



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



**“DINÁMICA DEL ENSAMBLAJE PLANCTÓNICO DE PROCARIONTES
UNICELULARES EN UN LAGO ATALASOHALINO
MONOMÍCTICO CÁLIDO CON HIPOLIMNION ANÓXICO”**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Doctor en Ciencias
(Limnología)**

p r e s e n t a

M. en C. JUSTO SALVADOR HERNÁNDEZ AVILÉS

Director de Tesis: DR. MIROSLAV MACEK

**Comité Tutorial: DR. JAVIER ALCOCER DURAND
DR. JAVIER CARMONA JIMÉNEZ
DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ
DR. ALFONSO LUGO VÁZQUEZ
DRA. ELIZABETH ORTEGA MAYAGOITIA
DRA. GLORIA VILA CLARA FATJÓ**

México, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Con todo mi amor para mi esposa Rosa Ma. Velázquez Palafox y mis hijos Rodrigo, Miriam y Alonso. Gracias por compartir conmigo los mejores momentos de mi vida.

A mis padres Jesús y Arcelia, mi familia Hernández Avilés, Velázquez Palafox y Mateo Quinto por todo lo que representan para mi.

A todos mis amigos por su afecto, cariño y tiempo compartido.

A mis estudiantes que son una razón fundamental para actualizarme permanentemente.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por la formación académica recibida a lo largo de mi proceso de preparación doctoral, así como por todos los apoyos económicos proporcionados, los cuales entre otras cosas me permitieron presentar los resultados de investigación en Congresos Nacionales e Internacionales.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme realizar mis estudios de Doctorado a través de las Comisiones otorgadas por el H. Consejo Técnico con base en el artículo 95 inciso b del Estatuto del Personal Académico de la UNAM.

Al Proyecto de Investigación en Limnología Tropical (PILT) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM donde se llevó acabo el proyecto de Investigación Doctoral por todas las facilidades prestadas durante sus diferentes fases.

El proyecto de investigación doctoral estuvo respaldado y financiado por los proyectos DGAPA-UNAM PAPIIT IN207206, UNAM FES Iztacala PAPCA2006 y CONACYT 41667.

A la Dirección General del Personal Académico de la UNAM por permitirme estar incorporado al Programa de Apoyos para la Superación Académica de la UNAM (PASPA) para la realización de estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a través de una beca para la realización de estudios doctorales.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo económico brindado otorgado a través de una beca para la conclusión de la tesis doctoral.

Al Dr. Miroslav Macek por su acertada y comprometida dirección de tesis doctoral, así como por su invaluable contribución a mi formación académica y científica.

A la Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, a la Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia y al Dr. Javier Carmona Jiménez por su acompañamiento como miembros de mi Comité Tutoral, lo que favoreció el mejor desarrollo del trabajo de investigación.

A los miembros del Comité Tutoral y demás miembros de mi jurado Dr. Javier Alcocer Durand, Dra. Luisa Falcón Álvarez, Dr. Alfonso Lugo Vázquez por sus atinados comentarios y sugerencias que contribuyeron a enriquecer este trabajo

de tesis.

Al M. en C. Laura Peralta S. y al M. en C. Luis Ocegüera por el apoyo logístico en campo. A la Biól. Beatriz López Trejo por su asistencia en el trabajo de laboratorio, al Hidrobiól. Sergio Castillo Sandoval, M. en C. Diana López Anaya y al M. en C. Jorge Ramírez Zierold por el análisis de los nutrientes. Al M. en C. Gerardo González Aguilar por el procesamiento de las biomásas del picoplancton autotrófico.

A la Dra. Patricia Velazco de León por proporcionarme el programa estadístico CANOCO y al M. en C. Armando Cervantes Sandoval de la FES Zaragoza por su asistencia para el manejo del mismo.

Al personal del Posgrado de CMyL M. en C. Diana Juárez Bustos, C. Gabriela Almaraz Mejía, C. Guadalupe Godoy Medina y Mtra. Chantal Ruiz Guerrero por todo el apoyo brindado a lo largo de mi estancia en el Posgrado. Y a la C. Ma. Teresa Cruz Muñoz responsable del Departamento de Registro Académico de la FES Zaragoza por su apoyo y asesoría en los trámites administrativos en mi dependencia de adscripción como Académico.

INDICE

	Página
1 RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Definición y clasificación del plancton	2
1.2 Picoplancton	2
1.3 Picoplancton en sistemas lacustres	3
1.4 Circuito microbiano	4
1.5 Ecología del plancton procarionte en sistemas lacustres anóxicos	5
1.6 Taxonomía del plancton procarionte	6
2 ANTECEDENTES	9
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
4 OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General	12
4.2 Objetivos Particulares	12
5 HIPÓTESIS	13
6 ÁREA DE ESTUDIO	14
7 MÉTODOS	
7.1 Muestreo biológico y medición de parámetros físicos y químicos	16
7.2 Densidad y biomasa del plancton procarionte autotrófico y heterotrófico	17
7.3 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH por sus siglas en inglés)	18
7.4 Procesamiento gráfico y estadístico de los datos	22
8 RESULTADOS	
8.1 Características limnológicas	
8.1.1 Temperatura	24
8.1.2 Oxígeno disuelto	26
8.1.3 Radiación fotosintéticamente activa (PAR)	27
8.1.4 Nutrientes inorgánicos	28
8.1.5 Nutrientes orgánicos particulados	31
8.1.6 Comparación entre las concentraciones de las formas Inorgánicas y orgánicas de los nutrientes	33
8.2 Dinámica espacio-temporal del picoplancton procarionte (autotrófico y heterotrófico)	
8.2.1 Abundancia	35
8.2.2 Biomasa	40

8.3 Estructura, composición y dinámica de los grupos procariontes determinados por hibridación <i>in situ</i> fluorescente	42
8.4 Relación del picoplancton procarionte con parámetros Limnológicos del lago Alchichica	47
9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
10 CONCLUSIONES	71
11 REFERENCIAS	72

RESUMEN

Se estudió la composición del picoplancton procarionte (PPP) en el lago Alchichica, utilizando la técnica de hibridación *in situ* fluorescente durante un ciclo bienal (2005-2006). La dinámica temporal del PPP estuvo determinada por la hidrodinámica de este lago monomítico cálido. La abundancia y la biomasa de los grupos funcionales del PPP, tanto del autotrófico (PPA) como del heterotrófico (PPH), se incrementaron durante el período de mezcla, registrándose máximas al inicio del período de estratificación, cuando también se encontraron los máximos porcentajes de hibridación del Dominio *Bacteria*. El incremento en el PPP se asoció con la disponibilidad de nutrientes poco después del inicio del período de mezcla. En la estratificación bien establecida y tardía, el PPA y el PPH decrecieron de manera conjunta con los porcentajes de hibridación, lo que se relacionó principalmente con el agotamiento de los nutrientes en la capa de mezcla. Al ser Alchichica un lago hiposalino y atalasoalino, la composición del procarioplancton tuvo una mayor afinidad con los sistemas dulceacuícolas que con cuerpos de agua más salados. Durante el período de mezcla, las picocianobacterias y *Planctomycetes* (PLA) constituyeron la fracción dominante del bacterioplancton, mientras que -en el periodo de estratificación- PLA, Betaproteobacteria (BETA) y Gammaproteobacteria (GAMA) fueron los grupos más abundantes en el epilimnion y en el metalimnion. El Dominio *Archaea*, BETA, GAMA, *Paracoccus* -el principal desnitrificante perteneciente a Alphaproteobacteria- y las bacterias sulfato reductoras dominaron en la oxiclina y el hipolimnion, vinculado con el agotamiento del oxígeno disuelto y el enriquecimiento de nutrientes en los estratos más profundos del lago.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Definición y clasificación del plancton

El plancton está constituido por organismos acuáticos adaptados a vivir parte o toda su vida en aparente suspensión en las aguas abiertas del mar, lagos, estanques y ríos. El plancton es una fuente primaria de alimento para otros niveles tróficos, y algunos organismos representativos incluyen bacterias, protistas, hongos y metazoarios (Reynolds, 2006).

Para su estudio, el plancton puede ser clasificado en función de criterios fisiológicos, taxonómicos o dimensionales. Cuando el plancton se clasifica por su tamaño se divide de acuerdo con una escala logarítmica en: macroplancton (200-2000 μm), microplancton (20-200 μm) y nanoplancton (2-20 μm) (Dussart, 1965). Gracias al desarrollo de instrumentos modernos de observación y medición, se han podido caracterizar otras fracciones más pequeñas que se engloban en el picoplancton (0.2-2 μm) y femtoplancton (0.02-0.2 μm) (Sieburth *et al.*, 1978).

1.2 Picoplancton

El picoplancton juega un papel ecológico fundamental dentro de los ecosistemas acuáticos al ser la base del circuito microbiano.

El picoplancton suele dividirse en dos categorías funcionales: picoplancton autotrófico (PPA) y picoplancton heterotrófico (PPH) (Sieburth *et al.*, 1978). Dentro del PPA quedan incluidos tanto organismos procariontes como eucariontes (Komárková, 2002). Mientras, el PPH está conformado por bacterias y arqueas, ambos Dominios procariontes (Jürgens *et al.*, 2000), el PPA se considera un importante reservorio de la biomasa de carbono asimilable en la base de las redes tróficas microbianas (Callieri y Stockner, 2002) y puede contribuir del 10 al 90% de la biomasa y/o producción primaria en sistemas marinos y dulceacuícolas de todo el mundo (Stockner, 1991).

1.3 Picoplancton en sistemas lacustres

En los sistemas lacustres, el PPA está dominado principalmente por cianoprocariontes. Su abundancia suele aumentar con el nivel trófico del sistema, al tiempo que su contribución a la biomasa fitoplanctónica total disminuye (Jasser, 2002). El PPA cianoprocarionte se ve generalmente favorecido en ambientes con bajas concentraciones de nutrientes y, a medida que éstos aumentan, el picoplancton eucarionte es el que tiende a predominar (Weisse, 1993).

En el PPH de lagos predominan las bacterias heterotróficas que, por su abundancia contribuyen considerablemente al biovolumen del picoplancton total (PPT), incluso más que las células autotróficas (Callieri y Pinolini, 1995). En general, la abundancia y biomasa del PPH aumentan con la productividad primaria y la concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos en los sistemas lacustres (Wetzel, 2001). Así, en un lago oligotrófico se observan densidades entre 0.5 y 0.8×10^6 cél. mL^{-1} y biomásas de 40 a 70 mg m^{-3} , mientras que en uno eutrófico éstas son del orden de 3 a 8×10^6 cél. mL^{-1} y 600 a 2000 mg m^{-3} respectivamente (Sorokin, 1999).

La dinámica del picoplancton lacustre ha sido estudiada principalmente en latitudes templadas (Cole *et al.*, 1993, Straškrabová *et al.*, 1999; Lind *et al.*, 2000), existiendo pocas referencias para zonas tropicales algunos ejemplos son Kilham (1981), Lewis *et al.* (1986), Lind y Dávalos-Lind (1991), Sarvala *et al.* (1999).

Asimismo, la diversidad taxonómica del plancton procarionte también se ha estudiado preferentemente en lagos de zonas templadas o boreales (Belkova *et al.*, 2003, Jürgens *et al.*, 2000, Glöckner *et al.*, 2000, Pernthaler *et al.*, 1998) y en sistemas marinos (DeLong *et al.*, 1999, Eilers, 2001, Pernthaler, 2002a), estableciendo incluso comparaciones de la estructura de las comunidades entre estos ambientes (Glöckner *et al.*, 1999). En contraste, se conoce poco acerca de los ensamblados procariontes en latitudes tropicales (Abe *et al.*, 2003, Aaike *et al.*, 2005).

En latitudes tropicales, los lagos con más de 25 m de profundidad suelen ser monomícticos cálidos (Lewis, 1983), caracterizados por presentar una fase de mezcla durante la época de secas (“invierno tropical”) seguida por un período prolongado de estratificación, lo que favorece la formación de un hipolimnion anóxico. Incluso algunos lagos oligotróficos salinos presentan una anoxia profunda durante este período (Alcocer *et al.*, 2000). Bajo estas condiciones hipolimnéticas particulares también existe un conocimiento incipiente de la estructura y dinámica del picoplancton (Caldell y Tiedje, 1975; Cole *et al.*, 1993; Lugo *et al.*, 2000).

Así, a partir del conocimiento de la estructura, composición taxonómica y dinámica del plancton procarionte en lagos tropicales profundos que desarrollan anoxia hipolimnética, se podrá entender con mayor precisión su importancia en el ciclo del carbono, así como otros procesos biogeoquímicos asociados (Cottrel y Kirchman, 2000).

1.4 Circuito microbiano

El circuito microbiano es una vía trófica por medio de la cual el carbono orgánico disuelto puede ser reincorporado a la red alimenticia a través de las bacterias y arqueas. Éstas son consumidas principalmente por protistas como flagelados y ciliados. Los protistas, a su vez, son consumidos por organismos acuáticos más grandes, como por ejemplo los rotíferos y copépodos (Azam *et al.*, 1983; Arndt, 1993).

Dentro del circuito microbiano tanto los nanoflagelados heterótrofos (NFH) como los mixótrofos y los ciliados son considerados frecuentemente los mayores filtradores del picoplancton (Weisse, 1990, Šimek *et al.*, 1995, Pernthaler, 2005). Se ha reportado que los NFH son responsables del 90% del pastoreo del picoplancton total (PPT) y que el restante 10% es debido al consumo de ciliados, mostrando ambos grupos un consumo preferencial por el PPA a corto plazo (Pernthaler *et al.*, 1996). Sin embargo, otros autores han registrado en los protistas una marcada selectividad alimenticia por las bacterias sobre las picocianoprocariontes (Caron *et al.*, 1991).

La bacterivoría selectiva de los protistas es un factor clave en la regulación de la composición del ensamblado de la comunidad bacteriana en sistemas de agua dulce (Jürgens *et al.*, 1999, Šimek *et al.*, 1999). Más específicamente se ha reportado que la composición de la comunidad bacteriana cambia principalmente por el pastoreo cuando hay una limitación de recursos para las bacterias, desempeñando el pastoreo un papel menos importante cuando hay suficientes recursos (Šimek *et al.*, 2003). La bacterivoría por protistas también induce cambios morfológicos en las bacterias con la formación de cadenas de células y/o la floculación (Jürgens y Güde, 1994).

En esta investigación, a través de la evaluación de la estructura del plancton procarionte, del análisis de su composición taxonómica y del conocimiento de su dinámica espacio temporal en un lago monomítico cálido atalasoalino que desarrolla anoxia hipolimnética durante la etapa de estratificación, se pretendió alcanzar un mayor entendimiento de la estructura del circuito microbiano.

1.5 Ecología del plancton procarionte en sistemas lacustres anóxicos

Los sistemas lacustres que se estratifican térmicamente suelen presentar bajas o nulas concentraciones de oxígeno disuelto en el hipolimnion. Los factores que determinan que este estrato profundo se vuelva anóxico son la intensidad del flujo de materia orgánica del epilimnion, y la duración y permanencia de la estratificación, que se correlaciona con la profundidad máxima del cuerpo acuático (Wetzel, 2001).

Así, el desarrollo anual de la anoxia hipolimnética depende principalmente de los niveles de producción primaria, la cual está limitada tanto por los nutrientes (mecanismo conocido como control "*bottom-up*"), como por la presión de depredación de los niveles tróficos más altos (control "*top-down*"). Durante los procesos de estratificación, hay limitación de nutrientes en el epilimnion, por lo que el fitoplancton está controlado principalmente por un mecanismo *bottom-up* y esto repercute en otros grupos como el zooplancton.

Aunque también se ha reportado que los florecimientos del plancton pueden autoregularse dentro del epilimnion (incluyendo parte del metalimnion) particularmente por depredación (*top-down*) (Sommer *et al.*, 1986; Straškrabová, 1990).

El plancton procarionte es el responsable de mineralizar la materia orgánica y contribuir a la producción primaria a través de la fotosíntesis y la quimiosíntesis. Dentro de las fotosintéticas se encuentran las cianoprocariontes que liberan oxígeno molecular y las bacterias fotosintéticas anoxigénicas, que típicamente usan sulfuro u otro compuesto del azufre reducido, así como hidrógeno molecular o una variedad de pequeñas moléculas orgánicas como donadores de electrones en la fotosíntesis (Acheubach *et al.*, 2001).

La actividad del plancton procarionte en el metalimnion juega un papel importante en el ciclo del nitrógeno: el amonio producido en la mineralización de la materia orgánica es utilizado inmediatamente por las bacterias nitrificadoras (produciendo nitritos y nitratos) en condiciones aerobias, mientras en el metalimnion microaerobio, con alta actividad heterotrófica, algunas bacterias utilizan los nitratos para su respiración y convierten los nitritos producidos en óxidos de nitrógeno o gas nitrógeno (desnitrificación) (Abe *et al.*, 2003).

