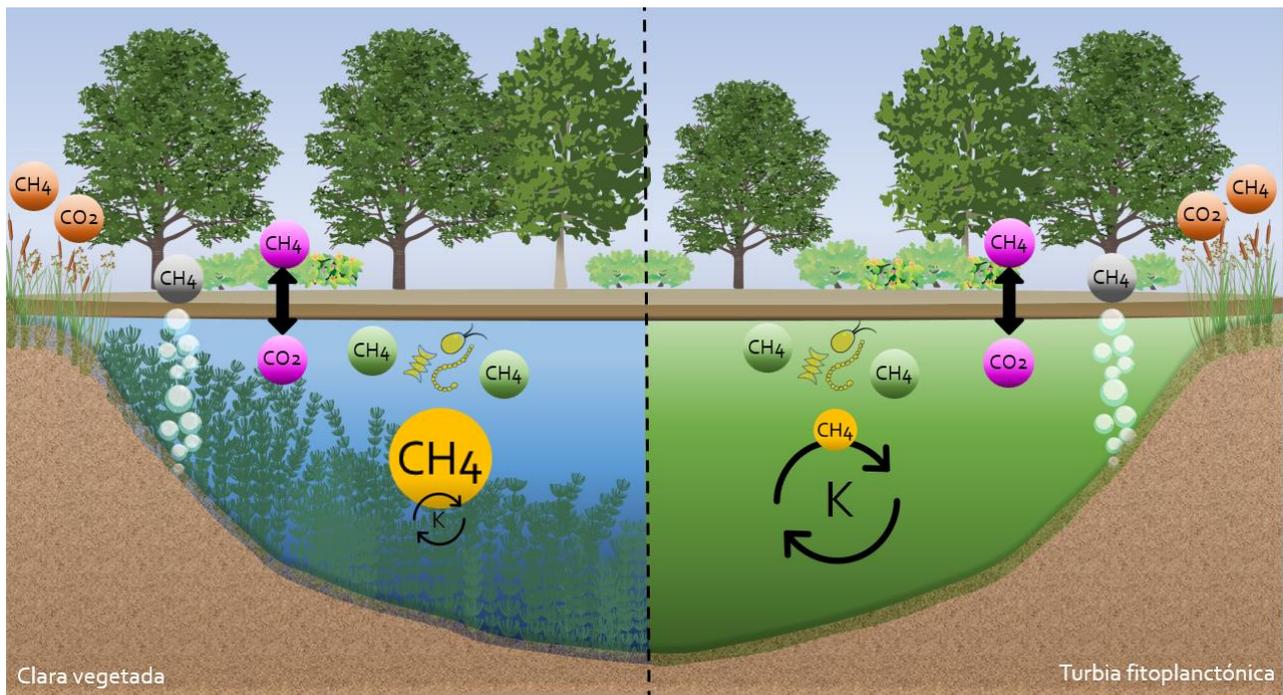


Figura 5.2. Esquema conceptual de la dinámica de CH_4 y CO_2 para una laguna clara vegetada (izquierda) y una laguna turbia fitoplanctónica (derecha). En colores se identifican los GEI provenientes de distintos procesos: naranja, emisiones de macrófitas emergentes; violeta, flujo difusivo; gris, flujo ebullitivo; amarillo, CH_4 disuelto en la columna de agua – para este caso en particular el tamaño del CH_4 está relacionado con la concentración –; verde, CH_4 producido por POM, relacionado con fitoplancton. Recordar que en el caso de la POM y la producción de CH_4 por fitoplancton no es una comparación estrictamente entre lagunas claras y turbias, sino que fue un estudio realizado en tres lagunas pampeanas con distinta abundancia y composición de fitoplancton.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kweku, D. *et al.* Greenhouse Effect: Greenhouse Gases and Their Impact on Global Warming. *J. Sci. Res. Reports* **17**, 1–9 (2018).
2. Neubauer, S. C. Global Warming Potential Is Not an Ecosystem Property. *Ecosystems* **24**, 2079–2089 (2021).
3. IPCC. *Summary for Policymakers: Climate Change 2022_ Impacts, Adaptation and Vulnerability_ Working Group II contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Working Group II contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (2022). doi:10.1017/9781009325844.Front.
4. Cole, J. J. *et al.* Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* **10**, 171–184 (2007).
5. Bastviken, D., Cole, J., Pace, M. & Tranvik, L. Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochem. Cycles* **18**, 1–12 (2004).
6. Bastviken, D. *et al.* the Continental Carbon Sink. *Science* (80-.). **331**, 50 (2011).
7. Downing, J. A. Emerging global role of small lakes and ponds: Little things mean a lot. *Limnetica* **29**, 9–24 (2010).
8. Holgerson, M. A. & Raymond, P. A. Large contribution to inland water CO₂ and CH₄ emissions from very small ponds. *Nat. Geosci.* **9**, 222–226 (2016).
9. Boon, P. I. & Mitchell, A. Methanogenesis in the sediments of an Australian freshwater wetland: Comparison with aerobic decay, and factors controlling methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**, 175–190 (1995).
10. Whiticar, M. J. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol.* **161**, 291–314 (1999).
11. Conrad, R. *et al.* Methanogenic pathway, ¹³C isotope fractionation, and archaeal community composition in the sediment of two clear-water lakes of Amazonia. *Limnol. Oceanogr.* **55**, 689–702 (2010).
12. Hofmann, H. Spatiotemporal distribution patterns of dissolved methane in lakes: How accurate are the current estimations of the diffusive flux path? *Geophys. Res. Lett.* **40**, 2779–2784 (2013).
13. Cole, J. J. & Caraco, N. F. Atmospheric exchange of carbon dioxide in a low-wind oligotrophic lake measured by the addition of SF₆. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 647–656 (1998).
14. Aben, R. C. H. *et al.* Cross continental increase in methane ebullition under climate change. *Nat. Commun.* **8**, 1–8 (2017).
15. Laanbroek, H. J. Methane emission from natural wetlands: Interplay between emergent macrophytes and soil microbial processes. A mini-review. *Ann. Bot.* **105**, 141–153 (2010).

16. Tang, K. W. *et al.* Paradox reconsidered: Methane oversaturation in well-oxygenated lake waters. *Limnol. Oceanogr.* **59**, 275–284 (2014).
17. Bižić-Ionescu, M. *et al.* Oxic Methane Cycling: New Evidence for Methane Formation in Oxic Lake Water. *Biog. Hydrocarb.* 379–400 (2019) doi:10.1007/978-3-319-78108-2_10.
18. Thottathil, S. D., Reis, P. C. J. & Prairie, Y. T. Magnitude and Drivers of Oxic Methane Production in Small Temperate Lakes. *Environ. Sci. Technol.* **56**, 11041–11050 (2022).
19. Günthel, M. *et al.* Contribution of oxic methane production to surface methane emission in lakes and its global importance. *Nat. Commun.* **10**, 1–10 (2019).
20. Bogard, M. J. *et al.* Oxic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH₄ fluxes. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
21. Günthel, M. *et al.* Photosynthesis-driven methane production in oxic lake water as an important contributor to methane emission. *Limnol. Oceanogr.* **65**, 2853–2865 (2020).
22. Grossart, H. P. *et al.* Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19657–19661 (2011).
23. Bižić, M. *et al.* Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane. *Sci. Adv.* **6**, (2020).
24. Bastviken, D., Ejlertsson, J. & Tranvik, L. Measurement of methane oxidation in lakes: A comparison of methods. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 3354–3361 (2002).
25. Bastviken, D. *et al.* Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH₄ emissions. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **113**, 1–13 (2008).
26. Reis, P. C. J. *et al.* Rapid shifts in methanotrophic bacterial communities mitigate methane emissions from a tropical hydropower reservoir and its downstream river. *Sci. Total Environ.* **748**, 141374 (2020).
27. Balmer, M. & Downing, J. Carbon dioxide concentrations in eutrophic lakes: undersaturation implies atmospheric uptake. *Int. Waters* **1**, 125–132 (2011).
28. Scheffer, M. *et al.* Shallow Lake. *Trends Ecol. Evol.* **8**, 1212–1212 (1993).
29. Scheffer, M. *et al.* Vegetated areas with clear water in turbid shallow lakes. *Aquat. Bot.* **49**, 193–196 (1994).
30. Scheffer, M. *et al.* On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology* **78**, 272–282 (1997).
31. Scheffer, M. & Van Nes, E. H. Shallow lakes theory revisited: Various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth and lake size. *Hydrobiologia* **584**, 455–466 (2007).
32. Scheffer, M. Alternative attractors of shallow lakes. *ScientificWorldJournal.* **1**, 254–263 (2001).
33. Quirós, R. *et al.* Análisis del Estado Trófico de las Lagunas Pampeanas (Argentina). *Interciencia* **27**, 584–591 (2002).
34. Geraldi, Alejandra M., Piccolo Maria C. & Perillo, G. E. Lagunas bonaerenses en el paisaje. *Cienc. hoy, ISSN 0327-1218, Vol. 21, N°. 123 (JUN-JUL), 2011, págs. 16-22* **21**, 16–22 (2011).

