

Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche



LOS PROTISTAS MIXOTRÓFICOS
EN LA ESTRUCTURA
TRÓFICA PLANCTÓNICA
DE LAGOS NORPATAGÓNICOS

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología

Lic. Luca Schenone
Directora: Beatriz Modenutti
Co-Director: Esteban Balseiro
2022

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Abstract	v
Glosario de abreviaturas	viii
Capítulo 1	1
Introducción general y marco teórico.....	1
<i>El bucle microbiano y los protistas mixotróficos</i>	<i>1</i>
<i>La mixotrofia y su relación con la luz y los nutrientes</i>	<i>5</i>
<i>El efecto del zooplancton en el bucle microbiano</i>	<i>8</i>
<i>La modelización de la red trófica planctónica y los mixótrofos.....</i>	<i>11</i>
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos	14
Hipótesis.....	14
Capítulo 2	15
Modelado del efecto de la luz en el balance fototrofia:fagotrofia de mixótrofos constitutivos y no constitutivos	15
<u>Introducción.....</u>	<u>16</u>
<u>Objetivo general</u>	<u>20</u>
<u>Objetivos específicos</u>	<u>20</u>
<u>Hipótesis</u>	<u>20</u>
<u>Predicciones.....</u>	<u>20</u>
<u>Materiales y Métodos</u>	<u>21</u>
<i>Área de estudio</i>	<i>21</i>
<i>Los protistas mixotróficos.....</i>	<i>22</i>
<i>Recopilación de datos de fototrofia y fagotrofia</i>	<i>23</i>
<i>Construcción del modelo</i>	<i>26</i>
<i>Calibración del modelo.....</i>	<i>26</i>
<i>Validación del modelo</i>	<i>29</i>
<u>Resultados.....</u>	<u>29</u>
<i>Datos experimentales y ajuste del modelo.....</i>	<i>29</i>
<i>Distribuciones posteriores de los parámetros del modelo</i>	<i>33</i>

Discusión	40
Capítulo 3	44
El efecto de las arcillas glaciares en la fagotrofia de nanoflagelados mixotróficos	44
Introducción.....	45
Objetivo general	48
Objetivos específicos.....	48
Hipótesis	48
Predicciones.....	48
Materiales y Métodos	49
Área de estudio	49
Experimentos de bacterivoría.....	51
Preparación de FLB y suspensión de arcilla glacial	53
Determinaciones de laboratorio	54
Construcción del modelo	55
Calibración del modelo.....	57
Validación del modelo	58
Resultados.....	58
Abundancia de nanoflagelados y sus presas	58
Experimento con gradiente lumínico (LE).....	59
Experimento con gradiente de arcilla glacial (CE)	61
Distribuciones posteriores de los parámetros	64
Experimento combinado (LCE)	65
Discusión	68
Capítulo 4	71
Los efectos del pastoreo y el reciclado de nutrientes por parte del zooplancton en el bucle microbiano planctónico: modelado de la red trófica	71
Introducción.....	72
Objetivo general	76
Objetivos específicos.....	76
Hipótesis	76
Predicciones.....	76
Materiales y Métodos	77
Área de estudio	77
Experimentos de incubación en el campo.....	78
Experimentos de laboratorio	81
Determinaciones de laboratorio	81
Construcción del modelo	82
Calibración del modelo.....	90
Análisis estadísticos sobre los valores de entrada y salida del modelo	91

<i>Validación del modelo</i>	91
<u>Resultados</u>	<u>92</u>
<i>Experimentos de incubación a campo</i>	92
<i>El modelo</i>	97
<i>Experimentos de laboratorio y predicción de las tasas de excreción</i>	102
<i>Síntesis conceptual</i>	103
<u>Discusión</u>	<u>105</u>
Conclusiones	109
Bibliografía.....	117
Apéndice 1.....	1
<i>Códigos en lenguaje de R del modelo del Capítulo 2</i>	1
<i>Códigos en lenguaje de R del modelo del Capítulo 3</i>	2
<i>Códigos en lenguaje de R del modelo del Capítulo 4</i>	2
Apéndice 2.....	11



Agradecimientos

Acérrimo pregonero de los logros colectivos, sólo puedo pensar en que el camino recorrido hasta aquí no fue en solitario. Tan importante como la Tesis en sí, son para mí ustedes que acompañaron este proceso netamente gratificante.

A mis directores de Tesis, Beatriz y Esteban. Por darme este tema con tanto potencial y por introducirme, motivarme y entusiasmarme en el camino de la ciencia. Agradezco su mano invisible en mi espalda, que me sostuvo en los escalones más difíciles y que le dio un empujoncito a mi curiosidad por este fascinante mundo “modelístico y mixotrófico”.

A mis compas de laboratorio: Marce, Nico, Eve, Chili, Lau, Vero, Flor, Cande y Agus. Por tantos almuerzos, risas, consejos, paciencia y trabajo que fueron parte esencial de mi doctorado.

A mi compañera más especial, Aitu. Por encontrarme, esperarme, cuidarme y amarme a cada segundo. Hiciste de los momentos más difíciles un arcoíris, interminable, que nunca deja de darme sorpresas. Con vos a todos lados, te amo.

A mi hermano, Franco, mi eterno amigo, el que más me conoce. Por tantas enseñanzas en todos los aspectos que hacen a una persona, y por compartir conmigo tus conocimientos en modelos matemáticos, esta Tesis tiene mucho de vos.

A mis padres, Fernanda y Leonel, hermosos e incondicionales, acompañando mis deseos, atentos a mis traspies, sacándome adelante con un amor más fuerte que el viento en Meliquina.

A mi familia de Buenos Aires, siempre presente a la distancia, orgullosos de mí y yo de todos ellos.

A mi nueva familia de El Hoyo y Santa Cruz (la calle Santa Cruz, je), por tanto interés y amor por lo que me gusta hacer.

A mis amigas y amigos de siempre: Facu K, Iván, Sabri, Day, Romi, Flor, Eve y Facu B. ¡Que la vida nos siga cambiando para bien y juntos!

Cinco años doctorales puede ser mucho tiempo cuando de relaciones humanas se trata. A quienes supieron ser parte de mi vida en algún momento de esta importante etapa, les agradezco desde el afecto que les guardo.

A la Universidad Nacional del Comahue, por estos 10 años (recién cumplidos) de estudio libre y gratuito, y a CONICET por la beca doctoral que hizo posible esta Tesis.

Esta Tesis fue financiada por los proyectos FONCyT PICT 2017-1940, PICT 2018-1563, CONICET PUE 2016-0008 y UNC B163.

Resumen

En ambientes lacustres con una alta relación luz:nutrientes, como son los lagos andinos norpatagónicos, los protistas mixotróficos dominan la producción primaria y conectan la producción microbiana con el zooplancton y los niveles tróficos superiores. La mixotrofia representa en estos ambientes una ventaja para los protistas al poder utilizar no sólo el recurso lumínico sino también al alimentarse del picoplancton que capta la mayor parte de los nutrientes disueltos. La presente Tesis Doctoral tuvo como pregunta central determinar el papel de los protistas mixotróficos en la red trófica planctónica de los lagos andinos norpatagónicos frente a cambios ambientales que afectan la disponibilidad de sus recursos (luz, nutrientes y presas) y la presencia de depredadores. Por lo tanto, el objetivo general fue analizar y modelar algunas de las interacciones que ocurren entre los protistas mixótrofos con variables bióticas y abióticas en lagos andinos norpatagónicos. Para abordar estos estudios, se combinaron experimentos de campo y de laboratorio con formulaciones matemáticas e inferencia bayesiana, procurando modelar las estrategias nutricionales de los mixótrofos frente a distintas variables bióticas y abióticas.

La Tesis fue organizada en cinco capítulos. En el primer capítulo se presentan y se introducen los conceptos teóricos enfocándolos hacia la pregunta de esta Tesis; asimismo se presentan el objetivo general, los objetivos específicos, y las hipótesis. En particular, se tratan aspectos relacionados con la ventaja de la mixotrofia como estrategia en ambientes pobres en nutrientes, los vínculos con niveles tróficos superiores y la importancia de modelar las interacciones con formulaciones matemáticas y el empleo de estos modelos en ecología.

Los protistas mixotróficos pueden ser clasificados en mixótrofos constitutivos (CM) que tienen una capacidad fotosintética innata y mixótrofos no constitutivos (NCM) que la adquieren de sus presas. Esta diferencia entre grupos funcionales podría verse reflejada en el equilibrio fototrofia-fagotrofia frente a distintas condiciones de luz subacuática (irradiancia). En el segundo capítulo se analiza y modela el efecto de la luz sobre el balance fototrofia:fagotrofia de un CM (el nanoflagelado *Chrysochromulina parva*) y un NCM (el ciliado *Ophrydium naumanni*). Se desarrollaron modelos para la fototrofia y fagotrofia de estos protistas mixotróficos en función de la irradiancia. Los modelos propuestos se ajustaron con datos de producción primaria y bacterivoría provenientes de experimentos de laboratorio y de campo. La capacidad predictiva de

estos modelos se evaluó con la técnica de validación cruzada. Tanto para la fototrofia como para la fagotrofia se obtuvieron respuestas no monotónicas en función a la irradiancia en ambos tipos de mixótrofos. Cuando los modelos fueron ajustados con los datos experimentales, se observó que los valores máximos de fototrofia y fagotrofia se encontraron a irradiancias intermedias coincidiendo con el nivel de luz al que se encuentran los picos profundos de clorofila en estos lagos. La combinación de los modelos con los datos experimentales reveló diferencias en el balance fototrofia:fagotrofia entre ambos grupos funcionales de mixótrofos. En el caso de los CM la fototrofia y la fagotrofia se encuentran acopladas a lo largo del gradiente lumínico. Por el contrario, el ciliado como representante de un NCM mostró un fuerte desacople de las dos funciones a irradiancias medias y altas.

En el tercer capítulo de esta Tesis, se analizó y modeló el efecto de las arcillas glaciares en la bacterivoría de los nanoflagelados mixótrofos (MNF) teniendo en cuenta su doble efecto: atenuación del ambiente lumínico e interferencia directa en la fagotrofia. Se desarrolló un modelo de fagotrofia incluyendo un factor de interferencia por partículas no comestibles (arcillas). Se realizaron series de experimentos para cuantificar el efecto de la atenuación lumínica, la interferencia y finalmente el efecto conjunto de ambos factores. Se utilizó inferencia bayesiana para calibrar los parámetros del modelo a partir de información previa y los experimentos de bacterivoría *in situ*. Finalmente, se evaluó la capacidad predictiva de nuestro modelo con experimentos independientes de la calibración. Estos experimentos de bacterivoría se realizaron en el lago proglaciar turbio (lago Frías) durante primavera y verano, lo que permitió analizar diferentes condiciones de luz y concentraciones de arcillas. Tanto los experimentos como el modelo mostraron un decaimiento exponencial de la bacterivoría frente al incremento en la concentración de arcilla. El modelo también demostró que el efecto no monotónico de la luz sobre la bacterivoría se reduce a medida que aumenta la concentración de arcilla. Por otra parte, nuestro modelo predijo con éxito el efecto combinado de la disponibilidad de luz y la interferencia directa por partículas sobre la bacterivoría, cuando se compararon los datos ajustados del modelo con los experimentos independientes del lago Frías.

En el cuarto capítulo se analizan los efectos del pastoreo y el reciclado de nutrientes por parte de dos especies contrastantes de zooplancton (el cladóceros *Diaphanosoma chilense* y el copépodo *Boeckella gibbosa*) sobre el bucle microbiano y, en particular, sobre los MNF. En las

redes tróficas planctónicas, el zooplancton actúa como sumidero de nutrientes al incorporarlos a su biomasa a través de la depredación, y como fuente al liberar nutrientes disueltos con la excreción. En este sentido, los cladóceros y los copépodos tendrían diferentes efectos en el bucle microbiano al alimentarse de presas de diferentes tamaños y liberar distintas cantidades de fósforo (P). Se realizaron experimentos de incubación *in situ* en el lago Los Cántaros, evaluando por separado los efectos del pastoreo y el reciclado de nutrientes y utilizando la comunidad microbiana natural y los dos zoopláncteres mencionados. Luego, se desarrolló un modelo de dinámica del plancton en función del P que fue parametrizado con los resultados de nuestro experimento y con información previa utilizando un enfoque bayesiano. Se encontró que *D. chilense* se alimentó principalmente de picoplancton y mostró una baja tasa de liberación de P, mientras que *B. gibbosa* consumió nanoflagelados y algas y liberó mayores cantidades de P. En consecuencia, *D. chilense* redujo el contenido de P de los MNF mientras que *B. gibbosa* lo aumentó. De manera independiente se realizó un experimento de excreción de los zoopláncteres que se utilizó para verificar la capacidad predictiva del modelo. El modelo desarrollado permitió estimar tasas de excreción de P del zooplancton, así como el contenido de P de los compartimentos del bucle microbiano a partir de su biomasa y la concentración de P disuelto y particulado. Nuestros resultados ubican a los MNF como un compartimento altamente sensible a estructuras zooplanctónicas contrastantes, en especial respecto a la adquisición y almacenamiento de nutrientes limitantes, como el P.

Finalmente, en el quinto capítulo se incluyen las conclusiones finales de la Tesis. La conclusión final señala que los mixótrofos se ven afectados por una combinación de factores ambientales, bióticos y abióticos, como cambios en la luz, la presencia de partículas no comestibles y distintas estructuras del zooplancton. Por otra parte, la respuesta a estos efectos puede encontrarse en el balance entre sus estrategias nutricionales, su abundancia o su contenido de nutrientes esenciales como el fósforo. Los modelos mecanicistas formulados en esta Tesis permitieron la evaluación de dinámicas del plancton frente a estas condiciones variables por lo cual consideramos que esta Tesis aportaría al desarrollo de la teoría cuantitativa sobre las interacciones de los mixótrofos en la red trófica planctónica.

Abstract

In freshwater systems with high light:nutrient ratios, such as North Patagonian Andean lakes, mixotrophic protists dominate primary production and connect microbial production with zooplankton and higher trophic levels. Mixotrophy represents an advantage for protists in these environments since they can use both, light and feeding on picoplankton which uptakes most of the dissolved nutrients. This PhD Thesis aimed to determine the role of mixotrophic protists in the planktonic food web of north Patagonian Andean lakes facing environmental changes that affect the availability of their resources (light, nutrients and prey) and the presence of predators. Therefore, the main goal was to analyse and model some interactions between mixotrophic protists and biotic and abiotic variables in north Patagonian Andean lakes. To assess this, field and laboratory experiments were combined with mathematical formulations and Bayesian inference to model the nutritional strategies of mixotrophs affected by different biotic and abiotic variables.

This PhD Thesis was organized into five chapters. In the first chapter, the theoretical concepts are presented followed by the general and specific objectives and the main hypotheses. In particular, we discussed aspects related to the advantage of mixotrophy as a strategy in oligotrophic environments, the links with higher trophic levels, the importance of modelling interactions with mathematical formulations and the use of these models in ecology.

Mixotrophic protists can be classified into constitutive mixotrophs (CM) that have an innate photosynthetic capacity and non-constitutive mixotrophs (NCM) that acquire it from their prey. This difference between functional groups could be reflected in the phototrophy:phagotrophy balance under different underwater light conditions (irradiance). In the second chapter, I analysed and modelled the effect of light on the phototrophy:phagotrophy balance of a CM (the nanoflagellate *Chrysochromulina parva*) and a NCM (the ciliate *Ophrydium naumanni*). Models for phototrophy and phagotrophy of these mixotrophic protists were developed as a function of irradiance. The proposed models were adjusted with primary production and bacterivory data from laboratory and field experiments. The predictive accuracy of these models was evaluated using the cross-validation technique. For both phototrophy and phagotrophy, non-monotonic responses were obtained as a function of irradiance in both functional types of mixotrophs. When the models were adjusted with the experimental data, it was observed that the maximum values of phototrophy and

phagotrophy were found at intermediate irradiances, matching the light level at the deep chlorophyll maximum in these lakes. The models fitted with the experimental data revealed differences in the phototrophy:phagotrophy balance between both mixotrophic functional groups. In the case of the CM, phototrophy and phagotrophy were coupled along the light gradient. In contrast, the NCM ciliate showed a strong decoupling of both functions at intermediate and high irradiances.

In the third chapter, I analysed and modelled the effect of glacial clay on the bacterivory of mixotrophic nanoflagellates (MNF) considering their double effect: light attenuation and direct interference in phagotrophy. For this purpose, I develop a phagotrophy model including an interference factor for non-edible particles (glacial clay). Then, different experiments were carried out to quantify the effect of light attenuation, interference and their joint effect. I applied Bayesian inference to calibrate the model parameters using prior information and the *in situ* bacterivory experiments. Finally, the predictive accuracy of our model was evaluated with independent experiments. These bacterivory experiments were carried out in the turbid proglacial lake (Frías) during spring and summer, which allowed us to analyse different light conditions and clay concentrations. Both the experiments and the model showed an exponential decay of the bacterivory with the increase in the glacial clay concentration. The model also showed that the non-monotonic effect of light on bacterivory is reduced as clay concentration increases. Moreover, our model successfully predicted the combined effect of light availability and direct particle interference on bacterivory in the independent experiments from Lake Frías.

In the fourth chapter, I analysed and modelled the effects of grazing and nutrient recycling of two contrasting species of zooplankton (the cladoceran *Diaphanosoma chilense* and the copepod *Boeckella gibbosa*) on the microbial loop and, in particular, on MNF. In planktonic food webs, zooplankton act as a sink for nutrients by incorporating them into their biomass through predation, and as a source by releasing dissolved nutrients through excretion. In this sense, cladocerans and copepods would have different effects on the microbial loop by feeding on prey of different sizes and releasing different amounts of phosphorus (P). *In situ* incubation experiments were carried out in Lake Los Cántaros where the effects of grazing and nutrient recycling were assessed separately using the natural microbial community and the two zooplankters mentioned above. Then, a model of plankton dynamics as a function of P was developed and parameterized

with the results of our incubation experiments and prior information using a Bayesian approach. We found that *D. chilense* fed mainly on picoplankton and showed low P release, while *B. gibbosa* consumed nanoflagellates and algae and showed high P release. Consequently, *D. chilense* reduced the P quota of the MNF while *B. gibbosa* increased it. Excretion experiments of the two zooplankters were carried out independently and used to test the predictive accuracy of the model. The developed model estimated zooplankton P excretion rates, as well as the P quota of the microbial loop compartments from their biomass and the concentration of dissolved and particulate P. Our results place MNF as a highly sensitive compartment to different zooplanktonic structures, especially regarding their acquisition and storage of limiting nutrients, such as P.

Finally, in the fifth chapter, I included the final conclusions of the Thesis. The final conclusion indicates that mixotrophs are affected by a combination of environmental factors both, abiotic and biotic, such as changes in light, the presence of inedible particles and different zooplanktonic structures. On the other hand, the response of mixotrophs to these effects can be found in the balance between their nutritional strategies, their abundance and their nutrient quota. The mechanistic models formulated in this Thesis allowed the evaluation of plankton dynamics in these variable conditions, contributing to the development of quantitative theory on the interactions of mixotrophic protists in the planktonic food web.



Glosario de abreviaturas

ANOVA: análisis de varianza

BH: Bacterias heterotróficas

C: carbono

CE: experimentos de bacterivoría en gradiente de arcillas glaciares

CM: mixótrofo constitutivo

C:P: relación estequiométrica entre carbono (C) y fósforo (P)

CPcy: colonias de picocianobacterias.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol (marcador fluorescente)

DCM: máximo profundo de clorofila

DOC: carbono orgánico disuelto

DTAF: 5-(4,6-diclorotriazinilo)aminofluoresceína (marcador fluorescente)

FLB: bacterias marcadas con fluorescencia

G: pastoreo sobre el bucle microbiano por parte del zooplancton

HNF: nanoflagelados heterotróficos

I: irradiancia

Kd: coeficiente de atenuación de la luz

LCE: experimentos de bacterivoría con variación de luz y arcillas

LE: experimentos de bacterivoría en gradiente lumínico

MA: microalgas

MAE: error medio absoluto

MCMC: Cadenas Markovianas Monte Carlo

MNF: nanoflagelados mixotróficos

M-M: fórmula de Michaelis-Menten

m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar

N: nitrógeno

NCM: mixótrofo no constitutivo

NF: nanoflagelados

P: fósforo

Pcy: Picocianobacterias



Phot: fototrofía

Phag: fagotrofía

Q: contenido somático de fósforo

R: reciclado de nutrientes por parte del zooplancton

PAR: radiación fotosintéticamente activa

R+G: combinación de pastoreo y reciclado de nutrientes por parte del zooplancton

TDN: Nitrógeno total disuelto

TDP: Fósforo total disuelto

TP: Fósforo total (disuelto y particulado)

TPP: Fósforo total particulado

TSS: sólidos totales en suspensión

UV: ultravioleta

$Z_{1\%RFA}$: profundidad del 1% de incidencia de la radiación fotosintéticamente activa

$Z_{m\acute{a}x}$: profundidad máxima

%p/v: porcentaje peso a volumen

%v/v: porcentaje volumen a volumen



Capítulo 1

Introducción general y marco teórico

El bucle microbiano y los protistas mixotróficos

La dinámica de la red trófica microbiana pelágica tiene importantes implicancias para los flujos biogeoquímicos de los ecosistemas y la transferencia de energía (Cotner y Biddanda, 2002). A partir de su descubrimiento en la década de los '70 (Pomeroy, 1974) y gracias al avance en las técnicas de microscopía (e.g. epifluorescencia) que permitieron la cuantificación del picoplancton (células $< 2 \mu\text{m}$), pudo reconocerse la importancia de la fracción microbiana en la comunidad planctónica. Luego, Azam *et al.* (1983) incorporaron el concepto del “bucle microbiano” a la concepción clásica de la cadena trófica fitoplancton-zooplancton (Figura 1.1). El bucle microbiano incluye múltiples compartimentos de diferentes tamaños y modos de nutrición, como bacterias heterotróficas, picocianobacterias autotróficas (Pcy) y protistas fagotróficos, tanto heterotróficos como mixotróficos. Estos compartimentos se conectan con el resto de la red pelágica ya que la materia orgánica exudada por productores primarios, la producida por excreción del zooplancton y por muerte celular es reutilizada por las bacterias heterotróficas (Tranvik, 1992; Sigee, 2005). A su vez, estas bacterias son consumidas por protistas (nanoflagelados y ciliados) que luego son presa del zooplancton transfiriéndose a niveles tróficos superiores. De esta forma, la conceptualización del bucle microbiano posicionó a los nanoflagelados fagotróficos (2-20 μm) y a los ciliados (generalmente $> 20 \mu\text{m}$) como organismos clave, siendo la conexión heterotrófica con la red clásica de base autotrófica e incrementando la eficiencia del sistema, ya que aumenta las vías de transferencia de materia y energía hacia los niveles tróficos superiores (Pomeroy, 1974; Azam *et al.*, 1983).

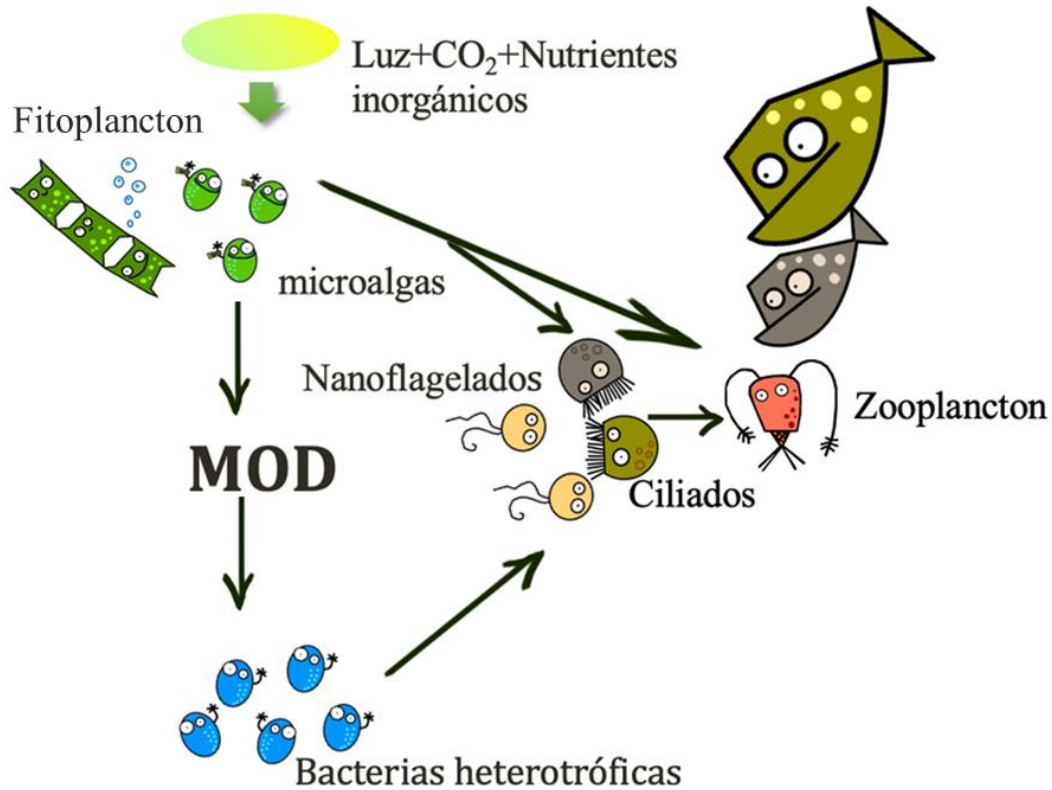


Figura 1.1: El bucle microbiano planctónico y su conexión con la red trófica tradicional de ambientes pelágicos. Dibujos de Dra. Clara Ruiz González.

Hacia fines del siglo pasado, Bird y Kalff (1986) demostraron que el alga *Dinobryon sp.* era capaz de ingerir bacterias en forma significativa y comparable a los componentes heterotróficos de un lago (por ejemplo, flagelados heterotróficos, ciliados, rotíferos y cladóceros). Estos hallazgos impulsaron al reconocimiento de la importancia del bucle microbiano y al consiguiente aumento de su investigación lo que reveló, además, que los protistas mixotróficos son muy comunes en ambientes acuáticos (Stoecker, 1998; Jones, 2000; Johnson, 2011), y un componente importante en muchas redes tróficas planctónicas (Flynn *et al.*, 2019). La mixotrofia se define como la combinación de fototrofia y fagotrofia en un solo organismo, en el cual se produce fotosíntesis y toma activa de carbono particulado, suprimiendo la tradicional dicotomía entre el fitoplancton autótrofo y microzooplancton heterótrofo (Sanders, 1991; Mitra *et al.*, 2016) (Figura 1.2). En este sentido, los protistas mixotróficos representan una fracción considerable de los productores primarios y consumidores (Flynn *et al.*, 2013) constituyendo un vínculo clave entre el bucle microbiano y niveles tróficos superiores (Ptacnik *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2014).



La capacidad de combinar la fotosíntesis y la ingestión de carbono orgánico no está relacionada con un grupo taxonómico específico y se encuentra muy extendida entre los protistas, desde algas con capacidad fagotrófica hasta ciliados “fotosintéticos” que mantienen las estructuras fototróficas de sus presas (cloroplastos o células completas) dentro de su citoplasma (Putt, 1990; Christaki *et al.*, 1999; Bell y Laybourn-Parry, 2003; Bergstrom *et al.*, 2003; Mitra *et al.*, 2016). Los protistas mixotróficos han sido clasificados según diferentes criterios, por ejemplo, Jones (1997) los clasificó en función a su modo de nutrición y, más recientemente, Mitra *et al.* (2016) los categoriza como dos grupos funcionales: constitutivos y no constitutivos (Figura 1.2). Los mixótrofos constitutivos (CM, por sus siglas en inglés) poseen una capacidad fotosintética innata (es decir, poseen sus propios fotosistemas). En este grupo funcional se encuentran los nanoflagelados mixotróficos (MNF). Por otra parte, los mixótrofos no constitutivos (NCM, por sus siglas en inglés) adquieren la capacidad fotosintética a partir de la ingesta de presas autotróficas, manteniendo la célula completa o sólo sus fotosistemas. En este grupo funcional se encuentran los dinoflagelados de gran tamaño y ciliados mixotróficos. Adicionalmente, los NCM pueden dividirse de acuerdo a si los fotosistemas se obtienen de presas específicas (NCM especialistas) o de cualquier alga (NCM generalistas) (Mitra *et al.*, 2016) (Figura 1.2). Todos estos enfoques indican que existe un interés creciente en la comprensión de los diferentes tipos de mixotrofia y cómo los factores ambientales afectan el equilibrio fototrofia-fagotrofia.

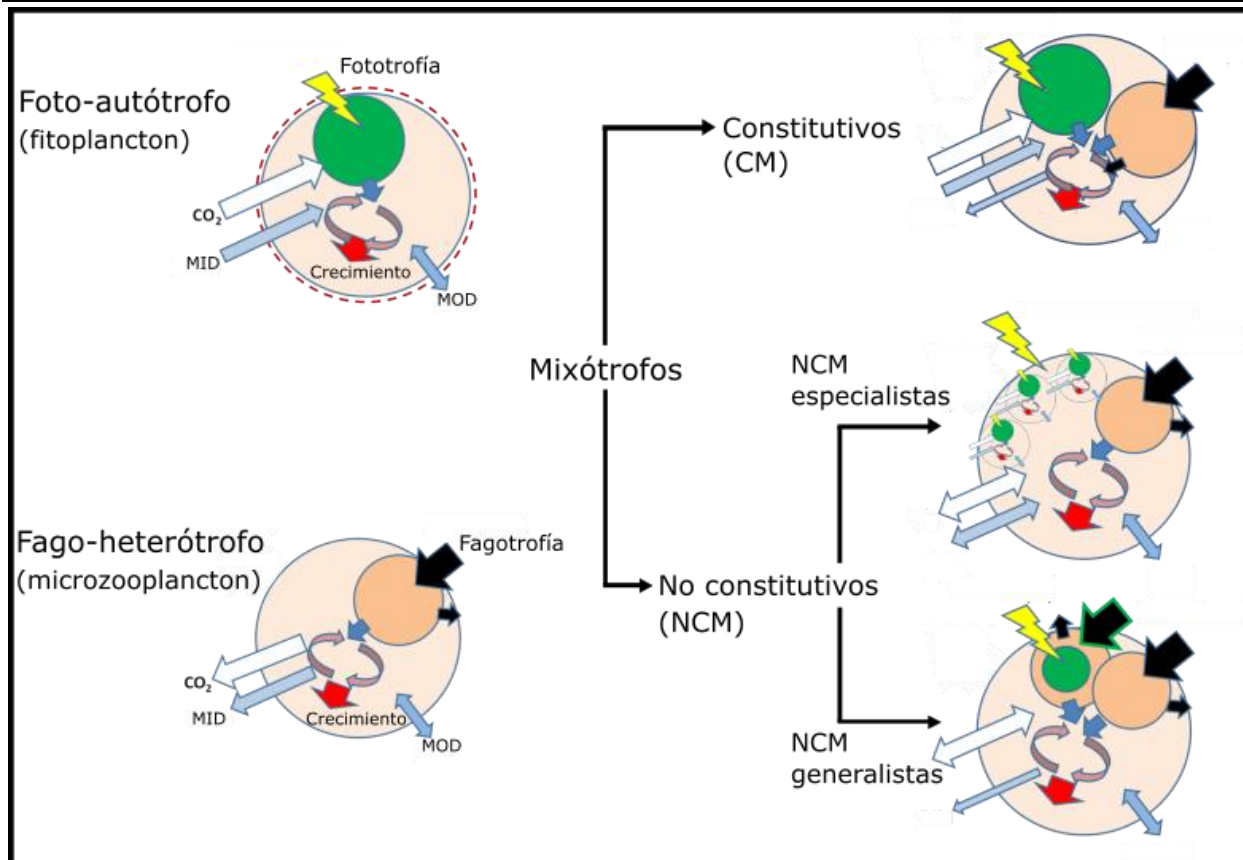


Figura 1.2: Estrategias nutricionales de los protistas, incluyendo la mixotrofia. Las flechas y símbolos representan las mismas interacciones en todos los esquemas. Referencias: MID = materia inorgánica disuelta; MOD = materia orgánica disuelta. Modificado de (Mitra *et al.*, 2016).

Si bien la existencia de la mixotrofia como estrategia nutricional entre las algas (es decir, mixótrofos constitutivos) se conoce desde hace más de 80 años (Biecheler, 1936), la importancia de las algas mixotróficas como potenciales depredadores dentro de la trama trófica (Sanders, 1991) cobró mayor relevancia a partir del mencionado trabajo de Bird y Kalff (1986). Actualmente, se considera que casi todas las Clases algales que presentan organismos flagelados (a excepción de las Chlorophyceae) albergan especies mixotróficas: Cryptophyceae, Chrysophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Dictyochophyceae, Chlorarachniophyceae, Euglenophyceae, Raphidophyceae y Prasinophyceae (Porter, 1988; Havskum y Riemann, 1996; Burkholder *et al.*, 2008; Flynn *et al.*, 2013; Maruyama y Kim, 2013). En ambientes de agua dulce, las especies de MNF pertenecen principalmente a las clases Cryptophyceae, Chrysophyceae, Dinophyceae y Haptophyceae. Asimismo, se ha demostrado que las algas mixotróficas son importantes



bacterívoros en ambientes tanto marinos como de agua dulce (Medina-Sánchez *et al.*, 2004; Unrein *et al.*, 2007; Zubkov y Tarran, 2008; Hartmann *et al.*, 2012). En lagos andino-patagónicos, el fitoplancton se encuentra dominado por distintas especies de MNF (Queimaliños *et al.*, 2002; Bastidas Navarro *et al.*, 2009; Queimaliños y Diaz, 2014; Gereá *et al.*, 2019) que se destacan como principales depredadores del picoplancton (Bastidas Navarro *et al.*, 2011; Gereá *et al.*, 2019).

Los ciliados y otros protistas, como los radiolarios y los foraminíferos (mixótrofos no constitutivos), adquirieron la capacidad fototrófica gracias a una asociación con organismos fotosintéticos (Stoecker *et al.*, 2009). En agua dulce, sólo los ciliados están presentes, y pueden representar una fracción importante de las comunidades del plancton (Laybourn-Parry *et al.*, 1997; Modenutti, 1997; Modenutti *et al.*, 2000; Macek *et al.*, 2001). Los distintos grupos de ciliados adquieren la capacidad fototrófica por medio de la ingesta de algas a través de la fagotrofía, reteniendo temporalmente los cloroplastos en un proceso denominado cleptoplastidia (Rogerson *et al.*, 1989; Stoecker *et al.*, 2009) o mediante la posesión del alga completa como endosimbionte (Reisser *et al.*, 1985; Stoecker y Silver, 1987; Perriss *et al.*, 1994) (Figura 1.2). Tanto los cloroplastos como las células completas son capaces de continuar con la fotosíntesis una vez ingeridas gracias a membranas vacuolares adaptadas que las protegen de ser digeridas (Johnson, 2011). La estabilidad de los plástidos transitorios varía considerablemente entre ciliados, pudiendo ser de días a meses dependiendo de la especie y las condiciones ambientales (Stoecker *et al.*, 2009; Johnson, 2011). En cambio, otros ciliados mantienen endosimbiosis con algas (principalmente del género *Chlorella*) que pueden permanecer durante todo el ciclo de vida del ciliado (Reisser, 1986; Summerer *et al.*, 2008; Stoecker *et al.*, 2009; Modenutti, 2014). Además de ser aprovechada como fuente de carbono, la fotosíntesis de los endosimbiontes provee oxígeno (Stoecker *et al.*, 2009), que permite a los ciliados de gran tamaño mantener sus funciones celulares y hasta sobrevivir en ambientes anóxicos (Finlay *et al.*, 1996).

La mixotrofia y su relación con la luz y los nutrientes

La productividad de los ecosistemas acuáticos está gobernada principalmente por los ingresos de luz y nutrientes (Hessen *et al.*, 2002; Diehl *et al.*, 2005). Para poder estudiar este tipo de balance, la estequiometría ecológica establece un marco conceptual, que considera el equilibrio relativo de los elementos químicos y el balance energético en las interacciones ecológicas (Reiners, 1986; Elser *et al.*, 1996; Elser y Urabe, 1999; Elser *et al.*, 2000; Sterner y Elser, 2002). Asimismo,



brinda información sobre los mecanismos fisiológicos de los organismos, y permite descubrir cómo las relaciones de los elementos químicos en los organismos modelan su ecología.

La combinación de fotosíntesis, alimentación fagotrófica y osmotrofia ubica a los protistas mixotróficos en múltiples niveles dentro de la red trófica, ya que pueden utilizar formas disueltas y particuladas de los nutrientes (Sanders *et al.*, 1990; Caron *et al.*, 1993; Caron, 2016). La mixotrofia implica un mayor costo energético para los organismos que la presentan, ya que requieren energía para sostener dos sistemas alimenticios (Rothhaupt, 1996; Raven, 1997). Sin embargo, presenta ventajas sobre los autótrofos y los heterótrofos estrictos ante situaciones de limitación por recursos, como luz o nutrientes, entre otros (Nygaard y Tobiesen, 1993; Marshall y Laybourn-Parry, 2002). En tales circunstancias se ha demostrado experimentalmente que los mixótrofos generalistas son más eficientes que los organismos especialistas, y por lo tanto terminan desplazándolos competitivamente (Tittel *et al.*, 2003; Katechakis y Stibor, 2006). A su vez, se ha observado que la mixotrofia tiene un efecto estabilizador sobre la red trófica frente a cambios en la disponibilidad de nutrientes (Moorthi *et al.*, 2017). De esta forma, la mixotrofia tiene implicancias directas para los ciclos de nutrientes y la producción secundaria a través de la regulación de las relaciones elementales de los productores primarios, amortiguando las restricciones estequiométricas para los herbívoros y permitiendo una mayor producción secundaria estable en comparación con sistemas dominados únicamente por fotótrofos estrictos (Moorthi *et al.*, 2017).

En sistemas acuáticos con mucha luz y pocos nutrientes las relaciones carbono:nutrientes de los productores primarios son elevadas (Sterner *et al.*, 1997), y la bacterivoría por parte de protistas mixotróficos es una interacción depredador-presa particularmente importante (Modenutti y Balseiro, 2002; Queimaliños *et al.*, 2002; Unrein *et al.*, 2014; Yvon-Durocher *et al.*, 2017). Se predice que los lagos transparentes con una alta relación luz-nutrientes tendrán una alta relación C:P (carbono:fósforo) y, por lo tanto, una mayor competencia por P entre protistas y bacterias, donde las últimas se ven favorecidas por una mayor relación superficie-volumen (Gurung *et al.*, 1999; Danger *et al.*, 2007). En este contexto, la mixotrofia representa una ventaja para los protistas al comerse a su competidor (Nygaard y Tobiesen, 1993; Fischer *et al.*, 2017). En esta interacción, el picoplancton (bacterias y Pcy) proporciona nutrientes esenciales a los protistas mixotróficos para compensar su fijación de carbono por fototrofia (Mitra *et al.*, 2016; Ptacnik *et al.*, 2016).



Particularmente, la toma del P proveniente de presas bacterianas por parte de los MNF constituye una vía clave del ciclo del P (Yvon-Durocher *et al.*, 2017). Sin embargo, a medida que la luz disminuye y los nutrientes aumentan, un incremento en la osmotrofía sobre la fagotrofía ha sido observado tanto en el campo (Waibel *et al.*, 2019), como experimentalmente (Ptacnik *et al.*, 2016; Fischer *et al.*, 2017) y predicho por modelos mecanicistas (Mitra *et al.*, 2016; Berge *et al.*, 2017).

La penetración de la luz en la columna de agua se reconoce como una característica clave que da forma a las relaciones elementales y a las interacciones bióticas del medio acuático (Sterner *et al.*, 1997). En ambientes de alta transparencia, como la zona pelágica de los océanos y muchos lagos oligotróficos, los niveles de luz pueden ser demasiado altos y la fotosíntesis se reducirá debido a un aumento de la fotoinhibición (Villafañe *et al.*, 2004; Callieri *et al.*, 2007; Gerla *et al.*, 2011). Asimismo, estos niveles superficiales pueden ser dañinos debido a la alta penetración de la radiación ultravioleta (UVR) que produce daño celular como fuera observado en lagos andinos patagónicos (Villafañe *et al.*, 2004). En estos lagos transparentes, la alta penetración de luz implicará una amplia zona eufótica donde un exceso o escasez de luz redundará en una baja tasa de fotosíntesis (Callieri *et al.*, 2007). Esta situación se traduce en que en ciertos niveles lumínicos intermedios se desarrollarán picos profundos de biomasa fitoplanctónica (estimada como clorofila) siendo denominados por su sigla en inglés como DCM (Deep Chlorophyll Maximum). Estos niveles en los lagos andinos patagónicos ocurren cerca del 1% de radiación fotosintéticamente activa (PAR) (Pérez *et al.* 2002) donde la abundancia de células fotótrofas y la eficiencia fotosintética es mayor (Callieri *et al.*, 2007; Modenutti *et al.*, 2013). En estos lagos, estos niveles de DCM se encuentran entre los 20 y los 35 m de profundidad y están constituidos principalmente por Pcy (Modenutti y Balseiro, 2002; Callieri *et al.*, 2007), MNF como la haptofita *Chrysochromulina parva* y la criptofita *Plagioselmis lacustris*, el dinoflagelado autotrófico *Gymnodinium paradoxum* y el ciliado mixotrófico *Ophrydium naumanni* (Queimaliños *et al.*, 1999; Modenutti *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2007; Modenutti *et al.*, 2008; Modenutti *et al.*, 2013). Por lo tanto, los protistas mixotróficos y sus presas coexisten en estos niveles de profundidad de los lagos (Modenutti y Balseiro, 2002).

La atenuación de la luz por incrementos en la turbidez puede afectar fuertemente el ecosistema acuático, pudiendo crear gradientes horizontales de atenuación luz que afectan la distribución y el comportamiento de la comunidad planctónica (Hylander *et al.*, 2011; Slemmons



et al., 2013). Particularmente, la turbidez inducida por partículas glaciares tendrá fuertes consecuencias para los organismos planctónicos, generando comunidades dominadas por microorganismos (Sommaruga, 2015). En lagos andinos, por ejemplo, en el lago Masecardi, se ha observado que los coeficientes de extinción de luz disminuyen desde el ingreso de arcilla proveniente de glaciares (Modenutti *et al.*, 2000) afectando a la distribución de los organismos y provocando que la profundidad del DCM aumente hacia el extremo más transparente del lago (Hylander *et al.*, 2011; Modenutti *et al.*, 2013). En estos gradientes, se ha observado además un aumento en la abundancia de Pcy, MNF dominantes como *C. parva*, y cambios en la comunidad del zooplancton a medida que el lago se vuelve más transparente (Modenutti *et al.*, 2013; Bastidas Navarro *et al.*, 2018).

El efecto del zooplancton en el bucle microbiano

El bucle microbiano se encuentra directamente relacionado con los niveles tróficos más altos de la trama trófica pelágica a través del pastoreo por parte del zooplancton (Jürgens, 1994; Li *et al.*, 2014). Los distintos integrantes del zooplancton, rotíferos y microcrustáceos, acceden a los diferentes componentes del bucle, aunque los grupos producen diferentes efectos de pastoreo (Modenutti *et al.*, 2003; Zöllner *et al.*, 2003). Los cladóceros pelágicos pueden filtrar eficazmente una amplia gama de tamaños de partículas, por lo cual acceden a casi todos los compartimentos del bucle (Brendelberger, 1991). Los primeros estudios han informado que diferentes especies del género *Daphnia* pueden acceder desde partículas pequeñas como las bacterias hasta nanoflagelados (Gophen y Geller, 1984; Jürgens, 1994). Esta capacidad de filtración de *Daphnia* se relaciona de manera directa con su tamaño corporal y con la distribución de las sedas de los apéndices torácicos (Figura 1.3). Por otro lado, los copépodos poseen una estructura bucal que les permite consumir nanoflagelados y ciliados de manera efectiva (Vrede y Vrede, 2005), sin embargo, no acceden a compartimentos tan pequeños como el picoplancton (Sanders *et al.*, 1989) (Figura 1.4). En particular, los copépodos calanoideos del género *Boeckella*, dominantes en cuerpos de agua del hemisferio sur, se han indicado como importantes consumidores de protistas mixotróficos (Burns y Schallenberg, 1996; Balseiro *et al.*, 2001; Modenutti *et al.*, 2003).

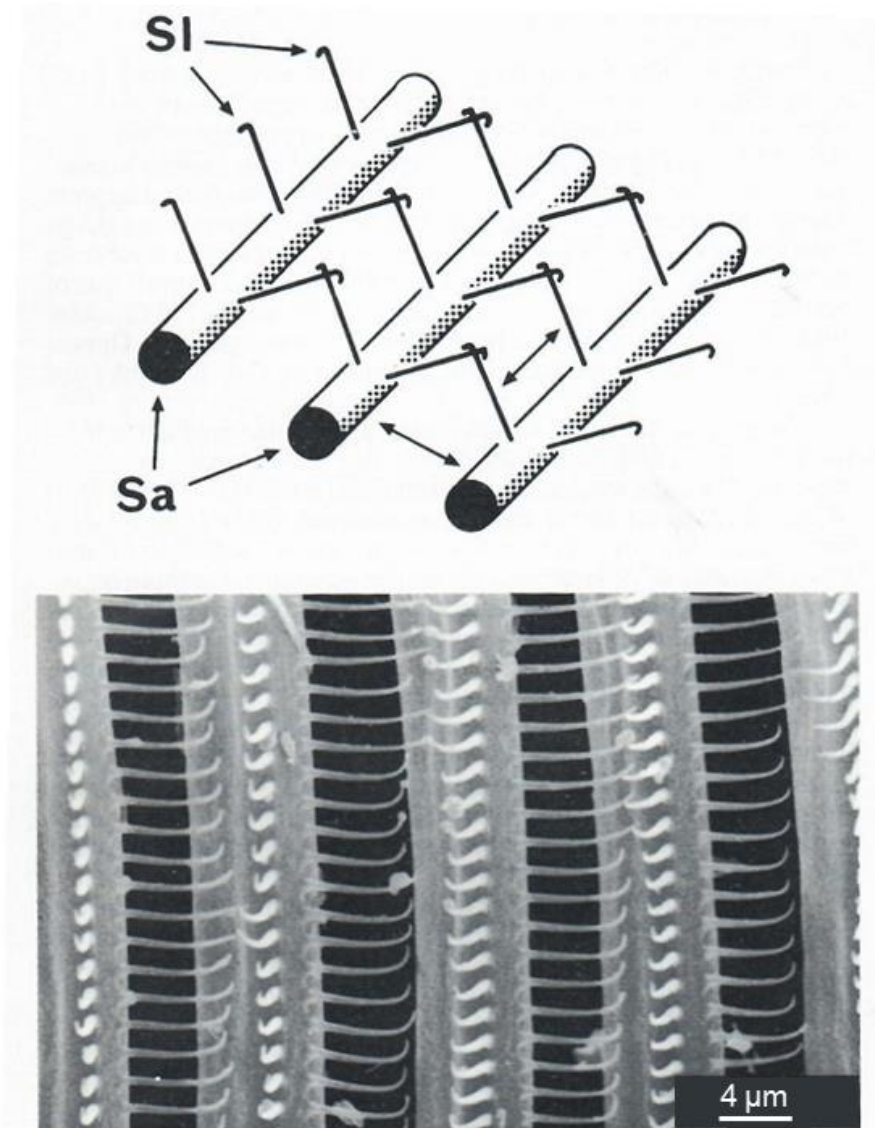


Figura 1.3: El aparato filtrador de *Daphnia magna*, tomado de Lampert (1987). La figura superior corresponde a un esquema del corte transversal del aparato filtrador que muestra las sedas dispuestas de forma paralela (Sa) y las sétulas (Sl) conectadas por puntas en forma de gancho. La figura inferior corresponde a una fotografía de microscopio de barrido de electrones donde se puede observar dos hileras de sétulas saliendo de cada seta.

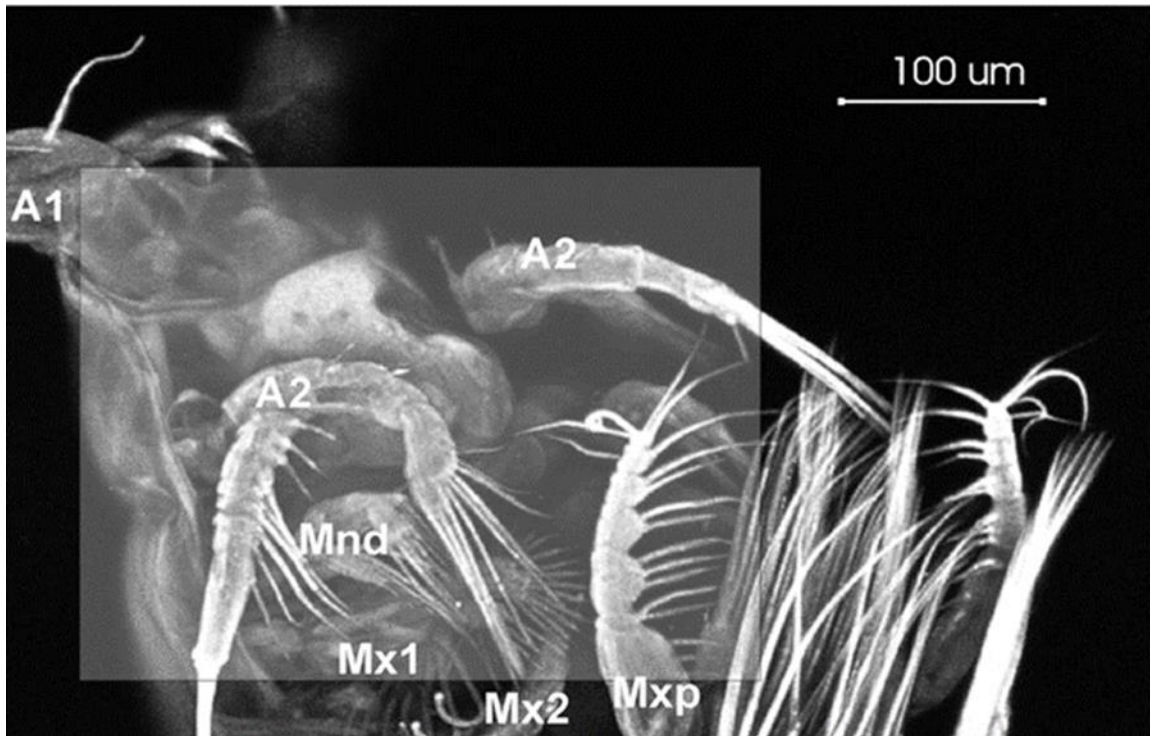


Figura 1.4: Aparato bucal de un copépedo calanoideo, tomado de Bundy y Vanderploeg (2002). Referencias: A1 y A2: Antenas. Mnd: Mandíbula, Mx1 y Mx2: Maxílas 1 y 2, Mxp: Maxilípedo. Nótese la ausencia de sétulas en Mx1 y Mx2.

En las redes tróficas planctónicas, el zooplancton actúa como sumidero de nutrientes al incorporarlos a su biomasa a través de la depredación, y como fuente al liberar nutrientes disueltos con la excreción (Balseiro *et al.*, 1997; Elser y Urabe, 1999; Branco *et al.*, 2018). La composición elemental del zooplancton suele ser más homeostática que la de sus presas y, por lo tanto, el zooplancton libera los nutrientes excedentes al medio acuático cuando consume alimentos que difieren de su composición elemental (Sterner y Elser, 2002). De esta forma, el reciclado mediado por el zooplancton puede cambiar la disponibilidad de nutrientes esenciales como el fósforo (P) y el nitrógeno (N) (Balseiro *et al.*, 1997; Elser y Urabe, 1999). La tasa de reciclado de un elemento en particular dependerá de los requisitos elementales del zooplancton dominante (Elser *et al.*, 1988; Balseiro *et al.*, 1997). En particular, los copépodos tienden a tener un C:P corporal relativamente más alto que los cladóceros y, por lo tanto, reciclan más P (Elser *et al.*, 1988; Sterner y Elser, 2002). En tal sentido, el zooplancton desempeña un papel importante en la estructuración de las redes tróficas microbianas al pastorear diferentes compartimentos de presas y reciclar parte de los nutrientes obtenidos cambiando las relaciones elementales.



La modelización de la red trófica planctónica y los mixótrofos

Los modelos matemáticos son una importante herramienta para abordar el análisis de las dinámicas complejas que ocurren entre los organismos y con el ambiente en el que habitan (Maynard-Smith, 1978; Hallam y Levin, 2012). Desde los modelos predador-presa pioneros de Lotka-Volterra, que ya cuentan con 100 años, hasta los modernos modelos espacio-temporales y de redes tróficas, las teorías que sustentan la ciencia de la ecología se ven expresadas en forma sintética como ecuaciones matemáticas. Actualmente, es ampliamente reconocido que nuestra aproximación a problemas en ecología es cada vez más cuantitativa, y que nuestra forma de explicar y predecir cambios en el ecosistema puede ser a través de modelos matemáticos.

Desde su implementación a principios del siglo pasado, los modelos matemáticos en ecología han evolucionado en concordancia con el conocimiento causal. Los modelos mecanicistas (o explicativos, derivados de la teoría hipotético-deductiva) intentan representar la causalidad e interacción entre las variables expresando matemáticamente la estructura y funcionamiento del ecosistema. En estos modelos, las funciones matemáticas formulan nuestro conocimiento e hipótesis de los mecanismos que relacionan a las variables (Schoener, 1986). Las ecuaciones pueden resolverse para obtener valores de predicción que pueden contrastarse con mediciones experimentales en el sistema real, y así, refutar o apoyar las hipótesis. Por otra parte, los modelos pueden ajustarse a los sistemas reales ya que sus parámetros pueden estimarse a partir de datos observacionales y/o experimentales (Ogle, 2009).

Particularmente, la modelización de la fotosíntesis en el ambiente acuático constituye un buen ejemplo de la combinación de formulaciones matemáticas ajustadas a datos, con modelos clásicos representando curvas de fotosíntesis-irradiancia (Jassby y Platt, 1976; Platt *et al.*, 1980; Eilers y Peeters, 1988; Huisman y Weissing, 1994) y modelos dinámicos involucrando la relación entre la luz y los nutrientes disueltos (Loladze *et al.*, 2000; Diehl, 2002). Estos modelos se componen de parámetros de relevancia biológica (como la constante de asimilación de fotones por una célula/fotosistema) que han sido estimados con datos experimentales tanto de laboratorio (MacIntyre *et al.*, 2002; Modenutti *et al.*, 2004) como en el campo (Platt *et al.*, 1980; Knoll *et al.*, 2003). Asimismo, se han aplicado para predecir variaciones en la biomasa de productores primarios en la columna de agua frente a cambios en las condiciones ambientales (Bouman *et al.*, 2018).



El avance en la aplicación de modelos cada vez más estructurados frente a datos ecológicos es posible gracias al desarrollo de herramientas estadísticas potentes. Los modelos resultantes pueden ser simples en términos biológicos, pero computacionalmente complejos para estimar parámetros relevantes a partir de datos empíricos y/o predecir nuevas observaciones (Dietze *et al.*, 2018). Afortunadamente, los métodos estadísticos bayesianos han demostrado ser una alternativa confiable a los métodos que se basan únicamente en la función de verosimilitud (Clark, 2005; Arhonditsis *et al.*, 2008; Zhang y Arhonditsis, 2009). La inferencia bayesiana proporciona una medida de la probabilidad que una hipótesis sea cierta a la luz de los datos disponibles, utilizando conocimientos previos junto con datos y tratando a los parámetros del modelo como variables aleatorias (Ellison, 2004; Clark, 2005). Actualmente, existen muchos trabajos en distintos campos de la ecología que utilizan inferencia bayesiana, desde movimiento animal (Beyer *et al.*, 2013) y ecología de poblaciones (Dorazio, 2016), hasta redes tróficas (Arhonditsis *et al.*, 2008; Solomon *et al.*, 2011). Por ejemplo, Lignell *et al.* (2013) propusieron un modelo que describe y predice interacciones tróficas en la comunidad planctónica marina con foco en el bucle microbiano. A partir de ecuaciones no lineales ampliamente conocidas (como la hipérbola de Michaelis-Menten) y un enfoque bayesiano para combinar datos experimentales con información previa, su contribución fue un modelo biológicamente realista de dinámica planctónica con valores estimados (distribuciones de probabilidad posteriores) para parámetros clave, como tasas de depredación y afinidad por nutrientes de distintos compartimentos planctónicos.

Basándome en todas las evidencias mencionadas, la presente Tesis Doctoral tuvo como pregunta central determinar el papel de los protistas mixotróficos en la red trófica planctónica de los lagos andinos norpatagónicos frente a cambios ambientales que afectan la disponibilidad de sus recursos (luz, nutrientes y presas) y la presencia de depredadores. Para responderla, abordamos el análisis de las interacciones tróficas de los protistas mixotróficos mediante la combinación de datos y experimentos de campo con modelos mecanicistas utilizando un enfoque estadístico Bayesiano. Primero, modelamos la fototrofía y fagotrofía de un mixótrofo constitutivo (el MNF *C. parva*) y uno no constitutivo (el ciliado *O. naumanni*) y analizamos cómo el balance entre ambas estrategias nutricionales se ve afectado por cambios en la disponibilidad de luz (Capítulo 2). A continuación, analizamos y modelamos las distintas vías por las cuales el ingreso de arcillas, producto de la retracción glacial, afecta la fagotrofía por parte de la comunidad de MNF de lagos andinos norpatagónicos (Capítulo 3). Luego, analizamos y modelamos cómo dos especies



contrastantes del zooplancton (el cladóceros *Diaphanosoma chilense* y el copépodo *Boeckella gibbosa*) afectan a los distintos compartimentos del bucle microbiano, incluidos los MNF, a través del pastoreo y el reciclado de nutrientes (Capítulo 4). Finalmente, en el último capítulo de este trabajo de Tesis Doctoral se exponen las principales conclusiones (Capítulo 5).



Objetivo General

Analizar las interacciones que ocurren entre los protistas mixótrofos, sus presas y sus depredadores en lagos andinos norpatagónicos mediante formulaciones matemáticas e inferencia bayesiana, procurando modelar las estrategias nutricionales de los mixótrofos frente a algunas variables bióticas y abióticas.

Objetivos Específicos

- Modelar el efecto de la luz en el balance entre fototrofia y fagotrofia de mixótrofos constitutivos y no constitutivos (CM y NCM) de lagos andinos norpatagónicos.
- Analizar y modelar el efecto de las arcillas glaciares en la fagotrofia de nanoflagelados mixotróficos de lagos andinos norpatagónicos afectados diferencialmente por la retracción glacial.
- Analizar y modelar los efectos del pastoreo y reciclado de nutrientes producto de distintas estructuras zooplanctónicas (copépodos y cladóceros) en el bucle microbiano planctónico.

Hipótesis

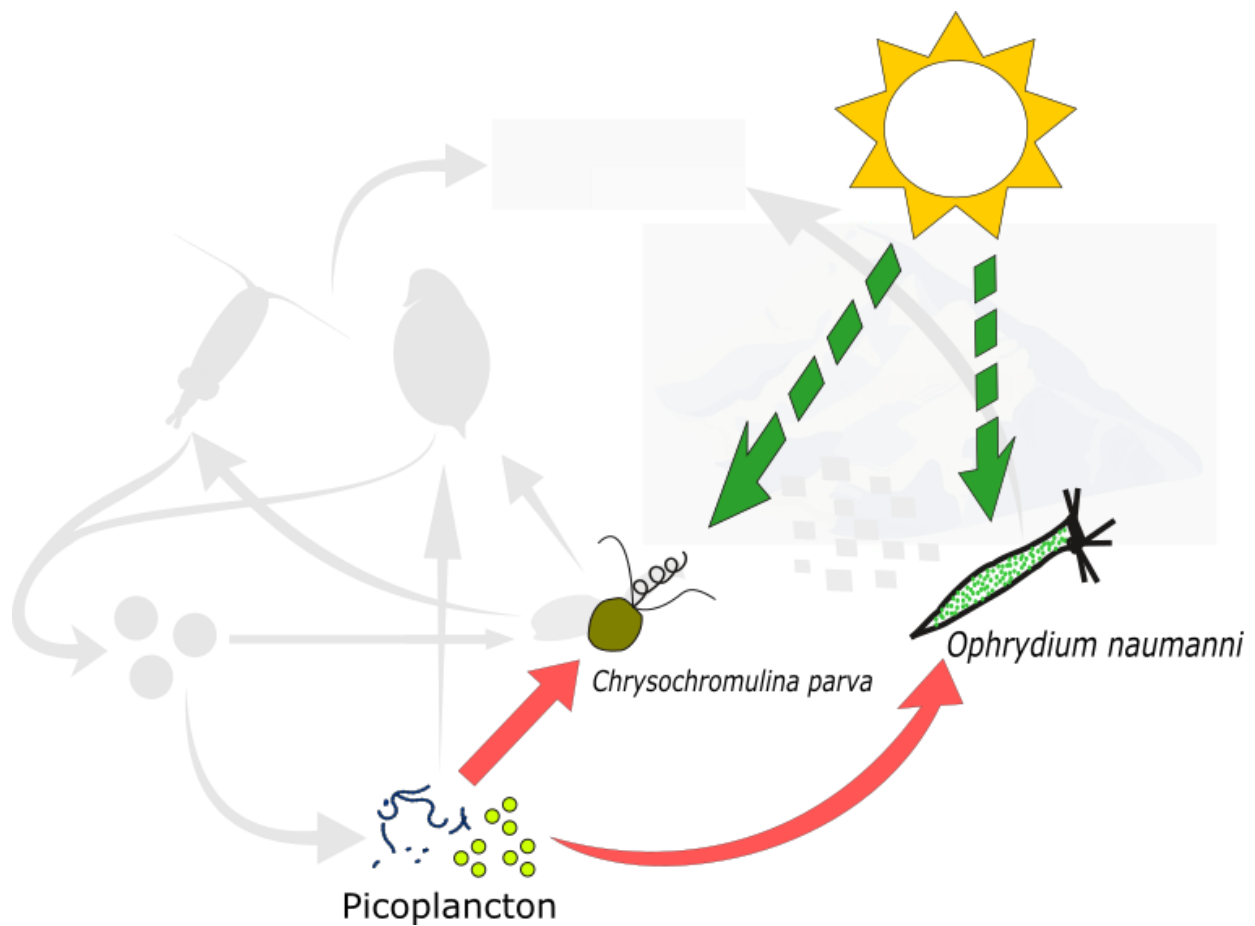
- Los grupos funcionales de mixótrofos (CM y NCM) diferirán en su balance fototrofia:fagotrofia en función de la luz.
- Las arcillas glaciares tendrán un doble efecto en la fagotrofia de los MNF a través de cambios en el ambiente lumínico e interferencia directa en la fagotrofia.
- La biomasa y el contenido de fósforo de los distintos compartimentos del bucle microbiano de ambientes oligotróficos, incluidos los nanoflagelados mixotróficos, depende del pastoreo y reciclado diferencial de P por parte de copépodos y cladóceros.

Los objetivos particulares y sus respectivas hipótesis se consignan en cada uno de los capítulos que integran la presente Tesis.



Capítulo 2

Modelado del efecto de la luz en el balance fototrofia:fagotrofia de mixótrofos constitutivos y no constitutivos





Introducción

Los protistas mixotróficos poseen estrategias nutricionales contrastantes y constituyen grupos clave que conectan las redes tróficas planctónicas. Estos pueden ser clasificados en mixótrofos constitutivos (CM) que tienen una capacidad fotosintética innata y mixótrofos no constitutivos (NCM) que la adquieren de sus presas. Esta diferencia entre grupos funcionales podría verse reflejada en su balance fototrofía-fagotrofía frente a distintas condiciones de luz subacuática (irradiancia). En este capítulo, modelamos la fototrofía y fagotrofía de protistas mixotróficos en función de la irradiancia. Ajustamos nuestros modelos con datos de producción primaria y bacterivoría provenientes de experimentos de laboratorio y de campo con el nanoflagelado *Chrysochromulina parva* (CM) y el ciliado *Ophrydium naumanni* (NCM), dos especies que dominan la comunidad planctónica de lagos andinos norpatagónicos.

La cantidad de luz que ingresa y se distribuye en un cuerpo de agua, expresada en adelante como irradiancia, es un factor clave que determina la producción primaria en las redes tróficas acuáticas. En este sentido, la relación fotosíntesis-irradiancia (P/I) es un enfoque fundamental para estimar la producción primaria del fitoplancton frente a diferentes ambientes lumínicos (Macedo *et al.*, 1998; Forget *et al.*, 2007). El modelado de esta relación se realizó con varias formulaciones matemáticas, siendo los modelos de Platt los más extendidos (Jassby y Platt, 1976; Platt *et al.*, 1980). En un primer modelo, Jassby y Platt (1976) propusieron una función hiperbólica de dos parámetros (Figura 2.1 C y α) con un aumento de la fotosíntesis a bajas irradiancias y fotosíntesis máxima asintótica a altas irradiancias (Figura 2.1 línea azul). Luego, Platt *et al.* (1980) incorporaron un nuevo parámetro (Figura 2.1 β) para considerar la disminución de la fotosíntesis que ocurre a altas irradiancias (fotoinhibición) (Figura 2.1 línea amarilla). Esta última ecuación, que es no monotónica, tiene una estructura similar a la ecuación previa, pero confiere más flexibilidad frente a un rango de irradiancia más amplio. Por lo tanto, la formulación no monotónica de Platt *et al.* (1980) ha sido elegida por muchos autores para modelar la fototrofía en ambientes con alta irradiancia, donde la fotoinhibición y el daño por luz son factores relevantes, como la zona pelágica marina y los lagos oligotróficos de montaña (Forget *et al.*, 2007).

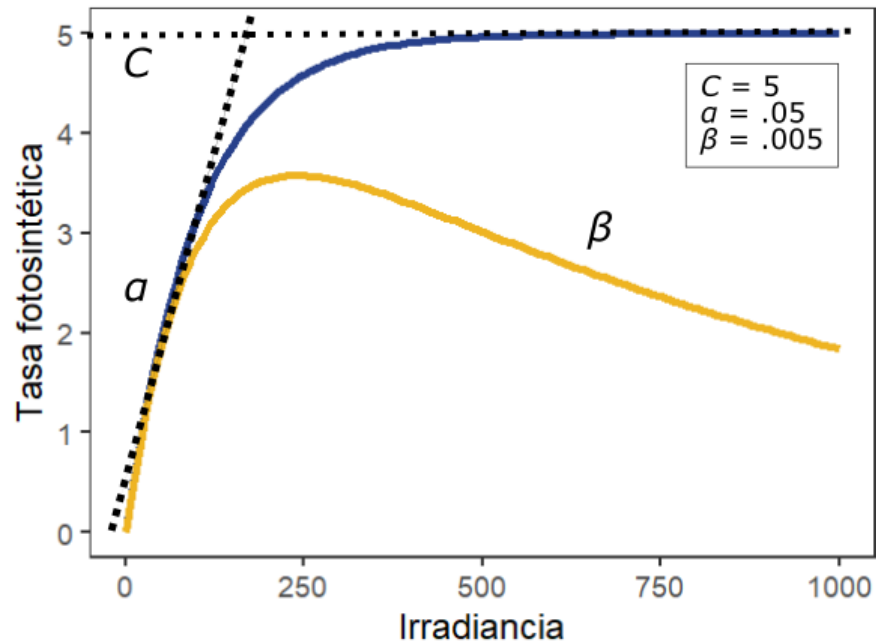


Figura 2.1: Curvas de Platt de fotosíntesis en función a la irradiancia. La curva azul corresponde a las ecuación de Jassby y Platt (1976) que cuenta con los parámetros C y a . La línea amarilla corresponde a la ecuación de Platt *et al.* (1980) que adiciona el parámetro β .

La luz desempeña un papel clave en las estrategias nutricionales de los protistas mixotróficos, teniendo un efecto directo en su función fototrófica (Jones, 2000). Los primeros enfoques conceptuales clasificaron a los mixótrofos en función de su modo de nutrición principal, y si la relación entre fototrofía y fagotrofía es directamente proporcional, inversa o independiente (Jones, 1997; Stoecker, 1998). En particular, los nanoflagelados mixotróficos (MNF) se consideraron tradicionalmente como 'fitoplancton fagotrófico', y la mayoría de los grupos son principalmente fototróficos, pero se benefician de la fagotrofía según la disponibilidad de luz (Jones, 1997). Por otro lado, los ciliados mixotróficos se denominaban tradicionalmente como 'protozoos fotosintéticos' (principalmente fagotróficos) en los que la fototrofía es un complemento de carbono para la nutrición (Stoecker *et al.*, 2009). Si bien el efecto de la luz sobre la fagotrofía de protistas mixotróficos se ha evaluado tanto en experimentos de campo como de laboratorio (Balseiro *et al.*, 2004; Ptacnik *et al.*, 2004; Waibel *et al.*, 2019), la representación de la fagotrofía en función de la irradiancia a través de modelos mecanicistas ha sido muy poco desarrollada.

Recientemente, los protistas mixotróficos han sido agrupados funcionalmente por (Mitra *et al.*, 2016) en constitutivos (CM) y no constitutivos (NCM) de acuerdo a la capacidad



fotosintética, siendo innata en los CM y adquirida (a través de fagotrofia) en los NCM. Esta clasificación se utilizó en la mayoría de los modelos de redes tróficas actuales para diferenciar la mixotrofia en diferentes rangos de tamaño, niveles tróficos y distribución biogeográfica (Leles *et al.*, 2018; Faure *et al.*, 2019). En este sentido, se considera que los CM son más flexibles para cambiar entre estrategias nutricionales dependiendo de las condiciones ambientales (Laybourn-Parry *et al.*, 2005; Berge *et al.*, 2017), mientras que los NCM dependen de la presa de la cual adquieren la fototrofia (Leles *et al.*, 2021).

Los lagos andinos norpatagónicos son oligotróficos (clorofila a $<1 \mu\text{g L}^{-1}$, fósforo total $<5 \mu\text{g L}^{-1}$) y extremadamente transparentes, con coeficientes de atenuación lumínica muy bajos ($K_{d\text{PAR}}$: $0.1-0.2 \text{ m}^{-1}$) (Morris *et al.*, 1995). La baja concentración de DOC ($< 1.5 \text{ mg L}^{-1}$) observada en estos lagos (Morris *et al.*, 1995) hace que la absorbancia específica dependa principalmente de la molécula de agua misma y, por lo tanto, la luz está dominada por las longitudes de onda verde y azul del espectro de luz visible (Pérez *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2007). La alta penetración de luz implica una amplia zona eufótica y el desarrollo de máximos profundos de clorofila (DCM) donde la mayor eficiencia fotosintética y abundancia de fitoplancton ocurren cerca del 1% del PAR superficial (Callieri *et al.*, 2007; Modenutti *et al.*, 2013). Estos DCM están constituidos principalmente por picocianobacterias (Pcy) (Modenutti y Balseiro, 2002; Callieri *et al.*, 2007), MNF (Queimaliños *et al.*, 2002; Modenutti *et al.*, 2013), y el ciliado mixótrofo *Ophrydium naumanni* (Queimaliños *et al.*, 1999; Modenutti *et al.*, 2004). Por lo tanto, los protistas mixotróficos (tanto CM como NCM) y sus presas (Pcy) coexisten en estos niveles profundos del lago (aproximadamente 30-35 m de profundidad) (Modenutti y Balseiro, 2002).

