

ESTRUCTURA Y DINÁMICA DEL BACTERIOPLANCTON EN LAGUNAS UBICADAS EN LA CUENCA SUPERIOR E INFERIOR DEL RÍO SALADO

Trabajo Final de Grado

del alumno

CAMILA SEOANE ROCHA

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de

Licenciado en Genética

Carrera

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino,.....

**ESTRUCTURA Y DINÁMICA DEL BACTERIOPLANCTON EN LAGUNAS UBICADAS
EN LA CUENCA SUPERIOR E INFERIOR DEL RÍO SALADO**

Trabajo Final de Grado
del alumno

CAMILA SEOANE ROCHA

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

MARÍA E. del R. LLAMES
(Nombre y Apellido)
Co-Director

MARÍA R. SCHIAFFINO
(Nombre y Apellido)
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
1. Comunidades bacterianas	4
2. Herramientas para el estudio de las bacterias	8
3. Lagunas de la Región Pampeana	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
4. Área de estudio	17
5. Descripción del muestreo	22
6. Medición de variables físicas y químicas	23
7. Análisis de las comunidades bacterianas	24
8. Análisis de los datos	26
RESULTADOS	33
9. Análisis de variación temporal y espacial de variables ambientales	33
10. Análisis de la estructura comunitaria	41
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61

INTRODUCCIÓN

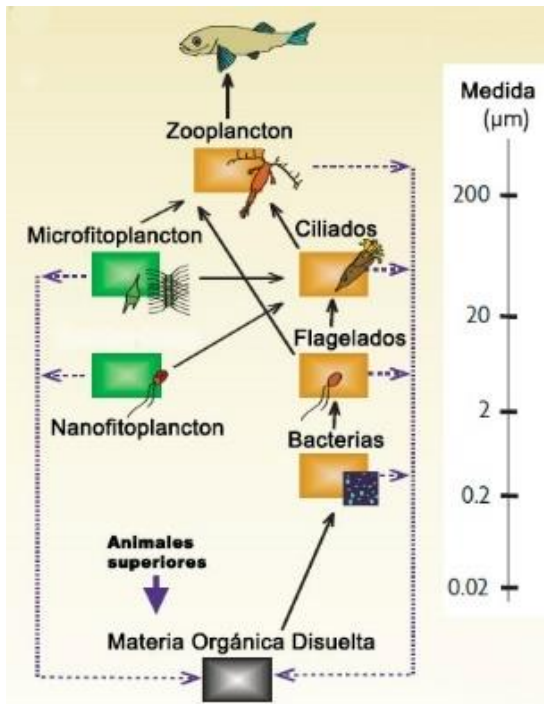
1. COMUNIDADES BACTERIANAS

Las bacterias conforman comunidades que están caracterizadas por su gran riqueza, abundancia y diversidad y son las encargadas de llevar a cabo gran parte de los procesos biogeoquímicos en los distintos ecosistemas del mundo. Debido a su gran potencial de dispersión y a su gran versatilidad metabólica, es posible caracterizarlas como un grupo ubicuo, hallándose inclusive en ambientes con condiciones extremas para el desarrollo de la vida. Esto último hace a este grupo un candidato excepcional para aplicaciones dentro del área de la biorremediación, uso industrial y la bioprospección (Horner-Devine *et al.*, 2003; Prosser *et al.*, 2007). Asimismo, las bacterias son responsables de una gran fracción de la respiración aeróbica y del total de la respiración anaeróbica en los sistemas acuáticos, y su biomasa constituye una fuente importante de carbono, nitrógeno y fósforo (Cole, 1999; Horner-Devine *et al.*, 2003).

1.1 EL BACTERIOPLANCTON

La definición de *plancton* corresponde a todos los organismos que habitan en suspensión en la columna de agua en los ecosistemas acuáticos. El bacterioplancton, refiere al componente bacteriano del plancton y cuyo tamaño varía desde los 0,2 a los 2 μm (Omori e Ikeada, 1992). Es el principal protagonista dentro del bucle microbiano (*microbial loop*) (**Figura 1**), proceso por el cual la Materia Orgánica Disuelta (MOD), proveniente del sistema (autóctona) o fuera del mismo (alóctona), es devuelta a la red trófica convencional debido a la vinculación entre ésta y el bucle microbiano, obteniendo como resultado la re-vehiculización de la MOD hacia los niveles más altos de la trama trófica tradicional (Azam *et al.*, 1983; Wetzel, 2001; Sarmiento, 2012). Por lo tanto, el bacterioplancton es imprescindible en el reciclaje de la materia orgánica y en la remineralización de los nutrientes en los sistemas acuáticos (Muyllaert *et al.*, 2002).

La composición de las comunidades bacterioplanctónicas es variable entre lagos y



lagunas y, además, manifiesta variabilidad temporal dentro de los mismos. El crecimiento y desarrollo de estos microorganismos puede estar condicionado por el pH, la temperatura del agua, la composición química, la salinidad y el estado trófico de estos ecosistemas siendo, estas variables, responsables de las diferencias observadas en estas comunidades (Wetzel, 2001; Wu *et al.*, 2007).

Figura 1. Modelo de red trófica planctónica convencional (formada por los peces, el zooplancton, el fitoplancton y los ciliados) y el bucle microbiano constituido por los flagelados, bacterias y la materia orgánica disuelta de diversos orígenes. (Adaptación de Gasol *et al.*, 2005)

1.2 DIVERSIDAD MICROBIANA

La biodiversidad es la información genética total existente en la Tierra, o en cualquier parte de ella, en un tiempo y lugar determinado (Pedrós-Alió, 2006). La diversidad bacteriana puede exhibir patrones y, en algunos casos, esos patrones pueden ser similares a los observados en plantas y animales. En los estudios de biodiversidad de los organismos superiores, se emplea como unidad de medida de diversidad a las especies. En el caso de las bacterias, la definición de especie es compleja y aun no se ha llegado a un consenso, debido a que el genoma bacteriano es dinámico como consecuencia de la transferencia genética horizontal (Cohan, 2002). Por lo tanto, se ha establecido una unidad pragmática que permite clasificar a los taxones de manera excluyente denominada *Unidad Taxonómica Operativa* (OTU: *Operational Taxonomic Unit*). Descriptores tales como el número de clones en una biblioteca genética o las bandas obtenidas en un gel mediante alguna técnica de “huella genética” molecular (*fingerprinting*) cumplen con los requisitos para ser considerados OTUs. De esta manera, resulta posible realizar estudios de diversidad bacteriana, y gracias a las técnicas moleculares actuales, es posible determinar esta diversidad a diferentes escalas (Horner-Devine *et al.*, 2003).

Durante décadas, la ecología de comunidades ha dirigido sus estudios a procesos de escala local o a procesos de escala regional. Posteriormente, se ha ido incorporando un enfoque encaminado a procesos teniendo en cuenta ambos tipos de escalas en conjunto. Este último enfoque es el concepto que radica en la Teoría de Metacomunidad (Logue *et al.*, 2011), la cual fue desarrollada para explicar los patrones de distribución de macroorganismos y que también resulta útil para fundamentar el patrón de composición de las comunidades bacterianas. Esta teoría postula que, en una región determinada, existe un grupo de comunidades locales que se encuentran interconectadas a través de procesos de dispersión de especies. Existen cuatro paradigmas conceptuales (*Sorting* de especies, Efecto de masa, Dinámica de parches y el Modelo neutral) que describen a las metacomunidades y cada paradigma evoca diferentes mecanismos de ensamblaje de las comunidades en una metacomunidad (**Tabla 1**). En particular, en los sistemas acuáticos pampeanos, el *Sorting* de especies, el cual propone que la estructura de la comunidad está determinada por las condiciones ambientales locales, es el mejor modelo para explicar la estructura comunitaria del bacterioplancton en estas lagunas (Llames, 2011). En este sentido, el patrón comunitario resulta de la existencia de parches ambientales heterogéneos que son susceptibles a ser colonizados por cualquier organismo que llegue por dispersión. A su vez, las condiciones ambientales locales ejercen presión de selección, por lo tanto, aquellos organismos adaptados a las condiciones locales logran establecer una población estable gracias a sus altas tasas de crecimiento.

Tabla 1. Resumen de los paradigmas de la Teoría de Metacomunidad.

Teoría de Metacomunidad	
Paradigmas	Características
<i>Sorting</i> de especies	Parches ambientales heterogéneos. La dispersión permite a los organismos alcanzar parches donde puedan adaptarse a las condiciones locales y así establecer una población.
Efecto Masa	Parches ambientales heterogéneos. La alta dispersión de los organismos entre parches resulta en diferencias en el tamaño y densidad de la población local. Por ejemplo, una especie presa evita su extinción local debido a la llegada de inmigrantes desde parches vecinos que no poseen predadores (“efecto rescate”).

Dinámica de parches	Parches ambientales homogéneos. La dispersión ocurre a tasas más bajas que la dinámica local. Existe una compensación entre la dispersión y el dominio local, como por ejemplo, una compensación entre la colonización y la competencia donde competidores exitosos son colonizadores pobres y viceversa.
Modelo Neutral	El contexto ambiental es irrelevante y las especies tienen la misma tasa demográfica poblacional. En consecuencia, el ensamblaje de las comunidades locales es al azar de acuerdo al <i>pool</i> regional de especies y las diferencias en la composición comunitaria surgen a partir de la limitación de la dispersión (por ejemplo, la distancia) o procesos evolutivos (por ejemplo, especiación).

Otro aspecto relevante de la estructura comunitaria es la distribución de organismos dentro de los distintos rangos de abundancia. En términos generales, dentro de un ecosistema podemos diferenciar dos grandes grupos de organismos de acuerdo a su abundancia (Magurran y Henderson, 2003) (**Figura 2**). Los taxones dominantes (*core*) son los más abundantes y son los que llevan a cabo la mayoría de las funciones del ecosistema, se desarrollan activamente y son propensos a la predación y a la lisis viral. Estos grupos “núcleo” en general suelen ser detectados e identificados con mayor facilidad mediante técnicas moleculares. También, dentro de un ecosistema se hayan los taxones raros (*seedbank*), es decir, los menos abundantes. Estos se desarrollan lentamente, son menos propensos a ser predados o a sufrir pérdidas por lisis viral y pueden ser desarrollados en cultivos celulares dada su especificidad de recursos. Estos organismos funcionan, principalmente, como “bancos de semillas” de forma tal que, frente a un cambio ambiental, las poblaciones se reemplazan y la comunidad se regenera, desempeñando, así, un rol central en la recuperación de los ecosistemas disturbados.

A pesar de los distintos niveles de abundancia de los taxones, todos ellos tienen funciones que son cruciales ante las condiciones ambientales diferentes y cambiantes, por lo tanto, resultan esenciales para mantener la salud del ecosistema (Szabó *et al.*, 2007).

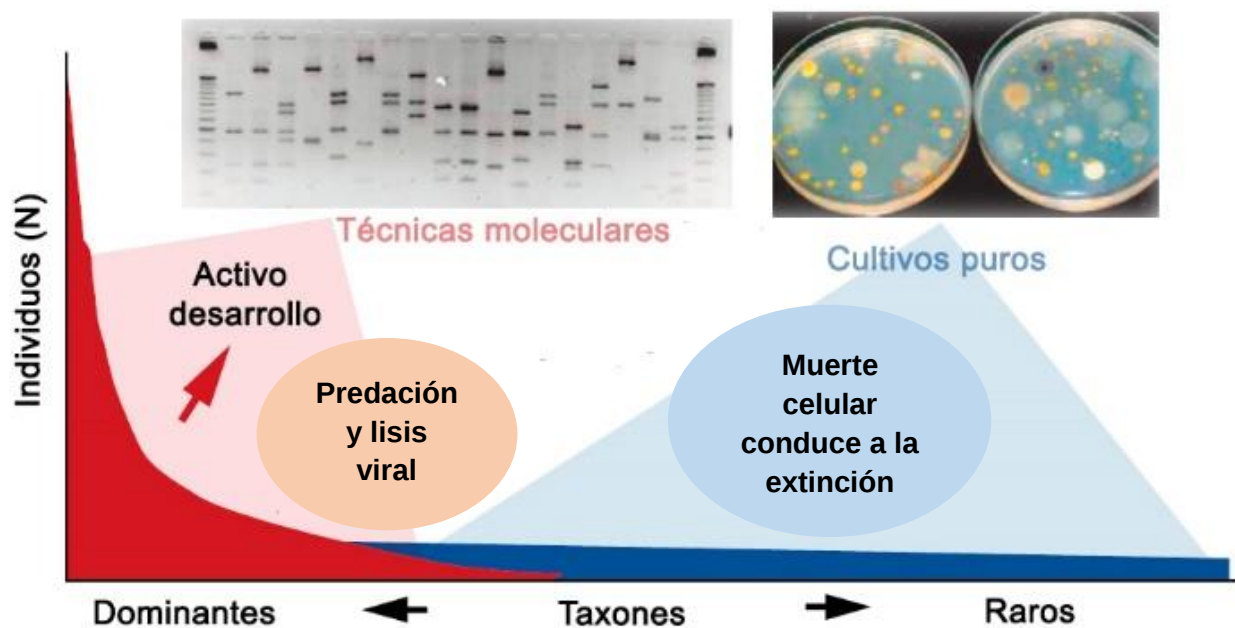
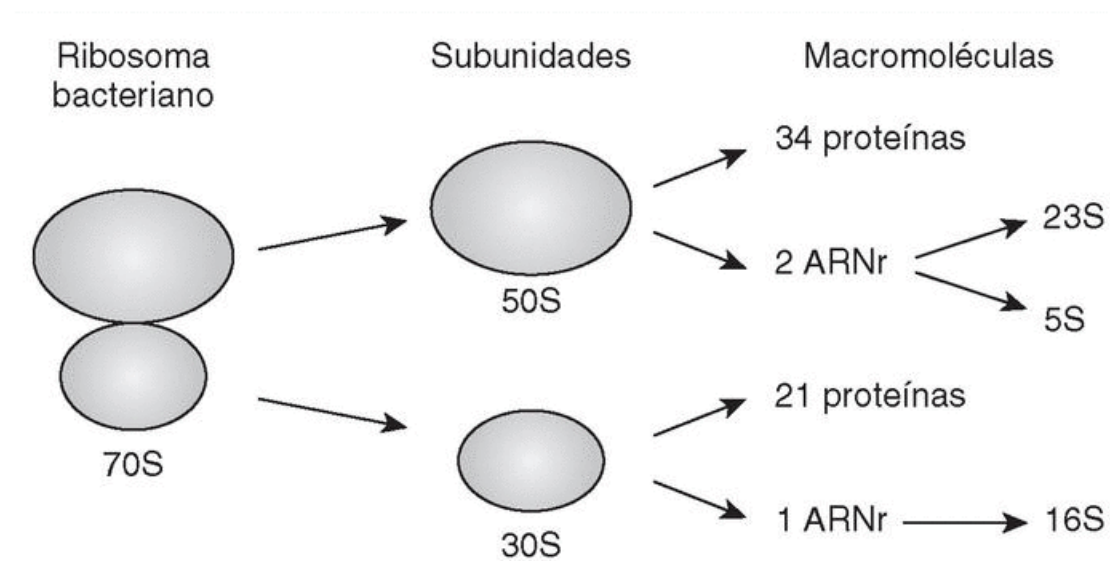


Figura 2. Gráfico que muestra el número de individuos versus la abundancia de taxones (dominantes o raros). La curva total representa la biodiversidad y se compone de dos secciones: la zona “roja”, contiene a los taxones dominantes que tienen un rol activo en el flujo de carbono y energía en un ecosistema dado. La sección azul de la curva corresponde a los taxones raros, que sobreviven en el ecosistema a una baja abundancia. La misma curva ilustra qué porciones de la biodiversidad pueden ser obtenidas mediante diferentes técnicas. Las técnicas moleculares permiten acceder a la mayoría de los taxones, pero la cola de la biodiversidad no es detectada por las técnicas de fingerprinting. Las técnicas de cultivo pueden, únicamente, obtener unos pocos taxones presentes en el ambiente (adaptación de Pedrós-Alió, 2006).

menor del ribosoma bacteriano (**Figura 3A**). El empleo de este gen se debe a su presencia en el genoma de todos los organismos procariotas y a que la mayoría de la variación encontrada en él es el resultado de mutaciones neutrales actuando, de esta manera, como reloj molecular (Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer, 1999; Pedrós-Alió, 2006; Logue *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2010). El ADNr 16s posee un tamaño de 1500 pb y contiene nueve regiones variables (**Figura 3B**) expresadas entre regiones conservadas. Las regiones variables son frecuentemente usadas para clasificaciones filogenéticas (tales como géneros o especies), así como para determinar un perfil genético mediante técnicas de *fingerprinting*. Las regiones conservadas, en cambio, son utilizadas para realizar cebadores (*primers*) específicos.

A



B

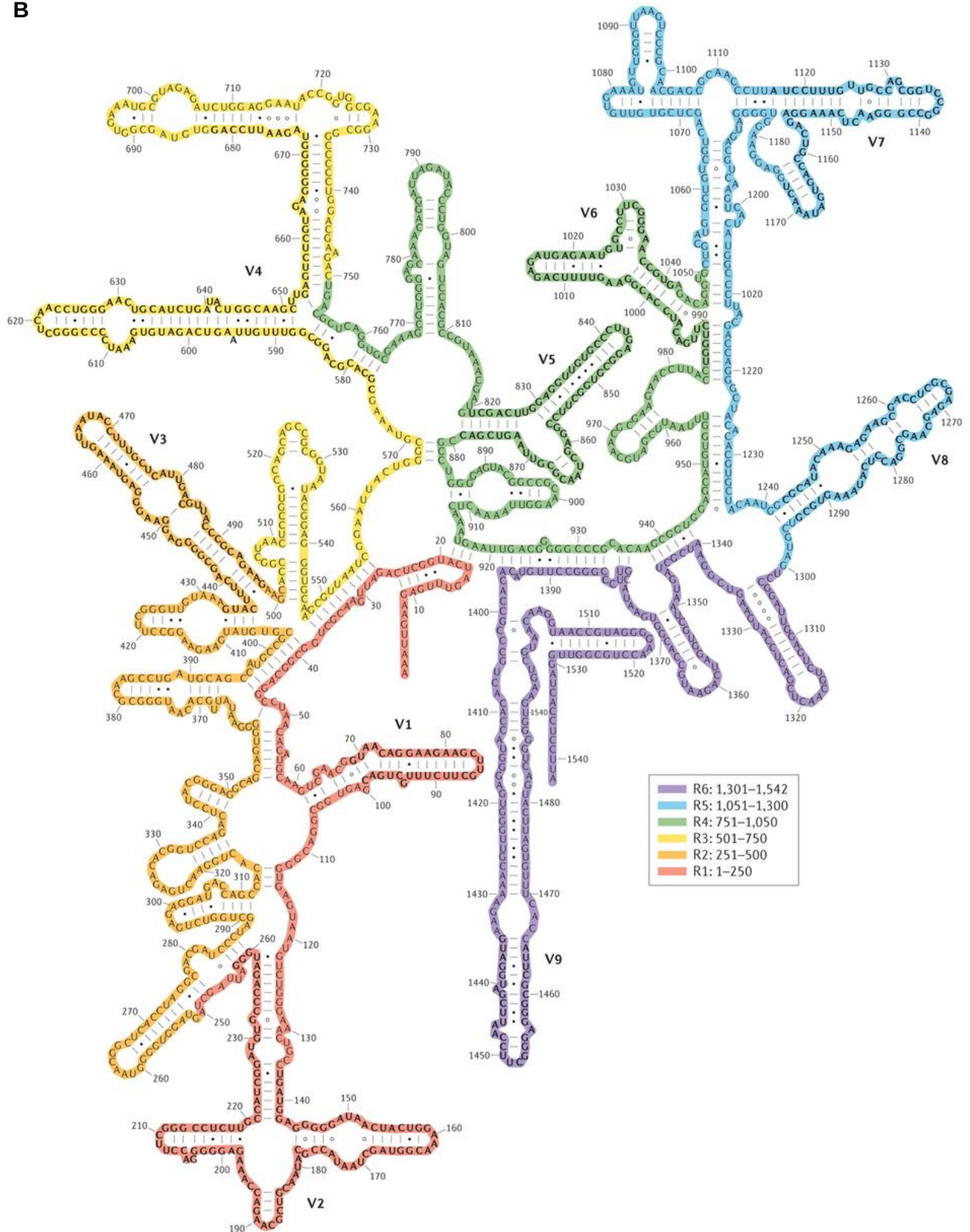


Figura 3. A: Subunidades y componentes del ribosoma bacteriano (adaptado de Rodicio y Mendoza, 2004). B: Estructura secundaria del ADNr 16S, también se encuentran identificadas las 9 regiones hipervariables (V1-V9) (adaptado de Yarza et al., 2014).

2.1.1 DGGE: ELECTROFORESIS EN GEL DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE (*DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS*)

Dentro de la rama de la ecología microbiana se emplean técnicas que aprovechan la información presente en la secuencia génica del ADNr 16S, utilizando métodos de *fingerprinting* del ADN (Logue *et al.*, 2008). Varias de ellas pueden ser usadas para comparar comunidades microbiológicas de diferentes ambientes o para seguir el comportamiento de una comunidad a lo largo del tiempo (Muyzer, 1999). Entre los métodos más utilizados podemos mencionar el Análisis de Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Terminales de Restricción (T-RFLP: *Terminal-Restriction Fragments Length Polymorphism*) (Avaniss-Aghajani *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997), Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer *et al.*, 1993, 1997) y el Análisis Automatizado del Espacio Intergénico Ribosomal (ARISA: *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) (Fisher y Triplett, 1999; Yannarell y Triplett, 2005), entre otros.

De un modo simplificado, el fundamento de la técnica de DGGE se basa en la separación, por electroforesis en gel, de fragmentos (previamente amplificados) del ADNr 16S que poseen longitud similar pero que difieren en su secuencia (**Figura 4**). Estos fragmentos son separados en base a su punto de desnaturalización (*melting point*) en un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente desnaturalizante generado a partir de una concentración adecuada de formamida y urea (Muyzer *et al.*, 1993). Como regla general, se ha observado que cualquier ADN diana que se encuentre en un porcentaje mayor al 1% en el *pool*, es probable de ser detectado por esta técnica de *fingerprinting* (Muyzer *et al.*, 1993). Por lo tanto, la misma permite caracterizar al componente dominante de una comunidad (Green *et al.*, 2010). Asimismo, una ventaja de esta técnica es que, eventualmente, es posible realizar la escisión de bandas en el gel, amplificarlas, luego re-amplificarlas y secuenciarlas, permitiendo obtener información taxonómica detallada de las mismas (Muyzer y Smalla, 1998; Muyzer, 1999; Dorigo *et al.*, 2005).