1.6 Taxonomía del plancton procarionte

Los dominios *Arquea* y *Bacteria* se diferencian entre sí genética y bioquímicamente. La separación filogenética entre estos Dominios se fundamenta en la secuencia de su ARN ribosomal, en la estructura de su ARN polimerasa y en algunos lípidos característicos (Snyder y Champness, 1997).

Dentro del Dominio *Bacteria* los filos que más se han reportado para los sistemas acuáticos se encuentran *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Planctomycetes* y *Cyanobacteria*.

En las proteobacterias se incluyen la mayoría de las bacterias quimioheterótrofas Gram-negativas. Las clases distintivas de las proteobacterias son designados por letras griegas.

En los ambientes acuáticos la clase Alphaproteobacteria incluye la mayoría de las proteobacterias que son capaces de crecer a bajas concentraciones de nutrientes. *Caulobacter* es un género característico que se encuentra en lagos poco productivos. *Nitrobacter* es un miembro de las bacterias nitrificantes, la cual oxida el amonio a nitritos de manera quimioautotrófica.

La clase Betaproteobacteria frecuentemente emplea como fuente de energía compuestos que se producen en áreas de descomposición anaerobia de la materia orgánica, como el gas hidrógeno, el amoníaco y el metano. Las especies del género *Thiobacillus* y otras bacterias oxidantes del azufre son importantes en el ciclo de este elemento. Dichas bacterias son capaces de obtener energía por la oxidación de las formas reducidas del azufre, como el ácido sulfhídrico o azufre elemental en sulfatos. Dentro de esta clase se encuentra el género quimiolitotrófico *Nitrosomonas* cuyas especies oxidan el nitrito a nitrato en el proceso de nitrificación.

La clase Gammaproteobacteria es la más amplia de las proteobacterias e incluye una gran variedad de tipos fisiológicos. Dentro de éstas, el género *Pseudomonas* (Pseudomonadales), son aerobias obligatorias y algunas especies utilizan los nitratos como aceptores terminales de electrones a través del proceso denominado respiración anaerobia. La familia Vibrionaceae son anaerobias facultativas Gram-negativas, que se encuentran principalmente en hábitats acuáticos. A Gammaproteobacteria también pertenecen las bacterias púrpuras del azufre (Tortora *et al.*, 2001).

A la clase Deltaproteobacteria pertenecen las bacterias reductoras del azufre y de los sulfatos (Fröstl y Overmann, 2000). Estas bacterias junto con las desnitrificantes favorecen la diferenciación química de la columna de agua durante la estratificación térmica en lagos monomícticos cálidos (Eckert *et al.*, 2002).

Actinobacteria es un filo cosmopolita de las aguas dulces y frecuentemente domina en número en las comunidades bacterias de lagos (Newton *et al.*, 2007).

Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides es un grupo de bacterias Gram-negativas, típicas de aguas dulces y saladas, capaces de degradar aeróbicamente un amplio espectro de sustratos, entre los que se incluyen proteínas, carbohidratos, pesticidas, insecticidas y macromoléculas complejas (Bernardet et al., 1996). Unas cuantas especies de *Cytophaga* son anaerobias facultativas y pueden fermentar sacáridos, así como descomponer celulosa, quitina o agar. *Flavobacterium* es una bacteria típica del plancton de aguas salinas, que crece quimioautotróficamente en presencia de H₂. Las bacterias del grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* pueden ser desnitrificadoras (Tortora et al., 2001).

Planctomycetes es un filo de bacterias acuáticas encontradas en aguas dulce, salobre y marina. Dentro de éste, el orden Planctomycetales es el grupo más cercano en la base del árbol filogenético del Dominio *Bacteria* (Brochier y Philippe 2002). Algunas de sus especies son aeróbicas, quimio-organoheterótrofas y otras son quimio-litoautotróficas anaerobias, llevando a cabo la oxidación anaerobia del amonio (anammox) en sistemas marinos y dulceacuícolas (Jetten et al., 2003).

Las cianobacterias comprenden las bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica y en los ambientes acuáticos son las principales fijadores de nitrógeno molecular (Wetzel, 2001).

De las cianobacterias, entre las de tamaño pequeño -entre 0.2 y 2 µm, denominadas picocianobacterias (Pcy)- se han determinado tres géneros de acuerdo con criterios citomorfológicos, moleculares y bioquímicos: *Cyanobium*, *Synechococcus* y *Cyanothece diana/cedrorum* tipo (Komárek, 1996). El más común es *Cyanobium*, con células pequeñas (1-2 µm de longitud) de forma esférica a oval sin mucílago. La mayoría de los *Synechococcus* presentan forma de bastoncillo, con 3-15 µm de longitud y 1-3 µm de anchura (Callieri y Stockner, 2002). En lagos con diferente estado trófico, las Pcy desarrollan pequeños agregados o colonias (CPcy) que tienden a presentarse más comúnmente en lagos meso-eutróficos. Funcionalmente, las CPcy pueden ser incluidas en el PPA dado que no desarrollan florecimientos ("*blooms*") y sus células individuales

tienen las dimensiones propias del picoplancton. La mayoría de las CPcy pertenecen a las croococales, con tamaños de células entre 0.5-2 ó 3 μm de diámetro, la forma de las células son generalmente redondas u ovals. Algunas de las células CPcy en agua dulce pertenecen a los géneros *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Coelosphaerium*, *Cyanodictyon*, *Merismopedia*, *Snowella* y *Tetrarcus* (Stockner *et al.*, 2000).

2 ANTECEDENTES

Para la diferenciación taxonómica de grupos procariontes, funciones metabólicas y relaciones espaciales dentro de una comunidad acuática microbiana en su ambiente natural, se ha empleado exitosamente la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés) (Amann *et al.*, 2001). La técnica FISH combina la precisión de la genética molecular con la información visual del microscopio (Moter y Göbel, 2000). Esta técnica ha sido más empleada con fines taxonómicos en comunidades picoplanctónicas pelágicas marinas (DeLong *et al.*, 1999; Cottrell y Kirchman, 2000; Eilers *et al.*, 2001; Pernthaler *et al.*, 2002 a y b), aunque también se conoce su aplicación en limnología (Amann *et al.*, 2001), particularmente en embalses (Šimek *et al.*, 2001) y lagos (Pernthaler *et al.*, 1998; Belkova *et al.*, 2003) de zonas templadas.

A partir de análisis realizados con FISH, se ha encontrado que -en promedio- cerca del 50% de las células pueden ser ubicadas bajo los Dominios *Bacteria* y *Arquea*. Y de éstas, cerca de la mitad se identifican con pruebas específicas por grupo. De manera comparativa, la clase Betaproteobacteria constituye una fracción dominante con un promedio de 16% (intervalo, 3 al 32%) en los sistemas de agua dulce y están ausentes en los ambientes marinos. Por otra lado, miembros de *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* son dominantes en ambientes marinos con un promedio del 18% (intervalo, 2 a 72%), siendo también importantes en los sistemas dulceacuícolas 7% (intervalo, 0 a 18%). Las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria, así como miembros de Planctomycetales se detectan en ambos ambientes en abundancias <7%

(Glöckner *et al.*, 1999).

En contraste, el número de estudios sobre la diversidad en lagos salinos es muy reducido en comparación con otros tipos de aguas interiores (Hahn, 2006). Se ha demostrado que la salinidad desempeña un papel importante en la composición del plancton procarionte en aguas interiores (Benlloch *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2009); así las comunidades bacterianas de lagos dulces e hipersalinos muestran solamente un pequeño traslape taxonómico. Adicionalmente, la abundancia relativa de diferentes clases de *Proteobacteria* muestra una marcada sucesión a lo largo de un gradiente de salinidad (Wu *et al.*, 2006). En lagos atalashalinos, la contribución de CFB tiende a incrementarse con las salinidad (Demergaso *et al.*, 2004).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad existe un marcado interés por conocer la estructura, composición y dinámica de las comunidades microbianas, lo que se ha visto favorecido por el desarrollo de técnicas modernas de microbiología y biología molecular, siendo posible hacer determinaciones taxonómicas de los principales grupos de *Archaea* y *Bacteria* en muestras de agua procedentes directamente de los sistemas acuáticos. Sin embargo, aún se conoce poco acerca de la dinámica de estas comunidades en ambientes lacustres, particularmente en las zonas tropicales.

Los lagos tropicales con una profundidad mayor a 25 m tienen un comportamiento térmico de monomixis cálida. Un fenómeno común asociado con el periodo de estratificación en estos lagos es el establecimiento de gradientes en la concentración de oxígeno disuelto y el desarrollo de anoxia hipolimnética. Los cambios verticales en la composición de la comunidad bacteriana en lagos tropicales se ha relacionado aparentemente con la estratificación térmica, de oxígeno disuelto y de los nutrientes (De Weaver *et al.*, 2005). En estas condiciones, el hipolimnion es particularmente rico en plancton procarionte, pues aquí se realiza en gran medida la degradación de la materia orgánica, sea autóctona o alóctona. Sin embargo, en los sistemas poco productivos -como el lago de Alchichica- se espera que haya una limitación del plancton procarionte en esta zona, incrementándose su abundancia y biomasa cerca del fondo del sistema acuático y siendo alta en el metalimnion.

Así, en este estudio se analizó la estructura y composición de la comunidad procarionte en el lago Alchichica y su dinámica espacio-temporal asociada con la variabilidad de parámetros limnológicos durante los periodos de mezcla y estratificación, lo que permitió hacer inferencias sobre el papel que desempeñan en procesos biogeoquímicos en este tipo de ambientes. Asimismo, al ser un lago hiposalino ubicado en una cuenca endorreica, el conocimiento de su composición taxonómica de grupos procariontes permitió compararlo con sistemas que presentan diferente salinidad.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la estructura, composición, biomasa y variación espacio-temporal del plancton procarionte unicelular y su relación con la dinámica limnológica en un lago monomítico cálido oligotrófico (Alchichica) durante un ciclo bienal.

4.2 Objetivos particulares

Evaluar la variación espacio-temporal de la abundancia (cél. mL⁻¹) y biomasa ($\mu\text{g C}_{\text{org}}\cdot\text{L}^{-1}$) del picoplancton autotrófico (PPA) y del picoplancton heterotrófico (PPH).

Determinar la variación espacio-temporal de la abundancia (cél. mL⁻¹) de los Dominios *Archaea* y *Bacteria*, así como de los grupos bacterianos: *Cyanobacteria*, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria, *Planctomycetes* y *Bacteroidetes* durante dos ciclos anuales.

Estimar la abundancia de algunos grupos de procariontes asociados con la desnitrificación o la reducción de los sulfatos durante el proceso de estratificación térmica del lago.

Relacionar la variación anual de los grupos del plancton procarionte con la dinámica limnológica del sistema (etapas de circulación-estratificación de la columna de agua, profundidad de la zona eufótica, concentración del oxígeno disuelto y la de los nutrientes (formas de nitrógeno y fósforo)).

5. HIPÓTESIS

- 1) La composición del picoplancton procarionte en el Lago Alchichica es más parecida a sistemas acuáticos con mayor salinidad que a los del agua dulce, al ser éste hiposalino y atalasoalino.
- 2) La composición específica por grupos del picoplancton procarionte está determinada por la homogenización de parámetros limnológicos durante la circulación y el establecimiento de gradientes químicos durante la estratificación térmica.
- 3) En la zona de oxiclina e hipolimnion anóxico se favorece la presencia de grupos bacterianos asociados con la desnitrificación y la reducción de los sulfatos.
- 4) La posición de la termoclina y el límite de la zona de anoxia determinan la abundancia y biomasa del plancton unicelular procarionte.
 - a) El plancton unicelular procarionte presenta abundancias y biomásas altas en el metalimnion y/o cerca del fondo y bajas en el hipolimnion anóxico.
 - b) La distribución de las cianobacterias unicelulares se relaciona tanto con la profundidad de la zona fótica como con la posición de la termoclina-oxiclina.
- 5) La abundancia y distribución de las arqueas dependen del establecimiento de la anoxia en el hipolimnion.

6. ÁREA DE ESTUDIO

El lago Alchichica pertenece a un conjunto de lagos de origen volcánico, tipo maar o de cráter explosivo, conocidos localmente con el nombre de Axalapazcos. Éstos se encuentran en la provincia fisiográfica de la Faja (o Cinturón) Volcánica TransMexicana (FVTM o CVTM), en donde se cruza la Sierra Madre del Sur y la Sierra de Puebla, que conforma dos llanos lacustres. De estos lagos, Alchichica es el de mayor área superficial y volumen, se localiza cerca de los poblados de Alchichica, Municipio de Tepeyahualco, Puebla y Zalayeta, Municipio de Perote, Veracruz (19°24'N, 97°24'W) a una altitud de 2345 m s.n.m. (Vilaclara *et al.*, 1993) y corresponde al llano de San Juan (Fig. 1). Tiene una forma subcircular (diámetro de 1.8 km), con una longitud máxima de 1700 m con orientación SE-NE, y una gran cresta al oeste, de 1000 m de altura sobre el nivel del agua. Su profundidad máxima es de 62 m y la media de 40.9 m (Filonov *et al.*, 2006).

El área se caracteriza por un clima semi-árido, con tasas de precipitación y evaporación menores a 500 y 1,690 mm, respectivamente, y una temperatura media anual de 12.9° C (Adame *et al.*, 2008; García, 1988).

El lago recibe alimentación hídrica a partir de la red hidrográfica subterránea de la región. Es hiposalino (8.5‰) y atalasohalino (aguas no marinas con un considerable contenido de sal de acuerdo con Alcocer y Escobar (1993)), su composición iónica se asemeja al agua de mar en cuanto a la dominancia de cloruros y sodio, pero se diferencia por ser de aguas mucho más alcalinas (elevada reserva alcalina que se refleja asimismo en pH elevados, 8.7 a 9.2) (Vilaclara *et al.*, 1993). La temperatura de la masa de agua tiene una variación anual que va desde 14.5 °C (durante la mezcla) hasta 20 °C aproximadamente; en la zona fótica se observa frecuentemente una sobresaturación de oxígeno mientras que el hipolimnion se encuentra anóxico durante la estratificación del lago (Alcocer *et al.*, 2000; Filonov y Alcocer, 2002).

7 MÉTODO

7.1 Muestreo biológico y medición de parámetros físicos y químicos

En el Lago Alchichica se llevaron a cabo muestreos mensuales durante dos ciclos anuales (2005-2006) con la finalidad de caracterizar la comunidad del picoplancton procarionte unicelular durante los periodos de mezcla y estratificación.

Se estableció una sola estación de muestreo en el centro del sistema, que se corresponde con la profundidad máxima de 62 m en el cuerpo de agua (Fig. 2).

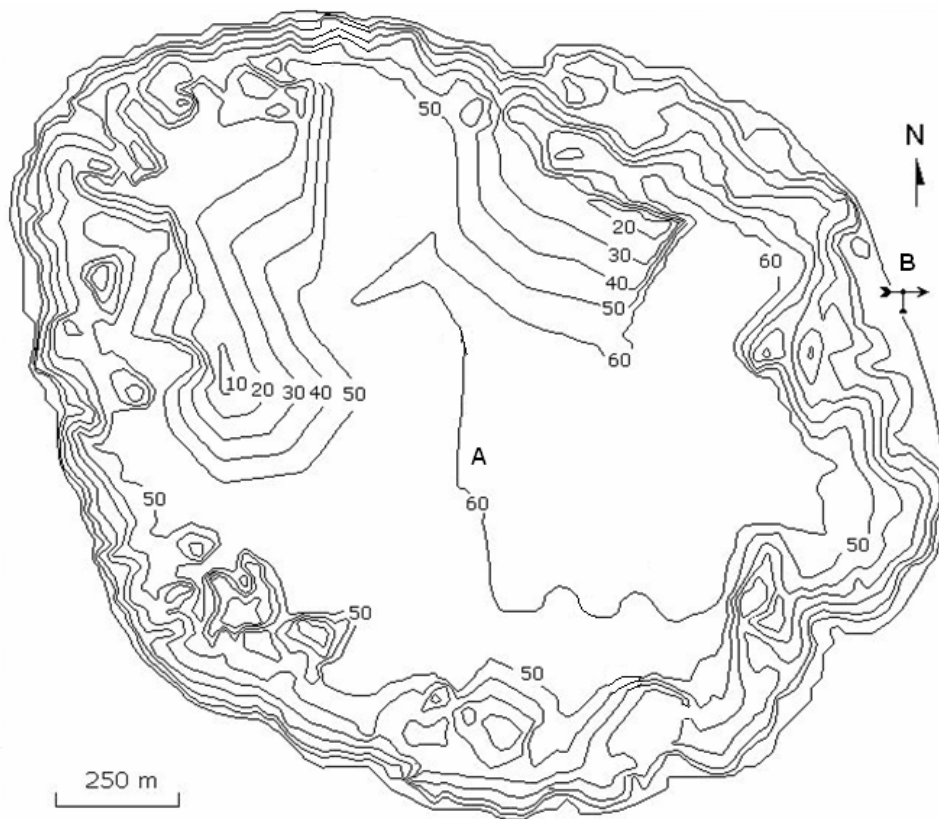


Fig. 2 Mapa batimétrico del lago Alchichica (Filonov *et al.*, 2006), con la letra A se señala la estación de muestreo y con la letra B la ubicación de la estación meteorológica.