En lagos de los Andes norpatagónicos, los MNF y los ciliados mixotróficos representan las principales fracciones fototróficas y fagotróficas de la comunidad planctónica (Modenutti *et al.*, 2004; Callieri *et al.*, 2007; Modenutti *et al.*, 2013). En estos ambientes, el fitoplancton se encuentra dominado por distintas especies de MNF (Queimaliños *et al.*, 2002; Bastidas Navarro *et al.*, 2009; Bastidas Navarro *et al.*, 2011; Queimaliños y Diaz, 2014; Gereá *et al.*, 2019) donde la haptofita *Chrysochromulina parva* se destaca como uno de los principales consumidores del picoplancton (Gereá *et al.*, 2019). Asimismo, se ha indicado la presencia de un importante conjunto de ciliados mixótrofos incluyendo a oligotricos, peritricos y espiotricos con diferente capacidad fotosintética y fagotrófica (Modenutti, 1997; Modenutti y Pérez, 2001). En particular, el peritrico *O. naumanni*



(> 80 μm) posee una asociación mixotrófica con endosimbiontes fotosintéticos y no se registraron poblaciones sin la presencia de los mismos (Modenutti, 1997). Se ha observado que las células endosimbiontes (*Chlorella* sp.) son capaces de replicarse dentro de la célula huésped y, cuando tiene lugar la reproducción, se distribuyen en las células hijas de modo que las sucesivas generaciones de protistas ya se encuentran dotadas de células endosimbiontes (Modenutti, 2014). Dada la condición lumínica de los lagos que habitan ambos mixótrofos, *C. parva* y *O. naumanni*, están potencialmente expuestos a amplios rangos de variación lumínica desde altas irradiancias ($\sim 1500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) hasta bajas en el límite de la zona eufótica ($\sim 15 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Los trabajos realizados sobre MNF y el ciliado *O. naumanni* han señalado que existe una fuerte interdependencia de la fototrofia y fagotrofia con las condiciones lumínicas del ambiente. En ese sentido, las máximas eficiencias fotosintéticas fueron señaladas al nivel del 1 % de la luz incidente en superficie en coincidencia con el máximo profundo de clorofila (Modenutti *et al.*, 2004; Callieri *et al.*, 2007). Por otra parte, también se ha observado que la luz influye en la fagotrofia de ambos mixótrofos (Queimaliños *et al.*, 1999; Balseiro *et al.*, 2004; Modenutti y Balseiro, 2020). Sin embargo, resta aún dilucidar los balances que podrían resultar si ambas estrategias son analizadas de manera conjunta. La inferencia Bayesiana proporciona un buen marco estadístico para el ajuste de modelos no lineales mediante la combinación de datos empíricos e información previa, y la comparación de los parámetros resultantes a través de sus distribuciones de probabilidad (Arhonditsis *et al.*, 2008). En este capítulo, modelamos la fototrofia y fagotrofia de forma conjunta en dos protistas mixotróficos en función de la irradiancia. Posteriormente se ajustaron estos modelos con datos de campo y experimentales mediante inferencias Bayesianas y comparamos los dos grupos funcionales (CM y NCM) en base al balance entre ambas estrategias nutricionales.



Objetivo general

Modelar el efecto de la luz en el balance entre fototrofía y fagotrofía de mixótrofos constitutivos (CM) y no constitutivos (NCM).

Objetivos específicos

- Aplicar el modelo no monotónico de Platt et al. (1980) para calibrar la fototrofía en función de la irradiancia de un CM (*C. parva*) y un NCM (*O. naumanni*).
- Desarrollar un modelo mecanicista para la fagotrofía en función de la irradiancia de un CM (*C. parva*) y un NCM (*O. naumanni*).
- Ajustar el modelo de fagotrofía con datos experimentales de bacterivoría por parte de mixótrofos de lagos andinos norpatagónicos utilizando un enfoque Bayesiano.
- Analizar la fototrofía y fagotrofía del CM y el NCM en función de la irradiancia y cuantificar el balance entre ambas estrategias a partir de los modelos propuestos y ajustados previamente.

Hipótesis

Los grupos funcionales de mixótrofos (CM y NCM) diferirán en su balance fototrofía:fagotrofía en función de la luz.

Predicciones

La luz tendrá un efecto no monotónico tanto en la fototrofía como en la fagotrofía de ambos grupos funcionales de mixótrofos.

El balance entre fototrofía y fagotrofía frente a distintas condiciones lumínicas se mantendrá más estable en los CM que en los NCM.



Materiales y Métodos

Área de estudio

Los lagos de donde se obtuvieron los datos se ubican a 40-42°S y 71°O (Tabla 2.1), corresponden al distrito de lagos glaciares de los Andes australes (Iriondo, 1989) y pertenecen a los Parques Nacionales Nahuel Huapi y Los Alerces, en la región Patagonia Norte. El clima de la región es fresco (temperatura media anual de 8.7°C) con predominio de fuertes vientos del oeste y una precipitación media anual de 1500 mm (Pruel et al., 1998). El área se caracteriza por un extenso sistema hidrográfico que incluye lagos grandes y profundos ($Z_{\max} \sim 150$ m) así como lagos menos profundos ($Z_{\max} \sim 15$ m). Los lagos estudiados en este capítulo fueron: Nahuel Huapi, Correntoso, Espejo, Mascardi (brazo Catedral), Moreno (cubeta Oeste), Rivadavia y Los Cántaros. Con excepción de Los Cántaros, todos estos lagos son monomícticos cálidos con estratificación de verano desde noviembre a abril y termoclinas profundas (Tabla 2.1). Además, si bien estos lagos difieren mucho en su tamaño, todos son muy transparentes y cuentan con una extensa zona eufótica (Tabla 2.1).



Tabla 2.1: Ubicación, morfometría y características limnológicas de los lagos andinos norpatagónicos (Argentina) estudiados. Referencias: Z_{\max} = profundidad máxima del lago; Z_{therm} = profundidad de la termoclina durante el período de estratificación del lago; K_{dPAR} = coeficiente de atenuación de la radiación fotosintéticamente activa (PAR[400-700 nm]); $Z_{1\% \text{ PAR}}$ = profundidad del 1 % de la luz PAR incidente en superficie.

Lago	Ubicación	Área (km ²)	Z_{\max} (m)	Régimen térmico	Z_{therm} (m)	K_{dPAR} (m ⁻¹)	$Z_{1\% \text{ PAR}}$ (m)
Nahuel	40°47' S	557	464	Monomíctico cálido	> $Z_{1\%}$	0.09	49
Huapi	71°39' O						
Correntoso	40°44' S	19	>100	Monomíctico cálido	13	0.10	43
	71°39' O						
Espejo	40°40' S	30	245	Monomíctico cálido	15	0.11	41
	71°41' O						
Mascardi	41°20' S	39	118	Monomíctico cálido	11	0.16	28
	Catedral						
Moreno	41°05' S	5.2	90	Monomíctico cálido	19	0.15	33
	Oeste						
Rivadavia	42°34' S	21	147	Monomíctico cálido	28	0.22	31
	71°39' O						
Los Cántaros	41°00' S 71°49' O	0.2	12	Polimíctico	-	0.29	>12

Los protistas mixotróficos

En este capítulo utilizamos a *C. parva* y *O. naumanni* como representantes de un CM y un NCM, respectivamente. El alga mixotrófica *C. parva* (Haptophyceae) es un nanoflagelado pequeño (~5 μm) altamente bacterívoro (Figura 2.2 a, b y c) y es el MNF (CM) más importante y abundante de los lagos de la región (Gerea *et al.*, 2019). Por otro lado, *O. naumanni* es un ciliado peritrico (Figura 2.2 d) que contiene algas simbiotes del género *Chlorella* (hasta 450 células por ciliado, Queimaliños *et al.*, 1999) (Figura 2.2 e) por lo que debe ser considerado como un NCM especialista de acuerdo a la clasificación de Mitra (Mitra *et al.*, 2016).

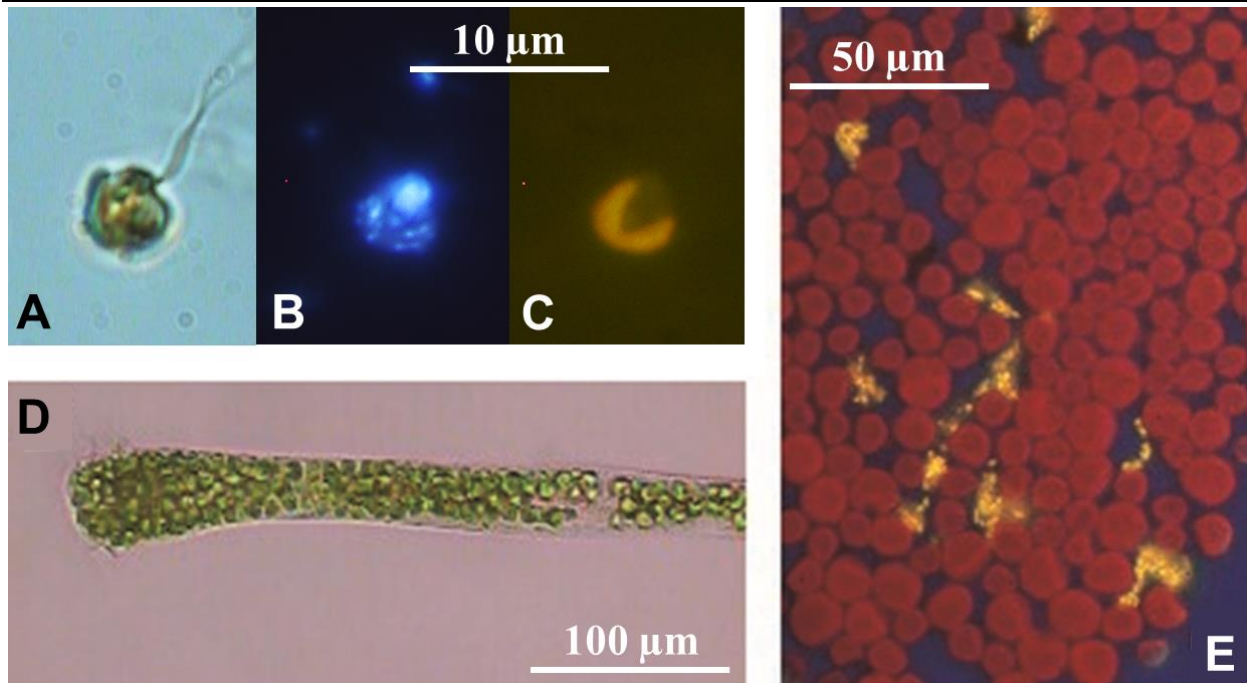


Figura 2.2: Los protistas mixotróficos estudiados en este capítulo: el MNF *Chrysochromulina parva* (A, B y C) y el ciliado *Ophrydium naumanni* (D y E). A = *C. parva* bajo microscopio invertido, B = *C. parva* bajo microscopio de epifluorescencia con radiación UV, C = *C. parva* bajo microscopio de epifluorescencia con luz azul, D = *O. naumanni* y sus *Chlorella* endosimbiontes bajo microscopio directo, E = *Chlorella* endosimbiontes (esferas rojas) y picocianobacterias ingeridas (puntos amarillos) por el ciliado *O. naumanni* bajo microscopio de epifluorescencia con luz azul.

Recopilación de datos de fototrofia y fagotrofia

Los datos utilizados en este capítulo se obtuvieron de trabajos previos que estimaron fototrofia y fagotrofia de protistas mixotróficos (CM y NCM) en función a la irradiancia a través de experimentos de laboratorio y de campo (Modenutti y Balseiro, 2002; Balseiro *et al.*, 2004; Modenutti *et al.*, 2004; Callieri *et al.*, 2007; Modenutti y Balseiro, 2020); así como nuevos experimentos de fagotrofia realizados en el campo que corresponden a esta Tesis (Tabla 2.2). En todos los casos los datos de irradiancia se consignan como luz PAR, correspondiente al espectro entre 400 y 700 nm de longitud de onda y expresada como $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La fototrofia fue estimada a partir de mediciones de producción primaria utilizando la técnica ^{14}C (Nielsen, 1952) en experimentos de campo y luego filtración para obtener MNF $> 2 \mu\text{m}$ (CM) o en el laboratorio con la exposición de un número conocido de *O. naumanni* (NCM). Los datos de fototrofia de nanoflagelados ($\text{pg C célula}^{-1} \text{h}^{-1}$) se obtuvieron de los experimentos de



producción primaria publicados en el trabajo de Callieri *et al.* (2007), realizados en 6 lagos andino-norpatagónicos a diferentes profundidades en un gradiente de luz (ver Tabla 2.2 para irradiancias). De este conjunto de datos, se seleccionaron los lagos en los que *C. parva* representaba más del 90% del fitoplancton $> 2 \mu\text{m}$. Los datos de fototrofía del ciliado *O. naumanni* ($\text{pg C ind.}^{-1} \text{h}^{-1}$) se obtuvieron de los experimentos de producción primaria publicados en el trabajo de Modenutti *et al.* (2004), realizados en el laboratorio con un gradiente de luz artificial (ver Tabla 2.2 para irradiancias). Estos experimentos de laboratorio permitieron aislar la producción primaria de *O. naumanni* de otros productores primarios más pequeños.

La fagotrofía fue estimada a partir de experimentos de bacterivoría utilizando bacterias marcadas con fluorescencia (FLB, por sus siglas en inglés) y luego contando bajo microscopía de epifluorescencia la cual permite la identificación de la presa marcada dentro de los protistas estudiados (CM o NCM) (Sherr *et al.*, 1987). Los datos de fagotrofía de nanoflagelados ($\text{pg C célula}^{-1} \text{h}^{-1}$) se obtuvieron de los experimentos de bacterivoría en el campo publicados en el trabajo de Balseiro *et al.* (2004) realizados en 2 lagos andinos norpatagónicos a diferentes profundidades, y nuevos experimentos de bacterivoría correspondientes al Capítulo III de esta Tesis, realizados en el lago Los Cántaros bajo diferentes condiciones de luz (ver Tabla 2.2 para irradiancias). Por otro lado, los datos de fagotrofía de *O. naumanni* se obtuvieron de Modenutti y Balseiro 2002, 2020, y de Balseiro *et al.* (2004) realizados tanto en campo como en laboratorio (ver Tabla 2.2 para irradiancias).



Tabla 2.2: Características de los experimentos de fototrofía y fagotrofía utilizados para el ajuste de los modelos. Referencias: CM: mixótrofo constitutivo; NCM: mixótrofo no constitutivo; FLB: Bacterias marcadas con fluorescencia; *I*: rango de irradiancia ($\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tipo de mixótrofo	Tipo de experimento	Modo de nutrición	Método	Lago	<i>I</i>	Referencias
NCM	Laboratorio	Fototrofía	^{14}C	Moreno	0-700	Modenutti <i>et al.</i> (2004)
NCM	Campo	Fagotrofía	FLB	Rivadavia Moreno	0-600	Balseiro <i>et al.</i> (2004)
NCM	Laboratorio/Campo	Fototrofía Fagotrofía	^{14}C FLB	Moreno	0-600	Modenutti y Balseiro (2002, 2020)
CM	Campo	Fototrofía	^{14}C	Nahuel Huapi Espejo Correntoso Mascardi	17-1750	Callieri <i>et al.</i> (2007)
CM	Campo	Fagotrofía	FLB	Rivadavia Moreno	0-300	Balseiro <i>et al.</i> (2004)
CM	Campo	Fagotrofía	FLB	Los Cántaros	100-1250	Capítulo III de esta tesis



Construcción del modelo

La fototrofia se modeló utilizando la formulación de Platt *et al.* (1980) que, como se explicó anteriormente, es una ecuación no monotónica de tres parámetros para la fototrofia (Phot) en función a la irradiancia (I):

$$\text{Phot}_{(I)} = C_{\text{Phot}} * (1 - e^{-\alpha_{\text{Phot}} * I / C_{\text{Phot}}}) * e^{-\beta_{\text{Phot}} * I / C_{\text{Phot}}} \quad (1)$$

donde C_{Phot} (pg C cél⁻¹ h⁻¹ para CM o pg C ind⁻¹ h⁻¹ para NCM) es la fototrofia teórica máxima (o también “número de asimilación” de acuerdo a Platt *et al.* (1980)), α_{Phot} (pg C cél⁻¹ h⁻¹ μmol fotones⁻¹ m² o pg C ind⁻¹ h⁻¹ μmol fotones⁻¹ m² s) es la pendiente creciente de fototrofia a bajas irradiancias, y β_{Phot} (pg C cél⁻¹ h⁻¹ μmol fotones⁻¹ m² o pg C ind⁻¹ h⁻¹ μmol fotones⁻¹ m² s) es la pendiente decreciente de fototrofia a altas irradiancias.

Por otro lado, la fagotrofia (Phag) también se modeló en función de la irradiancia con una ecuación no monotónica basada en la formulación de Platt *et al.* (1980), con cuatro parámetros:

$$\text{Phag}_{(I)} = C_{\text{Phag}} * (1 - e^{(\gamma_{\text{Phag}} - \alpha_{\text{Phag}} * I) / C_{\text{Phag}}}) * e^{-\beta_{\text{Phag}} * I / C_{\text{Phag}}} \quad (2)$$

donde C_{Phag} , α_{Phag} y β_{Phag} son análogos a los parámetros de la Ecuación 1 (comparten las mismas unidades) y γ_{Phag} (pg C cél⁻¹ h⁻¹ o pg C ind⁻¹ h⁻¹) es un parámetro adicional independiente de la irradiancia que explica la fagotrofia en la oscuridad, ya que la fagotrofia no es 0 en la oscuridad como sí lo es la fototrofia en la ecuación de Platt.

Calibración del modelo

El uso de ecuaciones no lineales para representar dinámicas en ecología, como las interacciones tróficas, puede generar grandes costos computacionales para estimar correctamente los parámetros (Clark, 2005). En este contexto, la inferencia Bayesiana proporciona un marco excelente al combinar los datos empíricos con información previa sobre los parámetros (Arhonditsis *et al.*, 2008). Nuestro análisis Bayesiano se realizó utilizando el lenguaje STAN interconectado con la interfaz de R studio a través del paquete 'brms' (Bürkner, 2017). Ajustamos la Ecuación 1 con los datos de fototrofia de CM y NCM y la Ecuación 2 con los datos de fagotrofia de CM y NCM, obteniendo cuatro ajustes de modelos denominados 'CM-Phot', 'NCM-Phot', 'CM-Phag' y 'NCM-Phag', respectivamente. El efecto del sitio experimental (campo versus laboratorio y entre lagos) se tuvo en cuenta como factor aleatorio mediante el uso de Bayes jerárquico



(Bürkner, 2018). Para asegurar que las distribuciones posteriores de nuestro modelo sean estimadas principalmente por nuestros datos experimentales y no por las distribuciones previas elegidas, se probaron cuatro conjuntos de distribuciones previas diferentes para la dinámica inicial de los parámetros del modelo, desde distribuciones de probabilidad altamente informativas hacia menos informativas basadas en la dependencia con nuestros datos experimentales (Tabla 2.3). Para evitar problemas de convergencia, se prefirieron distribuciones normales con varianza creciente respecto a distribuciones uniformes planas (Bürkner, 2017). Luego, se calcularon y compararon la media posterior y las distribuciones de probabilidad de los parámetros de los modelos cuantificando la superposición entre ellas (Arhonditsis *et al.*, 2008). Finalmente, se realizaron verificaciones predictivas de las distribuciones posteriores de nuestros modelos ajustados con todos los conjuntos de distribuciones previas y se calculó el R^2 Bayesiano para cuantificar la precisión del ajuste entre los valores observados y predichos (Bürkner, 2017).



Tabla 2.3: Los distintos conjuntos de distribuciones previas utilizadas para cada parámetro de los modelos en función de su dependencia con nuestros datos experimentales. Referencias: Max_{phot} : tasa máxima de fototrofia obtenida experimentalmente; Max_{phag} : tasa máxima de fagotrofia obtenida experimentalmente; C_{phot} : máximo teórico de fototrofia; α_{phot} : pendiente positiva de la fototrofia a baja irradiancia; β_{phot} : pendiente negativa de la fototrofia a alta irradiancia; C_{phag} : máximo teórico de fagotrofia; α_{phag} : pendiente positiva de la fagotrofia a baja irradiancia; β_{phag} : pendiente negativa de la fagotrofia a alta irradiancia; γ_{phag} : fagotrofia en oscuridad; μ : media de la distribución Gaussiana; τ : varianza de la distribución Gaussiana; $I_{Max_{phot}}$: Irradiancia donde se obtuvo experimentalmente la tasa máxima de fototrofia; $I_{Max_{phag}}$: Irradiancia donde se obtuvo experimentalmente la tasa máxima de fagotrofia; $mean$: media aritmética; sd : desvío estándar.

Parámetro	Set 1	Set 2	Set 3	Set 4
C_{phot}	$\mu_{C_{phot}}$ $= mean(Max_{phot})$ $\tau_{C_{phot}}$ $= sd(Max_{phot})^2$	$\mu_{C_{phot}}$ $= mean(Max_{phot} * 2)$ $\tau_{C_{phot}}$ $= sd(Max_{phot} * 2)^2$	$\mu_{C_{phot}}$ $= mean(Max_{phot})$ $\tau_{C_{phot}}$ $= sd(Max_{phot} * 2)^2$	$\mu_{C_{phot}}$ $= mean(Max_{phot} * 2)$ $\tau_{C_{phot}}$ $= sd(Max_{phot} * 4)^2$
α_{phot}	$\mu_{\alpha_{phot}} = \mu_{C_{phot}} / I_{Max_{phot}}$ $\tau_{\alpha_{phot}} = \tau_{C_{phot}} / I_{Max_{phot}}$			
β_{phot}	$\mu_{\beta_{phot}} = \mu_{\alpha_{phot}} / 10$ $\tau_{\beta_{phot}} = \tau_{\alpha_{phot}} / 10$			
C_{phag}	$\mu_{C_{phag}}$ $= mean(Max_{phag})$ $\tau_{C_{phag}}$ $= sd(Max_{phag})^2$	$\mu_{C_{phag}}$ $= mean(Max_{phag} * 2)$ $\tau_{C_{phag}}$ $= sd(Max_{phag} * 2)^2$	$\mu_{C_{phag}}$ $= mean(Max_{phag})$ $\tau_{C_{phag}}$ $= sd(Max_{phag} * 2)^2$	$\mu_{C_{phag}}$ $= mean(Max_{phag} * 2)$ $\tau_{C_{phag}}$ $= sd(Max_{phag} * 4)^2$
α_{phag}	$\mu_{\alpha_{phag}} = \mu_{C_{phag}} / I_{Max_{phag}}$ $\tau_{\alpha_{phag}} = \tau_{C_{phag}} / I_{Max_{phag}}$			
β_{phag}	$\mu_{\beta_{phag}} = \mu_{\alpha_{phag}} / 10$ $\tau_{\beta_{phag}} = \tau_{\alpha_{phag}} / 10$			
γ_{phag}	$\mu_{\gamma_{phag}} = \mu_{C_{phag}}$ $\tau_{\gamma_{phag}} = \tau_{C_{phag}}$			



Validación del modelo

Evaluamos la capacidad predictiva de nuestros modelos de fototrofía y fagotrofía en función de la irradiancia mediante la técnica de validación cruzada (Boyce *et al.*, 2002; Gelman *et al.*, 2020). Para ello, cada uno de nuestros conjuntos de datos se dividió iterativamente en 90% de datos destinados a entrenamiento del modelo y 10% de datos destinados a prueba para evaluar el ajuste del modelo. Este procedimiento se realizó diez veces ($k = 10$), sin repetición de datos de prueba entre subconjuntos. Luego validamos nuestros modelos usando el error absoluto medio (*mean absolute error*, MAE) calculado para cada uno de los subconjuntos de datos de prueba. El MAE posee las mismas unidades y escala que los datos originales y se puede interpretar como la diferencia entre los valores predichos y observados de la variable respuesta, en nuestro caso, las tasas de fototrofía y fagotrofía.

Resultados

Datos experimentales y ajuste del modelo

En el caso del CM *C. parva* y a partir de los experimentos de producción primaria y de bacterivoría, se observó un efecto no monotónico de la irradiancia tanto sobre la fototrofía como sobre la fagotrofía (Figura 2.3 círculos). En los experimentos de fototrofía, las tasas de producción primaria más altas se observaron con irradiancias bajas a intermedias (20 y $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mientras que las tasas más bajas se observaron con irradiancias altas ($> 800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De manera similar, en los experimentos de bacterivoría, las tasas de fagotrofía más altas se observaron con irradiancias intermedias ($100\text{-}300 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y los valores más bajos se encontraron con altas irradiancias ($> 750 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Resulta interesante remarcar que la incorporación del parámetro γ_{Phag} permitió ajustar la bacterivoría a irradiancia 0, que fue de $0.35 \text{ pg C c\acute{e}l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. De acuerdo a esto, nuestros modelos ajustados y denominados 'CM-Phot' y 'CM-Phag' mostraron funciones no monotónicas para la fototrofía y fagotrofía del CM *C. parva* (Figura 2.3 líneas). Ambos modelos mostraron un buen ajuste a los datos observados (R^2 de 'CM-Phot' = 0.72 y R^2 de 'CM-Phag' = 0.83) ya que la mayoría de los puntos se ubicaron dentro del intervalo de credibilidad Bayesiano del 95% (Figura 2.3 bandas grises). Según el modelo 'CM-Phot', la fototrofía media aumenta de 0 a $0.68 \text{ pg C c\acute{e}l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dentro de un rango de irradiancia de $0\text{-}65 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luego disminuye a $0.14 \text{ pg C c\acute{e}l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $2000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por otro lado, según el modelo 'CM-Phag', la fagotrofía media aumenta de 0.35 a $0.58 \text{ pg C c\acute{e}l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dentro



de un rango de irradiancia de 0-110 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luego disminuye a 0.08 $\text{pg C c\acute{e}l}^{-1} \text{h}^{-1}$ a 2000 $\mu\text{mol de fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

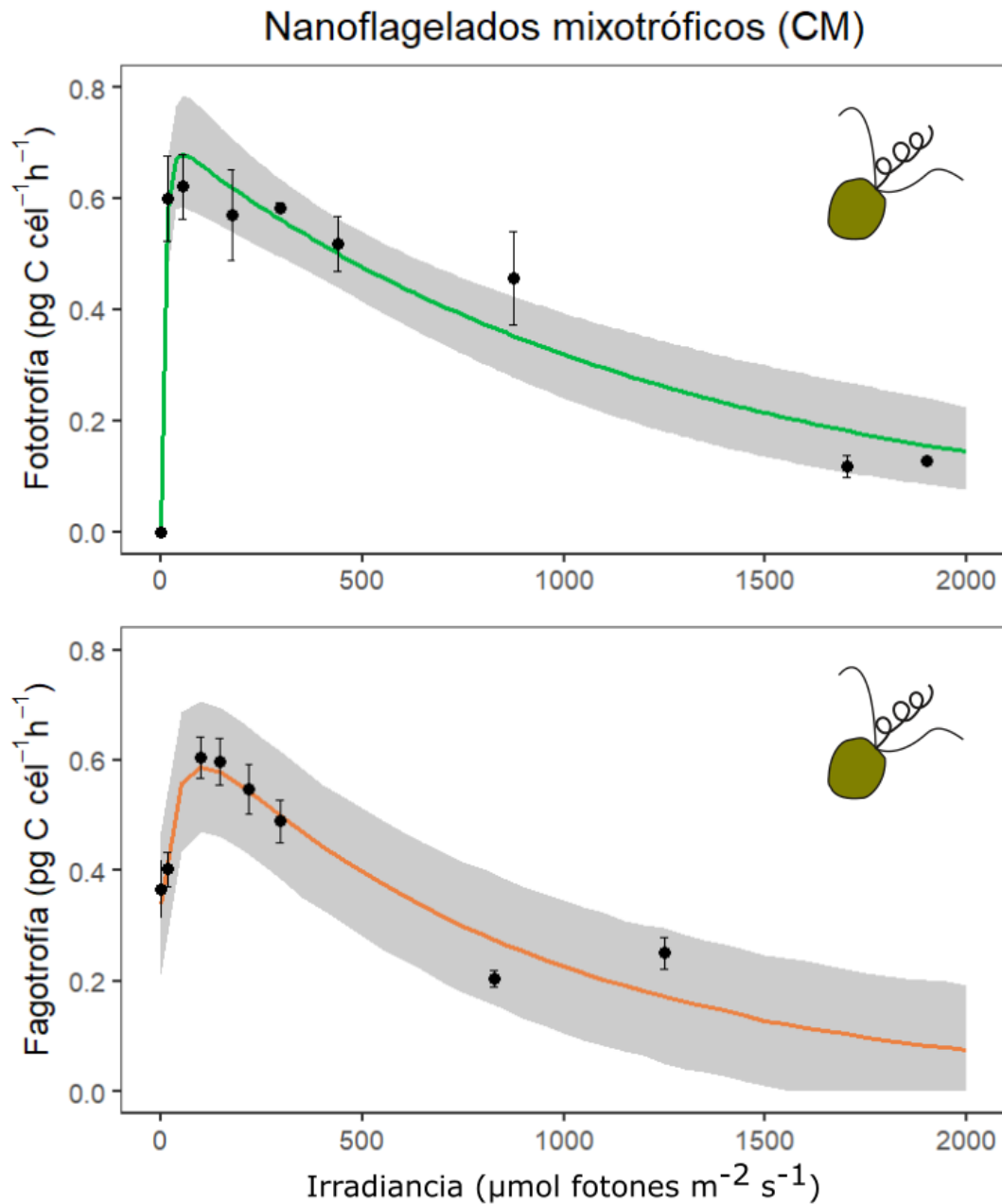


Figura 2.3: Curvas de fototrofia y fagotrofia en funci\u00f3n de la irradiancia para el CM *Chrysochromulina parva*. Los c\u00edrculos representan las tasas de fototrofia y fagotrofia medias y sus barras corresponden al error est\u00e1ndar. Las l\u00edneas corresponden a la fototrofia y la fagotrofia medias estimadas por los modelos 'CM-Phot' y 'CM-Phag', respectivamente. Las bandas grises representan los intervalos de credibilidad bayesianos del 95%.



Para el caso del NCM *O. naumanni* y de manera similar al CM analizado, observamos un efecto no monotónico de la irradiancia sobre la fototrofía y fagotrofía (Figura 2.4 círculos). En los experimentos de fototrofía, las tasas de producción primaria más altas se observaron con irradiancias bajas a intermedias (10 y $110 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mientras que los valores más bajos se encontraron con irradiancias más altas ($> 300 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En los experimentos de bacterivoría, la fagotrofía más alta se encontró con baja irradiancia ($35 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y los valores más bajos se encontraron con irradiancias más altas ($> 300 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$). De acuerdo con estos resultados, nuestros modelos denominados 'NCM-Phot' y 'NCM-Phag' mostraron claramente funciones no monotónicas para la fototrofía y fagotrofía del NCM *O. naumanni*, respectivamente (Figura 2.4 líneas). Ambos modelos mostraron un buen ajuste a los datos observados (R^2 de 'NCM-Phot' = 0.68 y R^2 de 'NCM-Phag' = 0.76) con la mayoría de los puntos ubicados dentro del intervalo de credibilidad Bayesiano del 95% (Figura 2.4 bandas grises). Según el modelo 'NCM-Phot', la fototrofía media aumenta de 0 a $191 \text{ pg C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dentro de un rango de irradiancia de 0 - $35 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luego disminuye a $105 \text{ pg C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en $750 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por otro lado, según el modelo 'NCM-Phag', la fagotrofía media aumenta de 3.6 a $23 \text{ pg C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ dentro de un rango de irradiancia de 0 - $55 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y luego disminuye a $4.2 \text{ pg C ind}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a $750 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

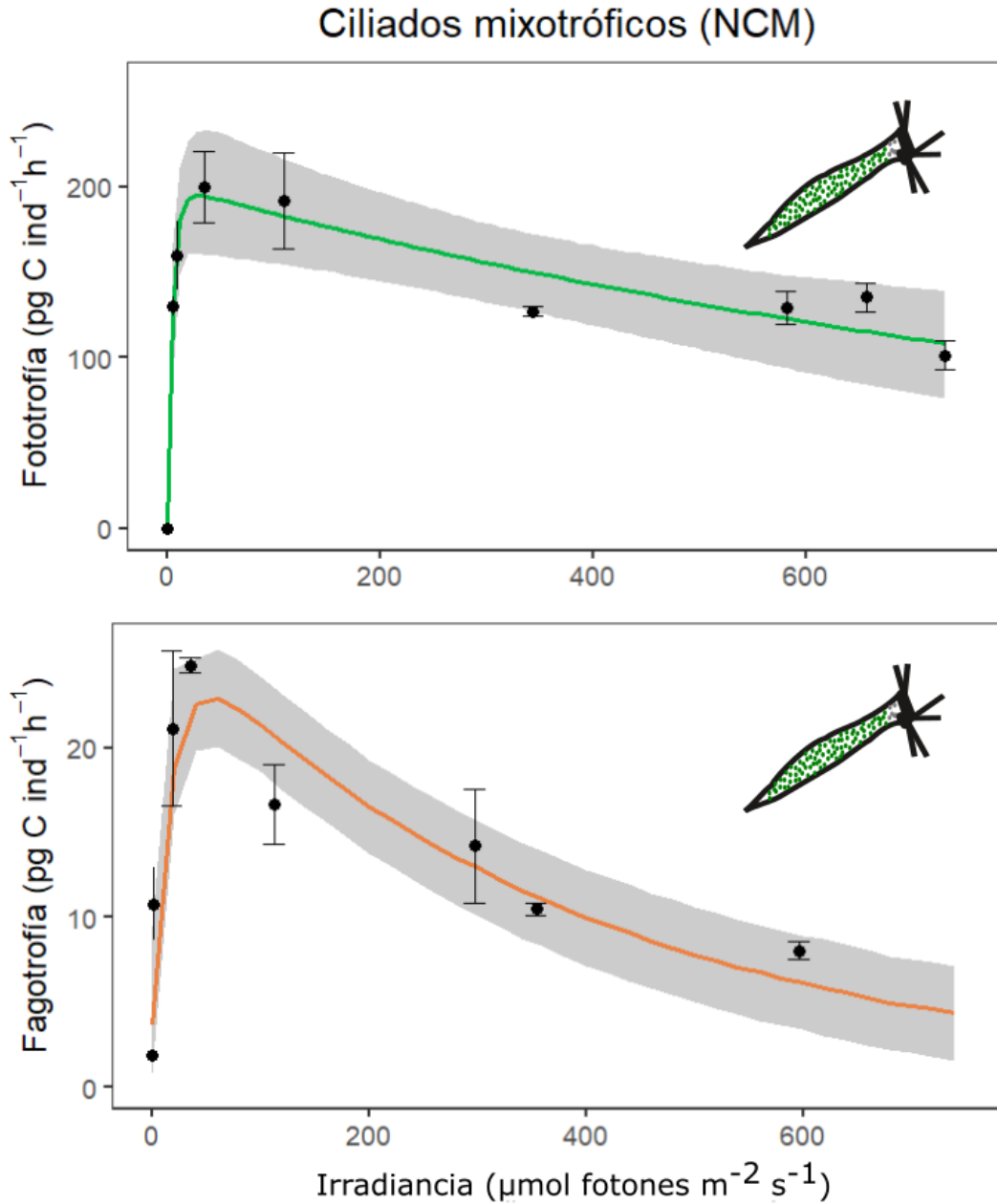


Figura 2.4: Curvas de fototrofia y fagotrofia en función de la irradiancia para el CM *Ophrydium naumanni*. Los círculos representan las tasas de fototrofia y fagotrofia medias y sus barras corresponden al error estándar. Las líneas corresponden a la fototrofia y la fagotrofia medias estimadas por los modelos 'NCM-Phot' y 'NCM-Phag', respectivamente. Las bandas grises representan los intervalos de credibilidad bayesianos del 95%.

*Distribuciones posteriores de los parámetros del modelo*

Del análisis de las distribuciones, se observa una alta superposición entre las distribuciones posteriores de los parámetros ajustados para todos nuestros modelos, independientemente de las distribuciones previas aplicadas (Figuras 2.5 y 2.6). Solo el parámetro α_{Phot} en los modelos 'CM-Phot' y 'NCM-Phot' mostró distribuciones posteriores ligeramente más bajas usando el primer conjunto de previas (distribuciones de parámetros altamente informativas) que usando los demás conjuntos (distribuciones de parámetros menos informativas) (Figuras 2.5 y 2.6). Al comparar los parámetros obtenidos en los modelos 'CM-Phot' y 'CM-Phag', observamos que solo α resultó diferente entre fototrofía y fagotrofía, donde α_{Phot} era cuatro veces mayor que su equivalente α_{Phag} (Figura 2.5). Además, el parámetro γ_{Phag} del modelo 'CM-Phag' mostró una distribución posterior consistente independientemente del conjunto de previas utilizado (Figura 2.5), con valores ligeramente más bajos que la posterior del parámetro C_{Phag} . Por otro lado, las distribuciones posteriores medias de los parámetros α_{Phot} , β_{Phot} y C_{Phot} del modelo 'NCM-Phot' fueron más altas que los parámetros equivalentes α_{Phag} , β_{Phag} y C_{Phag} del modelo 'NCM-Phag', con mayores diferencias en el primer par y menores diferencias en el último par (Figura 2.6). Además, el parámetro γ_{Phag} del modelo 'NCM-Phag' mostró una distribución posterior consistente independientemente del conjunto de previas utilizado (Figura 2.6) y seis veces menor que la posterior del parámetro C_{Phag} .

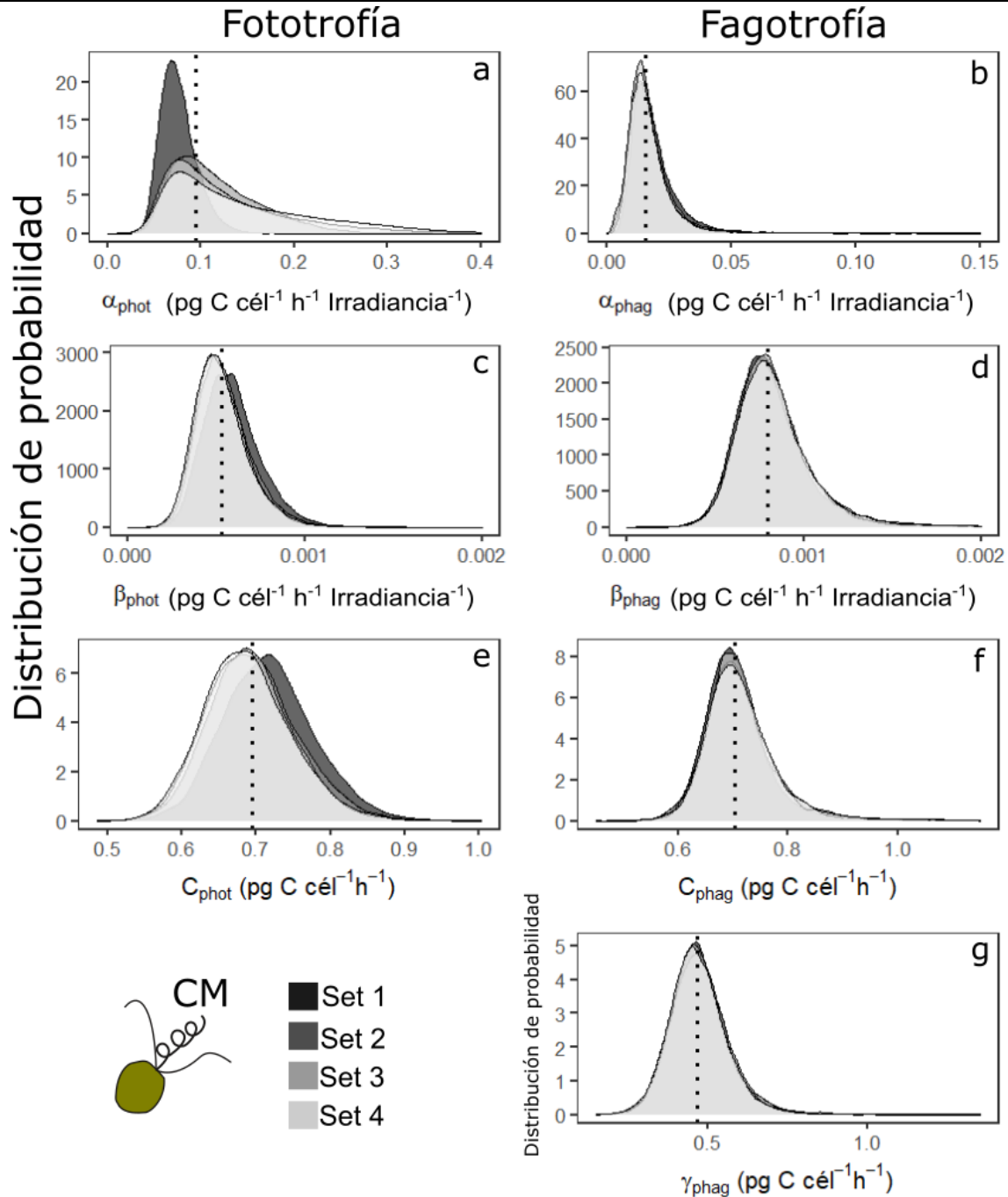


Figura 2.5: Distribuciones posteriores de los parámetros de fototrofía y fagotrofía del CM (*Chrysochromulina parva*). Referencias: a, c y e: modelo ‘CM-Phot’ y b, d, f y g: modelo ‘CM-Phag’. Los diferentes tonos de gris representan el mismo modelo ajustado con un conjunto diferente de distribuciones previas: muy informativo (set 1); informativo (set 2); menos informativo (set 3); y poco informativo (set 4). La línea punteada muestra la mediana de todas las distribuciones posteriores.

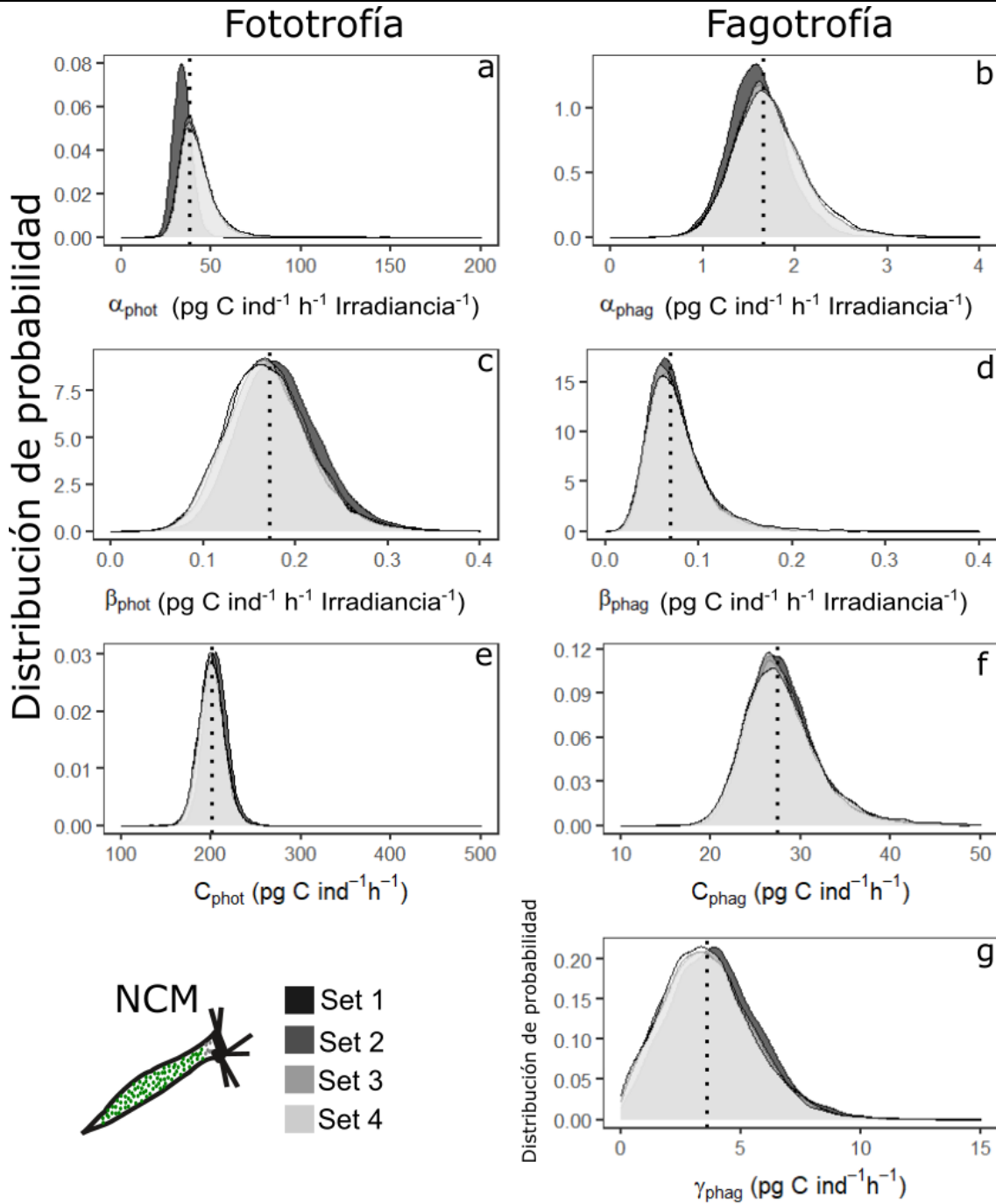


Figura 2.6: Distribuciones posteriores de los parámetros de fototrofia y fagotrofia del NCM (*Ophrydium naumanni*). Referencias: a, c y e: modelo 'NCM-Phot' y b, d, f y g: modelo 'NCM-Phag'. Los diferentes tonos de gris representan el mismo modelo ajustado con un conjunto diferente de distribuciones previas: muy informativo (set 1); informativo (set 2); menos informativo (set 3); y poco informativo (set 4). La línea punteada muestra la mediana de todas las distribuciones posteriores.



Los cocientes de las distribuciones posteriores de los parámetros de cada modelo se utilizaron para comparar la fototrofia y fagotrofia de los dos mixótrofos analizados, CM y NCM (Figura 2.7). En ambos tipos de mixótrofos, encontramos tendencias similares entre las relaciones de los parámetros de los modelos de fototrofia y fagotrofia: la relación α/C fototrófica (α_{Phot}/C_{Phot}) fue más alta que la fagotrófica (α_{Phag}/C_{Phag}); la relación β/C fototrófica (β_{Phot}/C_{Phot}) fue más baja que la fagotrófica (β_{Phag}/C_{Phag}); y la relación β/α fototrófica ($\beta_{Phot}/\alpha_{Phot}$) fue más baja que la fagotrófica ($\beta_{Phag}/\alpha_{Phag}$). Sin embargo, la superposición entre las distribuciones posteriores de algunas de estas relaciones fue diferente entre el CM y el NCM. En ambos tipos funcionales de mixótrofos, la relación α/C fototrófica fue menor que la fagotrófica (Figura 2.7) con una superposición similar entre el CM y el NCM (8.3 y 9.2% respectivamente). Por otro lado, la relación β/C fototrófica fue muy similar entre el CM y el NCM, sin embargo, la relación β/C fagotrófica fue considerablemente más alta en el NCM que en el CM (Figura 2.7). En consecuencia, se obtuvo una mayor superposición entre las relaciones β/C fototróficas y fagotróficas en el CM que en el NCM (32.8 y 1.4% respectivamente). Finalmente, las relaciones β/α tanto fototróficas como fagotróficas fueron similares entre el CM y el NCM, pero con una distribución más estrecha en el NCM (Figura 2.7). En consecuencia, se obtuvo una mayor superposición entre las relaciones β/α fototróficas y fagotróficas en el CM que en el NCM (11.2 y 1.5% respectivamente).

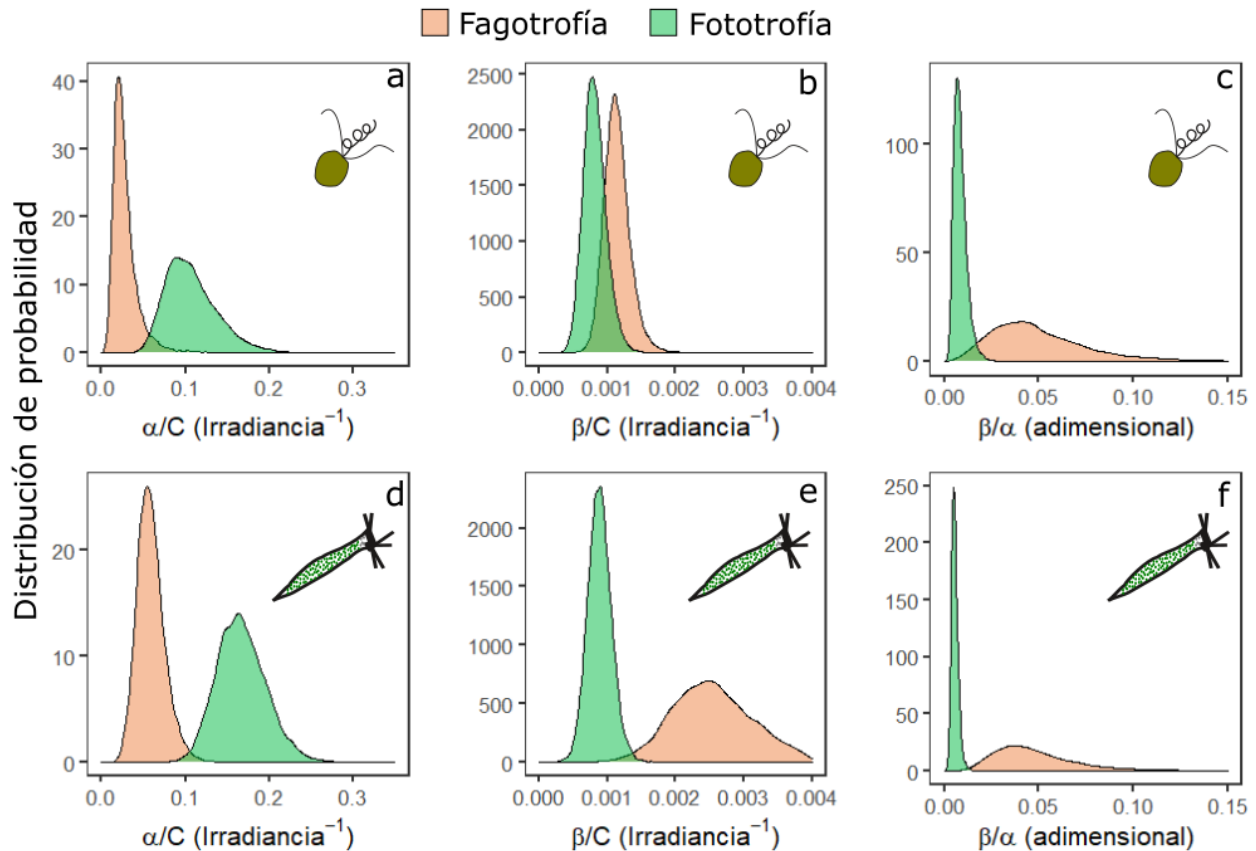


Figura 2.7: Distribuciones posteriores de los cocientes de los parámetros de fototrofia (verde) y fagotrofia (rojo) de protistas mixotróficos. Referencias: a, b y c: CM (*Chrysochromulina parva*) y d, e y f: NCM (*Ophrydium naumanni*).

Las predicciones del modelo para la fototrofia y fagotrofia de ambos protistas mixotróficos se estimaron en un rango de irradiancia de 0-2000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En la figura 2.8, comparamos la fototrofia y fagotrofia relativas (una proporción obtenida al dividir todos los valores predichos por su correspondiente valor máximo) para el CM y el NCM, con la irradiancia considerada de forma implícita. Para condiciones de oscuridad (esto es, irradiancia= 0 y fototrofia = 0), la fagotrofia relativa fue mayor en el CM que en el NCM (0.59 y 0.17 respectivamente). En condiciones de irradiancia baja a intermedia (puntos rojos) la fagotrofia relativa aumentó más linealmente con el aumento de la fototrofia en el CM que en el NCM. Luego se observa una superposición de los máximos de fototrofia y fagotrofia en ambos mixótrofos (puntos en el extremo superior derecho de las figuras 2.8). Finalmente, en irradiancias intermedias y altas (puntos verdes y azules respectivamente), se observa que la disminución de la fagotrofia relativa con la disminución de la fototrofia fue más lineal en el CM que en el NCM.

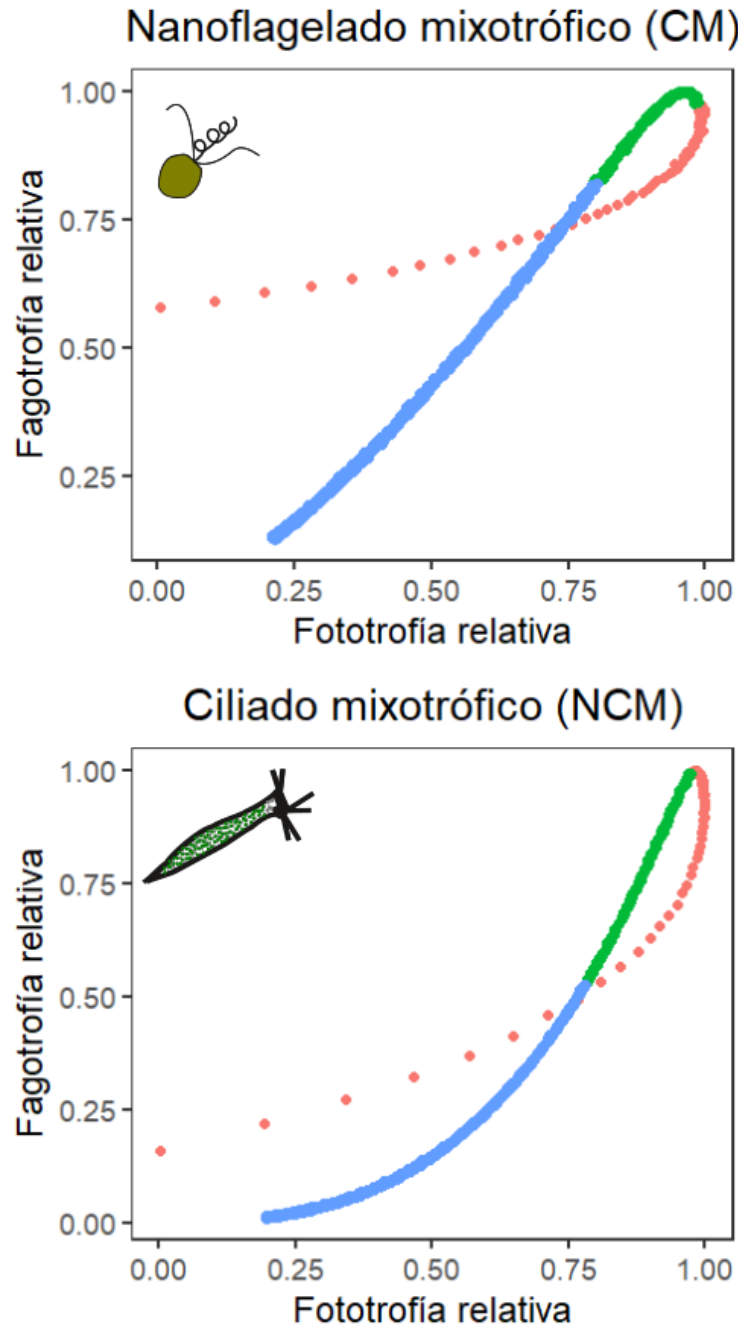


Figura 2.8: Fototrofia y fagotrofia relativas predichas (proporciones obtenidas al dividir todos los valores con su correspondiente valor máximo) del CM (*Chrysochromulina parva*) y el NCM (*Ophrydium naumanni*) para un rango de irradiancia de 0-2000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los puntos rojos indican irradiancias bajas (<math>< 65 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>), los puntos verdes indican irradiancias intermedias ($65-325 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y los puntos azules indicad irradiancias altas (> $325 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



El cociente entre fototrofía y fagotrofía expresado en valores relativos (Figura 2.9) mostró diferencias entre ambos tipos de mixótrofos. En el caso del CM, el cociente aumentó a irradiancias muy bajas (aumento rápido de fototrofía), alcanzando valores cercanos a 1 y luego permaneciendo alrededor de este valor en irradiancias intermedias a altas (Figura 2.9 línea de puntos). Por el contrario, el NCM mostró un patrón más complejo. A bajas irradiancias, la relación aumentó rápidamente, alcanzando valores superiores a 1.5, pero disminuyendo a 1 en un rango de irradiancia de 50-100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A estas intensidades de luz, la relación entre fototrofía y fagotrofía del CM y del NCM fueron muy similares y alrededor de 1. Sin embargo, a medida que la luz aumentó por arriba de los 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el cociente entre fototrofía y fagotrofía en el NCM resultó en un incremento lineal que se duplicó a 500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 2.9 línea continua).

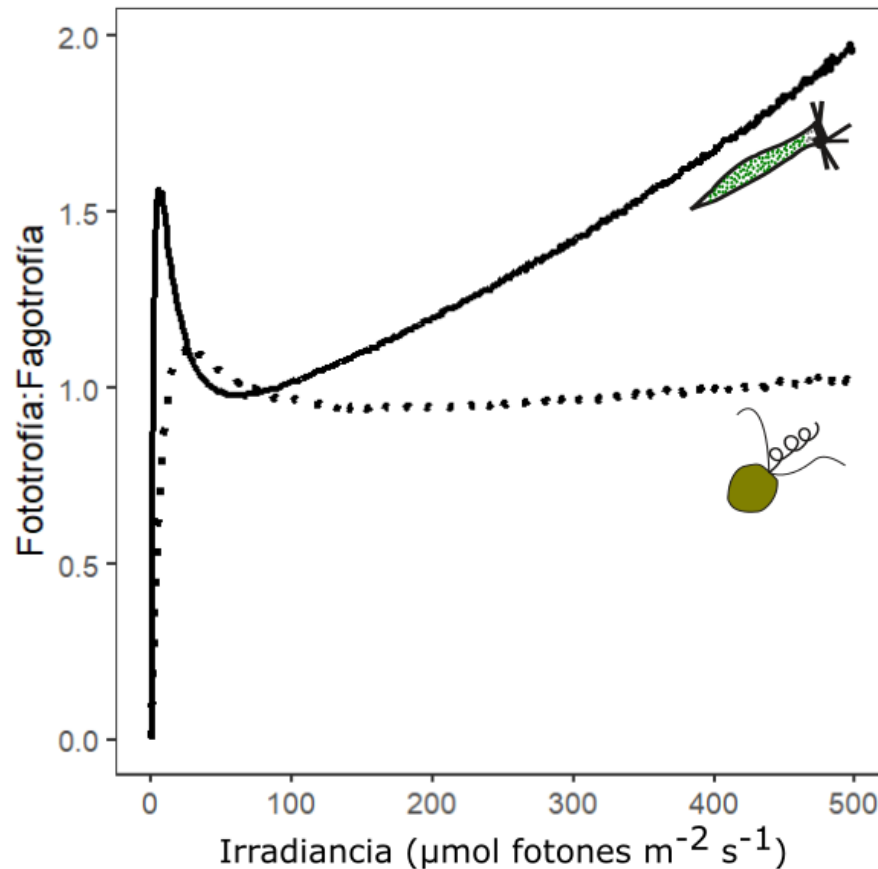


Figura 2.9: La relación predicha entre fototrofía y fagotrofía del CM y el NCM en función de la irradiancia (proporciones obtenidas al dividir todos los valores por el valor máximo). Línea de puntos: CM (*Chrysochromulina parva*), línea continua: NCM (*Ophrydium naumanni*).



Discusión

En este capítulo, probamos que la irradiancia tiene un efecto no monotónico sobre la fototrofía y fagotrofía de dos protistas mixotróficos (tanto CM como NCM), lo que significa que ambas estrategias nutricionales aumentan cuando la irradiancia es baja y disminuyen cuando la irradiancia es alta. Además, nuestros modelos mecanicistas basados en formulaciones de Platt y ajustados a datos experimentales utilizando métodos Bayesianos representaron con éxito estas funciones, obteniendo parámetros de fototrofía y fagotrofía biológicamente relevantes que pueden ser comparables fácilmente de forma cuantitativa. Las formulaciones de Platt son particularmente relevantes en sistemas oligotróficos profundos que desarrollan un DCM, donde ocurre la mayor abundancia de plancton fototrófico y producción primaria (Forget *et al.*, 2007; Bouman *et al.*, 2018). En estos sistemas transparentes y profundos, estar por encima o por debajo del DCM, que coincide con el 1% de irradiancia de la superficie, implica una disminución en la eficiencia fotosintética (Modenutti *et al.*, 2004). Sin embargo, las razones por la que ocurre esta disminución son muy diferentes: estar por debajo del límite implica una limitación por luz, pero estar por encima expone al mixótrofo a una saturación de los fotosistemas que lleva a la fotoinhibición (Kirk, 1994; Falkowski y Raven, 2007). En este sentido, la formulación de Platt *et al.* (1980) resalta un rango de irradiancia óptimo donde la fototrofía es máxima. Por otro lado, tanto los resultados experimentales como nuestro modelo muestran que la fagotrofía por mixótrofos tiene una función similar a la fototrofía y sus máximos valores se superponen en el rango de irradiancia óptimo. Las tasas de bacterivoría más altas también se encuentran en el rango lumínico del DCM, donde el picoplancton es más abundante, y los bacterívoros son principalmente protistas mixotróficos (Modenutti y Balseiro, 2002; Queimaliños *et al.*, 2002). Por lo tanto, los protistas mixotróficos de los sistemas oligotróficos de agua dulce exhiben máxima eficiencia de alimentación en ambos tipos de nutrición (fototrofía y fagotrofía) al ubicarse en la irradiancia óptima del DCM.

Tanto la fototrofía como la fagotrofía mostraron una tendencia creciente a irradiancias bajas, lo que indica que ambas estrategias nutricionales se benefician del aumento de la irradiancia cuando ésta es limitante. De acuerdo con los resultados de nuestro modelo, la relación entre las distribuciones posteriores α/C fue mayor para la fototrofía que para la fagotrofía tanto en el CM como en el NCM, lo que significa que la pendiente creciente en la fototrofía es mayor y, por lo tanto, es más variable que la fagotrofía a baja irradiancia. La razón principal de esta diferencia es



que no es posible la fototrofía con irradiancia cero, mientras que la fagotrofía sí lo es (Jones, 1997; McKie-Krisberg *et al.*, 2015). En consecuencia, nuestro modelo de fagotrofía (Ecuación 2) tiene un parámetro adicional (γ_{Phag}) en la formulación de Platt (Ecuación 1), que permite la estimación de la fagotrofía en oscuridad. Este nuevo parámetro fue relativamente más alto en el CM que en el NCM, coincidiendo con la fagotrofía obtenida experimentalmente a una irradiancia cercana a cero.

La tendencia al incremento en la fototrofía y fagotrofía que se observa con el incremento en los valores de irradiancia cuando ésta es baja, cambia a irradiancias intermedias y altas donde se observa que ambas funciones nutricionales decrecen. Esta última condición sugiere claramente que ambas estrategias nutricionales se ven perjudicadas por exceso de luz. La disminución de la eficiencia fotosintética debido a la fotoinhibición es conocida desde hace décadas (Platt *et al.*, 1980; Kirk, 1994; Falkowski y Raven, 2007). Más recientemente, se demostró que la luz también afecta a la bacterivoría por mixótrofos (Berge *et al.*, 2017; Fischer *et al.*, 2017). De acuerdo con los resultados de nuestro modelo, la relación entre las distribuciones posteriores β/C fueron similares entre fototrofía y fagotrofía en el caso del CM. Sin embargo, en el NCM estas relaciones fueron considerablemente diferentes, lo que significa que a alta irradiancia en el ciliado mixotrófico, la fagotrofía se ve significativamente más afectada que la fototrofía. La célula de los ciliados peritricos es altamente contráctil, mostrando una gran variación en su forma dependiendo de las condiciones ambientales (Winkler y Corliss, 1965; Corliss, 1979). En particular, la longitud de un individuo de *O. naumanni* es muy variable, lo que permite que las *Chlorella* endosimbióticas se dispongan de forma conveniente para optimizar la luz recibida. A baja irradiancia, *O. naumanni* adopta una forma alargada para maximizar la fotosíntesis, pero a alta irradiancia, la célula se contrae (Modenutti *et al.*, 2004). Durante la contracción celular, los ciliados peritricos reducen la frecuencia de batido de sus cilias y, por lo tanto, la corriente de alimentación que traslada las partículas alimenticias hacia la célula también se reduce (Ryu *et al.*, 2017). En consecuencia, el ciliado mixotrófico reduciría la fagotrofía de una manera más pronunciada que la fototrofía frente a alta irradiancia, tal como surge de los resultados de nuestro modelo.

Los modelos actuales de red trófica planctónica ajustados con datos empíricos reconocen a los protistas mixotróficos como un grupo de organismos diverso en términos de diferencias funcionales-alométricas entre CMs y NCMs (Caron, 2016; Leles *et al.*, 2021). El CM utilizado en nuestro estudio (el nanoflagelado *C. parva*) posee un tamaño comparable al de las *Chlorella*



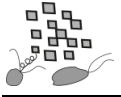
endosimbióticas del ciliado mixotrófico *O. naumanni*. Sin embargo, este último contiene cientos de células por individuo (Modenutti *et al.*, 2004) y, en consecuencia, la fijación de C por individuo resultó casi 300 veces mayor que la de un MNF. Además, en nuestro análisis, observamos que el balance entre fototrofia y fagotrofia es más constante en el CM que en el NCM a lo largo del gradiente de luz, lo que indica que estas estrategias nutricionales están más acopladas en el nanoflagelado. Para un CM, como los nanoflagelados mixotróficos, las funciones de fototrofia y fagotrofia han evolucionado conjuntamente en la misma célula (Troost *et al.*, 2005) y, por lo tanto, pueden mostrar respuestas similares a cambios en el ambiente lumínico. Por otro lado, los ciliados mixotróficos son primariamente fagotróficos, y comprenden una amplia gama de respuestas funcionales y numéricas frente a cambios en la disponibilidad de las presas y en las condiciones ambientales (Weisse *et al.*, 2016; Weisse, 2017). En nuestro análisis observamos que el cambio en el ambiente lumínico, desde irradiancias más bajas a más altas de la óptima, tienen un fuerte efecto negativo en *O. naumanni* en donde se desacopla la fagotrofia de la fototrofia. Estos resultados explicarían el bajo rendimiento y supervivencia de esta especie en la zona epilimnética (de alta irradiancia) de los lagos andino-patagónicos, fuera del DCM (Modenutti *et al.*, 2008).

La penetración de la luz es uno de los parámetros del lago con alta susceptibilidad a variar como consecuencia de cambios globales, la recesión de los glaciares y el uso de la tierra (Rose *et al.*, 2014; Kritzberg, 2017; Bastidas Navarro *et al.*, 2018). En este sentido, nuestros modelos predicen un equilibrio fototrofia-fagotrofia más constante en el CM que en el NCM frente a escenarios de luz extremadamente baja o alta. Se ha documentado que la fagotrofia permite a los algunos CM (Cryptophyceae y Prasinophyceae) sobrevivir durante períodos prolongados de oscuridad en los lagos antárticos, mientras que la fototrofia es significativa sólo cuando la irradiancia es óptima (Laybourn-Parry *et al.*, 2005). La temperatura es otra variable clave que afecta la nutrición de los protistas mixotróficos (Wilken *et al.*, 2013; Princiotta *et al.*, 2016). Particularmente, Wilken *et al.* (2013) demostraron experimentalmente que un aumento en la temperatura del agua reduce la fototrofia y aumenta la fagotrofia en el nanoflagelado *Ochromonas sp.* (CM), y que este desacoplamiento es más pronunciado al aumentar la irradiancia de baja a intermedia. Por lo tanto, la irradiancia tiene un papel clave en la determinación del equilibrio nutricional en protistas mixotróficos, tanto de forma directa como combinada con otras variables ambientales sensibles al cambio global.



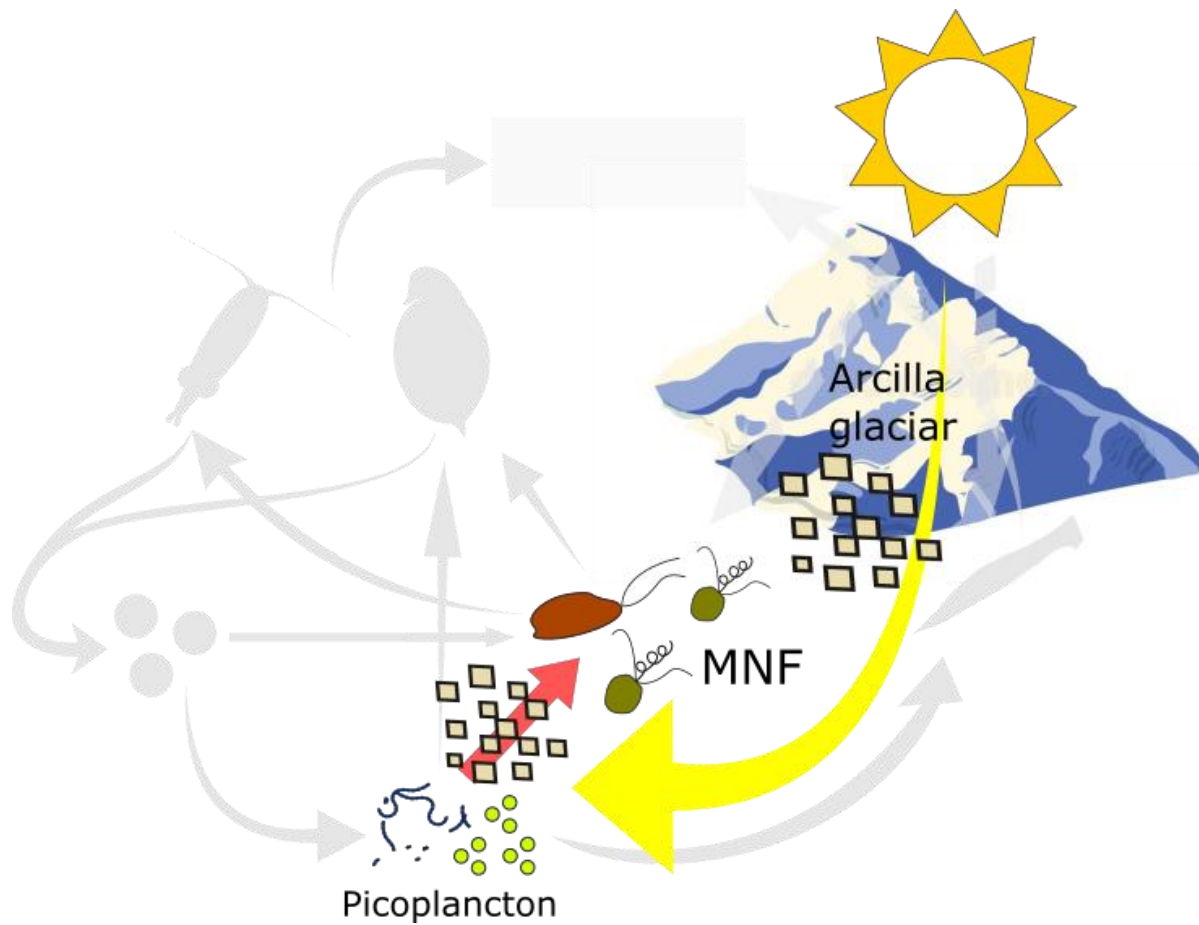
En este trabajo, presentamos un modelo general para considerar la fototrofia y la fagotrofia de protistas mixotróficos bajo diferentes escenarios de luz. Calibramos estos modelos (es decir, estimamos sus parámetros) con dos protistas de fisiologías diferentes (CM y NCM) pero correspondientes al Tipo C en el que la fototrofia y la fagotrofia cambian proporcionalmente con la luz (Jones 1997). Sin embargo, el modelo tiene el potencial de ser calibrado con otros tipos ecológicos de mixótrofos, como el Tipo B (Jones 1997), donde la fagotrofia disminuye con el aumento de la luz.