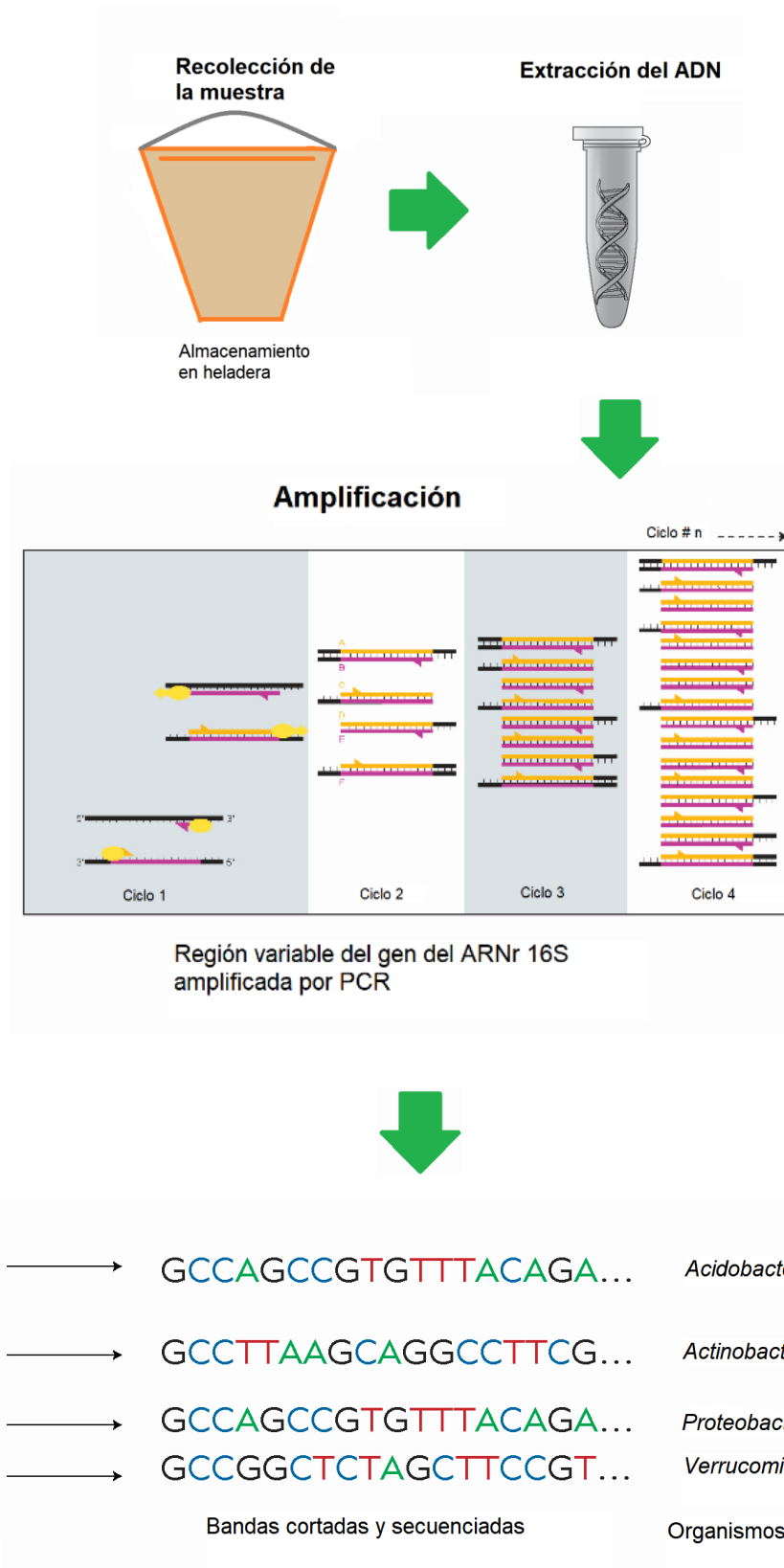


Figura 4. Esquema del proceso de DGGE.

2.1.2 SECUENCIACIÓN MASIVA DE ALTO RENDIMIENTO (HIGH THROUGHPUT SEQUENCING)

Las herramientas moleculares tales como PCR, secuenciación por Sanger y las técnicas de *fingerprinting*, permitieron dar a conocer la diversidad de las comunidades microbiológicas (Logares *et al.*, 2012). La era genómica, en este campo, comenzó en 1995, cuando el primer genoma bacteriano fue secuenciado mediante el método de Sanger; posteriormente, en 2005, el advenimiento de la secuenciación de alto rendimiento (HTS: *High Throughput Sequencing*) mostró un avance significativo en la facilidad y los costos de secuenciación (Loman *et al.*, 2012). La popularización de la secuenciación de alto rendimiento revolucionó el campo de la ecología microbiana (Logares *et al.*, 2012) ofreciendo grandes oportunidades en las ciencias de la vida (Ansorge, 2009).

Una de las plataformas más utilizadas últimamente en los estudios de diversidad microbiana es la plataforma Illumina MiSeq. Esta utiliza la química de secuenciación por síntesis (SBS), capaz de detectar de a un nucleótido por vez a medida que es incorporado durante la síntesis de la cadena de ADN (**Figura 5**). En primera medida, al ADN fragmentado es preparado con adaptadores en los extremos para permitir que sus cadenas desnaturalizadas puedan unirse a una superficie sólida. Luego, son enriquecidas a través de la amplificación tipo puente formando, de esta manera, *clusters* de ADN que poseen la misma secuencia nucleotídica. Posteriormente, se emplean nucleótidos con marcadores fluorescentes y terminadores reversibles que, al ser incorporados a la cadena en crecimiento, pueden ser detectados por una cámara. Por otro lado, aquellos nucleótidos que no hayan sido incorporados serán lavados para continuar con el ciclo. Una vez que se ha identificado la primera base y se hayan lavado las demás, se eliminará el terminador que se encuentra en el extremo 3', el cual tiene la función de impedir la continuación de la síntesis. Finalmente, se adiciona una nueva tanda de nucleótidos y continúa la secuenciación hasta completar toda la cadena. Con esta plataforma, se puede generar hasta 15 Gb de información en 56 horas, con una lectura de fragmentos de hasta 2x300bp (*paired end* o secuenciación desde ambos extremos), dando como resultado datos de alta calidad (Ansorge, 2009; Logares *et al.*, 2012).

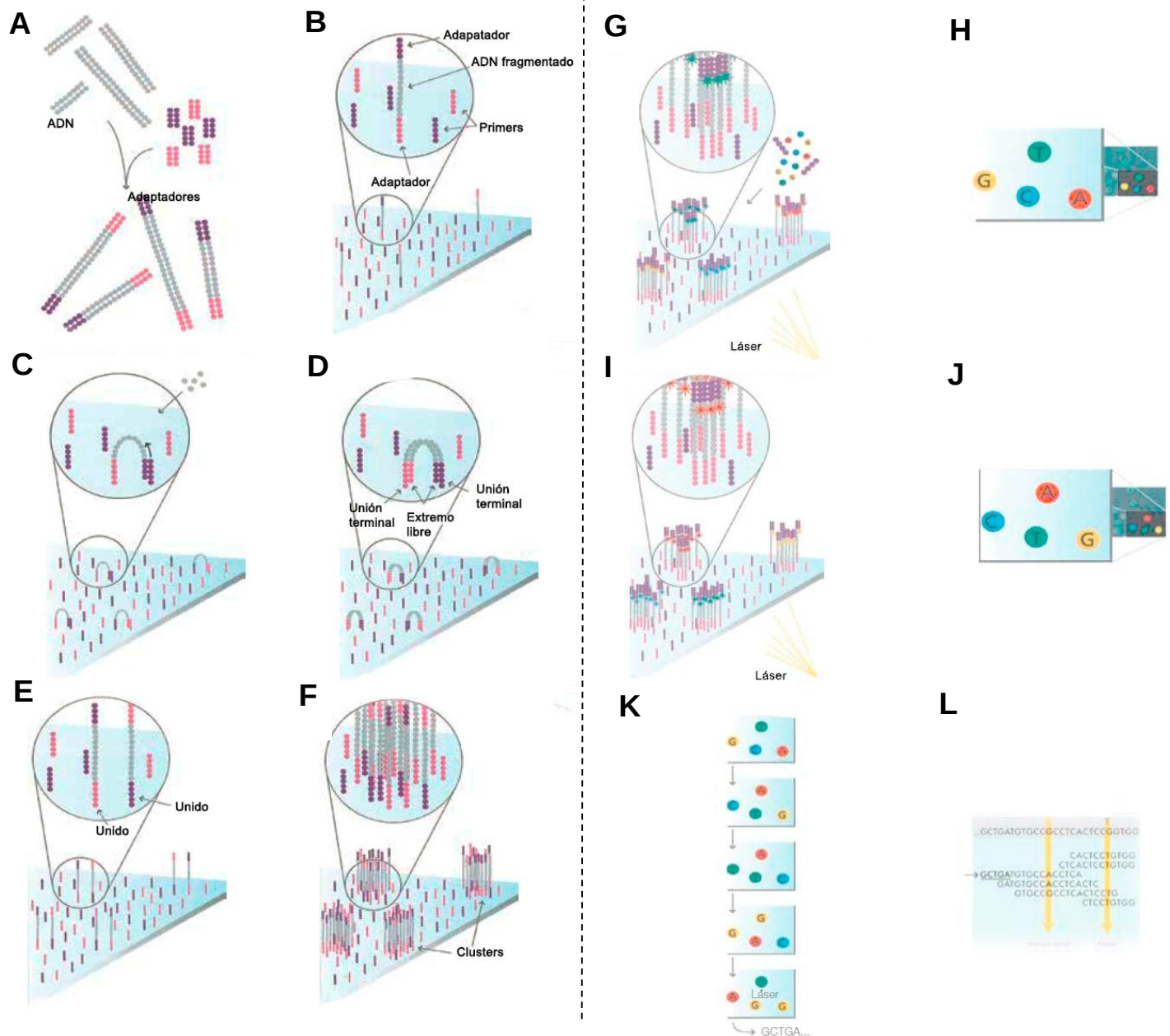


Figura 5. Esquema de la metodología de secuenciación empleada por Illumina. A: preparación de la muestra, el ADN genómico es fragmentado y los adaptadores son ligados a ambos extremos de cada segmento. B: unión del ADN a la superficie, se produce la unión de los fragmentos simple hebra, al azar, a la superficie de la célula de flujo. C: amplificación por puentes, se adicionan los nucleótidos no marcados y la enzima ADN polimerasa para iniciar la amplificación. D: los fragmentos se transforman en doble hebra, la enzima incorpora los nucleótidos para formar puentes de doble hebra en la superficie del sustrato sólido. E: desnaturalización de las moléculas doble hebra, la desnaturalización produce moldes simple hebra que quedan anclados al sustrato. F: amplificación completada, grupos o clusters de millones de moléculas de ADN de doble hebra son producidos en cada canal de la célula de flujo. G: primera base, el primer ciclo de secuenciación comienza por adición de los cuatro terminadores reversibles marcados, los primers y la enzima ADN polimerasa. H: imagen de la primera base, después de la excitación debida al láser, la fluorescencia emitida de cada cluster es capturada y la primera base es identificada. I: determinación de la segunda base, el siguiente ciclo repite la incorporación de los cuatro terminadores reversibles marcados, los primers y la ADN polimerasa. J: imagen del segundo ciclo, después de la excitación por láser, la imagen es capturada como en H y la identidad de la segunda base es descubierta. K: varios ciclos de secuenciación, los ciclos de secuenciación son repetidos para determinar la secuencia de bases en un fragmento de a una base por vez. L: alineación de los datos, los datos son alineados y comparados a una referencia, luego, las diferencias de la secuencia son identificadas. (Imagen adaptada de Illumina® Sequencing (2010)).

3. LAGUNAS DE LA REGIÓN PAMPEANA

3.1 LAGUNAS PAMPEANAS Y SU ESTADO ACTUAL

Las lagunas pampeanas poseen un origen fluvial-eólico (Rennella y Quirós, 2002, 2006) y son el principal componente del humedal pampeano. Pueden ser clasificadas como lagunas con régimen turbio o claro y la concentración salina que poseen permite identificarlas como subsalinas y salinas (Quirós *et al.*, 2002b). Su profundidad varía entre uno o dos metros, presentando cambios en la superficie, profundidad, salinidad y demás componentes en función a los ciclos de sequía e inundación que caracterizan a la región (Quirós *et al.*, 2006).

Originalmente las lagunas pampeanas se encontraban dominadas por una gran diversidad de macrófitas y estados de aguas claras (meso-eutróficas) (Quirós *et al.*, 2002a). Posteriormente, el estado trófico de las lagunas pampeanas fue variando entre eutrófico e hipereutrófico con frecuentes floraciones de algas y cianobacterias (Quirós *et al.*, 2002b). Esta eutrofización e hipereutrofización son consecuencia, en gran parte, de la actividad antrópica. Por un lado, el proceso de “agriculturización”, conjunto de grandes transformaciones que responden a cambios macroeconómicos y de tipo tecnológico-ambiental, favoreció la expansión de la frontera agropecuaria y permitió desarrollar la producción en áreas marginales y agroecológicamente frágiles. Esta incorporación de nuevas tecnologías, como la siembra directa de variedades genéticamente modificadas, con la expansión del doble cultivo trigo-soja en detrimento de rotaciones agro-ganaderas están provocando un cambio de régimen de las lagunas hacia sistemas hipertróficos altamente turbios debido al incremento de nutrientes que ingresan a la cuenca por esta actividad. (Paruelo *et al.*, 2005; Quirós *et al.*, 2006).

Por otro lado, el cambio en el estado trófico también se encuentra relacionado a la urbanización (por ejemplo, causante del vertido de materia orgánica), canalización de ríos y arroyos, la implantación de industrias contaminantes y al mal funcionamiento de los sistemas de tratamientos de efluentes (Wetzel, 2001; Quirós *et al.*, 2006). De este modo, los diferentes factores antropogénicos citados, en conjunto con los factores climáticos o ambientales, conducen a la alteración del metabolismo del ecosistema y a grandes cambios en la composición y abundancia relativa de las especies que se hallan en los sistemas

acuáticos de la región (Chornomaz *et al.*, 2002; Quirós *et al.*, 2002a; Austin *et al.*, 2003; Gabellone *et al.*, 2005).

Las lagunas bonaerenses cumplen funciones ambientales claves porque albergan una gran biodiversidad, tienen la capacidad moderar el régimen fluvial, cumplen un papel importante en las actividades pecuarias y turísticas, constituyendo la fuente de desarrollo de muchas localidades bonaerenses. Por lo tanto, en un contexto de continuos cambios en las prácticas agrícola-ganaderas, comprender en qué medida las variables ambientales y la estructura microbiana de las lagunas responden a los mismos, cobra importancia no sólo por el valor intrínseco de estos sistemas sino por su papel como indicadores de la salud de todo el paisaje (Geraldí *et al.*, 2011).

HIPÓTESIS

→ Las lagunas ubicadas en la cuenca superior (Gómez y Carpincho) del Río Salado poseen una concentración mayor de nutrientes, asociada al uso del suelo, en comparación con las lagunas de la cuenca inferior (Chascomús y El Triunfo) de dicho río.

→ La estructura comunitaria del bacterioplancton de las lagunas que se encuentran en la cuenca superior (Gómez y Carpincho) difieren en la estructura comunitaria respecto a las comunidades bacterianas que se desarrollan en lagunas de la cuenca inferior (Chascomús y El Triunfo) del Río Salado.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

La presente tesis tiene por objetivo general estudiar la estructura (composición y riqueza) y dinámica del bacterioplancton en cuatro lagunas pertenecientes a la Región Pampeana, ubicadas en la cuenca superior (Gómez y Carpincho) e inferior (Chascomús y El Triunfo) del Río Salado; así como también analizar la relevancia de los factores

ambientales, que determinan la estructura comunitaria en estos sistemas, dentro del contexto de las transformaciones ambientales provocadas por las actividades humanas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Analizar y comparar las principales variables ambientales en dos lagunas de la cuenca superior (Gómez y Carpincho) y dos lagunas de la cuenca inferior (Chascomús y El Triunfo) del Río Salado y sus variaciones temporales (estacionales) a lo largo de un año de estudio.

→ Estudiar la composición genética del bacterioplancton, así como su dinámica estacional en dichas lagunas mediante distintas técnicas y herramientas moleculares (DGGE e Illumina MiSeq).

→ Analizar el efecto de las variables ambientales (por ejemplo: nutrientes, temperatura, conductividad, pH, turbidez, oxígeno disuelto, nivel hídrico), el efecto temporal (estacional) y espacial (cuenca superior e inferior del Río Salado) sobre la estructura del bacterioplancton en dichas lagunas.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. ÁREA DE ESTUDIO

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA REGIÓN PAMPEANA

La Región o Llanura Pampeana (33° - 39° S, 58° -66° O) es el paisaje más productivo de la Argentina (Betolli *et al.*, 2009) (**Figura 6**). Aunque el área posee una corta historia agrícola, la región permaneció como pradera nativa hasta finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX, siendo posteriormente utilizada para la ganadería y el cultivo (Viglizzo *et al.*, 2001).

El clima en esta región se define como templado húmedo, sin temporada seca y con veranos cálidos e inviernos moderados (Fittkau *et al.*, 1969; Doering, 2002; Araus y Slafer, 2015). Las precipitaciones disminuyen de este a oeste y oscilan entre 1200 mm en el noreste y menos de 500 mm en el sur y el oeste (Krishna, 2015).

4.2 CUENCA DEL RÍO SALADO

El Río Salado ocupa unos 140.000 km² de la porción central y norte de la provincia de Buenos Aires (Mazza, 1961), discurriendo de Oeste a Este por la misma. Originalmente nacía en la laguna el Chañar (34°07'S, 61°36'O), en el sur de la provincia de Santa Fe recorriendo luego 690 Km hasta su desembocadura en la Bahía de Samborombón. Actualmente su nacimiento ha sido extendida artificialmente por canales hasta más allá de las lagunas encadenadas de Villa Cañas (Rosso, 2008). Este río cuenta con una pequeña pendiente y es el afluente más meridional de la cuenca del Río de La Plata (**Figura 6**). El Río Salado es considerado de régimen perenne, fluctuante y tiene una gran interrelación con ambientes lagunares asociados a su cuenca (Gabellone *et al.*, 2001; Bettolli *et al.*, 2009). A su vez, la cuenca del Río Salado es una de las más importantes de la Argentina, en términos socioeconómicos, debido a su transformación como la principal zona productora de alimentos de nuestro país (granos y carnes) y una de las principales del mundo (Halcrow y Partners, 1999).

Históricamente, la cuenca del Río Salado se ha caracterizado por presentar alta heterogeneidad en el uso del suelo, afectando de esta manera a los ambientes acuáticos asociados a ella, según las diferentes actividades humanas desarrolladas en sus alrededores (Gabellone *et al.*, 2005). En líneas generales, la cuenca alta de este río se ha caracterizado por presentar un mayor desarrollo de actividades agrícolas en sus alrededores (rotaciones de cultivos de soja-maíz-trigo), con grandes requerimientos de fertilizantes, herbicidas y plaguicidas, mientras que la cuenca baja se ha caracterizado por presentar mayores rotaciones de pasturas y actividades ganaderas (**Figura 6**). Actualmente, de acuerdo Sánchez *et al.* (*en prep.*), y en relación a los cuatro sistemas de estudio de esta tesis, es también posible hallar la zonificación en la cuenca de acuerdo al uso del suelo (**Figura 7**).

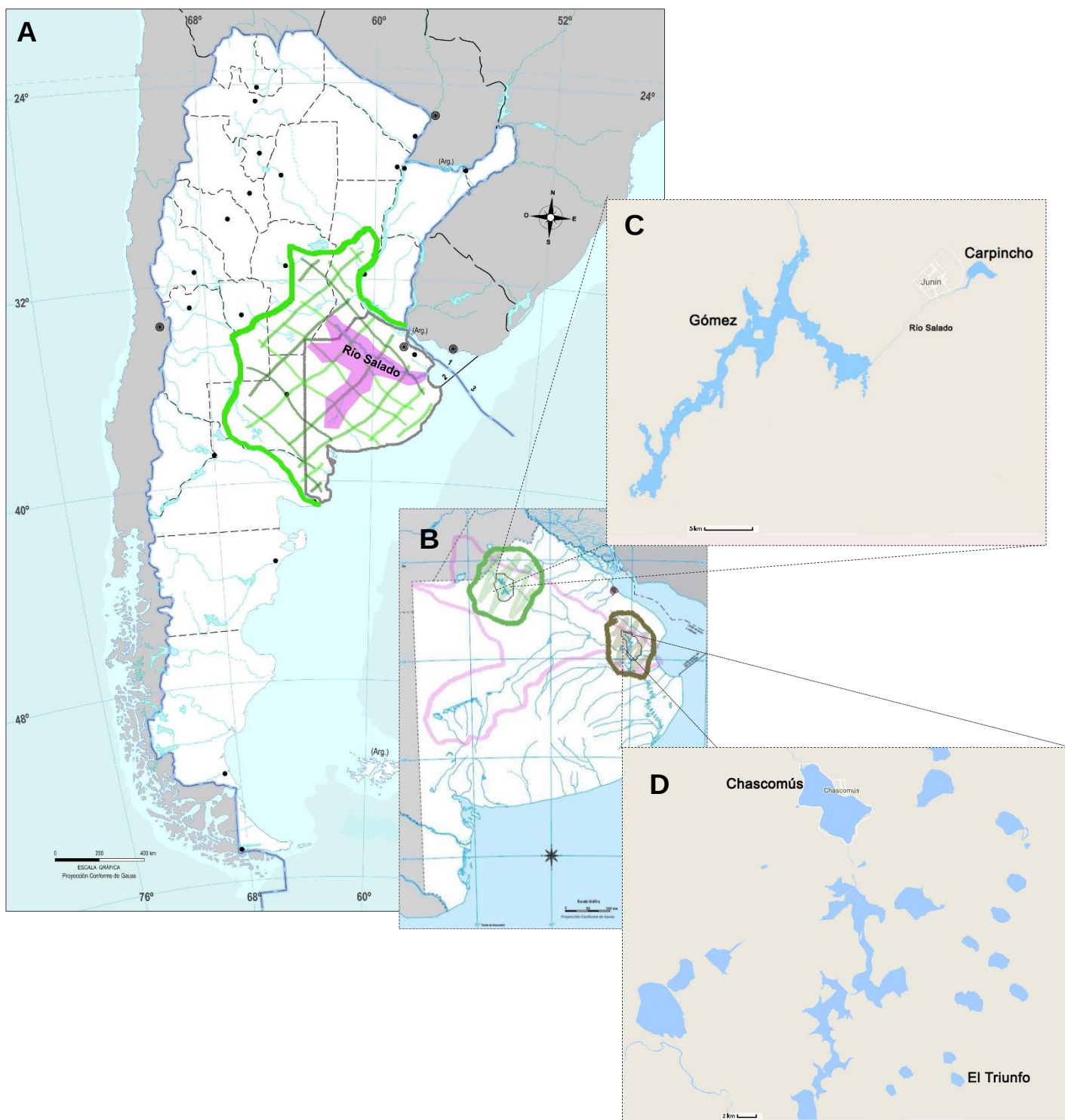


Figura 6. A: mapa de la República Argentina; en verde y a cuadros se encuentra marcada la Región Pampeana; en fucsia se representa a la cuenca del Río Salado. B: mapa de la provincia de Buenos Aires; en verde está representado el uso de suelo, en su mayoría agrícola, para la cuenca alta; en marrón se encuentra representado el uso de suelo, en su mayoría ganadero, para la cuenca baja del Río Salado; encerrada en negro se encuentra la zona donde se halla cada sitio incluido en este trabajo. C-D: localización de las 4 lagunas en cada área de la cuenca.