35. Quirós, R. *et al.* Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecol. Austral* **12**, 175–185 (2002).
36. Quirós, R. & Drago, E. The environmental state of Argentinean lakes: An overview. *Lakes Reserv. Res. Manag.* **4**, 55–64 (1999).
37. Quirós, R. *et al.* The effects of the pampa wetlands agriculturization on shallow lakes. *Univ. Agron.* 1 – 16 (2006).
38. Allende, L. *et al.* Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiologia* **624**, 45–60 (2009).
39. Casco, M. A. *et al.* Phytoplankton and epipelon responses to clear and turbid phases in a seepage lake (buenos aires, argentina). *Int. Rev. Hydrobiol.* **94**, 153–168 (2009).
40. Kosten, S. *et al.* Bimodal transparency as an indicator for alternative states in South American lakes. *Freshw. Biol.* **57**, 1191–1201 (2012).
41. Sánchez, M. L. *et al.* Changes in the phytoplankton structure in a Pampean shallow lake in the transition from a clear to a turbid regime. *Hydrobiologia* **752**, 65–76 (2015).
42. Izaguirre, I. *et al.* Comparison of morpho-functional phytoplankton classifications in human-impacted shallow lakes with different stable states. *Hydrobiologia* **698**, 203–216 (2012).
43. Cano, M. G., Casco, M. A. & Claps, M. C. Effect of environmental variables on epiphyton in a pampean lake with stable turbid- and clear-water states. *Aquat. Biol.* **15**, 47–59 (2012).
44. Pizarro, H. *et al.* Glyphosate input modifies microbial community structure in clear and turbid freshwater systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 5143–5153 (2016).
45. Viglizzo, E. F. *et al.* Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* **83**, 65–81 (2001).
46. Viglizzo, E. F. *et al.* Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina. *Glob. Chang. Biol.* **17**, 959–973 (2011).
47. Vera, M. S. *et al.* Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* **21**, 1805–1816 (2012).
48. Izaguirre, I., Zagarese, H. & O’Farrell, I. The limnological trace of contemporaneous anthropogenic activities in the Pampa Region. *Ecol. Austral* **32**, 650–662 (2022).
49. Sánchez, M. L. *et al.* Effect of land use on the phytoplankton community of Pampean shallow lakes of the Salado River basin (Buenos Aires Province, Argentina). *Aquat. Ecol.* **55**, 417–435 (2021).
50. Sánchez, M. L. *et al.* Drivers of planktonic chlorophyll a in pampean shallow lakes. *Ecol. Indic.* **146**, 0–3 (2023).
51. Diovisalvi, N. *et al.* Shallow lakes from the Central Plains of Argentina: an overview and worldwide comparative analysis of their basic limnological features. *Hydrobiologia* **752**, 5–20 (2015).
52. Huarte, A. *et al.* Correlation of methane emissions with cattle population in Argentine Pampas. *Atmos. Environ.* **44**, 2780 - 2786 (2010).
53. De Bernardi, M. *et al.* Impact of land use change on soil methane fluxes and diffusivity in Pampean

- plains, Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* **329**, (2022).
54. Priano, M. E. *et al.* Tree plantations on a grassland region: Effects on methane uptake by soils. *Agrofor. Syst.* **88**, 187–191 (2014).
 55. Feijóo, C. *et al.* Patterns and controls of carbon dioxide concentration and fluxes at the air–water interface in South American lowland streams. *Aquat. Sci.* **84**, 1–15 (2022).
 56. Fusé, V. S. *et al.* Temporal variation in methane emissions in a shallow lake at a southern mid latitude during high and low rainfall periods. *Environ. Monit. Assess.* **188**, (2016).
 57. Colina, M. *et al.* Carbon fluxes in subtropical shallow lakes: contrasting regimes differ in CH₄ emissions. *Hydrobiologia* **1**, (2021).
 58. Cheng, F. & Basu, N. B. Landscape Nutrient Processing. *Water Resour. Res.* **53**, 1–19 (2017).
 59. Rosentreter, J. A. *et al.* Half of global methane emissions come from highly variable aquatic ecosystem sources. *Nat. Geosci.* **14**, 225–230 (2021).
 60. Hilt, S. *et al.* Translating Regime Shifts in Shallow Lakes into Changes in Ecosystem Functions and Services. *Bioscience* **67**, 928–936 (2017).
 61. Xing, Y. *et al.* Methane and carbon dioxide fluxes from a shallow hypereutrophic subtropical Lake in China. *Atmos. Environ.* **39**, 5532–5540 (2005).
 62. Xing, Y. *et al.* The change of gaseous carbon fluxes following the switch of dominant producers from macrophytes to algae in a shallow subtropical lake of China. *Atmos. Environ.* **40**, 8034–8043 (2006).
 63. Trolle, D. *et al.* Seasonal Dynamics of CO₂ Flux Across the Surface of Shallow Temperate Lakes. *Ecosystems* **15**, 336–347 (2012).
 64. Brothers, S. M. *et al.* A regime shift from macrophyte to phytoplankton dominance enhances carbon burial in a shallow, eutrophic lake. *Ecosphere* **4**, (2013).
 65. Zimmer, K. D. *et al.* Uniform carbon fluxes in shallow lakes in alternative stable states. *Limnol. Oceanogr.* **61**, 330–340 (2016).
 66. Davidson, T. A. *et al.* Eutrophication effects on greenhouse gas fluxes from shallow-lake mesocosms override those of climate warming. *Glob. Chang. Biol.* **21**, 4449–4463 (2015).
 67. Davidson, T. A. *et al.* Synergy between nutrients and warming enhances methane ebullition from experimental lakes. *Nat. Clim. Chang.* **8**, 156–160 (2018).
 68. Xiao, Q. *et al.* Spatial variations of methane emission in a large shallow eutrophic lake in subtropical climate. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **122**, 1597–1614 (2017).
 69. Kelly, C.A., & Chynoweth, D. P. The contribution of temperature and of the input of organic matter in controlling rates of sediment methanogenesis. **26**, 891–897 (1981).
 70. Yavitt, J. B. *et al.* Methane fluxes, concentrations, and production in two Adirondack beaver impoundments. *Limnol. Oceanogr.* **37**, 1057–1066 (1992).
 71. Valentine, D. W. *et al.* Ecosystem and physiological controls over methane production in northern wetlands. *J. Geophys. Res.* **99**, 1563 (1994).