Se tomaron muestras de agua con una botella Niskin (USA) o IHE (Rep. Checa) para los análisis químicos y microbiológicos. Se midieron la temperatura y

el oxígeno disuelto para cada metro, desde la superficie hasta el fondo, mediante un instrumento de monitoreo de calidad del agua marca Hydrolab, modelo DS4 acoplado a un sistema de captura y almacenaje de información marca Hydrolab modelo SVR4. Asimismo se midió la radiación fotosintéticamente activa (por su siglas en inglés PAR, 400 a 700 nm) a lo largo del perfil vertical con un irradiómetro escalar instalado en un perfilador de fluorescencia natural Biospherical PNF-300. Se tomaron diez muestras de agua a diferente profundidad de la columna de agua para la cuantificación de los nutrientes, las cuales se filtraron en Acrodiscos Gelman de 25 mm de diámetro y con filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm , las cuales se mantuvieron en hielo y oscuridad. Posteriormente se almacenaron en el congelador para su ulterior análisis en el laboratorio. Los nutrientes que se cuantificaron fueron: fósforo reactivo soluble, nitrógeno como nitritos, nitratos y amonio, en un analizador de flujo segmentado (marca Skalar Sanplus System). Asimismo, se cuantificaron el nitrógeno orgánico particulado y el fósforo orgánico particulado de acuerdo con el método de oxidación húmeda para el análisis simultáneo de P y N (PujoPay y Raimbault, 1994). Todos estos análisis se realizaron en el laboratorio de Biogeoquímica Acuática del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

Para la cuantificación de los grupos bacterianos funcionales se tomaron dos muestras de agua por nivel en cinco profundidades durante la mezcla, y 10 profundidades durante la estratificación, de manera que quedara incluido para este último período el epilimnion, metalimnion y/u oxiclina, la zona fótica, el límite de anoxia y el fondo (0.5 m por encima del fondo).

7.2 Densidad y biomasa del plancton procarionte autotrófico y heterotrófico

El plancton procarionte unicelular se cuantificó tiñéndolo con DAPI (4' 6-diamidino-2-fenilindol) sobre membranas negras de policarbonato con tamaño de poro de 0.2 μm) montadas en aceite de inmersión, y se contabilizó usando un microscopio de epifluorescencia (Leica, Alemania) con un lente de inmersión 100x en campos seleccionados al azar hasta que fueron contadas de 400 a 600 bacterias, de

acuerdo con Hobbie *et al.* (1977) y Porter y Feig (1980).

La biomasa del picoplancton procarionte para un ciclo anual se estimó a partir de imágenes fotográficas tomadas con una cámara digital (Canon S-45) montada en el microscopio de epifluorescencia. En estas imágenes se analizaron entre 1000 a 3000 células según las ecuaciones propuestas por Psenner (1993) y con la ayuda del programa de cómputo Image J (USA). El contenido del carbono se determinó de acuerdo con las relaciones alométricas que guarda con el volumen celular, según lo reportado por Norland (1993). Para estimar la biomasa específica para el PPA se empleó la autofluorescencia de ficocianinas y ficoeritrinas, mientras para el PPH la fluorescencia con DAPI.

7.3 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés)

Para llevar a cabo esta técnica se llevaron a cabo los siguientes pasos básicos:

- a) Fijación de las muestras
- b) Hibridación de las células con sondas de oligonucleótidos fluorescentes.
- c) Lavado y montaje de los filtros de membrana.
- d) Cuantificación con microscopía de epifluorescencia de las células hibridadas.

a) Fijación de las muestras.

La fijación de las muestras de plancton procarionte unicelular se hizo de acuerdo con el protocolo propuesto por Pernthaler *et al.* (2001).

1) A las muestras de agua se les adicionó formaldehído para tener una concentración final del 2%, éstas se dejaron fijadas por no más de 24 horas antes de ser filtradas.

2) En el laboratorio se filtraron entre 10 y 20 mL de la muestra al vacío a baja presión, se emplearon filtros de policarbonato blancos (diámetro 47 mm, tamaño de poro 0.2 μm ; GTTP Millipore, USA u Osmonics, Alemania) y una columna de filtración de vidrio. Estas muestras fueron suficientes para tener al menos una densidad aproximada de 10^6 cél. mL⁻¹.

3) Los filtros se lavaron con 10-20 mL de agua sin partículas (filtrada a

0.2 µm).

4) Las membranas se colocaron en una caja de Petri y se dejaron secar al aire.

5) Las membranas se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Los filtros se pudieron almacenar por varios meses sin una pérdida significativa de las señales de hibridación una vez que esta se realizó.

b) Hibridación de las células con sondas de oligonucleótidos fluorescentes.

Los grupos procariontes se determinaron utilizando la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), de acuerdo con el protocolo de DeLong, 1993; Amann *et al.*, 1997, empleando sondas de oligonucleótidos fluorescentes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sondas de oligonucleótidos empleadas para la determinación de grupos taxonómicos del picoplancton procarionte utilizando la técnica de hibridación *in situ* fluorescente.

Prueba	Especificidad	Secuencia de la prueba (5'-3')	Sitio blanco (Posición rRNA)	Referencia
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16S (338-355)	Amann <i>et al.</i> , 1990
ARCH915	<i>Archaea</i>	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	16S (915-935)	Stahl y Amann. 1991.
NON338	Control negativo	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	16S (338-355)	Wallner <i>et al.</i> , 1993
BET42A	Betaproteobacteria	GCC TTC CCA CTT CGT TT	23S (1027-1043)	Manz <i>et al.</i> , 1992
GAM42a	Gammaproteobacteria	GCC TTC CCA CAT CGT TT	23S (1027-1043)	Manz <i>et al.</i> , 1992
CF319A	<i>Bacteroidetes</i>	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	16S (319-336)	Manz <i>et al.</i> , 1996
PLA886	<i>Planctomycetes</i>	GCC TTG CGA CCA TAC TCC C	16S (886-904)	Neef <i>et al.</i> , 1998
GP1199	Mayoría de las bacterias Gram positivas	AAG GGG CAT GAT G	16S (1199-1211)	Mac Gregor <i>et al.</i> , 2001
SRB385	Mayoría de Desulfovibrionales	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	16S (385-402)	Amann <i>et al.</i> , 1990
PAR1457	Género <i>Paracoccus</i>	CTA CCG TGG TCC GCT GCC	16S (1457-1474)	Neef <i>et al.</i> , 1996

La hibridación de las células en los filtros de membrana consistió en:

1) La preparación de 2 mL de buffer de hibridación en un tubo de microcentrífuga:

Reactivos	Volumen o porcentaje	Concentración en el buffer de hibridación
5M NaCl	360 μ L	900 mM NaCl
1M Tris/HCl	40 μ L	20 mM Tris HCl
Formamida	35 %	
Agua destilada	2 mL	
SDS	2 μ L (adicionar al último para evitar la precipitación)	0.01% SDS

Las condiciones de hibridación y lavado óptimos (en particular, la temperatura y la concentración de formamida) se verificaron experimentalmente para cada sonda específica.

2) Para la mezcla de hibridación se añadieron 2 μ L de la solución prueba de trabajo (sonda de oligonucleótido específica) a 18 μ L del buffer de hibridación en un tubo de microcentrifugación Eppendorf; la solución de prueba se guardaba en la oscuridad y refrigeración.

3) Se cortaron secciones del filtro de membrana con un bisturí. Un filtro de 47 mm de diámetro permitió la preparación de 16 hibridaciones individuales. Las secciones se enumeraron con un lápiz para su posterior identificación.

4) Los filtros se colocaron en un tubo Eppendorf; varias secciones del filtro se pudieron colocar en un mismo tubo e hibridizar simultáneamente con la misma prueba.

5) Se agregaron las mezclas de hibridación en las muestras y se colocaron con las secciones de los filtros dentro de un tubo Eppendorf.

6) Se incubaron a 46 °C durante 3 horas en un termomezclador Comfort Eppendorf.

c) Lavado y montaje de los filtros de membrana.

1) Se prepararon 50 mL de buffer de lavado en un matraz aforado:

Reactivo	Volumen	Concentración final
5M NaCl	Dependiendo del % de formamida en el buffer de hibridación	
1M Tris/HCl	1 mL	20 mM Tris/HCl
0.5 M EDTA	500 µL	5 mM EDTA
Agua destilada	50 mL	
SDS	50 µL (adicional al último para evitar la precipitación)	0.01 % SDS

2) Se transfirieron rápidamente las secciones de filtro al buffer de lavado precalentado dentro de un Eppendorf y se incubaron por 15 minutos a 48 °C en el termomezclador Comfort Eppendorf.

3) Se recogieron las secciones de filtro y se enjuagaron colocándolos dentro de una caja de Petri con agua destilada por varios segundos, después se dejaron secar al aire en papel secante.

4) Para contabilizar por tinción, los filtros se colocaron en una caja de Petri, se cubrieron con 50 µL de solución DAPI y se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El lado donde se encontraban las células bacterianas debía estar hacia arriba. Después, se lavaba la sección de los filtros por 10 minutos en etanol al 80% para eliminar el exceso de colorante, seguido por enjuagues con agua destilada y secado al aire.

5) Las muestras se montaron con una gota del medio fluorescente Vecta-

Shield (Burlingame, USA). Las secciones del filtro debían estar completamente secas antes del montaje.

6) Con la doble tinción y preparaciones en seco los filtros montados en portaobjetos se almacenaron en la oscuridad a -20 °C por varios meses sin una pérdida substancial de la fluorescencia.

d) Cuantificación con microscopia de epifluorescencia de las células híbridadas.

1) Las células híbridadas se cuantificaron en un microscopio de epifluorescencia (Leica Alemania) con un lente de inmersión 100x apocromático en campos seleccionados al azar con un filtro Y3 (Cy3, Indocarbocianina fluorescente) el cual produce excitación verde y genera fluorescencia naranja. Subsecuentemente, se contabilizaron todas las células del mismo campo teñidas con DAPI en excitación UV, con la finalidad de evitar la pérdida de la señal de las células híbridadas con el empleo del UV. Entre 500 y 1000 células teñidas con DAPI fueron contabilizadas en las muestras para obtener un error de conteo inferior al $\pm 5\%$ (Pernthaler *et al.*, 2001).

2) A partir del total de células procariontes teñidas con DAPI contabilizadas se obtuvo el porcentaje de las células híbridadas para cada sonda específica de oligonucleótidos.

7.4 Procesamiento gráfico y estadístico de los datos

Los datos del plancton procarionte unicelular se integraron a una base de datos con la finalidad de evaluar gráficamente el patrón de desarrollo anual y el de estratificación de procariontes heterótrofos y autótrofos -picocianobacterias (con el programa Microsoft Excel, y Golden Software -Surfer). Según la distribución y proporción de las arqueas / bacterias y cianobacterias, se estimó la importancia de heterotrofia anaerobia / microaerobia y de autotrofia en diferentes estratos. Los resultados se compararon con los parámetros físico-químicos (particularmente con los de formas de nitrógeno y fósforo).

Para la evaluación estadística se realizó un análisis exploratorio de datos a través del análisis de cajas múltiples con muesca (Salgado-Ugarte, 1992). Asimismo, se validaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, para determinar si se aplicaba la estadística paramétrica o la no paramétrica asimismo, se vio la pertinencia de la transformación de los datos (Márquez, 1991).

Durante el periodo de estratificación, cuando se tomaron 10 muestras, se calcularon la media de las abundancias y las concentraciones de los nutrientes para las distintas capas (epilimnion, metalimnion, oxiclina e hipolimnion) usando interpolación lineal (a través de promedios ponderados por profundidad). Los límites de la termoclina y la oxiclina fueron considerados dentro el gradiente $>0.2^{\circ}\text{C m}^{-1}$ y $>0.5 \text{ mg L}^{-1}\text{m}^{-1}$.

Entre las abundancias de los taxa procariontes y las variables ambientales se realizaron correlaciones paramétricas de Pearson empleando el Programa Statgraphics versión 5.0 (2000). Para cumplir con el supuesto de normalidad de la estadística paramétrica, las abundancias bacterianas se transformaron por medio de logaritmos.

Las relaciones entre las abundancias de los taxa y las variables ambientales fueron examinadas a través de una técnica multivariada usando un análisis de correspondencia canónica sin tendencia (DCCA) (Ter Braak, 1986). Este método permitió explorar de manera simultánea las relaciones de los grupos procariontes con múltiples variables ambientales.

8 RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS

8.1.1 TEMPERATURA

En el lago Alchichica la temperatura del agua fluctuó entre 14°C y 20°C a través de los dos ciclos anuales. Durante el bienio se presentó un comportamiento térmico de monomixis cálida, caracterizado por procesos alternados de circulación durante los meses del invierno hemisférico (finales de diciembre a finales de marzo), seguido por una estratificación térmica el resto del año (Fig. 3 a).

Durante los meses de circulación correspondiente al período más frío de la época de secas, se registró la temperatura más baja y homogénea en toda la columna de agua, alrededor de 14.5 °C.

La estratificación térmica se presentó durante la época de lluvias, estableciéndose diferencias térmicas verticales a lo largo de la columna de agua que permitieron distinguir al epilimnion, metalimnion e hipolimnion.

En la estratificación se pueden caracterizar tres etapas:

- 1) Temprana de los meses de abril a junio, donde la termoclina se ubicó entre los 9 y 23 m de profundidad y se presentó una diferencia de temperatura máxima de 0.9 °C m⁻¹.
- 2) Bien establecida de los meses de julio a septiembre, caracterizada por la formación de una termoclina bien definida que se encontró entre los 14 y 30 m de profundidad, con una diferencia máxima de 1.3 °C m⁻¹.
- 3) Tardía de los meses de octubre a diciembre, cuando la termoclina comienza a debilitarse y profundizar hasta desaparecer, encontrándose entre los 20 y 39 m de profundidad, con una diferencia máxima de 0.6 °C m⁻¹ (Figs. 3a, 4)

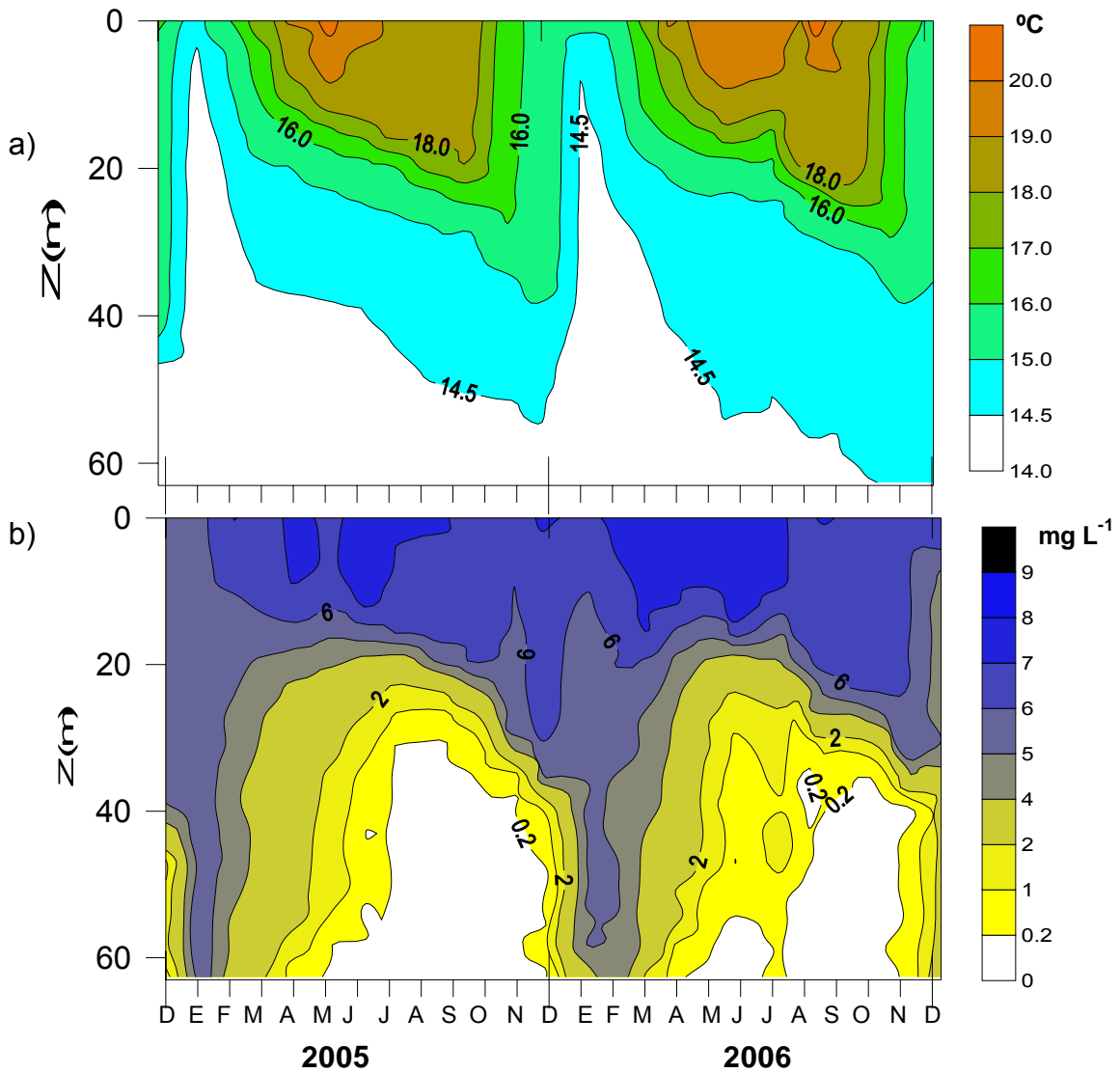


Fig. 3 Diagramas espacio-temporales de la variación de la temperatura (a) y del oxígeno disuelto (b) en el lago Alchichica durante un ciclo bienal.