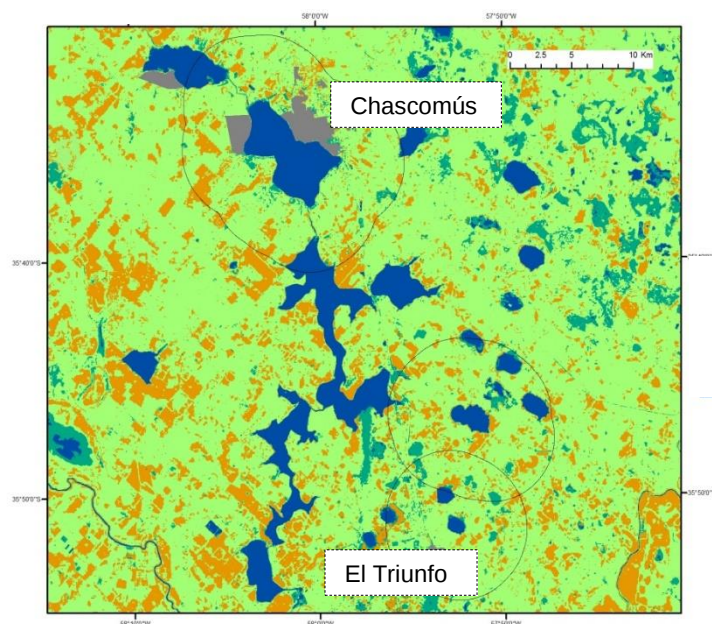
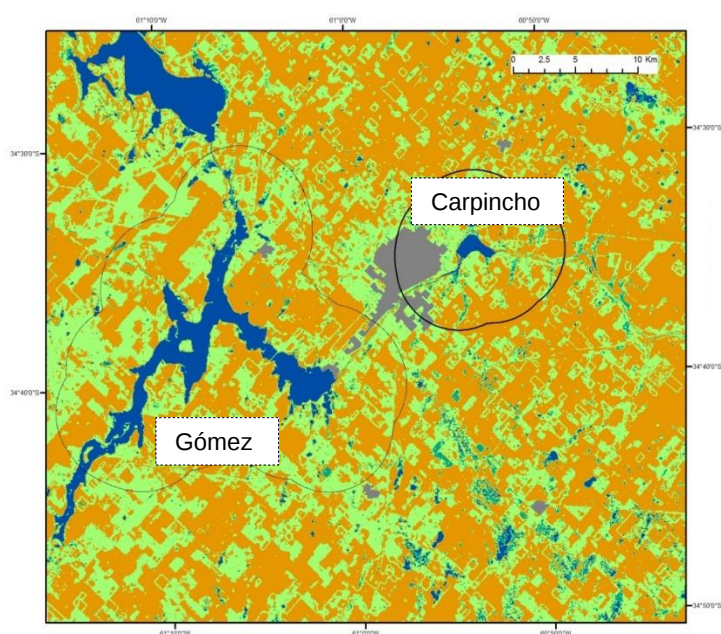
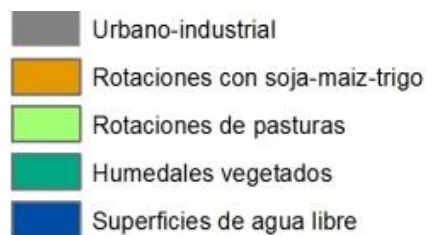


Figura 7. Imágenes satelitales correspondientes al uso de suelo en la zona de la cuenca alta (panel superior) y cuenca baja (panel inferior) del Río Salado. (Análisis de imágenes satelitales realizado por P. Minotti en Sánchez et al. en prep.)

Los ecosistemas acuáticos elegidos para este estudio en total son cuatro, dos de ellos ubicados en la cuenca superior del Río Salado y los dos restantes se encuentran en la cuenca inferior de dicho río (**Figura 6 y Figura 8**):

- Cuenca superior: lagunas localizadas en el partido de Junín, Provincia de Buenos Aires. Ambas poseen presas con vertederos para regular el nivel del agua.
 - Laguna de Gómez
 - Laguna el Carpincho
- Cuenca inferior: lagunas localizadas en los partidos de Lezama y Chascomús, Provincia de Buenos Aires. Únicamente Chascomús posee compuerta para regular el nivel del agua.
 - Laguna Chascomús
 - Laguna El Triunfo

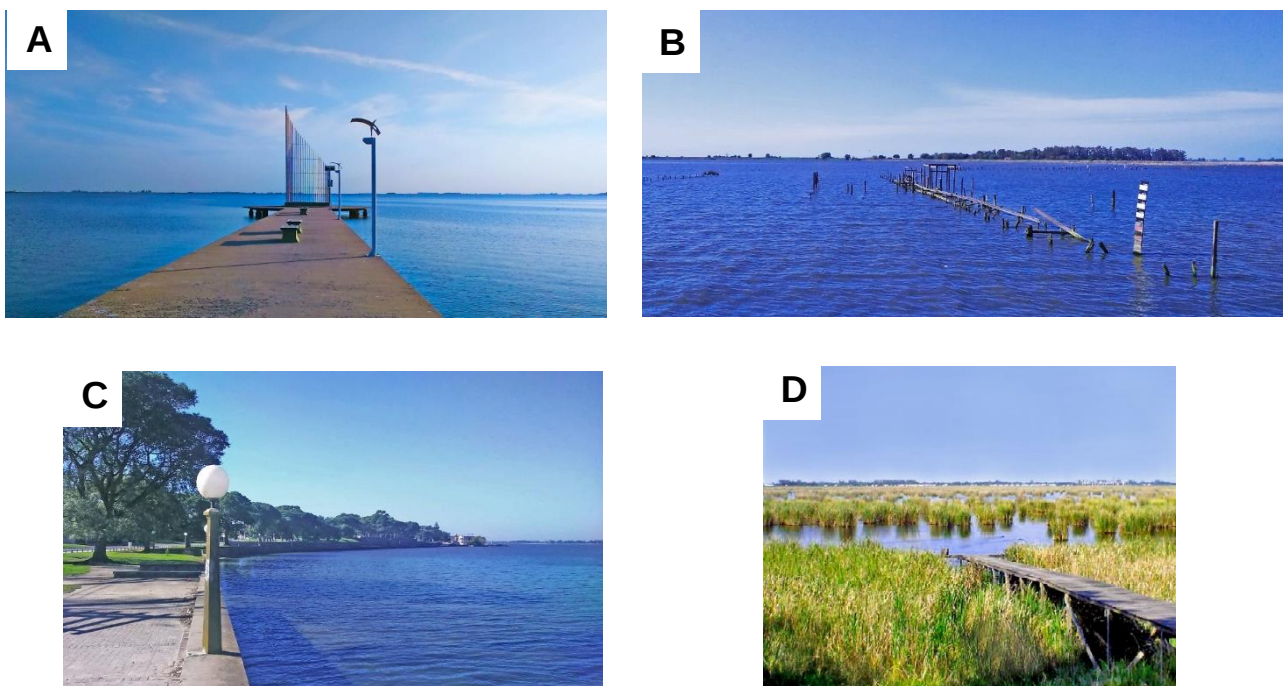


Figura 8. A-C: fotografías correspondientes a las cuatro lagunas incluidas en este trabajo. A y B: cuenca alta del Río Salado. C y D: cuenca baja del Río Salado. A: Gómez. B: Carpincho. C: Chascomús. D: El Triunfo.

Las coordenadas geográficas y demás características morfométricas de estas lagunas se muestran en la **Tabla 2**. La peculiaridad de los cuerpos de agua estudiados en este trabajo es la interconectividad existente en tres de ellos (Chascomús, Gómez y

Carpincho) a través del Río Salado. Por lo tanto, el balance hídrico de los mismos depende del aporte de aguas de origen fluvial que transporta el río, así como de sus tributarios naturales, canales artificiales e ingresos de aguas subterráneas y provenientes de las precipitaciones (Rosso, 2008). En el caso de la laguna El Triunfo corresponde a un sistema no conectado directamente con el río, alimentado por agua de lluvia, así como de canales subterráneos; aunque suele conectarse al mismo en períodos de inundación.

Tabla 2. Variables morfométricas para las cuatro lagunas incluidas en este estudio. msnm: metros sobre el nivel del mar, km²: kilómetros cuadrados.

	Gómez	Carpincho	Chascomús	El Triunfo
Latitud	34° 39'S	34° 33'S	35° 36'S	35°51'S
Longitud	61°2'O	60°53'O	58° 02'O	57° 52'O
Área (km²)	36,6	4,4	30,1	1,5
Altitud (msnm)	73	67	5	9

Estas lagunas consisten en cuerpos de agua de origen fluvial-eólico, cuya superficie es mayor a 100 hectáreas y muy poco profundos (profundidad media de 2 metros). Son sistemas permanentes, polimícticos (es decir que no estratifican térmicamente, tal vez con leves gradientes térmicos en los días calmos de verano), someros, cuya salinidad es altamente variable, naturalmente eutróficos y sujetos a estrés ambiental (Ringuelet *et al.*, 1967; Dangavs, 1976; Izaquirre y Vinocur, 1994; Quirós y Drago, 1999).

La laguna El Triunfo se halla en un régimen de aguas claras y vegetadas, colonizadas por macrófitas sumergidas y emergentes. En cambio, las lagunas Chascomús, Carpincho y Gómez se encuentran en estado de aguas turbias, caracterizadas por una escasa profundidad de disco de Secchi y una alta abundancia de fitoplancton (Allende *et al.*, 2009).

5. DESCRIPCIÓN DEL MUESTREO

Se tomaron muestras estacionales y simultáneas de las 4 lagunas, durante los meses de enero, abril, julio y octubre, comenzando en el mes de enero de 2015 y finalizando en el mes de enero de 2016.

En cada sitio y fecha se obtuvieron muestras de los primeros 30 cm de profundidad de la columna de agua, en la zona central o pelágica de cada cuerpo de agua. Una vez tomadas las muestras, se guardaron en contenedores refrigerados y en oscuridad hasta su procesamiento (no más de 4 horas luego de la toma de muestra).

6. MEDICIÓN DE VARIABLES FÍSICAS Y QUÍMICAS

En cada laguna y fecha de muestreo se realizaron las siguientes mediciones *in situ*: pH, nivel hídrico (mediante varilla graduada), conductividad, temperatura, oxígeno disuelto (OD) y turbidez nefelométrica mediante el uso de sensores de campo (HANNA pH/cond meter HI991301, HANNA HI9146 y HACH 2100P Turbidimeter), así como la profundidad del disco de Secchi. Asimismo, se recolectaron muestras de agua para el análisis de los nutrientes principales, tales como fósforo reactivo soluble (PRS), fósforo total (PT), nitrógeno total Kjeldahl (NT), sólidos totales en suspensión o seston (SS), peso seco libre de cenizas (PSLC) y clorofila-a (Chla).

6.1 ANÁLISIS DE NUTRIENTES

El análisis de nutrientes disueltos se realizó luego de la filtración del agua de cada laguna a través de filtros de microfibra de vidrio (Whatman GF/F, 0.7µm). Las determinaciones de fósforo para las lagunas pertenecientes a ambas cuencas, se realizaron mediante técnicas espectrofotométricas (APHA, 2005). El NT se determinó por el Método semi-micro Kjeldahl (APHA, 1992).

La concentración SS se obtuvo a partir del filtrado de volúmenes conocidos de agua a través de filtros Whatman GF/F previamente muflados y pesados. Estos filtros se dejaron secar en la estufa (103- 105 °C) hasta peso constante (APHA, 1992). Luego, se obtuvo el peso final del filtro y se le restó el peso inicial, para finalmente dividirlo por el volumen filtrado, de esta manera se logró determinar SS. Para estimar PSLC (MO: Materia Orgánica) los filtros con el material seco retenido fueron calcinados a 500°C por 3hs. Luego de la calcinación, fueron pesados nuevamente y por diferencia se estimó el contenido de materia orgánica (MO), también dividido por el volumen filtrado.

Finalmente, se estimó la concentración de Chla mediante espectrofotometría antes y después de la acidificación con HCl (1N), utilizando etanol caliente (60-70°C) como solvente de extracción (Nusch, 1980).

Por otro lado, se obtuvieron los registros mensuales de precipitaciones y demás parámetros meteorológicos de las estaciones cercanas del Servicio Meteorológico Nacional a los distintos cuerpos de agua seleccionados.

6.2 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE TRÓFICO

Se cuantificó y comparó el estado trófico de cada laguna utilizando el Índice de Estado Trófico (Adamovich *et al.*, 2016), teniendo en cuenta las concentraciones de Chla y PT, así como los valores obtenidos de Secchi:

$$TSI = 9,81 \times \ln Chla (\mu g/L) + 30,6$$

$$TSI = 14,43 \times \ln PT (\mu g/L) + 4,15$$

$$TSI = -14,39 \times \ln Secchi (m) + 59,91$$

TSI: *Trophic State Index*
(Índice de Estado Trófico)

Luego, se llevó a cabo el promedio de los tres índices, permitiendo clasificar el estado trófico de los distintos cuerpos de agua, empleando una escala de 0 a 100:

- Valores promedio mantenidos entre **30 y 50**: determinan condiciones meso-eutróficas.
- Valores promedio **50 y 60**: determinan condiciones eutróficas.
- Valores promedio obtenidos por encima de **70**: determinan condiciones hipereutróficas.

7. ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS

7.1 EXTRACCIÓN DE ADN AMBIENTAL

Para extraer el ADN ambiental de cada laguna, y así estudiar la composición genética, aproximadamente 300 ml de muestra fueron prefiltradas a través de una membrana de 51 µm de poro, con el fin de eliminar aquellos organismos/partículas de mayor tamaño, y luego fueron filtrados por filtros de 0,2 µm (Isopore GTTP). Dichos filtros se guardaron en crioviales a -80°C hasta su procesamiento. La extracción de ADN se

realizó a partir del material retenido en los filtros de 0,2 µm y se aplicó un protocolo de extracción en base al detergente catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio CTAB, cloroformo e isoamil alcohol (Fernández Zenoff *et al.*, 2006; Llames *et al.*, 2009).

7.2 OBTENCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO DE LA COMUNIDAD BACTERIANA POR EL MÉTODO DGGE

7.2.1 AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DE LOS FRAGMENTOS CORRESPONDIENTES AL GEN ARNr 16S

El ADN extraído fue amplificado mediante el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (*Touchdown*-PCR) en la sección que codifica para el gen del ARNr 16S. Se utilizó un set *primers* específicos previamente diseñados por Muyzer *et al.* (1993, 1995). Se generaron fragmentos de unos 540 pb aproximadamente, equivalentes a las posiciones 358-907 en las regiones variables V3-V5 del ADNr 16S de *Escherichia coli*. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 50 µl. Cada mezcla de PCR contuvo 1 µl de ADN extraído, 1 µl de mezcla de desoxirribonucleótidos (10 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl de buffer PCR (Invitrogen), 2,5 µl de cada primer (10 µM), 0,25 µl (5 U µl⁻¹) de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen) y 36,25 µl de agua MiliQ autoclavada. La secuencia del termociclador (BioRad) para fragmentos bacterianos de 540 pb se inició con un paso de precalentamiento por 5 minutos a 94°C, seguido por 10 ciclos que consistieron en: desnaturalización a 94°C por 1 minuto; hibridización a 65°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 3 minutos. Durante estos 10 ciclos, la temperatura de hibridización disminuyó en 1°C por ciclo hasta alcanzar la temperatura final de 55°C (ciclos *touchdown*). Luego de estos 10 ciclos, se realizaron 20 ciclos más que consistieron en: desnaturalización a 94°C por 1 minuto; hibridización a 55°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 3 minutos. Finalmente, se realizó un ciclo final de elongación a 72°C por 10 minutos.

7.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE

Los productos de amplificación de la PCR fueron separados en geles con gradientes desnaturizantes mediante un equipo DGGE-2000 (CBS Scientific Company). La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (relación acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) al 6% sumergidos en la solución reguladora TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 7,5) a una concentración final de 1X y a una temperatura de 60°C. Se sembraron en cada calle del gel aproximadamente 800 ng del producto de amplificación

de las muestras ambientales y la corrida se realizó a 100 voltios durante 16 horas en un gradiente lineal de desnaturalización 40-80%, de acuerdo con lo descrito previamente para comunidades bacterianas (Muyzer *et al.*, 1997; Schauer *et al.*, 2003). Una muestra similar fue corrida como referencia para poder comparar los geles entre sí e identificar las bandas en común. Luego de la electroforesis, los geles fueron teñidos con el fluorocromo específico de ácidos nucleicos Syber Gold (*Molecular Probes, Invitrogen*) y visualizados bajo luz ultravioleta utilizando un transiluminador conectado a una computadora.

Las imágenes digitalizadas de los geles fueron analizadas con el programa TotalLab TL120 (*Nonlinear Dynamics*), que permitió generar perfiles de densidad en cada calle, detectar bandas y calcular la contribución relativa de cada banda respecto de la señal total de cada calle. Una banda se definió como tal cuando su intensidad fue superior o igual a 0,2% del total de la intensidad en cada calle (ej.: Reche *et al.*, 2005). Las bandas ubicadas en la misma posición en el gel fueron detectadas automáticamente por el software y posteriormente se realizó la inspección visual del alineamiento de bandas de manera tal de corregir algún error que pudiera haberse cometido con el alineamiento automático.

7.3 SECUENCIACIÓN MASIVA

La secuenciación fue realizada mediante secuenciador Illumina MiSeq (2x300pb) en *Macrogen Inc.* Los *primers* utilizados fueron equivalentes a las posiciones 341-805 (Herlemann *et al.*, 2011) del ADNr 16S, correspondientes las regiones variables V3-V5. Los mismos generaron fragmentos con un tamaño de 464 pb.

8. ANÁLISIS DE LOS DATOS

8.1 ANÁLISIS DE VARIACIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL DE LAS VARIABLES AMBIENTALES

Se realizaron correlaciones entre las distintas variables ambientales, empleando el coeficiente de Spearman's (r).

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con la matriz de variables ambientales estandarizadas (Ramette, 2007) para observar la distribución de las lagunas seleccionadas según sus características físicas y químicas. Previo a este último análisis se eliminaron aquellas variables con datos faltantes o altamente correlacionadas.

8.2 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA COMUNITARIA DEL BACTERIOPLANCTON

8.2.1 ANÁLISIS POR DGGE

Se obtuvo el perfil genético de la comunidad bacteriana para cada laguna, a lo largo de un año de estudio. Este perfil, consistió en un patrón de bandas donde cada banda fue considerada como una Unidad Taxonómica Operativa (OTU). Una vez finalizado el análisis de las imágenes de los geles de DGGE, se generó una matriz basada en la presencia-ausencia de bandas en cada calle (matriz cualitativa). Esta técnica permitió llevar a cabo un análisis exploratorio inicial para estudiar el patrón comunitario del bacterioplancton.

8.2.2 ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN MASIVA

8.2.2.1 PROCESAMIENTO DE SECUENCIAS

El procesamiento de las secuencias fue realizado con la colaboración de la Dra. Paula Huber quien siguió el protocolo elaborado por el Dr. Ramiro Logares (<https://github.com/ramalok>). Para este análisis se empleó el Cluster Pirayu de CIMEC, Santa Fe. El protocolo se puede resumir en los siguientes pasos: (I) corrección de errores de secuenciación propios de la plataforma utilizada para la secuenciación; (II) ensamblado de las secuencias *forward* y *reverse*; (III) control de calidad; (IV) derreplicación; (V) definición de OTUs; (VI) detección y eliminación de quimeras; (VII) conformación de la tabla de OTUs y (VIII) asignación taxonómica.

Los detalles de cada paso se describen a continuación:

- I. Corrección de errores con BAYER HAMMER: este paso se realizó para corregir errores de sustitución (Medvedev *et al.*, 2011); tiene en cuenta los valores de calidad de las lecturas o *reads* e introduce sanciones bayesianas. Es importante aclarar que durante este paso las secuencias con errores de secuenciación se corrigen, no se eliminan. Este análisis se realizó con el comando '--only-error-correction' del programa SPAdes v3.5.0 (Nurk *et al.*, 2013).
- II. Ensamblado de las secuencias *forward* (R1) y *reverse* (R2): el ensamblado de las secuencias R1 y R2 se realizó con el programa PEAR v0.9.8 (Zhang *et al.*, 2014) utilizando como archivos de entradas (*corrected aile.gz) aquellos obtenidos del paso anterior. Para el ensamble se consideraron solo aquellas secuencias con un tamaño mayor a 200 pb y se estableció una longitud mínima de solapamiento de 20 pb. Para el resto de los parámetros se usaron los valores predeterminados.