72. Peters, V. & Conrad, R. Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. *Soil Biol. Biochem.* **28**, 371–382 (1996).
73. Delontro, T. *et al.* Spatial heterogeneity of methane ebullition in a large tropical reservoir. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 9866–9873 (2011).
74. Varadharajan, C. & Hemond, H. F. Time-series analysis of high-resolution ebullition fluxes from a stratified, freshwater lake. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **117**, 1–15 (2012).
75. DelSontro, T. *et al.* Methane ebullition and diffusion from northern ponds and lakes regulated by the interaction between temperature and system productivity. *Limnol. Oceanogr.* **61**, S62–S77 (2016).
76. Duc, N. T., Crill, P. & Bastviken, D. Implications of temperature and sediment characteristics on methane formation and oxidation in lake sediments. *Biogeochemistry* **100**, 185–196 (2010).
77. Borrel, G. *et al.* Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Res. Microbiol.* **162**, 832–847 (2011).
78. Rey-Sanchez, A. C. *et al.* Determining total emissions and environmental drivers of methane flux in a Lake Erie estuarine marsh. *Ecol. Eng.* **114**, 7–15 (2018).
79. Deemer, B. R. & Holgerson, M. A. Drivers of Methane Flux Differ Between Lakes and Reservoirs, Complicating Global Upscaling Efforts. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **126**, 1–15 (2021).
80. Sobek, S., Tranvik, L. J. & Cole, J. J. Temperature independence of carbon dioxide supersaturation in global lakes. *Global Biogeochem. Cycles* **19**, 1–10 (2005).
81. Kankaala, P. *et al.* Lake-size dependent physical forcing drives carbon dioxide and methane effluxes from lakes in a boreal landscape. *Limnol. Oceanogr.* **58**, 1915–1930 (2013).
82. Desrosiers, K., DelSontro, T. & del Giorgio, P. A. Disproportionate Contribution of Vegetated Habitats to the CH₄ and CO₂ Budgets of a Boreal Lake. *Ecosystems*. **25**, 1522 - 1542(2022).
83. Kyzivat, E. D. *et al.* The Importance of Lake Emergent Aquatic Vegetation for Estimating Arctic-Boreal Methane Emissions. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **127**, 1–23 (2022).
84. Chanton, J. P. The effect of gas transport on the isotope signature of methane in wetlands. *Org. Geochem.* **36**, 753–768 (2005).
85. Cheruvilil, K. S. & Soranno, P. A. Relationships between lake macrophyte cover and lake and landscape features. *Aquat. Bot.* **88**, 219–227 (2008).
86. Duan, X. *et al.* Seasonal and diurnal variations in methane emissions from Wuliangsu Lake in arid regions of China. *Atmos. Environ.* **39**, 4479–4487 (2005).
87. Valderrama, J. C. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.* **10**, 109–122 (1981).
88. Cuthbert, I. D. & del Giorgio, P. Toward a standard method of measuring color in freshwater. *Limnol. Oceanogr.* **37**, 1319–1326 (1992).
89. Lorenzen, C. J. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnol. Oceanogr.* **12**, 343–346 (1967).
90. Utermöhl, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *SIL Commun.* 1953-

- 1996 **9**, 1–38 (1958).
91. Callahan, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **13**, 581–583 (2016).
 92. Campeau, A. & Del Giorgio, P. A. Patterns in CH₄ and CO₂ concentrations across boreal rivers: Major drivers and implications for fluvial greenhouse emissions under climate change scenarios. *Glob. Chang. Biol.* **20**, 1075–1088 (2014).
 93. Maher, D. T. *et al.* Novel use of cavity ring-down spectroscopy to investigate aquatic carbon cycling from microbial to ecosystem scales. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 12938–12945 (2013).
 94. Koschorreck, M. *et al.* Technical note: CO₂ is not like CH₄- Limits of and corrections to the headspace method to analyse pCO₂ in fresh water. *Biogeosciences* **18**, 1619–1627 (2021).
 95. Rasilo, T., Prairie, Y. T. & del Giorgio, P. A. Large-scale patterns in summer diffusive CH₄ fluxes across boreal lakes, and contribution to diffusive C emissions. *Glob. Chang. Biol.* **21**, 1124–1139 (2015).
 96. Weiss, R. F. The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep. Res. Oceanogr. Abstr.* **17**, 721–735 (1970).
 97. Stets, E. G. *et al.* Carbonate buffering and metabolic controls on carbon dioxide in rivers. *Global Biogeochem. Cycles* **31**, 663–677 (2017).
 98. Vanhellemont, Q. Adaptation of the dark spectrum fitting atmospheric correction for aquatic applications of the Landsat and Sentinel-2 archives. *Remote Sens. Environ.* **225**, 175–192 (2019).
 99. Vanhellemont, Q. & Ruddick, K. Atmospheric correction of metre-scale optical satellite data for inland and coastal water applications. *Remote Sens. Environ.* **216**, 586–597 (2018).
 100. Dogliotti, A. I. *et al.* Detecting and quantifying a massive invasion of floating aquatic plants in the Río de la Plata turbid waters using high spatial resolution ocean color imagery. *Remote Sens.* **10**, (2018).
 101. Myhre, G. *et al.* Anthropogenic and natural radiative forcing. *Clim. Chang. 2013 Phys. Sci. Basis Work. Gr. I Contrib. to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.* **9781107057**, 659–740 (2013).
 102. Zuur. *Statistics for Biology and Health. Media* (2007).
 103. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **3**, (2019).
 104. Wickham H. *ggplot2: Elganta graphics for data analysis.* (2008).
 105. Oksanen, J. Vegan: an introduction to ordination. *Management* **1**, 1–10 (2008).
 106. Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B. & Christensen, R. H. B. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *J. Stat. Softw.* **82**, (2017).
 107. Sanford, F. J. and W. Fox & Weisberg 2019. (2019).
 108. Vachon, D. *et al.* Paired O₂ – CO₂ measurements provide emergent insights into aquatic ecosystem function. *Limnol. Oceanogr. Lett.* **5**, 287–294 (2020).
 109. Alfonso, M. B. *et al.* Drivers of ecosystem metabolism in two managed shallow lakes with different salinity and trophic conditions: The Sauce Grande and La Salada Lakes (Argentina). *Water*

- (Switzerland) **10**, (2018).
110. Andersen, M. R., Kragh, T. & Sand-Jensen, K. Extreme diel dissolved oxygen and carbon cycles in shallow vegetated lakes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **284**, (2017).
 111. Best, E. P. H. & Meulemans, J. T. natural conditions starts in March--June , the potential to grow under experi- physiological activities of these processes were measured in several develop- factors which may influence the carbon fixation rates reported in this paper , The experiments wer. **6**, 53–65 (1979).
 112. Barbosa, P. M. *et al.* Dissolved methane concentrations and fluxes to the atmosphere from a tropical floodplain lake. *Biogeochemistry* **148**, 129–151 (2020).
 113. Thottathil, S. D., Reis, P. C. J. & Prairie, Y. T. Methane oxidation kinetics in northern freshwater lakes. *Biogeochemistry* **143**, 105–116 (2019).
 114. Jeffrey, L. C. *et al.* Wetland methane emissions dominated by plant-mediated fluxes: Contrasting emissions pathways and seasons within a shallow freshwater subtropical wetland. *Limnol. Oceanogr.* **64**, 1895–1912 (2019).
 115. Oliveira Junior, E. S. *et al.* Water Hyacinth's Effect on Greenhouse Gas Fluxes: A Field Study in a Wide Variety of Tropical Water Bodies. *Ecosystems* **24**, 988–1004 (2021).
 116. Aben, R. C. H. *et al.* Cross continental increase in methane ebullition under climate change. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 117. Jeffrey, L. C. *et al.* Rhizosphere to the atmosphere: Contrasting methane pathways, fluxes, and geochemical drivers across the terrestrial-aquatic wetland boundary. *Biogeosciences* **16**, 1799–1815 (2019).
 118. Kankaala, P. *et al.* Methane efflux in relation to plant biomass and sediment characteristics in stands of three common emergent macrophytes in boreal mesoeutrophic lakes. *Glob. Chang. Biol.* **11**, 145–153 (2005).
 119. Rejmánková, E. *et al.* Regime shift in the littoral ecosystem of volcanic Lake Atitlán in Central America: combined role of stochastic event and invasive plant species. *Freshw. Biol.* **63**, 1088–1106 (2018).
 120. Kankaala, P. *et al.* Midsummer spatial variation in methane efflux from stands of littoral vegetation in a boreal meso-eutrophic lake. *Freshw. Biol.* **48**, 1617–1629 (2003).
 121. Windham-Myers, L. *et al.* Potential for negative emissions of greenhouse gases (CO₂, CH₄ and N₂O) through coastal peatland re-establishment: Novel insights from high frequency flux data at meter and kilometer scales. *Environ. Res. Lett.* **13**, (2018).
 122. Whiting, G. J. & Chanton, J. P. Greenhouse carbon balance of wetlands: Methane emission versus carbon sequestration. *Tellus, Ser. B Chem. Phys. Meteorol.* **53**, 521–528 (2001).
 123. Bridgham, S. D. Mechanisms Controlling (Co , and Ch ,) in Southern Peatlands. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 1089–1099 (1992).
 124. D'Angelo, E. M. & Reddy, K. R. Regulators of heterotrophic microbial potentials in wetland soils. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 815–830 (1999).
 125. Corstanje, R. *et al.* Soil microbial eco-physiological response to nutrient enrichment in a sub-tropical