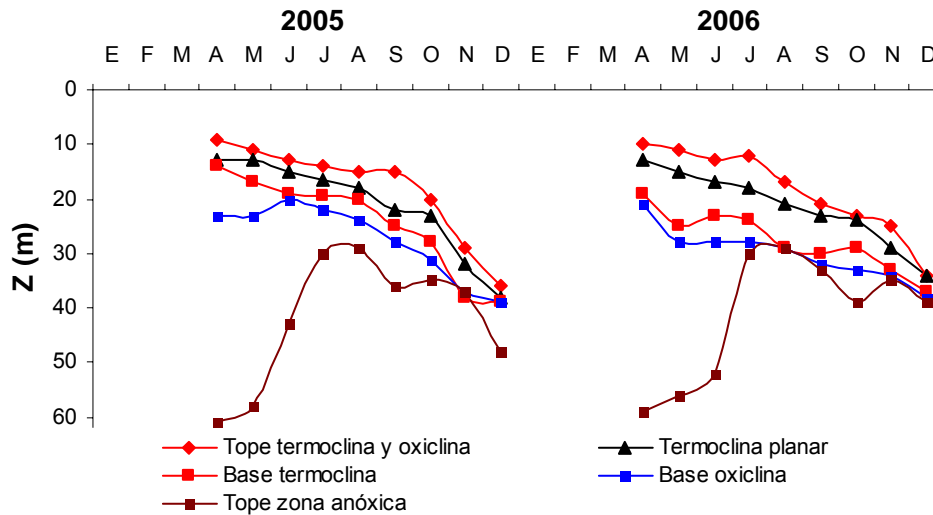


Fig. 4 Ubicación y amplitud de la termoclina, oxiclina y zona de anoxia durante los meses de estratificación térmica en el lago Alchichica durante un ciclo bienal.

8.1.2 OXÍGENO DISUELTO

En el período de mezcla la concentración del oxígeno disuelto (O.D.) fue aproximadamente constante de 5 mg L^{-1} a lo largo de toda la columna de agua.

Durante la estratificación temprana y bien establecida, en el epilimnion se registraron concentraciones entre 6 y 8 mg L^{-1} , mientras durante la estratificación tardía se registraron concentraciones entre 6 y 7 mg L^{-1} hacia las zonas más superficiales y entre 0.2 y 5 mg L^{-1} en la región más profunda de en este estrato (Fig. 3b).

En el lago se estableció una oxiclina directamente relacionada con el metalimnion, sin embargo, la depleción del oxígeno disuelto ($<0.5 \text{ mg L}^{-1}\text{m}^{-1}$) continuaba en promedio a tres metros por debajo de la termoclina. La máxima disminución del O.D. para el bienio fue de 0.9 , 1.3 y $2.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ m}^{-1}$ durante la estratificación temprana, bien establecida y tardía respectivamente (Figs. 3b, 4).

El hipolimnion fue anóxico cerca del fondo durante la estratificación temprana. Mientras, en la estratificación bien establecida el O.D. se consumió

totalmente por debajo de la base de la termoclina alrededor de los 30 m de profundidad. Posteriormente, durante la estratificación tardía, la zona anóxica disminuyó consecutivamente hasta los 40 m o 50 m en el mes de diciembre de los años respectivos (Fig. 4).

8.1.3 RADIACIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA (PAR)

La zona fótica (Zeu), delimitada por la profundidad a la que se encuentra el 1% de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), fue menor (rango, 15-19 m) durante la época de circulación y la estratificación temprana, incrementándose en la estratificación bien establecida y tardía (rango, 19-30 m). Lo que permite reconocer una fase de aguas turbias con una menor Zeu y otra de aguas claras con mayor Zeu respectivamente (Fig. 5).

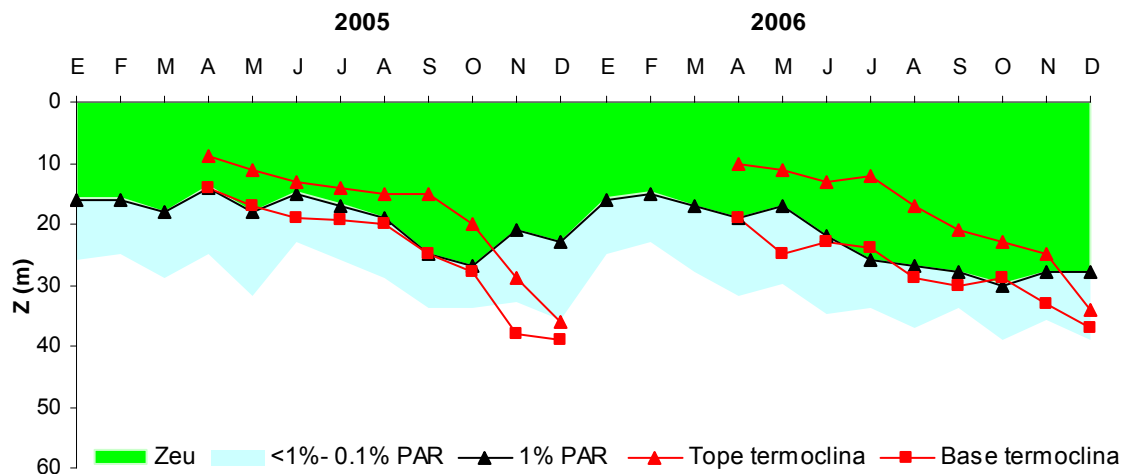


Fig. 5 Ubicación de la radiación fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés), profundidad eufótica (Zeu), límites de termoclina en el lago Alchichica durante un ciclo bienal.

Cabe destacar, que hubo un acoplamiento entre la evolución de la termoclina y del PAR durante la mayor parte de la estratificación en el ciclo bienal, ya que la base de la termoclina en general se ubicó hasta donde penetró el 1% del PAR. Con excepción, de los últimos meses de la estratificación tardía, donde el límite del 1% del PAR se ubicó por arriba de la termoclina (Fig. 5).

La región donde el PAR fluctuó entre 0.1% y <1% se profundizó entre 7 y 14 m con respecto al límite del 1% del PAR, por lo que su base alcanzó un intervalo entre 25 y 39 m.

8.1.4 NUTRIENTES INORGÁNICOS

En el período de circulación la concentración del N-NH₃ fue alrededor de 2 μmol L⁻¹ a lo largo de toda la columna de agua para el ciclo bienal. Mientras en el epilimnion, conforme se desarrolló la estratificación térmica, la concentración de este nutriente se redujo de 2 a 1 μmol L⁻¹, encontrando incluso concentraciones ≤ 0.5 μmol L⁻¹. En el metalimnion, se observó un comportamiento similar al del epilimnion, aunque en la etapa tardía de la estratificación la concentración de este nutriente se incrementó, llegando a alcanzar entre 2 y 4 μmol L⁻¹. En el hipolimnion, se observó un incremento pronunciado de este nutriente que estableció un gradiente de variación con respecto a la profundidad, alcanzándose la máxima concentración hacia el fondo entre 30 y 50 μmol L⁻¹ para el año 2005 y 2006 respectivamente (Fig. 6).

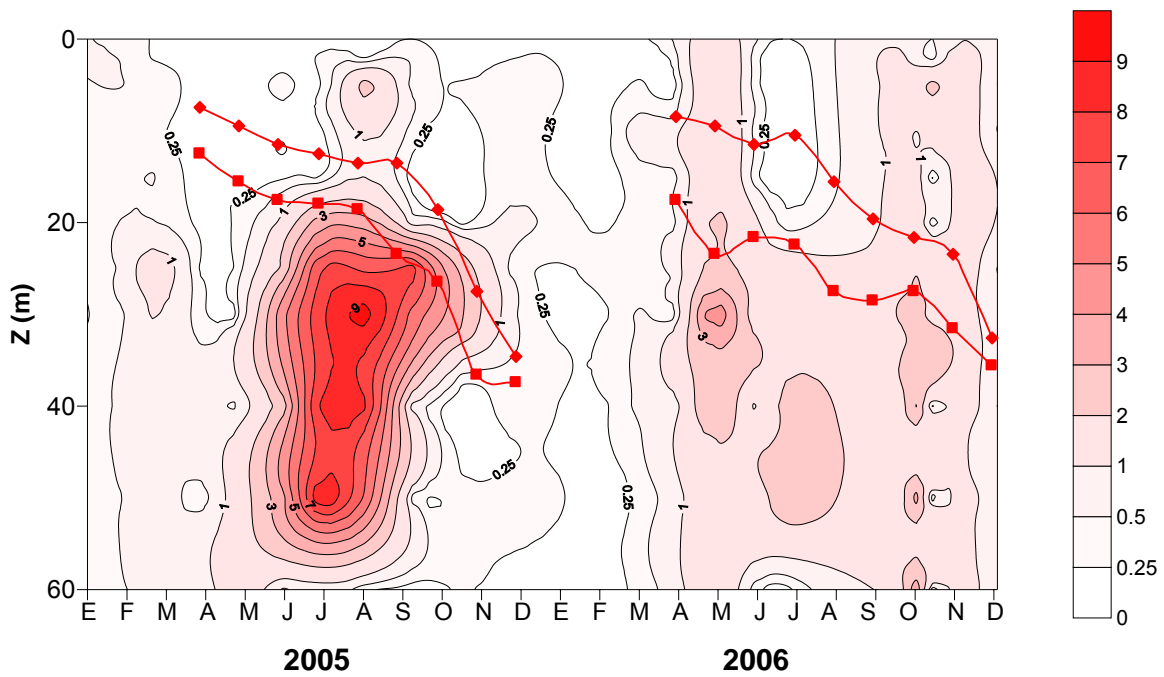


Fig. 7 Diagrama espacio-temporal de las isopleteras de la concentración del NO_3^- en el lago Alchichica durante un bienio (las líneas rojas marcan los límites de la termoclina)

Para el año 2006, se encontró un patrón de variación de la concentración de N-NO_3^- diferente durante todo el proceso de estratificación, registrando $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ como concentración máxima en el hipolimnion (Fig. 7).

En el período de circulación la concentración de fósforo soluble reactivo (PSR) fluctuó en un rango de 0.4 a $0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ y de 0.2 a $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ a lo largo de la columna de agua en los años 2005 y 2006 respectivamente (Fig. 8).

Durante la estratificación térmica se observó tanto para el epilimnion como en el metalimnion un agotamiento del PSR y un incremento hacia el hipolimnion, registrándose las máximas concentraciones cerca del fondo (alrededor de $4.4 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Fig. 8).

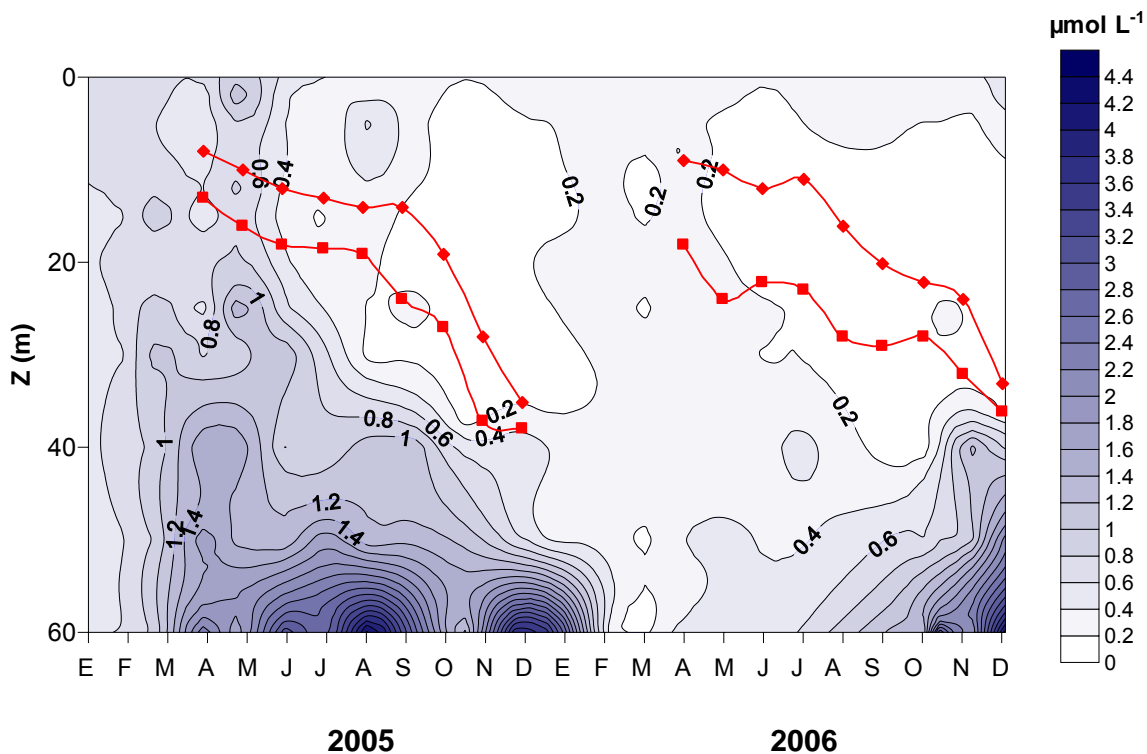


Fig. 8 Diagrama espacio-temporal de las isopletas de la concentración del fósforo soluble reactivo en el lago Alchichica durante un bienio (las líneas rojas marcan los límites de la termoclina).

Al relacionar las formas de los nutrientes inorgánicos se encontró un cociente para NID:PSR promedio de 3.7 ± 1.2 para el periodo de circulación y de 12.8 ± 13.8 durante el periodo de estratificación para el año 2005. Y la relación NID:PSR fue 10.9 ± 6.9 y 18.5 ± 10.2 para ambos periodos respectivamente durante el año 2006.

8.1.5 NUTRIENTES ORGÁNICOS PARTÍCULADOS

Durante el período de circulación el nitrógeno orgánico particulado (NOP) fluctuó entre 5 y 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a lo largo de la columna de agua para el año 2005, mientras entre 2 y 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para el año 2006 (Fig. 9).