- III. Control de calidad: durante este paso se realizó un filtrado por calidad, la simplificación del nombre de cada secuencia, corrección de la dirección de las *reads* (5'-3'), generando un archivo FASTA con las secuencias de todas las muestras. El control de calidad fue realizado con el comando '-fastq_filter' del programa USEARCH (Edgar, 2010). Se eliminaron aquellas secuencias con un error esperado mayor a 3,5 (según el *Q score*) y con una longitud menor a 150 pb. La dirección de las secuencias se corrigió utilizando HMM (modelo de cadena de Markov) y como gen marcador el 16S ARNr, con perfiles de bacterias.
- IV. Derreplicación: durante este paso se agrupan las secuencias que son 100% iguales en tamaño y composición nucleotídica. El objetivo de este paso es simplificar el set de datos y dar importancia a las lecturas (*reads*) de acuerdo a su abundancia. Las *reads* más abundantes tendrán más peso durante el agrupamiento. Este paso se realizó con la función '-derep_fulllength' del programa USEARCH (Edgar, 2010). Luego de la derreplicación, las secuencias se ordenaron por abundancia utilizando la función '-sortbysize' del programa USEARCH (Edgar, 2010). Durante este paso pueden ser eliminadas las secuencias únicas (*singletons*) indicando un valor de 2 a la función '-minsize'. En este trabajo estas secuencias fueron eliminadas de forma manual en pasos posteriores, por lo tanto a la función '-minsize' se le indicó un valor de 1. Como resultado se obtuvo un archivo FASTA que fue utilizado en el siguiente paso.
- V. Definición de OTUs: este paso tiene como objetivo agrupar las *reads* de acuerdo a la similitud en sus secuencias para definir las OTUs. En este trabajo, se definió como OTU a aquel *cluster* de secuencias agrupadas al 97% de similitud utilizando el programa UPARSE (Edgar, 2013). Como resultado se obtiene un archivo FASTA con las secuencias de las OTUs determinadas durante el agrupamiento.
- VI. Detección y eliminación de quimeras: en este paso se eliminan las quimeras del FASTA obtenido del paso anterior utilizando la función 'uchime_ref' del programa USEARCH (Edgar, 2010). Se utilizó como referencia la base de datos SILVA (<https://www.arb-silva.de/>): SILVA_123_SSURef_Nr99
- VII. Conformación de la tabla de OTUs: para la construcción de la tabla de abundancia de OTUs se realizó previamente el mapeo de las secuencias, combinando la información de los archivos obtenidos en los pasos III y VI. Este análisis se realizó utilizando la función '-usearch_global' de USEARCH (Edgar, 2010). Cada secuencia de entrada (archivo del

paso III) se asigna a un grupo según su porcentaje de identidad (en este caso 97%) con la secuencia referencia (archivo del paso VI). Si la secuencia de entrada pudo ser asignada se la identifica con la letra H, en caso contrario, si la secuencia no es asignada a ningún grupo se le asigna la letra N. En este paso los criterios utilizados fueron: ‘-maxaccepts’ 20 y ‘-maxrejects’ 2000. Como resultado se obtiene un archivo con formato de *cluster* (extensión por convención .UC) que es un archivo de texto separado con tabulaciones. Si una secuencia de entrada puede ser asignada, en el archivo.uc se va a mostrar información sobre: grupo al cual fue asignada, alineación y % de identidad calculado a partir de la alineación. Estos campos se completan con un asterisco (*) en aquellas secuencias entradas que no fueron asignadas a un grupo. Para la conformación de la tabla de OTUs se utilizó el script ‘uc2otutab.py’ de Python (Team, 2015). Este comando permite convertir archivos.uc en un archivo .txt separado por tabulaciones el cual tiene la información de abundancia de cada OTU en las diferentes muestras.

VIII. Asignación taxonómica: la asignación taxonómica se realizó mediante análisis de nucleótido BLASTN empleando la base de datos SILVA119 Ref_Nr95 utilizando el programa BLAST (Edgar, 2010)

Se construyeron curvas colectoras de OTUs para cada ambiente, para evaluar el “esfuerzo de muestreo” y por lo tanto saber si el número de secuencias obtenidas representa una fracción significativa o no de las muestras ambientales analizadas en este trabajo. Para esto se utilizó la función ‘rarefy’ del paquete Vegan (Oksanen *et al.*, 2017) del programa R (Team, 2016).

Se generaron dos matrices, una basada en la presencia-ausencia OTUs en cada sitio (matriz cualitativa) y otra basada en la abundancia relativa de OTUs (número de lecturas por sitio) (matriz cuantitativa). Estas matrices se exportaron a una planilla de EXCEL (Microsoft) para continuar con el análisis numérico de los datos.

8.2.3 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA COMUNITARIA

Para comparar entre lagunas y realizar los análisis de diversidad evitando sesgos por esfuerzo de muestreo, se realizó un submuestreo aleatorio en cada una de las muestras obtenidas por Illumina MiSeq en base a la muestra de menor número de lecturas o *reads* (rarefacción).

Se consideró al porcentaje de abundancia de las OTUs totales de la matriz de datos rarefaccionada obtenida a partir de secuenciación masiva. Por otro lado, se definieron como OTUs abundantes a aquellos taxones que presentaron un porcentaje $\geq 1\%$ del número total de OTUs. Por otro lado, se consideraron también OTUs poco comunes a aquellas que se encontraban en un porcentaje $>0,1\%$ y $<1\%$ y OTUs raras a aquellas que se hallaban en un porcentaje $\leq 0,1\%$. La justificación por el uso de estos valores umbrales es arbitraria y está basada en niveles de corte sugerido por otros autores (Pedrós-Alió, 2006; Fuhrman, 2009; Schiaffino *et al.*, 2016; Llames *et al.*, 2017).

Para DGGE la riqueza o número de OTUs se obtuvo a partir de la matriz cualitativa (presencia-ausencia), teniendo en cuenta el número total de bandas en cada calle del gel (cada muestra). Para la matriz rarefaccionada obtenida mediante secuenciación masiva, la riqueza de OTUs (taxones) se obtuvo a partir de la matriz cualitativa (presencia-ausencia) considerando las OTUs totales, OTUs abundantes, poco comunes y raras.

Sobre la matriz biológica rarefaccionada de abundancia relativa de OTUs totales (secuenciación masiva), se realizó la transformación de Hellinger (Legendre y Gallagher, 2001; Ramette, 2007). Con los datos transformados se realizaron los análisis posteriores.

Se utilizaron índices de similitud asimétricos, es decir, índices que no consideran a la doble ausencia de OTUs en el cálculo. Como índice cualitativo (basado en la matriz de presencia-ausencia) se estimó el coeficiente de similitud de Jaccard ($S(j)$) y como índice cuantitativo (basado en las matrices con el número de lecturas) se estimó el coeficiente de similitud de Bray-Curtis (Legendre y Legendre, 1998). Los patrones de similitud obtenidos a partir de la matriz obtenida por Illumina MiSeq fueron analizados a través de un análisis de escalamiento multidimensional no-métrico (NMDS: *Non-Metric Multidimensional Scaling*). El grado de ajuste entre la representación en un espacio de baja dimensión y la matriz original fue determinado utilizando el índice de stress de Kruskal (Legendre y Legendre, 1998):

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

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

Para poner a prueba la significación de los grupos generados a partir del escalamiento multidimensional, se realizaron análisis de similitud (ANOSIM) (Clarke y Green, 1988) basados en los grupos obtenidos a partir del perfil generado. El test ANOSIM genera un estadístico (R) y la magnitud de este estadístico indica el grado de similitud entre grupos. Un valor de 1 indica completa similitud de los grupos mientras que un valor de 0 indica no similitud de los mismos.

8.2.4 ANÁLISIS DE RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA COMUNITARIA Y LAS VARIABLES AMBIENTALES

Sobre la matriz biológica transformada (Hellinger) de abundancia relativa de OTUs totales (secuenciación masiva), se realizaron análisis de Mantel (simple y parcial) basados en el coeficiente de correlación de Spearman (r). Los tests Parciales de Mantel se llevaron a cabo para comparar las tres matrices de interés: matriz de similitud biológica, matriz de similitud ambiental y matriz de distancia geográfica (Smouse *et al.*, 1986). Esta metodología permite estimar la correlación entre dos matrices, controlando los efectos de la tercera matriz (r (AB.C)). Por ejemplo, los resultados presentados en la forma “Biológico-Ambiental (Geográfico)” deben interpretarse como la correlación entre la matriz de similitud genética y la de similitud ambiental, luego de remover los efectos de la distancia geográfica. En cambio, el test de Mantel simple se realizó para comparar la matriz de similitud ambiental y la matriz de distancia geográfica, sin tener en cuenta el control de los efectos de una tercera.

Con el objetivo de estudiar cuál o cuáles variables ambientales tenían una mayor influencia en el modelado de la estructura de las comunidades bacterioplanctónicas se llevaron a cabo análisis de redundancia (RDA: *Redundance Analysis*) (Legendre y Legendre, 1998). Para este análisis, se empleó la matriz ambiental estandarizada y la matriz biológica transformada de abundancia relativa de OTUs totales (secuenciación masiva). En primer término, se determinó la significancia de los modelos obtenidos mediante el Test de Monte Carlo. Luego, a través de “*forward selection*” se seleccionaron las variables significativas para, de esta manera, reducir el número de variables explicativas mientras se mantiene al máximo porcentaje de la variancia explicada.

8.2.5 ANÁLISIS DE MEDIAS

Para la comparación de medias de las variables ambientales y de la riqueza de OTUs se llevó a cabo el test no paramétrico Mann-Whitney aplicado a dos muestras independientes ($\alpha=0,05$).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software de código abierto R (Team, 2016), Past 3.0 (Hammer et al., 2001) y CANOCO (ter Braak, 1991).

RESULTADOS

9. ANÁLISIS DE VARIACIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL DE LAS VARIABLES AMBIENTALES

En la **Tabla 3** se muestran los resultados de las variables ambientales correspondientes a las lagunas estudiadas en el presente trabajo.

Tabla 3. *Parámetros físicos, químicos y biológicos (Clorofila-a) medido en las 4 lagunas pampeanas.*

	Gómez				Carpincho				Chascomús				El Triunfo			
	Media	DE	Máx	Mín	Media	DE	Máx	Mín	Media	DE	Máx	Mín	Media	DE	Máx	Mín
Precipitaciones (mm)	119,4	44	186,2	72	119,4	44	186,2	72	114,8	89	213,8	0,0	114,8	89	213,8	0,0
Nivel Hídrico (m)	1,4	0,1	1,6	1,3	1,4	0,1	1,5	1,3	1,4	0,3	1,7	0,9	1,1	0,6	1,1	1
Secchi (cm)	14,4	3,3	18	9	13,9	2,9	18	10	11,6	4	16	6	26,4	5	34	20
Temperatura H ₂ O (°C)	19,3	6,2	26	9,2	18,5	6	25,2	8,9	19,1	5,6	24,3	11	21,2	7,1	27	9
OD (ppm)	8,3	3,8	9,3	7,2	7,3	0,7	8,4	6,5	10	1,4	11,7	8,5	9	2,2	12,6	7
pH	8,9	0,2	9,1	8,6	8,9	0,2	9,1	8,6	8,7	0,2	9	8,5	8,3	0,4	8,7	7,7
Conductividad (µS/cm)	3944	879,1	4860	2630	3864	879,1	4590	2670	945,7	157,1	1126,7	776,7	1462,4	206,6	1700	1230
Turbidez (ntu)	112,2	65,1	225	62	93,8	35	152	60	149,4	87,6	235	52,6	15,4	9,7	24,7	2
Seston (mg/L)	136,4	71	257	71	111,6	41	167	65	167,8	85,3	252,5	70	26,2	11,7	41	12
PSLC (MO) (mg/L)	44,4	18,6	75	28	39,6	14,2	55	21	42,2	8,5	48,8	28,7	25,3	12,9	41	9
MI (mg/L)	92	53,1	182	43	72	28,1	115	44	125,6	77,5	203,7	41,3	0,9	1,3	3	0,0
Fósforo Total (mg/L)	0,8	0,2	1,1	0,6	0,7	0,3	1,1	0,4	0,5	0,2	0,6	0,3	0,3	0,3	0,6	0,0
Fósforo Soluble (mg/L)	0,5	0,4	0,9	0,2	0,5	0,2	0,7	0,3	0,2	0,1	0,3	0,0	0,2	0,2	0,5	0,0
Nitrógeno Total (mg/L)	4,2	0,9	5,2	2,9	4,7	1,2	6,7	3,7	4,3	0,6	5	3,7	5,6	1,8	7,8	3,9
Clorofila-a (µg/L)	124,1	96,8	293,9	54,4	136,4	90,9	293,9	63,1	80,1	32,6	124	43	23,3	10,1	39,2	15,2

OD Oxígeno Disuelto, PSLC (MO) Peso Seco Libre de Cenizas (Materia Orgánica), MI Materia Inorgánica. DE desvío estándar, Máx máximos, Mín mínimos, N=5.

En las cuatro lagunas, la temperatura del agua siguió la tendencia estacional, presentando los valores mínimos en invierno y los máximos en verano, mientras que el OD mostró un patrón de variación inverso (máximos en invierno y mínimos en verano) (**Figura 9**). Los valores de pH y conductividad registrados resultaron dentro del rango típico para las lagunas de la región. En particular, tanto los valores medios de conductividad

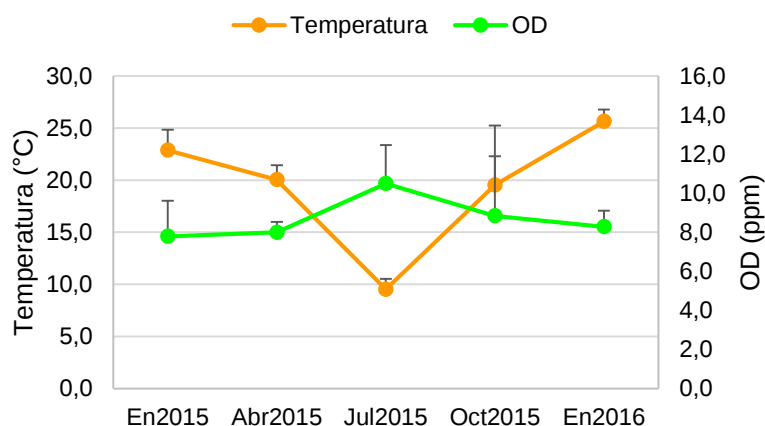


Figura 9. Gráfico de líneas: representación temporal de la temperatura y OD. Se utilizó la media general de cada variable para cada fecha de muestreo.

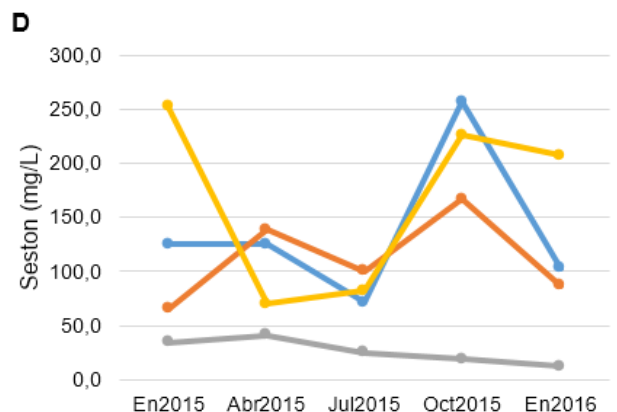
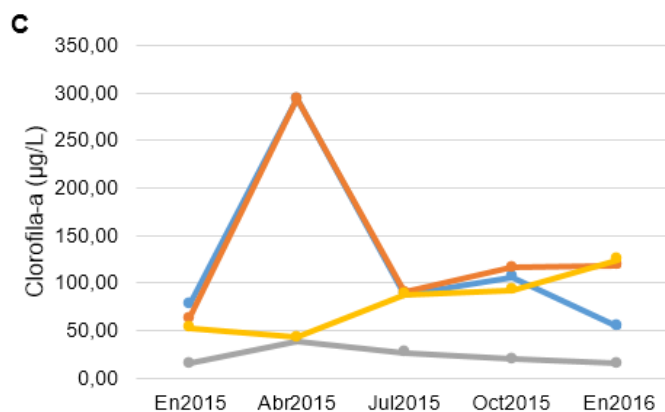
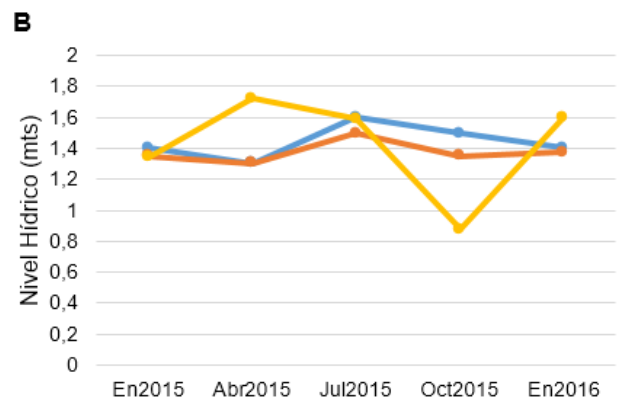
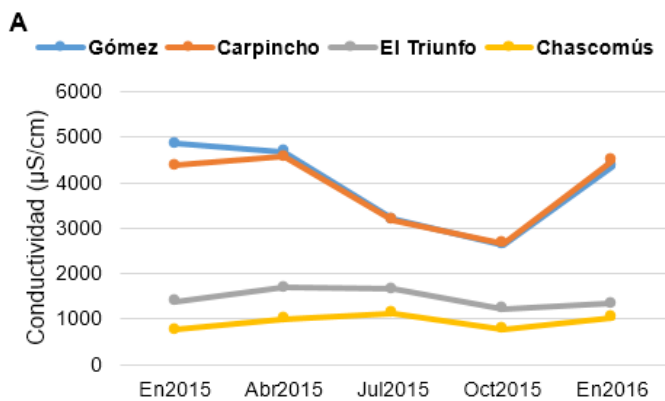
como los de pH fueron significativamente mayores ($p=0,005$ y $p<0,001$, respectivamente) en las lagunas de la cuenca alta en comparación con los de las lagunas de la cuenca baja (**Tabla 3**). Además, ambos parámetros (pH y conductividad) se correlacionaron significativamente ($r=0,61$; $p=0,0004$; $N=20$). La turbidez, la profundidad del disco de Secchi, los SS y la Chla reflejaron el estado de equilibrio que caracteriza a cada laguna (**Tabla 3**) y se correlacionaron significativamente (**Tabla 4**). El régimen claro de la laguna El Triunfo se vio reflejado en los bajos valores de turbidez y mayor transparencia (mayor profundidad del disco de Secchi), mientras que el régimen turbio fitoplanctónico de Gómez, Carpincho y Chascomús se evidenció por una menor profundidad del disco de Secchi, valores altos de turbidez y elevada concentración de Chla. En cuanto a las características de El Triunfo, los valores registrados para las variables citadas fueron inversos en relación a las otras lagunas (Gómez, Carpincho y Chascomús), aumentando su transparencia hacia finales del período (**Figura 10F**).

La conductividad mostró una gran sincronización entre lagunas pertenecientes a la misma cuenca (**Figura 10A**). El nivel hídrico también mostró sincronización para las lagunas de la cuenca alta y este patrón de variación fue opuesto para la laguna Chascomús (**Figura 10B**). Los SS y la turbidez mostraron una mayor sincronización entre las lagunas de la cuenca alta y, a su vez, esta fue similar a Chascomús, no así para el Triunfo (**Figura 10D y E**). Este mismo patrón de variación, aunque inverso, se observó para la variable Secchi (**Figura 10F**). Por último, para la variable Chla se observó, como en los casos

anteriores, una gran sincronización para las lagunas de la cuenca alta, no así para las lagunas pertenecientes a la cuenca baja (**Figura 10C**). Los valores medios de Chla de las lagunas de la cuenca alta fueron significativamente mayores que los de la cuenca baja ($p=0,01$) (**Tabla 3**).

Tabla 4. Correlaciones de Spearman entre profundidad del disco de Secchi, turbidez, seston (SS) y Clorofila-a (Chla). Derecha de la diagonal: valores de significancia. Izquierda: los coeficientes de correlación. (N=20).

	Secchi	Turbidez	Seston	Clorofila a
Secchi		$p<0,0001$	$p<0,0001$	0,0003
Turbidez	-0,90		$p<0,0001$	0,0003
Seston	-0,91	0,96		0,0002
Clorofila a	-0,72	0,72	0,73	



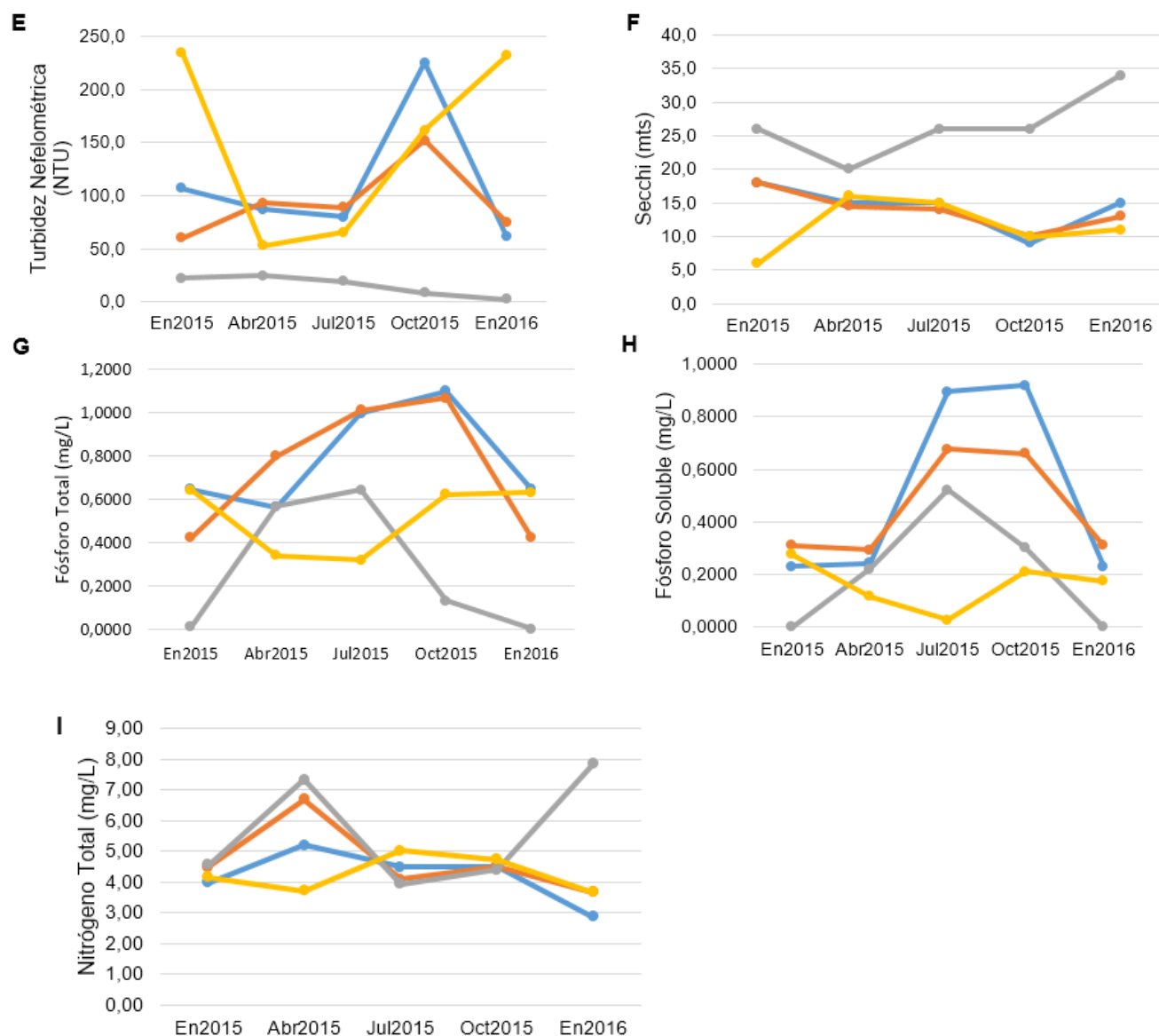


Figura 10. Gráfico de líneas: representación temporal de las variables físico-químicas y biológicas para el período de estudio (2015 a 2016). B: para la laguna El Triunfo no hubo dato disponible sobre el nivel hídrico.