- wetland. *Ecol. Indic.* **7**, 277–289 (2007).
126. Faußer, A. C. *et al.* Diurnal dynamics of oxygen and carbon dioxide concentrations in shoots and rhizomes of a perennial in a constructed wetland indicate down-regulation of below ground oxygen consumption. *AoB Plants* **8**, (2016).
 127. Shelley, F. *et al.* Microbial methane cycling in the bed of a chalk river: Oxidation has the potential to match methanogenesis enhanced by warming. *Freshw. Biol.* **60**, 150–160 (2015).
 128. Michener, R. & Lajtha, K. *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science: Second Edition. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science: Second Edition* (2008). doi:10.1002/9780470691854.
 129. Noyce, G. L. & Patrick Megonigal, J. Biogeochemical and plant trait mechanisms drive enhanced methane emissions in response to whole-ecosystem warming. *Biogeosciences* **18**, 2449–2463 (2021).
 130. Attermeyer, K. *et al.* Substantial carbon dioxide flux changes from day to night across European streams.
 131. Gómez-Gener, L. *et al.* Global carbon dioxide efflux from rivers enhanced by high nocturnal emissions. *Nat. Geosci.* **14**, 289–294 (2021).
 132. Liu, H. *et al.* Large CO₂ effluxes at night and during synoptic weather events significantly contribute to CO₂ emissions from a reservoir. *Environ. Res. Lett.* **11**, 1–8 (2016).
 133. Hilt, S. Regime shifts between macrophytes and phytoplankton-concepts beyond shallow lakes, unravelling stabilizing mechanisms and practical consequences. *Limnetica* **34**, 467–480 (2015).
 134. Emilson, E. J. S. *et al.* Climate-driven shifts in sediment chemistry enhance methane production in northern lakes. *Nat. Commun.* **9**, 1–6 (2018).
 135. Grasset, C. *et al.* The transformation of macrophyte-derived organic matter to methane relates to plant water and nutrient contents. *Limnol. Oceanogr.* **64**, 1737–1749 (2019).
 136. Schwarz, J. I. K., Eckert, W. & Conrad, R. Response of the methanogenic microbial community of a profundal lake sediment (Lake Kinneret, Israel) to algal deposition. *Limnol. Oceanogr.* **53**, 113–121 (2008).
 137. West, W. E., Coloso, J. J. & Jones, S. E. Effects of algal and terrestrial carbon on methane production rates and methanogen community structure in a temperate lake sediment. *Freshw. Biol.* **57**, 949–955 (2012).
 138. Thottathil, S. D. *et al.* The Extent and Regulation of Summer Methane Oxidation in Northern Lakes. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **123**, 3216–3230 (2018).
 139. Torremorell, A. *et al.* Annual patterns of phytoplankton density and primary production in a large, shallow lake: The central role of light. *Freshw. Biol.* **54**, 437–449 (2009).
 140. Herb, W. R. & Stefan, H. G. Dynamics of vertical mixing in a shallow lake with submersed macrophytes. *Water Resour. Res.* **41**, 1–14 (2005).
 141. Prairie, Y. T. & del Giorgio, P. A. A new pathway of freshwater methane emissions and the putative importance of microbubbles. *Inl. Waters* **3**, 311–320 (2013).
 142. McGinnis, D. F. *et al.* Enhancing surface methane fluxes from an oligotrophic lake: Exploring the microbubble hypothesis. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 873–880 (2015).

143. Tang, K. W. *et al.* Methane production in oxic lake waters potentially increases aquatic methane flux to air. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **3**, 227–233 (2016).
144. Beaulieu, J. J., Shuster, W. D. & Rebolz, J. A. Controls on gas transfer velocities in a large river. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **117**, 1–13 (2012).
145. Kankaala, P. *et al.* Oxidation, efflux, and isotopic fractionation of methane during autumnal turnover in a polyhumic, boreal lake. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **112**, 1–7 (2007).
146. Morana, C. *et al.* Production of dissolved organic matter by phytoplankton and its uptake by heterotrophic prokaryotes in large tropical lakes. *Limnol. Oceanogr.* **59**, 1364–1375 (2014).
147. Oswald, K. *et al.* Light-dependent aerobic methane oxidation reduces methane emissions from seasonally stratified lakes. *PLoS One* **10**, 1–22 (2015).
148. Langenegger, T. *et al.* What the bubble knows: Lake methane dynamics revealed by sediment gas bubble composition. *Limnol. Oceanogr.* **64**, 1526–1544 (2019).
149. Wanninkhof, R. Relationship between wind speed and gas exchange over the ocean revisited. *J. Geophys. Res.* **12**, 351–362 (1992).
150. Guérin, F. *et al.* Gas transfer velocities of CO₂ and CH₄ in a tropical reservoir and its river downstream. *J. Mar. Syst.* **66**, 161–172 (2007).
151. Happell, J. D., Chanton, J. P. & Showers, W. S. The influence of methane oxidation on the stable isotopic composition of methane emitted from Florida swamp forests. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 4377–4388 (1994).
152. Liptay, K. *et al.* Methane Production. *Journal of Geophysical Research.* **103**, 8243–8250 (1998).
153. Coleman, D. D., Risatti, J. B. & Schoell, M. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes by methane-oxidizing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* **45**, 1033–1037 (1981).
154. Alperin, Marc J., Reedburgh William S., & W. M. J. isotopes. **2**, 279–288 (1988).
155. Clayer, F. *et al.* Modeling the carbon isotope signatures of methane and dissolved inorganic carbon to unravel mineralization pathways in boreal lake sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **229**, 36–52 (2018).
156. Brooks, M. E. *et al.* glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *R J.* **9**, 378–400 (2017).
157. Royston, J. P. *An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. Source: Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* vol. 31 (1982).
158. Barbosa, P. M. *et al.* High rates of methane oxidation in an Amazon floodplain lake. *Biogeochemistry* **137**, 351–365 (2018).
159. Megonigal, J. P., Hines, M. E. & Visscher, P. T. Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes. *Treatise on Geochemistry* **8–9**, 317–424 (2003).
160. Yan, X. *et al.* Cyanobacteria blooms: A neglected facilitator of CH₄ production in eutrophic lakes. *Sci. Total Environ.* **651**, 466–474 (2019).
161. Hartmann, J. F. *et al.* High Spatiotemporal Dynamics of Methane Production and Emission in Oxic