De manera similar a la dinámica de los nutrientes inorgánicos se encontró una variabilidad interanual de la concentración de los nutrientes orgánicos. Así, durante la estratificación térmica temprana y bien establecida del año 2005 se registraron para el epilimnion las máximas concentraciones de NOP ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$), estableciéndose un gradiente de máxima variación en el metalimnion. En el

hipolimnion las concentraciones fueron menores y más constantes, entre 3 y 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para la estratificación tardía hubo una reducción general del NOP con concentraciones entre 2 y 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para todos los estratos (Fig. 9)

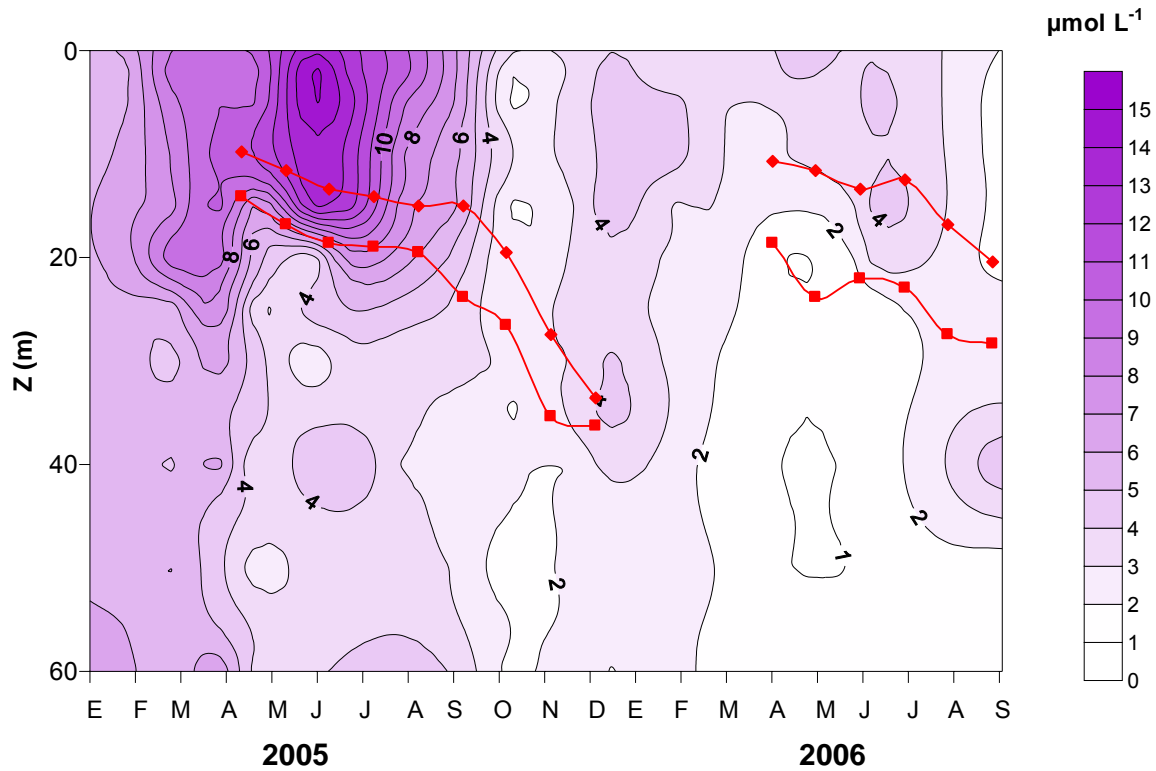


Fig. 9 Diagrama espacio-temporal de las isopletas de la concentración del nitrógeno orgánico particulado en el lago Alchichica durante un bienio (las líneas rojas marcan los límites de la termoclina)

Mientras, para el período de estratificación en el año 2006, no se registraron máximos epilimnéticos, ni gradientes pronunciados en el metalimnion y las concentraciones en todos los estratos fueron menores en comparación con el año 2005 (Fig. 9).

La concentración del fósforo orgánico particulado (POP) durante los meses de circulación en el lago fluctuaron entre 0.4 y 0.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para el año 2005 y entre 0.3 y 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a lo largo de la columna de agua (Fig. 10).

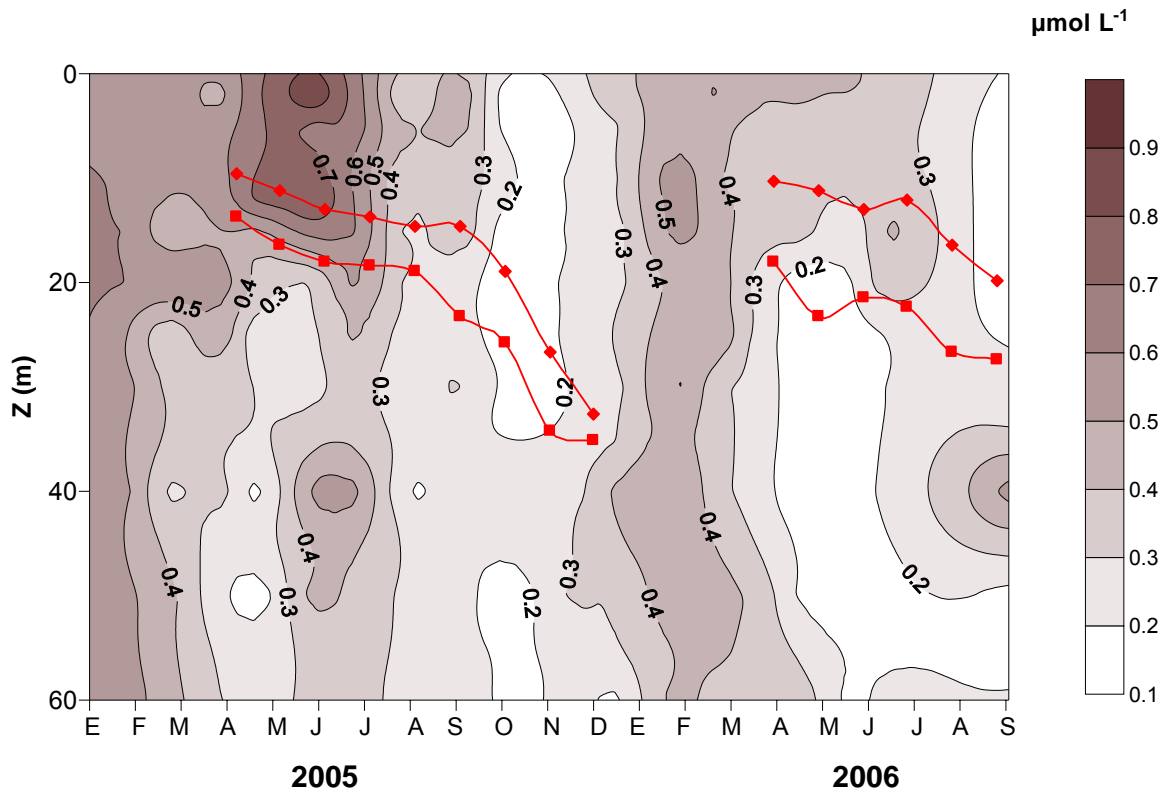


Fig. 10 Diagrama espacio-temporal de las isopletas de la concentración de fósforo orgánico particulado en el lago Alchichica durante un bienio (las líneas rojas marcan los límites de la termoclina)

De manera análoga a la concentración del NOP durante el año 2005 se presentó en la estratificación temprana y bien establecida un máximo epilimnético, con variación entre 0.7 y 0.9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y un gradiente de máxima variación en el metalimnion, con concentraciones $\leq 0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ hacia el hipolimnion. Para la estratificación tardía las concentraciones de POP disminuyen de 0.3 a 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en los tres estratos (Fig. 10).

De igual forma para el periodo de estratificación del año 2006 las concentraciones del POP fueron inferiores al año 2005, mostrando además un patrón de variación diferente entre estratos (Fig. 10).

8.1.6 COMPARACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE LAS FORMAS INORGÁNICAS Y ORGÁNICAS DE LOS NUTRIENTES.

En general durante el período de circulación del lago se encontró una concentración mediana mayor de las formas orgánicas particuladas del

nitrógeno que las inorgánicas. De éstas últimas predominaron las formas reducidas sobre las oxidadas (Fig. 11).

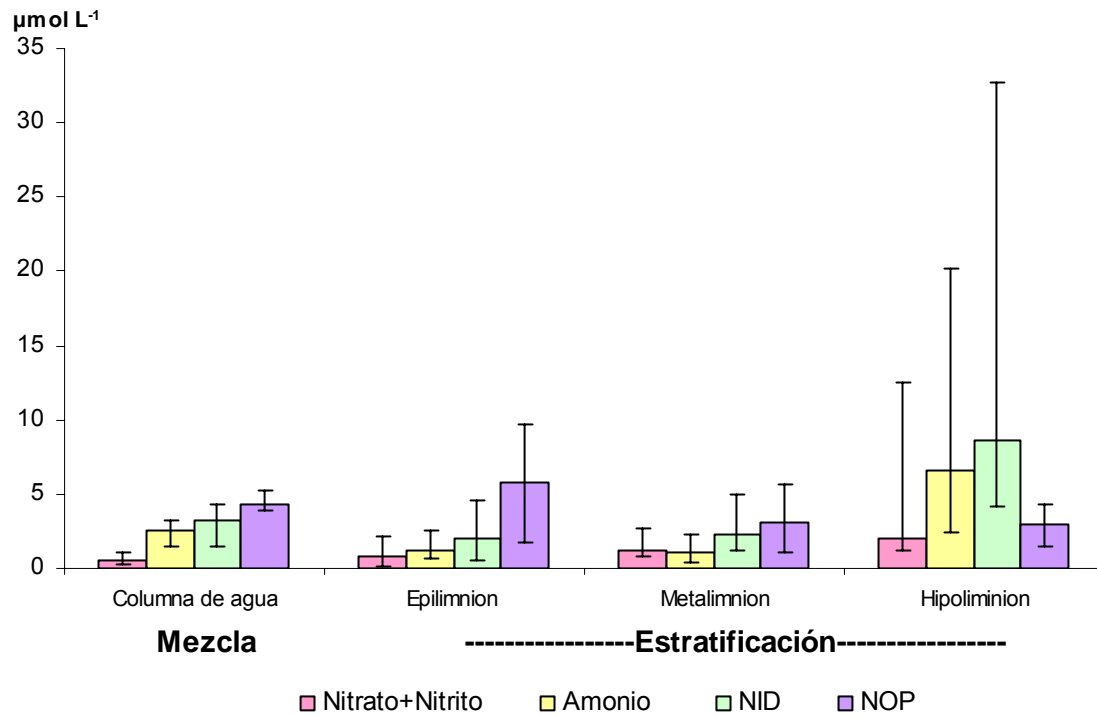


Fig. 11 Concentración mediana y rango de las formas de nitrógeno para el bienio (2005-2006) en el lago Alchichica (NID= nitrógeno inorgánico disuelto, NOP= nitrógeno orgánico particulado).

Para la estratificación térmica se registró una mayor concentración mediana del NOP, con un patrón similar de las formas inorgánicas a las registradas en la columna de agua durante la mezcla. De manera contrastante, en el hipolimnion se incrementan de manera significativa las concentraciones de las formas inorgánicas y decrece la concentración del NOP. Mientras en el metalimnion predominan las formas oxidadas sobre las reducidas del nitrógeno, con proporciones más o menos equivalente entre el NID y el NOP (Fig. 11)

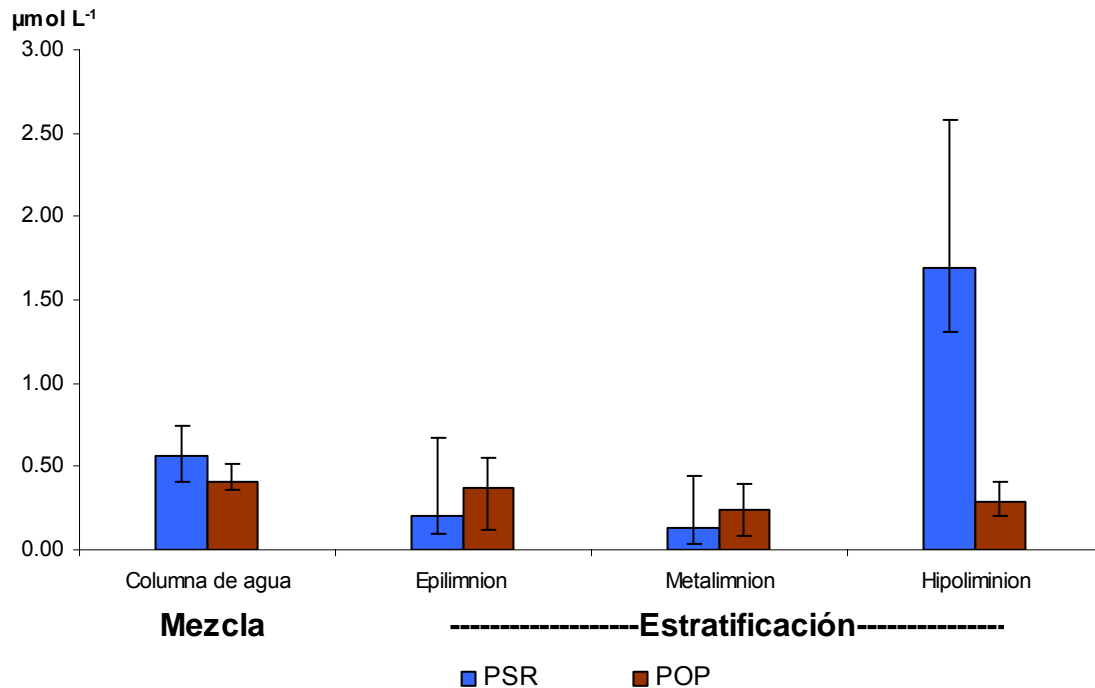


Fig. 12 Concentración mediana y rango de formas del fósforo para el bienio (2005-2006) en el lago Alchichica (PSR= fósforo soluble reactivo, POP= Fósforo orgánico particulado).

En el período de mezcla la concentración mediana del fósforo soluble reactivo (PSR) fue mayor que el fósforo orgánico particulado (POP). Mientras durante la estratificación térmica, para el epilimnion y el metalimnion predominó con mayor concentración el POP sobre PSR, aunque este último presentó un mayor rango de variación. De manera contrastante en el hipolimnion la concentración mediana del PSR superó de forma importante la del POP (Fig. 12).

8.2 DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE (AUTOTRÓFICO Y HETEROTRÓFICO).

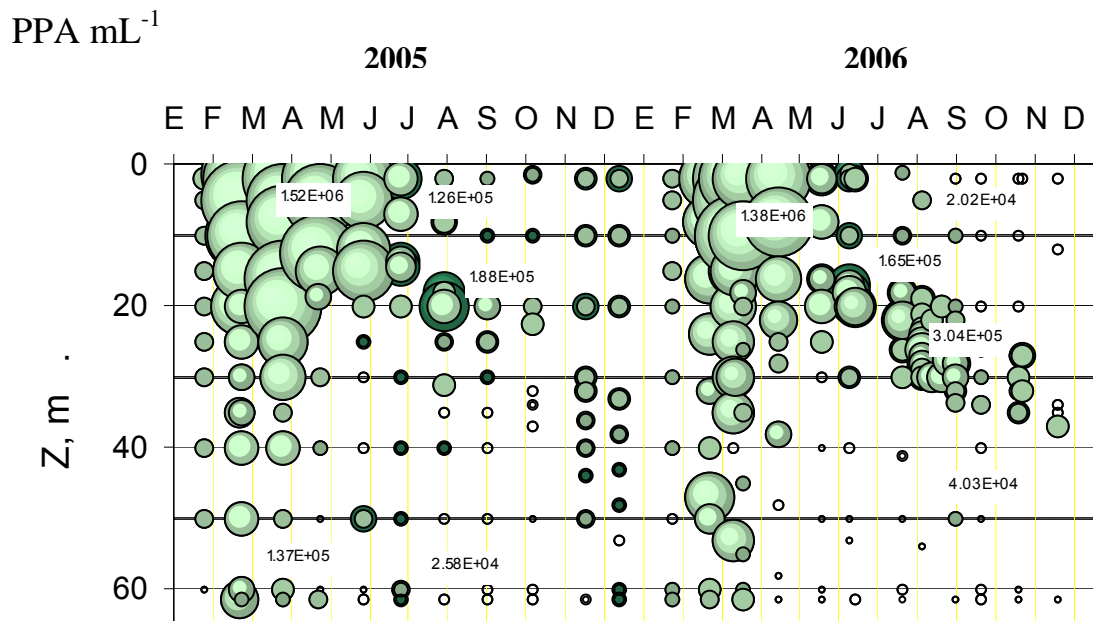
8.2.1 ABUNDANCIA

En el lago Alchichica la densidad del picoplancton autotrófico (PPA) tendió a ser homogénea $\leq 0.09 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ a lo largo de la columna de agua en el mes de enero de ambos años. En los meses subsiguientes de la mezcla y al principio de

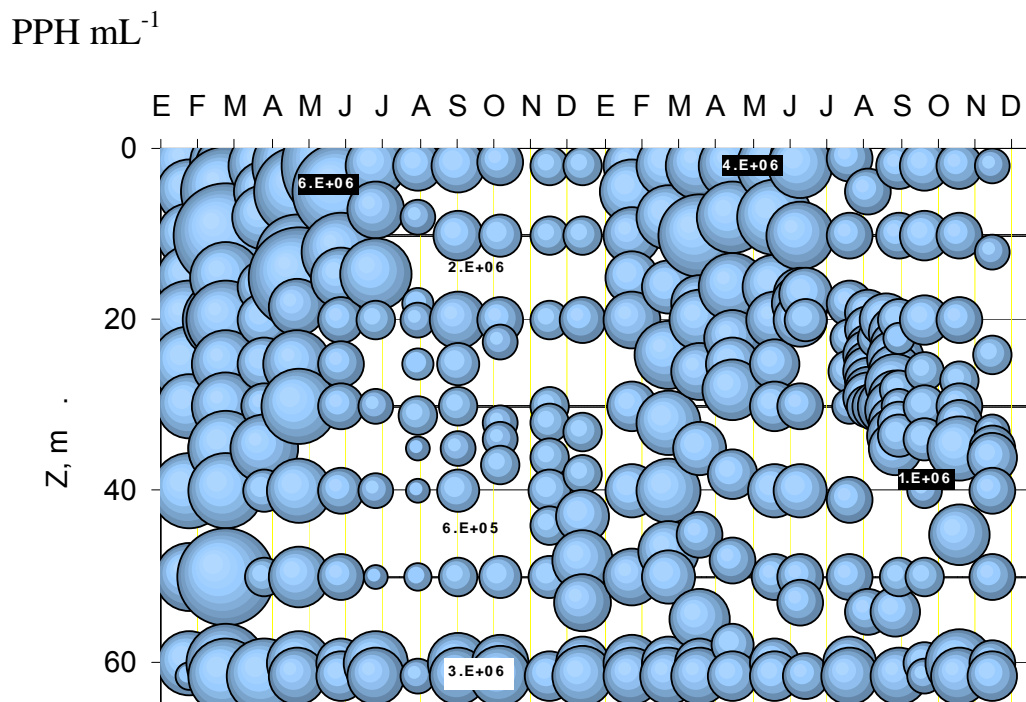
la estratificación se observó un incremento de la abundancia de este grupo hacia los primeros 30 m de la columna de agua, disminuyendo ésta con la profundidad. Así, en la estratificación temprana se registró la máxima abundancia (1.3 a 1.5×10^6 cél. mL^{-1}) en el epilimnion. Mientras, en el hipolimnion las concentraciones fueron $\leq 0.1 \times 10^6$ cél. mL^{-1} .