La concentración de PT y PRS varió significativamente entre cuencas (**Figura 11**), con los mayores valores medios registrados en las lagunas de la cuenca alta. PT se correlacionó positivamente con Chla ($r= 0,51$; $p=0,02$; $N=20$) y PRS no correlacionó con ninguna variable ambiental. La variación temporal del PT (**Figura 10G**) fue sincronizada entre las lagunas de la cuenca alta donde el aumento de este nutriente fue progresivo desde inicio del estudio con un pico máximo en octubre que coincidió con el aumento de las precipitaciones para la época (**Figura 12**). Un comportamiento opuesto se observó para las

lagunas de la cuenca baja. La variación temporal del PRS fue la misma que para el PT (Figura 10H).

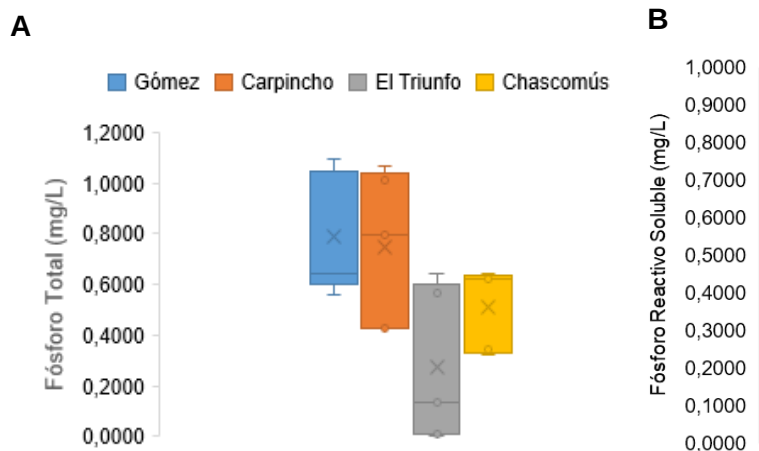


Figura 11. Diagrama de cajas. A: concentración de fósforo total para los cuatro sitios. La media entre cuenca alta (Gómez-Carpincho) y cuenca baja (Chascomús-El Triunfo) fue significativamente diferente ($p=0,009$). B: concentración de fósforo reactivo soluble para los cuatro sitios. La media entre cuenca alta (Gómez-Carpincho) y cuenca baja (Chascomús-El Triunfo) fue significativamente diferente ($p=0,005$).

Con respecto al NT, no se observaron diferencias entre cuencas o lagunas. Durante el período de muestreo se observó que la concentración del mismo varió casi de manera similar entre los cuatro sistemas aunque, en enero de 2016, la concentración de este nutriente aumentó para El Triunfo, al contrario de lo sucedido para las demás lagunas (Figura 10I).

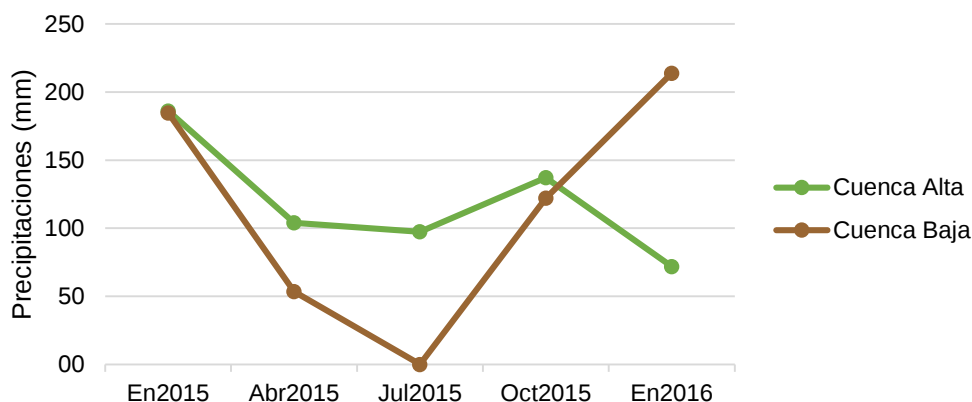


Figura 12. Gráfico de línea de las precipitaciones mensuales en cada cuenca a lo largo del período de estudio.

La **Figura 13** muestra los valores de SS promedio por sitio, diferenciando el contenido de materia orgánica (PSLC) e inorgánica (MI). Los resultados evidenciaron una marcada diferencia entre las lagunas Gómez, Carpincho y Chascomús, con respecto a El Triunfo. Los resultados indican la presencia de una gran cantidad de componente orgánico en el material particulado en suspensión (MI= 0,9 mg/L) en comparación a las demás. En los tres cuerpos restantes, la materia inorgánica se encontró en mayor proporción respecto a la materia orgánica de cada sistema.

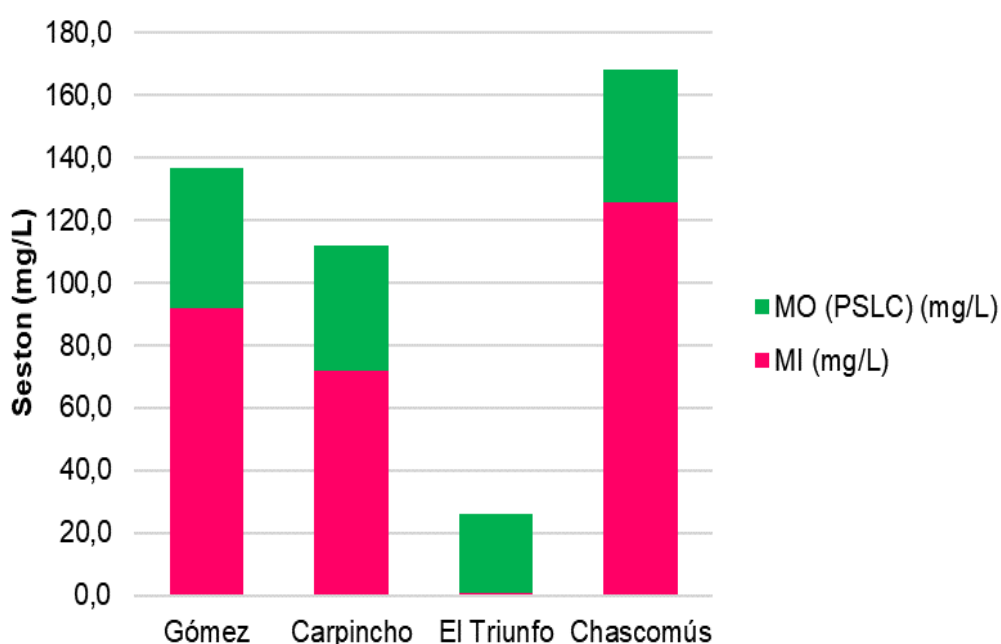


Figura 13. Gráfico de barras apiladas. Cada barra corresponde a la concentración del promedio mensual de seston o sólidos en suspensión por sitio. El seston está conformado por la materia orgánica (PSLC) y materia inorgánica (MI) en suspensión.

A partir de las concentraciones de Chla, PT y los valores de Secchi, se calculó el Índice Trófico para determinar en qué estado de trofismo se mantuvieron cada una de las lagunas durante el período del estudio (enero 2015 – enero 2016). Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Índice Trófico y Estado Trófico de las lagunas estudiadas.

	Índice Trófico	Estado Trófico
Gómez	88,7	Hipereutrófica
Carpincho	88,9	Hipereutrófica
El Triunfo	75,2	Hipereutrófica
Chascomús	86,2	Hipereutrófica

En resumen, se observó que la laguna Chascomús presentó niveles de Chla, SS, turbidez y Secchi similares a los de las lagunas de la cuenca alta (Gómez y Carpincho). Por otro lado, con respecto a los nutrientes, se observaron diferencias marcadas de PT y PRS (en mayor concentración en los sistemas de la cuenca superior) y menos marcadas de NT entre cuencas.

9.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

El ACP permitió dar un ordenamiento general de los sistemas estudiados teniendo en cuenta las variables limnológicas seleccionadas (**Figura 14**). Este análisis se realizó excluyendo la variable nivel hídrico ya que había datos faltantes. Además, se quitaron las variables SS, Secchi y PSLC debido a que ambas presentaron una alta correlación con la turbidez ($r= 0,96$; $r=-0,90$; $r= 0,96$ respectivamente y todos $p<0,0001$ y $N= 20$). Para el fósforo solo se tuvo en cuenta la variable fósforo total. Solamente las primeras dos componentes (CP1 y CP2) fueron elegidas para el análisis, ya que explicaron un 64,5% de la variabilidad total de los datos. La componente 1 (CP1) explicó el 41,0% de la variabilidad y la componente 2 (CP2) explicó un 23,5% (**Figura 14**). Las variables que presentaron mayores correlaciones con las componentes se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Correlación de las variables físicas, químicas y biológicas, empleadas en el ACP, para cada componente principal (CP).

	CP1 (r)	CP 2 (r)
pH	0,52	0,03
Conductividad	0,42	-0,43
Turbidez	0,31	0,50
PT	0,42	0,29
NT	-0,24	-0,39
Chl-a	0,40	-0,20
OD	-0,23	0,53

De acuerdo al biplot obtenido (**Figura 14**), se observó que, en general, hacia valores positivos de CP1 (derecha del biplot) se ordenaron las lagunas de la cuenca alta del Río Salado (excepto Chascomús enero 2016, ChEnero2016), junto con mayores valores de pH, conductividad, PT y Chla. En cambio, para valores negativos de CP1 (izquierda del biplot), se ordenaron las muestras correspondientes a las lagunas de la cuenca baja, junto con mayores valores de NT y menores valores de pH, conductividad, PT y Chla. Asimismo, hacia valores positivos de la CP2 (parte superior del biplot) se ordenaron las muestras correspondientes a las lagunas de ambas cuencas con mayores valores de turbidez y OD.

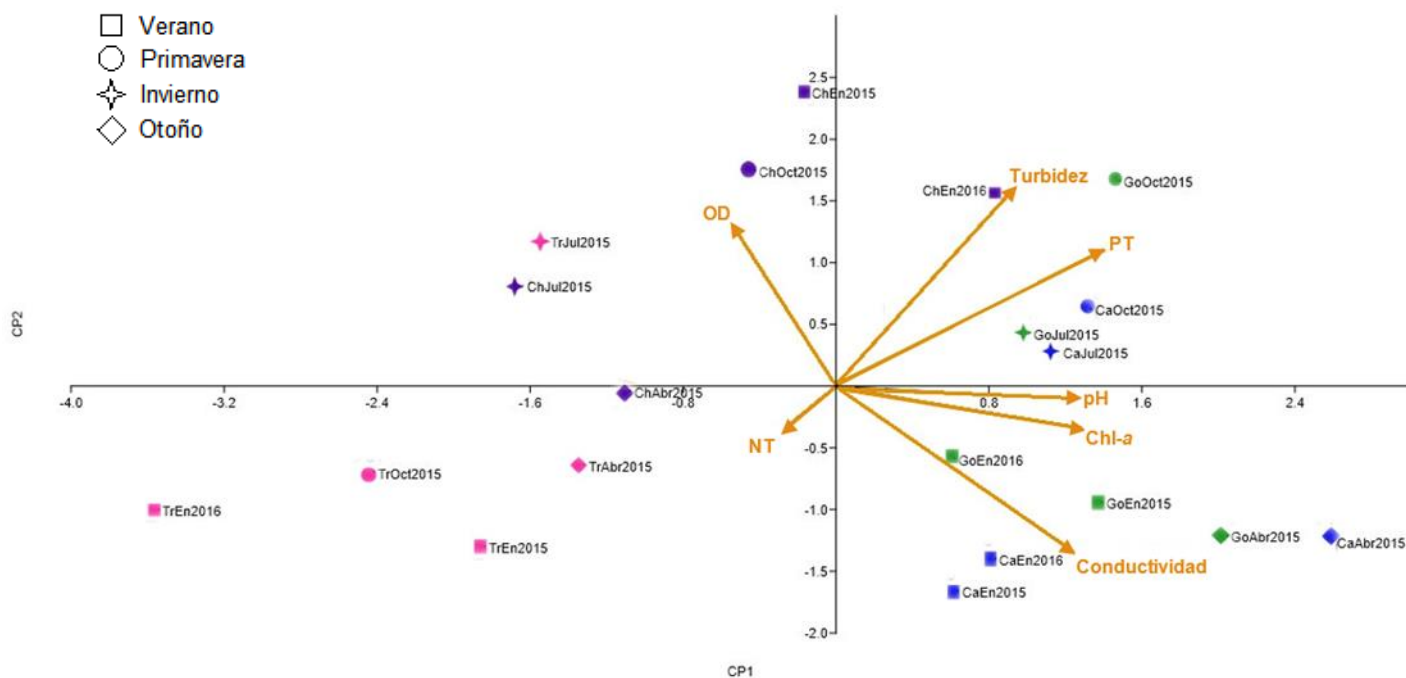


Figura 14. Análisis de Componentes Principales (ACP) con las variables físicas, químicas y biológicas.

10. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA COMUNITARIA DEL BACTERIOPLANCTON

10.1 ANÁLISIS POR DGGE

10.1.2 ANÁLISIS DE LA RIQUEZA DE OTUS DOMINANTES

La **Figura 15** muestra el perfil genético obtenido para Gómez, Carpincho, Chascomús y El Triunfo en cada fecha de muestreo. Se analizaron un total de 20 muestras, aunque la muestra correspondiente a Gómez octubre 2015 (GoOct2015) no dio un patrón de bandas definido, por lo que se quitó esa muestra del análisis.

En total se observaron 442 bandas ubicadas en 72 posiciones diferentes. El número de banda por sitio varió de 12 a 39. Se observó una buena correlación entre la conductividad y la riqueza de bandas para cada sitio y fecha de muestreo ($r = -0,65$; $p = 0,002$; $N = 19$). En cuanto a la riqueza, se observó que la cuenca baja presentó un número significativamente mayor de bandas (promedio= 27, rango: 20-39 bandas) respecto de la cuenca alta (promedio=19, rango: 15-32) ($p = 0,006$). Gómez fue la laguna que presentó una menor riqueza de bandas (14); mientras que Chascomús fue quien presentó la riqueza mayor (29 bandas) durante el año de estudio. (**Figura 16A y B**).

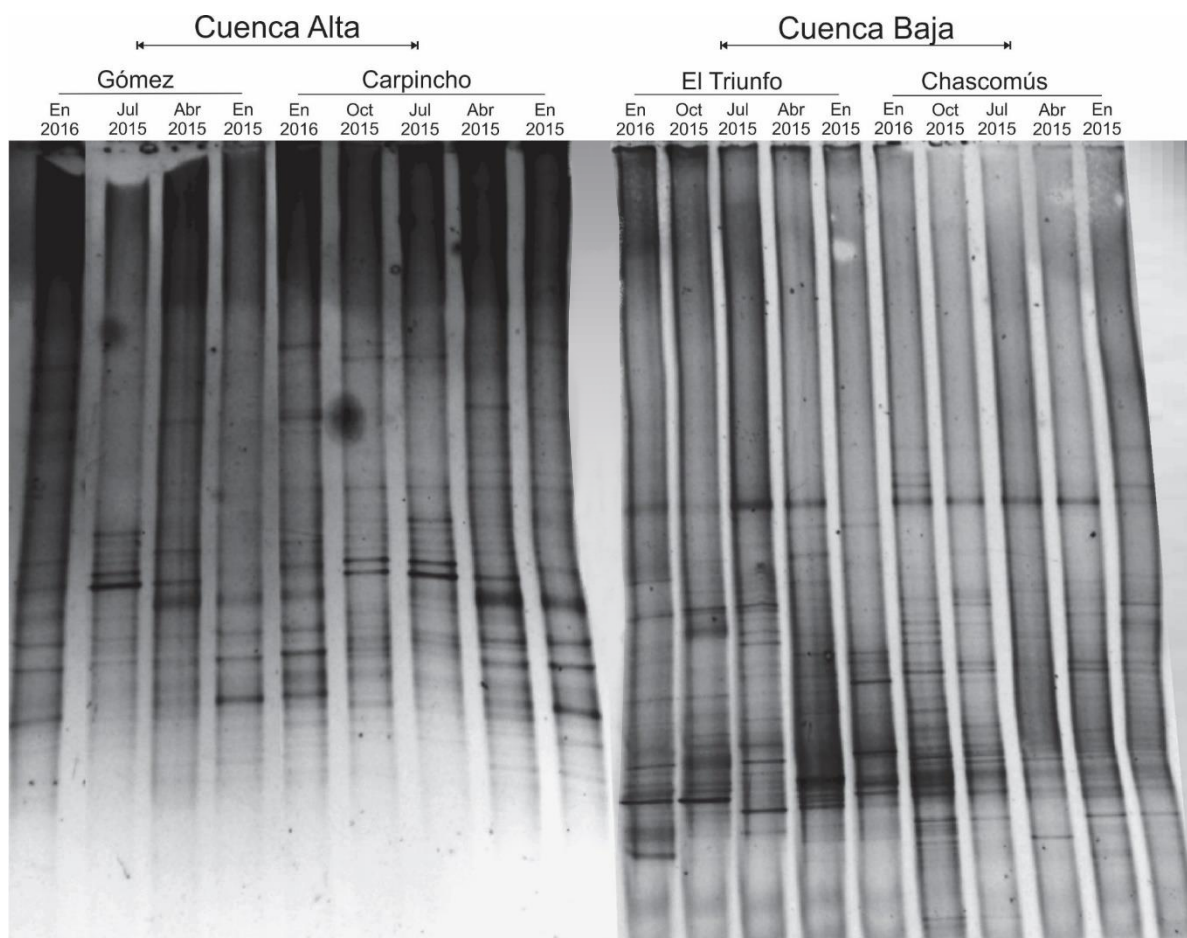


Figura 15. Perfil genético obtenido a partir de la técnica de fingerprinting (DGGE).

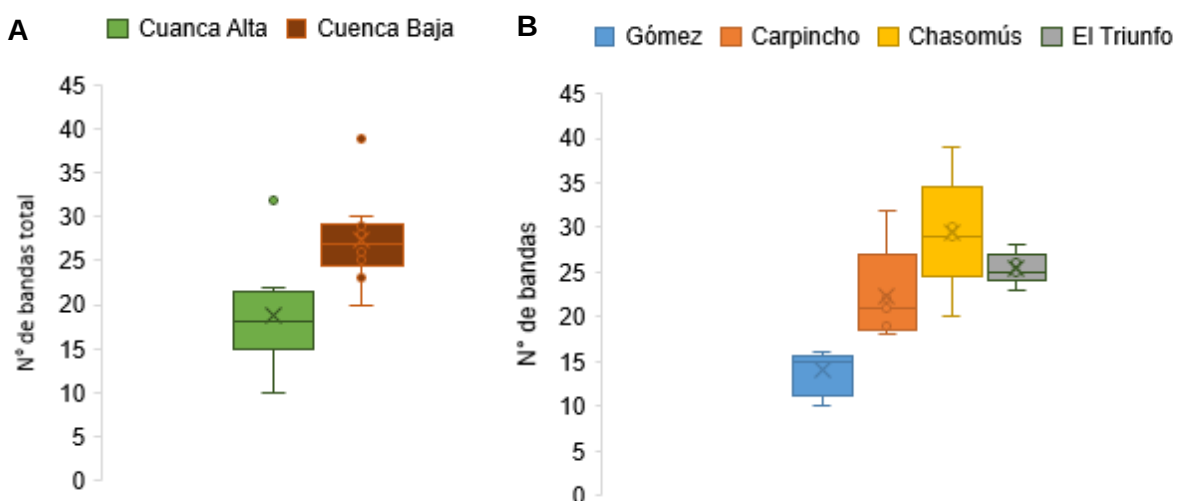


Figura 16. Diagramas de cajas correspondientes al número de bandas de DGGE entre cuencas (A) y entre sitios (B). El Triunfo-Chascomús, $p = 0,14$; Carpincho-El Triunfo, $p = 0,14$; Gómez-El Triunfo, $p = 0,01$; Gómez-Chascomús, $p = 0,01$; Carpincho-Chascomús, $p = 0,2$; Gómez-Carpincho, $p = 0,01$.

10.1.3 DIAGRAMA DE VENN

El gráfico de Venn (**Figura 17**) muestra la distribución de OTUs entre lagunas y cuencas. El 25% de las bandas (OTUs dominantes) se registraron en los cuatro sistemas. Por otro lado, el 19% de bandas registradas fueron exclusivas de la cuenca baja y el 7% de la cuenca alta. Una única banda fue exclusiva de Gómez, el 7% de bandas fueron exclusivas de la laguna Carpincho, el 3% de El Triunfo y el 7% de Chascomús.

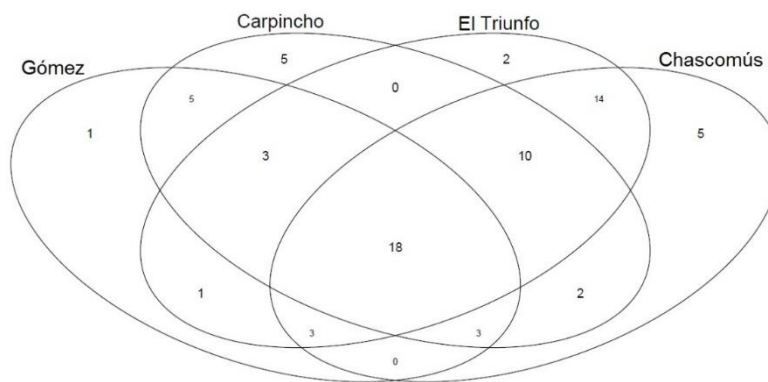


Figura 17. Diagramas de Venn para las 4 lagunas: OTUs dominantes (número de bandas) obtenidas por DGGE.

10.2 ANÁLISIS POR ILLUMINA MISEQ

10.2.1 ANÁLISIS DE LA RIQUEZA DE OTUs TOTALES

La riqueza total fue de 4021 OTUs, con un rango de 564 a 1335 OTUs, teniendo en cuenta las cuatro lagunas en su conjunto. La curva colectora (**Figura 18**) mostró que para las distintas lagunas la riqueza de OTUs se acercó a la meseta, sugiriendo que la secuenciación tendió a capturar la riqueza total del bacterioplancton presente en cada sistema.