- Surface Water. *Environ. Sci. Technol.* **54**, 1451–1463 (2020).
162. Rantakari, M. *et al.* Different Apparent Gas Exchange Coefficients for CO₂ and CH₄: Comparing a Brown-Water and a Clear-Water Lake in the Boreal Zone during the Whole Growing Season. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 11388–11394 (2015).
 163. Paranaíba, J. R. *et al.* Spatially Resolved Measurements of CO₂ and CH₄ Concentration and Gas-Exchange Velocity Highly Influence Carbon-Emission Estimates of Reservoirs. *Environ. Sci. Technol.* **52**, 607–615 (2018).
 164. Vagle, S., McNeil, C. & Steiner, N. Upper ocean bubble measurements from the NE Pacific and estimates of their role in air-sea gas transfer of the weakly soluble gases nitrogen and oxygen. *J. Geophys. Res. Ocean.* **115**, 1–16 (2010).
 165. Sebacher, D. I., Harriss, R. C. & Bartlett, K. B. Air Velocity Effects. *Tellus* **35B**, 103–109 (1983).
 166. Raymond, P. A. & Cole, J. J. Technical notes and comments: Gas exchange in rivers and estuaries: Choosing a gas transfer velocity. *Estuaries* **24**, 312–317 (2001).
 167. Lapierre, J. F. *et al.* Increases in terrestrially derived carbon stimulate organic carbon processing and CO₂ emissions in boreal aquatic ecosystems. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
 168. Rocher-Ros, G. *et al.* Landscape process domains drive patterns of CO₂ evasion from river networks. *Limnol. Oceanogr. Lett.* **4**, 87–95 (2019).
 169. Kosten, S. *et al.* Fate of methane in aquatic systems dominated by free-floating plants. *Water Res.* **104**, 200–207 (2016).
 170. Martinsen, K. T., Kragh, T. & Sand-Jensen, K. Carbon dioxide efflux and ecosystem metabolism of small forest lakes. *Aquat. Sci.* **82**, (2020).
 171. Heiskanen, J. J. *et al.* Effects of cooling and internal wave motions on gas transfer coefficients in a boreal lake. *Tellus, Ser. B Chem. Phys. Meteorol.* **66**, (2014).
 172. Tedford Edmund W. *et al.* Similarity scaling of turbulence in a temperate lake during fall cooling. *J. Geophys. Res. Ocean.* **119**, 24 (2014).
 173. Lei, P. *et al.* Algal Organic Matter Drives Methanogen-Mediated Methylmercury Production in Water from Eutrophic Shallow Lakes. *Environ. Sci. Technol.* **55**, 10811–10820 (2021).
 174. Crusius, J. & Wanninkhof, R. Gas transfer velocities measured at low wind speed over a lake. *Limnol. Oceanogr.* **48**, 1010–1017 (2003).
 175. MacIntyre, S. *et al.* Buoyancy flux, turbulence, and the gas transfer coefficient in a stratified lake. *Geophys. Res. Lett.* **37**, 2–6 (2010).
 176. Peter Schönheit, H. K. and R. K. T. Factor F420 degradation in Methanobacterium thermoautotrophicum during exposure to oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.* **12**, 347–349 (1981).
 177. Karl, D. M. *et al.* Aerobic production of methane in the sea. *Nat. Geosci.* **1**, 473–478 (2008).
 178. Damm, E. *et al.* Methane production in aerobic oligotrophic surface water in the central Arctic Ocean. *Biogeosciences* **7**, 1099–1108 (2010).
 179. Bižić, M. Phytoplankton photosynthesis: An unexplored source of biogenic methane emission from

- oxic environments. *J. Plankton Res.* **43**, 822–830 (2021).
180. Repeta, D. J. *et al.* Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter. *Nat. Geosci.* **9**, 884–887 (2016).
 181. Yao, M., Henny, C. & Maresca, J. A. Freshwater bacteria release methane as a by-product of phosphorus acquisition. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 6994–7003 (2016).
 182. Wang, Q., Dore, J. E. & McDermott, T. R. Methylphosphonate metabolism by *Pseudomonas* sp. populations contributes to the methane oversaturation paradox in an oxic freshwater lake. *Environ. Microbiol.* **19**, 2366–2378 (2017).
 183. Khatun, S. *et al.* Aerobic methane production by planktonic microbes in lakes. *Sci. Total Environ.* **696**, 133916 (2019).
 184. Wang, Q. *et al.* Aerobic bacterial methane synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, (2021).
 185. Ernst, L. *et al.* Methane formation driven by reactive oxygen species across all living organisms. *Nature* **603**, 482–487 (2022).
 186. Morana, C. *et al.* Methane paradox in tropical lakes? Sedimentary fluxes rather than pelagic production in oxic conditions sustain methanotrophy and emissions to the atmosphere. *Biogeosciences* **17**, 5209–5221 (2020).
 187. Klintzsch, T. *et al.* Stable Carbon Isotope Signature of Methane Released from Phytoplankton. *Geophys. Res. Lett.* (2023).
 188. Lenhart, K. *et al.* Evidence for methane production by marine algae (*Emiliana huxleyi*) and its implication for the methane paradox in oxic waters. *Biogeosciences Discuss.* **12**, 20323–20360 (2015).
 189. Klintzsch, T. *et al.* Methane production by three widespread marine phytoplankton species: Release rates, precursor compounds, and potential relevance for the environment. *Biogeosciences* **16**, 4129–4144 (2019).
 190. Klintzsch, T. *et al.* Effects of Temperature and Light on Methane Production of Widespread Marine Phytoplankton. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **125**, (2020).
 191. Perez-Coronel, E. & Michael Beman, J. Multiple sources of aerobic methane production in aquatic ecosystems include bacterial photosynthesis. *Nat. Commun.* **13**, (2022).
 192. Donis, D. *et al.* Full-scale evaluation of methane production under oxic conditions in a mesotrophic lake. *Nat. Commun.* **8**, 1–11 (2017).
 193. Izaguirre, I. *et al.* Which environmental factors trigger the dominance of phytoplankton species across a moisture gradient of shallow lakes? *Hydrobiologia* **752**, 47–64 (2015).
 194. Baliña, S. *et al.* Shallow lakes under alternative states differ in the dominant greenhouse gas emission pathways. *Limnol. Oceanogr.* **68**, 1–13 (2022).
 195. Soued, C. & Prairie, Y. T. The carbon footprint of a Malaysian tropical reservoir: measured versus modelled estimates highlight the underestimated key role of downstream processes. *Biogeosciences* **17**, 515–527 (2020).
 196. Morana, C. *et al.* Methanotrophy within the water column of a large meromictic tropical lake (Lake Kivu, East Africa). *Biogeosciences* **12**, 2077–2088 (2015).

197. Reis, P. C. J. *et al.* Niche separation within aerobic methanotrophic bacteria across lakes and its link to methane oxidation rates. *Environ. Microbiol.* **22**, 738–751 (2019).
198. Knox, M., Quay, P. D. & Wilbur, D. Kinetic isotopic fractionation during air-water gas transfer of O₂, N₂, CH₄, and H₂. *J. Geophys. Res.* **97**, (1992).
199. ODUM, H. T. Primary Production in Flowing Waters. *Limnol. Oceanogr.* **1**, 102–117 (1956).
200. Hall, R. O. & Hotchkiss, E. R. *Stream Metabolism. Methods in Stream Ecology: Third Edition* vol. 2 (Elsevier Inc., 2017).
201. Appling, A. P. *et al.* Overcoming Equifinality: Leveraging Long Time Series for Stream Metabolism Estimation. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* **123**, 624–645 (2018).
202. Ordóñez, C. *et al.* Evaluation of the methane paradox in four adjacent pre-alpine lakes across a trophic gradient. *Nat. Commun.* **14**, 2165 (2023).
203. Fernández Zenoff, V., Siñeriz, F. & Farías, M. E. Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7857–7863 (2006).
204. DelSontro, T., del Giorgio, P. A. & Prairie, Y. T. No Longer a Paradox: The Interaction Between Physical Transport and Biological Processes Explains the Spatial Distribution of Surface Water Methane Within and Across Lakes. *Ecosystems* **21**, 1073–1087 (2018).
205. Conrad, R. Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. *Adv. Agron.* **96**, 1–63 (2007).
206. Borrel, G. *et al.* Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biol. Evol.* **5**, 1769–1780 (2013).
207. Burlacot, A. *et al.* Membrane Inlet Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Algal Research. *Front. Plant Sci.* **11**, 1–15 (2020).
208. Nercessian, O. *et al.* Bacterial populations active in metabolism of C₁ compounds in the sediment of Lake Washington, a freshwater lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6885–6899 (2005).
209. Conrad, R. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: A review and a proposal. *Org. Geochem.* **36**, 739–752 (2005).
210. Samad, M. S. & Bertilsson, S. Seasonal variation in abundance and diversity of bacterial methanotrophs in five temperate lakes. *Front. Microbiol.* **8**, 1–12 (2017).
211. Chin, K. J. *et al.* Structure and function of the methanogenic archaeal community in stable cellulose-degrading enrichment cultures at two different temperatures (15 and 30°C). *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**, 313–326 (1999).
212. Penning, H. *et al.* Variation of carbon isotope fractionation in hydrogenotrophic methanogenic microbial cultures and environmental samples at different energy status. *Glob. Chang. Biol.* **11**, 2103–2113 (2005).
213. Zheng, Y. *et al.* A pathway for biological methane production using bacterial iron-only nitrogenase. *Nat. Microbiol.* **3**, 281–286 (2018).
214. Stal, L. J. & Moezelaar, R. Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 179–211 (1997).