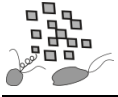
En conclusión, nuestro nuevo enfoque de modelado nos permitió comparar diferentes tipos funcionales de protistas mixotróficos al evaluar cuantitativamente el equilibrio entre sus estrategias nutricionales frente a una amplia gama de escenarios de luz. Los diferentes tipos funcionales de protistas mixotróficos coexisten en los ecosistemas acuáticos, desempeñando un papel clave como productores primarios y secundarios en las comunidades de plancton y en el bucle microbiano (Zubkov y Tarran, 2008; Flynn *et al.*, 2019). En este sentido, los modelos propuestos identificaron claramente cómo los dos tipos de protistas mixotróficos equilibran sus estrategias nutricionales bajo diferentes escenarios de luz. Además, el modelo tiene el potencial de ser aplicable para predecir la sucesión de tipos funcionales mixotróficos con importantes implicancias para los flujos de carbono y nutriente.



Capítulo 3

El efecto de las arcillas glaciares en la fagotrofia de nanoflagelados mixotróficos

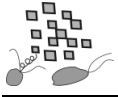




Introducción

El rápido retroceso de los glaciares en todo el mundo es una clara señal del cambio climático global (IPCC, 2014). Un glaciar es una masa de hielo lo suficientemente grande como para moverse debido a la fuerza ejercida por su propio peso pendiente abajo (Cuffey y Paterson, 2010). Los glaciares de baja elevación en regiones montañosas como los Alpes o los Andes centrales y meridionales son particularmente vulnerables, y se espera que la mayoría desaparezcan durante el siglo XXI (Zemp *et al.*, 2015). El incremento del derretimiento por el aumento de la temperatura, principalmente en el periodo estival, es uno de los principales responsables de la pérdida de masa de los glaciares (Cuffey y Paterson, 2010). En función de su alta sensibilidad climática y del relativamente bajo impacto antrópico que poseen (en general se encuentran en lugares aislados y de difícil acceso), las cuencas de glaciares han sido propuestas como sistemas indicadores de alerta temprana de la respuesta hidrológica y ecológica al cambio climático (Nijssen *et al.*, 2001). Por lo tanto, los lagos alimentados por glaciares son muy dinámicos y con cambios en su transparencia, lo que los convierte en centinelas del cambio climático (Rose *et al.*, 2014).

La abrasión del lecho rocoso por parte de los glaciares produce fragmentos de roca fina y minerales que constituyen la arcilla (o harina) glaciar que es transportada por las aguas de deshielo hasta los lagos proglaciares (Modenutti *et al.*, 2000; Ariztegui *et al.*, 2007; Slemmons *et al.*, 2013; Peter y Sommaruga, 2017). Estas finas partículas pueden permanecer suspendidas en la columna de agua durante largos períodos, dando lugar a un paisaje de lagos con variada influencia glaciar, desde lagos proglaciares turbios hasta lagos transparentes que han perdido su conexión con glaciares (Sommaruga, 2015). En Patagonia norte y del lado argentino del Monte Tronador, la arcilla glaciar se transporta a tres lagos proglaciares principales: Ventisquero Negro, Frías y Mascardi afectando su ambiente lumínico (Bonetto *et al.*, 1971; Morris *et al.*, 1995; Modenutti *et al.*, 2000). Las variaciones en el transporte de arcilla glaciar a la cuenca están relacionadas con cambios en el clima (Ariztegui *et al.*, 2007). Por ejemplo, el marcado retroceso del glaciar Ventisquero Negro (Ruiz *et al.*, 2015) y el evento de ruptura de morena frontal ocurrido en el 2009 (Worni *et al.*, 2012) causaron un cambio concomitante en los sedimentos arrastrados aguas abajo, provocando una variación sustancial en el ambiente lumínico del brazo Tronador del lago Mascardi (Bastidas Navarro *et al.*, 2018).



Además del efecto sobre el ambiente lumínico, las arcillas glaciares pueden tener un efecto directo en las funciones biológicas de los organismos acuáticos (Sommaruga, 2015). El tamaño de las partículas de arcilla se superpone al tamaño celular de los compartimentos más pequeños del bucle microbiano (bacterias y nanoflagelados) (Figura 3.1) y pueden superar en hasta un orden de magnitud la concentración de picoplancton en lagos de montaña (Sommaruga y Kandolf, 2014). En este sentido, se ha visto que concentraciones superiores a 30 mg L^{-1} de arcillas en suspensión reducen la fecundidad y la supervivencia en cladóceros dáfnidos (Kirk y Gilbert, 1990) y la alimentación en nanoflagelados heterotróficos (Sommaruga y Kandolf, 2014) debido a interferencia directa. Sin embargo, en menores concentraciones, como los valores observados en el lago Mascardi que van de 0 a 5 mg L^{-1} , *Daphnia* coexiste con las partículas de arcilla que tienen un efecto neto positivo en su desempeño (Laspoumaderes *et al.*, 2017). Esto se debe principalmente a que la disminución de la luz (tanto visible como ultravioleta) genera una menor relación luz:nutrientes (Sterner *et al.*, 1997) lo que ocasiona a su vez una mejor calidad de los recursos dada por una menor relación C:P del fitoplancton (Laspoumaderes *et al.*, 2017), además de brindar protección contra depredadores visuales como los peces (Jönsson *et al.*, 2011). Por el contrario, poco se sabe acerca de las múltiples vías por las que la presencia de arcillas glaciares puede afectar a los compartimentos del bucle microbiano (Sommaruga, 2015). En este sentido, los protistas mixotróficos podrían verse afectados en más de una forma por la retracción glacial debido a sus múltiples estrategias nutricionales. A partir de los resultados del capítulo anterior, encontramos que cambios en la disponibilidad de luz modulan la fagotrofia de los nanoflagelados mixotróficos. Por lo tanto, un aumento en la turbidez del lago ocasionada por la presencia de arcilla glacial tendrá un efecto indirecto en la fagotrofia a través de cambios en el ambiente lumínico. Sin embargo, aún se desconoce cómo la presencia de partículas glaciares, que poseen un tamaño similar al picoplancton (Figura 3.1), interfiere de manera directa en la captura de presas por parte de los nanoflagelados mixotróficos. En este capítulo, nos enfocamos en analizar y modelar la fagotrofia en función a distintas concentraciones de arcillas glaciares considerando sus efectos sobre la luz y como interferencia en la fagotrofia.

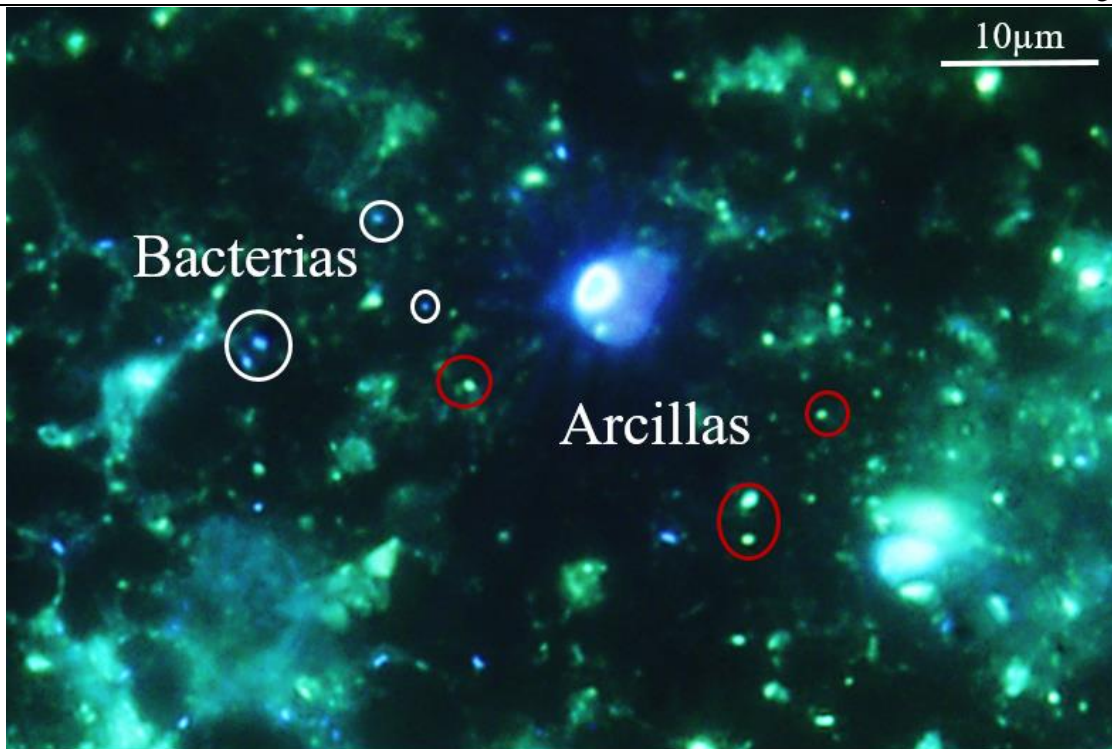
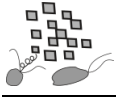


Figura 3.1. Nanoflagelado del lago Frías junto a sus presas del picoplancton (puntos azules) y arcillas glaciares (puntos verdes). Foto de microscopio de epifluorescencia con radiación UV.

Los lagos patagónicos pueden ser afectados por la recesión de los glaciares mostrando niveles variados de turbidez debido a la influencia glacial (Hylander *et al.*, 2011; Laspoumaderes *et al.*, 2013; Modenutti *et al.*, 2013; Bastidas Navarro *et al.*, 2018). Por otra parte, los nanoflagelados mixotróficos (MNF) dominan las comunidades planctónicas de los lagos glaciares en los Andes del norte de la Patagonia (Queimaliños *et al.*, 2002; Callieri *et al.*, 2007; Modenutti *et al.*, 2013). En este capítulo, analizamos cómo la fagotrofia por parte de los MNF se ve afectada de manera conjunta por la atenuación de la luz y la interferencia directa debido a las partículas glaciares. Basándome en los resultados del capítulo anterior, cambios en la disponibilidad de luz sin la presencia de partículas tendrán un efecto no monotónico en la fagotrofia de los MNF, con valores máximos a irradiancias intermedias. Por otra parte, la fagotrofia de los MNF se reducirá con el incremento de la concentración de arcilla glaciar a luz constante debido a la interferencia directa. En consecuencia, predecimos que la atenuación de la luz por incremento en la concentración de arcilla glaciar tendrá un efecto combinado con la interferencia directa en la fagotrofia de los MNF.



Objetivo general

Analizar y modelar el efecto de las arcillas glaciares en la fagotrofia de los MNF de lagos andinos norpatagónicos.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la luz en la fagotrofia de los MNF mediante experimentos de bacterivoría en lagos con distintos ambientes lumínicos y sin la presencia de arcilla glaciara.
- Determinar el efecto de interferencia por partículas en la fagotrofia de los MNF mediante experimentos de bacterivoría en un gradiente de concentración de arcilla glaciara y luz constante.
- Desarrollar un modelo mecanicista para el efecto combinado de las arcillas glaciares en la fagotrofia de los MNF, y ajustarlo con los datos experimentales utilizando un enfoque Bayesiano.
- Evaluar la capacidad predictiva de nuestro modelo frente a distintas condiciones de turbidez por arcillas glaciares con experimentos de bacterivoría independientes en un lago turbio proglaciara (lago Frías).

Hipótesis

Las arcillas glaciares tendrán un doble efecto en la fagotrofia de los MNF a través de la atenuación del ambiente lumínico y la interferencia directa en la captura de presas.

Predicciones

La fagotrofia de los MNF se verá afectada de forma no monotonica por cambios en la disponibilidad de luz.

La fagotrofia de los MNF se reducirá con el incremento de la concentración de arcilla glaciara a luz constante.

La atenuación de la luz por incremento en la concentración de arcilla glaciara tendrá un efecto combinado con la interferencia directa en la fagotrofia de los MNF.



Materiales y Métodos

Área de estudio

Los lagos donde se realizaron experimentos se ubican entre los 41 y 42 ° S (Tabla 3.1), corresponden al distrito de lagos glaciares de los Andes australes (Iriondo, 1989) y pertenecen a los Parques Nacionales Nahuel Huapi y Los Alerces, en la región Patagonia Norte. El clima de la región es fresco (temperatura media anual de 8.7 °C) con predominio de fuertes vientos del oeste y una precipitación media anual de 1500 mm (Pruel et al., 1998). El área se caracteriza por un extenso sistema hidrográfico que incluye lagos grandes y profundos ($Z_{\max} \sim 150$ m) así como lagos menos profundos ($Z_{\max} \sim 15$ m). Los seis lagos incluidos en este capítulo fueron: Moreno, Rivadavia, Verde, Los Cántaros, Mascardi Catedral (en adelante, Mascardi-C) y Frías (Tabla 3.1). Estos lagos fueron elegidos debido a sus diferencias en la penetración de la luz y la influencia de la arcilla glacial. Los lagos Moreno, Rivadavia, Verde, Los Cántaros y Mascardi-C son lagos claros con alta penetración de radiación fotosintéticamente activa (PAR) y radiación ultravioleta (RUV) (Corno et al., 2009) y sin la influencia de arcilla glacial. En contraste, el lago Frías es un lago turbio proglacial con alto contenido de arcilla durante el verano (Ariztegui et al., 2007).



Tabla 3.1. Ubicación y características morfométricas de los 5 lagos andino norpatagónicos (Argentina) estudiados. m.s.n.m= metros sobre el nivel del mar, $Z_{\text{máx}}$ = profundidad máxima del lago.

Lagos	Ubicación	Altitud (m.s.n.m)	Área (km ²)	$Z_{\text{máx}}$ (m)
Mascardi-C	41°07'31''S 71°17'24''W	750	39.20	118
Moreno	41°05'00''S 71°29'50''W	758	16.40	90
Rivadavia	42°36'39''S 71°38'58''W	560	21.70	147
Verde	41° 15' 37" S 71° 17' 53" W	1535	0.13	5
Cántaros	41°00'21''S 71°49'30''W	874	0.25	12
Frías	41° 03'40''S 71°47'54''N	790	3.54	75

Los lagos Moreno, Rivadavia y Mascardi-C son lagos monomícticos cálidos con estratificación de verano desde noviembre a abril y termoclinas profundas ubicadas aproximadamente a 20 m de profundidad (Figura 3.2). A su vez, en estos lagos se desarrollan DCM (Figura 3.2). Por el contrario, los lagos Verde y Los Cántaros son poco profundos, no estratifican y no desarrollan un DCM (Figura 3.2). Finalmente, el lago proglaciar Frías exhibe un gradiente en el perfil de temperatura vertical con distribución de clorofila hacia los niveles superiores (Figura 3.2).

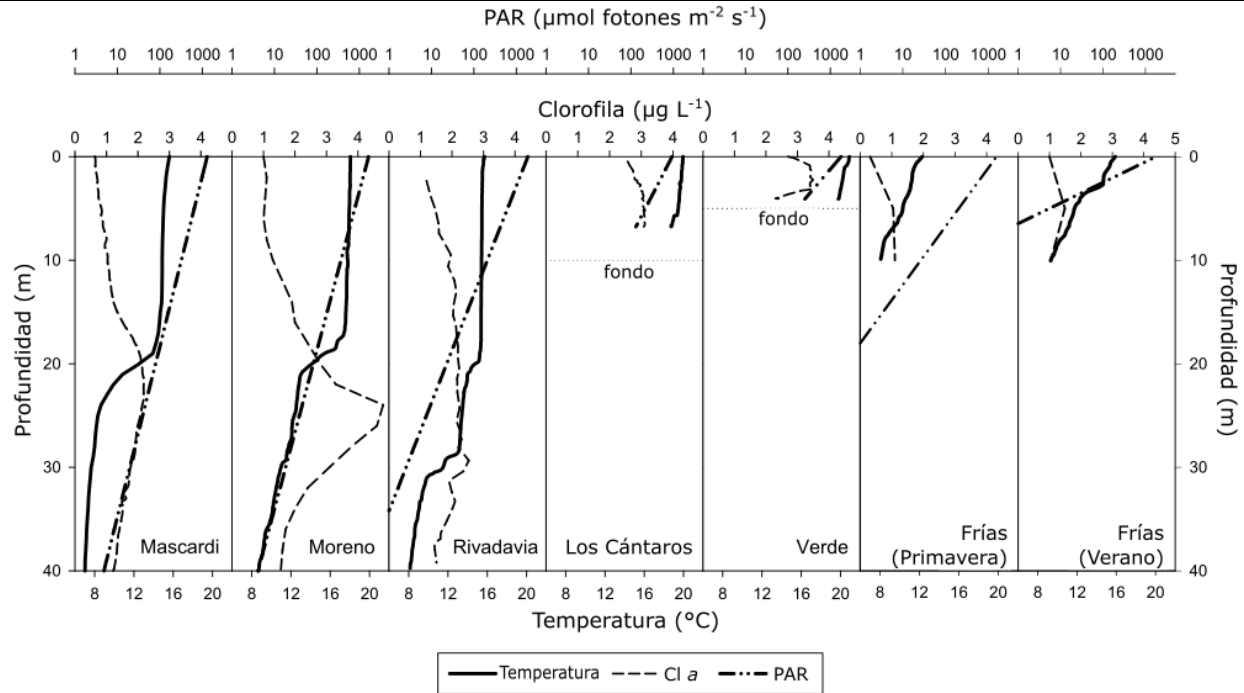
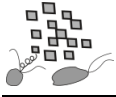


Figura 3.2: Perfiles verticales de PAR (radiación fotosintéticamente activa, $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y clorofila a ($\mu\text{g L}^{-1}$), en los diferentes lagos andinos norpatagónicos estudiados. Todos los datos corresponden a esta Tesis a excepción de los lagos Moreno y Rivadavia tomados de Balseiro *et al.* (2004).

Experimentos de bacterivoría

Se analizaron tres series de experimentos de bacterivoría *in situ* con la comunidad de MNF natural. La primera serie de experimentos consistió en un gradiente lumínico (en adelante, LE) obtenido en diferentes lagos y tuvo como objetivo evaluar el efecto de la irradiancia sobre la bacterivoría. Se seleccionaron cinco lagos transparentes (Mascardi-C, Moreno, Rivadavia, Verde y Los Cántaros) con diferentes condiciones de luz (Tabla 3.2) y sin arcilla glaciar (sólidos totales en suspensión $< 0.3 \text{ mg L}^{-1}$). Los experimentos se realizaron a diferentes profundidades (Tabla 3.2) con el fin de obtener un rango de luz amplio y una mayor concentración de MNF (es decir, a la profundidad del DCM en los lagos profundos Mascardi-C, Moreno y Rivadavia; y sub-superficial en los lagos someros Verde y Los Cántaros) (Tabla 3.2, Figura 3.2). Para el caso de los lagos Moreno y Rivadavia los datos fueron tomados de Balseiro *et al.* (2004). La segunda serie de experimentos (en adelante, CE) tuvo como objetivo probar el efecto directo de arcilla glaciar sobre la bacterivoría. Se seleccionó un punto de muestreo en el lago Mascardi-C a 20 m de profundidad (5% de la PAR superficial, coincidiendo con el DCM) donde se preparó un gradiente de

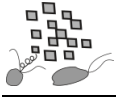


concentración de arcilla de 0 a 32 mg L⁻¹. Finalmente, la tercera serie de experimentos (en adelante, LCE) tuvo como objetivo evaluar de manera conjunta los efectos de la luz y las partículas de arcilla como factores que afectan la bacterivoría, y se realizaron en el lago proglaciar Frías. LE y CE se realizaron en verano (enero y febrero), mientras que LCE se realizó en verano (febrero) y primavera (noviembre) con el fin de lograr diferentes condiciones de luz y concentración de arcillas en el lago Frías. Las mediciones de luz se realizaron en todos los lagos utilizando un radiómetro sumergible PUV 500B (Biospherical Instruments). Luego, los coeficientes de atenuación lumínica (Kd) se estimaron como coeficientes de regresión a partir de los perfiles de luz obtenidos por el radiómetro en el campo.

Tabla 3.2: Coeficientes de atenuación de la luz (Kd) y profundidad e intensidad de la luz (I) en cada tratamiento de los experimentos de bacterivoría a campo. Referencias: LE: experimentos de gradiente de luz; CE: experimentos de gradiente de arcillas y LCE: experimentos combinados de luz y arcillas.

Temporada	Lago	Kd (m ⁻¹)	Profundidad (m)	I (μmol fotones m ⁻² s ⁻¹)	Tipo de experimento
Verano	Moreno	0.15	10	297	LE
			30	18.6	
	Rivadavia	0.22	10	97.3	LE
			30	0.85	
	Mascardi-C	0.14	20	130	LE y CE
	Verde	0.48	0.2	1538	LE
	Los Cántaros	0.29	0.2	1249	LE
			6.2	219	
	Frías	2.05	0.2	1008	LCE
			6.2	1.52	
Frías	0.39	0.2	1080	LCE	
		6.2	146		

Las unidades experimentales en todos los casos consistieron en bolsas de polipropileno de 150 mL, de las cuales hubo tres réplicas por tratamiento. Las bolsas se llenaron con agua del lago a la profundidad correspondiente que se había filtrado a través de una red de malla de 55 μm para



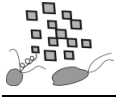
evitar el paso del zooplancton (es decir, rotíferos, copépodos y cladóceros). Luego se agregaron bacterias marcadas con fluorescencia (FLB) a cada recipiente a una concentración final del 20% de la abundancia total de bacterias (heterótrofas + picocianobacterias) para cada lago y profundidad. Estas abundancias y porcentajes se calcularon sobre muestras tomadas el día anterior al experimento y luego fueron ajustadas con muestras al tiempo inicial (T0) tomadas al inicio del experimento. En todos los casos, el coeficiente de variación del porcentaje de FLB agregado no superó el 10%. A diferentes intervalos de tiempo según el experimento (LE y LCE: 5, 10, 15, 20 y 40 minutos; CE: 15, 30 y 45 minutos), las muestras se fijaron secuencialmente con solución de Lugol al 0.5%, seguido de formaldehído al 2% y gotas de tiosulfato de sodio al 3% para aclarar el color (Kemp *et al.*, 1993).

En los experimentos CE, los diferentes tratamientos de concentración de arcilla fueron: 0, 2, 4, 8, 16 y 32 mg de arcilla L⁻¹. Debido a que las bolsas experimentales tenían 5 cm de diámetro y calculando un Kd dentro de la bolsa de 2 m⁻¹, se puede determinar que la intensidad media de PAR que llega al interior de la bolsa era mayor al 98%. Basándonos en estos cálculos se puede asumir que las diferentes concentraciones de arcilla no alteraron la disponibilidad de luz dentro de las bolsas. Por lo tanto, este experimento probó el efecto del aumento en la concentración de arcilla sobre la bacterivoría sin el efecto de sombreado (la luz permaneció constante a 130 μmol fotones m⁻² s⁻¹).

Preparación de FLB y suspensión de arcilla glaciara

Las bacterias marcadas con una sustancia fluorescente (FLB) se prepararon de acuerdo a Šimek y Chrzanowski (1992). Después de un pre filtrado a través de un filtro de tamaño de poro de 2 μm (Osmonics), se concentró el bacterioplancton en un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm (Nucleopore). Las células se separaron de la superficie del filtro mediante sonicación y se tiñeron con 5-(4,6-ichlorotriazin-2-il)amino) fluoresceína (DTAF) de acuerdo a Sherr *et al.* (1987). Las FLB se almacenaron en alícuotas de 2 mL a -20 °C. Luego, se midieron y contaron bajo un microscopio de epifluorescencia con el fin de verificar la forma, tamaño y abundancia. Las FLB obtenidas tenían en su mayoría una forma cocoide y 0.76 ± 0.21 μm de diámetro, similar al tamaño de las comunidades bacterianas naturales en los lagos andinos (Corno *et al.*, 2009).

La suspensión de arcilla glaciara se obtuvo a partir de arcilla recolectada del glaciara Ventisquero Negro (Monte Tronador) que se secó a 60 °C durante una semana. Se retuvieron las



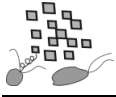
partículas finas tamizando la arcilla glaciara a través de una malla de 250 μm . A continuación, estas partículas se rehidrataron con agua ultra pura (MilliQ), se agitaron con un agitador magnético durante 1 hora y luego se dejaron decantar durante la noche. Finalmente, se descartó la fracción decantada. La concentración final de partículas fue de aproximadamente 500 mg de arcilla L^{-1} . Esta concentración se determinó filtrando 25 mL de la suspensión a través de filtros GF/F previamente pesados (Whatman). A continuación, los filtros se secaron a 60 °C durante 48 horas y se volvieron a pesar. El tamaño y la forma de las partículas de arcilla se evaluaron sobre filtros de policarbonato de 0.2 μm utilizando un sistema de análisis de imágenes (Image ProPlus; Media Cybernetics). Para ello, se filtró 1 mL de la suspensión y se tomaron al menos 50 fotografías de cada muestra. Las partículas tenían principalmente una forma cocoide, con un diámetro de $0.82 \pm 0.61 \mu\text{m}$.

Determinaciones de laboratorio

Los sólidos totales en suspensión (TSS) se estimaron filtrando 1 L de agua del lago a través de filtros GF/F previamente pesados que se volvieron a pesar después de secar a 60 °C durante 48 h. Los TSS se calcularon utilizando la diferencia en el peso de los filtros GF/F antes y después de la filtración del agua del lago.

Se estimó la abundancia natural de nanoflagelados y bacterioplancton en todos los tratamientos. Se fijaron muestras de 60 mL con formaldehído (concentración final 2% v/v) y se tiñeron con el fluorocromo 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; concentración final 0.2% p/v). El recuento se realizó en filtros de policarbonato negro (Poretics, Livermore, CA, EE. UU) de tamaño de poro de 1 μm (para nanoflagelados) y de 0.2 μm (para bacterioplancton) con un aumento de 1250x utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 con radiación UV (U-MWU) y luz azul (filtro U-MWB, excitación 450-480 nm, emisor 515 de paso largo, divisor de haz 500 nm) y luz verde (filtro U-MWG, excitación: 510-550 nm, emisor: 590 divisor de haz de paso largo 570 nm) para la identificación de MNF, nanoflagelados heterotróficos (HNF), bacterias heterotróficas y picocianobacterias.

Las muestras experimentales se tiñeron con DAPI y se filtraron a través de filtros de policarbonato negro de 1 μm (Poretics, Livermore, CA, EE. UU.). El número de FLB ingeridas por MNF se evaluó con un microscopio de epifluorescencia alternando entre luz ultravioleta y luz azul. Se observaron al menos 100 MNF en cada filtro, correspondiente a las especies



Cada tratamiento experimental se realizó en tres repeticiones y se prepararon al menos tres filtros para cada repetición. Simultáneamente, se observó el tamaño y la forma de las partículas de arcilla de un filtro de cada tratamiento mediante un sistema de análisis de imágenes (Image ProPlus; Media Cybernetics).

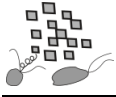
Construcción del modelo

A partir de los experimentos *in situ*, se obtuvo la cantidad de presas consumidas por flagelado (células flagelado⁻¹) dividiendo la cantidad de FLB consumidas por la proporción de FLB añadida respecto a la comunidad natural de bacterias (0.2 FLB por cada bacteria de la comunidad natural). A este valor de bacterias consumidas se lo dividió por la concentración natural de bacterias (células nL⁻¹) para estimar el volumen filtrado por flagelado (nL flagelado⁻¹). Finalmente, se modeló la fagotrofia en función del tiempo de incubación (t) para obtener la tasa de limpieza más conocida en inglés como “clearance rate” que es el volumen filtrado por flagelado por hora (F, nL flagelado⁻¹ h⁻¹) (Sherr *et al.*, 1987). Para ello, se utilizó la fórmula de Michaelis-Menten (M-M) (Ecuación 1).

$$F_{(t)} = \frac{B_{max} * t}{k + t} \quad (1)$$

Esta función hiperbólica es ampliamente elegida para modelar respuestas de saturación en la cinética depredador-presa (Smout *et al.*, 2010; Lignell *et al.*, 2013). En particular, consideramos que esta curva es más representativa de la fagotrofia a lo largo del tiempo que la "tasa de consumo" tradicional, que se calcula utilizando solo la parte lineal de la curva de captura de presas (Bastidas Navarro *et al.*, 2011; Sommaruga y Kandolf, 2014). Por el contrario, la fórmula de Michaelis-Menten incluye dos parámetros que tienen relevancia biológica: B_{max} que en este caso representa la máxima fagotrofia en el equilibrio entre la ingestión y la digestión de partículas, y la constante media máxima k , que describe el momento en que $F_{(t)}$ alcanza $\frac{1}{2}B_{max}$ y se puede utilizar como indicador del tiempo de manipulación de una presa por parte del depredador.

Para evaluar el efecto de la irradiancia sobre la fagotrofia de los MNF ($F_{(t,I)}$), se definió B_{max} utilizando la ecuación de Platt *et al.* (1980) modificada que se encuentra en el capítulo II de



esta tesis. Esta ecuación contiene un parámetro extra respecto a la de Platt (γ) que permite estimar la capacidad fagotrófica cuando la irradiancia es cero ($I = 0$) (Ecuación 2).

$$B_{max(I)} = C * \left(1 - e^{\left(\frac{-\alpha * I + \gamma}{c}\right)}\right) * e^{\left(\frac{-\beta * I}{c}\right)} \quad (2)$$

Se eligió esta ecuación debido a su rasgo no monótonico, donde el parámetro α corresponde a la pendiente a irradiancias bajas y β representa la pendiente a irradiancias más altas. Particularmente, si tanto α como β son positivos, la Ecuación 2 mostrará una fagotrofia creciente a baja irradiancia y una fagotrofia decreciente a alta irradiancia. Además, bajo esas condiciones de parámetros, esta función tiene el potencial de mostrar un rango de irradiancias donde la fagotrofia es máxima (C).

Para evaluar el efecto de interferencia directa de la arcilla glaciar en la fagotrofia $F_{(t,TSS)}$, se estableció el parámetro de tiempo de manipulación k como una función lineal de los TSS.

$$k_{(TSS)} = k_0 + m * TSS \quad (3)$$

Donde m es el coeficiente de interferencia por partículas no alimenticias. Consideramos que este enfoque lineal es suficiente para probar la hipótesis que los flagelados aumentan el tiempo que dedican a capturar e ingerir presas en presencia de partículas no comestibles (Boenigk y Arndt, 2002) (Figura 3.3), lo cual está respaldado por otros experimentos que prueban el efecto de la arcilla glaciar en la bacterivoría (Sommaruga y Kandolf, 2014). Para este estudio, esperamos un valor positivo de m .

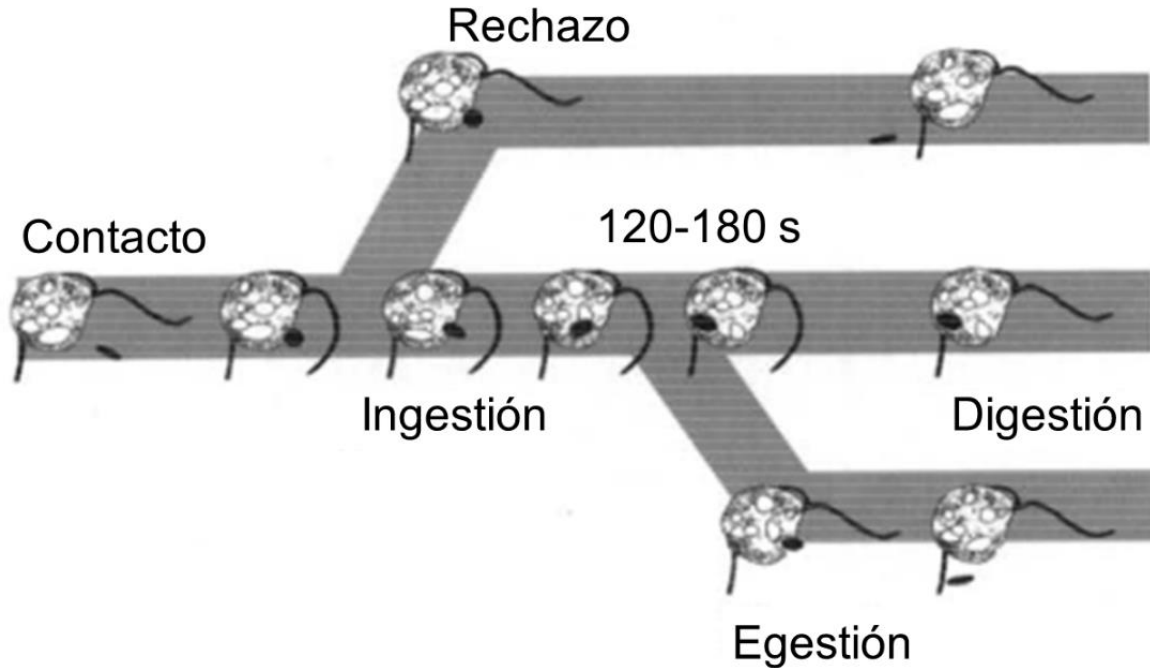
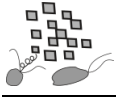


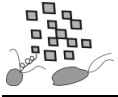
Figura 3.3: Ilustración de las diferentes vías y resultados de la interacción entre protistas fagotróficos y sus presas (bacterias) durante el proceso de alimentación. La duración expresada en segundos (s) corresponde al tiempo entre la ingestión y la digestión. Tomada de Boenigk y Arndt (2002).

Finalmente, el efecto combinado de la irradiancia y la interferencia de partículas para nuestro modelo “Luz-Arcillas” (Ecuación 4) se evaluó mediante combinaciones de las Ecuaciones 1 a 3: la fagotrofia máxima B_{max} de la Ecuación 1 se modeló en función a la irradiancia de acuerdo con las Ecuación 2, mientras que el parámetro k de tiempo de manipulación de la Ecuación 1 se modeló en función a la concentración de arcilla glaciar de acuerdo con la Ecuación 3. La Ecuación 4 tiene seis parámetros y sus variables son la irradiancia (I), la concentración de arcilla (TSS) y el tiempo de incubación (t).

$$F_{(t,I,TSS)} = \frac{\left(C * \left(1 - e^{\left(\frac{-\alpha * I + \gamma}{c} \right)} \right) * e^{\left(\frac{-\beta * I}{c} \right)} \right) * t}{k_0 + m * TSS + t} \quad (4)$$

Calibración del modelo

La representación precisa de dinámicas en ecología a través de ecuaciones no lineales puede generar altos costos computacionales en la estimación de sus parámetros (Lignell *et al.*, 2013). La inferencia Bayesiana resulta adecuada para estos desafíos, proporcionando un marco



coherente para caracterizar la incertidumbre relacionada con el modelado y la predicción (Clark, 2005; Arhonditsis *et al.*, 2008). Los parámetros de la Ecuación 4 (en adelante, modelo “Luz-Arcillas”) se estimaron utilizando cadenas Markovianas Monte Carlo (MCMC) y los datos obtenidos de los experimentos LE y CE. El análisis bayesiano se realizó utilizando JAGS (Plummer, 2003) a través de la interface R Studio. Se aplicaron previas débilmente informativas para los valores iniciales de los parámetros dinámicos, asumiendo distribuciones de probabilidad normales positivas. Finalmente, se obtuvo una muestra de posibles valores de parámetros mediante el algoritmo MCMC, formando la distribución posterior de cada parámetro. Se comprobó la convergencia de todos los parámetros utilizando cinco cadenas MCMC de 2×10^5 iteraciones cada una y una fase de “quemado” de 1×10^5 iteraciones.

Validación del modelo

A partir de las distribuciones posteriores de los parámetros del modelo “Luz-Arcillas”, se realizaron simulaciones de la bacterivoría en función de distintos valores de irradiancia ($0-1500 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y concentración de arcilla ($0-32 \text{ mg L}^{-1}$) a tiempo de incubación fijo (40 minutos). Esto permitió generar predicciones de la bacterivoría frente al efecto combinado de distintas condiciones de luz y arcillas. Para evaluar la capacidad predictiva del modelo, las simulaciones se contrastaron con las tasas de bacterivoría obtenidas de los experimentos de LCE en el lago Frías durante primavera y verano y a distintas profundidades.

Resultados

Abundancia de nanoflagelados y sus presas

Los MNF fueron la fracción dominante de la comunidad nanoplanctónica en todos los lagos y tratamientos (Tabla 3.3), mientras que los HNF representaron menos del 10% en todos los lagos excepto en Laguna Verde. Dentro de los MNF, los taxones dominantes (>70% de la abundancia entre los MNF) fueron *Chrysochromulina parva* (Haptophyceae) seguido por *Plagioselmis lacustris* (Cryptophyceae), que fue más abundante solo en el lago proglaciar Frías durante el verano. Finalmente, las abundancias de presas picoplanctónicas (bacterias heterotróficas y picocianobacterias) fueron similares entre los lagos (Tabla 3.3).

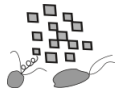


Tabla 3.3: Abundancia (células mL⁻¹) de nanoflagelados mixotróficos y heterotróficos (MNF y HNF respectivamente) y presas pico-planctónicas en todos los lagos andinos norpatagónicos estudiados.

Temporada	Lago	Profundidad (m)	Abundancia de MNF	Especie dominante (MNF)	Abundancia de HNF	Abundancia de presas
Verano	Moreno	10	330	<i>C. parva</i>	20	1.70 x 10 ⁶
		30	645		25	1.85 x 10 ⁶
	Rivadavia	10	222	<i>C. parva</i>	15	1.65 x 10 ⁶
		30	290		20	1.90 x 10 ⁶
	Mascardi-C	20	480	<i>C. parva</i>	56	1.25 x 10 ⁶
	Verde	0.2	1924	<i>C. parva</i>	909	3.20 x 10 ⁶
	Los	0.2	116	<i>C. parva</i>	6	1.07 x 10 ⁶
	Cántaros	6.2	283		26	9.27 x 10 ⁵
	Frías	0.2	108	<i>P.</i>	8	1.24 x 10 ⁶
		6.2	290	<i>lacustris</i>	27	9.51 x 10 ⁵
Primavera	Frías	0.2	101	<i>C. parva</i>	10	9.14 x 10 ⁵
		6.2	315		25	7.26 x 10 ⁵

Experimento con gradiente lumínico (LE)

La tasa de bacterivoría observada en los experimentos LE (Figura 3.4 círculos) mostró una función hiperbólica respecto al tiempo de incubación para cada tratamiento del gradiente de luz. De la misma forma, nuestro modelo (Ecuación 4) ajustado con estos datos mostró una función Michaelis- Menten (M-M) para cada tratamiento (Figura 3.4 línea). La bacterivoría observada fue mayor en el lago Mascardi-C (4.02 nL flagelado⁻¹ h⁻¹, Figura 3.4 d), donde la irradiancia fue de 130 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por el contrario, la bacterivoría fue menor a altas irradiancias (> 1200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Figura 3.4 g y h).



Experimentos de gradiente lumínico (LE)

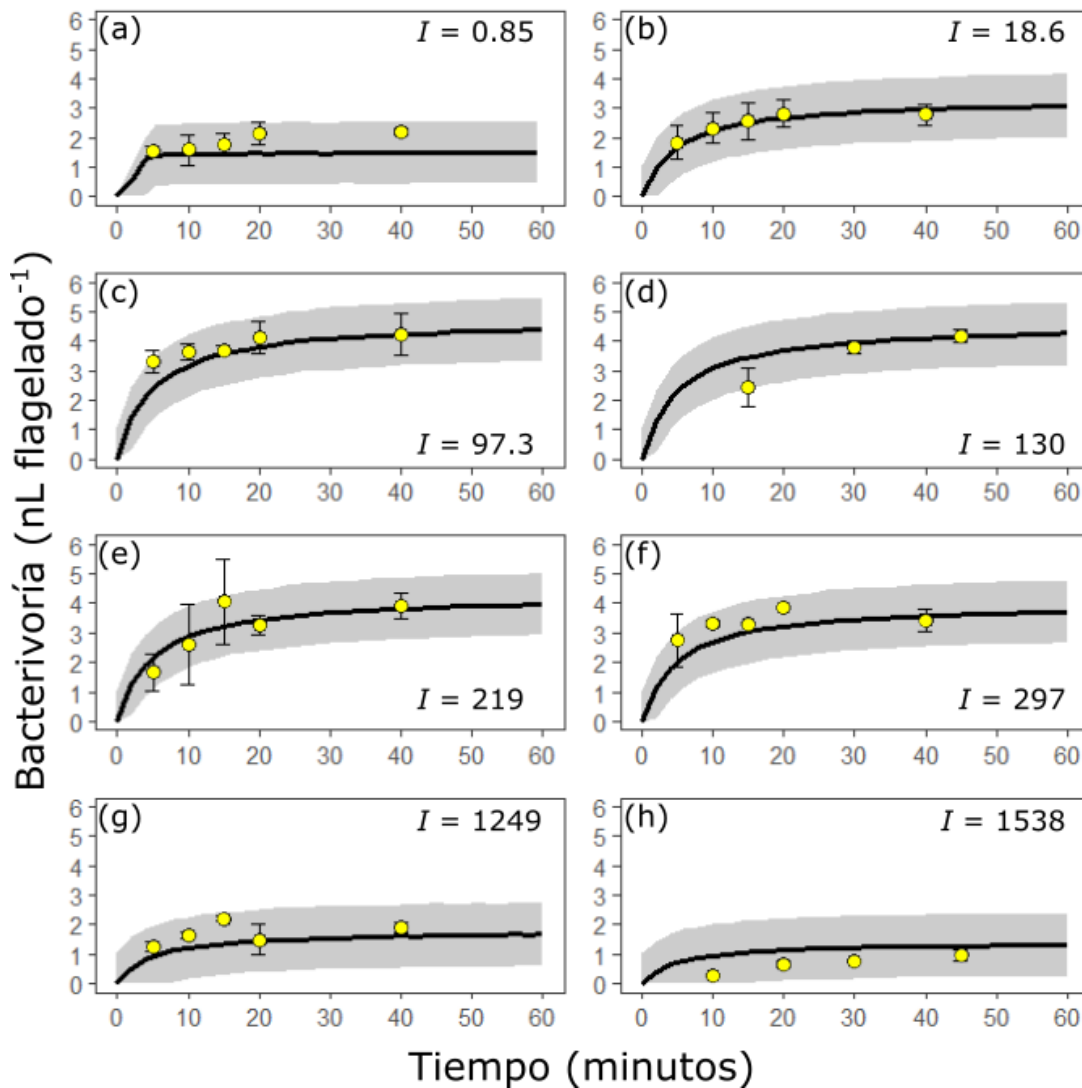
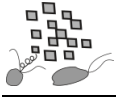


Figura 3.4: Bacterivoría en los experimentos de gradiente lumínico (LE) ordenados de forma creciente de acuerdo a la irradiancia I ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). a: Rivadavia 30 m; b: Moreno 30 m; c: Rivadavia 10 m; d: Mascardi-C; e: Los Cántaros 6 m; f: Moreno 10 m; g: Los Cántaros 0 m; y h: Verde. Los círculos corresponden a los valores de bacterivoría y sus barras corresponden al error estándar. La línea representa la bacterivoría estimada por nuestro modelo. Las bandas grises representan los intervalos Bayesianos del 95% de credibilidad.

Además, al combinar todos los tratamientos del gradiente, la bacterivoría observada a los 40 minutos de incubación mostró una función no monótona con el aumento de la irradiancia (Figura 3.5 círculos). De la misma forma, nuestro modelo (Ecuación 4) a tiempo fijo (40 minutos) y 0 mg de arcilla L^{-1} mostró una función similar a la formulación no monótona de Platt (Platt *et al.*, 1980) (Figura 3.5 línea). De acuerdo a la Figura 3.5, la tasa de bacterivoría más alta se detectó



dentro de un rango de irradiancia de 100 a 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fuera de este rango, la pendiente para irradiancias más bajas fue positiva y la pendiente para irradiancias más altas fue negativa.

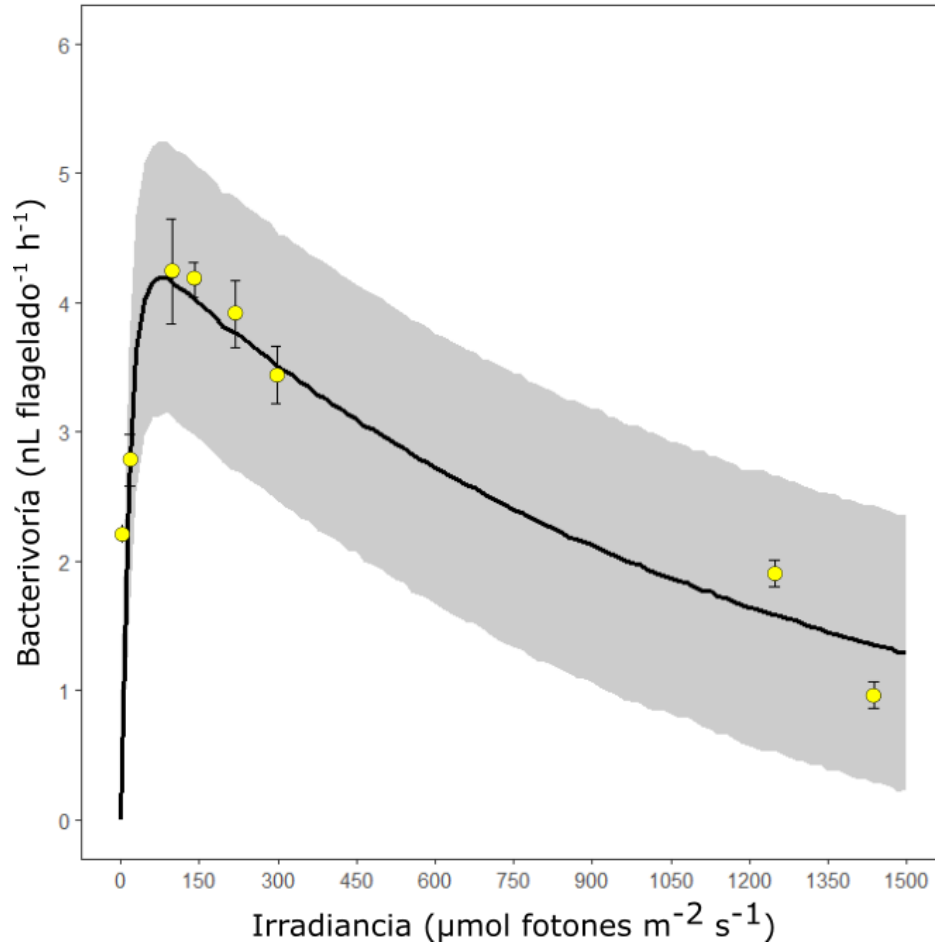
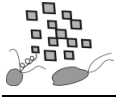


Figura 3.5: Bacterivoría en función de la irradiancia en los experimentos de gradiente lumínico (LE). Los círculos corresponden a la tasa de bacterivoría observada al final de los experimentos (40 o 45 minutos) y sus barras corresponden al error estándar. La línea representa la bacterivoría a 40-45 minutos estimada por nuestro modelo. Las bandas grises representan los intervalos Bayesianos del 95% de credibilidad.

Experimento con gradiente de arcilla glaciar (CE)

La tasa de bacterivoría observada en los experimentos CE mostró una función hiperbólica con el aumento del tiempo de incubación para cada tratamiento del gradiente de arcilla glaciar (Figura 3.6 círculos). No obstante, a medida que aumenta la concentración de arcilla, la función adoptó una forma más lineal (Figura 3.6 f y g). De la misma forma, nuestro modelo (Ecuación 4)



mostró una función Michaelis–Menten (Figura 3.6 líneas), donde la concentración de arcilla varió entre los tratamientos (0–32 mg L⁻¹) y la irradiancia fue siempre de 130 μmol fotones m⁻² s⁻¹. La tasa de bacterivoría más alta se detectó en el tratamiento sin adición de arcilla (Figura 3.6 a), y se encontraron valores más bajos al aumentar la concentración de arcilla.

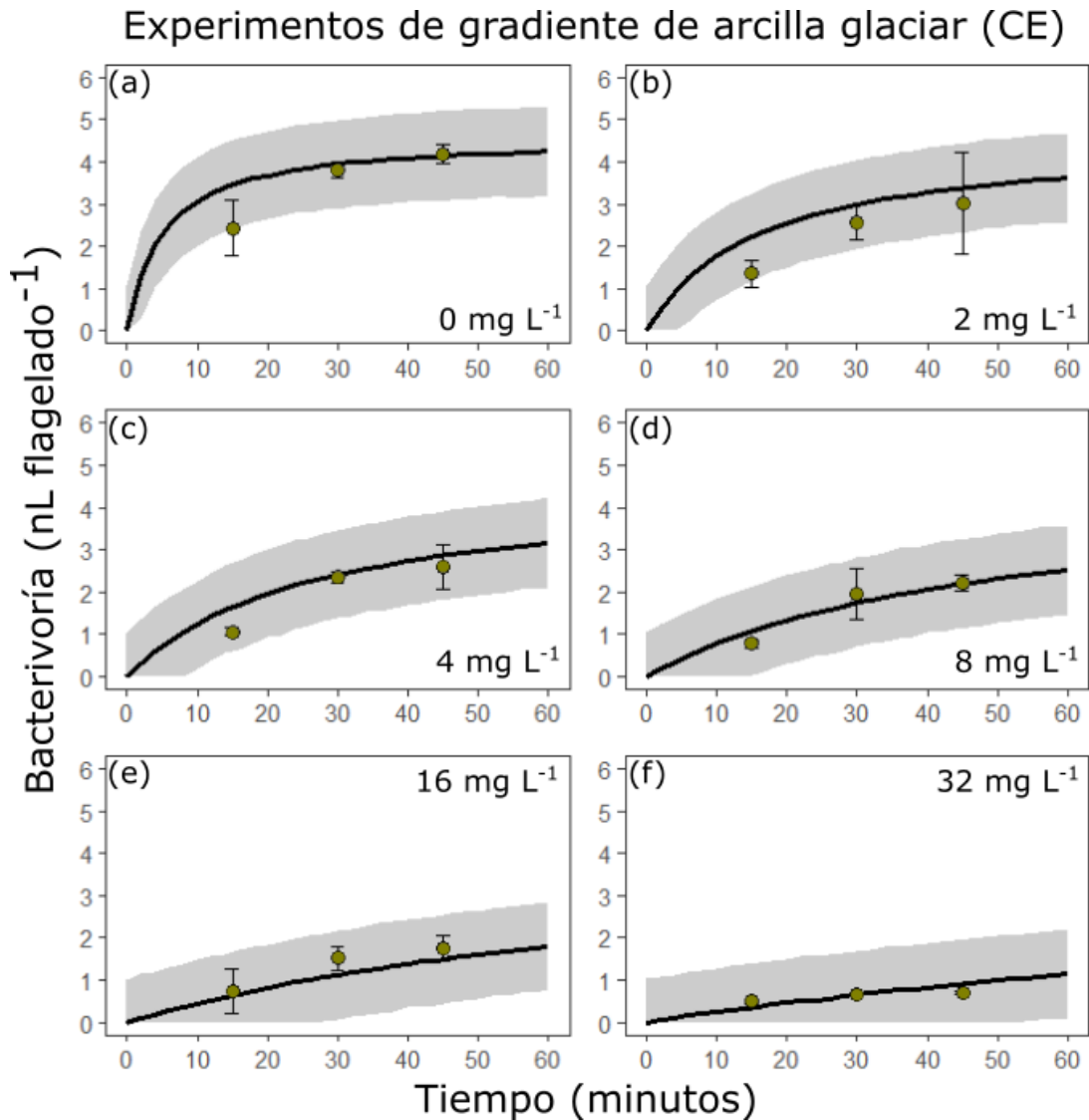
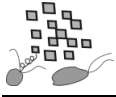


Figura 3.6: Bacterivoría en los experimentos de gradiente de arcillas (CE) ordenados de forma creciente de acuerdo a la concentración de arcilla glaciar. a: 0; b: 2; c: 4; d: 8; e: 16; y f: 32 mg arcilla L⁻¹. Los círculos corresponden a los valores de bacterivoría y sus barras corresponden al error estándar. La línea representa la bacterivoría estimada por nuestro modelo. Las bandas grises representan los intervalos Bayesianos del 95% de credibilidad.



Al analizar en conjunto todos los tratamientos del gradiente, la bacterivoría observada a los 45 minutos mostró un decaimiento exponencial con el aumento de la concentración de arcilla (Figura 3.7 círculos). De la misma forma, nuestro modelo (Ecuación 4) a tiempo fijo (45 minutos) y $130 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostró una función exponencial negativa (Figura 3.7 línea). Es decir, que la tendencia observada en los datos pudo representarse con solo un parámetro (m) afectando el tiempo de manipulación (k). De acuerdo a la Figura 3.7, la tasa de bacterivoría más alta se encontró con $0 \text{ mg de arcilla L}^{-1}$, y se detectó una disminución de más del 30% con la adición de $4 \text{ mg de arcilla L}^{-1}$.

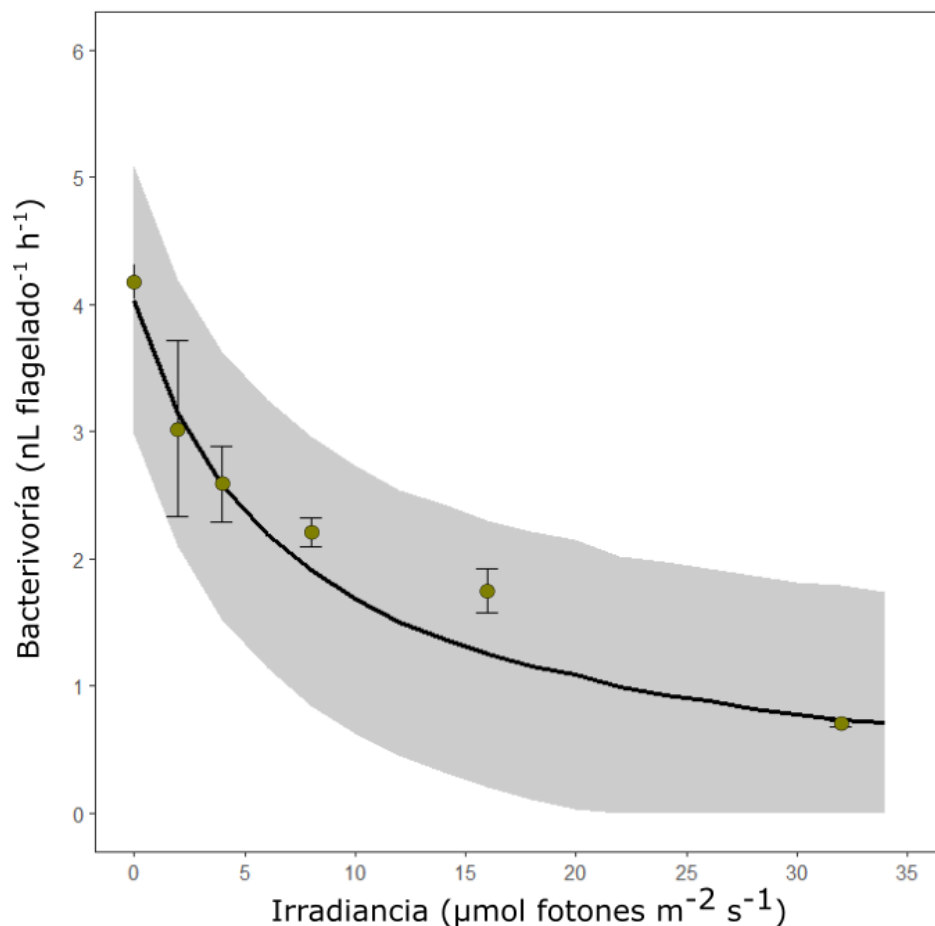


Figura 3.7: Bacterivoría en función de la concentración de arcilla glaciar en los experimentos de gradiente de arcillas (CE). Los círculos corresponden a la tasa de bacterivoría observada al final de los experimentos (45 minutos) y sus barras corresponden al error estándar. La línea representa la bacterivoría a 45 minutos estimada por nuestro modelo. Las bandas grises representan los intervalos Bayesianos del 95% de credibilidad.

*Distribuciones posteriores de los parámetros*

Utilizando los conjuntos de datos de los experimentos LE y CE se obtuvo la calibración bayesiana del modelo “Luz-Arcillas” (Ecuación 4). La media de las distribuciones posteriores y los intervalos de credibilidad del 95% para cada parámetro se muestran en la Tabla 3.4. Los valores de las distribuciones posteriores de los parámetros fueron consistentes con nuestros datos experimentales. El valor medio del parámetro C de máxima bacterivoría teórica fue de $5.2 \text{ nL flagelado}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mayor a la máxima bacterivoría observada en el lago Mascardi-C con irradiancia intermedia y sin adición de arcilla. Los valores de distribuciones posteriores para los otros parámetros relacionados con la irradiancia fueron consistentes con las previas proporcionadas, pero con intervalos de credibilidad más estrechos, lo que indica que la adición de datos experimentales redujo la incertidumbre sobre los parámetros. Además, el tiempo para la mitad de la máxima bacterivoría sin arcilla (k_0) se estimó en 4.5 minutos. Finalmente, el valor posterior de m fue positivo, lo que indica que $1 \text{ mg de arcilla L}^{-1}$ aumenta de 4.5 minutos a valores entre 6 y 7 minutos.

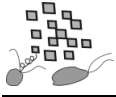


Tabla 3.4: Media e intervalos de credibilidad del 95% de las distribución previa y posterior de los parámetros de nuestro modelo “Luz-Arcillas”. Los intervalos Bayesianos del 95% de credibilidad se muestran entre paréntesis.

Parámetro	Descripción	Unidades	Distribución Previa	Distribución posterior
C	Bacterivoría teórica máxima	nL flagelado ⁻¹	4.00 (2.04 – 5.95)	5.18 (4.75 – 5.64)
α	Pendiente de bacterivoría a baja irradiancia	nL flagelado ⁻¹ I_1	0.50 (0.04 – 2.45)	0.30 (0.23 – 0.39)
β	Pendiente de bacterivoría a alta irradiancia	nL flagelado ⁻¹ I_1	0.05 (0.0 – 0.24)	0.005 (0.003 – 0.006)
γ	Estimador de bacterivoría a irradiancia nula	nL flagelado ⁻¹	0.10 (0.04 – 0.29)	0.035 (0.001 – 0.133)
k_0	Tiempo de saturación media de la bacterivoría sin arcillas	minutos	3.50 (1.54 – 5.45)	4.55 (3.22 – 5.87)
m	Interferencia por partículas no comestibles	minutos TSS ⁻¹	0.00 (-3.92 – 3.92)	6.57 (5.10 – 8.29)

Experimento combinado (LCE)

La tasa de bacterivoría observada en los experimentos LCE mostró una función hiperbólica (Figura 3.8 círculos). Al igual que con los resultados de los experimentos CE, el tiempo de manipulación aumentó con una mayor concentración de arcilla durante el verano, dando una forma más lineal a la hipérbola (Figura 3.8 b y d). La bacterivoría fue mayor durante la primavera, donde la concentración de TSS fue casi diez veces menor que en el verano (2.4 y 21.2 mg L⁻¹ respectivamente). Comparando los niveles de profundidad, la bacterivoría fue mayor a los 6 m que en la superficie durante la primavera, mientras que fue similar entre las profundidades durante el verano. En particular, la bacterivoría máxima se observó en el experimento de primavera a 6 m de profundidad cuando la irradiancia era de 145 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por otro lado, la irradiancia en



verano a 6 m de profundidad fue muy baja ($1.5 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Lago Frías $Z_{1\%PAR} = 2.25$ m), observándose una baja bacterivoría. Nuestro modelo predijo una función de Michaelis–Menten para la bacterivoría en función del tiempo (Figura 3.8 líneas) donde la irradiancia y la concentración de arcilla permanecieron constantes para cada combinación de profundidad y temporada.

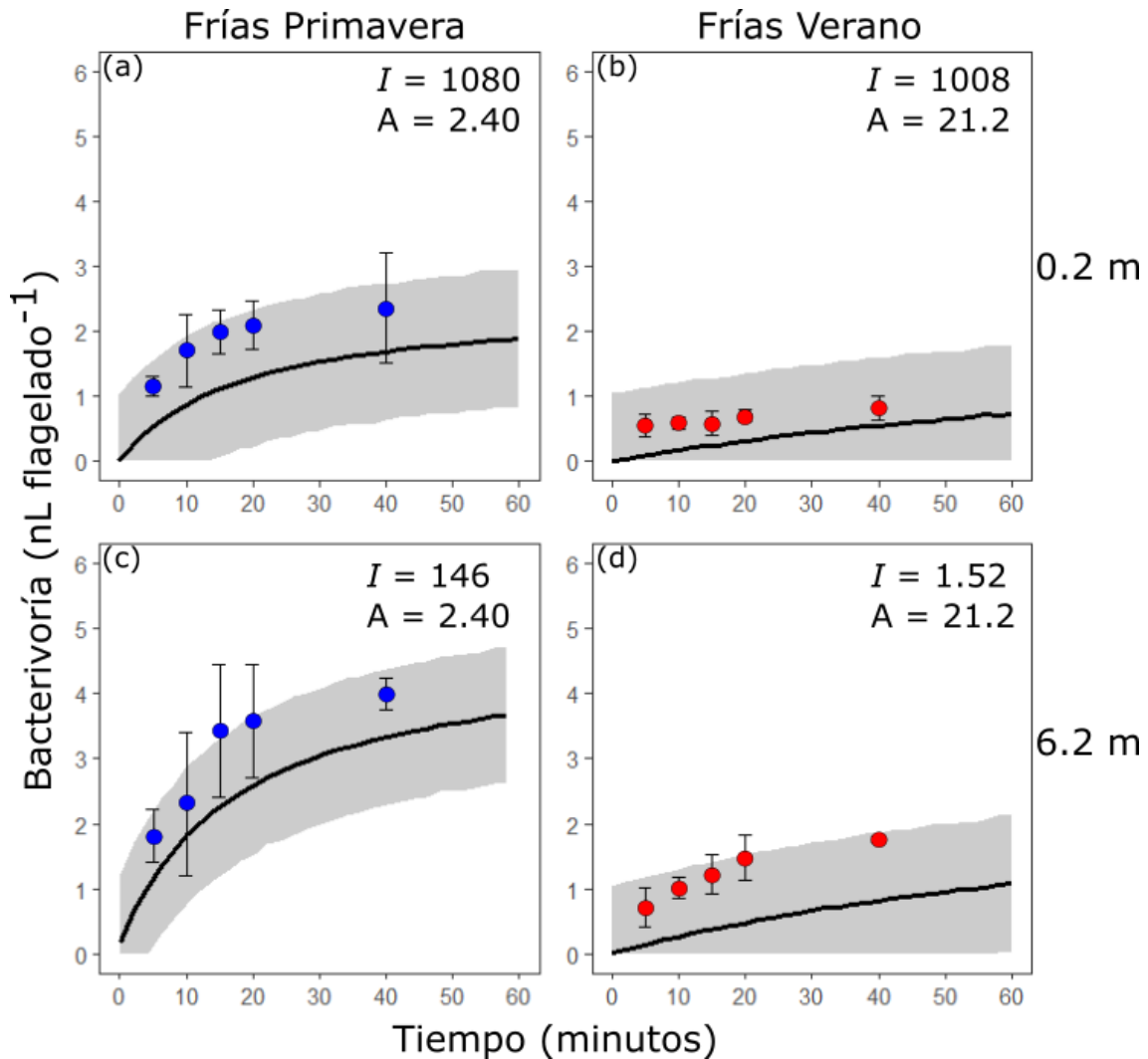
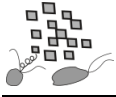


Figura 3.8: Bacterivoría de los experimentos de luz y arcillas combinadas (LCE) realizados en el lago Frías durante distintas temporadas y profundidades. a: Primavera 0.2 m; b: Verano 0.2 m; c: Primavera 6.2 m; y d: Verano 6.2 m. Los círculos corresponden a los valores de bacterivoría y sus barras corresponden al error estándar. La línea representa la bacterivoría predicha por nuestro modelo. Las bandas grises representan los intervalos Bayesianos del 95% de credibilidad. I = irradiancia ($\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), A = concentración de arcilla glaciara (mg L^{-1}).



Finalmente, logramos predecir la bacterivoría en función de la irradiancia y la concentración de arcilla glaciara a partir de nuestro modelo "Luz-Arcillas" calibrado con los experimentos LE y CE, obteniendo una "superficie de predicción del modelo" (Figura 3.9). Según la superficie de predicción del modelo, el efecto no monotónico de la luz se vuelve menos pronunciado a medida que aumenta la concentración de arcilla glaciara. Además, la bacterivoría observada a los 40 minutos en los cuatro tratamientos del lago Frías (Figura 3.9) mostró un alto grado de superposición con la predicción del modelo; en todos los casos, la superficie predicha incluye los valores experimentales ± 1 desvío estándar (Figura 3.9).

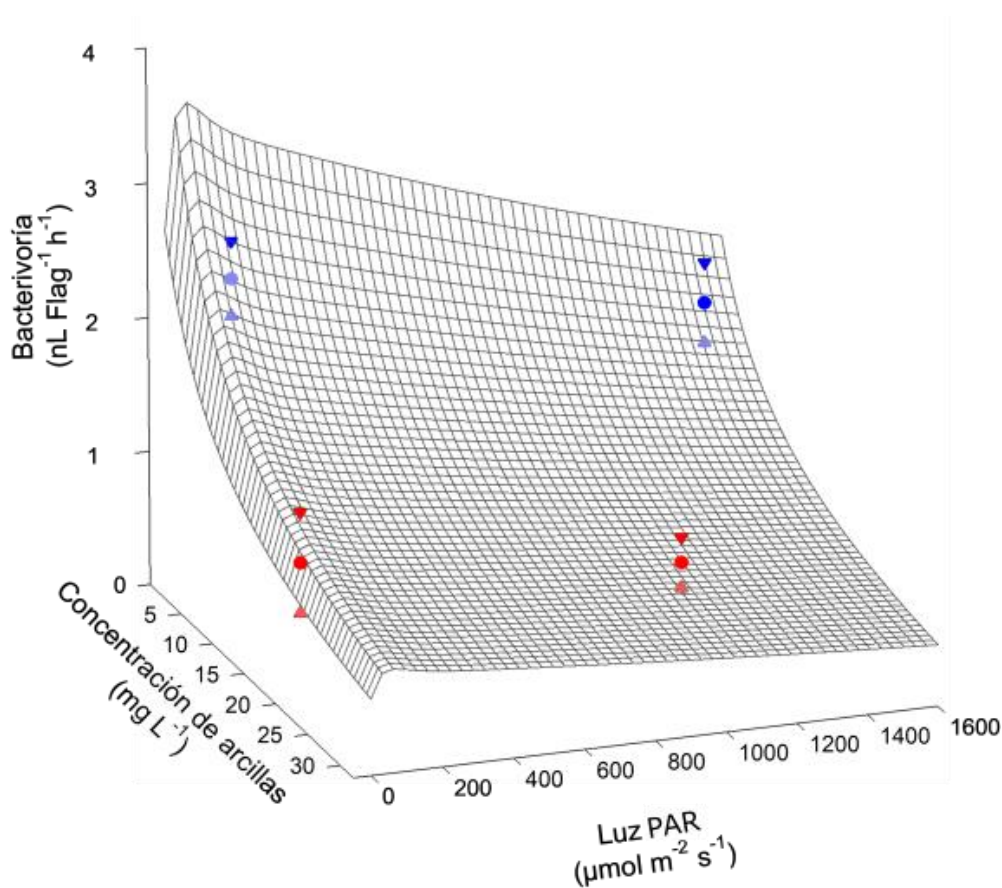


Figura 3.9: Bacterivoría en función de la irradiancia y la concentración de arcillas glaciara. La predicción del modelo a los 40 minutos está representada por la superficie cuadrículada gris. Los círculos corresponden a la bacterivoría efectivamente determinada a los 40 minutos en los experimentos del lago Frías. Los círculos de color azul corresponden a los experimentos de primavera (círculo para la media y triángulo para los desvíos estándar) y los círculos de color rojo corresponden a los experimentos de verano (círculo para la media y triángulo para los desvíos estándar). Nótese que algunos puntos se encuentran por debajo o por encima de la superficie de predicción (las figuras en color atenuado se encuentran por debajo).



Discusión

Nuestros resultados muestran que la fagotrofia por parte de los MNF se ve afectada por las partículas glaciares a través de la atenuación de la luz y la interferencia directa en la alimentación. Ambos efectos, individualmente y combinados, fueron observados en nuestros experimentos de campo y representados exitosamente por nuestro modelo “Luz-Arcillas”. Este modelo consistió en adaptaciones simples de las clásicas fórmulas de Michaelis-Menten y Platt para modelar la bacterivoría en función del tiempo de incubación y las variables ambientales. Aunque estas ecuaciones se consideran bastante simples (Lignell *et al.*, 2013), aumentan rápidamente en complejidad matemática. Sin embargo, los métodos estadísticos bayesianos permitieron la estimación de los parámetros clave en nuestra ecuación modelo, dando como resultado distribuciones de probabilidad posteriores que informan sobre la incertidumbre de los mismos.

Los protistas mixotróficos dominan muchos ecosistemas acuáticos, desde lagos a la zona pelágica de los océanos (Burkholder *et al.*, 2008; Flynn *et al.*, 2012). La mixotrofia aparece como una estrategia adecuada para los protistas en lagos oligotróficos transparentes (Modenutti *et al.*, 2008; Waibel *et al.*, 2019). De hecho, observamos que los MNF dominaron las comunidades nanoplantónicas de los seis lagos estudiados, como se observó en estudios previos realizados en lagos de los Andes norpatagónicos (Queimaliños *et al.*, 2002; Modenutti *et al.*, 2013). Debido a que se detectaron bajas abundancias de HNF, el modelo presentado en este trabajo consideró solo a los MNF. Actualmente, se reconoce que la comunidad de protistas mixotróficos es diversa en términos de cuál es su modo de nutrición primario (fototrofia o fagotrofia) y que esto depende de variables bióticas y abióticas, como la disponibilidad de luz, nutrientes y presas (Jones, 2000; Mitra *et al.*, 2014; Berge *et al.*, 2017). En este sentido, una gran proporción de mixótrofos exhibe una dependencia energética hacia la luz solar no solo para la fototrofia, sino también para la fagotrofia (Jones, 2000; Stoecker *et al.*, 2009; Hansen, 2011) y capítulo anterior.