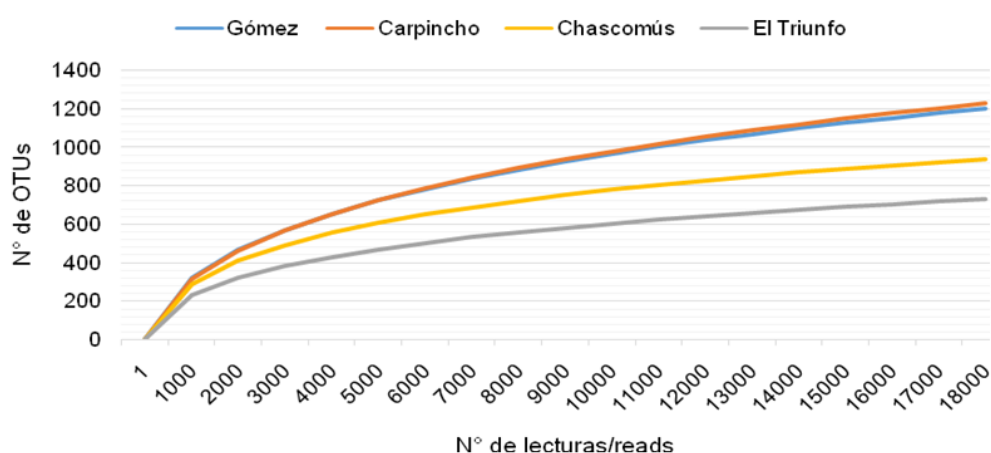


Figura 18. Curva colectora para cada laguna estudiada.

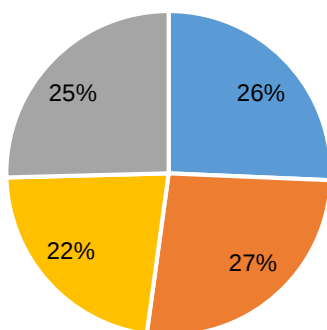
La riqueza de OTUs se muestra en la **Tabla 7**. En la **Figura 19** se representan, mediante gráficos de tortas, los porcentajes de OTUs pertenecientes a los taxones abundantes, poco comunes y raros, para los cuatro sistemas, así como también entre cuencas. Al considerar la riqueza de OTUs totales obtenidos por Illumina MiSeq, se observó una mayor riqueza de OTUs en las lagunas de la cuenca alta y una menor riqueza en las de la cuenca baja (**Tabla 7**). Chascomús fue la laguna que presentó una menor riqueza de OTUs, en cambio, Carpincho fue quien presentó un mayor número de OTUs totales (**Tabla 7** y **Figura 20**). Además, de acuerdo al análisis de medias fue posible determinar que la media de OTUs entre cuencas fue significativamente diferente ($p= 0,0004$). Asimismo, la única comparación de riqueza de OTUs totales, entre lagunas, que no fue significativa fue la de Gómez y Carpincho con un valor de $p= 0,7$ y Gómez y Chascomús con un $p= 0,06$ ($\alpha = 0,05$).

Tabla 7. Número de OTUs correspondientes a los taxones abundantes, poco comunes, raros y totales obtenidos en el período de muestreo.

OTUs	Gómez	Carpincho	Chascomús	El Triunfo	Cuenca Alta	Cuenca Baja
Taxones abundantes	95	98	83	94	106	150
Taxones poco comunes	482	434	450	406	550	743
Taxones raros	1755	1834	1159	1250	2379	2105
Totales	2332	2366	1692	1750	3035	2998

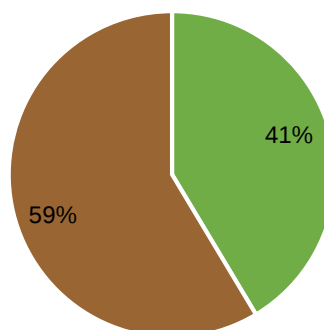
Taxones abundantes

■ Gómez ■ Carpincho ■ Chascomús ■ El Triunfo

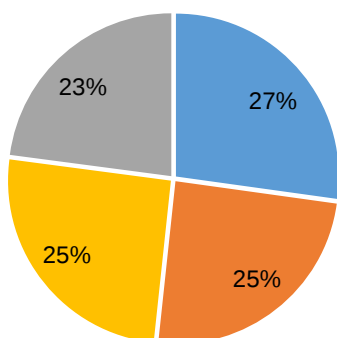


Taxones abundantes

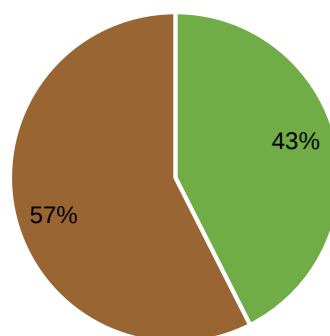
■ Cuenca Alta ■ Cuenca Baja



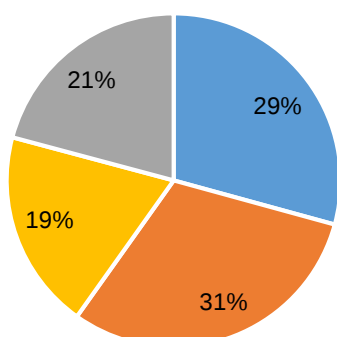
Taxones poco comunes



Taxones poco comunes



Taxones raros



Taxones raros

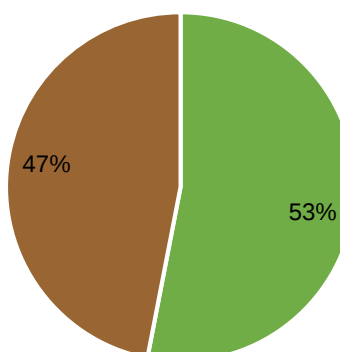


Figura 19. Gráficos de torta que representan el porcentaje de OTUs correspondiente a cada taxón (abundante, poco común, raro), teniendo en cuenta cada laguna y cuenca.

De acuerdo al análisis de medias de la riqueza de OTUs para los taxones abundantes/dominantes obtenidos por secuenciación masiva, se observó una diferencia significativa entre cuencas (alta y baja) con un valor de $p=0,0001$, donde la cuenca baja presentó una mayor riqueza de OTUs (**Tabla 7**), en coincidencia con lo obtenido por DGGE. Asimismo, se observaron diferencias significativas entre las lagunas de Gómez y Carpincho (cuenca alta) (**Tabla 8**).

Tabla 8. Nivel de significancia de medias correspondientes a la riqueza de OTUs abundantes entre sitios (significativo= $p<0,05$).

p	Gómez	Carpincho	Chascomús
Gómez			
Carpincho	0,009		
Chascomús	0,009	0,01	
El Triunfo	0,009	0,007	0,91

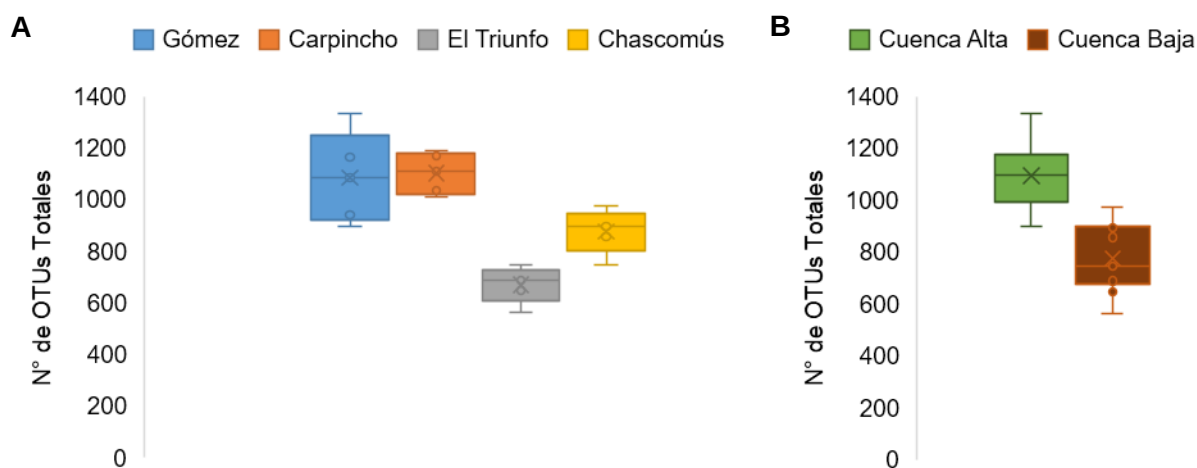


Figura 20. Diagramas de cajas correspondientes al número de OTUs promedio entre cuencas ($N=10$) (A) y entre sitios ($N=5$) (B). El Triunfo-Chascomús, $p=0,02$; Carpincho-El Triunfo, $p=0,01$; Gómez-El Triunfo, $p=0,01$; Gómez-Chascomús, $p=0,06$; Carpincho-Chascomús, $p=0,01$; Gómez-Carpincho, $p=0,7$.

10.2.2 DIAGRAMA DE VENN

El gráfico de Venn (**Figura 21**) muestra las OTUs exclusivas y/o compartidas entre lagunas o cuencas. El 19% de OTUs fueron compartidas entre los cuatro sistemas. El 22% de OTUs fueron exclusivas de la cuenca alta y el 4% fue exclusivo de la cuenca baja. En particular, el 6% de las OTUs fueron exclusivas de Gómez, el 7% fueron exclusivas de Carpincho, el 13% de El Triunfo y el 11% de Chascomús. Por otro lado, teniendo en cuenta el número total de OTUs obtenidos, se observaron correlaciones con las siguientes variables ambientales (N=20): profundidad del disco de Secchi ($r = -0,62$; $p = 0,003$), pH ($r = 0,54$; $p = 0,01$), conductividad ($r = 0,48$; $p = 0,03$), turbidez ($r = 0,640$; $p = 0,002$), SS ($r = 0,59$; $p = 0,006$), PT ($r = 0,68$; $p = 0,0009$), PRS ($r = 0,63$; $p = 0,003$) y Chla ($r = 0,64$; $p = 0,002$).

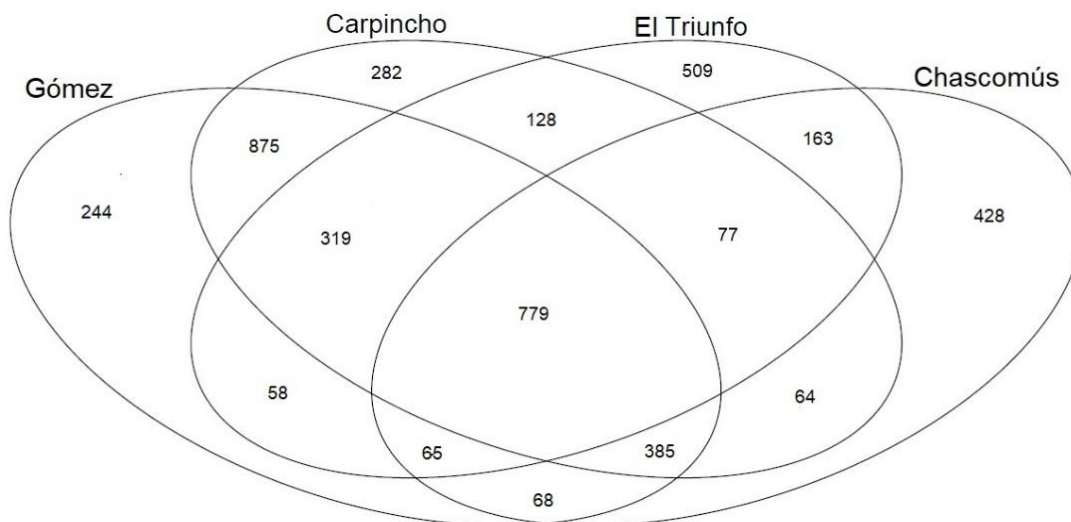


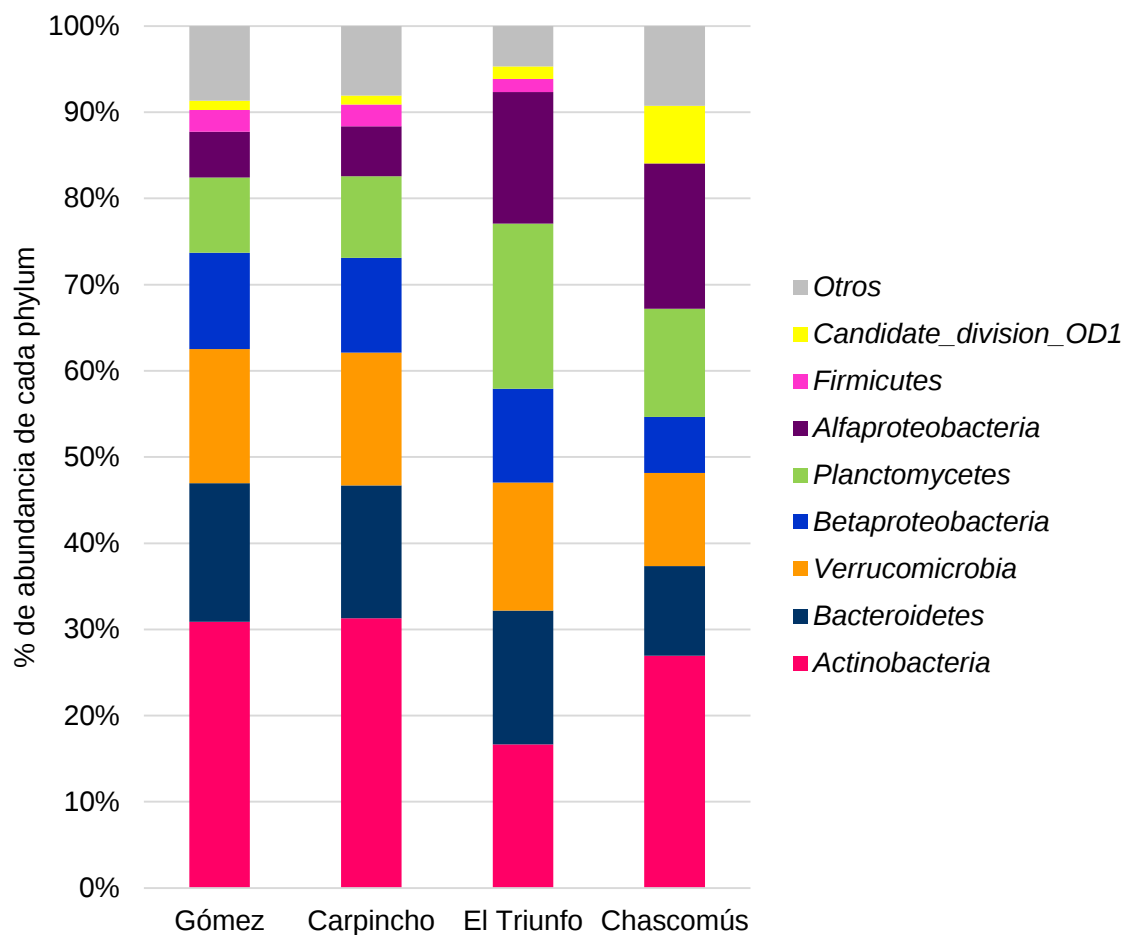
Figura 21. Diagrama de Venn para las 4 lagunas.

10.2.3 ANÁLISIS TAXONÓMICO

Los *phyla* *Proteobacteria* (Beta- y Alfa-), *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Candidato OD1* (*Parcubacteria*) se hallaron en los cuatro sistemas, aunque variaron en porcentajes entre sitios y/o cuencas (**Figura 22**). *Actinobacteria* dominó en las 4 lagunas durante el período de estudio. El grupo *Firmicutes* presentó un porcentaje muy similar en las lagunas de la cuenca alta y un menor porcentaje en El Triunfo, pero no se halló en la laguna Chascomús. Los grupos *Alfaproteobacterias* y *Planctomycetes* estuvieron mejor representados en las lagunas de la cuenca baja que en las de la cuenca alta (**Figura 22A**).

De acuerdo a la **Figura 22B**, se puede observar la dinámica temporal de los taxones dominantes para cada sitio. En el caso de las lagunas de la cuenca alta, *Actinobacteria* fue el único *phylum* que mostró un patrón de variación estacional marcado, con un mínimo de abundancia en el mes de julio. En relación con las lagunas pertenecientes a la cuenca baja, en Chascomús todos los grupos mostraron una variación estacional con, por ejemplo, un pico máximo en enero (2015), julio y octubre para *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, y *Alfaproteobacteria*, respectivamente. En El Triunfo, se observó que los *phyla* *Actinobacteria*, *Alfaproteobacteria* y *Bacteroidetes* variaron de manera sincronizada a lo largo de las estaciones, con un pico máximo de abundancia en julio, lo contrario ocurrió con el patrón de variación de *Planctomycetes*.

A



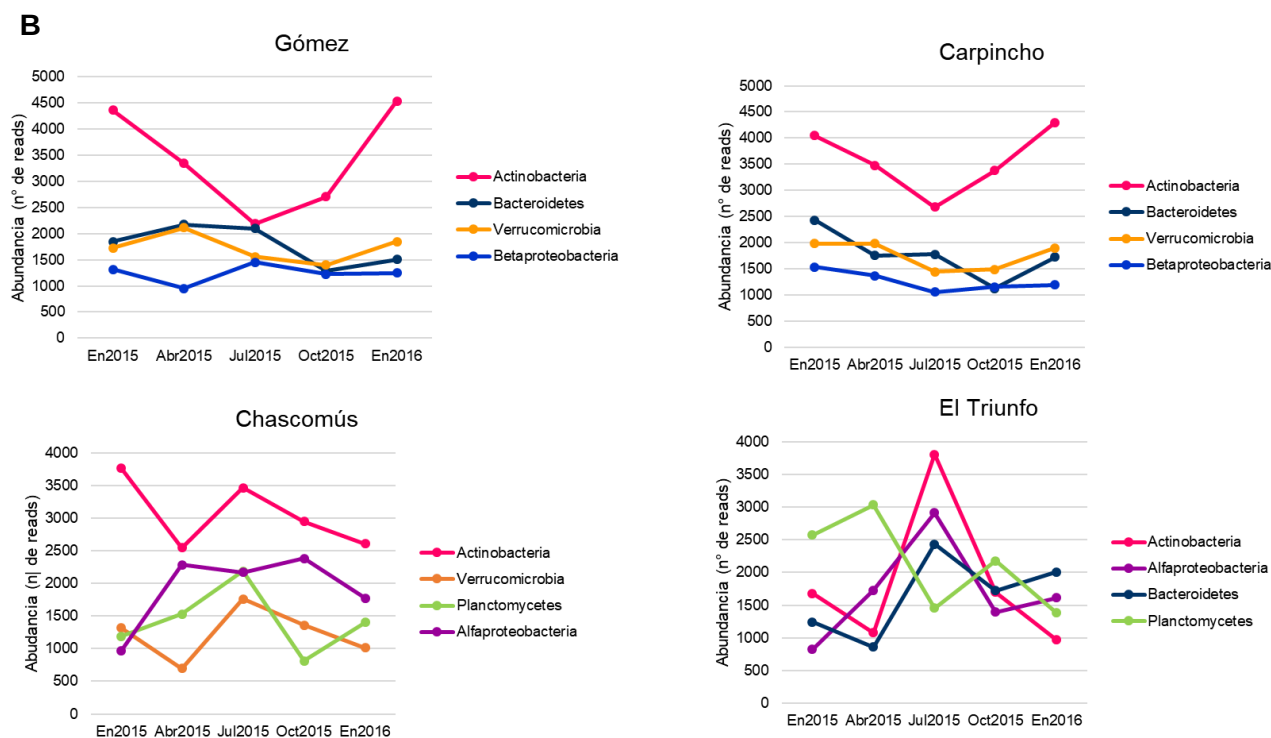


Figura 22. A: gráfico de barras apiladas al 100%, porcentaje en el que cada phylum contribuye al total de OTUs abundantes para cada sitio. B: dinámica temporal de los phyla más representados.

10.2.4 NMDS

En base a la matriz de abundancia relativa de OTUs totales obtenidos por secuenciación masiva, la ordenación empleando los ejes 1 y 3 resultó la que mejor segregó a los sitios de acuerdo a su estructura comunitaria (**Figura 23A**). Se observó que las lagunas se ordenaron de acuerdo a la cuenca de pertenencia: las lagunas de la cuenca alta se ordenaron, hacia la izquierda del eje NMDS 1 y las lagunas de la cuenca baja se ordenaron hacia la derecha del mismo. Por otro lado, los resultados del ANOSIM (**Tabla 9**) indicaron tres grupos diferentes en base a la estructura comunitaria bacteriana: la comunidad característica de Gómez-Carpincho que no difirió significativamente entre lagunas y se distinguieron de las lagunas de la cuenca baja; por otro lado, se distinguieron la comunidad característica de El Triunfo y la comunidad de Chascomús. Además, se observó un ordenamiento de acuerdo a la estacionalidad: las muestras correspondientes a invierno y primavera (julio-octubre) en Gómez, Carpincho y Chascomús tendieron a ordenarse juntas, así como también las muestras de verano y otoño (enero-abril). Por el contrario, este mismo comportamiento no se observó en la laguna El Triunfo.

Tabla 9. Significancia de las comparaciones entre grupos (sitios) mediante el test de ANOSIM ($\alpha=0,05$).