Durante la estratificación bien establecida la máxima densidad del PPA se registró en el metalimnion (0.3 a 0.5×10^6 cél. mL^{-1}). Y para la estratificación tardía las abundancias fueron las menores registradas $< 0.1 \times 10^6$ cél. mL^{-1} en los años respectivos (Fig. 13a).

La densidad del PPH fue superior a la registrada para el PPA a través del año. El máximo poblacional epilimnético se presentó de finales de abril a principios de junio del 2005 (6×10^6 cél. mL^{-1}) y de finales de marzo a principios de junio del 2006 (4×10^6 cél. mL^{-1}). Durante este mismo periodo, la densidad del hipolimnion fluctuó entre 1.8 y 3.3×10^6 cél. mL^{-1} . Para los meses restantes de estratificación existen menores diferencias de densidad del PPH entre los distintos estratos. Destaca que en el fondo del lago, en la zona de interfase agua-sedimento, se registraron las mayores densidades del hipolimnion. (Fig. 13b).



(a)



(b)

Fig. 13 Abundancia del picoplancton autotrófico “PPA” (a) y del picoplancton heterotrófico “PPH” del lago Alchichica durante un bienio (2005- 2006). Los números dentro de la gráfica muestran la relación entre el área de los círculos y las abundancias de los grupos.

En cuanto a la variabilidad general del picoplancton autótrofo (PPA) en la capa de mezcla, se definió un comportamiento en forma de campana asimétrica con un máximo a finales del mes de marzo y principios del mes de abril en el epilimnion, al inicio de la estratificación térmica. En los meses consecutivos hay un descenso de las densidades conforme avanza el período de estratificación. A partir del mes de septiembre y hasta enero hay una tendencia asintótica en las densidades más bajas durante el período de estudio, que se corresponden con la estratificación tardía en el lago.

En el metalimnion, en la estratificación térmica temprana se presentó también un máximo en la densidad del PPA, aunque por debajo de la registrada en el epilimnion. En la estratificación bien establecida, la densidad del PPA en el metalimnion fue mayor que en el epilimnion. Durante la estratificación tardía se observó un comportamiento análogo al de la zona epilimnética, registrándose los mínimos de abundancia del PPA en ambas zonas.

En el hipolimnion se presentaron siempre las abundancias más bajas de todos los estratos. Con densidades del PPA menores en uno o dos órdenes de magnitud, con respecto al epilimnion durante la estratificación temprana y bien establecida. Las diferencias de densidad del PPA entre estratos tendieron a hacerse mínimas en la estratificación tardía (Fig. 14 a).

El PPH mostró una tendencia general de variabilidad anual relativamente similar al PPA. Dado que para el PPH en la capa de mezcla, durante los meses del período de circulación y en la estratificación temprana se presentó un comportamiento bimodal, registrándose el primer máximo en el mes de febrero y el segundo en el mes de mayo para ambos años (Figs. 14a y 14b).

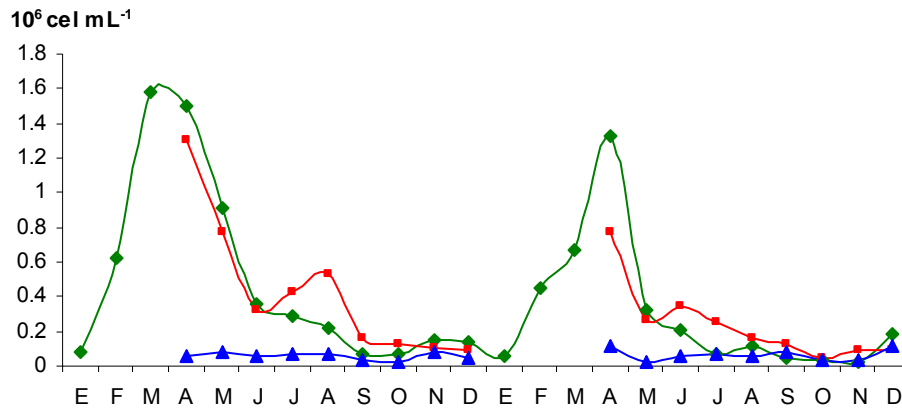
Las densidades del PPH fueron mayores con respecto al PPA, siendo de 3 a 5 veces superiores en el epilimnion y de uno a dos órdenes de magnitud en relación con el hipolimnion durante el período de estratificación térmica.

En la estratificación temprana el metalimnion presentó una densidad menor o igual con respecto al epilimnion. En la estratificación bien establecida las densidades fueron mayores en el metalimnion o equiparables entre estos dos estratos. Para el hipolimnion se registraron densidades entre 2 y 4 veces

menores al epilimnion y el metalimnion durante los primeros cuatro meses de la estratificación. En los meses subsecuentes las diferencias de densidades entre los estratos fueron mínimas, con excepción de los dos últimos meses de la estratificación tardía donde la densidad del hipolimnion llegó a superar la densidad de los otros dos estratos (Fig. 14 b).

Cabe destacar que en general en el bienio tanto para el PPA como el PPH se registraron mayores densidades durante el año 2005 con respecto al 2006 (Figs. 14 a y b).

(a)



(b)

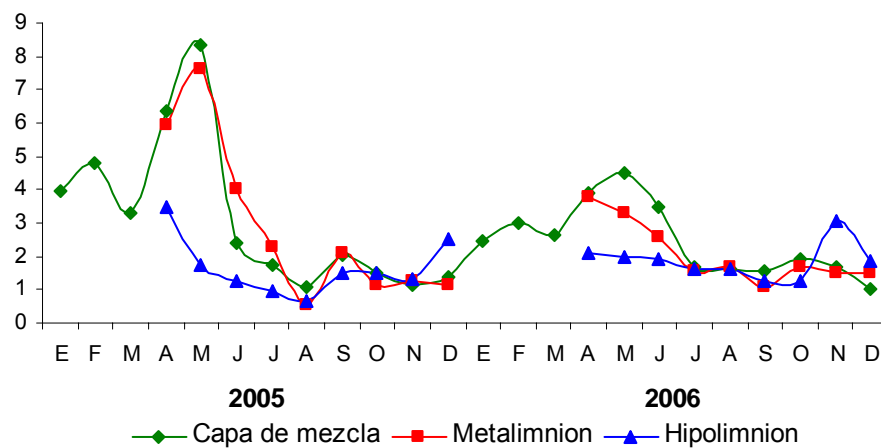


Fig. 14 Variación temporal de la abundancia por estratos del picoplancton autotrófico “PPA” (a) y del picoplancton heterotrófico “PPH” (b) del lago Alchichica durante un bienio.

8.2.2 BIOMASA

La variación de la biomasa del picoplancton autotrófico siguió un patrón equivalente al de la abundancia (Figs. 14a y 15a). Así, se estableció un incremento consecutivo de la biomasa durante los meses de circulación, presentándose para el período de estratificación un máximo epilimnético ($93 \mu\text{g C}_{\text{org. L}^{-1}}$). Posteriormente, se dio un descenso significativo de las biomásas en la capa de mezcla durante la estratificación bien establecida y tardía (de 5 a $0.18 \mu\text{g C}_{\text{org. L}^{-1}}$). También se observó que la biomasa metalimnética fue mayor que la biomasa epilimnética durante la estratificación bien establecida. Durante todo el periodo de estratificación la biomasa promedio hipolimnética por mes fue menor a $1 \mu\text{g C}_{\text{org. L}^{-1}}$ (Fig. 15a).

La variación temporal de la biomasa del picoplancton heterótrofo presentó dos máximos en la capa de mezcla durante los meses de febrero y mayo de $47 \mu\text{g C}_{\text{org. L}^{-1}}$. Posteriormente, en este estrato las biomásas disminuyen consecutivamente hasta alcanzar un mínimo en el mes de septiembre de $13 \mu\text{g C}_{\text{org. L}^{-1}}$. Para la estratificación tardía se volvió a presentar un incremento de la misma.

Las biomásas del PPH en la capa metalimnética siguen un patrón similar al epilimnion, aunque con biomásas menores.

Para las biomásas en el hipolimnion del lago se observó un incremento consecutivo a través del tiempo, superando incluso estas a las registradas en los estratos superiores en la estratificación bien establecida y tardía (Fig. 15b).

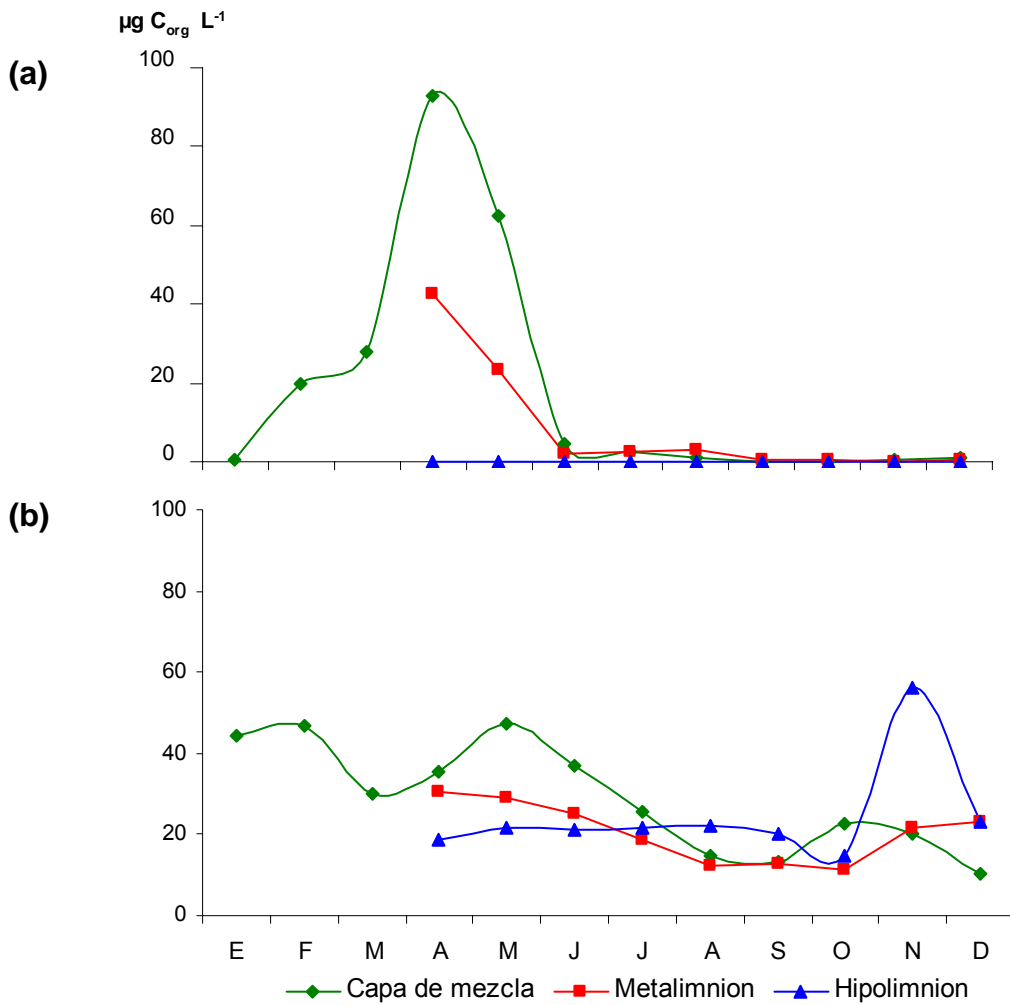


Fig. 15 Variación temporal de la biomasa por estratos del picoplancton autotrófico, PPA (a), y del picoplancton heterotrófico, PPH (b), durante un ciclo anual (2006).

El intervalo de variación del contenido de carbono y de la biomasa para ambos grupos funcionales del picoplancton se reporta en el cuadro (3).

Cuadro 3. Intervalo de variación del contenido de carbono y biomasa del picoplancton heterotrófico (PPH) y del picoplancton autotrófico (PPA) en el lago Alchichica.

	Contenido de carbono fg C _{org.} cél. ⁻¹	Biomasa µg C _{org} L ⁻¹
PPH	6 a 30	9 a 105
PPA	22 a 143	1 a 146

8.3 ESTRUCTURA, COMPOSICIÓN Y DINÁMICA DE LOS GRUPOS PROCARIONTES DETERMINADOS POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE.

Los mayores porcentajes de hibridación del Dominio *Bacteria* (EUB) (50 al 80 % dependiendo del estrato) se obtuvieron durante los meses de circulación y en la estratificación temprana para el ciclo bienal. Para el año 2006, además se registró una mayor variabilidad de los porcentajes de hibridación durante la estratificación bien establecida y tardía, donde incluso se encontraron otros máximos (Fig. 16).

Los menores porcentajes de hibridación (4 a 11 %) se registraron en la estratificación tardía, siendo particularmente notoria esta disminución en el mes de octubre para ambos años.

En general, aunque fue equiparable la variabilidad interanual de la densidad del picoplancton total (PPT), no lo fue para los porcentajes de hibridación del Dominio *Bacteria*. Debido a que para los porcentajes de hibridación, mientras en el año 2005 hubo una tendencia general a disminuir con respecto al tiempo, en el año 2006 hubo una marcada fluctuación de los mismos (Fig. 16).

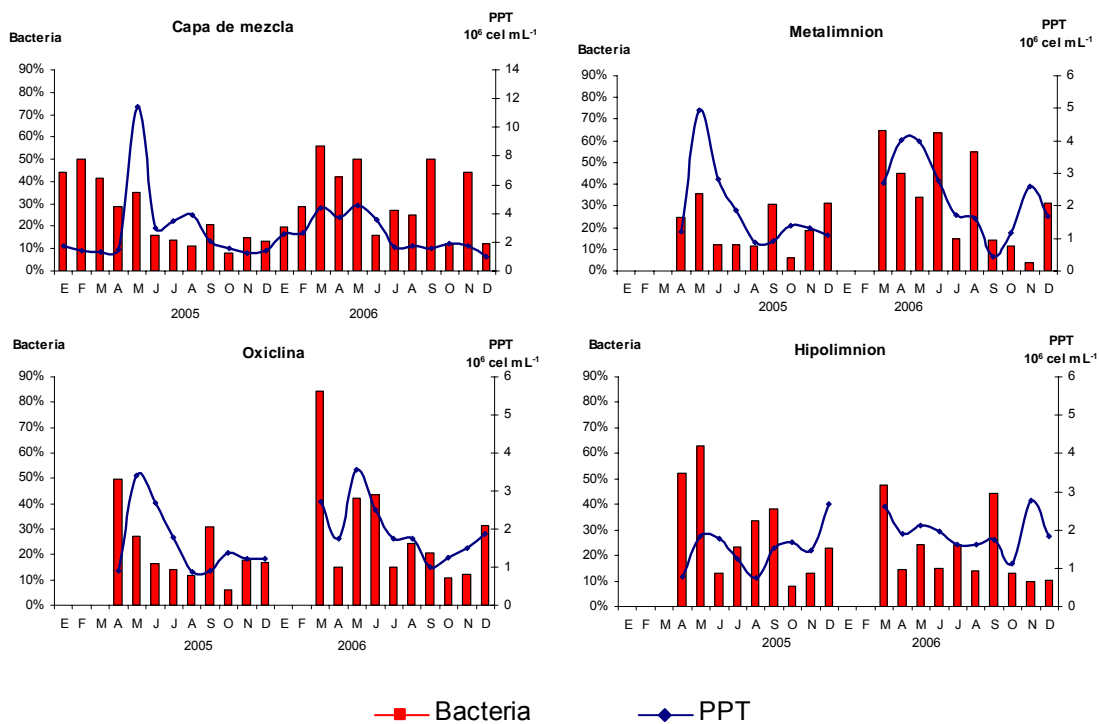


Fig. 16 Abundancia del picoplancton total (PPT) y porcentaje de hibridación *in situ* fluorescente del Dominio Bacteria en diferentes estratos durante un bienio en el lago Alchichica.