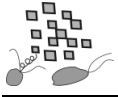
En nuestros experimentos en lagos transparentes de montaña con alta penetración lumínica, encontramos un efecto no monotónico de la luz sobre la bacterivoría. Este efecto pudo ajustarse utilizando la fórmula de Platt (Platt *et al.*, 1980), que se propuso originalmente para vincular la producción primaria y los parámetros fotosintéticos a diferentes irradiancias (Bouman *et al.*, 2018). El hecho que la bacterivoría mostrase una respuesta similar a la luz que la producción primaria sugiere una fuerte influencia de la fototrofia sobre la fagotrofia para esta comunidad de MNF.



Encontramos una tasa de bacterivoría máxima en el rango de luz de 100 a 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mismo rango en el que se observó la máxima eficiencia fotosintética del fitoplancton (Callieri *et al.*, 2007) y capítulo anterior. Por el contrario, la bacterivoría más baja se observó (y predijo) a alta irradiancia probablemente debido a la fotoinhibición y daño por luz (Villafañe *et al.*, 2004; Callieri *et al.*, 2007; Bastidas Navarro *et al.*, 2011). Por último, las tasas de bacterivoría obtenidas en los experimentos de campo fueron consistentes con los valores informados en la literatura. En particular, el tiempo de manipulación sin arcilla (k_0) se estimó en 4.5 minutos y resultó similar al intervalo de tiempo de manipulación de varias especies de flagelados (Boenigk y Arndt, 2002).

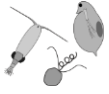
La interferencia por partículas glaciares en la bacterivoría se determinó experimentalmente agregando diferentes concentraciones de arcilla en nuestros experimentos de campo. El rango de concentración de arcilla utilizado en nuestros experimentos representa tanto lagos claros (0 mg L^{-1}) como lagos proglaciares turbios (32 mg L^{-1}) (Sommaruga, 2015; Kammerlander *et al.*, 2016), así como las concentraciones intermedias observadas en el lago Mascardi (Hylander *et al.*, 2011). La disminución de la bacterivoría fue exponencial con el aumento de la concentración de arcilla, lo que indica un fuerte efecto negativo de las partículas glaciares incluso en pequeñas cantidades. De hecho, se observó (y predijo) una disminución del 40% de la bacterivoría con un aumento desde 0 a 5 $\text{mg de arcilla L}^{-1}$. Además, determinamos una tasa de bacterivoría muy baja a niveles de 32 $\text{mg de arcilla L}^{-1}$ lo que afectaría negativamente a estos organismos. En tal sentido, otros trabajos observaron también que este alto nivel de turbidez afecta el crecimiento y la supervivencia de los HNF (Sommaruga y Kandolf, 2014). Por esta razón, a estos altos niveles de concentración de arcillas glaciares los nanoflagelados (HNF y MNF) se ven seriamente disminuidos.

Nuestro enfoque para modelar la interferencia de la arcilla sobre la bacterivoría fue simple, sin embargo, resultó eficaz para representar nuestros resultados. Un valor positivo del coeficiente de interferencia por partículas (m) indica que la presencia de arcilla glaciar aumenta el tiempo de manipulación por parte del fagótrofo. Dado que la manipulación de las presas lleva varios minutos (Boenigk y Arndt, 2002) (Figura 3.3), un aumento en el tiempo de manipulación implicaría una disminución de la bacterivoría. Si la partícula capturada no es comestible (arcilla), comienza un proceso de rechazo y expulsión de la misma que podría durar incluso más que el tiempo necesario para ingerir la presa (Boenigk y Arndt, 2002) (Figura 3.3). Bajo este escenario, encontramos que un aumento en la concentración de arcilla tiende a darle una forma lineal a la curva hiperbólica, lo



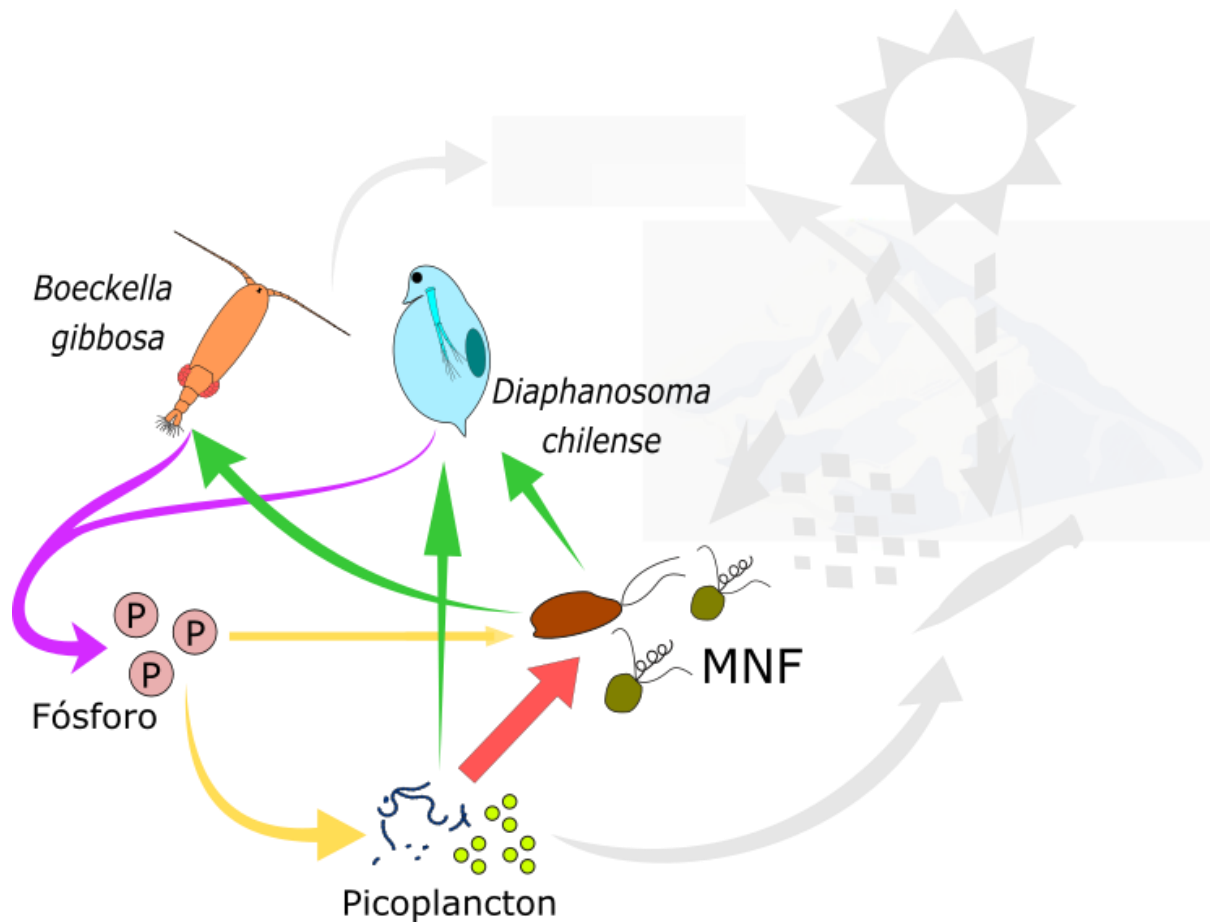
que dificulta la visualización de una asíntota en función al tiempo de incubación. Además, en nuestras muestras, vimos partículas de arcilla adheridas a la superficie celular y flagelos, mientras que otras probablemente fueron ingeridas (ver Kuosa (1991) para la detección de partículas ingeridas). Sin embargo, queda sin explorar si el efecto negativo de la arcilla sobre los flagelados es solo una consecuencia de la ingestión y expulsión de partículas no comestibles o una reducción en la eficiencia de fagotrofia causada por las partículas adheridas.

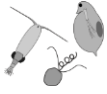
Los efectos de la atenuación de la luz y la interferencia directa en la alimentación causada por las partículas glaciares interactúan en el lago proglaciar Frías y fueron predichos con éxito por nuestro modelo. Los datos de los experimentos LE y CE se utilizaron para entrenar el modelo (ajustar sus parámetros), mientras que el experimento LCE sirvió como un conjunto de datos independiente para probar la capacidad predictiva de nuestro modelo. Así, la superficie tridimensional obtenida representa la función predictiva de la ecuación del modelo que describe los lagos de montaña con influencia glaciar variable. Una consecuencia importante de nuestro modelo es el efecto decreciente de la irradiancia sobre la bacterivoría al aumentar la concentración de arcilla. El lago Frías se estudió en dos períodos diferentes de concentración de arcilla que, a su vez, afectaron la disponibilidad de luz. Durante la primavera temprana y debido al bajo nivel erosivo de los glaciares durante el invierno, el lago se presenta con menores niveles de arcilla y, por lo tanto, más claro. Bajo esas circunstancias, observamos una mayor bacterivoría a 6 m de profundidad donde se presentaba un mejor ambiente lumínico (irradiancias intermedias a bajas) que en superficie (irradiancias altas). En contraste, en el verano (luego de altos niveles de deshielo) el lago se encuentra turbio y con altas concentraciones de arcilla. En este escenario, la bacterivoría disminuyó debido tanto a la atenuación de la luz como a un aumento de la interferencia directa por partículas. El modelo predijo con éxito este resultado, lo que indica su utilidad para una amplia gama de condiciones de turbidez tal como ocurre en lagos proglaciares. Además, la comunidad de nanoflagelados cambió entre temporadas, desde el predominio de *Chrysochromulina parva* en la primavera hacia una mayor abundancia relativa de *Plagioselmis lacustris* en las condiciones más turbias del verano. Sin embargo, el modelo fue capaz de predecir con éxito el cambio de bacterivoría a pesar de tratarse de diferentes especies de nanoflagelados.



Capítulo 4

Los efectos del pastoreo y el reciclado de nutrientes por parte del zooplankton en el bucle microbiano planctónico: modelado de la red trófica



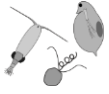


Introducción

El reciclado de nutrientes se reconoce, actualmente, como una interacción clave entre los depredadores y los niveles tróficos más bajos (Schmitz *et al.*, 2010). La evidencia empírica obtenida durante las últimas tres décadas destaca la importancia de los consumidores en los ciclos biogeoquímicos (Attayde y Hansson, 1999; Vanni, 2002; Atkinson *et al.*, 2017; Sitters *et al.*, 2017). El reciclado de nutrientes también cobra relevancia en el estudio de la dinámica eco-evolutiva de los depredadores y sus presas (Branco *et al.*, 2020). En modelos actuales de redes tróficas acuáticas, existe un creciente interés por integrar enfoques empíricos y teóricos para comprender el papel de los depredadores en los ciclos de los nutrientes (Atkinson *et al.*, 2017).

En ambientes donde el fósforo (P) es el nutriente limitante, como en muchos lagos oligotróficos, las comunidades microbianas planctónicas representan la mayor parte de la producción primaria y la transferencia de energía hacia niveles tróficos más altos (Cotner y Biddanda, 2002). La afinidad por el P disuelto es mayor para el picofitoplancton (picocianobacterias y picoeucariotas) que para el fitoplancton más grande debido a una mayor relación superficie-volumen, lo que permite alcanzar una mayor concentración de P por unidad de biovolumen (en adelante, contenido de P) que las células más grandes (Tambi *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2012; Branco *et al.*, 2020). Además, la combinación de fototrofia y fagotrofia representa una ventaja para los protistas mixotróficos frente a los estrictamente autótrofos al alimentarse de picoplancton rico en P (Yvon-Durocher *et al.*, 2017). Como consecuencia, el zooplancton que consume diferencialmente presas con distinto contenido de P daría lugar a diferencias en las tasas de adquisición y excreción de P (Elser *et al.*, 1996; Balseiro *et al.*, 1997).

Para poder incorporar el reciclado de nutrientes en los modelos de redes tróficas, es necesario considerar parámetros clave como la afinidad por los nutrientes y la capacidad de almacenamiento interno del fitoplancton (Edwards *et al.*, 2012) y características del bucle microbiano (Tambi *et al.*, 2009). Estos parámetros de utilización de nutrientes han servido durante mucho tiempo para vincular la eco-fisiología del fitoplancton con interacciones de competencia entre especies y cómo se estructuran las comunidades planctónicas (Eppley *et al.*, 1969; Tilman *et al.*, 1982). Asimismo, pueden ser utilizados en modelos que predicen las dinámicas poblacionales y resultados experimentales (Grover, 1991), permitiendo una comprensión mecanicista de las dinámicas naturales de la comunidad planctónica (Litchman y Klausmeier, 2008). Se ha



demostrado que muchos de estos parámetros escalan alométricamente con el volumen celular, como la tasa máxima de absorción de nutrientes, la constante de semisaturación de un nutriente y el contenido celular mínimo de un nutriente (Shuter, 1978; Grover, 1989; Litchman *et al.*, 2007; Tambi *et al.*, 2009). Por lo tanto, las relaciones entre estos parámetros permiten predecir cambios en la estructura trófica de la comunidad planctónica en términos de tamaño, composición específica y estrategias nutricionales frente a variaciones en la disponibilidad de nutrientes.

El bucle microbiano se encuentra conectado de manera directa al metazooplancton a través del pastoreo (Modenutti *et al.*, 2003; Zöllner *et al.*, 2003). Los cladóceros pelágicos pueden acceder a casi todos los compartimentos microbianos, ya que pueden filtrar eficazmente una amplia gama de tamaños de partículas (Brendelberger, 1991). En este sentido, distintos estudios han demostrado la eficiencia del sídido *Diaphanosoma* como bacterívoro (Gophen y Geller, 1984; Brendelberger, 1991). A pesar de esta alta eficiencia, el género *Diaphanosoma* rara vez se consideró como un herbívoro directo del picoplancton, por lo que se ignoró su posible efecto competitivo sobre otros bacterívoros (como los nanoflagelados fagotróficos). Por otro lado, los copépodos calanoideos, dominantes en cuerpos de agua del hemisferio sur, se han indicado como importantes consumidores de protistas mixotróficos (Burns y Schallenberg, 1996; Balseiro *et al.*, 2001; Modenutti *et al.*, 2003). Algunas especies del género *Boeckella* pueden consumir más protistas (nanoflagelados, ciliados y microalgas 20-200 μm) que los cladóceros (Burns y Schallenberg, 1996), provocando efectos en cascada sobre otros compartimentos microbianos (Vrede y Vrede, 2005). Por otra parte, se ha observado que células pequeñas como picocianobacterias pueden agregarse con una matriz gelatinosa (Callieri, 2010) aumentando su tamaño y reduciendo la depredación (Boenigk y Arndt, 2002; Huber *et al.*, 2017) (Figura 4.1). Por lo tanto, las comunidades planctónicas dominadas por grupos de zooplancton contrastantes pueden intensificar o mitigar la limitación por nutrientes de sus presas al ser un sumidero o fuente eficaz de elementos específicos (Hessen *et al.*, 1992; Balseiro *et al.*, 1997; Branco *et al.*, 2018).

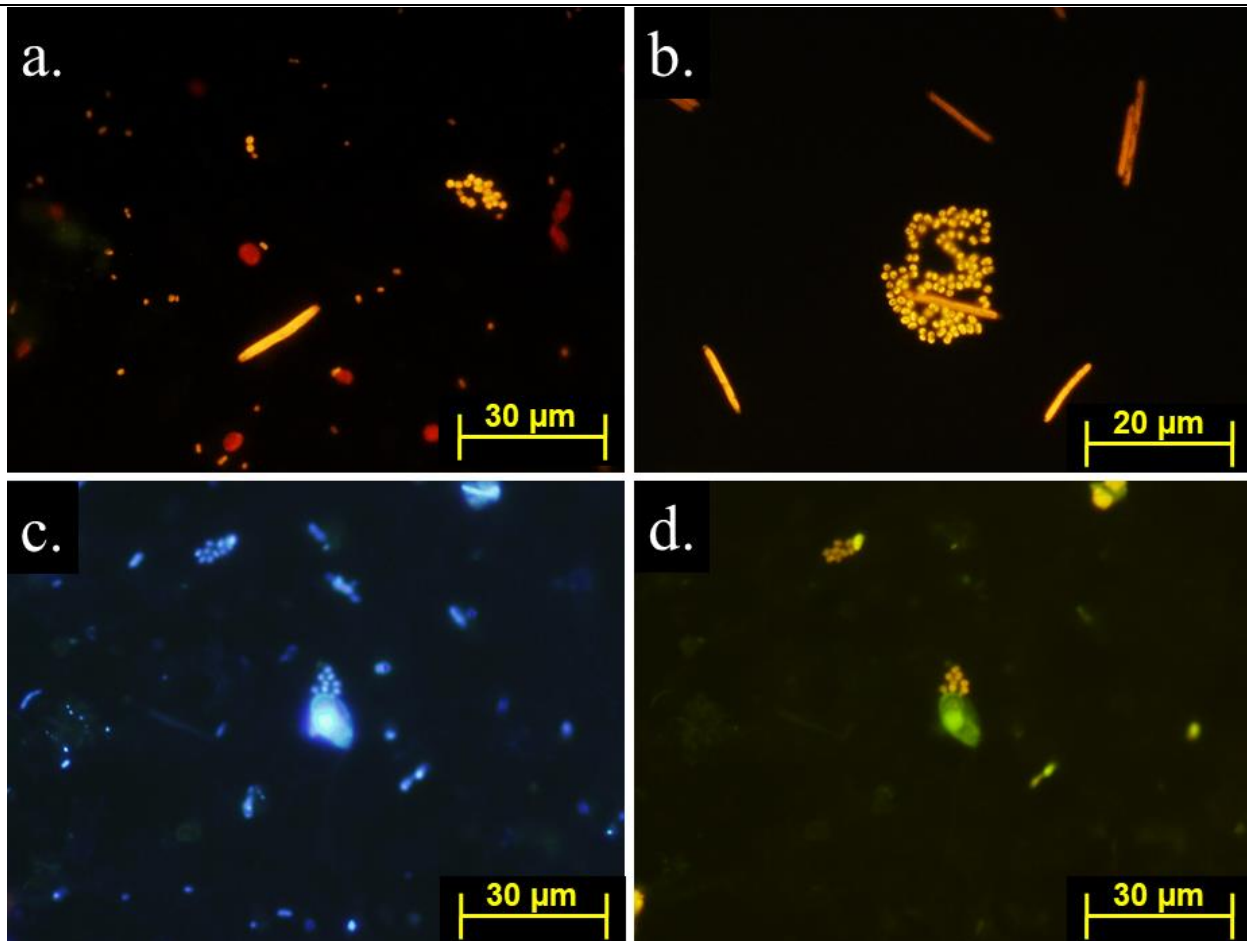
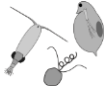
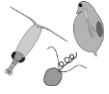
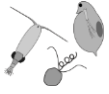


Figura 4.1: Formas de picocianobacterias (Pcy). Referencias: a. = Pcy solitarias, coloniales y elongadas. b. = colonia de Pcy (CPcy), c = flagelado en contacto con una CPcy (epifluorescencia luz UV), d = flagelado en contacto con una CPcy (epifluorescencia luz azul). a y b fotos gentileza Dra. Cristiana Callieri. c y d: fotos del Lago Los Cántaros durante este estudio.

Los sistemas lacustres andinos del norte de la Patagonia han sido definidos como sistemas de elevada relación luz:nutrientes, y bajo estas condiciones se generan altas relaciones C:P (carbono:fósforo) que resultan en redes tróficas caracterizadas por una baja calidad de recursos para los herbívoros (Balseiro *et al.*, 2008). En tal sentido, esta baja calidad de alimento restringe la distribución del zooplancton (Balseiro *et al.*, 2008; Laspoumaderes *et al.*, 2013) y destaca la importancia del reciclado de nutrientes (Balseiro *et al.*, 1997). Con respecto a las vinculaciones tróficas, los efectos directos del pastoreo del zooplancton sobre las diferentes fracciones del bucle microbiano son parcialmente conocidos (Modenutti *et al.*, 2003). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de los efectos del reciclado de nutrientes en el bucle microbiano y, en particular, sobre



los protistas mixotróficos. Tampoco se conocen los efectos de cladóceros del género *Diaphanosoma* (en nuestro caso *D. chilense*) en comparación con copépodos del género *Boeckella* dominantes en el hemisferio Sur. El lago Los Cántaros presenta una fuerte limitación por P (Souza *et al.*, 2010; Villar-Argaiz *et al.*, 2017), un fitoplancton dominado por nanoflagelados mixótrofos (Carrillo *et al.*, 2017), y un zooplancton donde coexisten el cladócero *D. chilense* con el copépodo *B. gibbosa*, por lo cual resulta un escenario óptimo para abordar los aspectos mencionados. En el presente capítulo, analizamos y modelamos el efecto del pastoreo y el reciclado de P de dos especies de zooplancton en la dinámica del bucle microbiano en términos de la abundancia y el contenido de P de los distintos compartimentos.



Objetivo general

Analizar y modelar los efectos del pastoreo y reciclado de nutrientes por parte del zooplancton (*D. chilense* y *B. gibbosa*) en el bucle microbiano planctónico.

Objetivos específicos

Evaluar por separado los efectos del pastoreo y reciclado de fósforo por parte de un copépodo (*B. gibbosa*) y un cladócero (*D. chilense*) a través de experimentos de campo.

Desarrollar un modelo mecanicista de la red trófica planctónica basado en la dinámica del fósforo e interacciones dentro del bucle microbiano y entre el bucle microbiano y el zooplancton.

Ajustar el modelo con los datos experimentales obtenidos y valores obtenidos de la bibliografía utilizando un enfoque Bayesiano.

Predecir la dinámica del fósforo particulado y disuelto dentro de la red trófica planctónica, así como la tasa de excreción de *B. gibbosa* y *D. chilense*.

Hipótesis

La biomasa y el contenido de fósforo de los niveles tróficos inferiores (bacterias heterotróficas, picoplancton autótrofo, nanoflagelados y microalgas) de ambientes oligotróficos depende del pastoreo y reciclado diferencial de P de copépodos y cladóceros.

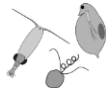
Predicciones

La presencia directa del copépodo *B. gibbosa* reducirá la biomasa de nanoflagelados y microalgas por pastoreo.

La presencia indirecta del copépodo *B. gibbosa* aumentará la biomasa de bacterias heterotróficas y picocianobacterias por un alto reciclado de fósforo.

La presencia directa del cladócero *D. chilense* reducirá la biomasa de bacterias heterotróficas y picocianobacterias y aumentará la biomasa de colonias de picocianobacterias.

La presencia indirecta del cladócero *D. chilense* reducirá la biomasa de microalgas por un bajo reciclado de fósforo.



Materiales y Métodos

Área de estudio

Los experimentos se realizaron en el lago Los Cántaros (noroeste de la Patagonia, Argentina, 41° 00'S, 71° 49'W) ubicado a 874 m.s.n.m., a 3 km de la Estación Biológica Puerto Blest (Universidad Nacional del Comahue). El lago tiene 14 m de profundidad máxima y es oligotrófico (Clorofila a $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$), transparente (más del 1% de la radiación fotosintéticamente activa [PAR, 400-700nm] penetra hasta la profundidad máxima), y con una fuerte limitación de P (Souza *et al.*, 2010; Villar-Argaiz *et al.*, 2017). Los lagos norpatagónicos tienen aguas muy diluidas, con concentraciones de iones por debajo del promedio mundial (Markert *et al.*, 1997). El lago Los Cántaros en particular tiene una conductividad muy baja ($< 40 \mu\text{S cm}^{-1}$). El fitoplancton está dominado principalmente por picocianobacterias (Pcy) y pequeños nanoflagelados mixotróficos (MNF) como *Chrysochromulina parva* (Carrillo *et al.*, 2017). No se registraron piceocariotas, mientras que los HNF se encuentran en muy bajas abundancias (< 15 individuos por mL). Especies más grandes del fitoplancton son menos abundantes y están representadas principalmente por pequeñas diatomeas (*Cyclotella* spp.) y dinoflagelados autótrofos (*Gymnodinium paradoxum*). Respecto a los ciliados, estos se encuentran en bajas abundancias (< 5 individuos por mL) y están representados principalmente por *Strombidium* spp., mientras que ciliados más grandes como *Ophrydium naumanni* o *Stentor araucanus* no se han detectado en este lago. El zooplancton está dominado por dos especies de microcrustáceos, el copépodo calanoideo *Boeckella gibbosa* y el cladóceros sídido *Diaphanosoma chilense*. El aparato bucal del copépodo *B. gibbosa* se encuentra descrito en De Mitrovich y Menu-Marque (1997). En el caso del cladóceros, se hizo una observación previa bajo microscopio de su aparato de filtración ya que el mismo no se encontraba descrito en la literatura. Se observa que la especie posee un estrecho espacio intersetular que le permitiría acceder a presas pequeñas menores de $1 \mu\text{m}$ (Figura 4.2).

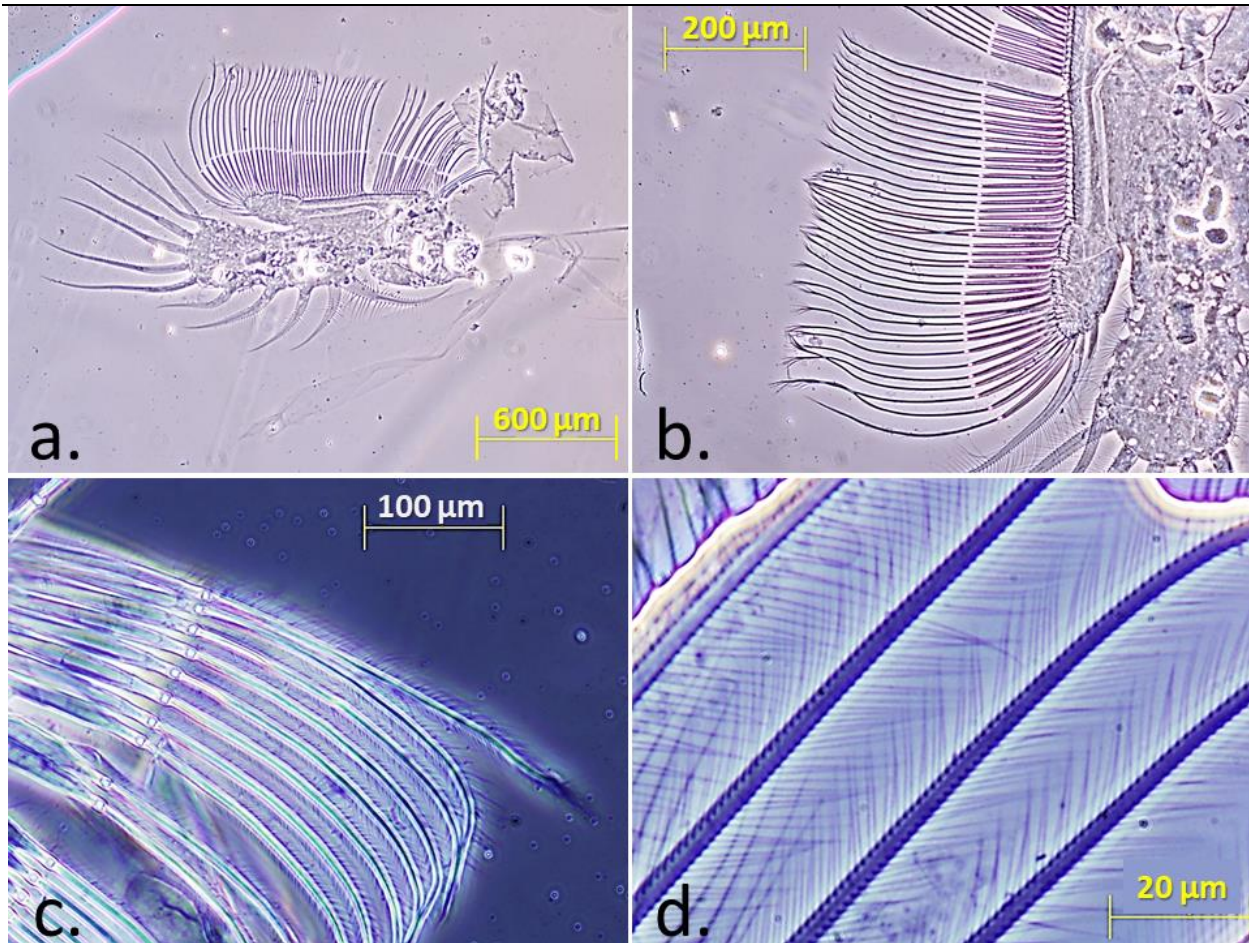
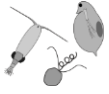
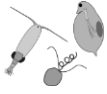


Figura 4.2: Aparato de filtración del cladócero sídido *Diaphanosoma chilense*. Referencias: a. vista de un apéndice filtrador completo; b. vista de las sedas filtradoras y su disposición en el apéndice; c. detalle de las sedas filtradoras; d. detalles de las sétulas que se insertan en las sedas filtradoras.

Experimentos de incubación en el campo

Se determinó el efecto del pastoreo (G) y el reciclado de nutrientes (R) del copépodo *B. gibbosa* y el cladócero *D. chilense* con un experimento de incubación a corto plazo (48 h) realizado en verano (4 al 6 de febrero de 2020). Las unidades experimentales consistieron en recipientes de poliestireno transparente de 1 L llenos de agua de lago filtrada pasivamente a través de una red de malla de 55 μm para remover el zooplancton. Las unidades experimentales se dividieron según los diferentes tratamientos y tiempo de incubación con 4 repeticiones cada una. El experimento consistió en un diseño factorial con 6 tratamientos: “R Control”, “R *Diaphanosoma*”, “R *Boeckella*”, “R+G Control”, “R+G *Diaphanosoma*” y “R+G *Boeckella*” (Figura 4.3). Los Tratamientos “R+G” (con ambos efectos G y R presentes) consistieron en frascos (unidades



experimentales) con presencia directa de zooplancton (5 individuos de *D. chilense* o *B. gibbosa*) o sin zooplancton (“R+G Control”). Los tratamientos “R” consistieron en una presencia indirecta de zooplancton (solo el efecto R presente) y esta condición se logró utilizando dos bolsas de diálisis dentro de las unidades experimentales (SigmaTM, de 8 cm de diámetro 15 cm de largo, 300 mL de capacidad). Las bolsas de diálisis se lavaron previamente con agua destilada durante 3 horas y se dejaron durante la noche en agua MilliQ. Previo a los experimentos a campo, se verificó en el laboratorio que las bolsas de diálisis lavadas no liberaran nutrientes disueltos (carbono orgánico disuelto: DOC, nitrógeno total disuelto: TDN o fósforo total disuelto: TDP) al agua. Las bolsas se transportaron al campo en agua MilliQ y se colocaron dentro de los recipientes de 1 L y se llenaron con el agua filtrada del lago. Luego, se colocaron cinco individuos de zooplancton (*B. gibbosa* o *D. chilense*) en cada recipiente en los tratamientos “R+G”, pero por fuera de las bolsas de diálisis en los tratamientos “R” (Figura 4.3). En nuestro experimento, se utilizó *B. gibbosa* en estadio de copepodito cinco (~1.6 mm) o adultos de *Diaphanosoma chilense* (~1.5 mm). Finalmente, los tratamientos “R control” consistieron en el mismo procedimiento utilizando recipientes de 1 L con las bolsas de diálisis y sin adición de zooplancton. Todas las unidades experimentales se sumergieron en el lago a 2 m de profundidad (58% del PAR superficial) y se retiraron cuatro réplicas de cada tratamiento a 24 y 48 h.

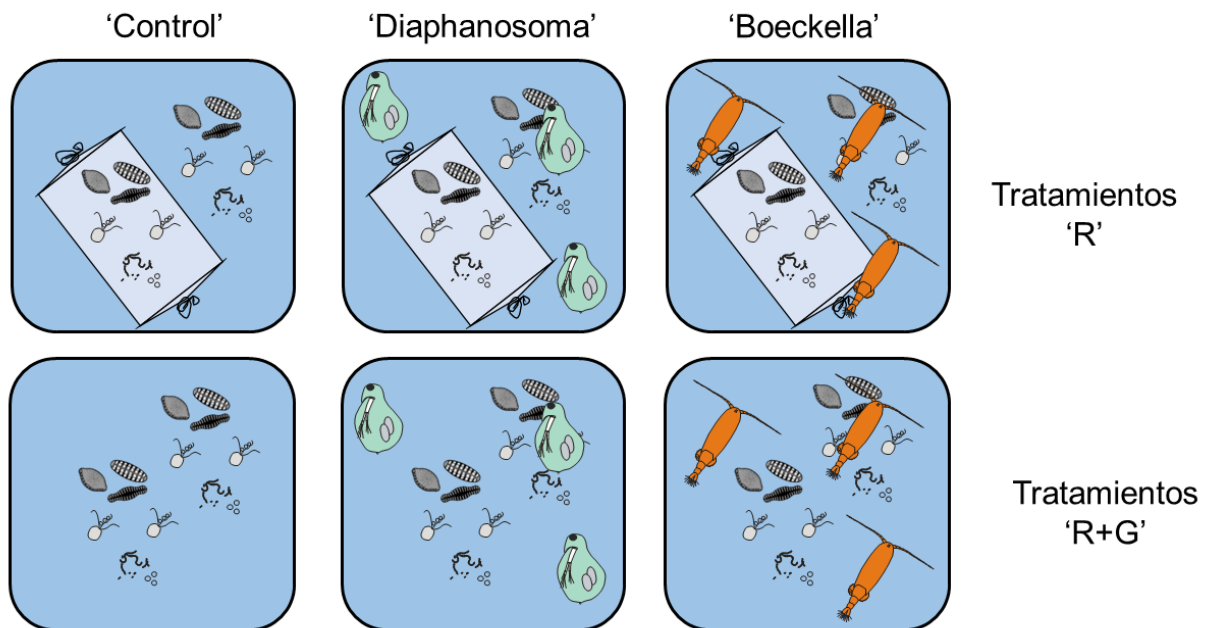
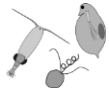
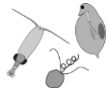


Figura 4.3: Diseño del experimento de incubación con zooplancton realizado en el lago Los Cántaros. El experimento consistió en un diseño factorial con 6 tratamientos. Los tratamientos “R” se realizaron utilizando bolsas de diálisis para evitar el pastoreo de zooplancton, por lo que sólo el efecto del reciclado de nutrientes estaba presente dentro de las bolsas. Los tratamientos “R+G” se realizaron sin las bolsas de diálisis permitiendo el contacto directo del zooplancton con los niveles tróficos inferiores, pudiendo estar presentes tanto los efectos del pastoreo como del reciclado de nutrientes.

Luego de ser removidas del agua, las unidades experimentales fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio de la Estación Biológica de Puerto Blest, en oscuridad dentro de contenedores térmicamente aislados. El agua dentro de los recipientes de 1 L (“R+G”) o dentro de las bolsas de diálisis (“R”) se recogió para los diferentes análisis. Se utilizó un volumen de 150 mL para analizar el fósforo total (TP) y el fósforo total disuelto (TDP). Se conservó un volumen de 60 mL con formaldehído (concentración final 2% v/v) para recuento de bacterias, Pcy y flagelados. Estas muestras se almacenaron refrigeradas en la oscuridad y se cuantificaron dentro de las 2 semanas posteriores al muestreo. Finalmente, se conservó un volumen de 50 mL con solución ácida de Lugol para cuantificación de fitoplancton y ciliados.



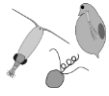
Experimentos de laboratorio

Se midió la excreción y egestión de P por parte de *B. gibbosa* y *D. chilense* de acuerdo a Laspoumaderes *et al.* (2015). Las muestras de zooplancton se recolectaron con una red de plancton (malla de 200 μm) haciendo al menos tres lanzamientos horizontales independientes en el área central del lago. Los individuos de ambas especies fueron cuidadosamente transportados en agua de lago natural (filtrada a través de una malla de 55 μm) hasta la Estación Biológica Puerto Blest. Se colocaron 10 individuos de *B. gibbosa* o 10 de *D. chilense* en Erlenmeyers con tapa esmerilada de 125 mL (6 réplicas por cada especie) llenos de agua MilliQ. Debido a la conductividad extremadamente baja del lago Los Cántaros, *D. chilense* y *B. gibbosa* no mostraron ningún signo de estrés (problemas en la natación, integridad corporal y/o hinchazón). Sin embargo, estos datos de excreción no se utilizaron en la calibración del modelo, sino para compararlos con la excreción predicha por el modelo para cada especie de zooplancton. Después de 4 h, se retiraron cuidadosamente los individuos del zooplancton con una pipeta limpia y el agua se filtró a través de filtros Whatman GF/F lavados previamente con ácido y puestos en estufa a 450 °C por 2 h. Los filtros fueron analizados para fósforo particulado total (TPP) y el agua filtrada para TDP. Finalmente, los individuos de zooplancton fueron recolectados y designados para análisis de contenido corporal de C y P.

Determinaciones de laboratorio

El fósforo total (TP) se determinó usando agua de lago sin filtrar y el fósforo total disuelto (TDP) se determinó usando agua de lago filtrada a través de filtros GF/F lavados previamente con ácido y puestos en estufa a 450 °C por 2 h. Las muestras para la determinación de P (TDP y TP) se digirieron con persulfato de potasio a 125 °C a 1.5 atm durante 1 h. Luego, las concentraciones de P se determinaron con el método de molibdeno reducido (APHA, 2005) y se midió la absorbancia en cubetas de 100 mm con un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV2450 a 885 nm (Límite de detección: $0.5 \mu\text{g L}^{-1} = 0.016 \mu\text{mol L}^{-1}$).

El fósforo particulado total (TPP) del experimento de excreción de laboratorio se determinó en los filtros GF/F puestos en estufa y lavados con ácido. Los filtros se colocaron en 45 mL de agua MilliQ. El contenido de P de los cladóceros y copépodos se obtuvo colocando 10 individuos de cada especie (previamente enjuagados en agua MilliQ) en 45 mL de agua MilliQ. En ambos casos, se determinó la concentración de P como TP. Por otra parte, el contenido de C somático del

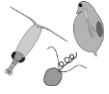


zooplancton se obtuvo colocando a los individuos por separado en filtros Whatman GF/F previamente muflados (2 horas a 450 °C) y se analizó en un analizador elemental Thermo Finnigan EA 1112 CN (Thermo Scientific, Milán, Italia).

Para la cuantificación de bacterias, se tiñeron 3 mL de las muestras del experimento de campo con el fluorocromo 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; concentración final 0.2% p/v) de acuerdo a Porter y Feig (1980). El recuento se realizó en filtros de membrana negra (Poretics, tamaño de poro de 0.2 μm) con un aumento de 1250x con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50 (Olympus, Japón) usando luz UV (filtro U-MWU). Se contaron además las Pcy en filtros de policarbonato negro (Poretics, tamaño de poro de 0.2 μm) mediante autofluorescencia utilizando el mismo microscopio equipado con luz azul (filtro U-MWB, excitación de 450-480 nm y emisión de 500-515 nm) y luz verde (Filtro U-MWG, excitación de 510-550 nm y emisión de 590-570 nm). Finalmente, se tiñó un volumen de 40 mL con DAPI (concentración final 0.2% p/v) y se filtró sobre filtros de membrana negra de 1 μm (Poretics) para la enumeración de NF. Las células se contaron mediante microscopía de epifluorescencia a 1250x de aumento, utilizando luz UV y luz azul y verde (filtros como el anterior), para distinguir entre nanoflagelados heterotróficos (HNF) y mixotróficos (MNF). La cuantificación del fitoplancton se realizó utilizando un microscopio invertido y cámaras Utermöhl. Se utilizó un analizador de imágenes para el recuento y las medidas de tamaño (Image Pro Plus, Media Cybernetic, Rockville, EE. UU.). Se midieron al menos 30 células de cada especie de picoplancton, nanoflagelados y fitoplancton y se calculó el biovolumen celular por aproximación a figuras geométricas apropiadas (Sun y Liu, 2003).

Construcción del modelo

Desarrollamos un modelo matemático para representar cómo los depredadores contrastantes cambian la biomasa y el contenido de P de sus presas a través del pastoreo y el reciclado de nutrientes. El modelo se construyó en base a la composición de la comunidad de plancton natural del lago Los Cántaros y nuestra comprensión de las relaciones tróficas dentro de este ambiente limitado por P (Souza *et al.*, 2010; Carrillo *et al.*, 2017; Villar-Argaiz *et al.*, 2017). Se identificaron cinco compartimentos de presas (i) y dos componentes de zooplancton (j) en nuestro sistema. Los compartimentos de presas fueron (i = 1): bacterias heterotróficas (BH) menores a 1 μm de longitud máxima; (i = 2): Picocianobacterias (Pcy) menores a 1,5 μm ; (i = 3): nanoflagelados (NF) de 2 a 10 μm (principalmente los MNF *C. parva* y *Pseudopedinella* sp.); (i =



4) microalgas (MA) de 8 a 35 μm (principalmente *Cyclotella* spp. y *G. paradoxum*), y ($i = 5$) colonias de Pcy (CPcy) de 10-12 células en promedio que alcanzaron 14-15 μm de diámetro. Los dos compartimentos de zooplancton fueron el copépodo *B. gibbosa* ($j = 1$) y el cladócero *D. chilense* ($j = 2$). En la Tabla 4.1 se encuentran todas las variables y parámetros con sus respectivas unidades.

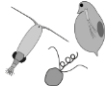


Tabla 4.1: Variables dinámicas, tasas biológicas y parámetros del modelo con sus unidades y distribuciones de probabilidad previas. Los valores fuera de los paréntesis corresponden a la media, mientras que los intervalos de credibilidad del 95% se encuentran dentro de los paréntesis. X1 = bacterias heterotróficas; X2 = picocianobacterias unicelulares; X3 = nanoflagelados; X4 = microalgas; X5 = colonias de picocianobacterias. P = fósforo; CO = copéodos (*Boeckella gibbosa*). CL = cladóceros (*Diaphanosoma chilense*).

Símbolo	Definición	Unidades	Valor de las previas	Referencias
VARIABLES:				
P	Concentración de P disuelto	$\mu\text{mol L}^{-1}$	-	-
X_i	Abundancia de las presas	$\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$	-	-
Q_i	Contenido de P de las presas	$\mu\text{mol mm}^{-3}$	-	-
Z_j	Abundancia del zooplancton	ind	-	-
TASAS DE LAS PRESAS:				
μ_i	Tasa de crecimiento	día^{-1}	-	-
V_i	Tasa captación de P	$\mu\text{mol mm}^{-3} \text{día}^{-1}$	-	-
B_i	Tasa de bacterivoría de X3	$\text{mm}^3 \text{día}^{-1}$	-	-
TASAS DEL ZOOPLANCTON:				
$G_{i,j}$	Tasa de pastoreo	$\text{mm}^3 \text{día}^{-1} \text{ind}^{-1}$	-	-
R_j	Tasa de reciclado de P	$\mu\text{mol día}^{-1} \text{ind}^{-1}$	-	-
CONDICIONES INICIALES:				



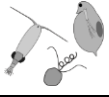
$X1_0$			X1: 0.292 (0.204-0.380)	
$X2_0$			X2: 0.114 (0.086-0.142)	
$X3_0$	Biomasa inicial de las presas	$\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$	X3: 0.028 (0.019-0.037)	Nuestros experimentos de incubación a campo
$X4_0$			X4: 0.009 (0.001-0.018)	
$X5_0$			X5: 0.002 (0.001-0.003)	
P_0	Concentración inicial de P disuelto	$\mu\text{mol L}^{-1}$	0.118 (0.056-0.180)	
Parámetros de las presas:				
μ_{max_i}	Tasa máxima de crecimiento de las presas	día^{-1}	X1: 1.152 (0.873-1.427) X2: 0.923 (0.643-1.197) X3: 0.245 (0.049-0.441) X4: 0.136 (0.038-0.233) X5: 0.039 (0.003-0.059)	(Edwards <i>et al.</i> , 2012)
Q_{min_i}	Contenido mínimo de P de las presas	$\mu\text{mol mm}^{-3}$	X1: 0.015 (0.006-0.035) X2: 0.019 (0.010-0.039) X3: 0.112 (0.050-0.174) X4: 0.696 (0.608-0.783) X5: 0.855 (0.767-0.943)	



f_{\max_i}	Tasa de captación máxima de P de las presas	$\mu\text{mol mm}^{-3} \text{ día}^{-1}$	X1: 0.023 (0.003-0.042)	(Edwards <i>et al.</i> , 2012)
			X2: 0.037 (0.017-0.057)	
			X3: 0.080 (0.052-0.108)	
			X4: 1.095 (0.818-1.371)	
			X5: 0.043 (0.015-0.071)	
k_i	Constante de saturación media para la captación de P de las presas	$\mu\text{mol L}^{-1}$	X1: 0.122 (0.032-0.208)	(Edwards <i>et al.</i> , 2012)
			X2: 0.134 (0.044-0.222)	
			X3: 0.551 (0.355-0.747)	
			X4: 0.653 (0.457-0.849)	
			X5: 0.855 (0.659-1.051)	
m_i	Tasa de mortalidad de las presas	día^{-1}	Para todas las presas: 0.10	(Branco <i>et al.</i> , 2020)
Parámetros de la bacterivoría:				
b_{\max_n}	Máxima captación de P de bacterivoría de X3	$\mu\text{mol mm}^{-3} \text{ día}^{-1}$	0.50 (0.30-0.70)	-
k'_n	Constante media de saturación de P de bacterivoría de X3	$\mu\text{mol L}^{-1} \text{ día}^{-1}$	0.05 (0.001-0.215)	-
a'_i	Tasa de ataque (captación) de X3	día^{-1}	X1: 0.73 (0.45-1.00) X2: 0.73 (0.45-1.00)	Nuestros experimentos de bacterivoría a campo
h'_i	Tiempo de manipulación de X3	día mm^{-3}	X1: 0.06 (0.01-0.11) X2: 0.06 (0.01-0.11)	Base de datos FoRAGE (Uiterwaal <i>et al.</i> , 2018)



ag_{X3}	Proporción de X2 agregadas por bacterivoría de X3	-	0.50 (0.10-0.90)	-
ag_{CL}	Proporción de X2 agregadas por bacterivoría de CL	-	0.50 (0.10-0.90)	-
Parámetros del zooplancton:				
$a_{i,j}$	Tasa de ataque del zooplancton	día ⁻¹ ind ⁻¹	0.10 (0.01-1.01)	-
$h_{i,j}$	Tiempo de manipulación del zooplancton	ind. día mm ⁻³	CL to X1: 3.6×10^{-7}	Base de datos FoRAGE (Uiterwaal <i>et al.</i> , 2018)
			CL to X2: 3.6×10^{-7}	
			CL to X3: 1.2×10^{-5}	
			CL to X4: 1.1×10^{-4}	
			CO to X3: 4.5×10^{-6}	
CP_j	Relación C:P molar somática del zooplancton	-	CO: 237.6 (211.2-264.1)	Nuestras estimaciones de laboratorio
			CL: 74.3 (61.1-87.9)	
r_j	Factor de conversión entre la relación C:P y el reciclado de P	-	0.010 (0.001-0.180)	-



La dinámica del P disuelto total (en adelante, P) durante el tiempo experimental (t) se ajustó con una ecuación diferencial:

$$\frac{dP}{dt} = \sum_{i=1}^5 X_i(-V_i + Q_i * m_i) + \sum_{j=1}^2 R_j Z_j \quad (1)$$

donde X_i es la biomasa del i-ésimo compartimento de presas, V_i corresponde a la absorción de P por el i-ésimo compartimento de presas, Q_i es el contenido de P del i-ésimo compartimento, m_i es la tasa de mortalidad del i-ésimo compartimento, por lo que $Q_i * m_i$ corresponde a la liberación de P debido a la muerte de la presa sin depredación, R_j es la excreción total de j-ésimo zooplancton, y Z_j es la abundancia de j-ésimo zooplancton.

La captación de P por parte de las presas (V_i) se modeló como una función del P disuelto siguiendo la fórmula de Michaelis-Menten:

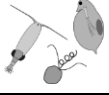
$$V_i = f_{\max_i} \left(\frac{P}{k_i + P} \right) + \sum_{n=1}^2 b_{\max_n} \left(\frac{B_n Q_n}{k'_n + B_n Q_n} \right) \quad (2)$$

donde f_{\max_i} es la tasa máxima de captación de nutrientes del i-ésimo compartimento de presas y k_i es la constante media de saturación. En particular, se agregó un segundo término de Michaelis-Menten $\sum_{n=1}^2 b_{\max_n} \left(\frac{B_n Q_n}{k'_n + B_n Q_n} \right)$ a la ecuación anterior para tener en cuenta la captación de P por parte de los NF a través de la bacterivoría (B_n). Por lo tanto, este término es igual a cero en los compartimentos osmotróficos estrictos (BH, Pcy, MA y CPcy).

La dinámica poblacional de las presas (X_i) se modeló usando el mismo enfoque que con el P. Se ajustó una ecuación diferencial para la dinámica de las presas durante el tiempo experimental:

$$\frac{dX_i}{dt} = X_i(u_i - m_i) - B_i X_3 - \sum_{j=1}^2 G_{i,j} Z_j \quad (3)$$

donde X_i aumenta según su tasa de crecimiento (u_i) y disminuye según su tasa de mortalidad (m_i) y su pastoreo por parte del zooplancton j ($G_{i,j}$). En el caso de la dinámica de BH (X_1) y Pcy (X_2), se adicionó un término de disminución de su biomasa debido a la bacterivoría (B_i) por parte de los NF (X_3).



La tasa de crecimiento de las presas (u_i) se modeló en función de su contenido de P celular utilizando la formulación de Droop (Droop, 1968):

$$u_i = \mu_{\max_i} \left(1 - \frac{Q_{\min_i}}{Q_i} \right) \quad (4)$$

donde el parámetro μ_{\max_i} es la tasa de crecimiento máxima de la i -ésima presa y el parámetro Q_{\min_i} es el contenido mínimo de P (Q_i) de la i -ésima presa.

El contenido de P de la presa (Q_i) aumenta debido a la captación de P y disminuye debido a la dilución por crecimiento celular según la formulación de Droop (Droop, 1973):

$$\frac{dQ_i}{dt} = V_i - u_i * Q_i \quad (5)$$

El pastoreo del zooplankton ($G_{i,j}$) en cada uno de los cinco compartimentos de presa, así como la bacterivoría por parte de los NF (B_i) sobre BH y Pcy, se modelaron utilizando la ecuación de respuesta funcional de Holling tipo II (Holling, 1959):

$$G_{i,j} = \frac{a_{i,j}X_i}{1 + a_{i,j}h_{i,j}X_i} \quad (6)$$

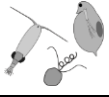
$$B_i = \frac{a'_iX_i}{1 + a'_ih'_iX_i} \quad (7)$$

donde los parámetros $a_{i,j}$ corresponden a la tasa de ataque y $h_{i,j}$ es el tiempo de manipulación de la j -ésima especie de zooplankton. Por otra parte, los parámetros a'_i y h'_i corresponden a la tasa de ataque y tiempo de manipulación de los NF (X_3).

En particular para las Pcy (X_2) y CPcy (X_5), se consideraron dos términos adicionales de agregación de células solitarias en respuesta a la depredación por parte de NF y cladóceros (Callieri, 2010). Estos términos fueron negativos para Pcy y positivos para CPcy según una disminución y un aumento de la biomasa, respectivamente:

$$\frac{dX_2}{dt} = X_2(u_2 - m_2) - B_2X_3 - B_2X_3ag_{NF} - G_{2,2}Z_2ag_{Cl} - G_{2,2}Z_2 \quad (8)$$

$$\frac{dX_5}{dt} = X_5(u_5 - m_5) + B_2X_3ag_{NF} + G_{2,2}Z_2ag_{Cl} - G_{5,1}Z_1 \quad (9)$$



donde los parámetros ag_{NF} y ag_{Cl} son coeficientes para la proporción de Pcy agregadas bajo presión de pastoreo por NF (B_2X_3) y el cladóceros *D. chilense* ($G_{2,2}Z_2$) respectivamente.

Finalmente, el reciclado de P por parte del zooplancton (R_j) se modeló en función de su relación C:P somática (CP_j), sus tasas de pastoreo ($G_{i,j}$) y el contenido de P de sus presas (Q_i):

$$R_j = r_j CP_j \sum_{i=1}^5 G_{i,j} Q_i \quad (10)$$

donde $\sum_{i=1}^5 G_{i,j} Q_i$ representa la adquisición de P por parte del zooplancton j y el parámetro r_j es un factor de conversión para la relación C:P somática del zooplancton j. Por lo tanto, $r_j CP_j$ representa la proporción de P que no se extrae de la presa ingerida y por lo tanto es reciclada por el zooplancton j (Elser *et al.*, 1996; Grover, 2004; Branco *et al.*, 2020).

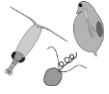
Calibración del modelo

Todas las ecuaciones de nuestro modelo se ajustaron con los resultados de nuestros experimentos de campo utilizando cadenas Markovianas Monte Carlo (MCMC). La técnica MCMC utiliza simulaciones consecutivas del modelo con una actualización constante de sus parámetros para producir una muestra de valores probables de los mismos (Haario *et al.*, 2006). Con este enfoque, todas las cantidades desconocidas pueden describirse a través de sus distribuciones de probabilidad, ya sean parámetros del modelo, estados desconocidos del sistema en cuestión o predicciones del modelo (Haario *et al.*, 2006; Malve *et al.*, 2007). Para ajustar nuestro modelo a los datos experimentales, se empleó una transformación de nuestras ecuaciones diferenciales (Ecuación 1, 3 y 5) a valores discretos siguiendo la formulación

$$A_{t+dt} = A_t dt \frac{dA}{dt} \quad (11)$$

Donde A_t corresponde a cada uno de nuestros compartimentos dinámicos (P, X_i , Q_i) en el paso de tiempo t y se actualiza al siguiente paso de tiempo t + dt multiplicando el estado actual por su derivada.

Se aplicaron distribuciones previas (en adelante previas) para los valores iniciales de los parámetros dinámicos, asumiendo distribuciones de probabilidad media normales positivas (Tabla 4.1). Particularmente, se eligieron previas altamente informativas para los parámetros de las presas



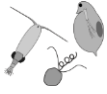
(tasas de mortalidad y crecimiento, afinidad de P y tasas de bacterivoría). Las tasas de mortalidad para todos los compartimentos de presas se fijaron en 0.1 día^{-1} según (Branco *et al.*, 2020). Las previas para μ_{\max_i} , f_{\max_i} , k_i y Q_{\min_i} se obtuvieron a partir de relaciones alométricas estimadas para el bucle microbiano y fitoplancton (Tambi *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2012). Las previas para los parámetros de bacterivoría (b_{\max} , a' y h') se calcularon a partir de los resultados de los experimentos de bacterivoría realizados en el Lago Los Cántaros presentados en los capítulos previos de esta Tesis. Del mismo modo, las previas para las relaciones C:P somáticas del zooplancton (CP) se obtuvieron a partir de nuestras propias mediciones de C y P de *B. gibbosa* y *D. chilense*. Por el contrario, se eligieron valores previos no informativos para las tasas de ataque de zooplancton ($a_{i,j}$) y el factor de conversión para el reciclado de P ($r_{i,j}$) mediante distribuciones normales de media $\mu = 0$ y varianza $\tau = 1$, por lo tanto, los valores posteriores para estos parámetros se estimaron solo a partir de nuestros datos experimentales sin suposiciones previas. Se verificó la convergencia de parámetros utilizando cinco cadenas MCMC con 2×10^5 iteraciones cada una y una fase de quemado de 1×10^5 iteraciones.

Análisis estadísticos sobre los valores de entrada y salida del modelo

A partir de los resultados de nuestro experimento de campo, se realizó un ANOVA de dos vías para comparar la biomasa de los compartimentos de presa y las concentraciones de P disuelto y particulado entre los tratamientos (factor con 6 niveles: R Control, R Diaphanosoma, R Boeckella, R+G Control, R+G Diaphanosoma y R+G Boeckella) y tiempo de incubación (factor con dos niveles: 24 y 48 h). Cuando el *p-valor* del ANOVA fue significativo, se realizó test *a posteriori* de Dunnett para determinar las diferencias entre los tratamientos de zooplancton y los tratamientos de control. Finalmente, para evaluar el efecto del zooplancton en las cantidades estimadas por nuestro modelo (es decir, contenidos de P de las presas y tasas de reciclado de P del zooplancton), se estimó la diferencia entre las distribuciones posteriores de los tratamientos de zooplancton y los tratamientos de control y se calculó la proporción de valores posteriores con el mismo signo que la media utilizando el software JAGS (Plummer, 2003).

Validación del modelo

A partir de los parámetros posteriores de nuestro modelo, se simuló las tasas de reciclado de P de copépodos y cladóceros, así como el contenido de P de las presas a tiempo de



incubación $t = 72$ h. Las tasas simuladas de reciclado de P por parte del zooplancton se contrastaron con los resultados obtenidos en los experimentos de excreción en el laboratorio. El análisis y las predicciones bayesianas se realizaron utilizando el software JAGS (Plummer, 2003) a través de la interface R Studio.

Resultados

Experimentos de incubación a campo

Encontramos diferencias significativas en la biomasa ($\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$) de los diferentes compartimentos de presas entre los tratamientos (ANOVA de dos vías, $p < 0.05$ para todos los compartimentos excepto CPcy, Tabla 4.2) y el tiempo de incubación (ANOVA de dos vías, $p < 0.01$ para todos los compartimentos, Tabla 4.2), aunque la interacción entre estos términos no fue significativa. Dado que no se encontraron diferencias entre los tratamientos “R Control” y “R+G Control” a las 24 y 48 horas de incubación, se agruparon como “Control” para facilitar la comparación *a posteriori* con los tratamientos con zooplancton. Las diferencias entre los tratamientos con zooplancton y el control se observaron a las 48 h de incubación (panel inferior de la Figura 4.4). En los tratamientos de pastoreo (R+G), la biomasa de NF y MA fue menor en presencia del copépodo *B. gibbosa* (prueba de Dunnett *a posteriori* $p = 0.004$ y $p = 0.023$, respectivamente). Por otra parte, la presencia del cladóceros *D. chilense* redujo la biomasa de BH y Pcy (prueba de Dunnett *a posteriori* $p = 0.009$ y $p = 0.013$, respectivamente), aumentó la biomasa de CPcy (prueba de Dunnett *a posteriori* $p = 0.023$) y redujo marginalmente la biomasa de NF (prueba de Dunnett *a posteriori* $p = 0.088$). Con respecto a los tratamientos de reciclado de nutrientes (R), el único efecto significativo con la presencia indirecta de *B. gibbosa* fue para CPcy (prueba de Dunnett *a posteriori* $p = 0.021$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre la abundancia de presas con la presencia indirecta del cladóceros *D. chilense* y el control. Se observaron patrones similares a las 24 h de incubación, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos de zooplancton y el control (panel superior de la Figura 4.4).

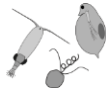


Tabla 4.2: Resultados del ANOVA de dos vías realizado en las variables del experimento de incubación de campo. SC = valor residual de la suma de cuadrados; GL = grados de libertad; Significancia = * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001).

Variable respuesta	Efectos fijos	SC	GL	F	p-valor	Significancia
Biomasa de bacterias heterótroficas	Zooplancton	2.450	5	19.69	6.8x10 ⁻⁹	***
	Tiempo	0.462	1	14.85	2.5x10 ⁻⁴	***
	Zooplancton:Tiempo	0.253	5	2.03	0.099	NS
Biomasa de picocianobacterias	Zooplancton	0.068	5	2.87	0.022	*
	Tiempo	0.146	1	24.51	4.9x10 ⁻⁶	***
	Zooplancton:Tiempo	0.052	5	2.19	0.079	NS
Biomasa de nanoflagelados	Zooplancton	0.007	5	10.09	1.7x10 ⁻⁶	***
	Tiempo	0.002	1	9.31	0.003	**
	Zooplancton:Tiempo	8.7x10 ⁻⁴	5	1.24	0.334	NS
Biomasa de microalgas	Zooplancton	0.001	5	15.91	2.6x10 ⁻⁹	***
	Tiempo	3.3x10 ⁻⁴	1	15.66	1.8x10 ⁻⁴	***
	Zooplancton:Tiempo	0.001	5	1.94	0.116	NS
Biomasa de las colonias de picocianobacterias	Zooplancton	0.008	5	1.80	0.147	NS
	Tiempo	0.052	1	47.83	1.8x10 ⁻⁹	***
	Zooplancton:Tiempo	0.010	5	2.38	0.059	NS
Tamaño de las colonias de picocianobacterias	Zooplancton	770.2	5	17.50	5.3x10 ⁻⁹	***
	Tiempo	110.4	1	10.74	0.002	**
	Zooplancton:Tiempo	134.8	5	3.28	0.016	*
Concentración de fósforo disuelto	Zooplancton	0.002	5	15.02	6.6x10 ⁻⁹	***
	Tiempo	3.9x10 ⁻⁴	1	1.27	0.265	NS
	Zooplancton:Tiempo	0.004	5	2.79	0.032	*
Concentración de fósforo particulado	Zooplancton	0.041	5	11.45	3.3x10 ⁻⁷	***
	Tiempo	1.7x10 ⁻⁴	1	0.19	0.677	NS
	Zooplancton:Tiempo	0.003	5	0.99	0.421	NS

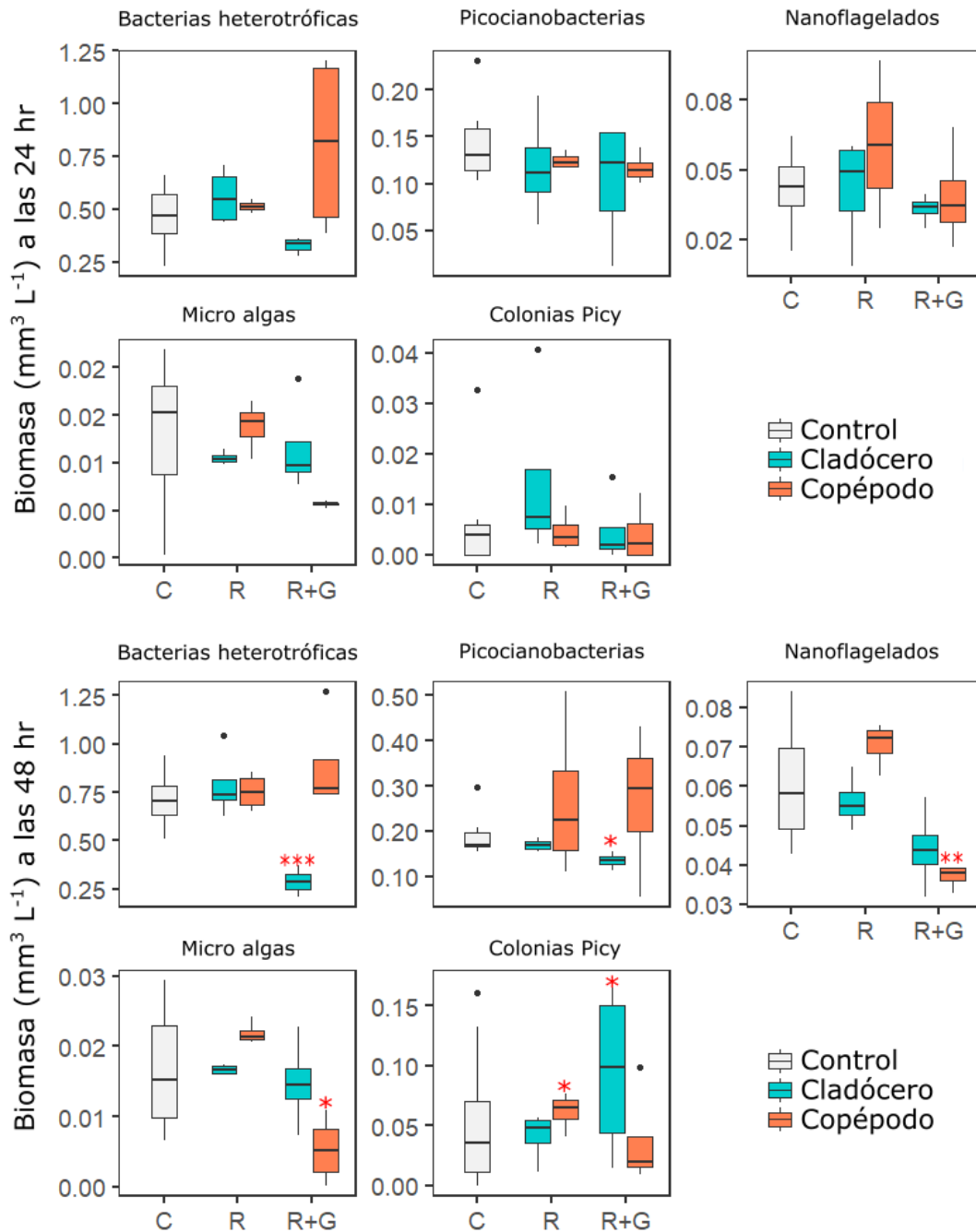
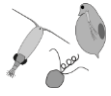
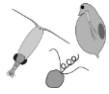


Figura 4.4: Biomasa de las presas a las 24 y 48 h de incubación bajo la presencia directa e indirecta del cladócero *Diaphanosoma chilense* y el copépodo *Boeckella gibbosa*. C = control sin zooplankton (R y R+G combinados); R = tratamientos de reciclado con zooplankton y presas separadas por bolsas de diálisis; R+G = tratamientos de pastoreo con contacto directo entre zooplankton y presas. Los puntos negros corresponden a observaciones atípicas y los asteriscos rojos representan diferencias significativas entre los tratamientos con zooplankton y el control (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001).



Durante los experimentos, el tamaño de las colonias de CPcy (células colonia⁻¹) aumentó después de 48 horas de incubación debido a la presión de pastoreo de *D. chilense* (Figura 4.5). El tamaño de las colonias fue diferente entre los tratamientos (ANOVA de dos vías, $p < 0.001$, Tabla 4.2) y el tiempo de incubación (ANOVA de dos vías, $p = 0.002$, Tabla 4.2), y la interacción entre estos dos términos fue significativa (ANOVA de dos vías, $p = 0.016$, Tabla 4.2). En comparación con el control sin zooplancton, el número de células por colonia fue mayor en el tratamiento R+G con presencia directa de *D. chilense* (Dunnett *a posteriori*, $p = 0.008$). Además, observamos una disminución marginal en el número de células por colonia en el tratamiento R+G con presencia directa de *B. gibbosa* (Dunnett *a posteriori*, $p = 0.077$).

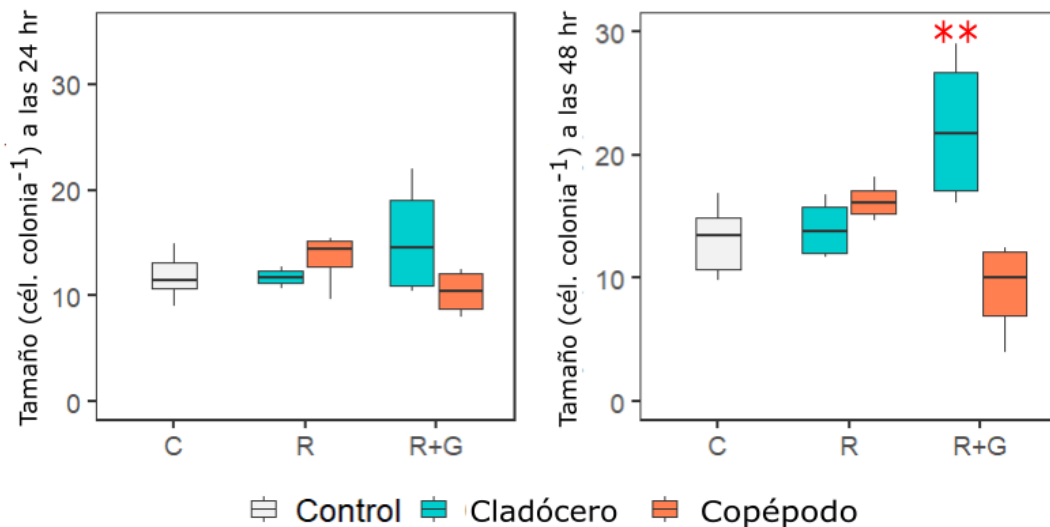
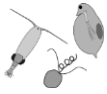


Figura 4.5: Tamaño de las colonias de picocianobacterias (CPcy) bajo la presencia directa e indirecta del cladóceros *Diaphanosoma chilense* y el copépodo *Boeckella gibbosa*. C = control sin zooplancton (R y R+G combinados); R = tratamientos de reciclado con zooplancton y presas separadas por bolsas de diálisis; R+G = tratamiento de pastoreo con contacto directo entre zooplancton y presa. Los asteriscos rojos representan diferencias significativas entre los tratamientos de zooplancton y el control (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$).

La concentración de P disuelto y particulado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) fue diferente entre los tratamientos (ANOVA de dos vías, $p < 0.001$, Tabla 4.2) y la interacción entre los tratamientos y el tiempo de incubación fue significativa solo para el P disuelto (ANOVA de dos vías, $p = 0.033$, Tabla 4.2). Dado que no se encontraron diferencias entre los tratamientos “R Control” y “R+G Control” a las 24 y 48 horas de incubación, se agruparon como "Control" para facilitar la comparación *a posteriori* con los tratamientos con zooplancton. El P disuelto a las 48 h de incubación fue mayor



en los tratamientos R+G que el control, especialmente con presencia directa de *D. chilense* (prueba de Dunnett *a posteriori* $p < 0.001$ para *D. chilense* y $p = 0.037$ para *B. gibbosa*, panel inferior de la Figura 4.6). Estos aumentos también fueron significativos a las 24 horas de incubación (prueba de Dunnett *a posteriori* $p = 0.022$ para *D. chilense* y $p = 0.034$ para *B. gibbosa* a las 48 horas, panel superior de la Figura 4.6). Por otro lado, el P particulado a las 48 h de incubación en el tratamiento R+G con presencia de *D. chilense* fue menor que el control (prueba de Dunnett *a posteriori* $p = 0.027$) y mayor que el control en el tratamiento R con presencia indirecta de *B. gibbosa* (prueba de Dunnett *a posteriori* $p = 0.049$). Finalmente, no se encontraron diferencias entre el tratamiento R con presencia indirecta de *D. chilense* y el control para P disuelto y particulado.