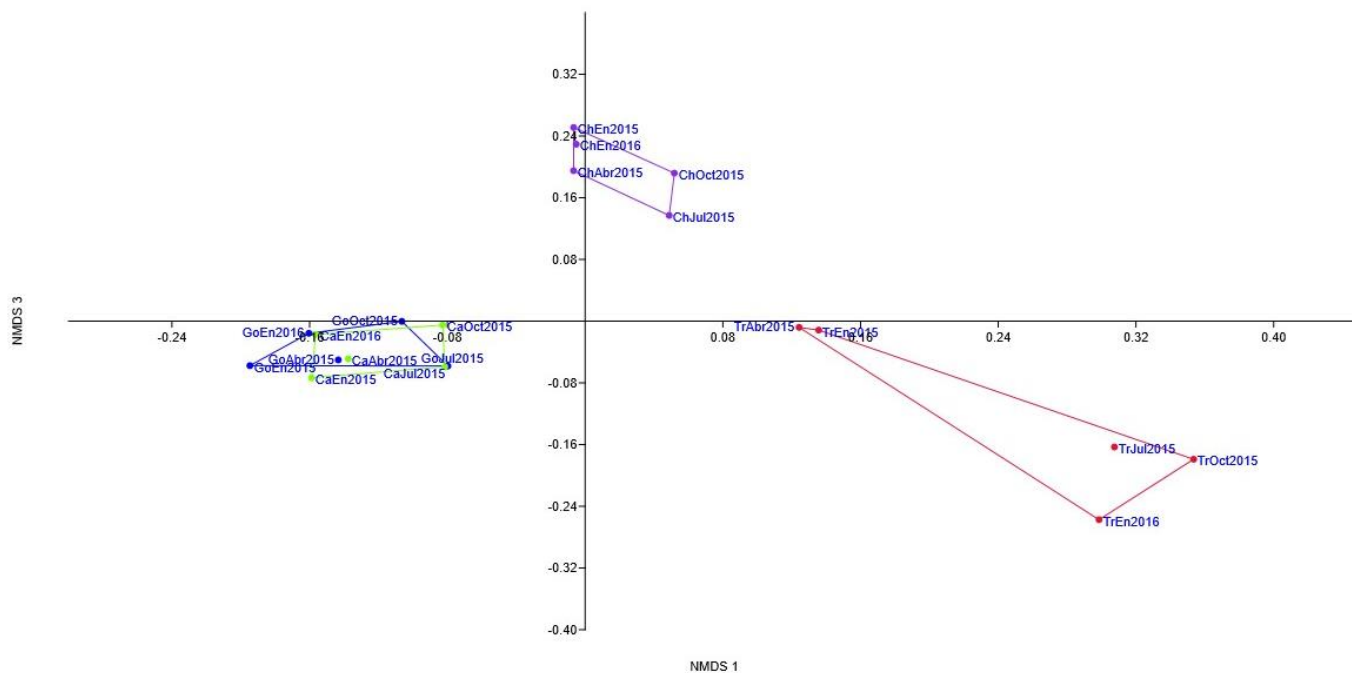
	R	p
Cuenca Alta-Cuenca Baja	0,57	0,0001
Gómez-Carpincho	-0,16	0,82
El Triunfo-Chascomús	0,72	0,009
Gómez-El Triunfo	0,78	0,007
Gómez-Chascomús	1	0,007
Carpincho-El Triunfo	0,72	0,008
Carpincho-Chascomús	1	0,008

De acuerdo a la matriz de presencia-ausencia de OTUs totales obtenidos por Illumina MiSeq, la ordenación de acuerdo a los ejes 1 y 2 resultó la que mejor segregó a los sitios entre sí (**Figura 23B**). Las lagunas con régimen turbio se ordenaron juntas hacia la izquierda del eje NMDS 1 y la laguna en régimen claro se encontró ordenada hacia la derecha, es decir, que se observó un ordenamiento separado de acuerdo al régimen de los sistemas. Las lagunas de la cuenca alta, al igual que en el NMDS para la abundancia de OTUs, se ordenaron de manera superpuesta, donde se observó un patrón de sincronización entre ellas, pero no así entre las lagunas pertenecientes a la cuenca baja. El Test de similitud (ANOSIM) realizado en base a todo el set de datos evidenció diferencias significativas entre cuenca alta y cuenca baja ($R=0,57$; $p=0,0001$) y diferencias entre sitios cuando se realizó la comparación de a pares ($R=0,78$; $p=0,0001$) (**Tabla 10**). La comparación entre cuencas exclusivamente, mostró que la composición de OTUs bacterianos difiere de acuerdo al factor cuenca. La comparación de pares evidenció la existencia de tres grupos (Chascomús, El Triunfo y, en conjunto, Gómez-Carpincho) tal como se vio anteriormente.

Tabla 10. Significancia de las comparaciones entre grupos (sitios) mediante el test de ANOSIM ($\alpha= 0,05$).

	R	p
Cuenca Alta-Cuenca Baja	0,47	0,0001
Gómez-Carpincho	0,12	0,7
El Triunfo-Chascomús	1	0,009
Gómez-El Triunfo	1	0,008
Gómez-Chascomús	1	0,007
Carpincho-El Triunfo	1	0,007
Carpincho-Chascomús	1	0,009

A



B

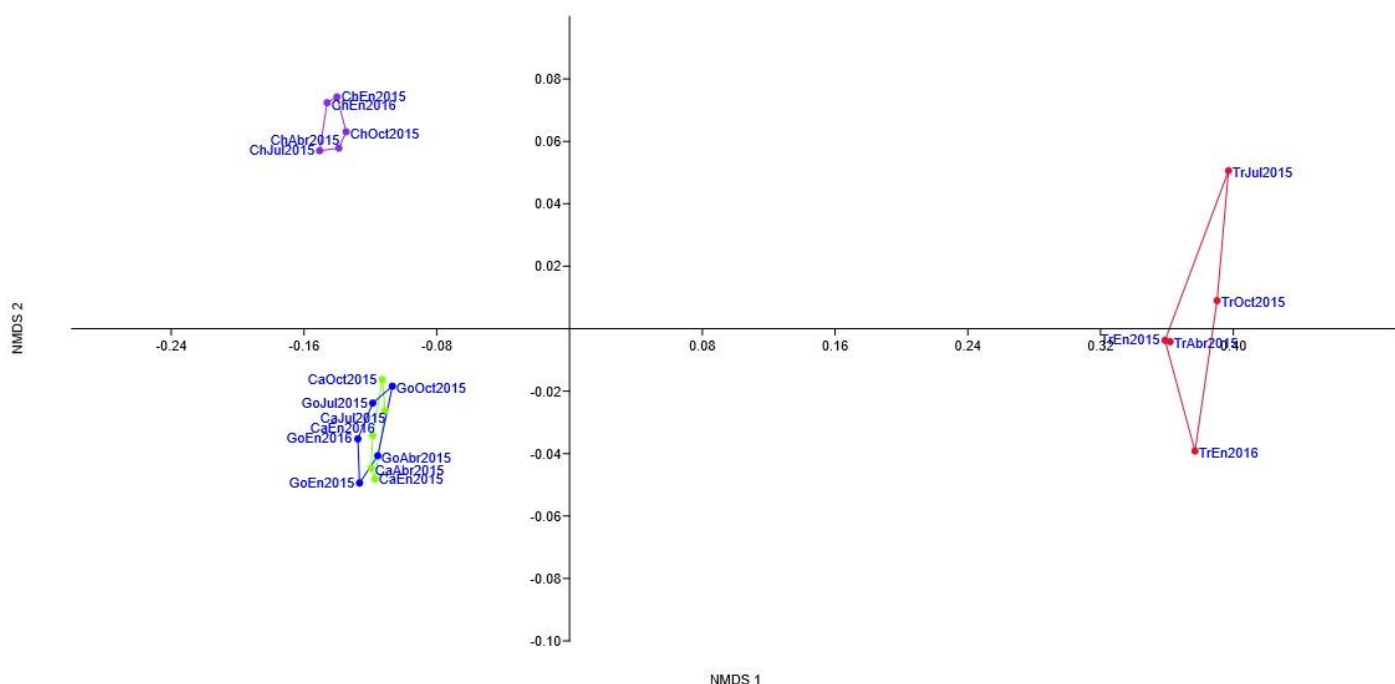


Figura 23. Análisis de Ordenamiento: NMDS. A: biplot obtenido a partir de la matriz biológica de abundancia relativa de reads/lecturas por OTU, empleando el índice de Similitud Bray Curtis. B: biplot obtenido a partir de la matriz biológica de presencia-ausencia de OTUs, empleando el Índice de Similitud de Jaccard. A: Índice de Stress= 0,05; B: Índice de Stress= 0,04.

10.2.5 TEST DE MANTEL

En la **Tabla 11** se muestran las correlaciones correspondientes a los análisis de Mantel simple y parcial, considerando la matriz de abundancia relativa de OTUs totales obtenidos por Illumina MiSeq. Los nombres de las matrices que figuran fuera del paréntesis corresponden a las matrices que fueron comparadas mientras que la tercera matriz, ubicada dentro del paréntesis corresponde al factor cuyo efecto fue removido. La correlación Biológico-Ambiental (Geográfico) mostró que, al aumentar la similitud en las variables ambientales, aumentó también la similitud en la composición del bacterioplancton. Es decir, a mayor similitud ambiental entre sitios, mayor es la similitud biológica. La correlación Biológico-Geográfico (Ambiental) reveló que, al aumentar la distancia geográfica entre los sitios, disminuyó la similitud entre comunidades del bacterioplancton; por lo tanto, no solo el ambiente influiría en la estructuración, sino que también la distancia geográfica entre los sitios estudiados.

Asimismo, se llevó a cabo un test de Mantel simple entre la matriz de similitud ambiental y la matriz de distancia geográfica donde hubo una correlación de -0,42 con un

valor de $p < 0,05$. Por lo tanto, a mayor distancia geográfica, menor la similitud ambiental entre los sitios estudiados.

Tabla 11. Test de Mantel simple y parcial. Coeficientes de correlación de Spearman r .

	Simple		Parcial	
	r	p	r	p
Biológico-Ambiental	0,60	$p < 0,05$		
Biológico-Geográfico	-0,64	$p < 0,05$		
Biológico-Ambiental (Geográfico)			0,52	$p < 0,05$
Biológico-Geográfico (Ambiental)			-0,60	$p < 0,05$

10.2.6 RDA

Para la matriz de abundancia relativa de las OTUs totales (**Figura 24**), obtenidas a partir de los datos de secuenciación masiva, se evaluó la significancia del modelo global a través del Test de Monte Carlo, el cual resultó significativo ($p = 0,002$). Al ser el modelo significativo, se prosiguió a realizar “*forward selection*” de las variables ambientales explicativas. El análisis realizado, indicó que el porcentaje de variancia acumulada fue del 79% para los dos ejes, siendo del 44% para el eje 1. Las variables significativas fueron: conductividad ($p = 0,001$), Secchi ($p = 0,001$), OD ($p = 0,011$) y PRS ($p = 0,001$). De acuerdo a los resultados, fue posible diferenciar entre cuencas: la cuenca alta se ordenó hacia el lado izquierdo del biplot junto a mayores valores de conductividad y PRS, y una disminuida concentración de OD, mientras que las lagunas de la cuenca baja se ordenaron hacia el lado derecho del biplot junto a mayores valores de OD y Secchi. En particular, la laguna El Triunfo se ordenó hacia mayores valores de Secchi. Asimismo, este análisis evidenció un patrón de ordenamiento temporal para Carpincho y Gómez, observándose que las muestras correspondientes al verano y al otoño (enero y abril) se ordenaron juntas (margen superior izquierdo del biplot), y separadas de las de invierno y primavera (julio y octubre, ordenadas hacia el margen inferior izquierdo).

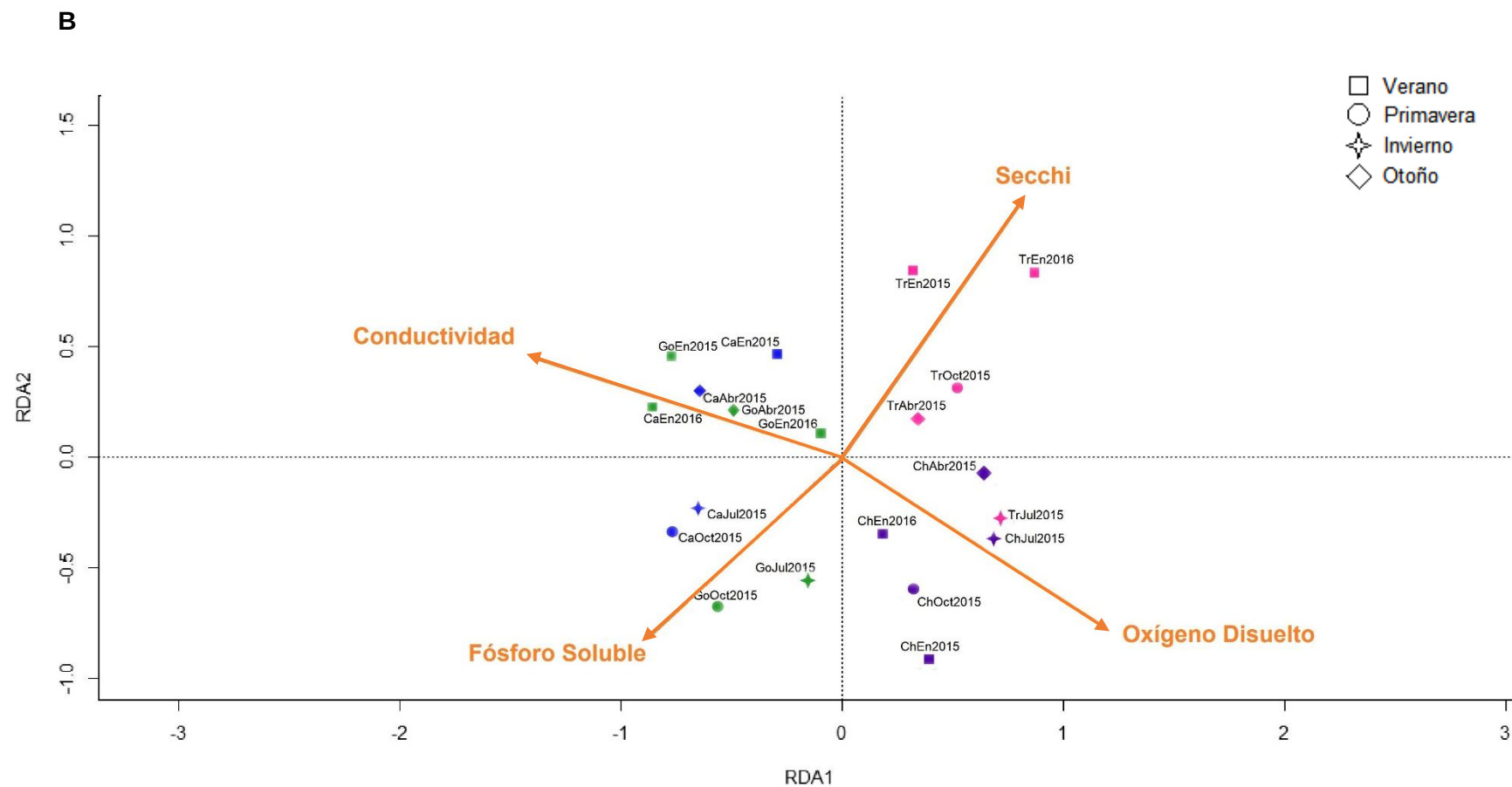


Figura 24. Análisis de Ordenamiento: RDA. Biplot obtenido a partir de la matriz biológica de abundancia de OTUs totales. En la figura: cuadrado representa verano, rombo representa otoño, estrella representa invierno y círculo primavera. Cada color representa a una laguna distinta.

DISCUSIÓN

El presente estudio constituye el primer trabajo en llevar a cabo la caracterización de la composición bacterioplanctónica de las lagunas Gómez y Carpincho (cuenca superior del Río Salado), así como también en comparar la estructura bacterioplanctónica entre lagunas ubicadas en la cuenca superior e inferior del Río Salado, utilizando técnicas de *fingerprinting* (DGGE) y tecnologías de última generación (Illumina MiSeq). En términos generales, los resultados indican diferencias en la estructura del bacterioplancton entre cuencas y, además, entre sistemas con diferentes estados de equilibrio.

De acuerdo a las técnicas empleadas en este trabajo, DGGE mostró una distinción comunitaria entre cuencas, con una mayor riqueza de OTUs abundantes en las lagunas de la cuenca inferior en comparación con las de la cuenca superior, al igual que lo observado con las OTUs abundantes/dominantes obtenidas por secuenciación masiva. Esta última técnica permitió, además, hacer una caracterización general acerca de los taxones que se encontraban en cada laguna y en cada cuenca, en contraposición al DGGE que, como se observó previamente (Llames et al., 2013), no resulta exitoso para obtener información taxonómica de las bandas cortadas y secuenciadas (Sanger) en ecosistemas acuáticos pampeanos.

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL DE LAS VARIABLES AMBIENTALES

Los valores de OD se mantuvieron, en los cuatro sistemas, por encima del umbral establecido para el desarrollo de la vida acuática (Arocena y Conde, 1999; Bain y Stevenson, 1999). Por otro lado, cabe destacar que el nivel hídrico no presentó correlación con las variables ambientales medidas. Esto puede deberse a que las lagunas Gómez, Carpincho y Chascomús presentan obras de regulación del nivel. Los valores de los Índices Tróficos indicaron que las lagunas estudiadas (Gómez, Carpincho, Chascomús y El Triunfo) se encontraron en un estado hipereutrófico durante el período de muestreo (2015-2016). Asimismo, durante este período tanto Gómez como Carpincho y Chascomús se hallaron en un régimen de aguas turbias fitoplanctónicas (dado los elevados valores de Chla, SS, turbidez, y los menores valores de Secchi), mientras que El Triunfo se encontró en un

estado de aguas claras. Estos resultados, en conjunto con el resto de los valores obtenidos para las variables ambientales, concuerdan con lo reportado previamente por otros autores para estos sistemas (Quirós *et al.*, 2002a; Torremorell *et al.*, 2007; Allende *et al.*, 2009; Silvoso *et al.*, 2011; Llames *et al.*, 2013).

El nitrógeno posee una dinámica abierta (ya que una parte del ciclo biogeoquímico consiste en la fijación atmosférica), por lo tanto, es difícil inferir alguna relación entre su concentración y su dinámica con las actividades antrópicas que se llevan a cabo en la cuenca. En cambio, el fósforo tiene una dinámica cerrada, lo cual, permite comprender los procesos que están ocurriendo en relación a las actividades humanas. Por otro lado, acorde a lo propuesto por Gabellone *et al.* (2005), y a las imágenes satelitales expuestas (Sánchez *et al.*, en prep.), se sabe que la cuenca del Río Salado presenta una marcada zonificación respecto a los distintos usos del suelo. Además, las precipitaciones asociadas a épocas de fertilización de los cultivos (en particular los meses de junio-julio para el trigo y la cebada, septiembre para el maíz, y octubre-diciembre para maíz y soja) provocan un mayor lavado de los nutrientes de tierras circundantes que finalmente se registran en los cuerpos de agua y terminan afectando el estado trófico y las comunidades planctónicas (Quirós *et al.*, 2002a).

De acuerdo a los registros, para la laguna Chascomús se observaron elevados valores de PT, no así de PRS. Esto sugiere que la dinámica de este nutriente es rápida y, una vez que ingresa al sistema, es captado por los microorganismos e incorporado a la biomasa. Por otro lado, para las lagunas de la cuenca alta, se observó, en octubre, un pico máximo en la concentración de fósforo junto con un aumento en las precipitaciones. Este aumento observado, en coincidencia con el pico máximo de lluvia para la fecha, sugiere un efecto de lavado y escorrentía de este nutriente desde los campos hacia las lagunas como consecuencia del período de fertilización en esta época del año. Esto se reflejó tanto en el patrón de variación de PRS como en el patrón de variación de PT. De acuerdo a los resultados obtenidos, el PT, además, se correlacionó con la concentración de Chla. Consistente al disminuido valor de esta última variable para octubre, el aumento en la concentración de fósforo no estaría relacionado a un evento de floración de fitoplancton. De modo que, la diferencia en la concentración de PT como PRS entre cuencas (mayor concentración en la cuenca alta) sugiere una relación con el uso de suelo que rodea la cuenca.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA COMUNITARIA DEL BACTERIOPLANCTON Y SU DINÁMICA

En relación a las técnicas empleadas, mediante *fingerprinting* (DGGE) y secuenciación masiva se visualizó que la estructura comunitaria entre los sistemas difiere entre cuenca alta y cuenca baja. Al tener en cuenta las OTUs totales (obtenidas por Illumina) se encontró que las lagunas de la cuenca superior presentaron una mayor riqueza que las lagunas de la cuenca inferior. Luego, para las lagunas Gómez y Carpincho (cuenca alta) no se observó diferencia significativa en cuanto a la riqueza total, mientras que, para El Triunfo y Chascomús (cuenca baja) si se observaron diferencias que son atribuibles, de acuerdo a resultados previos (Llames *et al.*, 2013), al estado alternativo de cada sistema.

Si bien la diversidad que capta cada técnica es diferente, como se discutió anteriormente, ambas mostraron que las lagunas de la cuenca inferior presentaron una mayor riqueza de OTUs abundantes/dominantes que las lagunas de la cuenca superior. Para DGGE, únicamente se observaron diferencias significativas en la riqueza de OTUs abundantes entre Gómez y el resto de las lagunas, donde Gómez mostró tener una menor riqueza en comparación a las demás. En cambio, en relación a las OTUs abundantes obtenidas mediante secuenciación, se observó únicamente diferencias significativas, al realizar la comparación entre lagunas, entre El Triunfo y Chascomús.

En términos generales, los tipos de *phyla* dominantes encontrados en las cuatro lagunas estudiadas, son los esperados de acuerdo a los linajes bacterianos más comunes encontrados en estos tipos de sistemas (Wu *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2009; Newton *et al.*, 2011; Steven *et al.*, 2011), donde la dominancia de la mayoría se relaciona con elevadas concentraciones de nutrientes como las registradas en las lagunas de este trabajo. En particular, como fue detallado en los Resultados, se encontró que el *phylum Firmicutes* se halló solamente en las lagunas de la cuenca alta (Gómez y Carpincho) y en El Triunfo. Montecchia *et al.* (2015) realizó un estudio en dos áreas de la yunga argentina, donde, al momento del estudio, se dedicaban al cultivo de caña de azúcar (Jujuy) y soja (Salta), empleando como “experimento control” el suelo nativo de la región. Observó que, a pesar de una débil asociación entre las propiedades del suelo y la estructura bacteriana, en Salta, donde el área estaba destinada al uso de suelo agrícola, el *phylum Firmicutes* se encontraba dentro de los abundantes, tal como se había visto en estudios posteriores en

suelos del Amazonas que estaban destinados a las pasturas. Esto sugiere que este grupo podría tener ventajas en ambos tipos de suelo, aunque, dada la mayor abundancia observada en las lagunas de la cuenca alta, podría suponerse que el mismo se encuentra más favorecido en zonas cuyo uso de suelo es predominantemente agrícola. Por otro lado, el *phylum Candidato OD1 o Parcubacteria* (Nelson y Stegen, 2015) fue encontrado en las cuatro lagunas, aunque en mayor porcentaje en Chascomús. Los organismos pertenecientes a este *phylum* fueron identificados en un amplio rango de ambientes anóxicos así como oxigénicos, además poseen un genoma pequeño (menor a 1 Mb) y tienen capacidades metabólicas reducidas (como por ejemplo la biosíntesis o reparación de ADN). Debido a esto, se considera que los organismos que pertenecen a este *phylum* son ectosimbiontes, es decir, parásitos adheridos a la superficie de otros microorganismos, de esta manera, tienen acceso a nutrientes o fuentes de energía que son producidas en el huésped. Hay muy poca información acerca de la ecología y biogeografía de *Parcubacteria*, por esta razón, no es posible determinar una causa específica de su presencia y abundancia.

El análisis de NMDS, en base a la matriz de abundancia y de presencia-ausencia, evidenció la asociación entre sistemas turbios (Gómez, Carpincho y Chascomús) y sistemas de aguas claras (El Triunfo). Esto muestra que el régimen ejerce cierto peso en la composición de la comunidad microbiana de estos sistemas (Gucht *et al.*, 2001; Muylaert *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007; Llamas *et al.*, 2013). Por otro lado, el NMDS reflejó una separación entre cuencas y, a través del RDA, fue posible hallar una separación similar. Este último análisis reveló, además, que la estructura comunitaria está determinada por la concentración de OD, la conductividad, la transparencia y la concentración PRS en las áreas circundantes a estas lagunas. En relación a esta última variable, Fermani *et al.* (2015) observó una fuerte correlación entre el PT y las bacterias heterotróficas, para los mismos cuerpos de agua, sugiriendo que la disponibilidad del recurso regularía la comunidad bacterioplanctónica de estos sistemas.