215. Beversdorf, L. J. *et al.* Phosphonate metabolism of *Trichodesmium* IMS101 and the production of greenhouse gases. *Limnol. Oceanogr.* **55**, 1768–1778 (2010).
216. Gomez-Garcia, M. R. *et al.* Alternative pathways for phosphonate metabolism in thermophilic cyanobacteria from microbial mats. *ISME J.* **5**, 141–149 (2011).
217. Paerl, H. W. & Huisman, J. Climate: Blooms like it hot. *Science* (80-.). **320**, 57–58 (2008).
218. Visser, P. M. *et al.* How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae* **54**, 145–159 (2016).
219. Glibert, P. M. *et al.* The Haber Bosch-harmful algal bloom (HB-HAB) link. *Environ. Res. Lett.* **9**, (2014).
220. Tranvik, L. J., Cole, J. J. & Prairie, Y. T. The study of carbon in inland waters-from isolated ecosystems to players in the global carbon cycle. *Limnol. Oceanogr. Lett.* **3**, 41–48 (2018).
221. Glok Galli, M., Martínez, D. E. & Kruse, E. E. The carbon budget of a large catchment in the Argentine Pampa plain through hydrochemical modeling. *Sci. Total Environ.* **493**, 649–655 (2014).
222. Vachon, D. & Prairie, Y. T. The ecosystem size and shape dependence of gas transfer velocity versus wind speed relationships in lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **70**, 1757–1764 (2013).
223. Klaus, M. & Vachon, D. Challenges of predicting gas transfer velocity from wind measurements over global lakes. *Aquat. Sci.* **82**, 1–17 (2020).
224. MacIntyre, S., Amaral, J. H. F. & Melack, J. M. Enhanced Turbulence in the Upper Mixed Layer Under Light Winds and Heating: Implications for Gas Fluxes. *J. Geophys. Res. Ocean.* **126**, (2021).
225. Donis, D. *et al.* Full-scale evaluation of methane production under oxic conditions in a mesotrophic lake. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
226. Günthel, M. *et al.* Contribution of oxic methane production to surface methane emission in lakes and its global importance. *Nat. Commun.* **10**, 1–10 (2019).
227. APHA, American Public Health Association, Standard methods for the examination of water and wastewaters. *American Public Health Association*, Washington, (2005)
228. APHA, American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters. *American Public Health Association*, Washington, (2009)
229. Venrick, E. L. How many cells to count? In: A. Sournia (ed.) *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris, 167-180, (1978)
230. Pinheiro, J. *et al.* R Core Team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_. R package version 3.1-142, <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>, (2019).
231. Lenth, R. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.8. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>, (2020).
232. Komarék, J. & K. Anagnostidis. Cyanoprokariota. 1. Chroococcales. In: *Subwasserflora von Mitteleuropa*.19. Gustav Fisher, Stuttgart. Jena, 548 pp, (1999)

233. Komárek, J. & K. Anagnostidis. Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. In: B. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner & M. Scnagerl (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759 pp, (2005)
234. Komárek, J. & B. Fott. Chlorophyceae, Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi, G. (ed.). *Das Phytoplankton des Süßwassers*. Die Binnengewässer, 16 (5). Ed. Schweizerbart'sché Verlagbuchhandlung, Stuttgart, 1044 pp, (1983)
235. Archibald, P. A. y Bold, H. C. Phycological studies. XI. The Genus *Chlorococcum* Meneghini. Univ. Texas Public., NI 7015, Austin, Texas, 86 pp, (1970)

ANEXO

- Anexo Capítulo 1

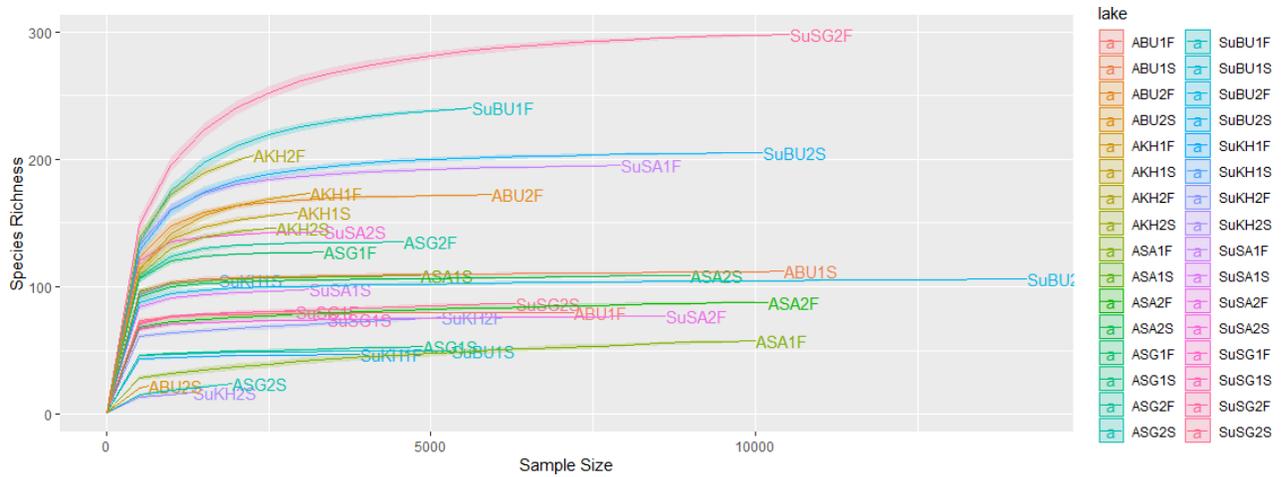


Figura Suplementaria 1.1: Curvas de rarefacción para arqueas, donde las muestras corresponden a las cuatro lagunas, en las cuatro estaciones del año y tanto de muestras de superficie como de fondo.



Figura Suplementaria 1.2: Curvas de rarefacción para bacterias, donde las muestras corresponden a las cuatro lagunas, en las cuatro estaciones del año y tanto de muestras de superficie como de fondo.

Tabla Suplementaria 1.1: Valores estacionales y anuales medios de CO₂ y CH₄ en presión parcial (ppmv) y también en concentración (μM)

$p\text{CO}_2$ (ppmv)	Winter	Spring	Summer	Autumn	Annual
Clear vegetated	1371.6 ± 712.4	321.4 ± 225.2	308.3 ± 147.1	654.1 ± 386.9	663.9 ± 597.5
Turbid phytoplanktonic	511.2 ± 95.9	1021.7 ± 214.0	488.1 ± 102.0	617.0 ± 455.6	659.6 ± 330.4
$p\text{CH}_4$ (ppmv)	Winter	Spring	Summer	Autumn	Annual
Clear vegetated	149.5 ± 67.7	390.5 ± 145.7	2396.6 ± 1971.1	1790.2 ± 654.3	1181.7 ± 1375.8
Turbid phytoplanktonic	71.4 ± 42.3	284.2 ± 57.7	949.6 ± 331.2	130.5 ± 30.2	358.9 ± 390.4
CO_2 ($\mu\text{mol/L}$)	Winter	Spring	Summer	Autumn	Annual
Clear vegetated	79.3 ± 37.2	12.5 ± 8.7	8.8 ± 3.9	27.17 ± 15.7	31.9 ± 34.8
Turbid phytoplanktonic	28.5 ± 5.5	37.6 ± 8.5	12.7 ± 4.3	26.6 ± 18.6	26.3 ± 13.7
CH_4 ($\mu\text{mol/L}$)	Winter	Spring	Summer	Autumn	Annual
Clear vegetated	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2	3.2 ± 2.9	2.9 ± 1.0	1.8 ± 2.0
Turbid phytoplanktonic	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.6	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.5

Los valores se expresan como la media ± desvío estándar de los valores para cada estación o para el año (anual). La Presión atmosférica en la llanura pampeana es muy cercana a 1atm, lo que se traduce en muy pequeñas diferencias entre ppmv y μatm .