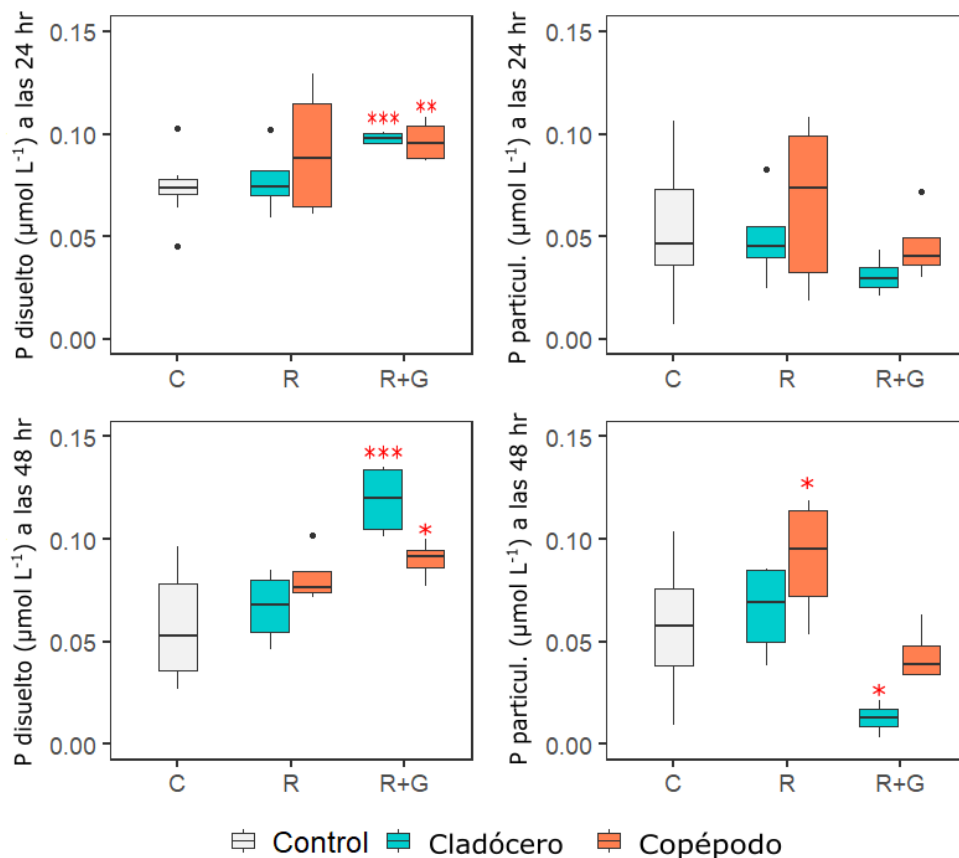
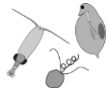


Figura 4.6: Concentración de fósforo disuelto y particulado a las 24 y 48 h de incubación bajo la presencia directa e indirecta del cladóceros *Diaphanosoma chilense* y el copépodo *Boeckella gibbosa*. C = control sin zooplancton (R y R+G combinados); R = tratamientos de reciclado con zooplancton y presas separadas por bolsas de diálisis; R+G = tratamiento de pastoreo con contacto directo entre zooplancton y presa. Los puntos negros corresponden a observaciones atípicas y los asteriscos rojos representan diferencias significativas entre los tratamientos de zooplancton y el control (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$).



El modelo

Las tasas de pastoreo estimadas por el modelo sobre los cinco compartimentos de presas fueron diferentes entre cladóceros y copépodos (Figura 4.7). La presión de pastoreo de *D. chilense* (en términos de % de la biomasa total reducida por individuo) fue mayor sobre las BH y Pcy que sobre los NF y MA (Figura 4.7, panel superior, Tabla 4.3). En consecuencia, el tamaño de la presa de *D. chilense* osciló entre 0.8 y 18 μm con una mayor contribución de células pequeñas de $\leq 2 \mu\text{m}$ (panel inferior de la Figura 4.7). Por el contrario, la presión de pastoreo de *B. gibbosa* fue considerablemente alta sobre los NF y MA (panel superior de la Figura 4.7, Tabla 4.3). El tamaño de la presa de *B. gibbosa* varió de 5 a 35 μm con una mayor contribución de células de tamaño mediano de 9 a 14 μm (panel inferior de la Figura 4.7). Particularmente, la tasa de pastoreo sobre los NF fue mayor en copépodos que en cladóceros, y se detectó una mínima tasa de pastoreo de *B. gibbosa* sobre las CPcy (Figura 4.7 panel superior, Tabla 4.3).

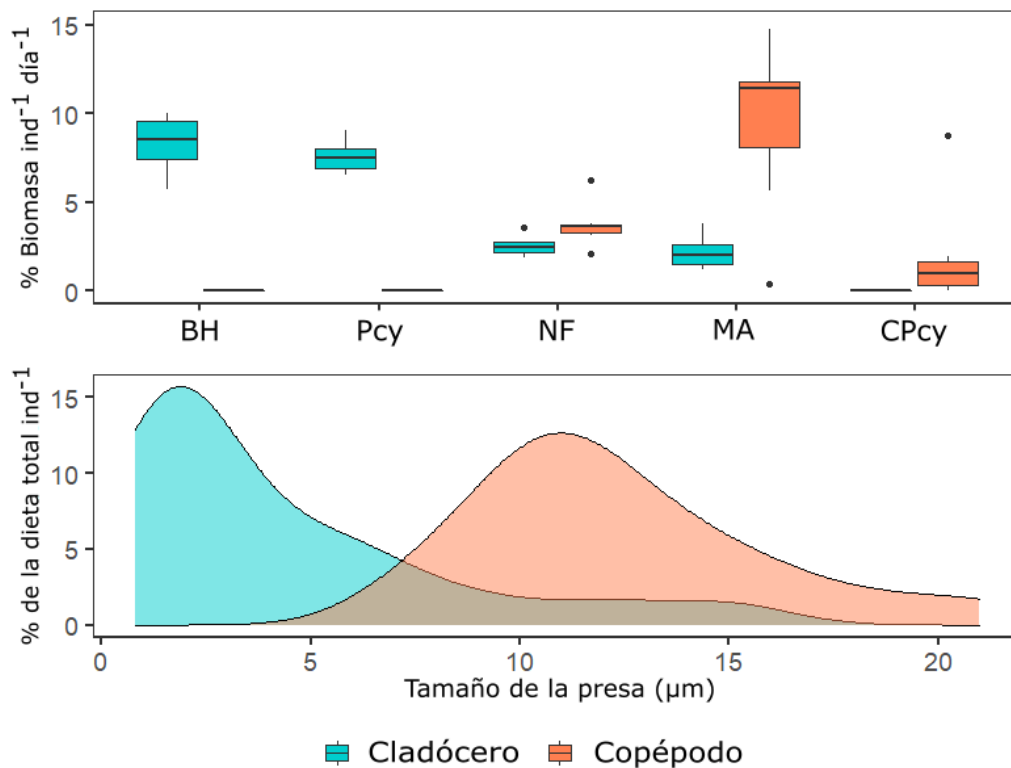


Figura 4.7: Tasas de pastoreo del cladóceros *D. chilense* (azul) y el copépodo *B. gibbosa* (rojo) estimadas por el modelo en los diferentes compartimentos de presas. El panel superior muestra el pastoreo de zooplancton per cápita como % consumido de la biomasa total de la presa y el panel inferior muestra el rango de tamaño (diámetro) de las presas consumidas. Los puntos negros corresponden a observaciones atípicas.

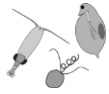
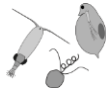


Tabla 4.3: Distribuciones de probabilidad posterior de los parámetros clave estimados por nuestros datos experimentales utilizando previas no informativas. Los valores por fuera de los paréntesis corresponden a la media, mientras que los que están adentro corresponden al intervalo de credibilidad del 95%. BH = bacterias heterotróficas; Pcy = picocianobacterias solitarias; NF = nanoflagelados; MA = microalgas; CPcy = colonias de picocianobacterias.

Parámetro	Predador	Presa	Valor de las posteriores
Tasa de ataque del zooplancton (a)	<i>Boeckella gibbosa</i>	NF	0.052 (0.004-0.137)
		MA	0.179 (0.041-0.485)
		CPcy	0.018 (0.001-0.050)
	<i>Diaphanosoma chilense</i>	BH	0.075 (0.007-0.164)
		Pcy	0.052 (0.005-0.148)
		NF	0.050 (0.003-0.133)
Tasa de agregación de las Pcy (ag)	Nanoflagelados	MA	0.048 (0.002-0.162)
		Pcy	0.270 (0.008-0.854)
	<i>Diaphanosoma chilense</i>	Pcy	0.173 (0.004-0.775)
Tasa de ataque de los nanoflagelados (a')	Nanoflagelados	BH	1.500 (0.868-2.122)
		Pcy	1.460 (0.809-2.087)
Tiempo de manipulación de los nanoflagelados (h')	Nanoflagelados	BH	0.061 (0.008-1.121)
		Pcy	0.062 (0.009-1.122)
Factor de conversión de la tasa de reciclado del zooplancton (r)	<i>Boeckella gibbosa</i>	-	0.007 (0.001-0.019)
	<i>Diaphanosoma chilense</i>	-	0.011 (0.003-0.015)
Relación C:P somática del zooplancton (CP)	<i>Boeckella gibbosa</i>	-	236.9 (228.3-245.5)
	<i>Diaphanosoma chilense</i>	-	74.0 (67.8-80.2)



La bacterivoría de los NF sobre las BH y Pcy estimada por el modelo fue de 0.966 ± 0.016 y $0.199 \pm 0.003 \text{ mm}^3 \text{ presa mm}^{-3} \text{ flagelado día}^{-1}$, respectivamente, lo que equivale a 265.3 ± 5.2 y $24.8 \pm 0.4 \text{ células presa flagelado}^{-1} \text{ día}^{-1}$, respectivamente. Tanto la bacterivoría como la osmotrofia se consideraron para modelar la captación de P por parte de los NF (Ecuación 2), y encontramos que la bacterivoría fue mayor que la osmotrofia (0.13 ± 0.05 y $0.02 \pm 0.01 \mu\text{mol P mm}^{-3} \text{ día}^{-1}$, respectivamente).

En la dinámica de CPcy del modelo (Ecuación 9), consideramos que las colonias pueden aumentar mediante la reproducción de células dentro de las colonias y a través de la agregación de células individuales inducida por depredación. Así, en la ecuación tenemos tres términos de aumento, uno por reproducción y dos como respuesta a la depredación (uno para NF y otro para *D. chilense*). Encontramos que ambos términos para la agregación (NF = 0.0027 ± 0.0015 y *D. chilense* = $0.0096 \pm 0.0032 \text{ mm}^3 \text{ día}^{-1}$) fueron más altos que la reproducción de células dentro de las colonias ($0.0019 \pm 0.0029 \text{ mm}^3 \text{ día}^{-1}$).

El contenido de P de las presas (Q, nmol mm^{-3}) estimado por nuestro modelo mostró diferencias entre los tratamientos de zooplancton y el control a las 48 h (panel superior de la Figura 4.8). El Q estimado para todos los compartimentos de presas osmotróficas estrictas (BH, Pcy, MA y CPcy) fue mayor en los tratamientos R+G de ambos taxones de zooplancton (99.9% de su probabilidad posterior mayor que los tratamientos de control, Tabla 4.4). Por otro lado, el Q estimado para los NF fue mayor en presencia directa de *B. gibbosa* (91.3% de su probabilidad posterior mayor que los tratamientos de control, Tabla 4.4), pero menor en presencia directa de *D. chilense* (78.9% de su probabilidad posterior menor que los tratamientos de control, Tabla 4.4). Además, realizamos predicciones del modelo para el contenido de P a las 72 horas de incubación a partir de la biomasa final de la presa y las condiciones de P disuelto de nuestros experimentos de campo a las 48 horas. Encontramos patrones similares a los observados a las 48 h, pero más pronunciados. Particularmente, el tratamiento R de *B. gibbosa* mostró menor variación y mayores diferencias con el control en el caso de las MA (81.3% de su probabilidad posterior mayor que los tratamientos de control, Tabla 4.4) y las CPcy (82.4% de su probabilidad posterior mayor que los tratamientos de control, Tabla 4.4). Finalmente, se encontraron mayores diferencias en los contenidos de P predichos a las 72 h entre copépodos y cladóceros en los tratamientos R+G (Figura 4.8 panel inferior).

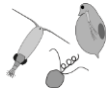


Tabla 4.4: Distribuciones de probabilidad posteriores del contenido de P de las presas estimado por nuestro modelo comparando los tratamientos experimentales de control sin zooplancton (contraste A) y los tratamientos con zooplancton (contraste B). Los valores por fuera de los paréntesis corresponden a la media mientras que los que están dentro corresponden a los intervalos de credibilidad del 95%. La columna de superposición (*S*) indica la proporción de la distribución posterior que posee el mismo signo que la media. BH = bacterias heterotróficas; Pcy = picocianobacterias solitarias; NF = nanoflagelados; MA = microalgas; CPcy = colonias de picocianobacterias.

Variable	Contraste A	Contraste B	Valor de las posteriores	<i>S</i>
Contenido de P de BH, Pcy, MA y CPcy a las 48 hr	Control R	Boeckella R+G	-0.0011(-0.0025/-0.0003)	<0.01 para todos los casos
	Control R+G	Boeckella R+G	-0.0016(-0.0028/-0.0004)	
	Control R	Diaphanosoma R+G	-0.0047(-0.0073/-0.0033)	
	Control R+G	Diaphanosoma R+G	-0.0053(-0.0075/-0.0040)	
Contenido de P de los NF a las 48 hr	Control R	Boeckella R+G	-0.0052(-0.0533/-0.0002)	89.6
	Control R+G	Boeckella R+G	-0.0060(-0.0528/-0.0002)	93.2
	Control R	Diaphanosoma R+G	0.0102(-0.0043/0.0433)	82.3
	Control R+G	Diaphanosoma R+G	0.0078(-0.0085/0.0340)	75.5
Contenido de P de las MA a las 72 hr	Control R	Boeckella R	-0.0025(-0.0045/0.0003)	84.5
	Control R+G	Boeckella R	-0.0017(-0.0078/0.0004)	78.1
Contenido de P de las CPcy a las 72 hr	Control R	Boeckella R	-0.0015(-0.0056/-0.0001)	79.6
	Control R+G	Boeckella R	-0.0018(-0.0061/-0.0002)	85.1

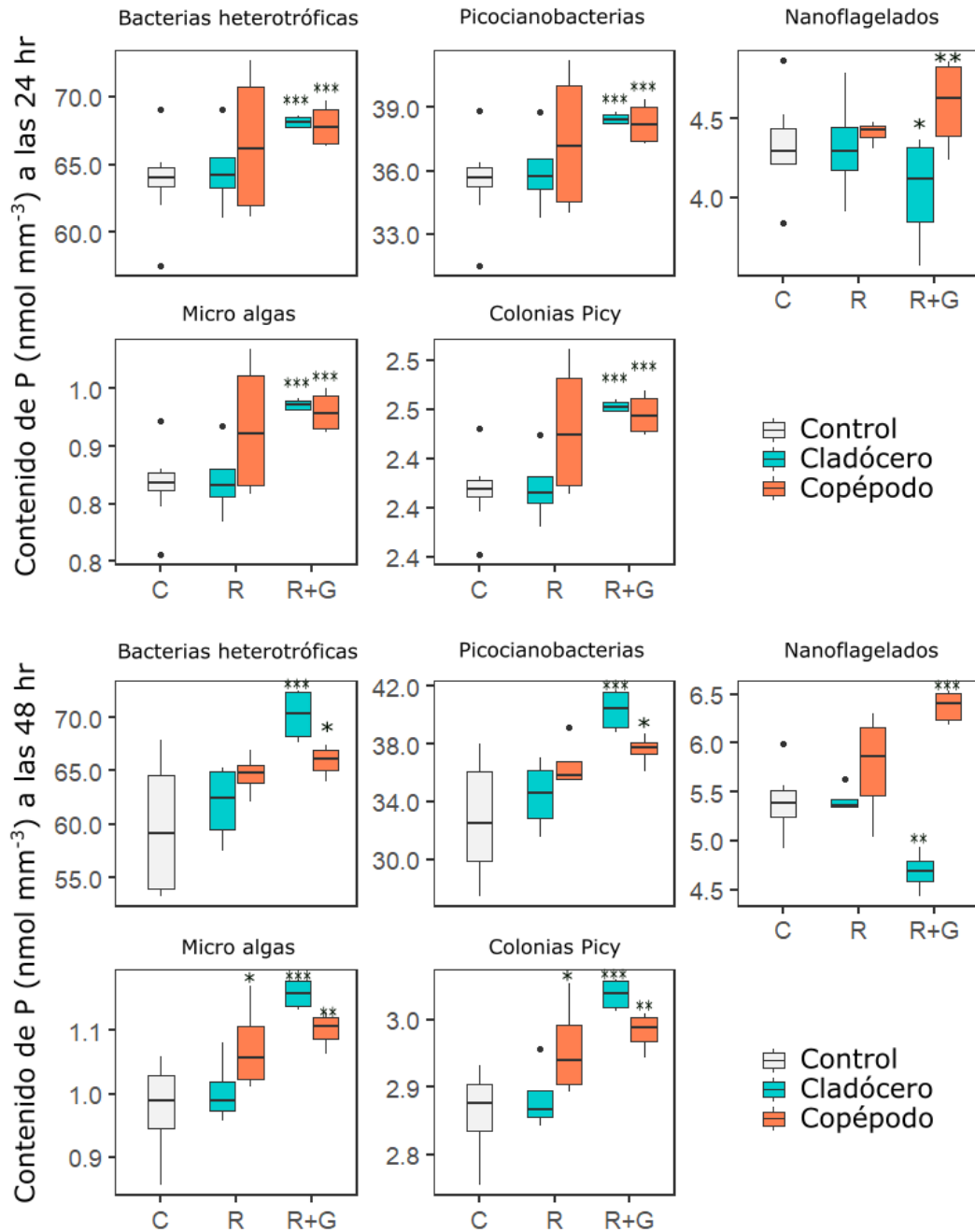
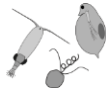
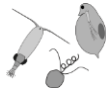


Figura 4.8: Contenido de P de las presas estimado por el modelo luego de 48 y 72 h de incubación bajo la presencia directa e indirecta del cladócero *Diaphanosoma chilense* y el copépodo *Boeckella gibbosa*. C = control sin zooplancton (R y R+G combinados); R = tratamientos de reciclado con zooplancton y presas separadas por bolsas de diálisis; R+G = tratamiento de pastoreo con contacto directo entre zooplancton y presas. Los puntos negros corresponden a valores atípicos y los asteriscos negros representan diferencias entre las distribuciones de probabilidad posteriores de los tratamientos de zooplancton y el control donde más del 75% tiene el mismo signo que la diferencia posterior media (* > 99 %, ** > 90 %, *** > 75%).



Las tasas de adquisición de P del zooplancton por pastoreo estimadas por el modelo ($\sum_{i=1}^5 G_{i,j} Q_i$ de la Ecuación 10) fueron diferentes entre copépodos y cladóceros. La tasa de adquisición de P fue mayor para *D. chilense* que para *B. gibbosa* (2.21 ± 0.16 y 1.29 ± 0.11 nmol P día⁻¹, respectivamente). Para el copépodo *B. gibbosa*, las tasas de adquisición de P por pastoreo sobre CPcy, MA y NF fueron 0.03 ± 0.01 , 0.82 ± 0.09 y 0.47 ± 0.06 nmol P día⁻¹, respectivamente, lo que representa el 2%, 62% y 36% de su adquisición de P. Para el cladóceros *D. chilense*, las tasas de adquisición de P por pastoreo sobre BH, Pcy, NF y MA fueron 1.28 ± 0.12 , 0.36 ± 0.04 , 0.30 ± 0.07 y 0.27 ± 0.03 nmol P día⁻¹, respectivamente, representando el 58% 16% 14% y 12% de su adquisición de P.

Experimentos de laboratorio y predicción de las tasas de excreción

Los contenidos de C y P somáticos de los copépodos y cladóceros se obtuvieron a partir de nuestros experimentos de laboratorio, y las relaciones molares C:P fueron 237.25 ± 26.50 para *B. gibbosa* y 73.85 ± 13.77 para *D. chilense*. Estos valores fueron suministrados a nuestro modelo como información previa para el parámetro 'CP' para estimar la proporción de P liberada por el zooplancton junto con el factor de conversión 'r' ($r_j CP_j$ de la Ecuación 10). Los valores posteriores para el parámetro 'r' fueron muy similares entre copépodos y cladóceros (> 99.9% de superposición entre sus probabilidades posteriores, Tabla 4.3).

El valor predictivo de nuestro modelo se probó comparando las tasas de excreción de P estimadas por el modelo con los resultados de los experimentos de laboratorio de excreción independientes. Las tasas de excreción de P obtenidas experimentalmente indicaron que los copépodos liberan más P (1.71 veces) que los cladóceros (Figura 4.9 cajas blancas). Notablemente, las tasas de excreción de P estimadas por nuestro modelo (Ecuación 10) mostraron el mismo patrón: los copépodos excretaron 1.65 veces más P que los cladóceros (Figura 4.9 cajas grises).

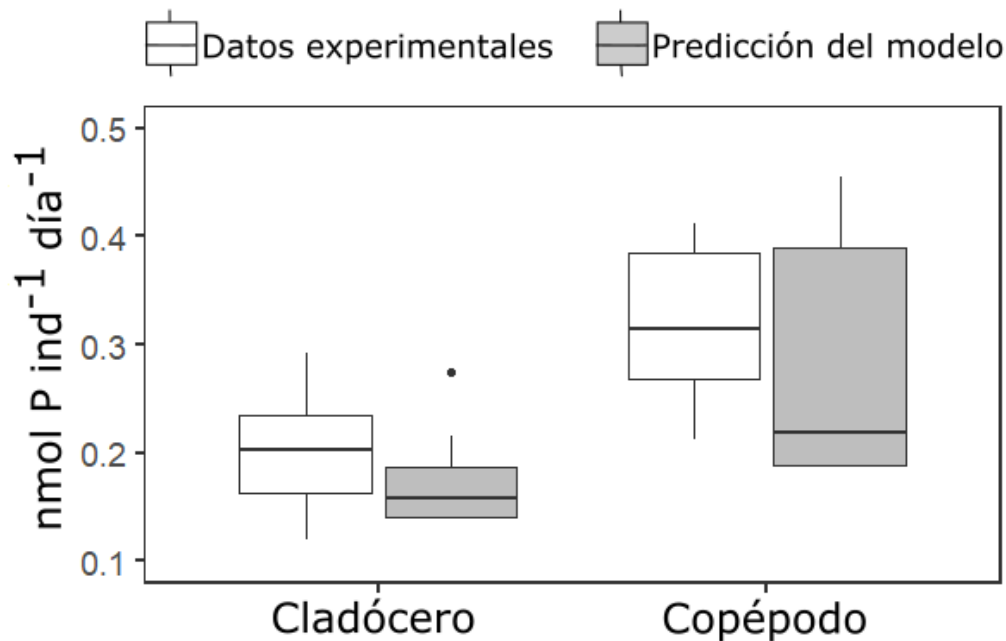
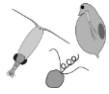


Figura 4.9: Tasas de reciclado de fósforo del cladocero *D. chilense* y el copépodo *B. gibbosa* obtenidas en los experimentos de excreción (cajas blancas) y estimadas por el modelo (cajas grises).

Síntesis conceptual

Nuestros resultados experimentales y el modelo mecanicista desarrollado señalaron que las contrastantes estrategias de alimentación y reciclado de P observadas para *B. gibbosa* y *D. chilense* dan forma diferencial a la abundancia y calidad nutricional de los niveles planctónicos inferiores (Figura 4.10). La biomasa de las presas bajo la presencia indirecta de *B. gibbosa* (Figura 4.10 A) aumentó significativamente para las CPcy, mientras que el contenido de P aumentó significativamente para las CPcy y MA. En cambio, la presencia indirecta de *D. chilense* (Figura 4.10 C) no indujo cambios en la biomasa de las presas ni en el contenido de P. Por otra parte, la presencia directa de *B. gibbosa* (Figura 4.10 B) aumentó el contenido de P de todos los compartimentos de las presas, especialmente para los NF, pero redujo la biomasa de los NF y las MA. Por último, la presencia directa de *D. chilense* (Figura 4.10 D) redujo drásticamente la biomasa de las BH y Pcy, aumentó la de las CPcy, redujo marginalmente la de los NF y no cambió la de las MA. Además, la presencia directa de *D. chilense* (Figura 4.10 D) aumentó considerablemente el contenido P de las BH, Pcy, CPcy y MA, pero redujo el de los NF.

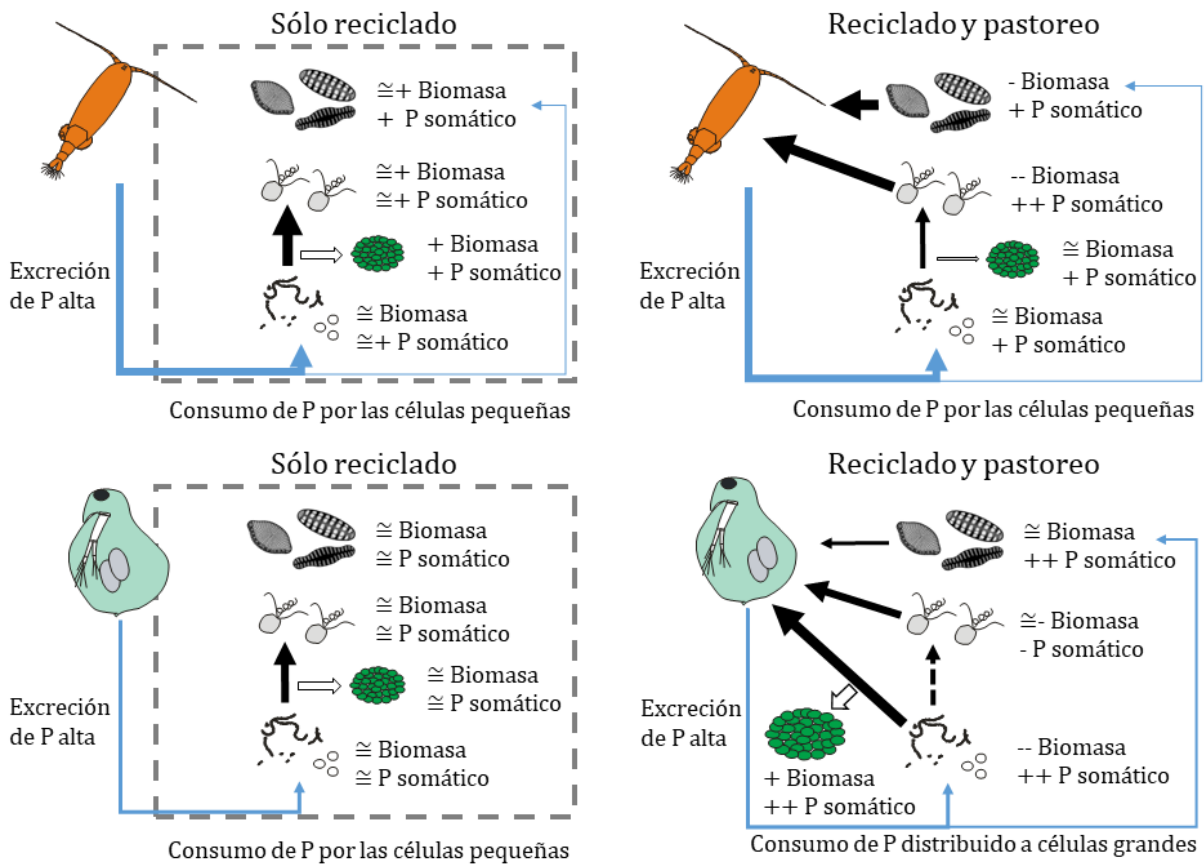
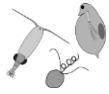
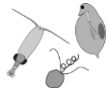


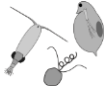
Figura 4.10: Síntesis conceptual de los efectos directos e indirectos del copépodo *B. gibbosa* y el cladócero *D. chilense* sobre los diferentes compartimentos microbianos y fitoplancton a través del pastoreo y reciclado de nutrientes. El tamaño de las flechas sugiere la fuerza de la interacción de acuerdo a nuestros resultados experimentales y las predicciones del modelo. Las flechas negras representan el pastoreo, las flechas blancas representan la agregación de Pcy en colonias. Los símbolos que acompañan a la biomasa y el P somático indican diferencias con el control sin zooplancton: \cong sin cambios apreciables; $\cong +$ tendencia creciente; $+$ aumento significativo; $++$ aumento alto; $\cong -$ tendencia decreciente; $-$ disminución significativa; $--$ disminución alta.



Discusión

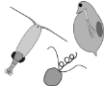
Las interacciones depredador-presa responden a múltiples efectos directos e indirectos, como el consumo de presas y el reciclado de nutrientes a través de la excreción (Schmitz *et al.*, 2010; Branco *et al.*, 2018). En este capítulo, construimos un modelo que generaliza el efecto sobre niveles tróficos inferiores por parte de dos especies de zooplancton con estrategias contrastantes en términos de pastoreo y reciclado de P. Nuestro enfoque estadístico Bayesiano nos permitió estimar estas variables en función de nuestros resultados experimentales, información previa sobre parámetros de utilización del P (Edwards *et al.*, 2012) y la tasa de crecimiento de los compartimentos microbianos y de fitoplancton (Tambi *et al.*, 2009). Además, pudimos estimar la dinámica de variables no observadas directamente, como el contenido de P de las presas, a partir de la dinámica observada en la biomasa de las presas y la concentración de P disuelto y particulado.

Nuestro modelo fue capaz de predecir exitosamente las tasas de adquisición y excreción de P por parte del zooplancton a partir de sus relaciones elementales C:P y los resultados de nuestros experimentos de campo. La tasa de excreción de P fue mayor para el copépodo *B. gibbosa* que para el cladócero *D. chilense*, como se esperaba de acuerdo a la teoría de estequiometría ecológica y la evidencia empírica (Sturner y Elser, 2002; Hébert *et al.*, 2017). Los resultados de nuestro modelo mostraron valores similares a los obtenidos de forma independiente en los experimentos de laboratorio, aunque no se le proporcionó información previa sobre las diferentes tasas de excreción del zooplancton. Por lo tanto, mostramos que interacciones indirectas depredador-presa que generalmente son difíciles de medir en el campo, como las tasas de excreción de nutrientes, pueden evaluarse modelando variables más fácilmente medibles, como la biomasa de la presa, la concentración de nutrientes y la relación C:P del zooplancton. Además, de acuerdo a nuestro modelo, el pastoreo sobre diferentes presas da como resultado una mayor adquisición de P para los cladóceros que para los copépodos, a pesar de que la liberación de P es mayor en estos últimos. Para el copépodo *B. gibbosa*, la adquisición de P se obtiene al consumir nanoflagelados y especies de fitoplancton más grandes, como diatomeas y dinoflagelados, que tienen concentraciones de P relativamente más bajas que las células pequeñas. Por el contrario, la adquisición de P por el cladócero *D. chilense* se debió a altas tasas de pastoreo sobre el picoplancton rico en P, en lugar de células más grandes.



Las estrategias de alimentación contrastantes de copépodos y cladóceros afectan en forma diferencial a la comunidad microbiana y las interacciones dentro de ella (Zöllner *et al.*, 2003; Vrede y Vrede, 2005). En concordancia con nuestras predicciones, encontramos experimentalmente que la presencia directa del copépodo *B. gibbosa* redujo la biomasa de los compartimentos de presas de mayor tamaño (NF y MA) mientras que el cladóceros *D. chilense* redujo la biomasa de los compartimentos de menor tamaño (BH y Pcy). El pastoreo de presas de diferentes tamaños permite la coexistencia de más de una especie de depredador planctónico (Sommer y Stibor, 2002) y actúa de manera diferencial sobre las presas. En este sentido, la producción de biomasa y energía por parte de los compartimentos del picoplancton está vinculada a los copépodos a través de protistas (Sommer y Sommer, 2006). Este fue el caso de *B. gibbosa*, que mostró en nuestros experimentos altas tasas de pastoreo sobre NF bacterívoros. Por el contrario, el cladóceros *D. chilense* se alimentó directamente del picoplancton de manera eficiente, lo que representa un atajo para su alto requerimiento de P en un lago oligotrófico limitado por este nutriente. La posición de *D. chilense* como omnívoro *sensu lato* (que se alimenta de dos niveles tróficos: NF y BH-Pcy) aumentaría la conectividad y la estabilidad de la red trófica (Kratina *et al.*, 2012), particularmente en sistemas de baja productividad (France, 2012). Además, nuestros resultados tanto experimentales como estimados por nuestro modelo implican que el fuerte efecto negativo de *D. chilense* sobre los NF se debe a la competencia por presas picoplanctónicas en lugar del pastoreo directo. Además, las observaciones directas de su sistema filtrador indicarían también su alta eficiencia en la toma de presas menores de 1 μm .

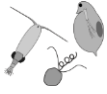
Los protistas bacterívoros se consideran un vínculo clave entre la producción bacteriana y los consumidores de niveles tróficos superiores (Gaedke *et al.*, 2002; Yvon-Durocher *et al.*, 2017). En este trabajo, encontramos que la principal adquisición de P en los NF es a través de la bacterivoría. En consecuencia, el contenido de P de los NF siguió un camino diferente al de los otros compartimentos osmotróficos considerados en nuestro modelo. En nuestro sistema, el compartimento de los NF estuvo dominado por especies mixotróficas (MNF) altamente bacterívoras (como *C. parva*). El contenido de P más alto en los MNF se encontró bajo la presencia directa de *B. gibbosa*, donde la biomasa de picoplancton aumentó debido al alto reciclado de P junto a una disminución en la biomasa de los MNF debida al pastoreo. Por el contrario, el contenido de P más bajo en los MNF se encontró bajo la presencia directa de *D. chilense*, que redujo la biomasa del picoplancton por pastoreo, limitando así la principal fuente de P de los MNF.



Estos resultados sitúan a los MNF como un compartimento altamente sensible en términos de su contenido de P, afectado por el pastoreo diferencial del zooplancton y el reciclado de nutrientes.

La capacidad de almacenar P interno es una variable clave dentro del bucle microbiano planctónico y el fitoplancton en sistemas limitados por P (Tambi *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2012). El contenido de P estimado por el modelo para los compartimentos de presas estrictamente osmotróficas (BH, Pcy, CPcy y MA) aumentó en todos los tratamientos de zooplancton excepto con la presencia indirecta de *D. chilense*. De acuerdo a esto, el contenido de P de las presas aumenta con la presencia directa de copépodos y cladóceros, sin embargo, los mecanismos subyacentes son diferentes. Los depredadores pueden aumentar la calidad nutricional de sus presas al reciclar el nutriente limitante, pero también al pastorear a los mejores competidores por este nutriente (Sterner y Elser, 2002; Vrede y Vrede, 2005). En este sentido, *B. gibbosa* aumentó el contenido de P de las presas indirectamente al liberar más P al ambiente y, por lo tanto, su presencia directa e indirecta tuvo efectos similares en los experimentos de incubación. En cambio, *D. chilense* aumentó el contenido de P de las presas únicamente de forma directa al consumir picoplancton, los mejores competidores por P (Tambi *et al.*, 2009). Tales hallazgos sugieren que, a pesar de ser considerados como un sumidero de P debido a su mayor requerimiento por este elemento (Elser y Urabe, 1999), los cladóceros altamente bacterívoros como *D. chilense* pueden mediar el flujo de P entre el bucle microbiano y el fitoplancton en sistemas limitados por P.

La biomasa de CPcy se incrementó con la presencia directa de *D. chilense* y bajo la presión de bacterivoría por parte de los MNF. La agregación facilita que las células pequeñas escapen de la depredación aumentando su tamaño y así aumentando el tiempo de manipulación por parte del depredador (Boenigk y Arndt, 2002; Huber *et al.*, 2017). Además, la presencia de una matriz gelatinosa en colonias de Pcy actúa como un factor anti-pastoreo eficaz (Callieri, 2010). Sin embargo, la afinidad de P disminuye con el tamaño (Edwards *et al.*, 2012), por lo que la agregación implicaría un balance entre evitar el pastoreo y adquirir nutrientes esenciales. La alta presión de pastoreo ejercida por el cladóceros *D. chilense*, que puede acceder a partículas más grandes que los MNF, dio lugar a colonias de mayor tamaño. En consecuencia, los incrementos de biomasa por agregación estimados por el modelo, fueron más altos que el crecimiento por reproducción celular, y, además, más altos para *D. chilense* que para los MNF. La leve disminución en la biomasa de CPcy junto con un aumento observado de Pcy y BH observada en presencia directa del copépodo



B. gibbosa estuvo probablemente más relacionada con un control de arriba hacia abajo sobre los MNF que con el pastoreo directo. Estos resultados apoyan la idea de que el control de arriba hacia abajo por copéodos sobre protistas bacterívoros favorece al picoplancton pequeño y unicelular (Vrede y Vrede, 2005; Callieri, 2010).

Actualmente, existe un gradiente en los modelos de redes tróficas planctónicas, desde modelos más conceptuales (Loladze *et al.*, 2000; Branco *et al.*, 2020) a modelos experimentales (Gaedke *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2020) y enfoques de modelado que combinan modelos mecanicistas con experimentos (Lignell *et al.*, 2013; Rosenbaum *et al.*, 2019). En este trabajo, estudiamos cómo la comunidad microbiana está estructurada a corto plazo por dos importantes miembros del zooplancton. Los copéodos y cladóceros constituyen los grupos de zooplancton dominantes en los lagos y su dominancia fluctúa estacionalmente, dependiendo de condiciones como la temperatura, la turbidez y la concentración de nutrientes (Gliwicz y Pijanowska, 1989; Laspoumaderes *et al.*, 2013; Schaffner *et al.*, 2019). Según los resultados de nuestro modelo, los copéodos favorecerían mayores tasas de adquisición de P para los cladóceros al liberar más P para el picoplancton. Por otro lado, los cladóceros tendrían un efecto mixto sobre los principales alimentos de los copéodos al aumentar el contenido de P de las algas estrictamente osmotróficas, pero disminuyendo el contenido de P de los MNF. El modelo presentado aquí podría usarse para analizar vías complejas en la red trófica microbiana. En este sentido, la importancia relativa de la fagotrofia y la osmotrofia en la absorción de P, el contenido de P y el reciclado de nutrientes por parte de los herbívoros son variables importantes que pueden evaluarse cuantitativamente con nuestro modelo. Estas variables son clave para comprender el flujo de materia de los ecosistemas y la eficiencia en el uso de los recursos.



Conclusiones

En ambientes lacustres con una alta relación luz:nutrientes, como los lagos andinos norpatagónicos, los protistas mixotróficos dominan la producción primaria y conectan la producción microbiana con el zooplancton y los niveles tróficos superiores. La mixotrofia representa en estos ambientes una ventaja para los protistas al poder utilizar no sólo el recurso lumínico sino también al alimentarse del picoplancton que capta la mayor parte de los nutrientes disueltos. La comunidad de protistas mixotróficos en estos lagos es muy diversa desde algas fagotróficas como los nanoflagelados mixotróficos (MNF) hasta ciliados fototróficos como *Ophrydium naumanni*. Los mixótrofos se ven afectados por la variación en las condiciones ambientales, las de sus presas y las de sus depredadores (Figura 5.1). Para poder comprender algunos aspectos de la dinámica de la comunidad planctónica de estos ambientes, en esta Tesis nos enfocamos en los protistas mixotróficos analizando y modelando algunas de sus interacciones con variables bióticas y abióticas.

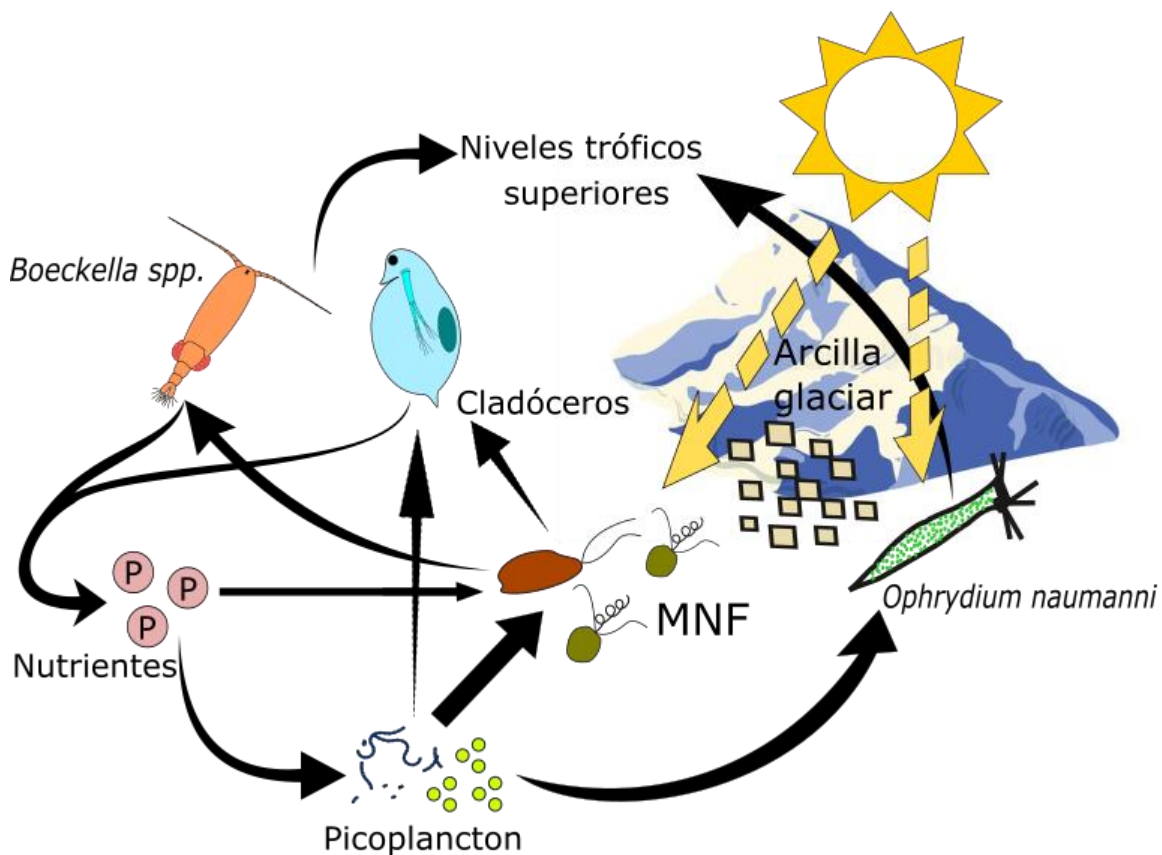


Figura 5.1: Esquema conceptual de las interacciones de los protistas mixotróficos analizados en esta Tesis.



Los protistas mixotróficos que habitan los lagos andinos norpatagónicos pertenecen a grupos funcionales contrastantes: mientras que los MNF como *Chrysochromulina parva* son mixótrofos constitutivos (CM) con capacidad fototrófica innata, los ciliados como *O. naumanni* son mixótrofos no constitutivos (NCM) y adquieren la capacidad fototrófica por endosimbiosis con algas del género *Chlorella* (Figura 5.2 A). En esta Tesis, encontramos que estos grupos funcionales se diferencian en su balance entre fototrofia y fagotrofia en función de la luz (Capítulo 2). A partir de nuestros modelos ajustados con datos experimentales, observamos que ambas estrategias nutricionales mostraron una función no monótonica con la irradiancia, con valores máximos ubicados a irradiancias cercanas al límite inferior de la zona eufótica y menores valores por fuera de este rango (Figura 5.2 B). En nuestro análisis también observamos que en el NCM *O. naumanni* se produjo un desacoplamiento entre fototrofia y fagotrofia mayor que en el CM *C. parva*, especialmente a altas irradiancias. Los datos modelados en esta Tesis incluyen un rango de irradiancia mayor que trabajos previos en otras partes del mundo, debido al escenario lumínico extremadamente amplio que ofrecen los lagos andinos y a los que los mixótrofos de estos ambientes se encuentran expuestos. Esto permitió analizar la relación fototrofia:fagotrofia en condiciones realistas con irradiancias por encima del máximo de estas funciones. En este sentido, nuestros resultados predicen que las estrategias nutricionales estarían más afectadas en los ciliados con algas endosimbiontes que en los CM por cambios en el ambiente lumínico debido al desacople entre fototrofia y fagotrofia que se observó en el NCM cuando la luz se incrementa (Fig. 5.2 B).

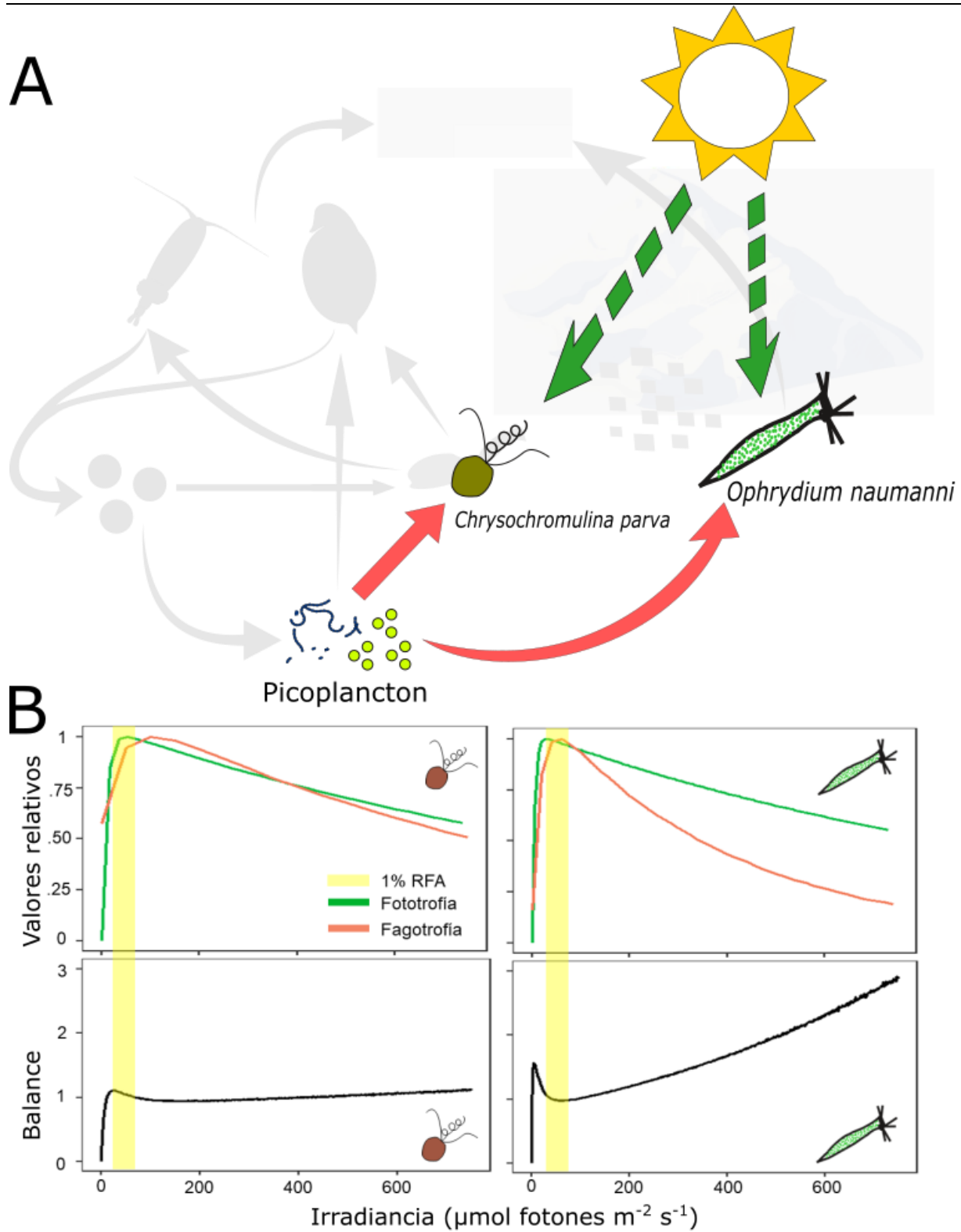


Figura 5.2: Síntesis del capítulo 2 de esta Tesis. A = Esquema conceptual de las interacciones analizadas, B = principales resultados obtenidos. PAR = radiación fotosintéticamente activa.



La turbidez causada por la retracción glaciaria no sólo afecta al ambiente lumínico, sino que también aumenta la concentración de partículas mineralogénicas que permanecen en suspensión en la columna de agua e interactúan con el plancton (Figura 5.3 A). En esta Tesis, demostramos que la arcilla glaciaria tiene un doble efecto en la fagotrofia de los MNF donde además de un efecto sobre la luz, las arcillas glaciares interfieren de forma directa en la captura de presas (Capítulo 3). Estos dos efectos (cambios en la luz e interferencia) se combinan en lagos proglaciares donde la concentración de arcilla es cambiante. En el lago Frías, la concentración de arcillas es mayor en verano que en primavera y por lo tanto la zona eufótica del lago es más estrecha. En este ambiente encontramos que altas concentraciones de arcilla glaciaria pueden mitigar el efecto no monótono de la luz. Esto sugiere, por un lado, que la eficiencia en la bacterivoría se reduce con la presencia de partículas no comestibles y, por otro lado, que la bacterivoría podría ser más homogénea a través de la columna de agua bajo condiciones de turbidez alta (Figura 5.3 B). Teniendo en cuenta que las arcillas también impactan negativamente en miembros del zooplancton como cladóceros, la presencia de arcilla glaciaria reducirá las interacciones heterotróficas como la fagotrofia y la filtración reduciendo los vínculos verticales, dando lugar a un predominio de interacciones autotróficas y osmotróficas dentro de la red trófica. En contraposición, a medida que los glaciares desaparezcan, las entradas de arcilla glaciaria disminuirán y, de acuerdo a nuestro modelo, las tasas de bacterivoría serán más altas en los niveles profundos de los lagos proglaciares debido al aumento de la transparencia de los mismos.

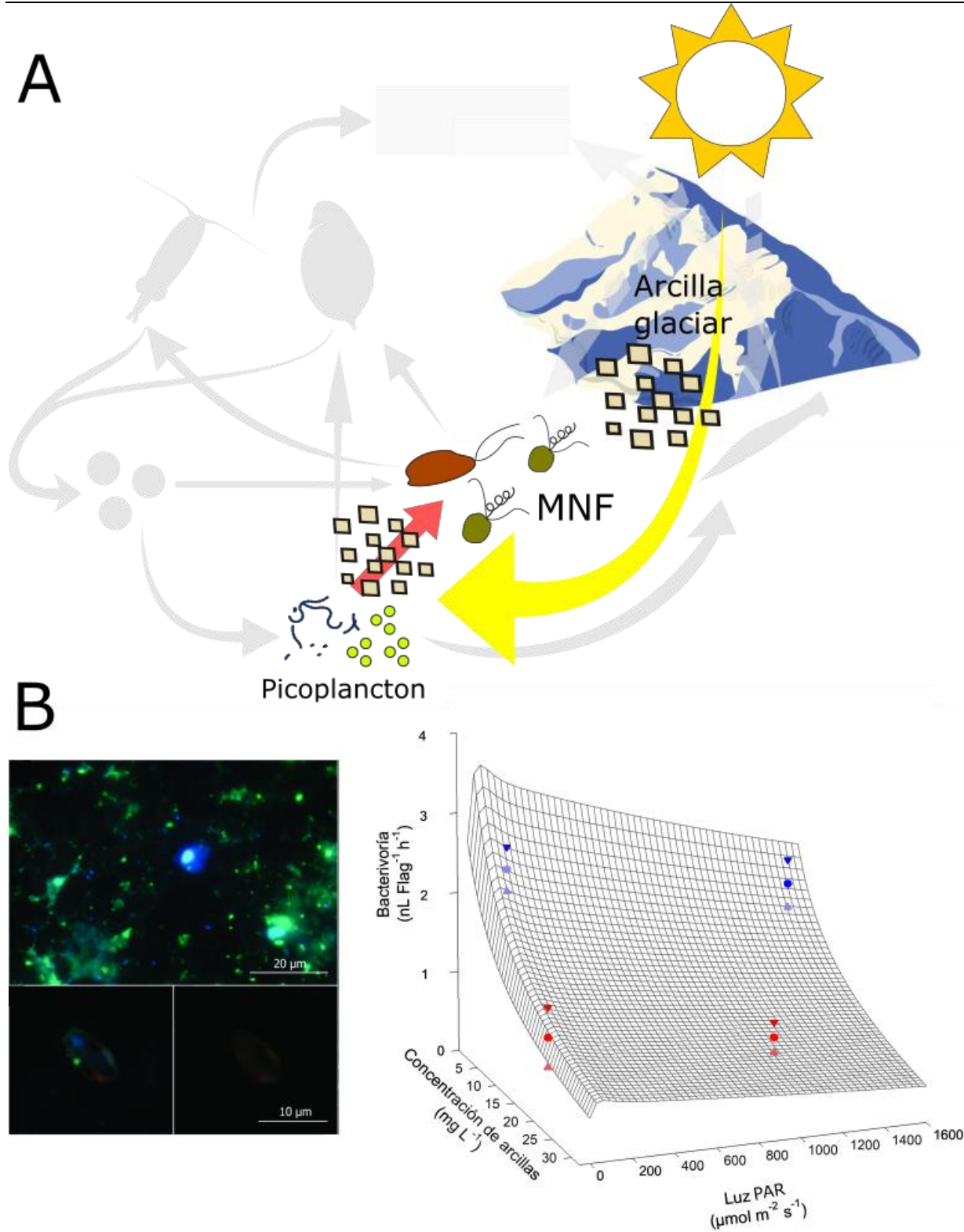


Figura 5.3: Síntesis del capítulo 3 de esta Tesis. A = Esquema conceptual de las interacciones analizadas, B = principales resultados obtenidos. PAR = radiación fotosintéticamente activa.



Para entender la dinámica del bucle microbiano y los mixótrofos, es necesario considerar también su interacción con otros compartimentos de la red trófica (Figura 5.4 A). En esta Tesis, demostramos que distintas estructuras zooplanctónicas tienen efectos contrastantes sobre los niveles tróficos inferiores, en especial sobre los MNF (Capítulo 4). Nuestros experimentos a campo permitieron cuantificar de forma separada los efectos del pastoreo y reciclado de nutrientes de dos miembros importantes del zooplancton: el copépodo *Boeckella gibbosa* y el cladóceros *Diaphanosoma chilense*. A pesar del alto contraste en sus modos de alimentación y de reciclado de fósforo, el efecto de ambos zoopláncteres fue similar sobre los MNF en términos de biomasa. Sin embargo, al utilizar nuestros datos experimentales para estimar la dinámica del fósforo en la trama trófica, encontramos que *B. gibbosa* aumentó el contenido de fósforo somático de los MNF mientras *D. chilense* lo redujo (Figura 5.4 B). Este hallazgo ubica a los MNF como una fracción altamente sensible al tipo de zooplancton dominante, pudiendo ser el contenido de P de este grupo un potencial predictor de la dinámica del bucle microbiano, así como tener un efecto estabilizador sobre la red trófica frente a cambios en la disponibilidad de nutrientes. Dado que los MNF representan la fracción dominante en estos ambientes oligotróficos, la presencia de diferentes estructuras de zooplancton, como un copépodo pastoreador o un cladóceros principalmente bacterívoro (y por lo tanto competidor de los MNF), tendrá consecuencias importantes en el flujo de nutrientes a través de la trama trófica acuática.

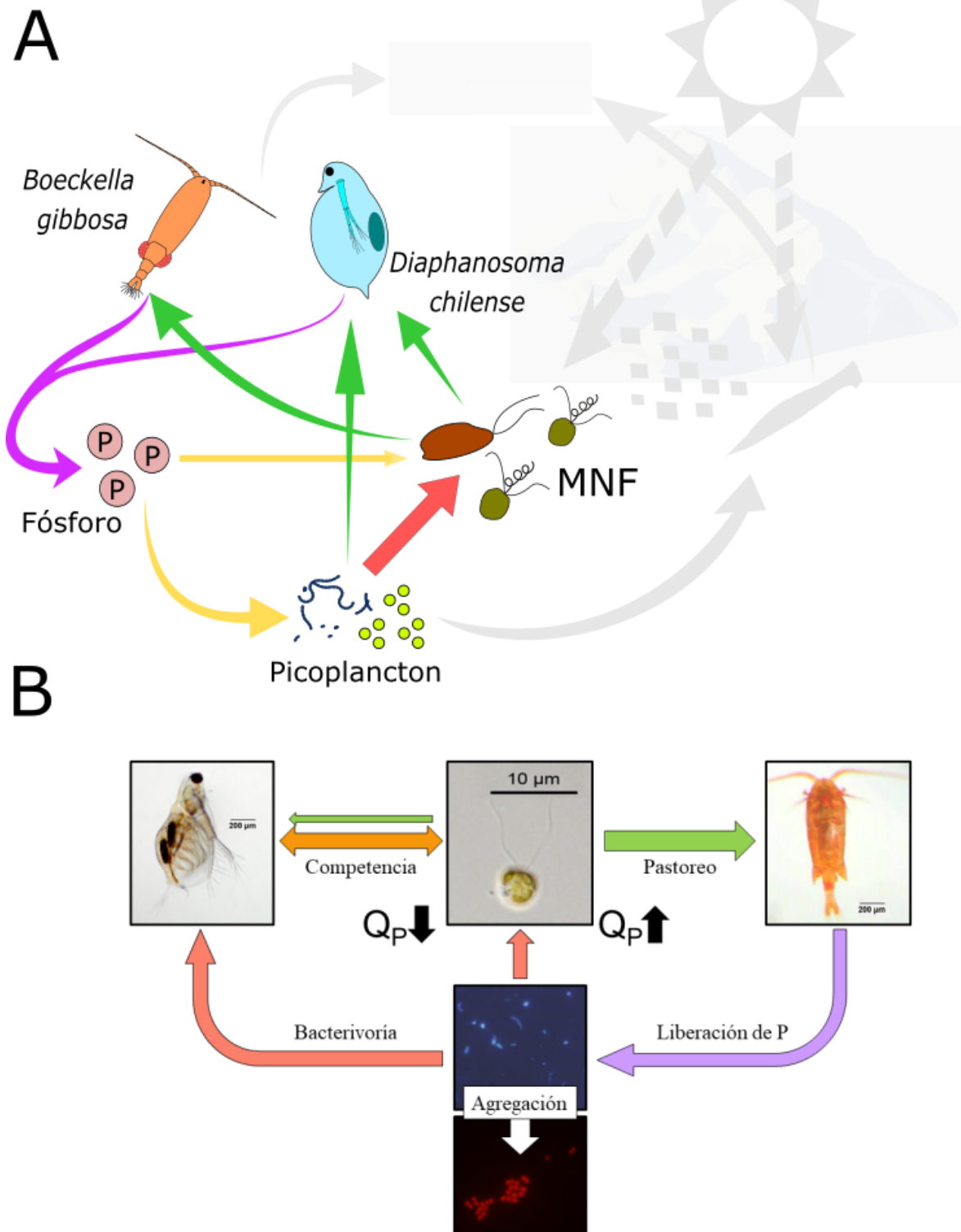


Figura 5.4: Síntesis del capítulo 4 de esta Tesis. A = Esquema conceptual de las interacciones analizadas, B = principales resultados obtenidos. Q_P = contenido de fósforo somático de los MNF.



Como conclusión final de esta tesis se puede indicar que los mixótrofos se ven afectados por la variación de diversos factores ambientales, abióticos y bióticos, y que la respuesta a estos efectos puede encontrarse en el balance entre sus estrategias nutricionales, su abundancia o su contenido de nutrientes esenciales como el fósforo. Los modelos mecanicistas formulados en esta tesis permitieron la evaluación de dinámicas del plancton frente a estas condiciones variables. Por ejemplo, es completamente factible adicionar a nuestro modelo de red trófica con zooplanton (Capítulo 4) el efecto de las arcillas glaciares en la bacterivoría (Capítulo 3) trasladando los efectos de la atenuación lumínica y la interferencia directa a otros grupos funcionales de mixótrofos (Capítulo 2). De esta forma, esta tesis constituye un aporte al desarrollo de la teoría cuantitativa sobre las interacciones de los mixótrofos en la red trófica planctónica.



Bibliografía

- APHA. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1220p.
- Arhonditsis GB, Papantou D, Zhang W, Perhar G, Massos E, Shi M. 2008. Bayesian calibration of mechanistic aquatic biogeochemical models and benefits for environmental management. *Journal of Marine Systems* 73: 8-30.
- Ariztegui D, Bösch P, Davaud E. 2007. Dominant ENSO frequencies during the Little Ice Age in Northern Patagonia: the varved record of proglacial Lago Frías, Argentina. *Quaternary International* 161: 46-55.
- Atkinson CL, Capps KA, Rugenski AT, Vanni MJ. 2017. Consumer-driven nutrient dynamics in freshwater ecosystems: From individuals to ecosystems. *Biological Reviews* 92: 2003-2023.
- Attayde JL, Hansson L-A. 1999. Effects of nutrient recycling by zooplankton and fish on phytoplankton communities. *Oecologia* 121: 47-54.
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray J, Meyer-Reil L, Thingstad F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*: 257-263.
- Balseiro E, Souza MS, Modenutti B, Reissig M. 2008. Living in transparent lakes: Low food P: C ratio decreases antioxidant response to ultraviolet radiation in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 53: 2383.
- Balseiro EG, Modenutti BE, Queimalffiños CP. 1997. Nutrient recycling and shifts in N: P ratio by different zooplankton structures in a South Andes lake. *Journal of Plankton Research* 19: 805-817.
- Balseiro EG, Modenutti BE, Queimalffiños CP. 2001. Feeding of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Calanoida) on ciliates and phytoflagellates in an ultraoligotrophic Andean lake. *Journal of Plankton Research* 23: 849-857.
- Balseiro EG, Queimalffiños CP, Modenutti BE. 2004. Grazing impact on autotrophic picoplankton in two south Andean lakes (Patagonia, Argentina) with different light: nutrient ratios. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 73-85.
- Bastidas Navarro M, Balseiro E, Modenutti B. 2009. Effect of UVR on lake water and macrophyte leachates in shallow Andean-Patagonian lakes: Bacterial response to changes in optical features. *Photochemistry and Photobiology* 85: 332-340.
- Bastidas Navarro M, Balseiro E, Modenutti B. 2011. UV radiation simultaneously affects phototrophy and phagotrophy in nanoflagellate-dominated phytoplankton from an Andean shallow lake. *Photochemical & Photobiological Sciences* 10: 1318-1325.
- Bastidas Navarro M, Martyniuk N, Balseiro E, Modenutti B. 2018. Effect of glacial lake outburst floods on the light climate in an Andean Patagonian lake: implications for planktonic phototrophs. *Hydrobiologia* 816: 39-48.
- Bell EM, Laybourn-Parry J. 2003. Mixotrophy in the antarctic phytoflagellate, *Pyramimonas gelidicola* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Journal of Phycology* 39: 644-649.
- Berge T, Chakraborty S, Hansen PJ, Andersen KH. 2017. Modeling succession of key resource-harvesting traits of mixotrophic plankton. *The ISME journal* 11: 212.
- Bergstrom AK, Jansson M, Drakare S, Blomqvist P. 2003. Occurrence of mixotrophic flagellates in relation to bacterioplankton production, light regime and availability of inorganic nutrients in unproductive lakes with differing humic contents. *Freshwater Biology* 48: 868-877.
- Beyer HL, Morales JM, Murray D, Fortin MJ. 2013. The effectiveness of Bayesian state-space models for estimating behavioural states from movement paths. *Methods in Ecology and Evolution* 4: 433-441.
- Biecheler B. 1936. Observation de la capture et de la digestion des proies chez un Périidinien vert. *CR Séances Soc. Biol* 122: 1173-1175.



- Bird DF, Kalff J. 1986. Bacterial grazing by planktonic lake algae. *Science* 231: 493-495.
- Boenigk J, Arndt H. 2002. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 465-480.
- Bonetto A, Dioni W, Depetris P. 1971. Investigaciones limnológicas en la cuenca del Río Manso y Lago Mascardi. Publ. n 4 Depto. Recursos Naturales y Energía, Fundación Bariloche: 1-62.
- Bouman HA, Platt T, Doblin M, Figueiras FG, Gudmundsson K, Gudfinnsson HG, Huang B, Hickman A, Hiscock M, Jackson T. 2018. Photosynthesis–irradiance parameters of marine phytoplankton: synthesis of a global data set. *Earth Systems Science Data* 10: 251-266.
- Boyce MS, Vernier PR, Nielsen SE, Schmiegelow FK. 2002. Evaluating resource selection functions. *Ecological Modelling* 157: 281-300.
- Branco P, Egas M, Elser JJ, Huisman J. 2018. Eco-evolutionary dynamics of ecological stoichiometry in plankton communities. *The American Naturalist* 192: E1-E20.
- Branco P, Egas M, Hall SR, Huisman J. 2020. Why do phytoplankton evolve large size in response to grazing? *The American Naturalist* 195: E20-E37.
- Brendelberger H. 1991. Filter mesh size of cladocerans predicts retention efficiency for bacteria. *Limnology and Oceanography* 36: 884-894.
- Bundy MH, Vanderploeg HA. 2002. Detection and capture of inert particles by calanoid copepods: the role of the feeding current. *Journal of Plankton Research* 24: 215-223.
- Burkholder JM, Glibert PM, Skelton HM. 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8: 77-93.
- Bürkner P-C. 2017. brms: An R package for Bayesian multilevel models using Stan. *Journal of statistical software* 80: 1-28.
- Bürkner P-C. 2018. Advanced bayesian multilevel modeling with the R package brms. *RJ-2018-017*, p395-411.
- Burns CW, Schallenberg M. 1996. Relative impacts of copepods, cladocerans and nutrients on the microbial food web of a mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research* 18: 683-714.
- Callieri C. 2010. Single cells and microcolonies of freshwater picocyanobacteria: a common ecology. *Journal of Limnology* 69: 257.
- Callieri C, Modenutti B, Queimalinos C, Bertoni R, Balseiro E. 2007. Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology* 41: 511-523.
- Caron DA. 2016. Mixotrophy stirs up our understanding of marine food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 2806-2808.
- Caron DA, Sanders RW, Lim EL, Marrasé C, Amaral LA, Whitney S, Aoki RB, Porters KG. 1993. Light-dependent phagotrophy in the freshwater mixotrophic chrysophyte *Dinobryon cylindricum*. *Microbial Ecology* 25: 93-111.
- Carrillo P, Medina-Sánchez J, Villar-Argaiz M, Bullejos F, Durán C, Bastidas-Navarro M, Souza MS, Balseiro EG, Modenutti BE. 2017. Vulnerability of mixotrophic algae to nutrient pulses and UVR in an oligotrophic Southern and Northern Hemisphere lake. *Scientific reports* 7: 1-11.
- Christaki U, Jacquet S, Dolan JR, Vaulot D, Rassoulzadegan F. 1999. Growth and grazing on *Prochlorococcus* and *Synechococcus* by two marine ciliates. *Limnology and Oceanography* 44: 52-61.
- Clark JS. 2005. Why environmental scientists are becoming Bayesians. *Ecology Letters* 8: 2-14.
- Corliss J. 1979. Characterization, classification and guide to the literature. . Oxford: Pergamon Press.
- Corno G, Modenutti BE, Callieri C, Balseiro EG, Bertoni R, Caravatia E. 2009. Bacterial diversity and morphology in deep ultraoligotrophic Andean lakes: the role of UVR on vertical distribution. *Limnology and Oceanography* 54: 1098-1112.
- Cotner JB, Biddanda BA. 2002. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5: 105-121.
- Cuffey KM, Paterson WSB. 2010. The physics of glaciers: Academic Press.



- Danger M, Leflaive J, Oumarou C, Ten-Hage L, Lacroix G. 2007. Control of phytoplankton–bacteria interactions by stoichiometric constraints. *Oikos* 116: 1079-1086.
- De Mitrovich CL, Menu-Marque S. 1997. Redescription and distribution of *Boeckella gibbosa* (Brehm, 1935)(Copepoda, Calanoida, Centropagidae). *Hydrobiologia* 354: 157-163.
- Diehl S. 2002. Phytoplankton, light, and nutrients in a gradient of mixing depths: theory. *Ecology* 83: 386-398.
- Diehl S, Berger S, Wöhrl R. 2005. Flexible nutrient stoichiometry mediates environmental influences on phytoplankton and its resources. *Ecology* 86: 2931-2945.
- Dietze MC, Fox A, Beck-Johnson LM, Betancourt JL, Hooten MB, Jarnevich CS, Keitt TH, Kenney MA, Laney CM, Larsen LG. 2018. Iterative near-term ecological forecasting: Needs, opportunities, and challenges. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 115: 1424-1432.
- Dorazio RM. 2016. Bayesian data analysis in population ecology: motivations, methods, and benefits. *Population Ecology* 58: 31-44.
- Droop MR. 1968. Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 48: 689-733.
- Droop MR. 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae 1. *Journal of Phycology* 9: 264-272.
- Edwards KF, Thomas MK, Klausmeier CA, Litchman E. 2012. Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 57: 554-566.
- Eilers P, Peeters J. 1988. A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecological Modelling* 42: 199-215.
- Ellison AM. 2004. Bayesian inference in ecology. *Ecology Letters* 7: 509-520.
- Elser JJ, Dobberfuhl DR, MacKay NA, Schampel JH. 1996. Organism size, life history, and N: P stoichiometry: toward a unified view of cellular and ecosystem processes. *Bioscience* 46: 674-684.
- Elser JJ, Elser MM, MacKay NA, Carpenter SR. 1988. Zooplankton-mediated transitions between N-and P-limited algal growth 1. *Limnology and Oceanography* 33: 1-14.
- Elser JJ, Sterner R, Gorokhova E, Fagan W, Markow T, Cotner J, Harrison J, Hobbie S, Odell G, Weider L. 2000. Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecology Letters* 3: 540-550.
- Elser JJ, Urabe J. 1999. The stoichiometry of consumer-driven nutrient recycling: Theory, observations, and consequences. *Ecology* 80: 735-751.
- Eppley RW, Rogers JN, McCarthy JJ. 1969. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton 1. *Limnology and Oceanography* 14: 912-920.
- Falkowski PG, Raven JA. 2007. *Aquatic photosynthesis*. Malden, MA USA: Blackwell Science.
- Faure E, Not F, Benoiston A-S, Labadie K, Bittner L, Ayata S-D. 2019. Mixotrophic protists display contrasted biogeographies in the global ocean. *The ISME journal* 13: 1072-1083.
- Finlay B, Maberly S, Esteban G. 1996. Spectacular abundance of ciliates in anoxic pond water: contribution of symbiont photosynthesis to host respiratory oxygen requirements. *FEMS Microbiology Ecology* 20: 229-235.
- Fischer R, Giebel HA, Hillebrand H, Ptacnik R. 2017. Importance of mixotrophic bacterivory can be predicted by light and loss rates. *Oikos* 126: 713-722.
- Flynn KJ, Mitra A, Anestis K, Anschutz AA, Calbet A, Ferreira GD, Gypens N, Hansen PJ, John U, Martin JL. 2019. Mixotrophic protists and a new paradigm for marine ecology: where does plankton research go now? *Journal of Plankton Research* 41: 375-391.
- Flynn KJ, Stoecker DK, Mitra A, Raven JA, Glibert PM, Hansen PJ, Granéli E, Burkholder JM. 2012. Misuse of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. *Journal of Plankton Research* 35: 3-11.
- Flynn KJ, Stoecker DK, Mitra A, Raven JA, Glibert PM, Hansen PJ, Granéli E, Burkholder JM. 2013. Misuse of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. *Journal of Plankton Research* 35: 3-11.