En concordancia con los resultados obtenidos con el análisis de NMDS, en el RDA también se observó la presencia de tres grupos (Gómez-Carpincho, Chascomús y El Triunfo), en conjunto a la separación de acuerdo a las cuencas. Esta diferenciación entre cuencas puede estar definida, además, por la limitación de la dispersión dada por dos

factores: la distancia y el grado de conexión al Río Salado. En lo referido a la limitación debida a la distancia entre los sistemas, se observó una correlación negativa (test de Mantel) entre la matriz de distancia geográfica y la matriz biológica correspondiente a la abundancia relativa (reads/lecturas por OTUs). Esto implicaría que, a una mayor distancia geográfica entre los sitios, menor es la similitud biológica entre ellos. Por otro lado, las lagunas presentes en el estudio presentan un grado variable de conectividad entre ellas y con el Río Salado (Gabellone *et al.*, 2005): Gómez y Carpincho se conectan directamente entre sí a través del río, la laguna Chascomús lo hace mediante otras lagunas y El Triunfo se vincula durante períodos de inundación. Además, según Quirós y Drago (1999) el tiempo de residencia del agua en las lagunas es generalmente corto, en el orden de 3-5 meses. Por lo tanto, podría esperarse que los taxones compartidos entre los sistemas estén relacionados con la conexión física entre ellos y la distancia geográfica que los separa. El Triunfo no posee entrada de río y es alimentado sólo por aguas subterráneas o lluvias, por lo tanto, se esperaría que la composición sea diferente en comparación de las demás lagunas (Gómez, Carpincho y Chascomús). A pesar de esto, los tres sistemas que poseen conexión permanente con el Río Salado comparten algunos *phyla* con El Triunfo (entre 1,5% y 4% de OTUs), lo que sugeriría que la selección ambiental ejerce un importante rol sobre la composición de estos sistemas, acorde a lo obtenido por Llames *et al.* (2017).

Finalmente, la dinámica estacional y la composición taxonómica del bacterioplancton de las lagunas de la cuenca alta fueron similares, resultado que podría deberse a la cercanía y/o conexión directa existente entre ellas (distancia de aproximadamente 14 km). Por otro lado, cuando se realizó el análisis empleando las OTUs totales, se evidenció un patrón de variación temporal para El Triunfo. La composición del bacterioplancton, al inicio del estudio, resultó similar a la de las lagunas con régimen turbio la cual fue cambiando progresivamente a un sistema de aguas claras, al finalizar el mismo. Un comportamiento similar fue reportado por Llames *et al.* (2013).

Dado los resultados obtenidos, es importante destacar que la relación entre el estado del ecosistema y la composición del bacterioplancton es consistente con trabajos previos que reportan patrones sistemáticos para las lagunas de la Región Pampeana, con respecto a las características físicas, químicas, macrozooplancton, comunidades de peces (Quirós *et al.*, 2002b), composición fitoplanctónica (Allende *et al.*, 2009; Izaguirre *et al.*, 2012, 2015;

Jyrkänkallio-Mikkola *et al.*, 2017), y la estructura de las comunidades del picoplancton (Silvoso *et al.*, 2011) y bacterioplancton (Llames *et al.*, 2013).

En síntesis, la relación observada entre las variables ambientales y los datos biológicos, para los sistemas tratados en esta tesis, concuerda con la noción del *Sorting* de especies (Teoría de Metacomunidad), al igual que lo observado en lagunas con las mismas características por Llames *et al.* (2013). Por lo tanto, no solo el estado de equilibrio de las lagunas pudo haber definido la presencia y/o abundancia de determinados microorganismos, sino que también cierto grado de limitación en la dispersión en épocas de aguas bajas y la variación físico-química entre cuencas. Los resultados aquí obtenidos presentan una evidencia más de que las diferencias ecológicas entre las lagunas pueden influenciar de manera pronunciada la composición de la comunidad bacteriana (Horner-Devine *et al.* 2004).

En base a los resultados obtenidos, se planea realizar, a mediano plazo, estudios que incorporen un mayor número de lagunas y de muestras por sitio a lo largo de la cuenca del Río Salado, de forma de posibilitar la obtención de mayor información acerca de la variación en la estructura comunitaria y de las variables ambientales, tanto a nivel espacial como temporal. Asimismo, abordar estudios que tengan en cuenta los factores ambientales (grado de conexión entre los sistemas, capacidad de dispersión de los microorganismos, y características ambientales de los cuerpos de agua) en su conjunto, resulta sustancial para determinar la proporción en la que influye cada uno de ellos en la determinación de la composición comunitaria. Por otro lado, el tipo de uso del suelo, relacionado a las actividades antrópicas, podría tener un importante rol en la modelación de la estructura del bacterioplancton en las lagunas pampeanas. Por lo tanto, en trabajos futuros, cobra importancia incorporar variables que proporcionen información directa de las actividades humanas y sus efectos sobre los cuerpos de aguas y las comunidades biológicas.

CONCLUSIONES

A nivel de técnicas moleculares, sería conveniente contemplar análisis futuros que empleen secuenciación masiva, ya que permite realizar un estudio de caracterización de la

diversidad de los componentes microbianos en lagunas pampeanas como se observó en este trabajo.

Por otro lado, este trabajo fue el primero en realizar la caracterización de la composición bacterioplanctónica de las lagunas Gómez y Carpincho, así como también en comparar dicha composición entre la cuenca superior e inferior del Río Salado. Los resultados obtenidos indican que la estructura bacteriana no solo varió entre cuencas, sino también entre sistemas con diferentes estados de equilibrio. En este sentido, dentro del concepto de Metacomunidad la noción de *Sorting* de especies explica el patrón de composición microbiana para los sistemas analizados. De modo que, estos resultados nos permiten avanzar en el entendimiento de la estructura de los componentes microbianos de estos ecosistemas, aportando información ecológica sobre las comunidades procariotas que se desarrollan en ellos.

Finalmente, incorporar la relación del grado de conexión entre los sistemas, la capacidad de dispersión de los microorganismos, además de las características ambientales de los cuerpos de agua, permite un mayor nivel de comprensión de la estructuración del bacterioplancton en los ecosistemas acuáticos. En particular, la incorporación de variables y experimentos que permitan evaluar de manera directa el efecto de la actividad humana sobre la estructura comunitaria del bacterioplancton resulta crucial para comprender la magnitud del impacto existente en las lagunas, posibilitando el desarrollo de estrategias de manejo que mitiguen estos efectos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamovich, B.V., Zhukova, T.V., Mikheeva, T.M., Kovalevskaya, R.Z. & Luk'yanova EV. (2016). Long-term variations of the trophic state index in the Narochnskie Lakes and its relation with the major hydroecological parameters. *Water resources*, 43(5), 809-817.
- Allende, L., Tell, G., Zagarese, H., Torremorell, A., Pérez, G., Bustingorry, J., Escaray, R., & Izaguirre, I. (2009). Phytoplankton and primary production in clear-vegetated, inorganic-turbid, and algal-turbid shallow lakes from the pampa plain (Argentina). *Hydrobiology*, 624, 45–60.
- Ansorge, W.J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*, 25(4), 195-203.
- APHA (American Public Health Association). (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Publication Health Association, Washington D.C.

- APHA (American Public Health Association). (2005) Standard Methods for the examination of waters and wastewater, 21st edn. APHA, Washington.
- Araus, J. L., & Slafer, G. A. (Eds.). (2011). *Crop stress management and global climate change* (Vol. 2). CABI.
- Arocena, R. & Conde, D. (ed.). (1999). Métodos en Ecología de Aguas Continentales, con ejemplos de Limnología en Uruguay. DIRAC/FC/UDELAR, Montevideo, 233 pp.
- Austin, A. T., Howarth, R. W., Baron, J. S., Chapin III, F. S., Christensen, T., Holland, E. A., ... & Shang, C. (2003). Human disruption of element interactions: drivers, consequences and trends for the 21st century. *Interactions of the Major Biogeochemical Cycles: Global Change and Human Impacts*.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Chapman, D., Brunk, C. (1994). A molecular technique for identification of bacteria using small-subunit ribosomal-RNA sequences. *Biotechniques*, 17, 144–149
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A. & Thingstad, F. (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10(3), 257-263
- Bain, M. B. (1999). Substrate. *Aquatic habitat assessment: common methods*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 95-103.
- Bettolli, M. L., Vargas, W. M., & Penalba, O. C. (2009). Soya bean yield variability in the Argentine Pampas in relation to synoptic weather types: monitoring implications. *Meteorological Applications*, 16(4), 501-511.
- Chornomaz, E. M., Etchepare, M. E., Escaray, R. V., Bustingorry, J. F., & Conzonno, V. H. (2002). Efectos de la inundación ocurrida durante el año 2001 sobre la laguna de Chascomús (Pcia. de Buenos Aires). In A. Fernández Cirelli, & G. Chalar Marquisá (Eds.), *El agua en Iberoamérica. De la limnología a la gestión en Sudamérica* (pp. 53–59). Buenos Aires: CYTED XVII, CETA – Centro de estudios Transdisciplinarios del Agua, Facultad de Ciencias Veterinarias
- Clarke KR y Green RH. Statistical design and analysis for “biological effects” study. *Marine Ecology- Progress Series*, 1988, 46, 213-226
- Cohan, F.M. (2002). What are bacterial species? *Annual Review of Microbiology*, 56, 457-87
- Cole, J.J. (1999) Aquatic microbiology for ecosystem scientists: new and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems*, 2, 215-225.
- Dangavs, N. (1979). Presencia de dunas de arcillas fósiles en la Pampa Deprimida. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 34 (1), 31-35.
- Doering III, O.C. (Ed.). (2002). *Effects of climate change and variability on agricultural production systems*. Springer Science & Business Media.
- Dorigo, U., Volatier, L., & Humbert, J. F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*, 39(11), 2207-2218.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461.
- Edgar, R.C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10, 996–998
- Fermani, P., Torremorell, A., Lagomarsino, L., Escaray, R., Unrein, F., & Pérez, G. (2015). Microbial abundance patterns along a transparency gradient suggest a weak coupling

- between heterotrophic bacteria and flagellates in eutrophic shallow Pampean lakes. *Hydrobiologia*, 752(1), 103-123.
- Fernández Zenoff, V., Siñeriz, F., Farías, M.E. (2006). Diverse Responses to UV-B Radiation and Repair Mechanisms of Bacteria Isolated from High-Altitude Aquatic Environments. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 7857-7863
 - Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4630-4636.
 - Fittkau, E. J., Illies, J., Klinge, H., & Schwabe, G. H. (Eds.). (2012). *Biogeography and ecology in South America* (Vol. 18). Springer Science & Business Media.
 - Fuhrman, J.A. (2009) Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 459, 193-199.
 - Gabellone, N.A., Solari, L.C. & Claps, M.C. (2001). Planktonic and physicochemical dynamics of a markedly fluctuating backwater pond associated with a lowland river (Salado River, Buenos Aires, Argentina). *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 6, 133-142.
 - Gabellone, N. A., Claps M. C., Solari L. C., & Neschuk N. C. (2005). Nutrients, conductivity and plankton in a landscape approach to a Pampean saline lowland river (Salado River, Argentina). *Biogeochemistry*, 75, 455–477.
 - Gasol, J.M., Massana, R., Pedrós-Alió, C. (2005). Xarxes invisibles, o l'art d'esbrinar quants microorganismes marins hi ha, qui són i què fan. *Mètode* 46, 73-79.
 - Geraldi, A. M., Piccolo, M. C., & Perillo, G. M. E. (2011). El rol de las lagunas bonaerenses en el paisaje pampeano.
 - Green, S. J., Leigh, M. B., & Neufeld, J. D. (2010). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, 4137-4158. Springer Berlin Heidelberg.
 - Halcrow & Parteners, 1999. "*Plan Maestro Integral de la Cuenca de Río Salado*" Ministerio de Obras y Servicios Públicos de la Provincia de Buenos Aires. La Plata, Argentina.
 - Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1-9
 - Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., & Andersson, A. F. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME journal*, 5(10), 571-1579.
 - Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. & Bohannon, B.J.M. (2003). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6, 613-622
 - Horner-Devine, M.C., Carney, K.M. & Bohannon, B.J.M. (2004). An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London*, 271, 113-122
 - Illumina® Sequencing. (2010). *Illumina Sequencing Technology* [PDF file]. Recuperado de https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf
 - Izaguirre, I. & Vinocur A. (1994) Typology of shallow lakes of the Salado River basin (Argentina) based on Phytoplankton communities. *Hydrobiologia*, 277, 49-62
 - Izaguirre, I.; Sinistro, R.; Schiaffino, M.R.; Sánchez, M.L.; Unrein, F. & Massana R. (2012). Grazing rates of protists in wetlands under contrasting light conditions due to free-floating plants. *Aquat. Microb. Ecol*, 65, 221-232.

- Izaguirre, I., Sánchez, M. L., Schiaffino, M. R., O'Farrell, I., Huber, P., Ferrer, N., ... & Mancini, M. (2015). Which environmental factors trigger the dominance of phytoplankton species across a moisture gradient of shallow lakes?. *Hydrobiology*, 752(1), 47-64.
- Jyrkänkallio-Mikkola, J., Meier, S., Heino, J., Laamanen, T., Pajunen, V., Tolonen, K. T., ... & Soininen, J. (2017). Disentangling multi-scale environmental effects on stream microbial communities. *Journal of Biogeography*.
- Krishna, K. R. (2015). *Agricultural Prairies: Natural Resources and Crop Productivity*. CRC Press.
- Legendre, P. & Legendre, L. (1998). *Numerical Ecology*. Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Legendre, P., & E. Gallagher. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecology*, 129, 271–280.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. & Forney, L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4516–4522
- Llames, M.; Lagomarsino, L.; Diovisalvi, N.; Fermani, P.; Torremorell, A.; Pérez, G.; Unrein, F.; Bustingorry, J.; Escaray, R., Ferraro, M. & Zagarese, H. (2009). The effects of different degrees of light availability in shallow, turbid waters: a mesocosm study. *J. Plankton Res*, 31(12), 1517-1529.
- Llames, M. (2011). Diversidad y ecología de las comunidades microbiológicas de las lagunas pampeanas. Tesis para optar el título de Doctor en Biología de la Universidad de Buenos Aires.
- Llames, M. E., Del Giorgio, P. A., Zagarese, H., Ferraro, M., & Izaguirre, I. (2013). Alternative states drive the patterns in the bacterioplankton composition in shallow Pampean lakes (Argentina). *Environmental microbiology reports*, 5(2), 310-321.
- Llames, M. E., Huber, P., Metz, S., & Unrein, F. (2017). Interplay between stochastic and deterministic processes in the maintenance of alternative community states in Verrucomicrobia-dominated shallow lakes. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Logares, R., Haverkamp, T. H., Kumar, S., Lanzén, A., Nederbragt, A. J., Quince, C., & Kausarud, H. (2012). Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. *Journal of microbiological methods*, 91(1), 106-113.
- Logue, J. B., Mouquet, N., Peter, H., Hillebrand, H., & Metacommunity Working Group. (2011). Empirical approaches to metacommunities: a review and comparison with theory. *Trends in ecology & evolution*, 26(9), 482-491.
- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., ... & Pallen, M. J. (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 599-606.
- Magurran, A.E. & Henderson, P.A. (2003). Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. *Nature*, 422: 714-716
- Makoto, O., & Tsutomu, I. (1984). *Methods in marine zooplankton ecology*.
- Mazza, G. (1961). Recursos hídricos superficiales. Evaluación de los Recursos Naturales de la Argentina (primera etapa). CFI, Buenos Aires, 4 (1), 1-459.
- Medvedev P., Scott, E., Kakaradov, B. & Pevzner, P. (2011). Error correction of high-throughput sequencing datasets with non-uniform coverage. *Bioinformatics*, 27(13), 137-141.

- Montecchia, M. S., Tosi, M., Soria, M. A., Vogrig, J. A., Sydorenko, O., & Correa, O. S. (2015). Pyrosequencing reveals changes in soil bacterial communities after conversion of Yungas forests to agriculture. *PLoS One*, 10(3).
- Muylaert, K., Van der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M., & Vyverman, W. (2002). Relationship between bacterial community composition and bottom-up versus top-down variables in four eutrophic shallow lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4740-4750.
- Muyzer, G., Dewaal, E.C. & Uitterlinden AG. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695–700
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U. *et al.* (1997) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: Akkermans ADL, van Elsas JD y de Bruijn FJ (Eds). *Molecular Microbial Ecology Manual* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 3.4.4, 1–27
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127-141
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol*, 2(3), 317–322
- Nelson, W. C., & Stegen, J. C. (2015). The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., & Bertilsson, S. (2011). A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 14-49
- Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A. A., Korobeynikov, A., Lapidus, A., ... & Stepanauskas, R. (2013). Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *Journal of Computational Biology*, 20(10), 714-737.
- Oksanen, F. J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... & Henry, M. (2017). *Vegan: Community Ecology Package*.
- Paruelo, J. M., Guerschman, J.P., & Verón, S.R. (2005). Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. *Ciencia hoy*, 15, 14–23.
- Pedrós-Alió, C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *TRENDS in Microbiology*, 14 (6), 257-263
- Prosser, J. I., Bohannan, B. J., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., ... & Osborn, A. M. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 384-392.
- Quirós, R. & Drago, E. (1999). The environmental state of Argentinean lakes: An overview. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 4, 55–64
- Quirós, R.; Rosso, J.J; Rennella, A.M.; Sosnovsky, A. & Boveri, M.B. (2002a). Análisis del estado trófico de las lagunas pampeanas (Argentina). *Interciencia*, 27(11), 584-591.
- Quirós, R; Rennella A.M.; Boveri, M.B.; Rosso, J.J. & Sosnovsky, A. (2002b). Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecol. Aust.*, 12, 175-185.

- Quirós, R., Boveri, M. B., Petracchi, C. A., Rennella, A. M., Rosso, J. J., Sosnovsky, A., & Von Bernard, H. T. (2006). Los efectos de la agriculturización del humedal pampeano sobre la eutrofización de sus lagunas the effects of the pampa wetlands agriculturization on shallow lakes eutrophication.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 62(2), 142-160.
- Rennella, A. M., & Quirós, R. (2001). Relations between planktivorous fish and zooplankton in two very shallow lakes of the Pampa Plain. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 28(2), 887-891.
- Rennella, A.M., & Quiros, R. (2006). The effects of hydrology on plankton biomass in shallow lakes of the Pampa Plain. *Hydrobiologia*, 556(1), 181-191.
- Ringuelet, R.A., Salibián, A., Clavérie, E. & Ilhero, S. (1967). Limnología química de las lagunas pampásicas (Provincia de Buenos Aires). *Physis*, 27, 201-221
- Rodicio, M.R. & Mendoza, M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 22(4), 238-245
- Rosso, J.J. (2008). *Relación entre la abundancia y estructura de la comunidad de peces y el régimen hidrológico, en lagunas de la alta cuenca del Río Salado* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía).
- Sarmiento, H. (2012). New paradigms in tropical limnology: the importance of the microbial food web. *Hydrobiologia*, 686(1), 1-14.
- Schauer, M., Balagué, V., Pedrós-Alió, C. & Massana, R. (2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquatic Microbial Ecology*, 32, 1163–1174
- Schiaffino, M. R., Lara, E., Fernández, L. D., Balagué, V., Singer, D., Seppey, C. C., ... & Izaguirre, I. (2016). Microbial eukaryote communities exhibit robust biogeographical patterns along a gradient of Patagonian and Antarctic lakes. *Environmental microbiology*, 18(12), 5249-5264.
- Silvano, J., Izaguirre, I., & Allende, L. (2011). Picoplankton structure in clear and turbid eutrophic shallow lakes: a seasonal study. *Limnologica-Ecology and Management of Inland Waters*, 41(3), 181-190.
- Smouse, P.E., Long, J.C. & Sokal, R.R. (1986). Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, 35, 627–632
- Steven, B., Dowd, S.E., Schulmeyer, K.H. & Ward, N.L. (2011). Phylum-targeted pyrosequencing reveals diverse planctomycete populations in a eutrophic lake. *Aquat Microb Ecol.*, 64, 41–49.
- Szabó, K. É., Iltor, P. O., Bertilsson, S., Tranvik, L., & Eiler, A. (2007). Importance of rare and abundant populations for the structure and functional potential of freshwater bacterial communities. *Aquatic microbial ecology*, 47(1), 1-10.
- Tang, X., Gao, G., Qin, B., Zhu, L., Chao, J., Wang, J., & Yang, G. (2009). Characterization of bacterial communities associated with organic aggregates in a large, shallow, eutrophic freshwater lake (Lake Taihu, China). *Microbial ecology*, 58(2), 307-322.
- Team, P. C. (2015). Python: A dynamic, open source programming language. Wilmington, DE: Python Software Foundation.
- Team, R. C. (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna,

- Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014. R Foundation for Statistical Computing.
- ter Braak C.J.F. (1991) CANOCO: a FORTRAN program for canonical community ordination by correspondence analysis, principle components analysis and redundancy analysis. Agricultural math. Group, Wageningen, The Netherlands.
 - Torremorell, A., Bustingorry, J.F., Escaray, R. & Zagarese, H. (2007). Seasonal dynamics of a large, shallow lake, laguna Chascomús: The role of light limitation and other physical variables. *Limnologia*, 37, 100-108
 - Van Der Gucht, K., Sabbe, K., De Meester, L., Vloemans, N., Zwart, G., Gillis, M., & Vyverman, W. (2001). Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environmental Microbiology*, 3(11), 680-690.
 - Viglizzo, E. F., Lértora, F., Pordomingo, A. J., Bernardos, J. N., Roberto, Z. E., & Del Valle, H. (2001). Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 83, 65-81
 - Wetzel, R.G. (2001). *Limnology, Lake and River Ecosystems*. Academic Press, San Diego, California, USA.
 - Wu, Q. L., Zwart, G., Wu, J., Kamst-van Agterveld, M. P., Liu, S., & Hahn, M. W. (2007). Submersed macrophytes play a key role in structuring bacterioplankton community composition in the large, shallow, subtropical Taihu Lake, China. *Environmental Microbiology*, 9(11), 2765-2774.
 - Wu, X., Xi, W., Ye, W., & Yang, H. (2007). Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(1), 85-96.
 - Yannarell, A.C. & Triplett, E.W. (2005). Geographic and Environmental Sources of Variation in Lake Bacterial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 227-239
 - Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K. H., ... & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645.
 - Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., & Stamatakis, A. (2013). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614-620.