Al realizar un análisis de cajas múltiples con muesca para los porcentajes de hibridación, se obtuvieron para el año 2005 dos grupos claramente diferenciados estadísticamente: aquellos que se corresponden con la época de circulación estratificación temprana, y los relacionados con la estratificación bien establecida y tardía. Así, entre estos grupos existen diferencias significativas con respecto a la mediana ($P < 0.05$). En el primer grupo se presentó un alto porcentaje de hibridación y, en el segundo, un bajo o medio porcentaje de hibridación (Fig. 17).

Para el año 2006, durante los meses de circulación y al inicio de la estratificación se observó un incremento consecutivo en la mediana de los porcentajes de hibridación. En la estratificación bien establecida y tardía disminuyó la mediana en los mismos, con excepción del mes de septiembre (Fig.17).

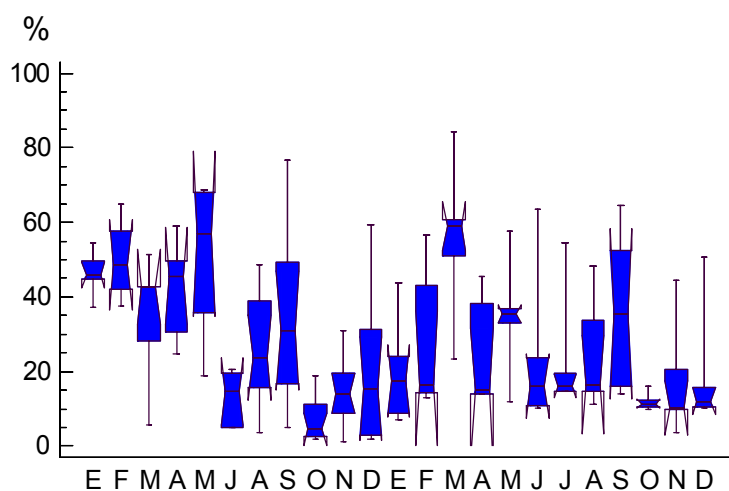


Fig. 17 Análisis de cajas múltiples del porcentaje de bacterias totales hibridadas en el lago Alchichica durante un ciclo bienal (2005-2006).

En el lago Alchichica, durante el periodo de circulación el número de grupos bacterianos específicos fue menor con respecto al período de estratificación (Fig. 18). Así, en los meses de mezcla predominaron por su abundancia el grupo *Planctomycetes*, seguidos de manera consecutiva por Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y, en una mínima proporción, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, de tal forma que más del 50% de las bacterias no pudieron ser determinadas para este periodo (Fig. 18). Lo anterior podría atribuirse a la abundancia elevada de picocianobacterias en el lago durante la mezcla, que podrían ser consideradas como el grupo dominante a lo largo de toda la columna de agua (Fig. 14a).

Durante la estratificación térmica en el bienio los grupos bacterianos dominantes en el epilimnion fueron *Planctomycetes* y Betaproteobacterias; en la estratificación bien establecida y tardía también *Paracoccus* tuvo una contribución importante. Únicamente, en el año 2006, para éstas dos últimas etapas de la estratificación las bacterias sulfato reductoras (BSR) fueron importantes porcentualmente (Fig. 18).

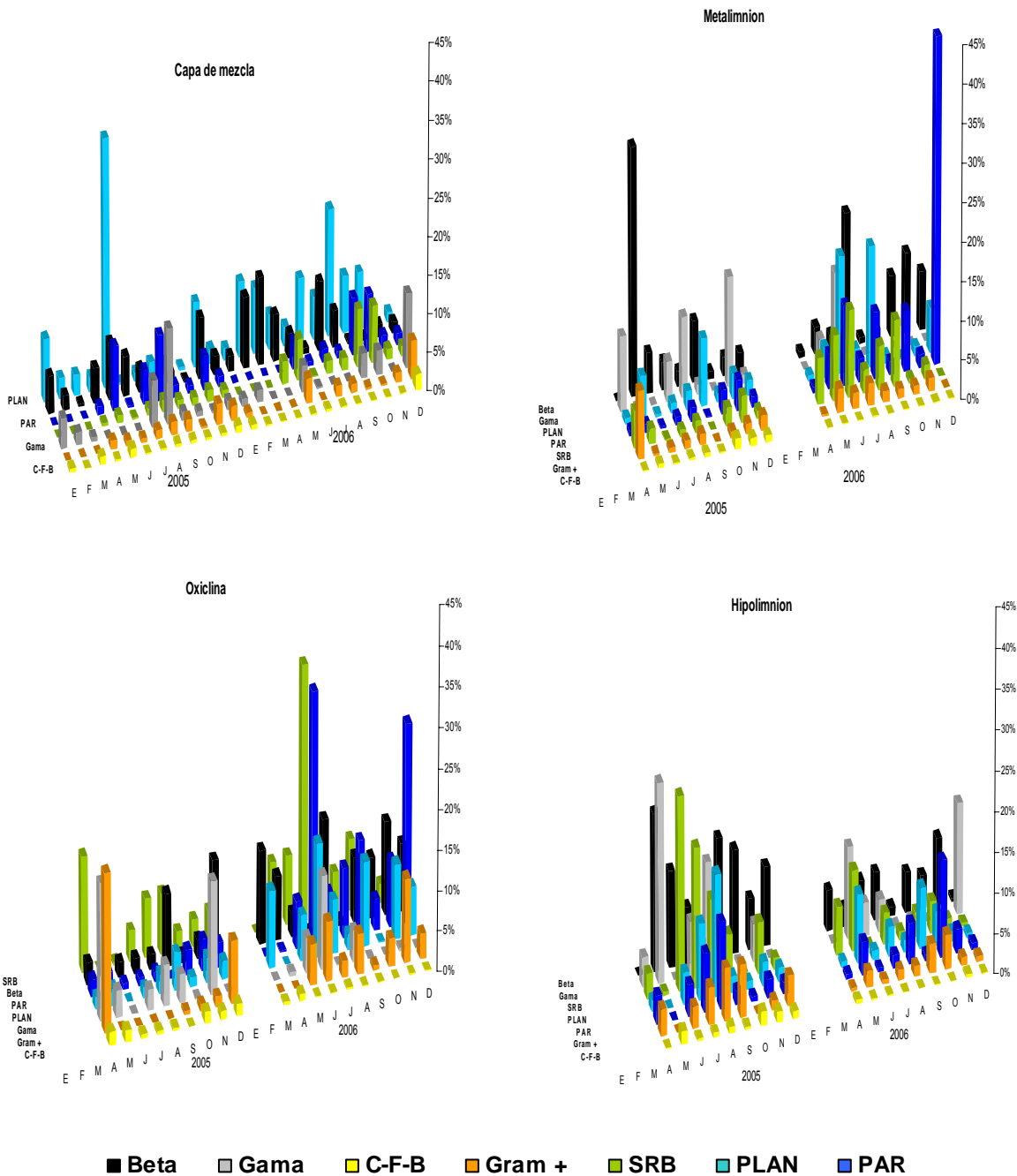


Fig. 18 Composición de la comunidad bacteriana analizada por estratos para la abundancia de grupos específicos bacterianos a través de pruebas de oligonucleótidos con FISH, para los años 2005-2006 en el lago Alchichica (en cada estrato los grupos aparecen ordenados de forma ascendente de acuerdo con su contribución).

En el metalimnion, a lo largo de toda la estratificación predominaron los grupos Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria, seguidos por *Planctomycetes*. Asimismo, en el año 2006, hubo una contribución porcentual relativa mayor de BSR y *Paracoccus* con respecto al año 2005 (Fig.18).

En la oxiclina, para el año 2005 dominaron las BSR, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria, registrando la presencia de CFB en bajos porcentajes. Mientras para el 2006 predominaron *Paracoccus*, BSR, *Planctomycetes*, seguidos por Gram+ con una contribución porcentual importante.

En el hipolimnion, para el 2005 se presentaron en la estratificación temprana en porcentajes equiparables los diversos grupos bacterianos, en la estratificación bien establecida se registró un máximo en las hibridaciones con dominancia en forma descendente de Betaproteobacteria y Gammaproteobacterias, BSR, *Planctomycetes*, *Paracoccus*, Gram+. En la estratificación tardía, se conservó esta tendencia aunque con menores porcentajes de hibridación. En el 2006, también hubo una contribución porcentual relativa de los diferentes grupos bacterianos, con excepción de CFB. Aunque para este año, los máximos porcentajes de hibridación se presentaron en la estratificación temprana y tardía.

El Dominio *Archaea* fluctuó del 0 al 2 % durante el año 2005 presentándose el mayor porcentaje de hibridación durante los meses de estratificación bien establecida. En el año 2006, su variación fue del 0 al 6%, registrándose este último valor a inicio de la estratificación (Fig. 19). En cuanto al control negativo (NON) promedio registrado a través del período de estudio se mantuvo entre menos del 0.5% y el 2% (Fig. 19).

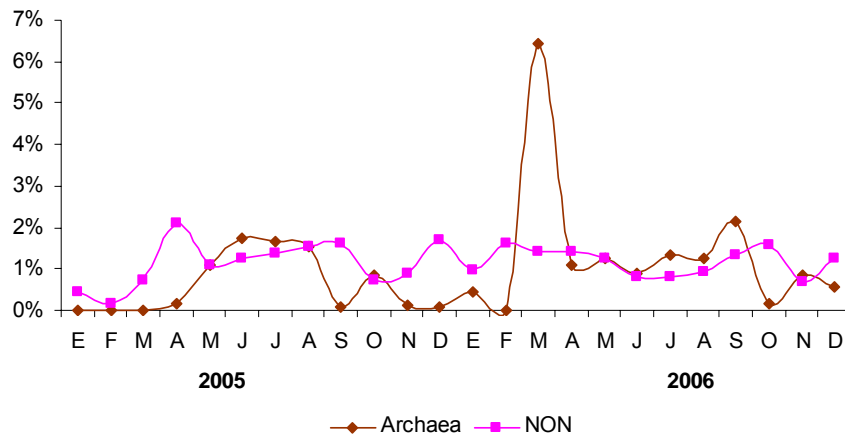


Fig. 19 Variación temporal del Dominio *Archaea* y del control negativo (NON) durante un bienio en el lago Alchichica

8.4 RELACIÓN DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE CON PARÁMETROS LIMNOLÓGICOS DEL LAGO ALCHICHICA

Al relacionar los parámetros limnológicos con los logaritmos de las abundancias del picoplancton tanto autotrófico (PPA) como heterotrófico (PPH) se encontró una correlación positiva (r^2 entre 0.51 y 0.64, $p < 0.01$) con la concentración del oxígeno disuelto durante la mezcla y la estratificación. Así como con la temperatura para ambos grupos funcionales en la estratificación ($p < 0.01$) y únicamente entre esta variable con el PPA en la mezcla ($P < 0.05$) (Cuadro 3).

Para estos dos grupos funcionales también se registró una correlación alta significativa (r^2 entre 0.6 y 0.77; $p < 0.01$) con el NOP a lo largo del ciclo anual en el lago. Así como con el POP una correlación significativa ($r^2 = 0.63$, $p < 0.01$) para el PPH y el PPA durante la estratificación y con este mismo parámetro únicamente para el PPH ($r^2 = 0.73$, $p < 0.01$) durante la mezcla (Cuadro 3).

Cabe destacar que durante la mezcla, el APP presentó una correlación menor significativa con la relación molar NID:PSR. Asimismo, en el período de estratificación también se registraron correlaciones menores significativas con el fósforo soluble reactivo, el nitrógeno inorgánico disuelto, el $N-NH_3$ (Cuadro 3 a y b).

De los grupos taxonómicos de procariontes determinados por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) durante el período de estratificación para el Dominio *Bacteria*, se encontró una correlación positiva con el O.D. y los nutrientes orgánicos particulados (nitrógeno y fósforo) y una correlación negativa con el NID y la relación molar NID:PSR durante el período de circulación. Para el Dominio *Archaea* se encontró una correlación positiva con NID:PSR y una asociación negativa con el POP y los N-NO_3^- . Para *Planctomyces* se registró una asociación positiva también con el POP y NOP y negativa con NID:PSR. Para Betaproteobacteria se presentó con la temperatura y el POP (Cuadro 3a).

Durante el proceso de estratificación para los grupos taxonómicos *Bacteria*, *Archaea*, Betaproteobacteria, *Planctomyces* se registró correlación positiva con ambos nutrientes orgánicos particulados. Y para *Paracoccus* se obtuvo una asociación positiva con NOP. Para éste género, las bacterias Gram-positivas y las bacterias sulfato reductoras hubo una correlación positiva con los N-NO_3^- (Cuadro 3b).

Cuadro 3. Correlación de Pearson entre el picoplancton procarionte y los parámetros limnológicos del lago Alchichica, durante el período de mezcla (a), con n=22 y el período de estratificación (b) en el año 2005 con diferencias significativas: ^a p<0.01 o ^b p<0.05, ns= no diferencias significativas p>0.05. NOP nitrógeno orgánico particulado, POP Fósforo orgánico particulado, PSR fósforo soluble reactivo, NID nitrógeno inorgánico disuelto, PPA picoplancton autotrófico, PPH picoplancton heterotrófico, Beta Betaproteobacteria, Gama Gammaproteobacteria, PLA *Planctomycetes*, PAR *Paracoccus*, Gram + Bacterias Gram-positivas, SRB bacterias sulfato reductoras.

a) Mezcla

Parámetro	PPA	PPH	Bacteria	Archaea	PLA	Beta
Temperatura	0.41 ^b	ns	ns	ns	ns	-0.43 ^b
Oxígeno	0.51 ^a	0.65 ^a	0.44 ^b	ns	ns	ns
NOP	0.75 ^a	0.69 ^a	0.61 ^a	ns	0.43 ^b	ns
POP	ns	0.73 ^a	0.78 ^a	-0.44 ^b	0.65 ^b	-0.41 ^b
NID	ns	-0.50 ^b	-0.54 ^a	ns	ns	ns
NID:PSR	-0.36 ^b	-0.59 ^a	-0.41 ^b	0.45 ^b	-0.54 ^b	ns
Nitrato	ns	ns	ns	-0.51 ^a	ns	ns

b) Estratificación

Parámetro	PPA	PPH	Bacteria	Archaea	Beta	Gama	PLA	PAR	Gram+	SRB
Temperatura	0.56 ^a	0.64 ^a	ns	ns	ns	-0.32 ^b	ns	ns	ns	ns
Oxígeno	0.65 ^a	0.61 ^a	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NOP	0.70 ^a	0.77 ^a	0.41 ^a	0.32 ^b	0.29 ^b	ns	0.47 ^a	0.41 ^a	ns	ns
POP	0.63 ^a	0.63 ^a	0.49 ^a	0.39 ^a	0.38 ^a	ns	0.39 ^a	ns	ns	ns
PSR	-0.34 ^a	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NID	-0.37 ^a	ns	ns	ns	ns	0.33 ^b	ns	ns	ns	ns
Nitrato	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.33 ^b	0.40 ^a	0.47 ^a
Amoniaco	-0.42 ^a	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

En el año 2006 se encontraron menores correlaciones entre los parámetros biológicos y los limnológicos (Cuadro 4). No presentándose una consistencia entre la explicación dada por la asociación de estas variables para el bienio (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 4. Correlación de Pearson entre el picoplancton procarionte y los parámetros limnológicos del lago Alchichica, durante el período de mezcla (a), con n=22 y el período de estratificación (b) en el año 2006 con diferencias significativas: ^a p<0.01 o ^b p<0.05, ns= no diferencias significativas p>0.05. NOP nitrógeno orgánico particulado, POP Fósforo orgánico particulado, PSR fósforo soluble reactivo, NID nitrógeno inorgánico disuelto, PPA picoplancton autotrófico, PPH picoplancton heterotrófico, Beta Betaproteobacteria, Gama Gammaproteobacteria, PLA *Planctomycetes*, PAR *Paracoccus*, Gram + Bacterias Gram-positivas, SRB bacterias sulfato reductoras.

a) Mezcla 2006

Parámetro	PPA	PPH	Bacteria	Archaea	PLA	Beta	Gama	CF
Profundidad	-0.57 ^b	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Temperatura	0.74 ^a	0.74 ^a	ns	ns	ns	ns	ns	ns
POP	ns	ns	-0.54 ^b	ns	-0.58 ^b	-0.56 ^a	ns	-0.53 ^b
Nitrato	ns	ns	ns	ns	0.70 ^a	ns	ns	-0.54 ^b
PSR	ns	0.52 ^b	ns	0.67 ^a	ns	ns	0.55 ^b	ns

b) Estratificación 2006

Parámetro	PPA	PPH	Bacteria	Archaea	Beta	Gama	PLA	PAR	Gram+	SRB
Profundidad	-0.65 ^a	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Temperatura	ns	ns	ns	ns	ns	-0.32 ^b	ns	ns	ns	ns
Oxígeno	0.39 ^b	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NOP	0.45 ^a	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.41 ^a	ns	ns
POP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.3 ^b
Nitrato	ns	ns	ns	ns	ns	-0.59 ^a	ns	0.33 ^b	0.40 ^a	ns
Amoniaco	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NID:PSR	ns	ns	ns	0.39 ^a	0.34 ^b	ns	ns	ns	0.35 ^b	0.34 ^b

Asimismo, con un análisis de correspondencia canónica sin tendencia (DDCA), se encontraron las relaciones multivariadas entre las variables ambientales con la abundancia de los grupos taxonómicos de procariontes (Fig 20).