- Forget M-H, Sathyendranath S, Platt T, Pommier J, Vis C, Kyewalyanga M, Hudon C. 2007. Extraction of photosynthesis-irradiance parameters from phytoplankton production data: demonstration in various aquatic systems. *Journal of Plankton Research* 29: 249-262.
- France RL. 2012. Omnivory, vertical food-web structure and system productivity: stable isotope analysis of freshwater planktonic food webs. *Freshwater Biology* 57: 787-794.
- Gaedke U, Hochstädter S, Straile D. 2002. Interplay between energy limitation and nutritional deficiency: empirical data and food web models. *Ecological Monographs* 72: 251-270.
- Gelman A, Vehtari A, Simpson D, Margossian CC, Carpenter B, Yao Y, Kennedy L, Gabry J, Bürkner P-C, Modrák M. 2020. Bayesian workflow. arXiv preprint arXiv:2011.01808.
- Gerea M, Queimaliños C, Unrein F. 2019. Grazing impact and prey selectivity of picoplanktonic cells by mixotrophic flagellates in oligotrophic lakes. *Hydrobiologia* 831: 5-21.
- Gerla DJ, Mooij WM, Huisman J. 2011. Photoinhibition and the assembly of light-limited phytoplankton communities. *Oikos* 120: 359-368.
- Gliwicz ZM, Pijanowska J. 1989. The role of predation in zooplankton succession. *Plankton ecology: Springer*, p253-296.
- Gophen M, Geller W. 1984. Filter mesh size and food particle uptake by *Daphnia*. *Oecologia* 64: 408-412.
- Grover JP. 1989. Phosphorus-dependent growth kinetics of 11 species of freshwater algae. *Limnology and Oceanography* 34: 341-348.
- Grover JP. 1991. Resource competition in a variable environment: phytoplankton growing according to the variable-internal-stores model. *The American Naturalist* 138: 811-835.
- Grover JP. 2004. Predation, competition, and nutrient recycling: a stoichiometric approach with multiple nutrients. *Journal of Theoretical Biology* 229: 31-43.
- Gurung TB, Urabe J, Nakanishi M. 1999. Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. *Aquatic Microbial Ecology* 17: 27-35.
- Haario H, Laine M, Mira A, Saksman E. 2006. DRAM: efficient adaptive MCMC. *Statistics and computing* 16: 339-354.
- Hallam TG, Levin SA. 2012. *Mathematical ecology: an introduction*: Springer Science & Business Media.
- Hansen PJ. 2011. The Role of Photosynthesis and Food Uptake for the Growth of Marine Mixotrophic Dinoflagellates 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 58: 203-214.
- Hartmann M, Grob C, Tarran GA, Martin AP, Burkill PH, Scanlan DJ, Zubkov MV. 2012. Mixotrophic basis of Atlantic oligotrophic ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 5756-5760.
- Havskum H, Riemann B. 1996. Ecological importance of bacterivorous, pigmented flagellates (mixotrophs) in the Bay of Aarhus, Denmark. *Marine Ecology Progress Series* 137: 251-263.
- Hébert M-P, Beisner BE, Maranger R. 2017. Linking zooplankton communities to ecosystem functioning: toward an effect-trait framework. *Journal of Plankton Research* 39: 3-12.
- Hessen D, Andersen T, Faafeng B. 1992. Zooplankton contribution to particulate phosphorus and nitrogen in lakes. *Journal of Plankton Research* 14: 937-947.
- Hessen DO, Færøvig PJ, Andersen T. 2002. Light, nutrients, and P: C ratios in algae: grazer performance related to food quality and quantity. *Ecology* 83: 1886-1898.
- Holling CS. 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Canadian Entomologist* 91: 385-398.
- Huber P, Diovisalvi N, Ferraro M, Metz S, Lagomarsino L, Llamas ME, Royo-Llonch M, Bustingorry J, Escaray R, Acinas SG. 2017. Phenotypic plasticity in freshwater picocyanobacteria. *Environmental Microbiology* 19: 1120-1133.
- Huisman J, Weissing FJ. 1994. Light-limited growth and competition for light in well-mixed aquatic environments: an elementary model. *Ecology* 75: 507-520.



- Hylander S, Jephson T, Leuret K, Von Einem J, Fagerberg T, Balseiro EG, Modenutti BE, Souza MS, Laspoumaderes C, Jönsson M. 2011. Climate-induced input of turbid glacial meltwater affects vertical distribution and community composition of phyto-and zooplankton. *Journal of Plankton Research* 33: 1239-1248.
- IPCC. 2014. *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects. Central and South America. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, p151.
- Iriondo M. 1989. Quaternary lakes of Argentina. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 70: 81-88.
- Jassby AD, Platt T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 21: 540-547.
- Johnson MD. 2011. Acquired Phototrophy in Ciliates: A Review of Cellular Interactions and Structural Adaptations 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 58: 185-195.
- Jones H. 1997. A classification of mixotrophic protists based on their behaviour. *Freshwater Biology* 37: 35-43.
- Jones RI. 2000. Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biology* 45: 219-226.
- Jönsson M, Ranåker L, Nicolle A, Ljungberg P, Fagerberg T, Hylander S, Jephson T, Leuret K, Von Einem J, Hansson L-A. 2011. Glacial clay affects foraging performance in a Patagonian fish and cladoceran. *Hydrobiologia* 663: 101-108.
- Jürgens K. 1994. Impact of Daphnia on planktonic microbial food webs - a review. *Marine Microbial Food Webs* 8: 295-324.
- Kammerlander B, Koinig KA, Rott E, Sommaruga R, Tartarotti B, Trattner F, Sonntag B. 2016. Ciliate community structure and interactions within the planktonic food web in two alpine lakes of contrasting transparency. *Freshwater Biology* 61: 1950-1965.
- Katechakis A, Stibor H. 2006. The mixotroph *Ochromonas tuberculata* may invade and suppress specialist phago- and phototroph plankton communities depending on nutrient conditions. *Oecologia* 148: 692-701.
- Kemp PF, Cole JJ, Sherr BF, Sherr EB. 1993. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*: CRC press.
- Kirk JT. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge: Cambridge university press.
- Kirk KL, Gilbert JJ. 1990. Suspended clay and the population dynamics of planktonic rotifers and cladocerans. *Ecology* 71: 1741-1755.
- Knoll LB, Vanni MJ, Renwick WH. 2003. Phytoplankton primary production and photosynthetic parameters in reservoirs along a gradient of watershed land use. *Limnology and Oceanography* 48: 608-617.
- Kratina P, LeCraw RM, Ingram T, Anholt BR. 2012. Stability and persistence of food webs with omnivory: is there a general pattern? *Ecosphere* 3: 1-18.
- Kritzberg ES. 2017. Centennial-long trends of lake browning show major effect of afforestation. *Limnology and Oceanography Letters* 2: 105-112.
- Kuosa H. 1991. Picoplanktonic algae in the northern Baltic Sea: seasonal dynamics and flagellate grazing. *Mar. Ecol. Prog. Ser* 73: 269-276.
- Lampert W. 1987. Feeding and nutrition in Daphnia. *Daphnia*: 143-192.
- Laspoumaderes C, Modenutti B, Elser JJ, Balseiro E. 2015. Does the stoichiometric carbon: phosphorus knife edge apply for predaceous copepods? *Oecologia* 178: 557-569.
- Laspoumaderes C, Modenutti BE, Souza MS, Bastidas Navarro M, Cuassolo F, Balseiro EG. 2013. Glacier melting and stoichiometric implications for lake community structure: zooplankton species distributions across a natural light gradient. *Global Change Biology* 19: 316-326.
- Laspoumaderes C, Souza MS, Modenutti B, Balseiro E. 2017. Glacier melting and response of Daphnia oxidative stress. *Journal of Plankton Research*: 1-12.
- Laybourn-Parry J, Marshall WA, Marchant HJ. 2005. Flagellate nutritional versatility as a key to survival in two contrasting Antarctic saline lakes. *Freshwater Biology* 50: 830-838.



- Laybourn-Parry J, Perriss SJ, Seaton GG, Rohozinski J. 1997. A mixotrophic ciliate as a major contributor to plankton photosynthesis in Australian lakes. *Limnology and Oceanography* 42: 1463-1467.
- Leles SG, Bruggeman J, Polimene L, Blackford J, Flynn KJ, Mitra A. 2021. Differences in physiology explain succession of mixoplankton functional types and affect carbon fluxes in temperate seas. *Progress in Oceanography* 190: 102481.
- Leles SG, Polimene L, Bruggeman J, Blackford J, Ciavatta S, Mitra A, Flynn KJ. 2018. Modelling mixotrophic functional diversity and implications for ecosystem function. *Journal of Plankton Research* 40: 627-642.
- Li Y, Gal G, Makler-Pick V, Waite A, Bruce L, Hipsey M. 2014. Examination of the role of the microbial loop in regulating lake nutrient stoichiometry and phytoplankton dynamics. *Biogeosciences* 11: 2939-2960.
- Lignell R, Haario H, Laine M, Thingstad TF. 2013. Getting the “right” parameter values for models of the pelagic microbial food web. *Limnology and Oceanography* 58: 301-313.
- Litchman E, Klausmeier CA. 2008. Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39: 615-639.
- Litchman E, Klausmeier CA, Schofield OM, Falkowski PG. 2007. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecology Letters* 10: 1170-1181.
- Loladze I, Kuang Y, Elser JJ. 2000. Stoichiometry in producer-grazer systems: linking energy flow with element cycling. *Bulletin of Mathematical Biology* 62: 1137-1162.
- Macedo M, Ferreira J, Duarte P. 1998. Dynamic behaviour of photosynthesis-irradiance curves determined from oxygen production during variable incubation periods. *Marine Ecology Progress Series* 165: 31-43.
- Macek M, Šimek K, Bittl T. 2001. Conspicuous peak of oligotrichous ciliates following winter stratification in a bog lake. *Journal of Plankton Research* 23: 353-363.
- MacIntyre HL, Kana TM, Anning T, Geider RJ. 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria 1. *Journal of Phycology* 38: 17-38.
- Malve O, Laine M, Haario H, Kirkkala T, Sarvala J. 2007. Bayesian modelling of algal mass occurrences—using adaptive MCMC methods with a lake water quality model. *Environmental Modelling & Software* 22: 966-977.
- Markert B, Pedrozo F, Geller W, Friese K, Korhammer S, Baffico G, Diaz M, Wöfl S. 1997. A contribution to the study of the heavy-metal and nutritional element status of some lakes in the southern Andes of Patagonia (Argentina). *Science of the Total Environment* 206: 1-15.
- Marshall W, Laybourn-Parry J. 2002. The balance between photosynthesis and grazing in Antarctic mixotrophic cryptophytes during summer. *Freshwater Biology* 47: 2060-2070.
- Maruyama S, Kim E. 2013. A modern descendant of early green algal phagotrophs. *Current Biology* 23: 1081-1084.
- Maynard-Smith J. 1978. *Models in ecology*: CUP Archive.
- McKie-Krisberg ZM, Gast RJ, Sanders RW. 2015. Physiological responses of three species of Antarctic mixotrophic phytoflagellates to changes in light and dissolved nutrients. *Microbial Ecology* 70: 21-29.
- Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M, Carrillo P. 2004. Neither with nor without you: A complex algal control on bacterioplankton in a high mountain lake. *Limnology and Oceanography* 49: 1722-1733.
- Mitra A, Flynn KJ, Burkholder JM, Berge T, Calbet A, Raven JA, Granéli E, Glibert PM, Hansen PJ, Stoecker DK. 2014. The role of mixotrophic protists in the biological carbon pump. *Biogeosciences* 11: 995-1005.



- Mitra A, Flynn KJ, Tillmann U, Raven JA, Caron D, Stoecker DK, Not F, Hansen PJ, Hallegraeff G, Sanders R. 2016. Defining planktonic protist functional groups on mechanisms for energy and nutrient acquisition: incorporation of diverse mixotrophic strategies. *Protist* 167: 106-120.
- Modenutti B, Balseiro E. 2020. Mixotrophic ciliates in North-Patagonian Andean lakes: stoichiometric balances in nutrient limited environments. *Limnetica* 39: 263-274.
- Modenutti B, Balseiro E, Callieri C, Queimaliños C, Bertoni R. 2004. Increase in photosynthetic efficiency as a strategy of planktonic organisms exploiting deep lake layers. *Freshwater Biology* 49: 160-169.
- Modenutti BE. 1997. Distribución de los ciliados planctónicos *Ophrydium naumanni* y *Stentor araucanus* en lagos oligotróficos andinos. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat* 47: 79-83.
- Modenutti BE. 2014. Mixotrophy in Argentina freshwaters. *Advances in limnology* 65: 359-374.
- Modenutti BE, Balseiro EG. 2002. Mixotrophic ciliates in an Andean lake: Dependence on light and prey of an *Ophrydium naumanni* population. *Freshwater Biology* 47: 121-128.
- Modenutti BE, Balseiro EG, Bastidas Navarro M, Laspoumaderes C, Souza MS, Cuassolo F. 2013. Environmental changes affecting light climate in oligotrophic mountain lakes: the deep chlorophyll maxima as a sensitive variable. *Aquatic Sciences* 75: 361-371.
- Modenutti BE, Balseiro EG, Callieri C, Bertoni R. 2008. Light versus food supply as factors modulating niche partitioning in two pelagic mixotrophic ciliates. *Limnology and Oceanography* 53: 446-455.
- Modenutti BE, Balseiro EG, Queimaliños CP. 2000. Ciliate community structure in two South Andean lakes: the effect of lake water on *Ophrydium naumanni* distribution. *Aquatic Microbial Ecology* 21: 299-307.
- Modenutti BE, Pérez G. 2001. Planktonic ciliates from an oligotrophic south Andean lake, Morenito lake (Patagonia, Argentina). *Brazilian Journal of Biology* 61: 389-395.
- Modenutti BE, Queimaliños CP, Balseiro EG, Reissig M. 2003. Impact of different zooplankton structures on the microbial food web of a South Andean oligotrophic lake. *Acta Oecologica* 24: S289-S298.
- Moorthi SD, Ptacnik R, Sanders RW, Fischer R, Busch M, Hillebrand H. 2017. The functional role of planktonic mixotrophs in altering seston stoichiometry. *Aquatic Microbial Ecology* 79: 235-245.
- Morris DP, Zagarese H, Williamson CE, Balseiro EG, Hargreaves BR, Modenutti B, Moeller R, Queimalinos C. 1995. The attenuation of solar UV radiation in lakes and the role of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography* 40: 1381-1391.
- Nielsen ES. 1952. The use of radio-active carbon (C14) for measuring organic production in the sea. *ICES Journal of Marine Science* 18: 117-140.
- Nijssen B, O'Donnell GM, Hamlet AF, Lettenmaier DP. 2001. Hydrologic sensitivity of global rivers to climate change. *Climatic Change* 50: 143-175.
- Nygaard K, Tobiesen A. 1993. Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. *Limnology and Oceanography* 38: 273-279.
- Ogle K. 2009. Hierarchical Bayesian statistics: merging experimental and modeling approaches in ecology. *Ecological Applications* 19: 577-581.
- Paruelo JM, Beltrán A, Jobbágy E, Sala OE, Golluscio RA. 1998. The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. *Ecologia Austral* 8: 85-101.
- Perez G, Queimalinos C, Balseiro E, Modenutti B. 2007. Phytoplankton absorption spectra along the water column in deep North Patagonian Andean lakes (Argentina). *Limnologica* 37: 3-16.
- Pérez GL, Queimaliños CP, Modenutti BE. 2002. Light climate and plankton in the deep chlorophyll maxima in North Patagonian Andean lakes. *Journal of Plankton Research* 24: 591-599.
- Perriss SJ, Laybourn-Parry J, Jones RI. 1994. Chlorophyll contents and photosynthetic rates of the freshwater mixotrophic ciliate *Strombidium viride* (Ciliophora: Oligotrichida). *Archiv fur Hydrobiologie*: 473-483.
- Peter H, Sommaruga R. 2017. Alpine glacier-fed turbid lakes are discontinuous cold polymictic rather than dimictic. *Inland Waters* 7: 45-54.



- Platt T, Gallegos C, Harrison WG. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38: 687-701.
- Plummer M. 2003. JAGS: A program for analysis of Bayesian graphical models using Gibbs sampling. *Proceedings of the 3rd international workshop on distributed statistical computing: Vienna, Austria.*, p10.
- Pomeroy LR. 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience* 24: 499-504.
- Porter KG. 1988. Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia* 159: 89-97.
- Porter KG, Feig YS. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora 1. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948.
- Princiotta SD, Smith BT, Sanders RW. 2016. Temperature-dependent phagotrophy and phototrophy in a mixotrophic chrysophyte. *Journal of Phycology* 52: 432-440.
- Ptacnik R, Gomes A, Royer S-J, Berger SA, Calbet A, Nejstgaard JC, Gasol JM, Isari S, Moorthi SD, Ptacnikova R. 2016. A light-induced shortcut in the planktonic microbial loop. *Scientific reports* 6: 29286.
- Ptacnik R, Sommer U, Hansen T, Martens V. 2004. Effects of microzooplankton and mixotrophy in an experimental planktonic food web. *Limnology and Oceanography* 49: 1435-1445.
- Putt M. 1990. Abundance, chlorophyll content and photosynthetic rates of ciliates in the Nordic Seas during summer. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 37: 1713-1731.
- Queimaliños C, Diaz M. 2014. Phytoplankton of Andean Patagonian lakes. *Advances in limnology*: 235-256.
- Queimaliños C, Pérez G, Modenutti B. 2002. Summer population development and diurnal vertical distribution of dinoflagellates in an ultraoligotrophic Andean lake (Patagonia, Argentina).
- Queimaliños CP, Modenutti BE, Balseiro EG. 1999. Symbiotic association of the ciliate *Ophrydium naumanni* with *Chlorella* causing a deep chlorophyll a maximum in an oligotrophic South Andes lake. *Journal of Plankton Research* 21.
- Raven J. 1997. Phagotrophy in phototrophs. *Limnology and Oceanography* 42: 198-205.
- Reiners WA. 1986. Complementary models for ecosystems. *The American Naturalist* 127: 59-73.
- Reisser W. 1986. Endosymbiotic associations of freshwater protozoa and algae. *Progress in protistology* 1: 195-214.
- Reisser W, Meier R, Görtz HD, Jeon KW. 1985. Establishment, Maintenance, and Integration Mechanisms of Endosymbionts in Protozoa 1. *The Journal of protozoology* 32: 383-390.
- Rogers TL, Munch SB, Stewart SD, Palkovacs EP, Giron-Nava A, Matsuzaki SiS, Symons CC. 2020. Trophic control changes with season and nutrient loading in lakes. *Ecology Letters* 23: 1287-1297.
- Rogerson A, Finlay B, Berninger U-G. 1989. Sequestered chloroplasts in the freshwater ciliate *Strombidium viride* (Ciliophora: Oligotrichida). *Transactions of the American Microscopical Society*: 117-126.
- Rose KC, Hamilton DP, Williamson CE, McBride CG, Fischer JM, Olson MH, Saros JE, Allan MG, Cabrol N. 2014. Light attenuation characteristics of glacially-fed lakes. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 119: 1446-1457.
- Rosenbaum B, Raatz M, Weithoff G, Fussmann GF, Gaedke U. 2019. Estimating parameters from multiple time series of population dynamics using Bayesian inference. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6: 234.
- Rothhaupt KO. 1996. Utilization of substitutable carbon and phosphorus sources by the mixotrophic chrysophyte *Ochromonas* sp. *Ecology* 77: 706-715.
- Ruiz L, Berthier E, Masiokas M, Pitte P, Villalba R. 2015. First surface velocity maps for glaciers of Monte Tronador, North Patagonian Andes, derived from sequential Pléiades satellite images. *Journal of Glaciology* 61: 908-921.
- Ryu S, Pepper RE, Nagai M, France DC. 2017. Vorticella: a protozoan for bio-inspired engineering. *Micromachines* 8: 4.



- Sanders R. 1991. Mixotrophic protists in marine and freshwater ecosystems. *The Journal of protozoology* 38: 76-81.
- Sanders RW, Porter KG, Bennett SJ. 1990. Heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic nanoflagellates: seasonal abundances and bacterivory in a eutrophic lake. *Limnology and Oceanography* 35: 1821-1832.
- Sanders RW, Porter KG, Bennett SJ, DeBiase AE. 1989. Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnology and Oceanography* 34: 673-687.
- Schaffner LR, Govaert L, De Meester L, Ellner SP, Fairchild E, Miner BE, Rudstam LG, Spaak P, Hairston NG. 2019. Consumer-resource dynamics is an eco-evolutionary process in a natural plankton community. *Nature ecology & evolution* 3: 1351-1358.
- Schmitz OJ, Hawlena D, Trussell GC. 2010. Predator control of ecosystem nutrient dynamics. *Ecology Letters* 13: 1199-1209.
- Schoener TW. 1986. Mechanistic approaches to community ecology: a new reductionism. *American Zoologist* 26: 81-106.
- Sherr BF, Sherr EB, Fallon RD. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Applied Environmental Microbiology* 53: 958-965.
- Shuter B. 1978. Size dependence of phosphorus and nitrogen subsistence quotas in unicellular microorganisms 1. *Limnology and Oceanography* 23: 1248-1255.
- Sigee DC. 2005. *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*: John Wiley & Sons.
- Šimek K, Chrzanowski TH. 1992. Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3715-3720.
- Sitters J, Bakker ES, Veldhuis MP, Veen G, Olde Venterink H, Vanni MJ. 2017. The stoichiometry of nutrient release by terrestrial herbivores and its ecosystem consequences. *Frontiers in Earth Science* 5: 32.
- Slemmons KE, Saros JE, Simon K. 2013. The influence of glacial meltwater on alpine aquatic ecosystems: a review. *Environ. Sci. Process Impacts* 15: 1794-1806.
- Smout S, Asseburg C, Matthiopoulos J, Fernández C, Redpath S, Thirgood S, Harwood J. 2010. The functional response of a generalist predator. *PLoS ONE* 5: e10761.
- Solomon CT, Carpenter SR, Clayton MK, Cole JJ, Coloso JJ, Pace ML, Vander Zanden MJ, Weidel BC. 2011. Terrestrial, benthic, and pelagic resource use in lakes: results from a three-isotope Bayesian mixing model. *Ecology* 92: 1115-1125.
- Sommaruga R. 2015. When glaciers and ice sheets melt: consequences for planktonic organisms. *Journal of Plankton Research* 37: 509-518.
- Sommaruga R, Kandolf G. 2014. Negative consequences of glacial turbidity for the survival of freshwater planktonic heterotrophic flagellates. *Scientific reports* 4: 4113.
- Sommer U, Sommer F. 2006. Cladocerans versus copepods: the cause of contrasting top-down controls on freshwater and marine phytoplankton. *Oecologia* 147: 183-194.
- Sommer U, Stibor H. 2002. Copepoda–Cladocera–Tunicata: the role of three major mesozooplankton groups in pelagic food webs. *Ecological Research* 17: 161-174.
- Souza M, Modenutti B, Carrillo P, Villar-Argaiz M, Medina-Sánchez J, Bullejos F, Balseiro E. 2010. Stoichiometric dietary constraints influence the response of copepods to ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Limnology and Oceanography* 55: 1024.
- Sterner RW, Elser JJ. 2002. *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*: Princeton University Press.
- Sterner RW, Elser JJ, Fee EJ, Guildford SJ, Chrzanowski TH. 1997. The light: nutrient ratio in lakes: the balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. *The American Naturalist* 150: 663-684.
- Stoecker DK. 1998. Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications. *European Journal of Protistology* 34: 281-290.



- Stoecker DK, Johnson MD, de Vargas C, Not F. 2009. Acquired phototrophy in aquatic protists. *Aquatic Microbial Ecology* 57: 279-310.
- Stoecker DK, Silver MW. 1987. Chloroplast Retention by Marine Planktonic Ciliates a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503: 562-565.
- Summerer M, Sonntag B, Sommaruga R. 2008. CILIATE-SYMBIONT SPECIFICITY OF FRESHWATER ENDOSYMBIOTIC CHLORELLA (TREBOUXIOPHYCEAE, CHLOROPHYTA) 1. *Journal of Phycology* 44: 77-84.
- Sun J, Liu D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25: 1331-1346.
- Tambi H, Flaten GAF, Egge JK, Bødtker G, Jacobsen A, Thingstad TF. 2009. Relationship between phosphate affinities and cell size and shape in various bacteria and phytoplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 57: 311-320.
- Tilman D, Kilham SS, Kilham P. 1982. Phytoplankton community ecology: the role of limiting nutrients. *Annual Review of Ecology and Systematics*: 349-372.
- Tittel J, Bissinger V, Zippel B, Gaedke U, Bell E, Lorke A, Kamjunke N. 2003. Mixotrophs combine resource use to outcompete specialists: implications for aquatic food webs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 12776-12781.
- Tranvik LJ. 1992. Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop. *Dissolved organic matter in lacustrine ecosystems*: Springer, p107-114.
- Troost TA, Kooi BW, Kooijman SA. 2005. Ecological specialization of mixotrophic plankton in a mixed water column. *The American Naturalist* 166: E45-E61.
- Uiterwaal SF, Lagerstrom IT, Lyon SR, DeLong JP. 2018. Data paper: FoRAGE (Functional Responses from Around the Globe in all Ecosystems) database: a compilation of functional responses for consumers and parasitoids. *bioRxiv*: 503334.
- Unrein F, Gasol JM, Not F, Forn I, Massana R. 2014. Mixotrophic haptophytes are key bacterial grazers in oligotrophic coastal waters. *The ISME journal* 8: 164.
- Unrein F, Massana R, Alonso-Sáez L, Gasol JM. 2007. Significant year-round effect of small mixotrophic flagellates on bacterioplankton in an oligotrophic coastal system. *Limnology and Oceanography* 52: 456-469.
- Vanni MJ. 2002. Nutrient cycling by animals in freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 341-370.
- Villafañe VE, Buma AG, Boelen P, Helbling EW. 2004. Solar UVR-induced DNA damage and inhibition of photosynthesis in phytoplankton from Andean lakes of Argentina. *Archiv fur Hydrobiologie* 161: 245-266.
- Villar-Argaiz M, Balseiro E, Modenutti B, Souza M, Bullejos F, Medina-Sánchez J, Carrillo P. 2017. Resource versus consumer regulation of phytoplankton: testing the role of UVR in a Southern and Northern hemisphere lake. *Hydrobiologia*: 1-14.
- Vrede T, Vrede K. 2005. Contrasting 'top-down' effects of crustacean zooplankton grazing on bacteria and phytoflagellates. *Aquatic Ecology* 39: 283-293.
- Waibel A, Peter H, Sommaruga R. 2019. Importance of mixotrophic flagellates during the ice-free season in lakes located along an elevational gradient. *Aquatic Sciences* 81: 45.
- Weisse T. 2017. Functional diversity of aquatic ciliates. *European Journal of Protistology* 61: 331-358.
- Weisse T, Anderson R, Arndt H, Calbet A, Hansen PJ, Montagnes DJ. 2016. Functional ecology of aquatic phagotrophic protists—Concepts, limitations, and perspectives. *European Journal of Protistology* 55: 50-74.
- Wilken S, Huisman J, Naus-Wiezer S, Van Donk E. 2013. Mixotrophic organisms become more heterotrophic with rising temperature. *Ecology Letters* 16: 225-233.
- Winkler RH, Corliss JO. 1965. Notes on the rarely described, green colonial protozoon *Ophrydium versatile* (OFM) (Ciliophora, Peritrichida). *Transactions of the American Microscopical Society* 84: 127-137.



- Worni R, Stoffel M, Huggel C, Volz C, Casteller A, Luckman B. 2012. Analysis and dynamic modeling of a moraine failure and glacier lake outburst flood at Ventisquero Negro, Patagonian Andes (Argentina). *Journal of Hydrology* 444: 134-145.
- Yvon-Durocher G, Schaum C-E, Trimmer M. 2017. The temperature dependence of phytoplankton stoichiometry: investigating the roles of species sorting and local adaptation. *Frontiers in Microbiology* 8: 2003.
- Zemp M, Frey H, Gärtner-Roer I, Nussbaumer SU, Hoelzle M, Paul F, Haeberli W, Denzinger F, Ahlstrøm AP, Anderson B. 2015. Historically unprecedented global glacier decline in the early 21st century. *Journal of Glaciology* 61: 745-762.
- Zhang W, Arhonditsis GB. 2009. A Bayesian hierarchical framework for calibrating aquatic biogeochemical models. *Ecological Modelling* 220: 2142-2161.
- Zöllner E, Santer B, Boersma M, Hoppe HG, Jürgens K. 2003. Cascading predation effects of *Daphnia* and copepods on microbial food web components. *Freshwater Biology* 48: 2174-2193.
- Zubkov MV, Tarran GA. 2008. High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature* 455: 224.



Apéndice 1

Códigos en lenguaje de R del modelo del Capítulo 2

```
# Fototrofía de mixótrofo constitutivo (modelo “CM-Phot”)
m_fF <- brm(formula = bf(PP_FI ~ C*(1-exp(-a*I/C))*exp(-b*I/C), C~1, a~1, b~1, nl = T),
  data = fF_data, family = gaussian(link = 'identity'),
  prior = c(set_prior("normal(.600, .300)", nlpar = 'C', lb = 0),
    set_prior("normal(.060, .030)", nlpar = "a", lb = 0),
    set_prior("normal(.006, .003)", nlpar = "b", lb = 0)), #ejemplo set 1 de previas
  chains = 3, iter = 9000, warmup = 4500, cores = 3, seed = 333,
  control = list(adapt_delta = .99, max_treedepth = 15),
  sample_prior = TRUE, file = "m_fF")

# Fagotrofía de mixótrofo constitutivo (modelo “CM-Phag”)
m_bF <- brm(formula = bf(B_FI ~ C*(1-exp(-(a*I+D)/C))*exp(-b*I/C), C~1, a~1, b~1, D~1, nl=T),
  data = bF_data, family = gaussian(link = 'identity'),
  prior = c(set_prior("normal(.600, .300)", nlpar = "C", lb = 0),
    set_prior("normal(.060, .030)", nlpar = "a", lb = 0),
    set_prior("normal(.006, .003)", nlpar = "b", lb = 0),
    set_prior("normal(.600, .300)", nlpar = "D", lb = 0)), #ejemplo set 1 de previas
  chains = 3, iter = 9000, warmup = 4500, cores = 3, seed = 777,
  control = list(adapt_delta = .9, max_treedepth = 15),
  sample_prior = TRUE, file = "m_bF")

# Fototrofía de mixótrofo no constitutivo (modelo “NCM-Phot”)
m_fC <- brm(formula = bf(PP_Op ~ C*(1-exp(-a*I/C))*exp(-b*I/C), C~1, a~1, b~1, nl = T),
  data = fC_data, family = gaussian(link = 'identity'),
  prior = c(set_prior("normal(200, 100)", nlpar = "C", lb = 0),
    set_prior("normal(20, 10)", nlpar = "a", lb = 0),
    set_prior("normal(0.2, 1.0)", nlpar = "b", lb = 0)), #ejemplo set 1 de previas
  chains = 3, iter = 9000, warmup = 4500, cores = 3, seed = 333,
  control = list(adapt_delta = .99, max_treedepth = 15),
  sample_prior = TRUE, file = "m_fC")

# Fagotrofía de mixótrofo no constitutivo (modelo “NCM-Phag”)
m_bC <- brm(formula = bf(B_Op ~ C*(1-exp(-(a*I+D)/C))*exp(-b*I/C), C~1, a~1, b~1, D~1, nl=T),
  data = bC_data, family = gaussian(link = 'identity'),
  prior = c(set_prior("normal(25, 25.0)", nlpar = "C", lb = 0),
    set_prior("normal(.250, 1.0)", nlpar = "a", lb = 0),
    set_prior("normal(.025, 0.1)", nlpar = "b", lb = 0),
    set_prior("normal(25, 25.0)", nlpar = "D", lb = 0)), #ejemplo set 1 de previas
  chains = 3, iter = 9000, warmup = 4500, cores = 3, seed = 777,
  control = list(adapt_delta = .9, max_treedepth = 15),
  sample_prior = TRUE, file = "m_bC")
```


*Códigos en lenguaje de R del modelo del Capítulo 3*

```
# Modelo Luz-Arcillas
```

```
datos <- read_excel("light_bacterivory.xlsx")
I <- datos$Light
A <- datos$Clay
t <- datos$Time
N <- datos$Clearance
d_brms <- data.frame(I, A, t, N)

mod <- brm(formula = bf(N ~ C*(1-exp(-(d-a*I)/C))*exp(-b*I/C)*t/(k+m*A+t),
  C ~ 1, a ~ 1, b ~ 1, d ~ 1, m ~ 1, nl = TRUE),
  data = d_brms, family = gaussian(link = 'identity'),
  prior = c(set_prior("normal(8, 4)", nlpar = 'C', lb = 0),
    set_prior("normal(0, .1)", nlpar = "a", lb = 0),
    set_prior("normal(0, .1)", nlpar = "b", lb = 0),
    set_prior("normal(0, 5)", nlpar = 'd', lb = 0),
    set_prior("normal(5, 1)", nlpar = "k", lb = 0),
    set_prior("normal(0, 2)", nlpar = "m")),
  chains = 3, iter = 9000, warmup = 4500, cores = 3, seed = 333,
  control = list(adapt_delta = .99, max_tredepth = 15))
```

```
# Predicción
```

```
M <- mesh(seq(0, 1500, 30), seq(0, 36, 2))
x <- as.data.frame(M$x) %>% gather(factor_key = TRUE) #luz
y <- as.data.frame(M$y) %>% gather(factor_key = TRUE) #arcillas
z <- data.frame(predict(mod, newdata = data.frame(I = x$value, A = y$value, t = 80)))
```

Códigos en lenguaje de R del modelo del Capítulo 4

```
cat(file = "model.bug", "
  model{
    #likelihood
    for (i in 1:obs) {
      DP_48[i] ~ dnorm(dp_48[i], DP_48t)T(0.) #Dissolved P concentration at 48 h
      dp_48[i] <- DP_24[i]
        + X1_24[i] * (m_X1 * QX1_24[i] - VX1_48[i])
        + X2_24[i] * (m_X2 * QX2_24[i] - VX2_48[i])
        + X5_24[i] * (m_X5 * QX5_24[i] - VX5_48[i])
        + X4_24[i] * (m_X4 * QX4_24[i] - VX4_48[i])
        + X3_24[i] * (m_X3 * QX3_24[i] - VX3_48[i])
        + Co_out[i] * RCo_48[i] + Cl_out[i] * RCl_48[i]
```



DP_24[i] ~ dnorm(dp_24[i], DP_24t)T(0,) #Dissolved P concentration at 24 h
dp_24[i] <- DP_0

+ X1_0 * (m_X1 * QX1_00[i] - VX1_24[i])
+ X2_0 * (m_X2 * QX2_00[i] - VX2_24[i])
+ X5_0 * (m_X5 * QX5_00[i] - VX5_24[i])
+ X4_0 * (m_X4 * QX4_00[i] - VX4_24[i])
+ X3_0 * (m_X3 * QX3_00[i] - VX3_24[i])
+ Co_out[i] * RCo_24[i] + Cl_out[i] * RCl_24[i]

X1_48[i] ~ dnorm(x1_48[i], X1_48t)T(0,) #Heterotrophic bacteria at 48 h

x1_48[i] <- X1_24[i]
+ X1_24[i] * (uX1_48[i] - m_X1) - BX1_X3_48[i] * X3_24[i] - GX1_Cl_48[i] *
Cl_inn[i]

X1_24[i] ~ dnorm(x1_24[i], X1_24t)T(0,) #Heterotrophic bacteria at 24 h

x1_24[i] <- X1_0
+ X1_0 * (uX1_24[i] - m_X1) - BX1_X3_24[i] * X3_0 - GX1_Cl_24[i] * Cl_inn[i]

X2_48[i] ~ dnorm(x2_48[i], X2_48t)T(0,) #Pico-cyanobacteria (single cells) at 48 h

x2_48[i] <- X2_24[i]
+ X2_24[i] * (uX2_48[i] - m_X2) - BX2_X3_48[i] * X3_24[i] - GX2_Cl_48[i] *
Cl_inn[i] - c_X5_X3 * BX2_X3_48[i] * X3_24[i] - c_X5_Cl * GX2_Cl_48[i] * Cl_inn[i]

X2_24[i] ~ dnorm(x2_24[i], X2_24t)T(0,) #Pico-cyanobacteria at (single cells) 24 h

x2_24[i] <- X2_0
+ X2_0 * (uX2_24[i] - m_X2) - BX2_X3_24[i] * X3_0 - GX2_Cl_24[i] * Cl_inn[i]
- c_X5_X3 * BX2_X3_24[i] * X3_0 - c_X5_Cl * GX2_Cl_24[i] * Cl_inn[i]

X5_48[i] ~ dnorm(x5_48[i], X5_48t)T(0,) #Pico-cyanobacteria at (colonies) 48 h

x5_48[i] <- X5_24[i]
+ X5_24[i] * (uX5_48[i] - m_X5) - GX5_Co_48[i] * Co_inn[i]
+ c_X5_X3 * BX2_X3_48[i] * X3_24[i] + c_X5_Cl * GX2_Cl_48[i] * Cl_inn[i]

X5_24[i] ~ dnorm(x5_24[i], X5_24t)T(0,) #Pico-cyanobacteria at (colonies) 24 h

x5_24[i] <- X5_0 + X5_0 * (uX5_24[i] - m_X5) - GX5_Co_24[i] * Co_inn[i]
+ c_X5_X3 * BX2_X3_24[i] * X3_0 + c_X5_Cl * GX2_Cl_24[i] * Cl_inn[i]

X4_48[i] ~ dnorm(x4_48[i], X4_48t)T(0,) #Micro-algae at 48 h

x4_48[i] <- X4_24[i]
+ X4_24[i] * (uX4_48[i] - m_X4) - GX4_Co_48[i] * Co_inn[i] - GX4_Cl_48[i] *
Cl_inn[i]

X4_24[i] ~ dnorm(x4_24[i], X4_24t)T(0,) #Micro-algae at 24 h

x4_24[i] <- X4_0
+ X4_0 * (uX4_24[i] - m_X4) - GX4_Co_24[i] * Co_inn[i] - GX4_Cl_24[i] * Cl_inn[i]



```
X3_48[i] ~ dnorm(x3_48[i], X3_48t)T(0,) #Nanoflagellates at 48 h
x3_48[i] <- X3_24[i]
+ X3_24[i] * (uX3_48[i] - m_X3) - GX3_Co_48[i] * Co_inn[i] - GX3_Cl_48[i] *
Cl_inn[i]
```

```
X3_24[i] ~ dnorm(x3_24[i], X3_24t)T(0,) #Nanoflagellates at 24 h
x3_24[i] <- X3_0 + X3_0 * (uX3_24[i] - m_X3) - GX3_Co_24[i] * Co_inn[i] - GX3_Cl_24[i]
* Cl_inn[i]
```

#B. gibbosa P recycling rate at 48 h

```
RCo_48[i] <- r_Co * (GX3_Co_48[i] * QX3_24[i]
+ GX4_Co_48[i] * QX4_24[i] + GX5_Co_48[i] * QX5_24[i]) * CP_Co
```

#D. chilense P recycling rate at 48 h

```
RCl_48[i] <- r_Cl * (GX1_Cl_48[i] * QX1_24[i] + GX2_Cl_48[i] * QX2_24[i]
+ GX3_Cl_48[i] * QX3_24[i] + GX4_Cl_48[i] * QX4_24[i]) * CP_Cl
```

#B. gibbosa P recycling rate at 24 h

```
RCo_24[i] <- r_Co * (GX3_Co_24[i] * QX3_00[i]
+ GX4_Co_24[i] * QX4_00[i] + GX5_Co_24[i] * QX5_00[i]) * CP_Co
```

#D. chilense P recycling rate at 24 h

```
RCl_24[i] <- r_Cl * (GX1_Cl_24[i] * QX1_00[i] + GX2_Cl_24[i] * QX2_00[i]
+ GX4_Cl_24[i] * QX4_00[i] + GX3_Cl_24[i] * QX3_00[i]) * CP_Cl
```

#B. gibbosa grazing rates on CPCy, Micro-algae and nanoflagellates at 48 h

```
GX5_Co_48[i] <- a_X5_Co * X5_24[i] / (1 + a_X5_Co * h_X5_Co * X5_24[i])
```

```
GX4_Co_48[i] <- a_X4_Co * X4_24[i] / (1 + a_X4_Co * h_X4_Co * X4_24[i])
```

```
GX3_Co_48[i] <- a_X3_Co * X3_24[i] / (1 + a_X3_Co * h_X3_Co * X3_24[i])
```

#D. chilense grazing rates on Picoplankton, nanoflagellates and micro-algae at 48 h

```
GX1_Cl_48[i] <- a_PI_Cl * X1_24[i] / (1 + a_PI_Cl * h_PI_Cl * X1_24[i])
```

```
GX2_Cl_48[i] <- a_PI_Cl * X2_24[i] / (1 + a_PI_Cl * h_PI_Cl * X2_24[i])
```

```
GX4_Cl_48[i] <- a_X4_Cl * X4_24[i] / (1 + a_X4_Cl * h_X4_Cl * X4_24[i])
```

```
GX3_Cl_48[i] <- a_X3_Cl * X3_24[i] / (1 + a_X3_Cl * h_X3_Cl * X3_24[i])
```

#Nanoflagellate bacterivory at 48 h

```
BX1_X3_48[i] <- b_X1_X3 * X1_24[i] / (1 + b_X1_X3 * h_X1_X3 * X1_24[i])
```

```
BX2_X3_48[i] <- b_X2_X3 * X2_24[i] / (1 + b_X2_X3 * h_X2_X3 * X2_24[i])
```

#B. gibbosa grazing rates on CPCy, Micro-algae and nanoflagellates at 24 h

```
GX5_Co_24[i] <- a_X5_Co * X5_0 / (1 + a_X5_Co * h_X5_Co * X5_0)
```

```
GX4_Co_24[i] <- a_X4_Co * X4_0 / (1 + a_X4_Co * h_X4_Co * X4_0)
```

```
GX3_Co_24[i] <- a_X3_Co * X3_0 / (1 + a_X3_Co * h_X3_Co * X3_0)
```



#D. chilense grazing rates on Picoplankton, nanoflagellates and micro-algae at 24 h

$$GX1_Cl_24[i] <- a_PI_Cl * X1_0 / (1 + a_PI_Cl * h_PI_Cl * X1_0)$$

$$GX2_Cl_24[i] <- a_PI_Cl * X2_0 / (1 + a_PI_Cl * h_PI_Cl * X2_0)$$

$$GX4_Cl_24[i] <- a_X4_Cl * X4_0 / (1 + a_X4_Cl * h_X4_Cl * X4_0)$$

$$GX3_Cl_24[i] <- a_X3_Cl * X3_0 / (1 + a_X3_Cl * h_X3_Cl * X3_0)$$

#Nanoflagellate bacterivory at 24 h

$$BX1_X3_24[i] <- b_X1_X3 * X1_0 / (1 + b_X1_X3 * h_X1_X3 * X1_0)$$

$$BX2_X3_24[i] <- b_X2_X3 * X2_0 / (1 + b_X2_X3 * h_X2_X3 * X2_0)$$

#Nanoflagellate bacterivory at 72 h (prediction)

$$BX1_X3_72[i] <- b_X1_X3 * X1_48[i] / (1 + b_X1_X3 * h_X1_X3 * X1_48[i])$$

$$BX2_X3_72[i] <- b_X2_X3 * X2_48[i] / (1 + b_X2_X3 * h_X2_X3 * X2_48[i])$$

#Growth of prey compartments at 72 h (prediction)

$$uX1_72[i] <- umax_X1 * (1 - Qmin_X1 / QX1_48[i])$$

$$uX2_72[i] <- umax_X2 * (1 - Qmin_X2 / QX2_48[i])$$

$$uX5_72[i] <- umax_X5 * (1 - Qmin_X5 / QX5_48[i])$$

$$uX4_72[i] <- umax_X4 * (1 - Qmin_X4 / QX4_48[i])$$

$$uX3_72[i] <- umax_X3 * (1 - Qmin_X3 / QX3_48[i])$$

#Growth of prey compartments at 48 h

$$uX1_48[i] <- umax_X1 * (1 - Qmin_X1 / QX1_24[i])$$

$$uX2_48[i] <- umax_X2 * (1 - Qmin_X2 / QX2_24[i])$$

$$uX5_48[i] <- umax_X5 * (1 - Qmin_X5 / QX5_24[i])$$

$$uX4_48[i] <- umax_X4 * (1 - Qmin_X4 / QX4_24[i])$$

$$uX3_48[i] <- umax_X3 * (1 - Qmin_X3 / QX3_24[i])$$

#Growth of prey compartments at 24 h

$$uX1_24[i] <- umax_X1 * (1 - Qmin_X1 / QX1_00[i])$$

$$uX2_24[i] <- umax_X2 * (1 - Qmin_X2 / QX2_00[i])$$

$$uX5_24[i] <- umax_X5 * (1 - Qmin_X5 / QX5_00[i])$$

$$uX4_24[i] <- umax_X4 * (1 - Qmin_X4 / QX4_00[i])$$

$$uX3_24[i] <- umax_X3 * (1 - Qmin_X3 / QX3_00[i])$$

#P uptake of prey compartments at 72 h (prediction)

$$VX1_72[i] <- vmax_X1 * DP_48[i] / (half_X1 + DP_48[i])$$

$$VX2_72[i] <- vmax_X2 * DP_48[i] / (half_X2 + DP_48[i])$$

$$VX5_72[i] <- vmax_X5 * DP_48[i] / (half_X5 + DP_48[i])$$

$$VX4_72[i] <- vmax_X4 * DP_48[i] / (half_X4 + DP_48[i])$$

$$VX3_72[i] <- vmax_X3 * DP_48[i] / (half_X3 + DP_48[i]) + BX3_72[i]$$

#P uptake of nanoflagellates through bacterivory at 72 h (prediction)

$$BX3_72[i] <- bmax_X1 * BX1_X3_72[i] * QX1_48[i] / (k_X1_X3 + BX1_X3_72[i] * QX1_48[i])$$

$$+ bmax_X2 * BX2_X3_72[i] * QX2_48[i] / (k_X2_X3 + BX2_X3_72[i] * QX2_48[i])$$



#P uptake of prey compartments at 48 h

```
VX1_48[i] <- vmax_X1 * DP_24[i] / (half_X1 + DP_24[i])
VX2_48[i] <- vmax_X2 * DP_24[i] / (half_X2 + DP_24[i])
VX5_48[i] <- vmax_X5 * DP_24[i] / (half_X5 + DP_24[i])
VX4_48[i] <- vmax_X4 * DP_24[i] / (half_X4 + DP_24[i])
VX3_48[i] <- vmax_X3 * DP_24[i] / (half_X3 + DP_24[i]) + BX3_48[i]
```

#P uptake of nanoflagellates through bacterivory at 48 h

```
BX3_48[i] <- bmax_X1 * BX1_X3_48[i] * QX1_24[i] / (k_X1_X3 + BX1_X3_48[i] *
QX1_24[i])
+ bmax_X2 * BX2_X3_48[i] * QX2_24[i] / (k_X2_X3 + BX2_X3_48[i] * QX2_24[i])
```

#P uptake of prey compartments at 24 h

```
VX1_24[i] <- vmax_X1 * DP_00[trt[i]] / (half_X1 + DP_00[trt[i]])
VX2_24[i] <- vmax_X2 * DP_00[trt[i]] / (half_X2 + DP_00[trt[i]])
VX5_24[i] <- vmax_X5 * DP_00[trt[i]] / (half_X5 + DP_00[trt[i]])
VX4_24[i] <- vmax_X4 * DP_00[trt[i]] / (half_X4 + DP_00[trt[i]])
VX3_24[i] <- vmax_X3 * DP_00[trt[i]] / (half_X3 + DP_00[trt[i]]) + BX3_24[i]
```

#P uptake of nanoflagellates through bacterivory at 24 h

```
BX3_24[i] <- bmax_X1 * BX1_X3_24[i] * QX1_00[i] / (k_X1_X3 + BX1_X3_24[i] *
QX1_00[i]) + bmax_X2 * BX2_X3_24[i] * QX2_00[i] / (k_X2_X3 + BX2_X3_24[i] *
QX2_00[i])
```

#Prey P Quota at 72 h (prediction)

```
QX1_72[i] <- QX1_48[i] + VX1_72[i] - uX1_72[i] * QX1_48[i]
QX2_72[i] <- QX2_48[i] + VX2_72[i] - uX2_72[i] * QX2_48[i]
QX5_72[i] <- QX5_48[i] + VX5_72[i] - uX5_72[i] * QX5_48[i]
QX4_72[i] <- QX4_48[i] + VX4_72[i] - uX4_72[i] * QX4_48[i]
QX3_72[i] <- QX3_48[i] + VX3_72[i] - uX3_72[i] * QX3_48[i]
```

#Prey P Quota at 48 h

```
QX1_48[i] <- QX1_24[i] + VX1_48[i] - uX1_48[i] * QX1_24[i]
QX2_48[i] <- QX2_24[i] + VX2_48[i] - uX2_48[i] * QX2_24[i]
QX5_48[i] <- QX5_24[i] + VX5_48[i] - uX5_48[i] * QX5_24[i]
QX4_48[i] <- QX4_24[i] + VX4_48[i] - uX4_48[i] * QX4_24[i]
QX3_48[i] <- QX3_24[i] + VX3_48[i] - uX3_48[i] * QX3_24[i]
```

#Prey P Quota at 24 h

```
QX1_24[i] <- QX1_00[i] + VX1_24[i] - uX1_24[i] * QX1_00[i]
QX2_24[i] <- QX2_00[i] + VX2_24[i] - uX2_24[i] * QX2_00[i]
QX5_24[i] <- QX5_00[i] + VX5_24[i] - uX5_24[i] * QX5_00[i]
QX4_24[i] <- QX4_00[i] + VX4_24[i] - uX4_24[i] * QX4_00[i]
QX3_24[i] <- QX3_00[i] + VX3_24[i] - uX3_24[i] * QX3_00[i]
```



```
#Prey P Quota at the beggining of the experiment
QX1_00[i] <- QX1_0 + VX1_24[i] - umax_X1 * (QX1_0 - Qmin_X1)
QX2_00[i] <- QX2_0 + VX2_24[i] - umax_X2 * (QX2_0 - Qmin_X2)
QX5_00[i] <- QX5_0 + VX5_24[i] - umax_X5 * (QX5_0 - Qmin_X5)
QX4_00[i] <- QX4_0 + VX4_24[i] - umax_X4 * (QX4_0 - Qmin_X4)
QX3_00[i] <- QX3_0 + VX3_24[i] - umax_X3 * (QX3_0 - Qmin_X3)

PP_48[i] ~ dnorm(pp_48[i], PP_48t) #Particulate phosphorus concentration at 48 h
pp_48[i] <- QX1_48[i] * X1_48[i] + QX2_48[i] * X2_48[i] + QX5_48[i] * X5_48[i]
  + QX4_48[i] * X4_48[i] + QX3_48[i] * X3_48[i]

PP_24[i] ~ dnorm(pp_24[i], PP_24t) #Particulate phosphorus concentration at 24 h
pp_24[i] <- QX1_24[i] * X1_24[i] + QX2_24[i] * X2_24[i] + QX5_24[i] * X5_24[i]
  + QX4_24[i] * X4_24[i] + QX3_24[i] * X3_24[i]
}

#Priors
#Initial conditions of the prey and P compartments
X1_0 ~ dnorm(0.292, 500)T(0,)
X2_0 ~ dnorm(0.114, 5000)T(0,)
X5_0 ~ dnorm(1e-04, 500000)T(0,)
X4_0 ~ dnorm(0.009, 50000)T(0,)
X3_0 ~ dnorm(0.028, 50000)T(0,)
DP_0 ~ dnorm(0.118, 1000)T(0,)

PP_0 ~ dnorm(pp_0, 10000)
pp_0 <- QX1_0 * X1_0 + QX2_0 * X2_0 + QX5_0 * X5_0 + QX4_0 * X4_0 + QX3_0 * X3_0

DP_00[1] ~ dunif(0.096, 0.118)
DP_00[2] ~ dunif(0.092, 0.118)
DP_00[3] ~ dunif(0.073, 0.118)
DP_00[4] ~ dunif(0.098, 0.118)
DP_00[5] ~ dunif(0.078, 0.118)

QX1_0 ~ dnorm(0, 5000)T(0,)
QX2_0 ~ dnorm(0, 5000)T(0,)
QX5_0 ~ dnorm(0, 100)T(0,)
QX4_0 ~ dnorm(0, 100)T(0,)
QX3_0 ~ dnorm(0, 1000)T(0,)

#Growth and primary nutrient traits from Edwards et al (2012) L&O

umax_X1 ~ dnorm(1.15, 50)T(0,)
umax_X2 ~ dnorm(0.92, 50)T(0,)
umax_X5 ~ dnorm(0.03, 1000)T(0,)
umax_X4 ~ dnorm(0.13, 200)T(0,)
```



```
umax_X3 ~ dnorm(0.24, 100)T(0,)  
  
Qmin_X1 ~ dnorm(0.015, 50000)T(0,)  
Qmin_X2 ~ dnorm(0.019, 50000)T(0,)  
Qmin_X5 ~ dnorm(0.855, 500)T(0,)  
Qmin_X4 ~ dnorm(0.696, 500)T(0,)  
Qmin_X3 ~ dnorm(0.112, 1000)T(0,)  
  
vmax_X1 ~ dnorm(0.023, 1000)T(0,)  
vmax_X2 ~ dnorm(0.037, 1000)T(0,)  
vmax_X5 ~ dnorm(0.043, 1000)T(0,)  
vmax_X4 ~ dnorm(1.095, 50)T(0,)  
vmax_X3 ~ dnorm(0.080, 100)T(0,)  
  
half_X1 ~ dnorm(0.12, 500)T(0,)  
half_X2 ~ dnorm(0.13, 500)T(0,)  
half_X5 ~ dnorm(0.85, 100)T(0,)  
half_X4 ~ dnorm(0.65, 100)T(0,)  
half_X3 ~ dnorm(0.55, 100)T(0,)  
  
#Bacterivory rates of Nanoglagellates  
  
b_X1_X3 ~ dnorm(0.73, 50)T(0,)  
b_X2_X3 ~ dnorm(0.73, 50)T(0,)  
h_X1_X3 ~ dnorm(0.06, 1000)T(0,)  
h_X2_X3 ~ dnorm(0.06, 1000)T(0,)  
  
#Another bacterivory parameters  
  
bmax_X1 ~ dnorm(0.5, 100)T(0,)  
k_X1_X3 ~ dnorm(0, 1000)T(0,)  
bmax_X2 ~ dnorm(0.5, 100)T(0,)  
k_X2_X3 ~ dnorm(0, 1000)T(0,)  
  
#Picy aggregation rates due to nanoflagellate and D. chilense grazing  
  
c_X5_X3 ~ dunif(0, 1)  
c_X5_C1 ~ dunif(0, 1)  
  
#Strict prior for death rate according to Branco et al (2020) Am Nat.  
  
m_X1 <- 0.1  
m_X2 <- 0.1  
m_X5 <- 0.1  
m_X4 <- 0.1  
m_X3 <- 0.1
```



#Handling time for Copepods and Cladocerans from FoRAGE database (2018)

h_X5_Co ~ dnorm(0.00743, 10000000)T(0,)
h_X4_Co ~ dnorm(0.000743, 100000000)T(0,)
h_X3_Co ~ dnorm(0.00000452, 1000000000)T(0,)

h_PI_Cl ~ dnorm(0.000000358, 10000000000)T(0,)
h_X4_Cl ~ dnorm(0.0000113, 100000000)T(0,)
h_X3_Cl ~ dnorm(0.00000198, 1000000000)T(0,)

#C:P ratios for *B. gibbosa* and *D. chilense*

CP_Co ~ dnorm(237, 0.05)T(0,)
CP_Cl ~ dnorm(74, 0.1)T(0,)

#Non-informative priors for attack rate of *B. gibbosa* and *D. chilense*

a_X5_Co ~ dnorm(0, 2000)T(0,)
a_X4_Co ~ dnorm(0, 2)T(0,)
a_X3_Co ~ dnorm(0, 2)T(0,)

a_PI_Cl ~ dnorm(0, 2)T(0,)
a_X4_Cl ~ dnorm(0, 2)T(0,)
a_X3_Cl ~ dnorm(0, 2)T(0,)

#Non-informative priors for P release conversion factor of *B. gibbosa* and *D. chilense*

r_Co ~ dnorm(0.01, 50000)T(0,)
r_Cl ~ dnorm(0.01, 50000)T(0,)

#Priors for variance in data

X1_48t <- 1 / (s_X1 * s_X1)
s_X1 ~ dnorm(0.237, 500)T(0,)

X2_48t <- 1 / (s_X2 * s_X2)
s_X2 ~ dnorm(0.075, 1000)T(0,)

X5_48t <- 1 / (s_X5 * s_X5)
s_X5 ~ dnorm(0.035, 5000)T(0,)

X4_48t <- 1 / (s_X4 * s_X4)
s_X4 ~ dnorm(0.006, 10000)T(0,)

X3_48t <- 1 / (s_X3 * s_X3)



```
s_X3 ~ dnorm(0.016, 5000)T(0,)

DP_48t <- 1 / (s_DP * s_DP)
s_DP ~ dnorm(0.023, 5000)T(0,)

PP_48t <- 1 / (s_PP * s_PP)
s_PP ~ dnorm(0.037, 5000)T(0,)

X1_24t <- 1 / (ss_X1 * ss_X1)
ss_X1 ~ dnorm(0.237, 200)T(0,)

X2_24t <- 1 / (ss_X2 * ss_X2)
ss_X2 ~ dnorm(0.075, 1000)T(0,)

X5_24t <- 1 / (ss_X5 * ss_X5)
ss_X5 ~ dnorm(0.035, 5000)T(0,)

X4_24t <- 1 / (ss_X4 * ss_X4)
ss_X4 ~ dnorm(0.006, 10000)T(0,)

X3_24t <- 1 / (ss_X3 * ss_X3)
ss_X3 ~ dnorm(0.016, 5000)T(0,)

DP_24t <- 1 / (ss_DP * ss_DP)
ss_DP ~ dnorm(0.023, 5000)T(0,)

PP_24t <- 1 / (ss_PP * ss_PP)
ss_PP ~ dnorm(0.037, 5000)T(0,)

#Derived quantities: differences in prey P quota between experiment

QX1_rg1 <- QX1_48[Contro1] - QX1_48[Co_2016]
QX1_rg2 <- QX1_48[Contro2] - QX1_48[Co_2016]

QX3_co1 <- QX3_48[Contro1] - QX3_48[Co_2016]
QX3_co2 <- QX3_48[Contro2] - QX3_48[Co_2016]

QX3_cl1 <- QX3_48[Contro1] - QX3_48[Cl_2016]
QX3_cl2 <- QX3_48[Contro2] - QX3_48[Cl_2016]

QX4_co1 <- QX4_48[Contro1] - QX4_48[Co_2020]
QX4_co2 <- QX4_48[Contro2] - QX4_48[Co_2020]

QX5_co1 <- QX5_48[Contro1] - QX5_48[Co_2020]
QX5_co2 <- QX5_48[Contro2] - QX5_48[Co_2020]
})"
```



Apéndice 2

Lista de trabajos publicados como parte de la presente Tesis

Schenone L., Balseiro E., Bastidas Navarro M. y Modenutti, B. 2020. Modelling the consequence of glacier retreat on mixotrophic nanoflagellate bacterivory: a Bayesian approach. *Oikos*, 129(8), 1216-1228.

Schenone L., Modenutti B., Martyniuk N., Bastidas Navarro M., Laspoumaderes C. y Balseiro E. 2021. Modelling key variables for understanding the effects of grazing and nutrient recycling by zooplankton on the freshwater microbial loop. *Freshwater Biology*, 66(12), 2322-2337.

Research

Modelling the consequence of glacier retreat on mixotrophic nanoflagellate bacterivory: a Bayesian approach

Luca Schenone, Esteban G. Balseiro, Marcela Bastidas Navarro and Beatriz E. Modenutti

L. Schenone (<http://orcid.org/0000-0003-3025-7133>) ✉ (lucaschenone@comahue-conicet.gob.ar), E. G. Balseiro (<http://orcid.org/0000-0002-5052-0587>), M. Bastidas Navarro (<http://orcid.org/0000-0002-6558-0451>) and B. E. Modenutti (<http://orcid.org/0000-0002-8683-5679>), Laboratorio de Limnología, INIBIOMA (CONICET-UNCo), Quintral 1250, San Carlos de Bariloche (8400), Río Negro, Argentina.

Oikos

00: 1–13, 2020

doi: 10.1111/oik.07170

Subject Editor: Silke Langenheder

Editor-in-Chief: Dries Bonte

Accepted 18 April 2020

Mixotrophic nanoflagellate bacterivory is affected by light; however, in glacially influenced lakes, glacial clay may also interfere with prey uptake. Mechanistic models based on prior quantitative hypotheses and tested with field data are useful for predicting these predator–prey interactions under a changing climate. We modelled the effect of glacial particles on the bacterivory of mixotrophic nanoflagellates, the dominant phytoplankton in mountain lakes in the North Patagonian Andes. Our model equation is based on the classical Michaelis–Menten formulation and Platt's photosynthesis–irradiance curve to account for the interference by glacial particles and the effect of light intensity, respectively. Bayesian inference was applied to estimate model parameters using data from field bacterivory experiments. Light experiments (LE) were performed in lakes with different levels of light penetration without clay particles, while clay experiments (CE) were performed with an experimental gradient of glacial clay concentration at constant light intensity. The LE showed a non-monotonic effect of light intensity and the CE revealed an exponential negative effect of clay concentration. The obtained model was tested with two independent experiments carried out in a turbid proglacial lake. Our proposed mechanistic model successfully predicted the combined effect of light availability and particle interference on the mixotrophic nanoflagellate–bacteria relationship. The model demonstrated that the effect of light is dampened as clay concentration increases.

Keywords: glacier melting, light availability, Markov chain Monte Carlo, particle interference, predator–prey modelling

Introduction

The rapid retreat of glaciers around the world is a clear signal of global climate change (IPCC 2014). Low-elevation glaciers in mountain regions such as the Alps or the central and southern Andes are identified as vulnerable, and most are expected to disappear within the current century (Zemp et al. 2015). One of the major consequences of glacier melting is the input of minerogenic solids into mountain freshwater systems (Slemmons et al. 2013, Peter and Sommaruga 2017). These fine particles, termed 'glacial flour' or 'glacial clay', can remain suspended in the water column for long

periods, leading to a landscape of lakes with varied glacial influence, from turbid proglacial lakes to clear lakes that have lost their connection with glaciers (Sommaruga 2015). Thus, glacially fed lakes are very dynamic, and their transparency will change depending on climate, making them sensitive sentinels of climate change (Rose et al. 2014).

Light penetration is recognized as a key feature that shapes the elemental ratios and biotic interactions of the aquatic environment (Sternner et al. 1997). Therefore, turbidity induced by glacial particles will have strong consequences for planktonic organisms (Hylander et al. 2011, Laspoumaderes et al. 2013). Transparent lakes with high light:nutrient ratios are predicted to have high C:P ratios, and thus an increased phosphorus competition between their algae and bacteria (Gurung et al. 1999, Danger et al. 2007). However, mixotrophic algae have a combination of feeding strategies; while phagotrophy primarily provides nutrients and carbon for synthesis, photosynthesis provides carbon for both synthesis and respiration (Jones 2000, Berge et al. 2017, Hansson et al. 2019). Therefore, mixotrophs constitute a key link in the energy and matter transference between bacterial production and higher trophic levels (Mitra et al. 2014). In oligotrophic systems, the uptake of P by mixotrophic algae from bacterial prey may be a key pathway of the P cycle (Yvon-Durocher et al. 2017). Thus, the combination of phagotrophy and phototrophy in mixotrophic protists appears to be an advantage in nutrient-limited and transparent environments (Nygaard and Tobiesen 1993, Fischer et al. 2017). However, as light decreases and nutrients increase, an increase in osmotrophy over phagotrophy in mixotrophic algae was predicted by mechanistic models (Mitra et al. 2016, Berge et al. 2017) as well as experimental and field observations (Ptacnik et al. 2016, Fischer et al. 2017, Waibel et al. 2019).

Due to their combination of nutritional modes, mixotrophs will be affected by glacial clay in several different ways. Light will affect mixotrophs' phototrophic function directly (Jones 2000), as increased light attenuation induced by glacial particles will reduce light availability and hence phototrophy (Kirk 1994). In addition, in clear lakes, subsurface light levels may be too high and photosynthesis will be reduced due to an increase in photoinhibition (Callieri et al. 2007, Gerla et al. 2011). Thus, light will have a non-monotonic effect, where too low or too high of light levels will reduce carbon uptake. In addition, phagotrophy has been observed to be affected by light (Jones 2000). In the mixotrophic flagellates *Dinobryon* and *Uroglena*, ingestion rate is proportional to light intensity (Kimura and Ishida 1985, Jones and Rees 1994), while in *Mantoniella antarctica* and *Geminigera cryophila* ingestion rate increases under dark conditions (McKie-Krisberg et al. 2015). In addition to the light effect, suspended glacial particles may also affect nanoflagellate feeding. Studies on alpine lakes showed that glacial clay negatively affects the growth and survival of heterotrophic nanoflagellates through direct feeding interference (Sommaruga and Kandolf 2014). Based on these lines of evidence, we assumed that bacterivory in mixotrophs would be affected by glacial particles through both the indirect effect of light attenuation and the direct effect of feeding interference.

Planktonic food webs are highly dynamic, and there is a growing interest from ecologists in assessing these complex interactions through mechanistic models (Anderson 2005, Robson et al. 2018). In successful cases, the resultant equations are rather simple in biological terms, but are computationally complex in order to estimate relevant parameters from observational data and make assessments for predictive ecology (Dietze et al. 2018). Fortunately, novel approaches using Bayesian methods appear to be an alternative to the classical methods that rely on the likelihood function (Clark 2005, Arhonditsis et al. 2008, Zhang and Arhonditsis 2009). Recently, Lignell et al. (2013) proposed a model that describes and predicts trophic interactions in the marine planktonic community with a focus on the microbial fraction. Using nonlinear equations (such as the Michaelis–Menten hyperbola) and a Bayesian approach to combine experimental data with prior information, their contribution was a biologically realistic model of planktonic dynamics with posterior probability distributions for key parameters such as cell size and nutrient concentration. Following Lignell et al. (2013) and others (Norros et al. 2017, Leles et al. 2018), we propose a combination of mechanistic models and Bayesian parameter calibration to analyse the effects of light attenuation and feeding interference by glacial particles on mixotrophic flagellate bacterivory.

Mixotrophic nanoflagellates were found to dominate the nanoplanktonic communities of glacial lakes in the North Patagonian Andes (Callieri et al. 2007, Modenutti et al. 2013). Patagonian lakes are severely affected by glacial recession (Hylander et al. 2011, Laspoumaderes et al. 2013, Bastidas Navarro et al. 2018), displaying varied levels of turbidity due to glacial influence under a very low dissolved carbon concentration (Modenutti et al. 2013). Thus, this scenario represents an opportunity to study how bacterivory by mixotrophic nanoflagellates is affected by different concentrations of glacial particles. In this work, we analysed how bacterivory is affected by light attenuation and feeding interference due to glacial particles. We carried out a series of bacterial uptake field experiments on a natural pelagic microbial community in North Patagonian Andes lakes. In the first experimental series, we tested different light intensities; in the second series, we examined different clay concentrations at a constant light intensity. From these experiments, we developed and calibrated a model. Finally, we carried out similar bacterivory experiments in a turbid proglacial lake, where we expected that both light attenuation and feeding interference would act in combination. With these data we tested the predictive value of our model.

Methods

Study site

The field experiments were carried out in six lakes of Nahuel Huapi and Los Alerces National Parks, in the North Andean Patagonian region (Argentina), within the glacial lake district of the southern Andes (Iriondo 1989). The climate in the region

is cool (mean annual temperature 8.7°C) with a predominance of strong westerly winds and an average annual precipitation of 1500 mm (Paruelo et al. 1998). The area is characterized by a profuse hydrographic system including large and deep lakes (Z_{\max} ~ 150 m) as well as shallower lakes (Z_{\max} ~ 15 m). The six lakes included in the study were Lakes Moreno, Rivadavia, Verde, Cántaros, Mascardi Catedral (hereafter, Mascardi-C) and Frías (Table 1). These lakes were chosen due to their differences in light penetration and glacial clay influence. Lakes Moreno, Rivadavia, Mascardi-C, Verde and Cántaros are clear lakes with high penetration of photosynthetically active radiation (PAR) and ultraviolet radiation (UVR) (Corno et al. 2009) and without the influence of glacial clay. In contrast, Lake Frías is a proglacial turbid lake with high glacial clay content during summer (Ariztegui et al. 2007). Lakes Moreno, Rivadavia and Mascardi-C are warm-monomictic lakes with summer stratification during November to April and deep thermoclines located approximately at 20 m depth (Fig. 1). In these lakes we observed the development of a DCM (deep chlorophyll maxima) (Fig. 1). On the contrary, Lakes Verde and Cántaros are shallow lakes that do not stratify and show higher chlorophyll concentrations in the upper two meters (Fig. 1). Finally, the turbid Lake Frías exhibit a gradient in the vertical temperature profile with chlorophyll distribution towards the upper levels (Fig. 1).

Field experiments

We carried out a series of three bacterivory experiments. The first experiment, the light experiment (LE), was carried out in order to evaluate the effect of light intensity on bacterivory. We selected five transparent lakes (Mascardi-C, Moreno, Rivadavia, Cántaros and Verde) with different light conditions (Table 2) and without the presence of clay particles (total suspended solids ~ 0 mg l⁻¹). Experiments were carried out at different depths (Table 2) in order to achieve a light gradient and a higher concentration of nanoflagellates (i.e. DCM in the deep lakes Mascardi-C, Moreno and Rivadavia; and subsurface in the shallow lakes Cántaros and Verde) (Table 2, Fig. 1). In the second experiment, the clay experiment (CE), we aimed to test the effect of clay particles on bacterivory. We selected a clear sampling point in Lake

Table 1. Location and morphometric characteristics of the six studied Andean lakes (Argentina).

Lakes	Location	Altitude (m a.s.l.)	Area (km ²)	Z_{\max} (m)
Mascardi-C	41°07'31"S, 71°17'24"W	750	39.20	118
Moreno	41°05'00"S, 71°29'50"W	758	16.40	90
Rivadavia	42°36'39"S, 71°38'58"W	560	21.70	147
Verde	41°15'37"S, 71°17'53"W	1535	0.13	5
Cántaros	41°00'21"S, 71°49'30"W	874	0.25	12
Frías	41°03'40"S, 71°47'54"W	790	3.54	75

Mascardi-C at 20 m depth (5% of surface PAR, coinciding with the deep chlorophyll maxima) and tested a clay concentration gradient from 0 to 32 mg l⁻¹. Finally, we performed a combined bacterivory experiment (LCE) in the glacial turbid Lake Frías in order to consider both light and particles as factors affecting bacterivory. The LE and CE were carried out in summer (January and February), while the LCE was carried out in summer (February) and spring (November) in order to achieve different light and particle concentration conditions in lake Frías. Light measurements were carried out in all lakes using a submersible radiometer. Then, the diffuse attenuation coefficients (K_d) were estimated as regression coefficients from the light profiles obtained by the radiometer in the field.