Tabla Suplementaria 1.2: Flujos de CO_2 de las tres vías de emisión medidas, para lagunas claras y turbias. Todos los valores están en $\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$

CO_2 diffusive flux	Winter	Spring	Summer	Autumn	Annual
Clear vegetated	23.1 ± 8.9	-18.9 ± 18.6	-19.4 ± 10.4	7.8 ± 31.7	-6.9 ± 20.6
Turbid phytoplanktonic	-0.3 ± 8.3	18.4 ± 15.6	-9.9 ± 16.9	2.6 ± 18.2	5.1 ± 22.4
CO_2 vegetated area flux	Winter	Spring	Summer	Autumn	Annual
Clear vegetated	34.2 ± 9.2	82.8 ± 15.4	125.4 ± 49.0	83.2 ± 24.0	81.5 ± 38.5
Turbid phytoplanktonic	34.0 ± 14.4	96.7 ± 30.9	NA	75.3 ± 11.9	68.7 ± 32.7

Los valores están expresados como la media ± desviación estándar de los valores correspondientes a cada Estación o al año (anual). Para el Flujo de CO_2 de área vegetada no se pudo colectar datos en verano

Tabla Suplementaria 1.3: Flujos de CH_4 de las tres vías de emisión medidas, para lagunas claras y turbias. Todos los valores estan en $\text{mmol m}^{-2} \text{d}^{-1}$

CH₄ diffusive flux	Winter	Spring	Summer	Autumn	Anual
Clear vegetated	0.3 ± 0.2	6.3 ± 2.5	34.5 ± 36.8	9.1 ± 11.7	14.4 ± 24.2
Turbid phytoplanktonic	0.4 ± 0.4	7.2 ± 7.5	64.8 ± 39.5	4.1 ± 3.9	19.9 ± 33.5
CH₄ vegetated area flux	Winter	Spring	Summer	Autumn	Anual
Clear vegetated	1.2 ± 0.37	10.3 ± 2.1	22.5 ± 26.1	3.6 ± 3.7	9.4 ± 13.3
Turbid phytoplanktonic	1.3 ± 0.5	11.4 ± 14.9	18.7 ± NA	3.2 ± 0.2	7.1 ± 8.9
CH₄ ebullitive flux	Winter	Spring	Summer	Autumn	Anual
Clear vegetated	0.2 ± 0.1	3.4 ± 1.8	14.8 ± 9.1	1.1 ± 0.7	4.9 ± 7.3
Turbid phytoplanktonic	0.3 ± 0.1	2.5 ± 2.4	11.7 ± 11.3	0.2 ± 0.2	4.5 ± 8.0

Los valores están expresados como la media ± desviación estándar de los valores para cada Estación o para el año (anual).

Tabla Suplementaria 1.4: Area correspondiente a cada hábitat, para cada laguna y cada estación del año.

SG (km²)	Winter	Spring	Summer	Autumn
Emergent macrophytes	1.99	1.41	2.82	2.52
Open water	0.86	1.53	0.01	0.28
Total	2.85	2.94	2.83	2.80
KH (km²)	Winter	Spring	Summer	Autumn
Emergent macrophytes	6.02	5.51	6.86	8.72
Open water	13.72	14.61	12.44	10.37
Total	19.74	20.12	19.30	19.09
SA (km²)	Winter	Spring	Summer	Autumn
Emergent macrophytes	0.20	0.19	0.38	0.21
Open water	5.38	5.40	5.10	5.08
Total	5.58	5.59	5.48	5.29
BU (km²)	Winter	Spring	Summer	Autumn
Emergent macrophytes	0.34	0.60	0.64	0.27
Open water	9.98	9.81	9.59	9.84
Total	10.32	10.41	10.23	10.11

Emergent macrophytes se refiere al hábitat con macrófitas emergentes, *Open Water* se refiere al hábitat de aguas abiertas y *Total* se refiere al total del area de la laguna. Los valores se expresan en km² y las estaciones del año corresponden a Invierno 2018, Primavera 2018, Verano 2019 y Otoño 2019.

- Anexo capítulo 4

Suplementario 4.1

Medios de cultivos utilizados

Bold's Basal Medium (BBM): este medio es útil para el mantenimiento y crecimiento de microalgas, principalmente del grupo de las Chlorococcales (Chlorophyta).

Preparar previamente las siguientes soluciones stock de macro y micronutrientes:

1) NaNO_3 10g/400 ml agua bidestilada

2) KH_2PO_4 7g/400 ml agua bidestilada

3) K_2HPO_4 3g/400 ml agua bidestilada

4) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3g/400 ml agua bidestilada

5) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1g/400 ml agua bidestilada

6) NaCl 1g/400 ml agua bidestilada

I) Solución stock EDTA: diluir 50 g de EDTA (Ethylendiaminetetracetic acid) y 31 g de KOH, llevando a un volumen final de 1 L en agua bidestilada.

II) Solución stock de Fe: diluir 4,98 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ llevando a un volumen final de

1 L en agua bidestilada acidificada. (Esta última se prepara agregando 1 ml de H_2SO_4 concentrado a 999 ml de agua bidestilada).

III) Solución stock de Boro: diluir 11,42 g de H_3BO_3 a 1 L con agua bidestilada.

IV) Solución stock de Micronutrientes: diluir 8,82 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,44 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,71 g MoO_3 ; 1,57 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0,49 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 1 l con agua bidestilada acidificada (preparada como se describió arriba).

El medio de cultivo se prepara agregando 10 ml de las soluciones 1 a 6 y 1 ml de las soluciones I a IV a 936 ml de agua bidestilada. Verificar que el pH del medio sea 5,5 (si no es así, ajustar el pH con solución de KOH).

Este medio se utiliza para cultivos líquidos (en cuyo caso es preferible mantenerlos con agitación) y para cultivos sólidos se lo solidifica agregando 1,5 % (P/V) de agar-agar.

Mantener los cultivos a temperatura ambiente y luz continua (o en su defecto con fotoperíodo de aproximadamente 12-12 hs. Luz-Oscuridad).

BBM + vitaminas: se prepara agregando 1 ml de solución de 3 vitaminas a 1 litro de BBM. Este medio también se utiliza en forma líquida o sólida.

Solución de vitaminas: 0,008 g cianocobalamina (vitamina B12) + 0,008 g Tiamina HCl 28

(vitamina B1) + 0,008 g biotina en 1 litro de agua bidestilada

BBM + extracto de suelo: se prepara con diferentes proporciones de BBM y extracto de suelo (1:1, 2:1, 3:1 v/v). Este medio también se utiliza en forma líquida o sólida.

Extracto de suelo: sobrenadante de medio bifásico tierra agua.

BG11: este medio es especialmente útil para el crecimiento de cianobacterias, pero también puede ser utilizado para otros grupos de fitoplancton.

Preparación de soluciones stock

Para preparar las siguientes soluciones stocks, agregar la cantidad especificada del componente a la cantidad especificada de agua miliq (50 ml o 200ml)

#Solución stock	Componente	Cantidad para 50ml (g)	Cantidad para 200ml (g)
1	Na ₂ EDTA.2(H ₂ O)	0.044	0.176
2	Citric acid.1(H ₂ O)	0.326	1.302
4	K ₂ HPO ₄	2.000	8.000
5	MgSO ₄ .7(H ₂ O)	3.700	14.800
6	CaCl ₂ .2(H ₂ O)	1.765	7.060
7	Na ₂ CO ₃	1.005	4.020
8	Ferric ammonium citrate	0.300	1.200

Para la solución #9 (micronutrientes) agregar la cantidad especificada de cada componente a la cantidad de agua miliq requerida.