Experimental units in all cases consisted of 150 ml polypropylene bags, of which there were three replicates per treatment. The bags were filled with lake water from the corresponding depth that had been filtered through a 100 µm mesh net in order to avoid zooplankton (i.e. rotifers, copepods and cladocerans). Fluorescence labelled bacteria (FLB) were then added to each container at a final concentration of 20% of total bacterial abundance for each lake and depth. At different times intervals according to the experiment (LE and LCE: 5, 10, 15, 20 and 40 min; CE: 15, 30 and 45 min), samples were fixed sequentially with 0.5% of Lugol solution, followed by 2% formaldehyde and drops of 3% sodium thiosulphate to clear the colour (Kemp et al. 1993).

In the CE experiment, the different treatments of clay concentration were: 0, 2, 4, 8, 16 and 32 mg clay l⁻¹. Because the experimental bags were of 5 cm diameter, the different clay concentrations did not alter the light availability inside the bags. We calculated, assuming an extinction coefficient inside the bag of 2 m⁻¹, that the mean irradiance of PAR reaching the inside of the bag was > 98%. Thus, this experiment tested the effect of the increase in clay concentration on bacterivory interference without the shading effect (light remained constant at 110 µmol photon m⁻² s⁻¹).

Fluorescence labelled bacteria (FLB) and glacial clay suspension preparation

The FLB were prepared following Šimek and Chrzanowski (1992). After prefiltration through a 2 µm pore size filter, we concentrated the bacterioplankton of each lake in a 0.22 µm pore size filter. Bacterial cells were detached from the filter surface by sonication, and were heat-killed and stained with 5-([4,6-ichlorotriazin-2-yl]amino)fluorescein (DTAF) according to Sherr et al. (1987). FLB were stored in 2 ml aliquots at -20°C. The obtained FLB were measured and counted under an epifluorescence microscope in order to verify shape, size and abundance. The obtained FLB were mostly coccoid shaped and 0.76 ± 0.21 µm in diameter, similar to the size of the natural bacterial communities in Andean lakes (Corno et al. 2009).

Glacial clay suspension was obtained from glacial clay collected from the glacier Ventisquero Negro (Mount Tronador) that was dried at 60°C for one week. We retained fine particles by sieving the glacial clay through a 250 µm mesh. These particles were then re-hydrated with milliQ water,

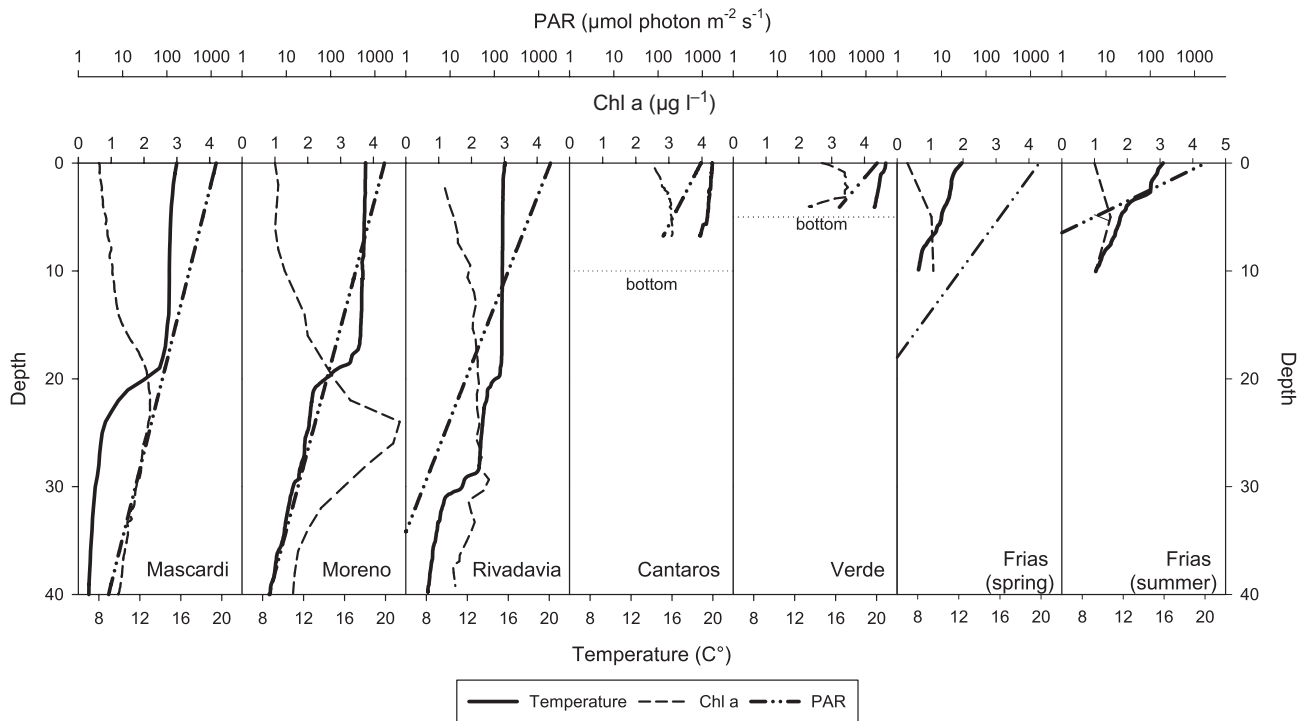


Figure 1. Vertical profiles of PAR (photosynthetically active radiation, $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$), temperature ($^{\circ}\text{C}$) and chlorophyll a ($\mu\text{g l}^{-1}$), in the different studied Andean lakes.

stirred with a vortex for 1 h, and then decanted overnight. Finally, we discarded the settled fraction. Final particle concentration was $\sim 500 \text{ mg clay l}^{-1}$. This concentration was determined by filtering 250 ml of the suspension through pre-weighted GF/F filters (Whatman). The filters were then dried at 60°C for 48 h and reweighed. Clay particle size and shape was assessed from $0.2 \mu\text{m}$ polycarbonate filters using an image analysis system (Image ProPlus). For this purpose, we filtered 1 ml of the suspension and we took at least 50 pictures of each sample. Particles were mainly coccoid shaped, with $0.82 \pm 0.61 \mu\text{m}$ diameter.

Laboratory determinations

Total suspended solids (TSS) were estimated by filtering 1 l of lake water through previously weighed GF/F filters that were

reweighed after drying at 60°C for 48 h. TSS were calculated using the difference in the weight of the GF/F filters before and after lake water filtration.

Natural abundance of nanoflagellates and bacterioplankton was estimated in all treatments. Samples of 60 ml were fixed with formaldehyde (final concentration 2% v/v) and stained with fluorochrome 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; final concentration 0.2% w/v). Counting was performed on black polycarbonate filters of $1 \mu\text{m}$ (for nanoflagellates) and $0.2 \mu\text{m}$ (for bacterioplankton) pore size at $1000\times$ magnification using an epifluorescence microscope with UV light (U-MWU) and blue light (U-MWB filter, excitation 450–480 nm, Emitter 515 Long Pass, Beam Splitter 500 nm) and green light (U-MWG filter, excitation: 510–550 nm, Emitter: 590 Long Pass Beam Splitter 570 nm) for the identification of mixotrophic nanoflagellates (MNF),

Table 2. Lake's light attenuation coefficient (K_d) and depth and light intensity (I) in each experimental situation of the field bacterivory experiments. References: LE: light experiments; CE: clay experiments and LCE: light and clay combined experiments.

Season	Lake	K_d (m^{-1})	Depth (m)	I ($\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Field experiment
Summer	Moreno	0.15	20	97.3	LE
	Rivadavia	0.22	20	19.6	LE
	Verde	0.48	0.2	1538.2	LE
	Cántaros	0.29	0.2	1249.8	LE
	Cántaros		6	219.8	LE
	Mascardi-C	0.14	20	109.7	LE and CE
	Frías	2.05	0.2	1008.3	LCE
Spring	Frías		6	0.015	LCE
	Frías	0.39	0	1080.4	LCE
	Frías		6	145.6	LCE

heterotrophic nanoflagellates (HNF), heterotrophic bacteria and picocyanobacteria.

Experimental samples were stained with DAPI and filtered through 1 μm black polycarbonate filters. The number of ingested FLB per MNF was assessed with an epifluorescence microscope by alternating between UV light and blue light. At least 100 mixotrophic flagellates were checked on each filter. Each experimental treatment was run in three replicates and at least three filters were prepared for each replicate. Simultaneously, the size and shape of the clay particles were observed from one filter of each treatment by an image analysis system (Image ProPlus).

Model description

From the ingested FLB data of our field experiments, we calculated the ingested bacteria dividing the ingested FLB by the proportion of FLB added (0.2 FLB per natural bacteria cell). Then, we estimated the cleared volume per flagellate (nl flagellate⁻¹) dividing the ingested bacteria by the natural bacterial concentration (cell nl⁻¹). Finally, we modelled flagellate bacterivory in terms of clearance rate (F , nl flagellate⁻¹ h⁻¹) as a function of incubation time (t) using the classical Michaelis–Menten (M–M) formula (Eq. 1).

$$F(t) = \frac{B_{\max} \times t}{k + t} \quad (1)$$

This hyperbolic function is widely chosen to model saturation response in predator–prey kinetics (Smout et al. 2010, Lignell et al. 2013). Particularly, we consider this curve to be more representative of bacterivory over time than the traditional ‘Uptake ratio’, which is calculated using only the linear part of the uptake curve (Bastidas Navarro et al. 2011, Sommaruga and Kandolf 2014). In contrast, M–M returns two parameters that have biological relevance: B_{\max} , which in this case represents the maximum cleared volume at equilibrium between particle ingestion and digestion, and the half maximum constant k , which describes the time when F reaches $B_{\max}/2$ and can be used as an indicator of handling time (Boenigk and Arndt 2002).

To assess the light intensity effect on flagellate clearance rate ($F_{(I,t)}$), we modelled B_{\max} with the formulation (Eq. 2) used by Platt et al. (1980). This formulation was proposed as a photosynthesis–irradiance curve that accounts for photoinhibition at high light levels (Bouman et al. 2018).

$$B_{\max(I>0)} = C \times \left(1 - e^{\left(\frac{-\alpha \times I}{C}\right)} \right) \times e^{\left(\frac{-\beta \times I}{C}\right)} \quad (2)$$

We chose this equation because of its non-monotonic trait, where parameter α corresponds to the cleared volume slope at low light intensities and β represents the cleared volume slope at higher light intensities. If both α and β are positive, Eq. 2 will show an increasing cleared volume at low light intensity

and a decreasing one with high light intensity. Moreover, under those parameter conditions, this function has the potential to return a range of light intensity where cleared volume is maximum, represented by C . Therefore, Platt’s formulation is convenient for testing the effect of different light intensities on bacterivory.

However, Eq. 2 cannot represent cleared volume under light absence because Platt’s formulation returns zero when light is zero. Therefore, we added another function (Eq. 3) a simple exponential decay that can model cleared volume only at a light intensity close to zero.

$$B_{\max(I=0)} = \frac{D}{e^{\gamma \times I}} \quad (3)$$

Where D corresponds to cleared volume when light intensity is ~ 0 and γ is the parameter for the decay of D as light increases. Equation 3 can describe the nanoflagellate cleared volume when no phototrophic growth is possible (Berge et al. 2017, Fischer et al. 2017).

To assess the feeding interference effect of glacial clay particles on clearance rate ($F_{(TSS,t)}$), we set the handling time parameter k as a linear function of TSS.

$$k_{(TSS)} = k_0 + m \times TSS \quad (4)$$

where m is the coefficient for particle interference. We considered this linear approach to be sufficient for testing the hypothesis that flagellates increase their time spent catching and ingesting prey when contending with non-edible particles (Boenigk and Arndt 2002); this is supported by other experiments testing the effect of glacial particles on bacterivory (Sommaruga and Kandolf 2014). For this study, we expect a positive value for m .

Finally, the combined effect of both light intensity and particle interference for our ‘Model equation’ (Eq. 5) was assessed through combinations of Eq. 1–4: the maximum cleared volume B_{\max} from Eq. 1 was modelled with light intensity according to Eq. 2 and 3, while the handling time parameter k from Eq. 1 was modelled with clay concentration according to Eq. 4. Equation 5 has seven parameters and its variables are light intensity, clay concentration and incubation time.

$$F_{(t,I,TSS)} = \frac{\left(C \times \left(1 - e^{\left(\frac{-\alpha \times I}{C}\right)} \right) \times e^{\left(\frac{-\beta \times I}{C}\right)} + \frac{D}{e^{\gamma \times I}} \right) \times t}{k_0 + m \times TSS + t} \quad (5)$$

Model calibration and fitted parameters

Accurate representation of ecological dynamics through non-linear equations could lead to high computational costs for estimating parameters (Lignell et al. 2013). Thus, Bayesian

inference is suitable for these challenges, providing a coherent framework for characterizing the uncertainty related to modelling and forecasting (Clark 2005, Arhonditsis et al. 2008). Parameters from Eq. 5 (hereafter, Model equation) were estimated using the Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) and data obtained from the LE and CE experiments. The MCMC technique utilizes consecutive model simulations with judicious parameter updating to produce a sample from the prior probability distribution (uncertainties) of the parameters (Haario et al. 2006). Bayesian analysis was performed using JAGS (Plummer 2003) interfaced through R Studio (<www.r-project.org>). Then, weakly informative priors for initial dynamic parameter values were applied, assuming positive half-normal probability distributions (see Supplementary material Appendix 1 for detailed model syntax). Particularly, parameter for the decay of cleared volume under dark conditions (γ) was assumed to be high to account a low effect of Eq. 3 when light intensity reaches intermediate values ($>100 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Finally, a sample of possible parameter values was produced by the MCMC algorithm, forming the posterior distribution of the parameters. We checked parameter convergence using five MCMC chains with 2×10^5 iterations each and a burn in phase of 1×10^5 iterations.

Finally, we used parameter posteriors from the Model equation to simulate clearance rate as a function of both light intensity and clay concentration. The obtained clearance rates were contrasted with data from the LCE experiments.

Results

Nanoflagellates and prey abundances

MNF were the dominant fraction of the nanoplanktonic community in all lakes and treatments (Table 3) while HNF accounted for less than 10% in all lakes except Verde. Within the MNF, dominant taxa ($>70\%$ of MNF abundance) were the haptophyte *Chrysochromulina parva* followed by the cryptophyte *Plagioselmis lacustris*, which was more abundant only in the turbid proglacial Lake Frías during summer. Finally, pico-planktonic prey abundances (heterotrophic bacteria and picocyanobacteria) were similar among lakes.

Light experiment (LE)

The observed cleared volume in the LE bacterivory experiments (Fig. 2 empty circles) showed a hyperbolic function with increasing incubation time for each light intensity treatment. Accordingly, our Bayesian-fitted Model equation displayed a M–M function for each light treatment (Fig. 1, solid lines), where light intensity remained as a constant and clay concentration was always 0 mg l^{-1} . The observed clearance rate F was higher in lake Mascardi-C ($3.75 \text{ nl flagellate}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Fig. 2c), where light intensity was $110 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Conversely, F was lower at high light intensity $> 1200 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 2e–f).

Furthermore, pooling all light treatments, the observed cleared volume at 40 min showed a non-monotonic function with increasing light intensity (Fig. 3, empty circles). Accordingly, our Bayesian fitted Model (Eq. 5) with a fixed time (40 min) and 0 mg clay l^{-1} became a Platt model multiplied by a constant ($40/(k_0 + 40)$). Thus, the obtained curve for clearance rate versus light intensity displayed a function similar to Platt's (Platt et al. 1980) formulation (Fig. 3 solid line). According to Fig. 2, the highest clearance rate was detected within a light intensity range of $100\text{--}200 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Outside this range, the slope for lower light intensities was positive and the slope for higher light intensities was negative.

Clay experiment (CE)

The observed cleared volume in the CE bacterivory experiments showed a hyperbolic function with increasing incubation time for each clay treatment (Fig. 4, empty circles). As clay concentration increased, handling time increased, giving a linear-like function over time (Fig. 4f–g). Accordingly, our Bayesian-fitted Model equation displayed a M–M function (Fig. 4, solid lines), where clay concentration varied among treatments ($0\text{--}32 \text{ mg l}^{-1}$) and light intensity was always $110 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The highest clearance rate was detected with no clay addition (Fig. 4a), and lower values were found with increasing clay concentration.

Furthermore, pooling all clay treatments, the observed cleared volume at 45 min showed an exponential decay with increasing clay concentration (Fig. 5, empty circles). Accordingly, our Bayesian fitted Model (Eq. 5) with a fixed

Table 3. Abundance (cell ml^{-1}) of mixotrophic and heterotrophic nanoflagellates (MNF and HNF respectively) and pico-planktonic prey in all the north Patagonian Andean lakes studied.

Season	Lake	Depth (m)	MNF abundance	Dominant MNF taxa	HNF abundance	Prey abundance
Summer	Moreno	20	490	<i>C. parva</i>	30	1.2×10^6
	Rivadavia	20	300	<i>C. parva</i>	25	1.6×10^6
	Verde	0.2	1924	<i>C. parva</i>	909	3.2×10^6
	Cántaros	0.2	116	<i>C. parva</i>	6	1.07×10^6
	Cántaros	6	283	<i>C. parva</i>	26	9.27×10^5
	Mascardi-C	20	480	<i>C. parva</i>	56	1.25×10^6
	Frías	0.2	108	<i>P. lacustris</i>	8	1.24×10^6
	Frías	6	290	<i>P. lacustris</i>	27	9.51×10^5
	Spring	Frías	0.2	101	<i>C. parva</i>	10
Frías		6	315	<i>C. parva</i>	25	7.26×10^5

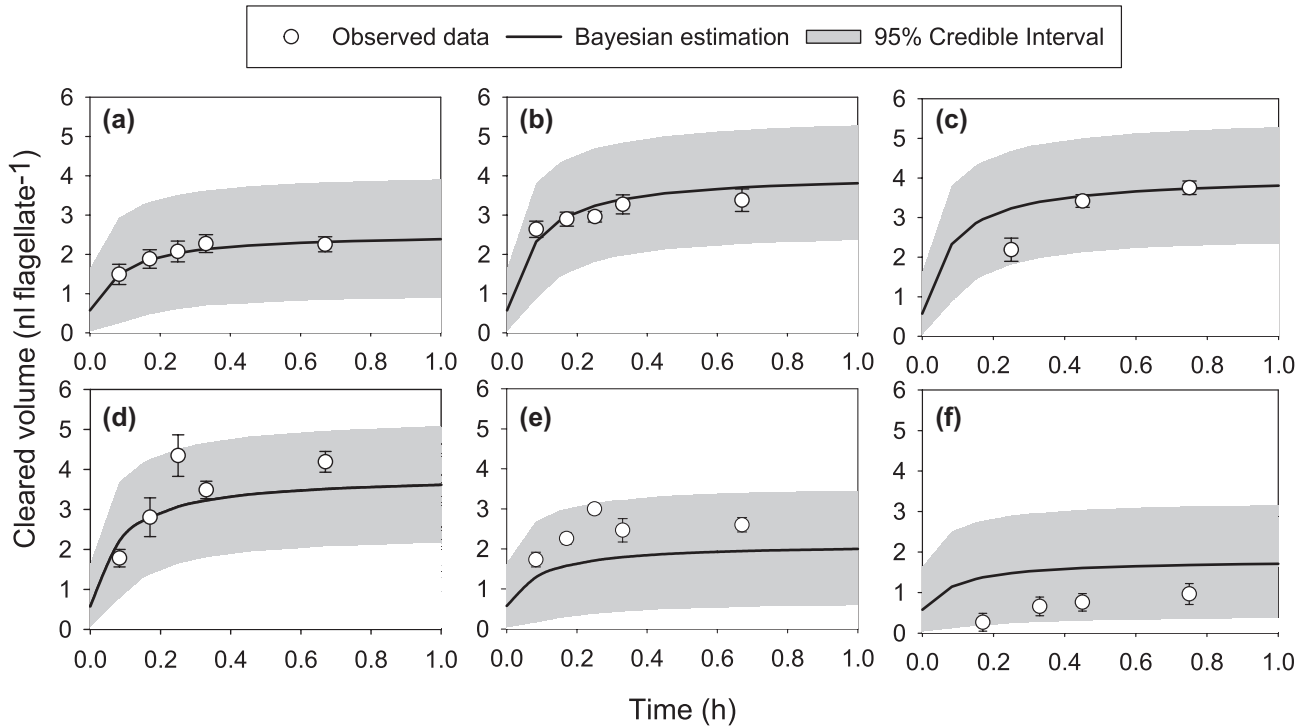


Figure 2. Clearance rate in the light experiments (LE). (a) Moreno, (b) Rivadavia, (c) Mascardi-C, (d) Cántaros (6 m depth), (e) Cántaros (0.2 m depth) and (f) Verde. Mean and standard errors for observed cleared volume are represented by the empty circles and error bars. Black solid line is the estimated cleared volume with the Bayesian fitted Model equation. Grey bands represent the Bayesian 95% credible intervals.

time (45 min) and $110 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ displayed an exponential decay function (Fig. 4 solid line). Remarkably, this trend was successfully represented with only one parameter affecting handling time (k). According to Fig. 4, the highest clearance rate was found at 0 mg clay l^{-1} , and a

decrease of more than 30% was detected with an addition of 4 mg clay l^{-1} .

Parameter posterior distributions

We achieved Bayesian calibration of the Model equation using the datasets from the LE and CE experiments. Posterior mean and 95% credible intervals for each parameter are shown in Table 4. Parameter posterior values were consistent with our experimental data (see Supplementary material Appendix 2 for probability density plots). C was $\sim 4.4 \text{ nl flagellate}^{-1} \text{ h}^{-1}$, coinciding with the maximum cleared volume observed in lake Mascardi-C (LE and CE), with intermediate light intensity and no clay addition. Posterior values for the other parameters related to light intensity were consistent with the supplied prior information but with narrower credible intervals, indicating that the addition of experimental data reduced parameter uncertainty. Moreover, time for half maximum cleared volume without clay k_0 , was estimated at 0.063 h ($\sim 4 \text{ min}$), similar to the handling time interval in several flagellate species (Boenigk and Arndt 2002). Finally, the posterior value of m was positive, indicating that 1 mg clay l^{-1} increases $k_0 \sim 8 \text{ min}$.

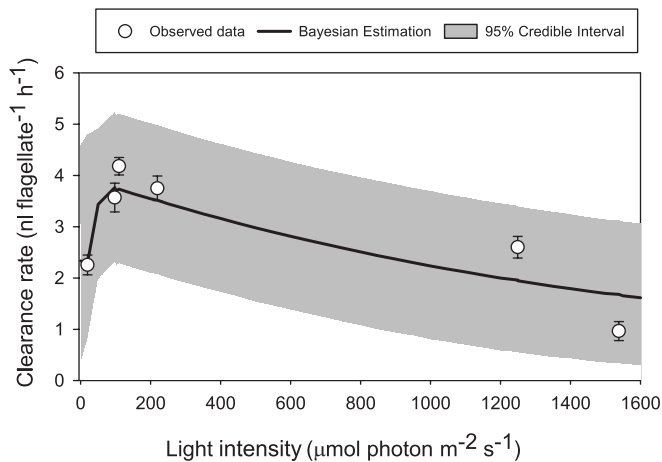


Figure 3. Clearance rate versus light intensity in the light experiments (LE). Mean and standard errors of observed cleared volume at 40 min are represented by the empty circles and error bars. Black solid line is the estimated mean for cleared volume at 40 min of incubation with the Bayesian fitted Model equation. Grey bands represent the Bayesian 95% credible intervals.

Combined experiment (LCE)

The observed cleared volume in the LCE bacterivory experiments showed a hyperbolic function (Fig. 6, empty circles). As with the results from the CE, handling time increased with

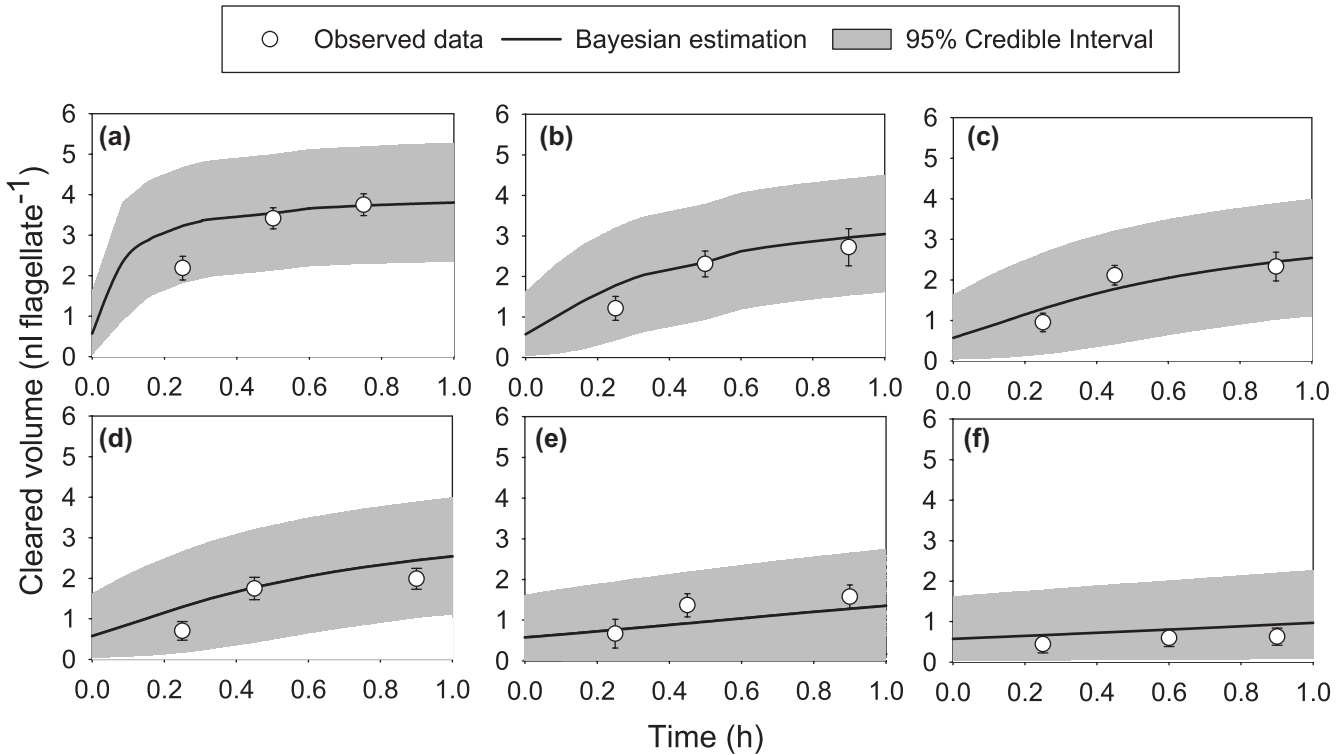


Figure 4. Clearance rate in the clay experiments (CE). (a) 0, (b) 2, (c) 4, (d) 8, (e) 16 and (f) 32 mg l⁻¹ of glacial clay. Mean and standard errors for observed cleared volume are represented by the empty circles and error bars. Black solid line is the estimated cleared volume with the Bayesian fitted Model equation. Grey bands represent the Bayesian 95% credible intervals.

higher clay concentration during summer, giving a linear-like function (Fig. 6b, d). Clearance rate was higher during spring, where TSS was almost ten times lower than in the summer (2.4 and 21.2 mg l⁻¹ respectively). Comparing depth levels, clearance rate was higher at 6 m than at the surface in the spring,

while similar in the summer. Particularly, the maximum cleared volume was observed in the spring experiment at 6 m depth when light intensity was 145 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. On the other hand, light intensity in summer at 6 m depth was almost null (0.015 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Lake Frías $Z_{1\%PAR} = 2.25 \text{ m}$), and low cleared volume was observed. Accordingly, our Model equation for clearance rate predicted a M-M function (Fig. 6, solid line) where clay concentration and light intensity remained as a constant for each combination of depth and season.

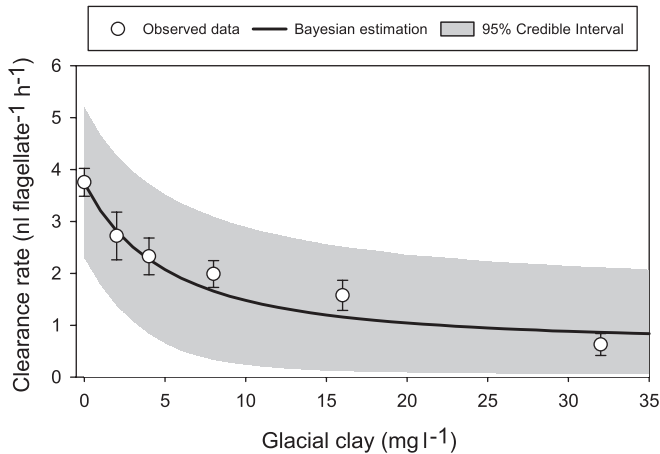


Figure 5. Clearance rate versus clay concentration in the clay experiments (CE). Mean and standard errors for observed cleared volume at 45 min are represented by the empty circles and error bars. Black solid line is the estimated cleared volume at 45 min with the Bayesian fitted Model equation. Grey bands represent the Bayesian 95% credible intervals.

Finally, we achieved a full prediction of cleared rate as a function of both light intensity and glacial clay concentration based on the parameters obtained in the LE and CE experiments. This ‘model prediction surface’ represents different conditions (clay concentration and light intensity) in glacial lakes (Fig. 7). According to the model prediction surface, the non-monotonic effect of light intensity becomes less pronounced as glacial particle concentration increases. Moreover, the observed cleared volume at 40 min in the four treatments of Lake Frías (Fig. 7) showed a high degree of overlap with the model prediction – in all cases, the predicted surface includes the experimental values $\pm 1 \text{ SE}$ (Fig. 6).

Discussion

In glacier-influenced lakes, we found that bacterivory of mixotrophic flagellates is affected by glacial particles through light attenuation and feeding interference. Both effects, individually

Table 4. Mean and 95% credible intervals of the Model equation's prior and posterior parameters. k_0 is the Michaelis–Menten parameter representing handling time in absence of glacial particles; C , α and β comes from the Platt et al. (1980) function for light intensity; γ and D represent bacterivory in absence of light and m is our proposed coefficient for particle interference. 95% Bayesian credible intervals are shown in brackets. CV = cleared volume per flagellate.

Model equation parameters (and units)		Prior distribution	Posterior distribution
C	Maximum CV (nl flagellate ⁻¹)	3.00 (1.04–4.95)	4.36 (3.81–5.02)
k_0	Time for half-maximum CV without particles (t)	0.10 (0.04–0.29)	0.06 (0.03–0.11)
α	CV slope in low light conditions (nl flagellate ⁻¹ I^{-1})	0.50 (0.04–2.45)	0.20 (0.13–0.29)
β	CV slope in high light conditions (nl flagellate ⁻¹ I^{-1})	0.05 (0.0–0.24)	0.003 (0.002–0.004)
D	Heterotrophic CV (nl flagellate ⁻¹)	2.50 (0.54–4.45)	2.52 (0.64–4.47)
γ	Heterotrophic CV decay (I^{-1})	0.01 (0.00–0.07)	0.001 (0.000–0.003)
m	Particle interference ($tTSS^{-1}$)	0.00 (–1.96 to 1.96)	0.13 (0.09–0.20)

and combined, were observed in our field uptake experiments and successfully represented by our Model equation. This formulation consisted of simple adaptations of the classical Michaelis–Menten and Platt's formula to model clearance rate as a function of light intensity and clay concentration. The obtained clearance rates were consistent with the values reported in literature (Boenigk and Arndt 2002). Although these equations are considered rather simple from a biological perspective (Lignell et al. 2013), they rapidly increase in mathematical complexity. In this context, the Bayesian methods applied here provide a coherent framework for the inclusion of prior knowledge in the key parameters of our Model equation, along with output posterior probability distributions which account for the uncertainty of the estimated parameters.

In an aquatic microbial food web, the mixotrophic strategy is widespread and often dominates large ecosystems such as oceans and freshwater lakes (Burkholder et al. 2008, Flynn et al. 2012). In particular, mixotrophy appears to be a suitable trophic strategy for protists in transparent oligotrophic lakes (Modenutti et al. 2008, Waibel et al. 2019). In fact, we observed that MNF dominated the nanoplanktonic communities of the six studied lakes, as observed in previous studies conducted in north Patagonian Andes lakes (Balseiro et al. 2004, Modenutti et al. 2013). Because low abundances of HNF were detected, the model presented in this work considered only MNF. Currently, in mixotrophic protists, the degree of bacterivory is understood to cover a wide range and to depend on the availability of light,

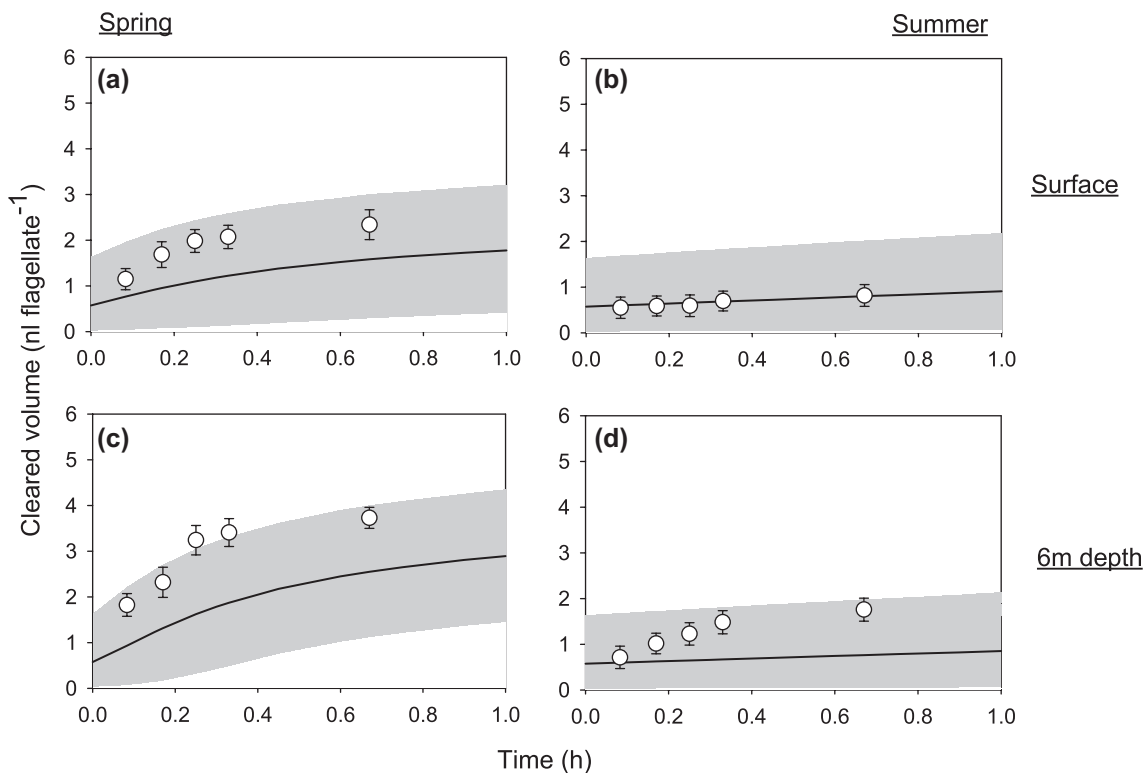


Figure 6. Clearance rate in the combined experiments (LCE) carried out in lake Frías. (a) spring 0.2 m, (b) summer 0.2 m, (c) spring 6 m and (d) summer 6 m. Means and standard errors for observed cleared volume are represented by the empty circles and error bars. Black solid line is the predicted mean cleared volume with our Model equation. Grey bands represent the Bayesian 95% credible intervals.

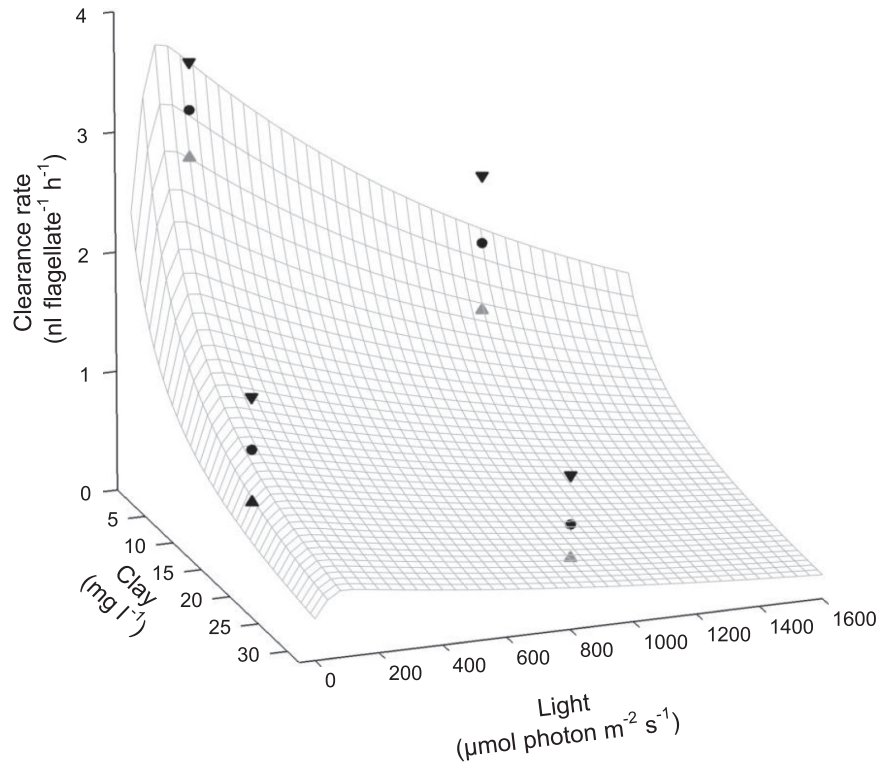


Figure 7. Clearance rate as a function of both light intensity and glacial clay concentration. Model prediction of cleared volume at 40 min is represented by the grey mesh surface. Observed cleared volume at 40 min are represented by circles (mean) and triangles (± 1 SE), black symbols indicate position above the surface, grey symbols below the surface.

nutrients and prey (Jones 1997, Stoecker 1998, Mitra et al. 2016, Berge et al. 2017). Moreover, a large proportion of mixotrophs exhibit an energy-dependence on sunlight not only for phototrophy, but also for phagotrophy (Modenutti and Balseiro 2002, Hansen 2011).

In our uptake experiments in clear mountain lakes with high light penetration, we found a non-monotonic effect of light intensity on bacterivory. This effect was well adjusted using Platt's formula (Platt et al. 1980), which was originally proposed to link primary production and photosynthetic parameters at different light intensities (Bouman et al. 2018). The fact that bacterivory by mixotrophic flagellates displayed a similar response to light intensity as primary production (Fig. 2), suggests a strong influence of phototrophy over phagotrophy in these mixotrophic nanoflagellates. We found maximum clearance rate in the light range of 100–200 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$, the same range in which the maximum photosynthetic efficiency of algae was observed (Callieri et al. 2007). Conversely, the lowest clearance rate was observed (and predicted) at high light intensity probably due to photo-inhibition or light damage (Villafañe et al. 2004, Callieri et al. 2007, Bastidas Navarro et al. 2011). This feeding behaviour fits within Jones's (Jones 1997) Group C, which comprises flagellates like *Dynobryon* sp. and *Uroglena* sp.

Feeding interference by glacial particles was experimentally determined by adding different clay concentrations in our uptake experiments. The clay concentration range used in our

experiments represents clear lakes (0 mg l^{-1}) to turbid proglacial lakes (32 mg l^{-1}) such as alpine glacial lakes (Sommaruga 2015, Kammerlander et al. 2016) and our Andean Lake Frias during summer. The decrease in bacterivory was exponential with increasing clay concentration, indicating a strong negative effect of glacial particles in even small amounts. Indeed, a 40% decrease in the clearance rate was observed (and predicted) with an increase from 0 mg clay l^{-1} to 5 mg clay l^{-1} . Furthermore, we found the lowest clearance rate in 32 mg clay l^{-1} ; this high concentration level was observed to affect the growth and survival of HNF (Sommaruga and Kandolf 2014). Moreover, although our approach to modelling clay interference on bacterivory was simple, it was effective in representing our results. A positive value of the particle interference coefficient m indicates that the presence of glacial clay increases the handling time of the phagotrophic predator. Since prey manipulation takes several minutes (Boenigk and Arndt 2002), an increase in the handling time would imply a decrease in bacterivory. If the captured particle is non edible (clay), then a rejection process begins that could last even longer than the time needed to ingest prey (Boenigk and Arndt 2002). Under this scenario, we found that an increase in clay concentration lowers and linearizes the curve, making it difficult to visualize an asymptote. In addition, in our samples, we saw clay particles attached to cell surface and flagella, while other were probably ingested (see Kuosa 1991 for detection of ingested particles). However, whether the negative effect of

clay on bacterivory is only a consequence of the ingestion and egestion of non-edible particles or a reduction of predation efficiency caused by attached particles remains unexplored.

Both the effects of light attenuation and feeding interference caused by glacial particles were present in the turbid proglacial Lake Frias and successfully predicted by our model. Data from the LE and CE experiments were used to train the model, while the LCE experiment served as an independent dataset to test our model. Thus, the obtained 3D surface represents the predictive function of the model equation that describes mountain lakes with variable glacial influence. One important consequence of the model is the decreasing effect of light intensity on bacterivory with increasing clay concentration. Lake Frías was studied in two different periods of clay concentration that, in turn, affected light availability. During the spring (because of low levels of melting in the winter), the lake was clearer and bacterivory was higher at 6m depth, suggesting a better light environment. In contrast, in the summer (following high levels of melting in the spring) the lake was turbid with high particle concentrations; accordingly, clearance rate decreased due to a decrease in light and an increase in particle interference. These different conditions were successfully predicted by the model, indicating its usefulness for a wide range of conditions in proglacial lakes. In addition, the nanoflagellate community changed between seasons from the dominance of *Chrysochromulina parva* in the spring towards a higher relative abundance of *Plagioselmis lacustris* in the more turbid summer conditions. Nevertheless, the model was able to successfully predict the change in bacterivory, allowing for the prediction of bacterivory in different types of nanoflagellates.

Glacier retreat dynamics are responsible for major changes in freshwater biotic and abiotic conditions due to the input of minerogenic particles (Sommaruga 2015). In this work, we showed and modelled the double effect that glacial particles have on the bacterivory of mixotrophs. On the one hand, glacial clay reduces light availability; on the other hand, it causes feeding interference. Under a decreasing light scenario coupled with the presence of non-edible clay particles, a decrease in bacterivory should be expected. Simultaneously, changes in composition and vertical distribution of phytoplankton and zooplankton will occur (Hylander et al. 2011, Laspoumaderes et al. 2013), including higher trophic levels (Jönsson et al. 2011). Furthermore, during glacial recession, sudden geological events causing high inputs of minerogenic particles are expected to increase (Worni et al. 2012), which will cause rearrangements in the distribution of both autotrophs (Bastidas Navarro et al. 2018) and mixotrophs. Finally, as glaciers eventually disappear (Zemp et al. 2015) glacial clay inputs will decrease, and according to our model, higher bacterivory rates are predicted at deep layers of proglacial lakes due to increasing lake transparency.

Data availability statement

Data are available from the Dryad Digital Repository: <<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.wpzgmsbj1>> (Schenone et al. 2020).

Acknowledgements – We thank Harri Kuosa for his advices in detection of attached clay particles in flagellates and Juan Morales for revision of the Bayesian methods applied. We also thank to Parques Nacionales for giving us permission to conduct sampling and field experiments.

Funding – This work was supported by the Fondo Para la Investigación Científica y Tecnológica Argentina (FONCyT), PICT 2015-0418, PICT 2017-1940.

Conflicts of interest – The authors declare no conflict of interest.

Author contributions – BM and EB conceived the study and designed the experiments, LS, MBN, EB and BM run the experiments, LS analysed data and developed the model, LS, BM and EB wrote the ms, all authors contributed to the final version of the ms.

Permits – Sampling and field experiments were conducted with permission no. 734 by Administración Parques Nacionales, Argentina.

References

- Anderson, T. R. 2005. Plankton functional type modelling: running before we can walk? – *J. Plankton Res.* 27: 1073–1081.
- Arhonditsis, G. B. et al. 2008. Bayesian calibration of mechanistic aquatic biogeochemical models and benefits for environmental management. – *J. Mar. Syst.* 73: 8–30.
- Ariztegui, D. et al. 2007. Dominant ENSO frequencies during the Little Ice Age in northern Patagonia: the varved record of proglacial Lago Frías, Argentina. – *Quat. Int.* 161: 46–55.
- Balseiro, E. G. et al. 2004. Grazing impact on autotrophic picoplankton in two south Andean lakes (Patagonia, Argentina) with different light: nutrient ratios. – *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77: 73–85.
- Bastidas Navarro, M. et al. 2011. UV radiation simultaneously affects phototrophy and phagotrophy in nanoflagellate-dominated phytoplankton from an Andean shallow lake. – *Photochem. Photobiol. Sci.* 10: 1318–1325.
- Bastidas Navarro, M. et al. 2018. Effect of glacial lake outburst floods on the light climate in an Andean Patagonian lake: implications for planktonic phototrophs. – *Hydrobiologia* 816: 39–48.
- Berge, T. et al. 2017. Modeling succession of key resource-harvesting traits of mixotrophic plankton. – *ISME J.* 11: 212.
- Boenigk, J. and Arndt, H. 2002. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. – *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 465–480.
- Bouman, H. A. et al. 2018. Photosynthesis–irradiance parameters of marine phytoplankton: synthesis of a global data set. – *Earth Syst. Sci. Data* 10: 251–266.
- Burkholder, J. M. et al. 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. – *Harmful Algae* 8: 77–93.
- Callieri, C. et al. 2007. Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. – *Aquat. Ecol.* 41: 511–523.
- Clark, J. S. 2005. Why environmental scientists are becoming Bayesians. – *Ecol. Lett.* 8: 2–14.
- Corno, G. et al. 2009. Bacterial diversity and morphology in deep ultraoligotrophic Andean lakes: the role of UVR on vertical distribution. – *Limnol. Oceanogr.* 54: 1098–1112.
- Danger, M. et al. 2007. Control of phytoplankton–bacteria interactions by stoichiometric constraints. – *Oikos* 116: 1079–1086.

- Dietze, M. C. et al. 2018. Iterative near-term ecological forecasting: needs, opportunities and challenges. – Proc. Natl Acad. Sci. USA 115: 1424–1432.
- Fischer, R. et al. 2017. Importance of mixotrophic bacterivory can be predicted by light and loss rates. – Oikos 126: 713–722.
- Flynn, K. J. et al. 2012. Misuse of the phytoplankton–zooplankton dichotomy: the need to assign organisms as mixotrophs within plankton functional types. – J. Plankton Res. 35: 3–11.
- Gerla, D. J. et al. 2011. Photoinhibition and the assembly of light-limited phytoplankton communities. – Oikos 120: 359–368.
- Gurung, T. B. et al. 1999. Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. – Aquat. Microb. Ecol. 17: 27–35.
- Haario, H. et al. 2006. DRAM: efficient adaptive MCMC. – Stat. Comput. 16: 339–354.
- Hansen, P. J. 2011. The role of photosynthesis and food uptake for the growth of marine mixotrophic dinoflagellates 1. – J. Eukaryot. Microbiol. 58: 203–214.
- Hansson, T. H. et al. 2019. Environmental drivers of mixotrophs in boreal lakes. – Limnol. Oceanogr. 64: 1688–1705.
- Hylander, S. et al. 2011. Climate-induced input of turbid glacial meltwater affects vertical distribution and community composition of phyto- and zooplankton. – J. Plankton Res. 33: 1239–1248.
- IPCC 2014. Climate Change 2014: impacts, adaptation and vulnerability. Part B: regional aspects. Central and South America. – In: Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge Univ. Press, p. 151.
- Iriondo, M. 1989. Quaternary lakes of Argentina. – Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol. 70: 81–88.
- Jones, H. 1997. A classification of mixotrophic protists based on their behaviour. – Freshwater Biol. 37: 35–43.
- Jones, R. I. 2000. Mixotrophy in planktonic protists: an overview. – Freshwater Biol. 45: 219–226.
- Jones, R. I. and Rees, S. 1994. Characteristics of particle uptake by the phagotrophic phytoflagellate, *Dinobryon divergens*. – Mar. Microb. Food Webs 8: 97–110.
- Jönsson, M. et al. 2011. Glacial clay affects foraging performance in a Patagonian fish and cladoceran. – Hydrobiologia 663: 101–108.
- Kammerlander, B. et al. 2016. Ciliate community structure and interactions within the planktonic food web in two alpine lakes of contrasting transparency. – Freshwater Biol. 61: 1950–1965.
- Kemp, P. F. et al. 1993. Handbook of methods in aquatic microbial ecology. – CRC Press.
- Kimura, B. and Ishida, Y. 1985. Photophagotrophy in *Uroglena americana*, Chrysophyceae. – Jpn J. Limnol. 46: 315–318.
- Kirk, J. T. 1994. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. – Cambridge Univ. Press.
- Kuosa, H. 1991. Picoplanktonic algae in the northern Baltic Sea: seasonal dynamics and flagellate grazing. – Mar. Ecol. Prog. Ser. 73: 269–276.
- Laspoumaderes, C. et al. 2013. Glacier melting and stoichiometric implications for lake community structure: zooplankton species distributions across a natural light gradient. – Global Change Biol. 19: 316–326.
- Leles, S. G. et al. 2018. Modelling mixotrophic functional diversity and implications for ecosystem function. – J. Plankton Res. 40: 627–642.
- Lignell, R. et al. 2013. Getting the ‘right’ parameter values for models of the pelagic microbial food web. – Limnol. Oceanogr. 58: 301–313.
- McKie-Krisberg, Z. M. et al. 2015. Physiological responses of three species of Antarctic mixotrophic phytoflagellates to changes in light and dissolved nutrients. – Microb. Ecol. 70: 21–29.
- Mitra, A. et al. 2014. The role of mixotrophic protists in the biological carbon pump. – Biogeosciences 11: 995–1005.
- Mitra, A. et al. 2016. Defining planktonic protist functional groups on mechanisms for energy and nutrient acquisition: incorporation of diverse mixotrophic strategies. – Protist 167: 106–120.
- Modenutti, B. E. and Balseiro, E. G. 2002. Mixotrophic ciliates in an Andean lake: dependence on light and prey of an *Ophrydium naumannii* population. – Freshwater Biol. 47: 121–128.
- Modenutti, B. E. et al. 2008. Light versus food supply as factors modulating niche partitioning in two pelagic mixotrophic ciliates. – Limnol. Oceanogr. 53: 446–455.
- Modenutti, B. E. et al. 2013. Environmental changes affecting light climate in oligotrophic mountain lakes: the deep chlorophyll maxima as a sensitive variable. – Aquat. Sci. 75: 361–371.
- Norros, V. et al. 2017. Parameterization of aquatic ecosystem functioning and its natural variation: hierarchical Bayesian modelling of plankton food web dynamics. – J. Mar. Syst. 174: 40–53.
- Nygaard, K. and Tobiesen, A. 1993. Bacterivory in algae: a survival strategy during nutrient limitation. – Limnol. Oceanogr. 38: 273–279.
- Paruelo, J. M. et al. 1998. The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. – Ecol. Austral 8: 85–101.
- Peter, H. and Sommaruga, R. 2017. Alpine glacier-fed turbid lakes are discontinuous cold polymictic rather than dimictic. – Inland Waters 7: 45–54.
- Platt, T. et al. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. – J. Mar. Res. 38: 687–701.
- Plummer, M. 2003. JAGS: a program for analysis of Bayesian graphical models using Gibbs sampling. – In: Proc. 3rd Int. workshop on distributed statistical computing, Vienna, Austria, p. 10, <www.R-project.org/conferences/DSC-2003/>.
- Ptacinik, R. et al. 2016. A light-induced shortcut in the planktonic microbial loop. – Sci. Rep. 6: 29286.
- Robson, B. J. et al. 2018. Towards evidence-based parameter values and priors for aquatic ecosystem modelling. – Environ. Model. Softw. 100: 74–81.
- Rose, K. C. et al. 2014. Light attenuation characteristics of glacially-fed lakes. – J. Geophys. Res. Biogeosci. 119: 1446–1457.
- Schenone, L. et al. 2020. Data from: Modelling the consequence of glacier retreat on mixotrophic nanoflagellate bacterivory: a Bayesian approach. – Dryad Digital Repository, <<http://dx.doi.org/10.5061/dryad.wpzgmsbj1>>.
- Sherr, B. F. et al. 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. – Appl. Environ. Microbiol. 53: 958–965.
- Šimek, K. and Chrzanowski, T. H. 1992. Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. – Appl. Environ. Microbiol. 58: 3715–3720.
- Slemmons, K. E. et al. 2013. The influence of glacial meltwater on alpine aquatic ecosystems: a review. – Environ. Sci. Process Impacts 15: 1794–1806.
- Smout, S. et al. 2010. The functional response of a generalist predator. – PLoS One 5: e10761.

- Sommaruga, R. 2015. When glaciers and ice sheets melt: consequences for planktonic organisms. – *J. Plankton Res.* 37: 509–518.
- Sommaruga, R. and Kandolf, G. 2014. Negative consequences of glacial turbidity for the survival of freshwater planktonic heterotrophic flagellates. – *Sci. Rep.* 4: 4113.
- Sterner, R. W. et al. 1997. The light: nutrient ratio in lakes: the balance of energy and materials affects ecosystem structure and process. – *Am. Nat.* 150: 663–684.
- Stoecker, D. K. 1998. Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications. – *Eur. J. Protistol.* 34: 281–290.
- Villafañe, V. E. et al. 2004. Solar UVR-induced DNA damage and inhibition of photosynthesis in phytoplankton from Andean lakes of Argentina. – *Arch. Hydrobiol.* 161: 245–266.
- Waibel, A. et al. 2019. Importance of mixotrophic flagellates during the ice-free season in lakes located along an elevational gradient. – *Aquat. Sci.* 81: 45.
- Worni, R. et al. 2012. Analysis and dynamic modeling of a moraine failure and glacier lake outburst flood at Ventisquero Negro, Patagonian Andes (Argentina). – *J. Hydrol.* 444: 134–145.
- Yvon-Durocher, G. et al. 2017. The temperature dependence of phytoplankton stoichiometry: investigating the roles of species sorting and local adaptation. – *Front. Microbiol.* 8: 2003.
- Zemp, M. et al. 2015. Historically unprecedented global glacier decline in the early 21st century. – *J. Glaciol.* 61: 745–762.
- Zhang, W. and Arhonditsis, G. B. 2009. A Bayesian hierarchical framework for calibrating aquatic biogeochemical models. – *Ecol. Model.* 220: 2142–2161.

Supplementary material (available online as Appendix oik-07170 at <www.oikosjournal.org/appendix/oik-07170>). Appendix 1.

Modelling key variables for understanding the effects of grazing and nutrient recycling by zooplankton on the freshwater microbial loop

Luca Schenone¹  | Beatriz Modenutti¹  | Nicolás Martyniuk¹  |
 Marcela Bastidas Navarro¹  | Cecilia Laspoumaderes^{1,2}  | Esteban Balseiro¹ 

¹Laboratorio de Limnología, INIBIOMA, CONICET-Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina

²Shelf Sea System Ecology, Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung (AWI), Biologische Anstalt Helgoland, Helgoland, Germany

Correspondence

Esteban Balseiro, Laboratorio de Limnología, INIBIOMA, CONICET-Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina.
 Email: ebalseiro@comahue-conicet.gob.ar

Funding information

Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Abstract

1. Pelagic microbial food webs are structured by zooplankton through grazing and nutrient recycling. Cladocerans and copepods are assumed to have different effects on the microbial loop by grazing on different prey sizes and releasing phosphorus (P) differentially. Here, we assessed this effect of differential zooplankton grazing and nutrient recycling on microbial loop dynamics using a combination of experimental and modelling approaches.
2. We performed field incubation experiments in an oligotrophic mountain lake (north-Patagonian Andes) using the natural microbial community and the two dominant zooplankton taxa: a cladoceran (*Diaphanosoma chilense*) and a copepod (*Boeckella gibbosa*). The effect of zooplankton grazing and nutrient recycling were assessed separately in different treatments with direct and indirect zooplankton presence, respectively. We built a mechanistic model to estimate zooplankton grazing and P recycling and prey P quotas. The model was parameterised with the results from our field experiment and with prior information from size-based traits and zooplankton C:P using a Bayesian approach. Laboratory experiments for zooplankton P excretion were also performed to test the predictive accuracy of our model.
3. Our model showed that copepods and cladocerans have contrasting effects on the microbial loop. *Diaphanosoma chilense* grazed mainly on picoplankton while *B. gibbosa* grazed on nanoflagellates and algae. *Diaphanosoma chilense* reduced the biomass and increased P quota of picoplankton, and reduced the P quota of nanoflagellates. In contrast, *B. gibbosa* released more P, increasing the picoplankton biomass and reducing the biomass of nanoflagellates, but increasing its P quota.
4. Based on our experimental and model results, copepod grazing favours higher P acquisition rates for cladocerans by releasing more P for picoplankton. By contrast, cladocerans would have a mixed effect on the main food items of copepods by increasing P quotas of the strict osmotrophic algae but decreasing P quotas of nanoflagellates.
5. Our mechanistic model is useful to quantitatively assess key planktonic variables, which are usually difficult to measure in the field, such as zooplankton P excretion

rates and microbial P quotas, by using more conspicuous variables such as biomass of the different microbial compartments and dissolved and particulate P concentrations.

6. The model presented here could be used to disentangle complex pathways in the microbial food web. The relative importance of phagotrophy and osmotrophy in P uptake, P quotas, and nutrient recycling by grazers result in key variables for understanding ecosystem matter flux and resource use efficiency.

KEYWORDS

bacterivory, Bayesian approach, ecological stoichiometry, mixotrophic nanoflagellates, phosphorus quota

1 | INTRODUCTION

The dynamic of the pelagic microbial food web has important implications for ecosystem biogeochemical fluxes and energy transfer (Cotner & Biddanda, 2002). This microbial food web, referred to as the *microbial loop* (Azam et al., 1983) includes multiple compartments such as heterotrophic bacteria, autotrophic picoplankton, nanoflagellates (mixotrophic and heterotrophic), and ciliates. Planktonic protists, nanoflagellates and ciliates, consume bacteria, and, in turn, serve directly as major prey items for most zooplankters. However, this simplified scheme results in complex top-down and bottom-up relationships, due to grazing and nutrient recycling (Vanni, 2002).

Together with direct consumption of prey, nutrient recycling is now recognised as an essential link between predators and lower trophic levels (Schmitz et al., 2010). Empirical evidence from the last 3 decades highlights the importance of consumers in biogeochemical cycles (Atkinson et al., 2017; Attayde & Hansson, 1999; Sitters et al., 2017; Vanni, 2002). The incorporation of nutrient recycling in food web models pointed out the importance of size-based physiological traits, such as nutrient affinity and internal store ability (Edwards et al., 2012). This aspect also becomes relevant in the study of the eco-evolutionary dynamics of predators and their prey (Branco et al., 2020). In current food web modelling, there is a growing interest among ecologists to integrate both empirical and theoretical approaches to understand the role of predators in nutrient cycling (Atkinson et al., 2017).

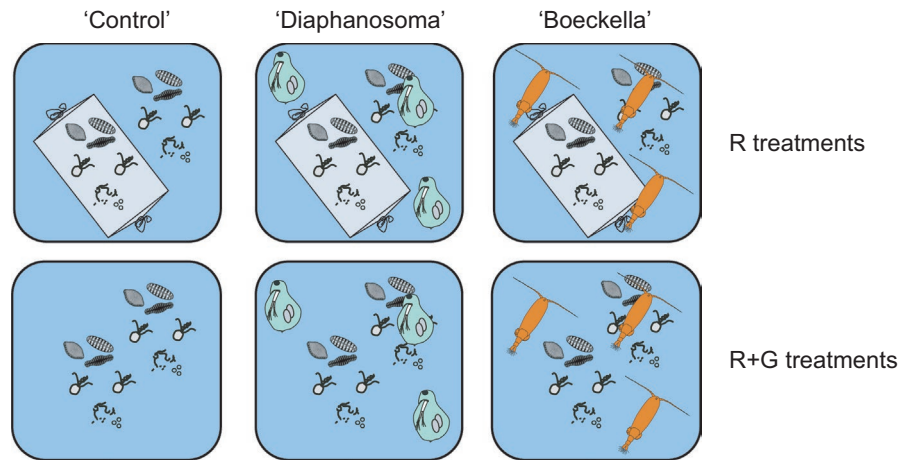
In planktonic food webs, zooplankton act as a sink for nutrients by incorporation into biomass through predation, and as a source by releasing dissolved nutrients (Branco et al., 2018; Elser & Urabe, 1999). The elemental composition of zooplankton is usually more homeostatic than their prey, and zooplankton, therefore, recycle surplus nutrients back into the environment when faced with nutritionally imbalanced food (Sterner & Elser, 2002). Zooplankton-mediated nutrient recycling may change the availability of essential nutrients such as phosphorus (P) and nitrogen (N; Elser & Urabe, 1999). The recycling rate of a particular element will depend on the elemental requirements of the dominant zooplankton (Balseiro et al., 1997; Elser et al., 1988). In particular, copepods tend to have a relatively

higher body C:P than cladocerans and thus recycle more P (Elser et al., 1988; Sterner & Elser, 2002). Therefore, planktonic communities dominated by contrasting zooplankton groups may intensify or mitigate nutrient limitation of their prey by being an effective sink or source of specific elements (Balseiro et al., 1997; Branco et al., 2018; Hessen et al., 1992).

Microbial food webs are directly linked to higher trophic levels through zooplankton grazing (Jürgens, 1994; Li et al., 2014). Within the microcrustacea, cladocerans and copepods produce differential grazing impact on microbial compartments (Modenutti et al., 2003; Zöllner et al., 2003). Pelagic cladocerans can access almost all compartments of the microbial loop since they can effectively filter a wide range of particle sizes (Brendelberger, 1991). Early studies have reported that different *Daphnia* species can access small particles such as bacteria (Gophen & Geller, 1984; Jürgens, 1994), while other studies have demonstrated the higher efficiency of the sidid *Diaphanosoma* as a bacteria feeder (Brendelberger, 1991; Gophen & Geller, 1984). Despite this high efficiency, *Diaphanosoma* was seldom considered as a direct bacteria grazer, so their potential competitive effect on other bacterivores (such as nanoflagellates) was ignored. By contrast, copepods are not important bacterial grazers (Sanders et al., 1989) but can effectively consume nanoflagellates and ciliates (Vrede & Vrede, 2005). Boeckellids in particular are the dominant calanoid copepods of the Southern Hemisphere, and reported as consumers of mixotrophic protists (Balseiro et al., 2001; Burns & Schallenberg, 1996; Modenutti et al., 2003). Therefore, zooplankton appear to play an important role in structuring microbial food webs by grazing different prey compartments. Currently, modelling the combined effect of zooplankton feeding strategies and nutrient excretion on the microbial food web represents a challenge in ecology (Branco et al., 2018; Lignell et al., 2013; Ptacnik et al., 2004).

In environments where P is the limiting nutrient, as in many freshwater oligotrophic lakes, planktonic microbial communities (bacteria, autotrophic picoplankton, protists) account for most of the primary production and energy transfer to higher trophic levels (Cotner & Biddanda, 2002). The affinity for dissolved P is higher for small-sized picoplankton than larger phytoplankton due to the higher surface/volume ratio, allowing picoplankton to attain higher P concentration

FIGURE 1 Design of the experiment performed in lake Los Cántaros. The experiment consisted of a factorial design with six treatments. R treatments were performed using dialysis bags to avoid zooplankton grazing, thus only the nutrient recycling effect was present inside the bags. R + G treatments were performed without the dialysis bags allowing direct contact of the zooplankton with the lower trophic levels, thus both grazing and nutrient recycling effects were present



per unit of biovolume (hereafter P quota) than larger cells (Branco et al., 2020; Edwards et al., 2012; Tambi et al., 2009). Moreover, the combination of autotrophic and heterotrophic modes of nutrition represents an advantage for mixotrophic algae (e.g. nanoflagellates) by feeding on P-rich picoplankton (Yvon-Durocher et al., 2017). As a consequence, zooplankton grazing differentially on prey with different P quotas would result in differences in P acquisition and excretion rates (Elser et al., 1996; Laspoumaderes et al., 2015).

Accurate parameterisation of food web models is a challenge since they rapidly increase in complexity when several prey and predator levels are involved (Anderson, 2005; Loreau & De Mazancourt, 2013). Fortunately, the Bayesian approach appears to be an alternative to the classical methods that rely on the likelihood function (Arhonditsis et al., 2008; Clark, 2005; Zhang & Arhonditsis, 2009). Bayesian methods were successfully applied to estimate key planktonic traits based on cell sizes, such as nutrient affinity and ingestion rates quantified from mesocosm experiments that focused on the microbial loop (Lignell et al., 2013). A similar approach, using prior information from the literature, succeeded in identifying the role of total N and P concentrations and zooplankton in governing algal mass occurrence during an 8-year monitoring study in a Finnish lake (Malve et al., 2007). In the present work, we modelled the effect of zooplankton grazing and P recycling on the abundance and P quota dynamics of the microbial loop. To achieve this, we combined two different approaches: (1) field experiments in an oligotrophic lake where zooplankton grazing and nutrient recycling effects were assessed separately; and (2) a mechanistic model that was parameterised with the results of the field experiments and prior information using a Bayesian approach. For our field experiments, we chose two contrasting zooplankton taxa: a copepod (*Boeckella gibbosa*) and a cladoceran (*Diaphanosoma chilense*). We expected that the biomass and P quota of the lower trophic levels (bacteria, autotrophic picoplankton, mixotrophic nanoflagellates, and algae) would be affected by the differential grazing and P recycling of these two zooplankton species. Finally, with our model, we aimed to predict particulate and dissolved P dynamics within the planktonic food web, which has important implications for production studies in oligotrophic systems.

2 | METHODS

2.1 | Study site and planktonic community

The experimental study was carried out in the glacial lake Los Cántaros (north-western Patagonia, Argentina, 41°00'S, 71°49'W) located at 1,000 m above sea level in the Andes mountain range, 3 km from the Puerto Blest Biological Station (Universidad Nacional del Comahue). The lake has 14 m of maximum depth and is oligotrophic (chlorophyll $a < 1 \mu\text{g/L}$), transparent (>1% of photosynthetically active radiation [PAR, 400–700 nm] penetrates to maximum depth), with strong P limitation (Souza et al., 2010; Villar-Argaiz et al., 2018). North Andean patagonian lakes have very dilute waters, with ion concentrations below world average (Markert et al., 1997). Lake Cantaros in particular has a very low conductivity (<40 $\mu\text{S/cm}$). The phytoplankton is mostly dominated by picoplanktonic cyanobacteria (Pcy) and small mixotrophic nanoflagellates such as the haptophyte *Chrysochromulina parva* (Carrillo et al., 2017; Schenone et al., 2020). Larger phytoplankton species are less abundant and are represented mainly by small diatoms (*Cyclotella* spp.) and autotrophic dinoflagellates (*Gymnodinium paradoxum*). The crustacean zooplankton is dominated by two species, the calanoid copepod *Boeckella gibbosa*, and the cladoceran *Diaphanosoma chilense*.

2.2 | Field incubation experiments

We determined the effect of grazing (G) and nutrient recycling (R) of the copepod *B. gibbosa* and the cladoceran *D. chilense* with a short-term incubation experiment (48 hr) carried out at midsummer (4–6 February 2020). Experimental units consisted of transparent polystyrene 1-L flasks filled with natural lake water gently filtered through a 55- μm mesh net to remove zooplankton. Experimental units were divided according to the different treatments and incubation time with four replicates each. The experiment consisted of a factorial design with six treatments: R Control, R *Diaphanosoma*, R *Boeckella*, R + G Control, R + G *Diaphanosoma* and R + G *Boeckella* (Figure 1). R + G Treatments (both G and R effects present) consisted

of flasks (experimental units) with direct zooplankton presence (five individuals of *B. gibbosa* or *D. chilense*) or without zooplankton (R + G Control). R treatments consisted of an indirect zooplankton presence (only R effect present) and this condition was achieved using two dialysis bags inside the experimental units (Sigma™, USA; 12,000–14,000 Da pore-size, c. 8 cm flat width, cut to a length of 15 cm c. 300 ml capacity). The bags were washed with distilled water for 3 hr and left overnight in MilliQ water. Before the field experiments, we checked in the laboratory that the pre-washed dialysis bags did not release any dissolved nutrients (dissolved organic carbon [DOC], total dissolved nitrogen [TDN], or total dissolved phosphorus [TDP]) to the water. The bags were transported to the field in MilliQ water. Dialysis bags of 300 ml were placed inside the 1-L flasks and filled with the filtered lake water. Then, five zooplankton individuals (*B. gibbosa* or *D. chilense*) were placed inside the flask in the R + G treatments or inside the flasks but outside the dialysis bags in the R treatments (Figure 1). In our experiment, we used *B. gibbosa* CV instar (c. 1.6 mm) or adults of *Diaphanosoma chilense* (c. 1.5 mm). Finally, R control treatments consisted of the same procedure using 1-L flasks with the dialysis bags and no zooplankton addition. All the experimental units were submerged in the lake at 2 m depth (58% of surface PAR) and four replicates of each treatment were removed after 24 and 48 hr.

After removal from the water, experimental units were carried immediately to the laboratory at the Puerto Blest Biological Station, in darkness in thermally insulated containers. The water inside the 1-L flasks (R + G) or inside the dialysis bags (R) was collected for the different analyses as follows. A volume of 150 ml was used to analyse total phosphorus (TP) and TDP. A volume of 60 ml was preserved with buffered formaldehyde (final concentration, 2% v/v) for bacteria, autotrophic picoplankton and nanoflagellate counting. These samples were stored refrigerated in darkness and quantified within 2 weeks of sampling. Finally, a volume of 50 ml was preserved with acid Lugol solution for algae and ciliate quantification.

2.3 | Field nanoflagellate bacterivory experiments

Nanoflagellate bacterivory was estimated using fluorescently labelled bacteria (FLB). The FLB were prepared following Šimek and Chrzanowski (1992). After prefiltration through a 2- μm pore filter, we concentrated the bacterioplankton in a 0.22- μm pore filter (Nucleopore). Cells were detached from the filter surface by sonication, and were heat-killed and stained with 5-([4,6-ichlorotriazin-2-yl] amino) fluorescein (DTAF) according to Sherr et al. (1987). FLB were stored in 2 ml aliquots at -20°C . The obtained FLB were measured and counted under an epifluorescence microscope to verify shape, size, and abundance. The obtained FLB were mostly coccoid shaped of $0.76 \pm 0.21 \mu\text{m}$ in diameter.

Experiments were carried out in 150-ml ground-stoppered glass bottles, with three replicates per time interval. The bottles were filled with lake water filtered through a 55- μm mesh net to remove zooplankton. FLB were then added to each bottle at a final

concentration of 20% of total bacterial abundance. The bottles were submerged in the lake at 2 m depth (58% of surface PAR). At different time intervals (5, 10, 15, 20, and 40 min), three replicates were removed and fixed in situ with 0.5% of Lugol solution, followed by 2% formaldehyde and drops of 3% sodium thiosulphate to clear the colour (Kemp et al., 1993).

2.4 | Laboratory experiments

We measured the P excretion and egestion of *B. gibbosa* and *D. chilense* following Laspoumaderes et al. (2015). Zooplankton samples were collected with a plankton net (200- μm mesh) by making at least three independent horizontal tows in the central pelagic area of the lake. Individuals of both species were carefully transported in natural lake water (filtered through 55- μm mesh) to the Puerto Blest Biological Station. We placed 10 individuals of *B. gibbosa* or 10 of *D. chilense* in 125-ml beakers (six replicates per each species) filled with Milli-Q water. Due to the extremely low conductivity of Lake Los Cantaros ($<40 \mu\text{S}/\text{cm}$), *D. chilense* and *B. gibbosa* did not show any sign of stress (swimming, body integrity, and/or swelling). However, these excretion data were not used in the model calibration, but only to compare with the model output. After 4 hr, the crustaceans were gently removed with a clean pipette and the water was filtered through acid-washed and pre-combusted (450°C , 2 hr) GF/F Whatman filters. The filters were analysed for total particulate phosphorus and the filtered water for TDP. Finally, the zooplankton individuals were collected and designated for body C and P content analyses.

2.5 | Laboratory determinations

Total phosphorus was determined using unfiltered lake water and TDP was determined using lake water filtered through GF/F filters. Samples for P determination (TDP and TP) were digested with potassium persulphate at 125°C at 1.5 atm for 1 hr. Then, P concentrations were determined with the ascorbate-reduced molybdenum method (APHA, 2005) and absorbance measured in 100 mm cuvettes with a Shimadzu UV2450 dual-beam spectrophotometer (Detection limits: $0.5 \mu\text{g}/\text{L} = 0.016 \mu\text{mol}/\text{L}$).

Total particulate phosphorus from the laboratory excretion experiment was determined on the precombusted and acid-washed GF/F filters. Filters were placed in 45 ml MilliQ water. P content of cladoceran and copepods were obtained placing 10 individuals of each species (previously rinsed in MilliQ water) in 45 ml MilliQ water. In both cases, P concentration was determined as TP.

Zooplankton body C content was obtained by placing individuals separately onto pre-combusted (2 hr at 450°C) GF/F Whatman filters and analysed in a Thermo Finnigan EA 1112 CN elemental analyser (Thermo Scientific).

For bacteria quantification, 3 ml from the field experiment samples were stained with fluorochrome 4', 6-diamidino-2-phenylindole

(DAPI; final concentration 0.2% w/v) according to Porter and Feig (1980). Counting was done on black membrane filters (Poretics, 0.2 μm pore size) at 1,250 \times magnification in an Olympus BX50 epifluorescence microscope (Olympus) using UV light (U-MWU filter). Picocyanobacteria were counted on black polycarbonate filters (Poretics, 0.2 μm pore size) by autofluorescence using the same microscope fitted with blue light (U-MWB filter, Excitation 450–480 nm, Emitter 515 Long Pass, Beam Splitter 500 nm) and green light (U-MWG filter, Excitation: 510–550 nm, Emitter: 590 Long Pass Beam Splitter 570 nm). Finally, a volume of 40 ml was stained with DAPI (final concentration 0.2% w/v) and filtered onto μm black membrane filters (Poretics) for the enumeration of nanoflagellates. Cells were counted by epifluorescence microscopy at 1,250 \times magnification, using both UV and blue and green light (filters as above), to distinguish between heterotrophic nanoflagellates and mixotrophic nanoflagellates. Phytoplankton quantification was performed using an inverted microscope and Utermöhl chambers. An image analyser was used for counting and size measurements (Image Pro Plus, Media Cybernetic). At least 30 cells of each pico- and phytoplankton species were measured and cell biovolume was calculated by approximation to appropriate geometric figures (Sun & Liu, 2003).

Finally, samples from the nanoflagellate bacterivory experiments were stained with DAPI and filtered through 1- μm pore size black polycarbonate filters. The number of ingested FLB per flagellate was assessed with the same epifluorescence microscope by alternating between UV light and blue light. At least 100 flagellates were checked on each filter. Each experimental treatment was run in three replicates and at least three filters were prepared for each replicate. Uptake rates were estimated by the linear regression between time and number of bacteria ingested per cell which was calculated based on the number of FLB and the FLB:bacteria ratio in each replicate (Sherr, 1993). The obtained uptake rates were converted into biomass of prey (mm^3) ingested per biomass of nanoflagellates (mm^3) per day and these data were supplied as prior information for the bacterivory parameters of our mechanistic model.

2.6 | Model description

We developed a mathematical model to represent how contrasting predators change biomass and P quota of their prey through grazing and nutrient recycling. The model was built based on the composition of the natural plankton community of Lake Los Cántaros and our understanding of the trophic relationships within this P-limited environment (Carrillo et al., 2017; Souza et al., 2010; Villar-Argaiz et al., 2018). In our studied system we identified five microbial compartments (i), and two zooplankton components (j). Microbial compartments were ($i = 1$): heterotrophic bacteria $<1 \mu\text{m}$ in maximum length; ($i = 2$): Pcy $<1.5 \mu\text{m}$; ($i = 3$) nanoflagellates 2–10 μm (mainly mixotrophic nanoflagellates *C. parva* and *Pseudopedinella* sp.); ($i = 4$) algae 8–35 μm (mainly *Cyclotella* spp. and *G. paradoxum*), and ($i = 5$) Pcy colonies (CPcy) corresponded to aggregates of 10–12 cells in average reaching 14–15 μm in diameter. The two zooplankton

compartments were the copepod *B. gibbosa* ($j = 1$) and the cladoceran *D. chilensis* ($j = 2$). A list of all variables and parameter with their respective units can be found in Table S1 of the Supplementary Information.

Dissolved P (P) dynamics during the experimental time (t) was fitted with a differential equation:

$$\frac{dP}{dt} = \sum_{i=1}^5 X_i(-V_i + Q_i * m_i) + \sum_{j=1}^2 R_j Z_j \quad (1)$$

where X_i is the biomass of the i th prey compartment, V_i corresponds to P uptake by the i th prey compartment, Q_i is the P quota of the i th compartment, m_i is the mortality rate of i th compartment, thus, $Q_i * m_i$ corresponds to P recycling due to prey death, R_j is the total excretion by j th zooplankton, and Z_j is the abundance of j th zooplankton.

Prey P uptake (V_i) was modelled as a function of P following Michaelis–Menten uptake kinetics:

$$V_i = f_{max_i} \left(\frac{P}{k_i + P} \right) + \sum_{n=1}^2 b_{max_n} \left(\frac{B_n Q_n}{k'_n + B_n Q_n} \right) \quad (2)$$

where f_{max_i} is the maximum nutrient uptake rate of the i th prey compartment and k_i is the half saturation constant. A second Michaelis–Menten term $\sum_{n=1}^2 b_{max_n} \left(\frac{B_n Q_n}{k'_n + B_n Q_n} \right)$ was added to the equation above to account for nanoflagellate P uptake through bacterivory (B_n). Therefore, this term equals zero in the strict osmotrophic compartments (heterotrophic bacteria, Pcy, micro-algae and CPcy).

Furthermore, we modelled prey dynamics (X_i) using the same approach as with P. We fit a differential equation for prey dynamics during the experimental time:

$$\frac{dX_i}{dt} = X_i(u_i - m_i) - B_i X_3 - \sum_{j=1}^2 G_{ij} Z_j \quad (3)$$

where X_i increases according to their growth rate (u_i) and decreases according to their mortality rate (m_i) and their grazing by zooplankton j (G_{ij}). In the case of heterotrophic bacteria (X_1) and Pcy (X_2) dynamics, we added a bacterivory term (B_i) exerted by nanoflagellates (X_3).

Prey growth rate (u_i) was modelled as a function of their cellular P quota using Droop's formulation (Droop, 1968):

$$u_i = \mu_{max_i} \left(1 - \frac{Q_{min_i}}{Q_i} \right) \quad (4)$$

where parameter μ_{max_i} is the maximum growth rate of i th prey and parameter Q_{min_i} is the lower bound of i th prey P quota (Q_i).

Prey P quota (Q_i) increases due to P uptake and declines due to dilution by growth according to Droop's formulation (Droop, 1973):

$$\frac{dQ_i}{dt} = V_i - u_i * Q_i \quad (5)$$

Zooplankton grazing (G_{ij}) on each of the five prey compartments, as well as nanoflagellate bacterivory (B_i) on bacteria and Pcy prey,

were modelled using the classical Holling's type II functional response (Holling, 1959):

$$G_{ij} = \frac{a_{ij}X_i}{1 + a_{ij}h_{ij}X_i} \quad (6)$$

$$B_i = \frac{a'_iX_i}{1 + a'_ih'_iX_i} \quad (7)$$

where parameters a_{ij} correspond to the attack rate and h_{ij} is the handling time of zooplankton species j . Parameters a'_i and h'_i correspond to the attack rate and handling time of nanoflagellates (X_3).

Particularly, for Pcy single-cells and colonies (CPcy) we considered two extra terms of aggregation of Pcy single-cells in response to predation by nanoflagellates and cladocerans (Callieri, 2010). These terms were negative for Pcy (X_2) and positive for CPcy (X_5) according to a decrease and increase in biomass, respectively:

$$\frac{dX_2}{dt} = X_2(u_2 - m_2) - B_2X_3 - B_2X_3ag_{NF} - G_{2,2}Z_2ag_{Cl} - G_{2,2}Z_2 \quad (8)$$

$$\frac{dX_5}{dt} = X_5(u_5 - m_5) + B_2X_3ag_{NF} + G_{2,2}Z_2ag_{Cl} - G_{5,1}Z_1 \quad (9)$$

where parameters ag_{NF} and ag_{Cl} are coefficients for the proportion of aggregated Pcy under grazing pressure by nanoflagellates (B_2X_3) and the cladoceran *D. chilense* ($G_{2,2}Z_2$).

Finally, zooplankton P recycling (R_j) was modelled as a function of their body C:P ratio (CP_j), their grazing rates (G_{ij}) and P quota of their prey (Q_i):

$$R_j = r_jCP_j \sum_{i=1}^5 G_{ij}Q_i \quad (10)$$

where $\sum_{i=1}^5 G_{ij}Q_i$ represents P acquisition of zooplankton j and parameter r_j is a conversion factor for the body C:P ratio. Therefore, r_jCP_j represents the proportion of phosphorus that is not extracted from the ingested prey and is released by zooplankton j (Branco et al., 2020; Elser et al., 1996; Grover, 2004).

2.7 | Model calibration

We fit our model equations with data from the field experiments using Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC). The MCMC technique utilises consecutive model simulations with judicious parameter updating to produce a sample from the prior probability distributions chosen for the model parameters (Haario et al., 2006). Within this Bayesian framework, all the unknown quantities are described by their statistical probability distributions, whether they are model parameters, unknown states of the system in question, or model predictions (Haario et al., 2006;

Malve et al., 2007). To fit the differential equations from our model to the experimental data, we performed a discretisation following the formulation

$$A_{t+dt} = A_t dt \frac{dA}{dt} \quad (11)$$

where A_t correspond to each of our dynamic compartments (P, X_j , and Q) at time step t and is updated to the next time step $t + dt$ by multiplying the actual state by its derivate.

Priors for initial dynamic parameter values were applied, assuming positive half-normal probability distributions (Table S1). Particularly, we choose highly informative priors for prey traits parameters (mortality and growth rates, P affinity and bacterivory rates). Mortality rates for all prey compartments were fixed to 0.1 day⁻¹ according to Branco et al. (2020). Priors for μ_{max} , f_{max} , k , and Q_{min} were obtained from known allometric relationships with cellular size in freshwater phytoplankton (Edwards et al., 2012) and protists and bacteria (Tambi et al., 2009). Priors for bacterivory parameters b_{max} and hr were obtained from the results of the bacterivory experiments. Likewise, priors for the body C:P ratios of zooplankton (CP) were obtained from our own measurement of particulate C and P. On the contrary, we choose non-informative priors for zooplankton attack rates (a) and conversion factor for P recycling (r) assuming half normal distributions of mean $\mu = 0$ and variance $\tau = 1$, thus, posterior values for these parameters were estimated only from our experimental data without previous assumptions. A sample of possible parameter values was obtained with the MCMC algorithm, forming the posterior distribution of the parameter. We checked parameter convergence using five MCMC chains with 2×10^5 iterations each and a burn-in phase of 1×10^5 iterations. Finally, we used parameter posteriors from the model equation to simulate P recycling rates of cladoceran and copepods and prey P quota at $t = 72$ hr. Bayesian analysis and predictions were performed using JAGS (Plummer, 2003) interfaced through R Studio (R Team, 2020).

2.8 | Statistical analysis

From our field experiment results, we performed two-way ANOVA to compare biomass of the prey compartments and dissolved and particulate P concentrations between the treatments (factor with six levels: R Control, R *Diaphanosoma*, R *Boeckella*, R + G Control, R + G *Diaphanosoma* and R + G *Boeckella*) and incubation time (factor with two levels: 24 and 48 hr). When the p -value from the ANOVA was significant, we performed a posteriori Dunnett's tests to determine differences between zooplankton treatments and the control treatments. Finally, to assess zooplankton effect on the quantities estimated by our model (i.e. prey P quotas and zooplankton P recycling rates), we estimated the difference between the posterior distributions of the zooplankton treatments and the control treatments and calculated the proportion of posterior values with the same sign as the mean using JAGS (Plummer, 2003).

3 | RESULTS

3.1 | Field incubation experiments

We found a statistically significant difference in the biomass (mm^3/L) of the different prey compartments between treatments (two-way ANOVA, $p < 0.05$ for all compartments except CPcy, Table S2) and incubation time (two-way ANOVA, $p < 0.01$ for all compartments, Table S2), although the interaction between these terms was not significant. Since no differences between the control R and the control R + G treatments were found at 24 and 48 hr of incubation, they were pooled as *control* for a posteriori comparison with zooplankton treatments. Differences between zooplankton treatments and the control were observed at 48 hr of incubation (Figure 2 lower panel). In the grazing treatments (R + G), the biomass of nanoflagellates and algae were lower in the presence of the copepod *B. gibbosa* (a posteriori Dunnett's test $p = 0.004$ and $p = 0.023$, respectively). The presence of the cladoceran *D. chilense* resulted in lower biomass of heterotrophic bacteria and Pcy (a posteriori Dunnett's test $p = 0.009$ and $p = 0.013$, respectively), higher biomass of CPcy (a posteriori

Dunnett's test $p = 0.023$) and marginally lower biomass of nanoflagellates (a posteriori Dunnett's test $p = 0.088$). Regarding the nutrient recycling treatments (R), the only significant effect for the indirect presence of *B. gibbosa* was for CPcy (a posteriori Dunnett's test $p = 0.021$). Similarly, no significant differences in prey abundance were observed between the indirect presence of the cladoceran *D. chilense* and the control. Furthermore, similar patterns were observed at 24 hr of incubation, that is, no significant differences between the zooplankton treatments and the control were detected (Figure 2 upper panel).

During the experiments, the colony size of CPcy (cells/colony) increased after 48 hr of incubation related to *D. chilense* predation (Figure 3). Colony size was different between treatments (two-way ANOVA, $p < 0.001$, Table S2) and incubation time (two-way ANOVA, $p = 0.002$, Table S2), and the interaction between these two terms was significant (two-way ANOVA, $p = 0.016$, Table S2). Compared to the control with no zooplankton, the number of cells per colony was higher in the R + G treatment with direct presence of *D. chilense* (a posteriori Dunnett's test $p = 0.008$). In addition, we observed a statistically marginal decrease in the number of cells per colony in

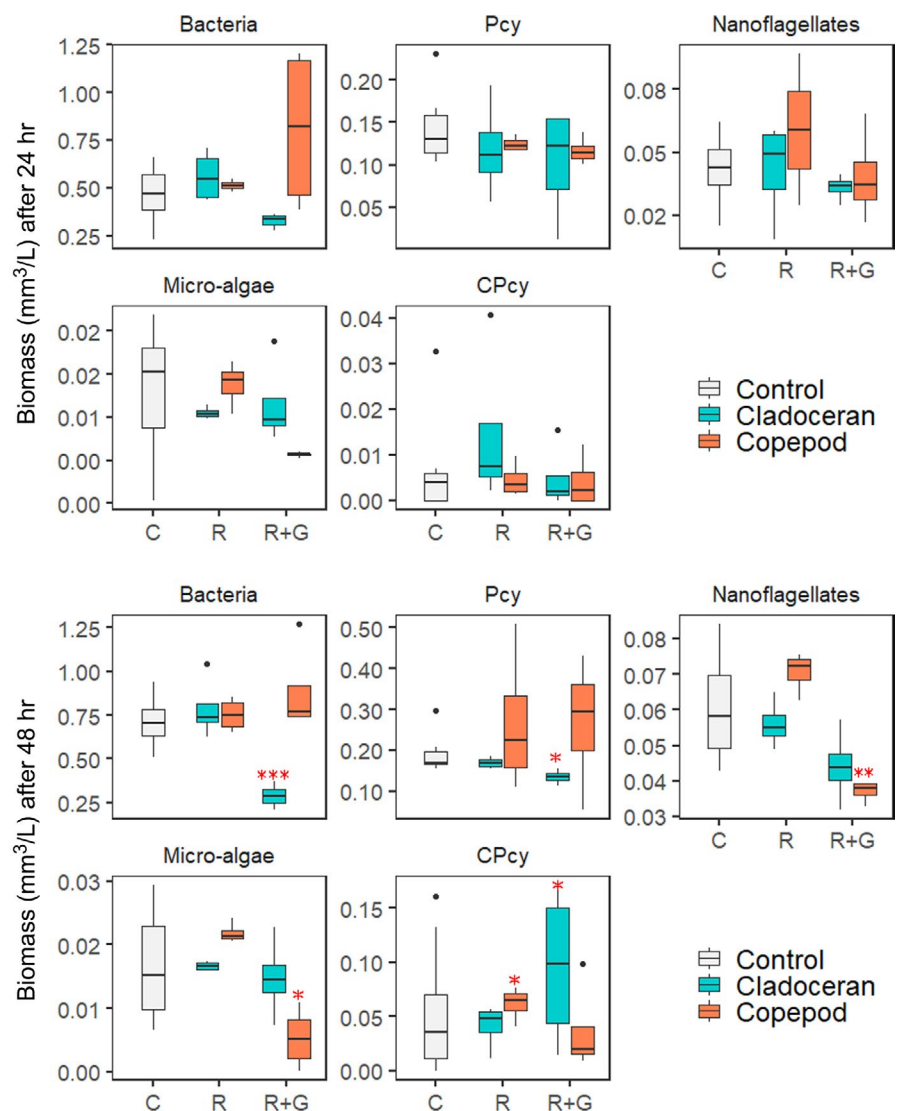


FIGURE 2 Biomass after 24- and 48-hr incubation of the five prey compartments under the direct and indirect presence of the cladoceran *Diaphanosoma chilense* and the copepod *Boeckella gibbosa*. C = control treatments with no zooplankton (R and R + G pooled together); R = recycling treatments with zooplankton and prey separated by dialysis bags; R + G = grazing treatment with direct contact between zooplankton and prey. Black dots correspond to outliers and red asterisks represent significant differences of the zooplankton treatments with the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

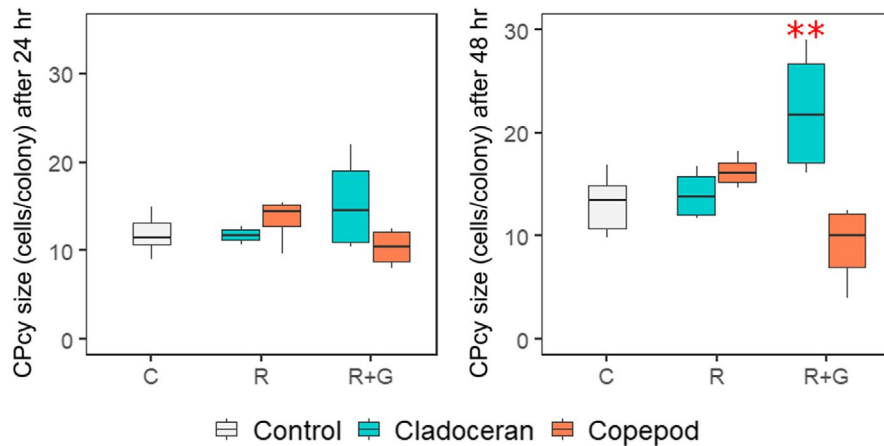


FIGURE 3 Picoplanktonic cyanobacteria colony (CPcy) sizes under the direct and indirect presence of the cladoceran *Diaphanosoma chilense* and the copepod *Boeckella gibbosa*. C = control treatments with no zooplankton (R and R + G pooled together); R = recycling treatments with zooplankton and prey separated by dialysis bags; R + G = grazing treatment with direct contact between zooplankton and prey. Black dots correspond to outliers and red asterisks represent significant differences of the zooplankton treatments with the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

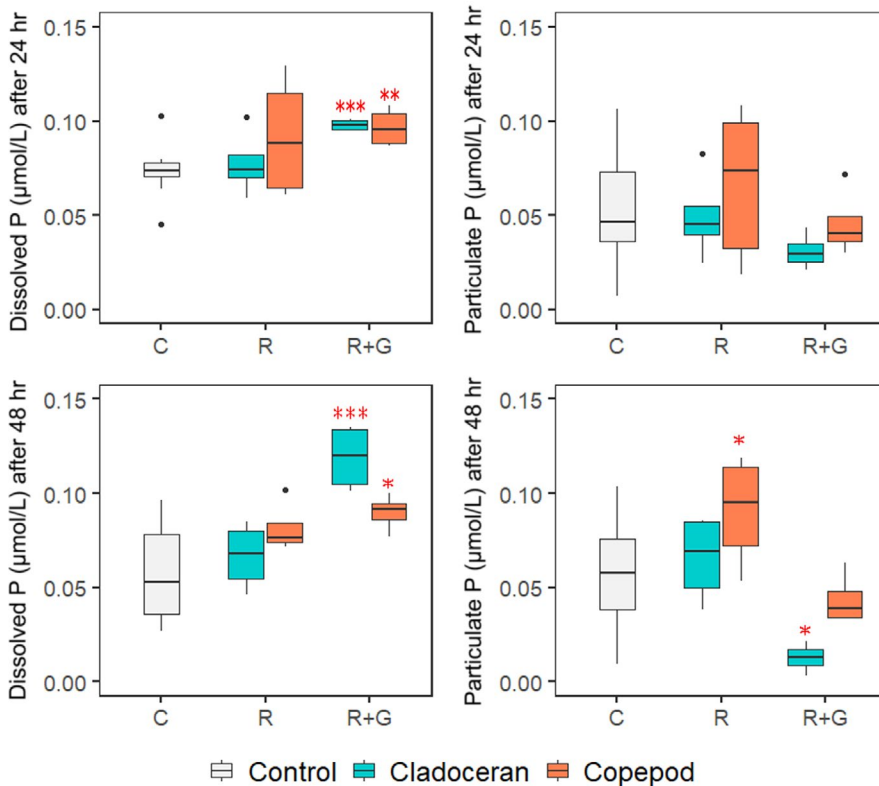


FIGURE 4 Dissolved and particulate phosphorus concentration after 24- and 48-hr incubation under the direct and indirect presence of the cladoceran *Diaphanosoma chilense* and the copepod *Boeckella gibbosa*. C = control treatments with no zooplankton (R and R + G pooled together); R = recycling treatment with zooplankton and prey separated by dialysis bags; R + G = grazing treatment with direct contact between zooplankton and prey. Black dots correspond to outliers and red asterisks represent significant differences of the zooplankton treatments with the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

the R + G treatment with direct presence of *B. gibbosa* (a posteriori Dunnett's test $p = 0.077$).

The concentration of dissolved and particulate P (μmol/L) differed among treatments (two-way ANOVA, $p < 0.001$, Table S2) and the interaction between treatments and incubation time was significant only for dissolved P (two-way ANOVA, $p = 0.033$, Table S2). Since no differences between the control R and the control R + G treatments were found at 24 and 48 hr of incubation, they were pooled as a control for a posteriori comparison with zooplankton treatments. Dissolved P at 48 hr of incubation in the

R + G treatments was higher than the control, especially with *D. chilense* (a posteriori Dunnett's test $p < 0.001$ for *D. chilense* and $p = 0.037$ for *B. gibbosa*, Figure 4 lower panel). These increases were also significant at 24 hr of incubation (a posteriori Dunnett's test $p = 0.022$ for *D. chilense* and $p = 0.034$ for *B. gibbosa* at 48 hr, Figure 4 upper panel). By contrast, particulate P at 48 hr of incubation in the R + G treatment with the presence of *D. chilense* was lower than the control (a posteriori Dunnett's test $p = 0.027$) and higher in the R treatment with indirect presence of *B. gibbosa* (a posteriori Dunnett's test $p = 0.049$). Finally, no differences

between the R treatment with indirect presence of *D. chilense* and the control were found for dissolved and particulate P.

3.2 | Field nanoflagellate bacterivory experiments

In the bacterivory experiments, we observed that more than 70% of nanoflagellates ingested FLB. The number of FLB ingested increased with incubation time reaching a maximum of 0.64 ± 0.08 FLB/flagellate at 15 min. The uptake rate was 1.25 ± 0.36 FLB flagellate⁻¹ hr⁻¹. Moreover, picoplankton (heterotrophic bacteria and Pcy) abundance in these experiments was $1.07 \times 10^6 \pm 0.49 \times 10^5$ cells/ml, corresponding to a biomass of 0.44 ± 0.12 mm³/L. By contrast, nanoflagellates abundance was $2.32 \times 10^2 \pm 1.12 \times 10^1$ cells/ml corresponding to a biomass of 0.05 ± 0.004 mm³/L. We used these values to calculate the uptake rate in terms of the relative biomass (mm³) of the predator (nanoflagellates) and prey (picoplankton). The uptake rate obtained was 0.73 ± 0.25 day⁻¹ (Table S1).

3.3 | The model

Grazing rates in the five prey compartments estimated by the model differed between cladocerans and copepods (Figure 4). *Diaphanosoma chilense* grazing pressure (in terms % of the total biomass reduced per individual) was higher on heterotrophic bacteria and Pcy than nanoflagellates and algae (Figure 5 upper panel, Table S3). Accordingly, *D. chilense* prey size ranged from 0.8 to c. 18 μm with a higher contribution of small cells of ≤2 μm (Figure 5 lower panel). Contrastingly, *B. gibbosa* grazing pressure was considerably high for nanoflagellates and micro-algae (Figure 5 upper panel, Table S3). *Boeckella gibbosa* prey size ranged from 5 to c. 35 μm with a higher contribution of medium-sized cells from c. 9 to c. 14 μm (Figure 5 lower panel). The grazing rate on nanoflagellates in particular was higher in copepods than in cladocerans, and a low grazing rate was detected on CPcy by *B. gibbosa* (Figure 5 upper panel, Table S3).

Model estimated bacterivory by nanoflagellates on heterotrophic bacteria and Pcy was 0.966 ± 0.016 and 0.199 ± 0.003 mm³ prey mm⁻³ flagellate day⁻¹, respectively, which is equivalent to 265.3 ± 5.2 and 24.8 ± 0.4 cell flagellate⁻¹ day⁻¹, respectively. Both bacterivory and osmotrophy were considered in our model dynamics for P uptake by nanoflagellates (Equation 2), and we found that nanoflagellates' P uptake was higher through bacterivory than osmotrophy (0.13 ± 0.05 and 0.02 ± 0.01 μmol P mm⁻³ day⁻¹, respectively).

In the model dynamics of CPcy (Equation 9), we considered that colonies can increase by reproduction of cells within colonies and by the aggregation of single cells induced by predation. Thus, in the equation we have three terms of increase, one by reproduction and two as a response to predation (one for nanoflagellates and another for *D. chilense*). We found that both terms for aggregation (nanoflagellates = 0.0027 ± 0.0015 and *D. chilense* = 0.0096 ± 0.0032 mm³/

day) were higher than reproduction of cells within the colonies (0.0019 ± 0.0029 mm³/day).

Prey P quota (Q , nmol/mm³) estimated by the model showed differences between zooplankton treatments and the control at 48 hr (Figure 6 upper panel). Estimated Q for all the strict osmotrophic prey compartments (heterotrophic bacteria, Pcy, micro-algae, and CPcy) were higher in the R + G treatments of both zooplankton taxa (99.9% of their posterior probability higher than the control treatments, Table S4). By contrast, estimated Q for mixotrophic nanoflagellates was higher under the direct presence of *B. gibbosa* (91.3% of their posterior probability higher than the control treatments, Table S4), but lower under the direct presence of *D. chilense* (78.9% of their posterior probability lower than the control treatments, Table S4). In addition, we performed model predictions for P quota at 72 hr of incubation from the final prey biomass and dissolved P conditions of our field experiments at 48 hr. We found similar patterns to those observed at 48 hr but more pronounced. Particularly, the *B. gibbosa* R treatment showed less variation and higher differences from the control in the case of micro-algae (81.3% of their posterior probability higher than the control treatments, Table S4) and CPcy (82.4% of their posterior probability higher than the control treatments, Table S4). Finally, greater differences in the predicted prey P quotas at 72 hr were found between copepods and cladocerans in the R + G treatments (Figure 6 lower panel).

Model estimated P acquisition rates ($\sum_{i=1}^5 G_{ij}Q_i$ from Equation 10), as occurred in grazing rates, were different between copepods and cladocerans. P acquisition rate was higher for *D. chilense* than *B. gibbosa* (2.21 ± 0.16 and 1.29 ± 0.11 nmol P/day, respectively). For the copepod *B. gibbosa*, P acquisition rates by grazing on CPcy, micro-algae and nanoflagellates were 0.03 ± 0.01 , 0.82 ± 0.09 , and 0.47 ± 0.06 nmol P/day, respectively, representing 2%, 62%, and 36% of their P acquisition. For the cladoceran *D. chilense*, P acquisition rates by grazing on heterotrophic bacteria, Pcy, nanoflagellates and micro-algae were 1.28 ± 0.12 , 0.36 ± 0.04 , 0.30 ± 0.07 , and 0.27 ± 0.03 nmol P/day, respectively, representing 58%, 16%, 14%, and 12% of their P acquisition.

3.4 | Laboratory experiments and model predictions of excretion rates

We obtained body C and P contents of copepods and cladocerans from our laboratory experiments, and C:P molar ratios were 237.25 ± 26.50 for *B. gibbosa* and 73.85 ± 13.77 for *D. chilense*. These values were supplied to our model as prior information for the parameter CP to estimate the proportion of P released by zooplankton together with the conversion factor r (r_{jCP_j} from Equation 10). Posterior values for the parameter r were very similar between copepods and cladocerans (>99.9% overlap between their posterior probabilities, Table S3).

The predictive value of our model was tested by comparing model estimations of P excretion rates with results from the independent excretion laboratory experiments. P excretion rates

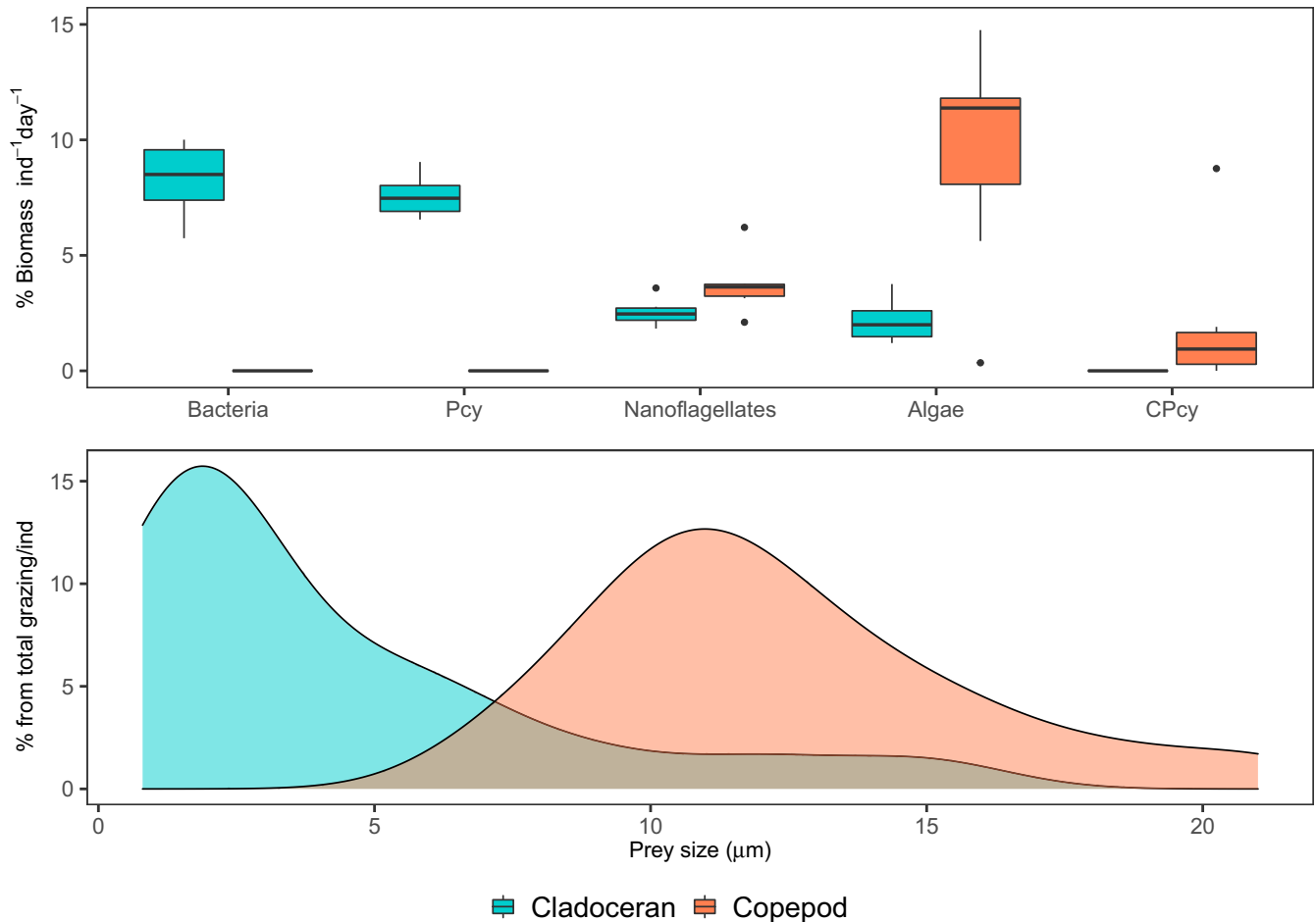


FIGURE 5 Model-estimated grazing rates on the different prey compartments by the cladoceran *Diaphanosoma chilense* (blue) and the copepod *Boeckella gibbosa* (red). Top panel shows zooplankton per capita grazing as % consumed from total prey biomass and bottom panel shows the size (diameter) range of consumed prey. Black dots correspond to outliers

obtained experimentally indicated that copepods release more P (1.71 times) than cladocerans (Figure 7 white boxes). Although these experimental data were not used for model calibration, the model predicted similar results. Noticeably, P excretion rates estimated by our model (Equation 10) showed the same pattern: copepods excreted 1.65 times more P than cladocerans (Figure 7 grey boxes).

3.5 | Conceptual synthesis

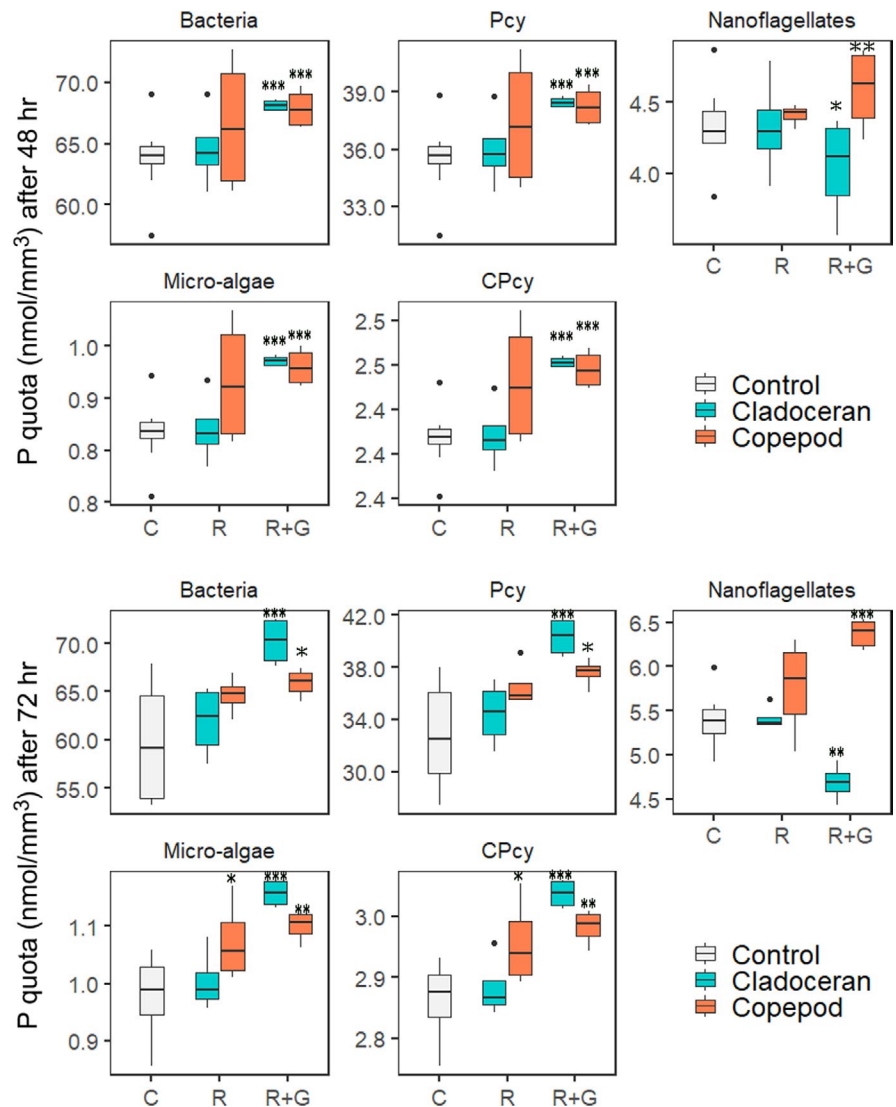
Our experimental results and the mechanistic model developed pointed out that the contrasting feeding strategies and P recycling observed for *B. gibbosa* and *D. chilense* differentially shape the abundance and nutritional quality of lower trophic planktonic levels (Figure 8). Prey biomass under the indirect presence of *B. gibbosa* (Figure 8a) increased significantly for CPcy, while P quota increased significantly for CPcy and micro-algae. Similarly, the indirect presence of *D. chilense* (Figure 8c) did not induce changes in prey biomass and P quota. The direct presence of *B. gibbosa* (Figure 8b) increased the P quota of all prey compartments, especially for nanoflagellates, but reduced the biomass of nanoflagellates and micro-algae. Also,

the direct presence of *D. chilense* (Figure 8d) sharply reduced biomass of heterotrophic bacteria and single-cell Pcy, increased CPcy biomass, but did not change the biomass of nanoflagellates and micro-algae. In addition, the direct presence of *D. chilense* (Figure 8d) sharply increased the P quota of heterotrophic bacteria, Pcy, CPcy and micro-algae but reduced the P quota of nanoflagellates.

4 | DISCUSSION

The outcomes of predator-prey interactions respond to multiple direct and indirect effects, such as consumption of prey and nutrient supply for them through excretion (Branco et al., 2018; Schmitz et al., 2010). Here, we present a model that generalises the effect of zooplankton on lower trophic levels with contrasting strategies in terms of grazing and P recycling. Our Bayesian modelling approach allowed us to estimate these variables based on our experimental results and prior information of P utilisation traits (Edwards et al., 2012) and growth rate of the microbial compartments and phytoplankton (Tambi et al., 2009). Moreover, from the observed dynamics of prey biomass and dissolved and particulate P concentration, we were able

FIGURE 6 Model-estimated prey P quota after 48- and 72-hr incubation of the five prey compartments under the direct and indirect presence of the cladoceran *Diaphanosoma chilense* and the copepod *Boeckella gibbosa*. C = control treatments with no zooplankton (R and R + G pooled together); R = recycling treatments with zooplankton and prey separated by dialysis bags; R + G = grazing treatment with direct contact between zooplankton and prey. Black dots correspond to outliers and black asterisks represent differences between the posterior probability distributions of the zooplankton treatments and the control where more than 75% has the same sign as the mean posterior difference (* > 99%, ** > 90%, *** > 75%)



to estimate the non-observed dynamics of prey P quota and predict zooplankton P acquisition and excretion rates.

Our model was able to predict zooplankton P acquisition and excretion rates based on the results of our field experiment and body C:P ratios. P excretion rate was higher for the copepod *B. gibbosa* than the cladoceran *D. chilense*, as expected from the ecological stoichiometry theory and empirical evidence (Hébert et al., 2017; Sterner & Elser, 2002). Although we did not provide prior information on different P excretion rates for these zooplankton, our model results showed similar values to those independently obtained in the laboratory experiments. Therefore, we showed that indirect predator–prey interactions, which are usually difficult to measure in the field, such as nutrient excretion rates, can be assessed by modelling more conspicuous variables, such as prey biomass, nutrient concentration, and zooplankton C:P ratios. Moreover, according to our model, grazing on different prey results in a higher P acquisition for cladocerans than copepods, despite P release being higher in the latter. For the copepod *B. gibbosa*, P acquisition is given by grazing on nanoflagellates and larger phytoplankton species such as diatoms and dinoflagellates, which have lower P quotas than small cells. On

the contrary, P acquisition for the cladoceran *D. chilense* was given by high grazing rates on P-rich picoplankton rather than larger cells.

The contrasting feeding strategies of copepods and cladocerans differentially shape the microbial community and the interactions within it (Vrede & Vrede, 2005; Zöllner et al., 2003). According to our expectations, we found experimentally that direct presence of the copepod *B. gibbosa* reduced the biomass of the large prey compartments (nanoflagellates and micro-algae) while the cladoceran *D. chilense* reduced the biomass of the small compartments (heterotrophic bacteria and Pcy). Grazing on different prey sizes probably allows two planktonic species to co-occur (Sommer & Stibor, 2002). Bacterial production is linked to copepods through protists (Sommer & Sommer, 2006), and this was the case for *B. gibbosa*, which showed high grazing rates on bacterivorous nanoflagellates. However, the high grazing efficiency of *D. chilense* on picoplankton represents a shortcut for their high P requirement in an oligotrophic P-limited lake. In addition, the position of *D. chilense* as an omnivore would increase the connectance and stability of the food web (Kratina et al., 2012) particularly in low productivity systems (France, 2012). Moreover, our results and the outputs of our model imply that the

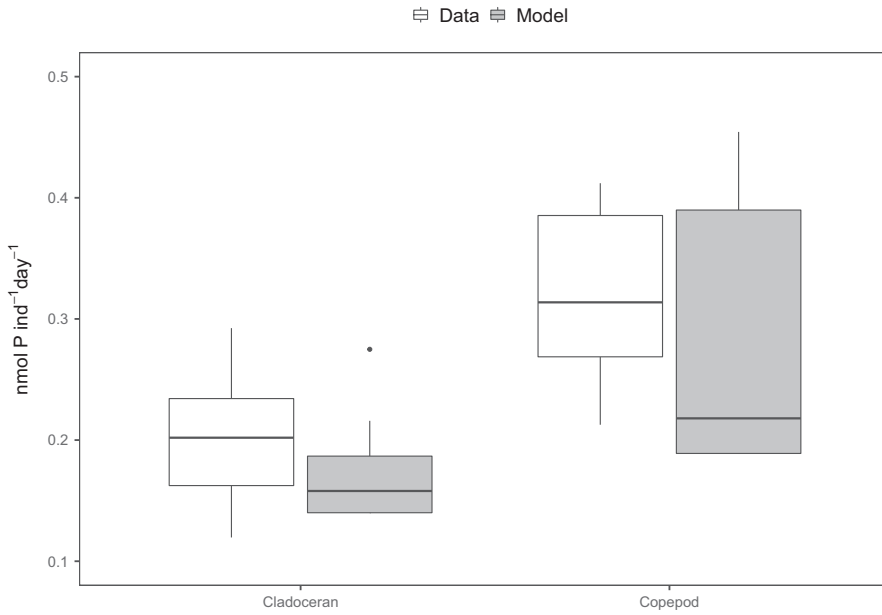


FIGURE 7 Phosphorus recycling rates of the cladoceran *Diaphanosoma chilense* and the copepod *Boeckella gibbosa* obtained in the excretion experiments (white boxes) and estimated by the model (grey boxes)

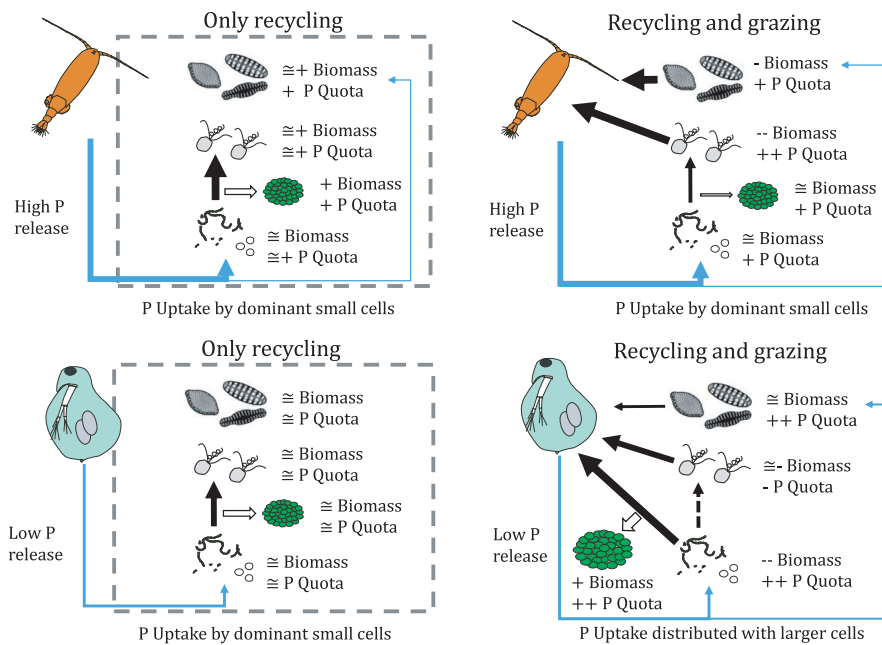


FIGURE 8 Conceptual synthesis of the direct and indirect effects of the copepod *Boeckella gibbosa* and the cladoceran *Diaphanosoma chilense* on the different microbial compartments through grazing and nutrient recycling. The arrows size suggests the strength of the interaction according to our experimental results and model predictions. Black arrows represent grazing, white arrows represent picoplanktonic cyanobacteria aggregation in colonies. The symbols accompanying biomass and P quota indicate differences from the control (no zooplankton treatments): \cong no appreciable changes; $\cong +$ increasing trend; $+$ significant increase; $++$ high increase; $\cong -$ decreasing trend; $-$ significant decrease; $--$ high decrease

strong negative effect of *D. chilense* on mixotrophic nanoflagellates is through competition for picoplanktonic prey rather than direct grazing.

Bacterivorous protists are considered a key link between bacterial production and higher consumers (Gaedke et al., 2002; Yvon-Durocher et al., 2017). We found that the main P uptake in nanoflagellates is through bacterivory. Accordingly, P quota of nanoflagellates followed a different path than the other osmotrophic

compartments considered in our model. This situation is expected since this group was dominated by highly bacterivorous mixotrophic species (i.e. *C. parva*). The highest P quota of nanoflagellates was found under the direct presence of *B. gibbosa*, where picoplankton biomass increased due to a high P recycling with a concomitant decrease in nanoflagellate biomass due to grazing. On the contrary, the lowest P quota of nanoflagellates was found in the direct presence of *D. chilense*, which reduced picoplankton biomass, therefore

limiting the main P source for nanoflagellates. These results place mixotrophic nanoflagellates, in terms of their P quota, as a highly sensitive compartment, affected by differential zooplankton grazing and nutrient recycling. Current models of planktonic food webs identify mixotrophy as a key interaction affected by environmental variables such as light, turbidity, and dissolved nutrients (Fischer et al., 2017; Schenone et al., 2020). As light decreases and nutrients increase, an increase in osmotrophy over phagotrophy in mixotrophic protists was predicted by mechanistic models (Berge et al., 2017; Mitra et al., 2016) as well as experimental and field observations (Fischer et al., 2017; Ptacnik et al., 2004; Waibel et al., 2019). In this continuum of feeding strategies, the relative importance of phagotrophy over osmotrophy in P uptake will also vary. Thus, our result that nanoflagellate bacterivory P uptake exceeds osmotrophy is not generalisable. However, our model allows us to disentangle and distinguish between these two pathways in P uptake.

The ability to store internal P is a key trait within the planktonic microbial loop and phytoplankton in P-limited systems (Edwards et al., 2012; Tambi et al., 2009). The model-estimated P quota for the strictly osmotrophic prey compartments (heterotrophic bacteria, Pcy, CPcy, and micro-algae) increased in all zooplankton treatments except for the indirect presence of *D. chilense*. According to this, prey P quota increases with direct presence of both copepods and cladocerans, however, the underlying mechanisms are different. Predators can increase the nutrient quality of the overall prey community by increasing the availability of the limiting nutrient, but also by grazing upon the best competitors for this nutrient (Sterner & Elser, 2002; Vrede & Vrede, 2005). *Boeckella gibbosa* increased prey P quota indirectly by releasing more P to the environment and thus both direct and indirect presence had similar effects. *D. chilense* increased prey P quota only directly by grazing on picoplankton, the best competitors for P (Tambi et al., 2009). Such findings suggest that, despite being considered as a P sink due to their higher requirement for this element (Elser & Urabe, 1999), highly bacterivorous cladocerans can mediate the P flux between bacteria and phytoplankton in P-limited systems (Pomati et al., 2020).

Finally, we also found an increase of CPcy biomass with the direct presence of *D. chilense* and under nanoflagellate bacterivory. Aggregation is a strategy for small cells to escape from predation by increasing their size and thus the handling time of the predator (Boenigk & Arndt, 2002; Huber et al., 2017). Moreover, the presence of a gelatinous matrix in larger CPcy acts as an effective anti-grazing agent (Callieri, 2010). However, P affinity decreases with size (Edwards et al., 2012) thus aggregation would imply a trade-off between grazing avoidance and acquisition of essential nutrients. The high grazing pressure exerted by the cladoceran *D. chilense*, which can access bigger particles than nanoflagellates, triggered larger colony sizes. Accordingly, model-estimated biomass increments by aggregation were higher than intrinsic growth and higher for *D. chilense* than for nanoflagellates. In addition, the slight decrease in CPcy biomass and number of cells per colony found under the direct presence of the copepod *B. gibbosa* was probably more related to a top-down control on nanoflagellates

than direct grazing. Together with an observed increase of Pcy and heterotrophic bacteria in this treatment, these results support the idea that top-down control by copepods on bacterivorous protozoans favours the small and single-cell picoplankton (Callieri, 2010; Vrede & Vrede, 2005).

Currently, there is a gradient in planktonic food web models from more conceptual (Branco et al., 2020; Loladze et al., 2000) to experimental models (Gaedke et al., 2002; Rogers et al., 2020). Consequently, modelling approaches combining mechanistic models with accurate experiments within a proper statistical framework are arising (Lignell et al., 2013; Rosenbaum et al., 2019). In this work, we studied how the microbial community is structured in the short term by two important members of the zooplankton. Copepods and cladocerans constitute the dominant zooplankton groups in lakes and their dominance fluctuates seasonally, depending on conditions such as temperature, turbidity, and nutrient concentration (Gliwicz & Pijanowska, 1989; Laspoumaderes et al., 2013; Schaffner et al., 2019). According to our model results, copepods would favour higher P acquisition rates for cladocerans by releasing more P for picoplankton. By contrast, cladocerans would have a mixed effect on the main food items of copepods by increasing P quotas of the strictly osmotrophic algae but decreasing P quotas of mixotrophic nanoflagellates. The model presented here could be used to disentangle complex pathways in the microbial food web. In this sense, the relative importance of phagotrophy and osmotrophy in P uptake, P quotas and nutrient recycling by grazers are important variables that can be assessed quantitatively with our model. These are key variables for understanding ecosystem matter flux and resource use efficiency.

ACKNOWLEDGMENTS

L.S. is a CONICET fellowship, all other authors are CONICET researchers, and C.L. was supported by the Alexander von Humboldt Foundation. This work was supported by the Fondo Para la Investigación Científica y Tecnológica Argentina (FONCYT), PICT 2017-1940, PICT 2018-1563, CONICET PUE2016-0008. Sampling and experiments were conducted with permission N°734 by Administración Parques Nacionales, Argentina.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.S., E.B., and B.M. conceived the study, designed experiments, analysed data and wrote the manuscript. L.S. carried out the experiments and laboratory determination and developed the model. N.M., M.B.N., and C.L. carried out experiments and laboratory determinations. All authors contributed to the final manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All the data generated during and/or analysed during the current study will be available at the Universidad Nacional del Comahue data repository <http://rdi.uncoma.edu.ar/handle/123456789/16092>

ORCID

- Luca Schenone  <https://orcid.org/0000-0003-3025-7133>
- Beatriz Modenutti  <https://orcid.org/0000-0002-8683-5679>
- Nicolás Martyniuk  <https://orcid.org/0000-0002-2423-7040>
- Marcela Bastidas Navarro  <https://orcid.org/0000-0002-6558-0451>
- Cecilia Laspoumaderes  <https://orcid.org/0000-0001-7790-2975>
- Esteban Balseiro  <https://orcid.org/0000-0002-5052-0587>

REFERENCES

- Anderson, T. R. (2005). Plankton functional type modelling: Running before we can walk? *Journal of Plankton Research*, 27, 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi076>
- APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, AWWA.
- Arhonditsis, G. B., Papantou, D., Zhang, W., Perhar, G., Massos, E., & Shi, M. (2008). Bayesian calibration of mechanistic aquatic biogeochemical models and benefits for environmental management. *Journal of Marine Systems*, 73, 8–30. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.07.004>
- Atkinson, C. L., Capps, K. A., Rugenski, A. T., & Vanni, M. J. (2017). Consumer-driven nutrient dynamics in freshwater ecosystems: From individuals to ecosystems. *Biological Reviews*, 92, 2003–2023. <https://doi.org/10.1111/brv.12318>
- Attayde, J. L., & Hansson, L.-A. (1999). Effects of nutrient recycling by zooplankton and fish on phytoplankton communities. *Oecologia*, 121, 47–54. <https://doi.org/10.1007/s004420050906>
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J., Meyer-Reil, L., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257–263. <https://doi.org/10.3354/meps010257>
- Balseiro, E. G., Modenutti, B. E., & Queimalfiños, C. P. (1997). Nutrient recycling and shifts in N:P ratio by different zooplankton structures in a South Andes lake. *Journal of Plankton Research*, 19, 805–817. <https://doi.org/10.1093/plankt/19.7.805>
- Balseiro, E. G., Modenutti, B. E., & Queimalfiños, C. P. (2001). Feeding of *Boeckella gracilipes* (Copepoda, Calanoida) on ciliates and phytoflagellates in an ultraoligotrophic Andean lake. *Journal of Plankton Research*, 23, 849–857. <https://doi.org/10.1093/plankt/23.8.849>
- Berge, T., Chakraborty, S., Hansen, P. J., & Andersen, K. H. (2017). Modeling succession of key resource-harvesting traits of mixotrophic plankton. *The ISME Journal*, 11, 212–223. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.92>
- Boenigk, J., & Arndt, H. (2002). Bacterivory by heterotrophic flagellates: Community structure and feeding strategies. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 465–480.
- Branco, P., Egas, M., Elser, J. J., & Huisman, J. (2018). Eco-evolutionary dynamics of ecological stoichiometry in plankton communities. *The American Naturalist*, 192, E1–E20. <https://doi.org/10.1086/697472>
- Branco, P., Egas, M., Hall, S. R., & Huisman, J. (2020). Why do phytoplankton evolve large size in response to grazing? *The American Naturalist*, 195, E20–E37. <https://doi.org/10.1086/706251>
- Brendelberger, H. (1991). Filter mesh size of cladocerans predicts retention efficiency for bacteria. *Limnology and Oceanography*, 36, 884–894. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.5.0884>
- Burns, C. W., & Schallenberg, M. (1996). Relative impacts of copepods, cladocerans and nutrients on the microbial food web of a mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 18, 683–714. <https://doi.org/10.1093/plankt/18.5.683>
- Callieri, C. (2010). Single cells and microcolonies of freshwater picocyanobacteria: A common ecology. *Journal of Limnology*, 69, 257. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2010.257>
- Carrillo, P., Medina-Sánchez, J., Villar-Argaiz, M., Bullejos, F., Durán, C., Bastidas-Navarro, M., ... Modenutti, B. E. (2017). Vulnerability of mixotrophic algae to nutrient pulses and UVR in an oligotrophic Southern and Northern Hemisphere lake. *Scientific Reports*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06279-9>
- Clark, J. S. (2005). Why environmental scientists are becoming Bayesians. *Ecology Letters*, 8, 2–14. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00702.x>
- Cotner, J. B., & Biddanda, B. A. (2002). Small players, large role: Microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems*, 5, 105–121. <https://doi.org/10.1007/s10021-001-0059-3>
- Droop, M. R. (1968). Vitamin B12 and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 48, 689–733.
- Droop, M. R. (1973). Some thoughts on nutrient limitation in algae 1. *Journal of Phycology*, 9, 264–272.
- Edwards, K. F., Thomas, M. K., Klausmeier, C. A., & Litchman, E. (2012). Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 57, 554–566. <https://doi.org/10.4319/lo.2012.57.2.0554>
- Elser, J. J., Dobberfuhl, D. R., MacKay, N. A., & Schampel, J. H. (1996). Organism size, life history, and N:P stoichiometry: Toward a unified view of cellular and ecosystem processes. *BioScience*, 46, 674–684. <https://doi.org/10.2307/1312897>
- Elser, J. J., Elser, M. M., MacKay, N. A., & Carpenter, S. R. (1988). Zooplankton-mediated transitions between N- and P-limited algal growth 1. *Limnology and Oceanography*, 33, 1–14. <https://doi.org/10.4319/lo.1988.33.1.0001>
- Elser, J. J., & Urabe, J. (1999). The stoichiometry of consumer-driven nutrient recycling: Theory, observations, and consequences. *Ecology*, 80, 735–751.
- Fischer, R., Giebel, H. A., Hillebrand, H., & Ptacnik, R. (2017). Importance of mixotrophic bacterivory can be predicted by light and loss rates. *Oikos*, 126, 713–722. <https://doi.org/10.1111/oik.03539>
- France, R. L. (2012). Omnivory, vertical food-web structure and system productivity: Stable isotope analysis of freshwater planktonic food webs. *Freshwater Biology*, 57, 787–794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02744.x>
- Gaedke, U., Hochstädtler, S., & Straille, D. (2002). Interplay between energy limitation and nutritional deficiency: Empirical data and food web models. *Ecological Monographs*, 72, 251–270.
- Gliwicz, Z. M., & Pijanowska, J. (1989). The role of predation in zooplankton succession. In U. Sommer (Eds.), *Plankton ecology: succession in plankton communities* (pp. 253–296). Springer.
- Gophen, M., & Geller, W. (1984). Filter mesh size and food particle uptake by *Daphnia*. *Oecologia*, 64, 408–412. <https://doi.org/10.1007/BF00379140>
- Grover, J. P. (2004). Predation, competition, and nutrient recycling: A stoichiometric approach with multiple nutrients. *Journal of Theoretical Biology*, 229, 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.03.001>
- Haario, H., Laine, M., Mira, A., & Saksman, E. (2006). DRAM: Efficient adaptive MCMC. *Statistics and Computing*, 16, 339–354. <https://doi.org/10.1007/s11222-006-9438-0>
- Hébert, M.-P., Beisner, B. E., & Maranger, R. (2017). Linking zooplankton communities to ecosystem functioning: Toward an effect-trait framework. *Journal of Plankton Research*, 39, 3–12. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw068>
- Hessen, D., Andersen, T., & Faafeng, B. (1992). Zooplankton contribution to particulate phosphorus and nitrogen in lakes. *Journal of Plankton Research*, 14, 937–947. <https://doi.org/10.1093/plankt/14.7.937>
- Holling, C. S. (1959). Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Canadian Entomologist*, 91, 385–398. <https://doi.org/10.4039/Ent91385-7>

- Huber, P., Diotallevi, N., Ferraro, M., Metz, S., Lagomarsino, L., Llamas, M. E., Royo-Llonch, M., ... Acinas, S. G. (2017). Phenotypic plasticity in freshwater picocyanobacteria. *Environmental Microbiology*, *19*, 1120–1133.
- Jürgens, K. (1994). Impact of *Daphnia* on planktonic microbial food webs—A review. *Marine Microbial Food Webs*, *8*, 295–324.
- Kemp, P. F., Cole, J. J., Sherr, B. F., & Sherr, E. B. (1993). *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. CRC Press.
- Kratina, P., LeCraw, R. M., Ingram, T., & Anholt, B. R. (2012). Stability and persistence of food webs with omnivory: Is there a general pattern? *Ecosphere*, *3*, 1–18. <https://doi.org/10.1890/ES12-00121.1>
- Laspoumaderes, C., Modenutti, B., Elser, J. J., & Balseiro, E. (2015). Does the stoichiometric carbon: Phosphorus knife edge apply for predaceous copepods? *Oecologia*, *178*, 557–569. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3155-8>
- Laspoumaderes, C., Modenutti, B. E., Souza, M. S., Bastidas Navarro, M., Cuassolo, F., & Balseiro, E. G. (2013). Glacier melting and stoichiometric implications for lake community structure: Zooplankton species distributions across a natural light gradient. *Global Change Biology*, *19*, 316–326. <https://doi.org/10.1111/gcb.12040>
- Li, Y., Gal, G., Makler-Pick, V., Waite, A., Bruce, L., & Hipsey, M. (2014). Examination of the role of the microbial loop in regulating lake nutrient stoichiometry and phytoplankton dynamics. *Biogeosciences*, *11*, 2939–2960. <https://doi.org/10.5194/bg-11-2939-2014>
- Lignell, R., Haario, H., Laine, M., & Thingstad, T. F. (2013). Getting the “right” parameter values for models of the pelagic microbial food web. *Limnology and Oceanography*, *58*, 301–313. <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.1.0301>
- Loladze, I., Kuang, Y., & Elser, J. J. (2000). Stoichiometry in producer-grazer systems: Linking energy flow with element cycling. *Bulletin of Mathematical Biology*, *62*, 1137–1162. <https://doi.org/10.1006/bulm.2000.0201>
- Loreau, M., & De Mazancourt, C. (2013). Biodiversity and ecosystem stability: A synthesis of underlying mechanisms. *Ecology Letters*, *16*, 106–115. <https://doi.org/10.1111/ele.12073>
- Malve, O., Laine, M., Haario, H., Kirkkala, T., & Sarvala, J. (2007). Bayesian modelling of algal mass occurrences—Using adaptive MCMC methods with a lake water quality model. *Environmental Modelling & Software*, *22*, 966–977. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2006.06.016>
- Markert, B., Pedrozo, F., Geller, W., Friese, K., Korhammer, S., Baffico, G., Diaz, M., & Wolf, S. (1997). A contribution to the study of the heavy-metal and nutritional element status of some lakes in the southern Andes of Patagonia (Argentina). *Science of the Total Environment*, *206*, 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)00218-0)
- Mitra, A., Flynn, K. J., Tillmann, U., Raven, J. A., Caron, D., Stoecker, D. K., ... Lundgren, V. (2016). Defining planktonic protist functional groups on mechanisms for energy and nutrient acquisition: Incorporation of diverse mixotrophic strategies. *Protist*, *167*, 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2016.01.003>
- Modenutti, B. E., Queimaliños, C. P., Balseiro, E. G., & Reissig, M. (2003). Impact of different zooplankton structures on the microbial food web of a South Andean oligotrophic lake. *Acta Oecologica*, *24*, S289–S298. [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(03\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(03)00030-4)
- Plummer, M. (2003). JAGS: A program for analysis of Bayesian graphical models using Gibbs sampling. In *Proceedings of the 3rd international workshop on distributed statistical computing*, vol. 124, p. 10.
- Pomati, F., Shurin, J. B., Andersen, K. H., Tellenbach, C., & Barton, A. D. (2020). Interacting temperature, nutrients and zooplankton grazing control phytoplankton size-abundance relationships in eight Swiss lakes. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03155>
- Porter, K. G., & Feig, Y. S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora 1. *Limnology and Oceanography*, *25*, 943–948. <https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943>
- Ptácnik, R., Sommer, U., Hansen, T., & Martens, V. (2004). Effects of microzooplankton and mixotrophy in an experimental planktonic food web. *Limnology and Oceanography*, *49*, 1435–1445. https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.4_part_2.1435
- R Team. (2020). *RStudio: Integrated development for R*. RStudio Inc.
- Rogers, T. L., Munch, S. B., Stewart, S. D., Palkovacs, E. P., Giron-Nava, A., Matsuzaki, S.-I., & Symons, C. C. (2020). Trophic control changes with season and nutrient loading in lakes. *Ecology Letters*, *23*, 1287–1297. <https://doi.org/10.1111/ele.13532>
- Rosenbaum, B., Raatz, M., Weithoff, G., Fussmann, G. F., & Gaedke, U. (2019). Estimating parameters from multiple time series of population dynamics using Bayesian inference. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *6*, 234. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00234>
- Sanders, R. W., Porter, K. G., Bennett, S. J., & DeBiase, A. E. (1989). Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers, and cladocerans in a freshwater planktonic community. *Limnology and Oceanography*, *34*, 673–687. <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.4.0673>
- Schaffner, L. R., Govaert, L., De Meester, L., Ellner, S. P., Fairchild, E., Miner, B. E., ... Hairston, N. G. (2019). Consumer-resource dynamics is an eco-evolutionary process in a natural plankton community. *Nature Ecology and Evolution*, *3*, 1351–1358. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0960-9>
- Schenone, L., Balseiro, E. G., Bastidas Navarro, M., & Modenutti, B. E. (2020). Modelling the consequence of glacier retreat on mixotrophic nanoflagellate bacterivory: A Bayesian approach. *Oikos*, *129*, 1216–1228. <https://doi.org/10.1111/oik.07170>
- Schmitz, O. J., Hawlena, D., & Trussell, G. C. (2010). Predator control of ecosystem nutrient dynamics. *Ecology Letters*, *13*, 1199–1209. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01511.x>
- Sherr, B. F., Sherr, E. B., & Fallon, R. D. (1987). Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Applied and Environment Microbiology*, *53*, 958–965.
- Sherr, E. B., & Sherr, B. F. (1993). Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labeled prey. In P. F. Kemp, J. J. Cole, B. F. Sherr & E. B. Sherr (Eds.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* (pp. 695–701). Lewis Publisher.
- Šimek, K., & Chrzanowski, T. H. (1992). Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Applied and Environment Microbiology*, *58*, 3715–3720.
- Sitters, J., Bakker, E. S., Veldhuis, M. P., Veen, G., Olde Venterink, H., & Vanni, M. J. (2017). The stoichiometry of nutrient release by terrestrial herbivores and its ecosystem consequences. *Frontiers in Earth Science*, *5*, 32. <https://doi.org/10.3389/feart.2017.00032>
- Sommer, U., & Sommer, F. (2006). Cladocerans versus copepods: The cause of contrasting top-down controls on freshwater and marine phytoplankton. *Oecologia*, *147*, 183–194. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0320-0>
- Sommer, U., & Stibor, H. (2002). Copepoda–Cladocera–Tunicata: The role of three major mesozooplankton groups in pelagic food webs. *Ecological Research*, *17*, 161–174. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2002.00476.x>
- Souza, M., Modenutti, B., Carrillo, P., Villar-Argaiz, M., Medina-Sánchez, J., Bulles, F., & Balseiro, E. (2010). Stoichiometric dietary constraints influence the response of copepods to ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Limnology and Oceanography*, *55*, 1024–1032. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.3.1024>
- Sturner, R. W., & Elser, J. J. (2002). *Ecological stoichiometry: The biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press.
- Sun, J., & Liu, D. (2003). Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, *25*, 1331–1346. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>
- Tambi, H., Flaten, G. A. F., Egge, J. K., Bødtker, G., Jacobsen, A., & Thingstad, T. F. (2009). Relationship between phosphate affinities and cell size and shape in various bacteria and phytoplankton.

- Aquatic Microbial Ecology*, 57, 311–320. <https://doi.org/10.3354/ame01369>
- Vanni, M. J. (2002). Nutrient cycling by animals in freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 341–370. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150519>
- Villar-Argaiz, M., Balseiro, E.G., Modenutti, B.E., Souza, M.S., Ballejos, F.J., Medina-Sánchez, J.M., & Carrillo, P. (2018). Resource versus consumer regulation of phytoplankton: Testing the role of UVR in a Southern and Northern hemisphere lake. *Hydrobiologia*, 816, 107–120.
- Vrede, T., & Vrede, K. (2005). Contrasting 'top-down' effects of crustacean zooplankton grazing on bacteria and phytoflagellates. *Aquatic Ecology*, 39, 283–293. <https://doi.org/10.1007/s10452-005-1326-8>
- Waibel, A., Peter, H., & Sommaruga, R. (2019). Importance of mixotrophic flagellates during the ice-free season in lakes located along an elevational gradient. *Aquatic Sciences*, 81, 45. <https://doi.org/10.1007/s00027-019-0643-2>
- Yvon-Durocher, G., Schaum, C.-E., & Trimmer, M. (2017). The temperature dependence of phytoplankton stoichiometry: Investigating the roles of species sorting and local adaptation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2003. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02003>
- Zhang, W., & Arhonditsis, G. B. (2009). A Bayesian hierarchical framework for calibrating aquatic biogeochemical models. *Ecological Modelling*, 220, 2142–2161. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2009.05.023>
- Zöllner, E., Santer, B., Boersma, M., Hoppe, H. G., & Jürgens, K. (2003). Cascading predation effects of *Daphnia* and copepods on microbial food web components. *Freshwater Biology*, 48, 2174–2193.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Schenone, L., Modenutti, B., Martyniuk, N., Bastidas Navarro, M., Laspoumaderes, C., & Balseiro, E. (2021). Modelling key variables for understanding the effects of grazing and nutrient recycling by zooplankton on the freshwater microbial loop. *Freshw Biol.*, 00, 1–16. <https://doi.org/10.1111/fwb.13835>