#Solución stock	Componente	Cantidad para 50ml (g)	Cantidad para 200ml (g)
A	H ₂ BO ₃	0.142	0.569
B	MnCl ₂ .2(H ₂ O)	0.073	0.291
C	ZnSO ₄ .7(H ₂ O)	0.011	0.044
D	CuSO ₄ .5(H ₂ O)	0.004	0.016
E	Na ₂ MoO ₄ .2(H ₂ O)	0.020	0.078
F	CoCl ₂ .6(H ₂ O)	0.002	0.008

Soluciones #4, #8 and #9 deben ser filtrada con un filtro de tamaño de poro 0.2µm y guardadas en frascos estériles previamente autoclavados, y esto debe ser realizado bajo flujo laminar.

Siempre chequear las soluciones por “Turbidez” u “objetos nubosos” porque estos pueden corresponden a bacterias u hongos. Las soluciones #2 y #5 son particularmente sensibles y suelen vencer aproximadamente un mes después de su preparación.

Preparación del medio BG11 y posterior esterilización

En un frasco de 1L, agregar 1L de agua miliq y 1,5mg de NaNO₃. Luego de esto, agregar 1ml de las soluciones #1, #2, #5, #6 y #7. Autoclavar por 20min a 121°C. Una vez que el frasco está a temperatura ambiente, agregar bajo flujo laminar 1ml de las soluciones #4, #8 y #9.

Suplementario 4.2

Relación entre la concentración de CH₄ inicial en los cultivos autoclavados (controles) y la pérdida de CH₄ física (es decir, la pendiente de la regresión entre concentración de CH₄ para cada medición) para cuatro de los cinco cultivos autoclavados medidos (#8, #9, #49 y #12) (Fig. Supl. 1). El cultivo autoclavado #43 no se utilizó porque tenía muy poco CH₄ disuelto y no hubo casi pérdida a la atmosfera, por lo que no se pudo calcular una pendiente de pérdida física. A partir de esta regresión se obtuvo una ecuación que permite determinar cual sería la pérdida física de CH₄ esperada para distintas concentraciones iniciales de CH₄. En otras palabras, a partir de esta ecuación se puede determinar cuál sería la pérdida física de un cultivo medido en el MIMS considerando la concentración de CH₄ inicial.

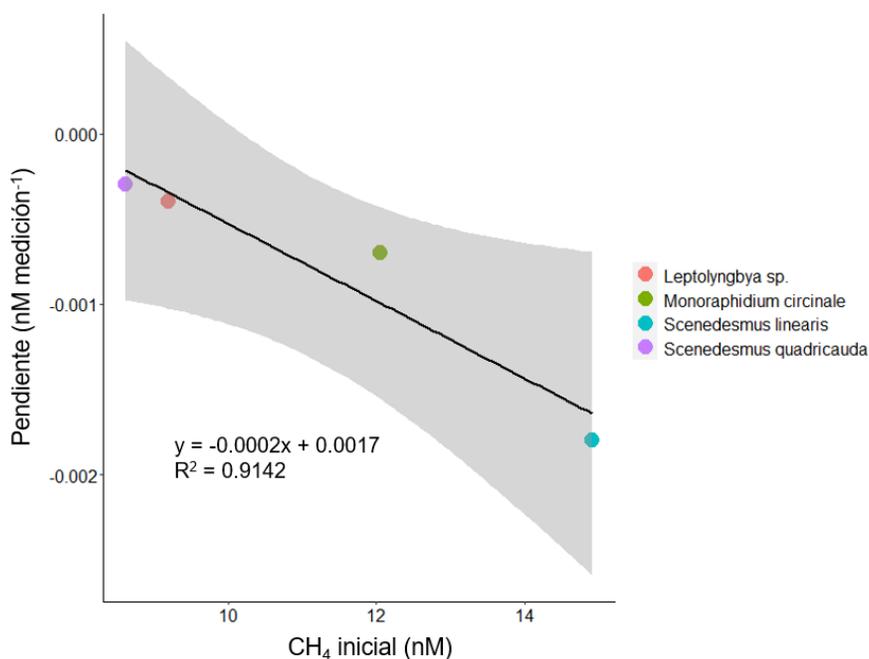


Figura suplementaria 4.1. Relación entre concentración inicial de CH₄ disuelto en el cultivo autoclavado medido y su pérdida física de CH₄ (pendiente).

Suplementario 4.3

Resultados de la medición de los cultivos autoclavados en el MIMS. A partir de estos resultados se construyó la regresión presentada en el punto anterior. De los siete cultivos medidos en el MIMS, se midieron los cultivos

autoclavados de cinco de ellos, por limitaciones de tiempo. De todos modos, dado que en todos los casos se trata de cultivo muerto, no fue necesario tampoco medir el cultivo autoclavado de cada uno de los cultivos.

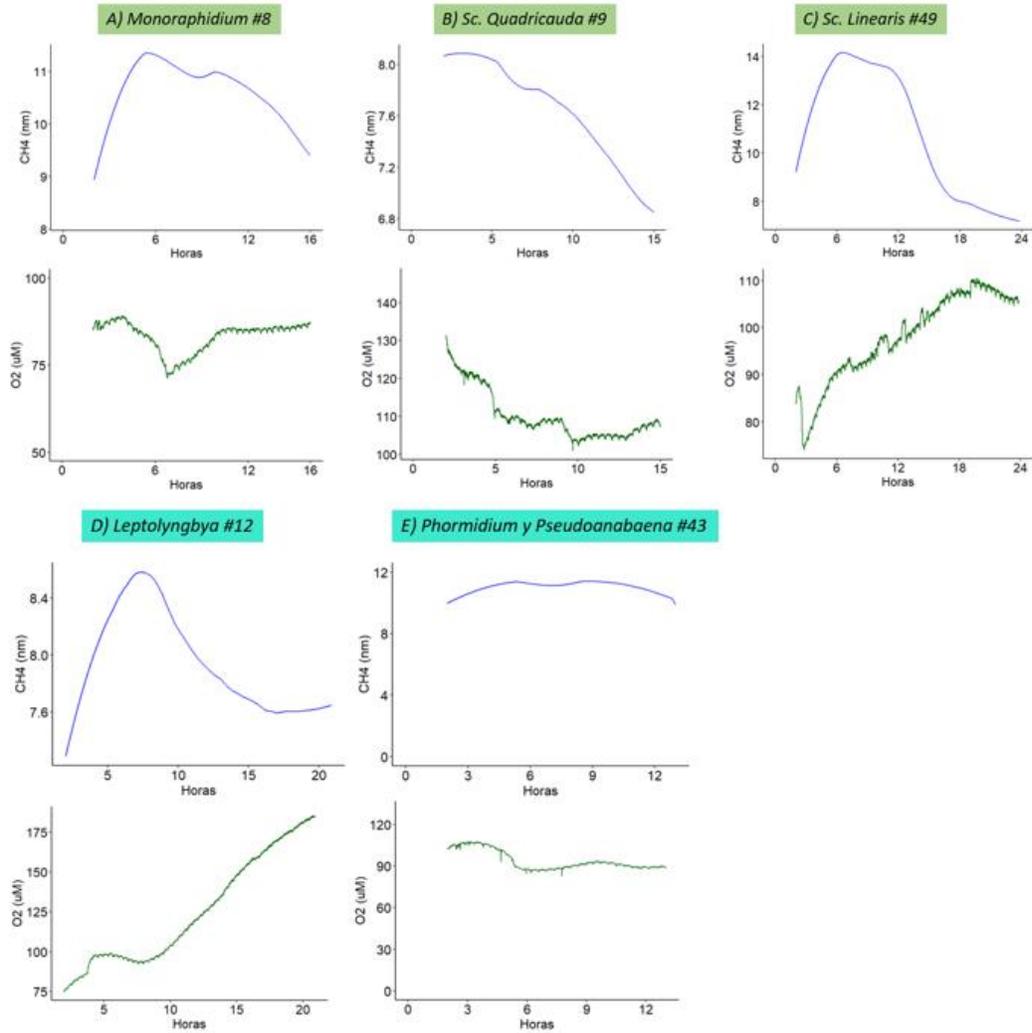


Figura suplementaria 4.2. Mediciones de cultivos autoclavados en el MIMS de Chlorophyta (A, B y C) y de Cyanobacteria (D y E).