En el DCCA para el año 2005, las variables ambientales medidas explicaron las abundancias de todos los grupos bacterianos con una correlación de 0.7 y 0.52 para los ejes canónicos 1 y 2. Asimismo, el porcentaje de varianza de la relación grupos bacterianos-parámetros ambientales indicaron que el

primer y segundo eje canónico explicaron el 67.4% y el 93% de la varianza acumulada.

Las variables ambientales con las mayores correlaciones ponderadas dentro de la matriz multivariada para el eje uno fueron el O.D. (0.42), la relación molar NID:PSR (-0.41), N-NO_3^- (-0.37) y POP (0.37). Las variables ambientales más fuertemente correlacionadas con el eje dos fueron los N-NO_3^- (0.40) y el N-NH_3 (-0.31).

El picoplancton autotrófico y el Dominio *Bacteria* tuvieron altos puntajes (0.75 a 1.25) en el eje uno del DCCA, presentando una correlación positiva con el O.D. y el POP y una correlación negativa con la relación molar del NID:PSR y con los N-NO_3^- . El Dominio *Archaea* tuvo un puntaje negativo alto (-1) en el eje uno presentando una relación negativa con el oxígeno disuelto. Las bacterias Gram-positivas, las bacterias sulfato reductoras, el género *Paracoccus* y Planctomycetes presentaron un alto puntaje (1.25) en el eje dos, lo que representó para todos estos grupos taxonómicos una correlación positiva con los N-NO_3^- , mientras Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria tuvieron un puntaje negativo alto (-1 a -1.5) en el eje dos indicando una correlación positiva con el N-NH_3 .

El picoplancton heterotrófico y *Cytophaga-Flavobacteriu-Bacteroides* sin altos puntajes en los ejes específicos ($<\pm 0.5$), por su ubicación entre los ejes sugieren cierta correlación con algunas de las variables ambientales. La abundancia del HPP parece estar relacionada de manera positiva con el oxígeno y la concentración de N-NO_2^- , y CF puede estar asociada con el N-NH_3 , nitrógeno total y el PSR (Fig. 20).

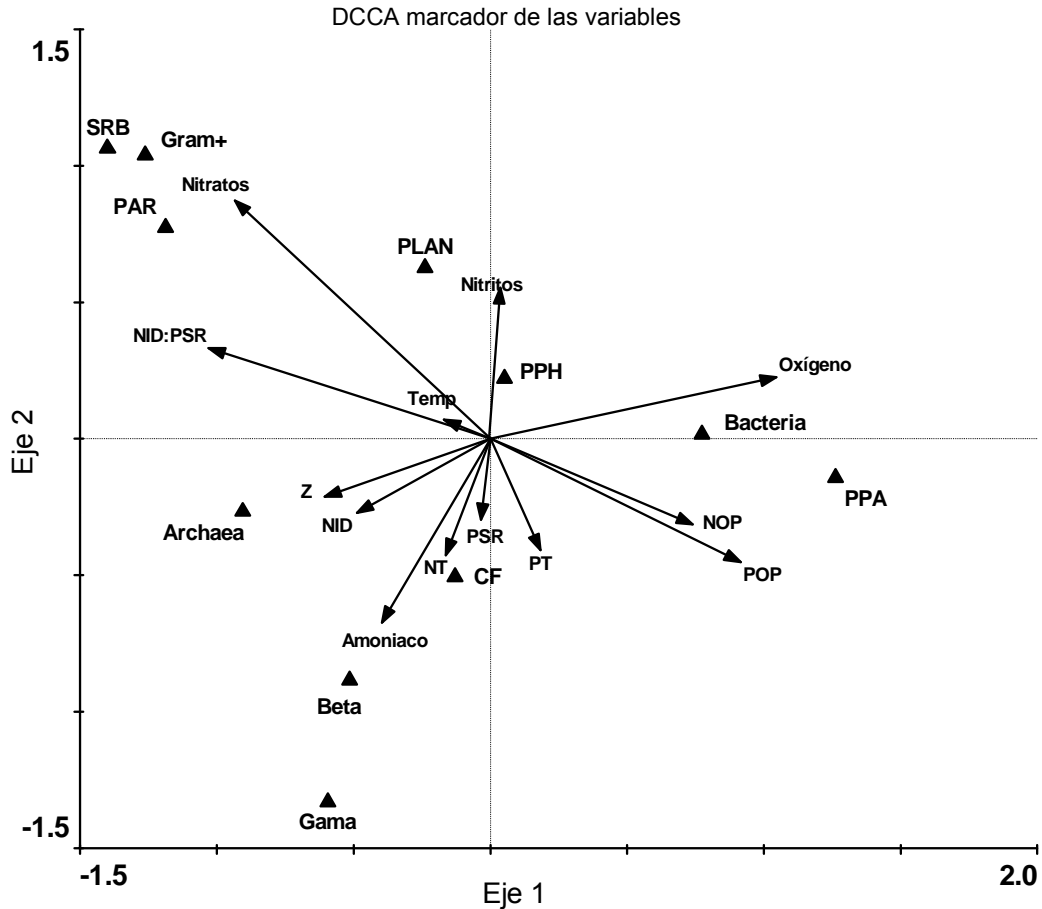


Fig. 20. Análisis de correspondencia canónica sin tendencia (DCCA. Ejes 1 y 2 explican el 67.4% y el 93% de la varianza acumulada de la relación grupos bacterianos-parámetros ambientales. NOP Nitrógeno orgánico particulado, POP fósforo orgánico particulado, PT fósforo total, NT nitrógeno total, PSR fósforo soluble reactivo, NID nitrógeno inorgánico disuelto ($N-NH_3 + N-NO_3^- + N-NO_2^-$), Temp temperatura, Z profundidad, PPH picoplancton heterotrófico enumerado por tinción con DAPI, PPA picoplancton autotrófico, *Bacteria* bacterias hybridizadas con la sonda EUB38, Beta Betaproteobacteria, Gama Gammaproteobacteria, CF *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, Par *Paracoccus*, Gram + *Bacteria* Gram- positiva, SRB bacterias sulfato reductoras, PLA *Planctomycetes*.

En el DCCA para el año 2006, las variables ambientales medidas explicaron las abundancias de todos los grupos bacterianos con una correlación de 0.7 para los ejes canónicos 1 y 2. Asimismo, el porcentaje de varianza de la relación grupos bacterianos-parámetros ambientales indicaron que el primer y segundo eje canónico explicaron el 48% y el 67% de la varianza acumulada.

Las variables ambientales con las mayores correlaciones ponderadas dentro de la matriz multivariada para el eje uno fueron el O.D. (0.36), la relación molar NID:PSR (-0.44), y POP (0.24). Las variables ambientales más fuertemente correlacionadas con el eje dos fueron la profundidad Z (0.57) y el OD (-0.41).

El picoplancton heterotrófico, el Dominio *Bacteria* tuvieron puntajes (<0.2) y Gram +, SRB y PAR (entre -0.7 y -0.8) a en el eje uno del DCCA, presentando una correlación positiva con el O.D. y el POP los primeros y una relación positiva con la relación molar del NID:PSR. El APP presentó un puntaje de ≈ -0.7 correlacionándose positivamente con el APP, mientras Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria se correlacionaron con la profundidad (Z) en el eje 2.

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La variación de la abundancia del picoplancton procarionte durante el ciclo bienal 2005-2006 siguió una tendencia equivalente interanual, aunque con menores densidades durante el segundo año (Fig. 14). En la capa de mezcla se estableció una curva en forma de campana asimétrica, con un incremento consecutivo durante los meses de circulación, presentando abundancias máximas durante el inicio de la estratificación térmica, y disminuyendo paulatinamente conforme esta última avanzó. La fluctuación anual media del picoplancton total (PPT), particularmente por arriba de los 20 m, muestra una periodicidad relacionada con la hidrodinámica del lago, que ha sido modelada a través de una ecuación ondulatoria senoide (Macek *et al.*, 2009).

La dinámica de variación de la abundancia y biomasa del picoplancton autotrófico y heterotrófico se relacionaron directamente con la hidrodinámica del lago Alchichica en cuanto a su comportamiento de monomixis cálida (Alcocer *et al.*, 2000), que se asoció con el patrón anual de los nutrientes equivalente a lo reportado por Oliva *et al.*, (2001). Así, los máximos de las abundancias y las biomásas del picoplancton de ambos grupos funcionales se correspondieron con el período donde hay una mayor disponibilidad de nutrientes provenientes del fondo del sistema, al finalizar el proceso de mezcla y el inicio de la estratificación, que coinciden con la fase de transición entre el período de secas fría y secas caliente.

Las abundancias y biomásas del picoplancton disminuyeron consecutivamente durante la estratificación térmica como resultado del agotamiento de los nutrientes inorgánicos en el epilimnion por asimilación fitoplanctónica y una exportación de las formas inorgánicas reducidas del nitrógeno y del fósforo soluble reactivo hacia el hipolimnion. En éste estrato además se presentaron procesos de desnitrificación, así como liberación de fosfatos de los sedimentos hacia la columna de agua por efecto de las condiciones de anoxia que se presentaron por la descomposición de la materia orgánica tal como lo sugiere Sánchez (2006).

Así, la distribución de las abundancias y biomásas del picoplancton procarionte se correlacionaron con la concentración de los nutrientes orgánicos particulados (nitrógeno y fósforo) en el lago particularmente durante la estratificación (Cuadro 3), siendo mayores sus abundancias y biomásas en el epilimnion y el metalimnion y menores hacia el hipolimnion .

La abundancia y biomasa del picoplancton autotrófico tendió a ser mayor hacia la capa metalimnética del lago durante el periodo de estratificación térmica bien establecida. Lo anterior coincidió con la posición de la termoclina, la oxiclina y el 1% de la radiación fotosintéticamente activa, que fluctuó entre los 15 m durante la mezcla y los 30 m en la estratificación (Fig. 5). En el lago Alchichica, el PPA estuvo representado principalmente por picocianobacterias ricas en ficoeritrinas, que son típicas de lagos estratificados profundos y que tienden a ser abundantes en lagos con tiempos de retención altos durante los periodos de estabilidad tal como lo ha reportado Camacho *et al.* (2003).

Entre el PPA, únicamente las picocianobacterias con prevalencia de fluorescencia roja se encuentran en un óptimo de autofluorescencia con el empleo de un filtro CY3, mientras que presentan una señal muy baja en excitación con luz UV/azul (Callieri y Stockner, 2000). En el lago Alchichica el PPA más brillante se registró en preparaciones de muestras metalimnéticas, esto puede relacionarse con cambios en la concentración de pigmentos en condiciones bajas de luz (Callieri y Stockner, 2002), Sin embargo, su densidad no fue diferente a la de las capas superficiales, donde el PPA presentó una autofluorescencia mucho menor, lo que puede reflejar un daño del PPA por radiación UV (Bertoni y Callieri, 1999; Medina-Sánchez *et al.*, 2002).

El PPA del lago Alchichica contribuyó del 30 al 60% en el número del picoplancton total (PPT) en el epilimnion y del 18 al 48% a lo largo de la columna de agua (Cuadro 4).

En función del intervalo de densidad del picoplancton autotrófico, éste es comparable a lo encontrado en ambientes mesotróficos, mientras que para el picoplancton heterotrófo las variaciones de su abundancia se aproximar más a un nivel mesotrófico o eutrófico (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de los intervalos de la densidad del picoplancton del lago Alchichica con otros sistemas lacustres y marino, y su caracterización trófica asociada (¹Hernández-Avilés *et al.*, inédito, ²Wakabayashi y Ichise, 2004; ³Weisse, 1993; ⁴Lewis *et al.*, 1986; ⁵Kilham, 1981; ⁶Salka *et al.*, 2008; ⁷Klinkerberg y Schumman, 1995).

	Lago Alchichica	Lago Metztitlán ¹	Otros lagos	Mar Báltico	Edo. trófico asociado para el lago Alchichica
Picoplancton Autótrofo 10 ⁶ cél. mL ⁻¹	0.004 – 2 (18-48% del PPT)	0.05-0.39 (10% del PPT)	0.0001-1 L. Biwa ² 0.0001-.08 L. Kinneret ³	<0-0.01 - 0.25 (11% del PPT) ⁶	Mesotrófico
Picoplancton Heterótrofo 10 ⁶ cél. mL ⁻¹	0.4 – 7	3.46-23.1	1-5² 0.1 a 1.4 L. Valencia ⁴ 3.7 360 Lagos salinos africanos ⁵	5.4-46⁷	Mesotrófico-Eutrófico

La media de 2.0×10^6 cél. mL⁻¹ del PPT (picoplancton total) en toda la columna de agua corresponde también con el intervalo reportado para cuerpos de agua mesotróficos-eutrófico (Sherr *et al.*, 1991; Šimek *et al.*, 1995) o lagos monomícticos mesotróficos (Gurung y Urabe, 1999), lo cual es mayor a lo esperado para ambientes oligotróficos en función a la concentración de clorofila *a* (Straškrabová *et al.*, 1999), como sucede en el lago Alchichica, donde se reportan concentraciones medias anuales de este pigmento entre 4 y 6 µg L⁻¹ (Oliva *et al.*, 2001, Adame *et al.*, 2008, Macek *et al.*, 2009).

Asimismo, en función de la biomasa del picoplancton 10 a 251 µg C_{org.} L⁻¹ (Cuadro 3), el lago Alchichica se caracteriza como un ambiente oligotrófico-mesotrófico, dado que el intervalo de biomasa para lagos oligotróficos se reporta entre 40 y 70 µg C_{org.} L⁻¹, mientras que para un lago eutrófico fluctúa entre 600 y 2000 µg C_{org.} L⁻¹, de acuerdo con Sorokin (1999).

La dinámica de la abundancia y de la composición del plancton procarionte por grupos taxonómicos también estuvo directamente relacionada

con el comportamiento térmico del lago. Los porcentajes de hibridación registrados para las bacterias totales respondieron a los periodos de mezcla y estratificación (Fig. 3), asociados en particular con la disponibilidad de nutrientes en la columna de agua a través del tiempo (Figs. 6 a 12). Así, durante el periodo de mezcla y al inicio de la estratificación en el epilimnion, se registraron los mayores porcentajes de hibridación del Dominio *Bacteria* (Figs. 16 y 17) lo que correspondió con concentraciones altas de nitrógeno inorgánico disuelto y de fósforo soluble reactivo en el lago (Figs. 6 a 8).

Conforme avanzó el periodo de estratificación, se presentó una fuerte variabilidad en el porcentaje de hibridación en los diferentes estratos, y, en algunos casos, baja respuesta de hibridación (Fig. 16 y 17). Lo que estuvo asociado con una reducción o agotamiento de nutrientes en el epilimnion y su acumulación en el hipolimnion (Figs. 6, 7 y 8), proceso previamente citado por Alcocer *et al.* (2000).

Los porcentajes de hibridación entre 6 y 67% del Dominio *Bacteria* con la sonda EUB338 registrados en el lago Alchichica durante el proceso de estratificación, son equivalentes a los reportados en el estudio de la dinámica espacio-temporal del bacterioplancton para lagos monomícticos cálidos mesotróficos como Bourget (Comte *et al.*, 2006) y Constance (Zwisler *et al.*, 2003).

A pesar de que en el lago Alchichica, la abundancia del picoplancton total fue similar a lo registrado en algunos cuerpos de agua mesotróficos-eutróficos (Sherr *et al.*, 1991; Šimek *et al.*, 1995; Wakabayashi y Ichise, 2004) (Cuadro 4), el picoplancton heterotrófico presentó un biovolumen individual muy pequeño ($0.05 \pm 0.03 \mu\text{m}^3$) y consecuentemente un bajo contenido de carbono individual ($12.13 \pm 4.12 \text{ fg C}_{\text{org.}} \text{cél.}^{-1}$) y una biomasa reducida (Cuadro 3). Lo que aunado a la limitación de nutrientes en el lago hacia el epilimnion y las condiciones de anoxia en el hipolimnion, se infiere que el bacterioplancton puede presentar un número reducido de ribosomas, lo que disminuye la intensidad de los signos de hibridación tal como lo mencionan Pernthaler *et al.* (2002a). El número de ribosomas por célula reflejan una relación positiva con el crecimiento bacteriano

(Kemp *et al.*, 1993) lo que representa una limitación importante para la detección del procarioplankton a través de FISH en sistemas naturales oligotróficos (Bouvier y del Giorgio, 2003). En el lago Alchichica asociado con la atenuación del porcentaje de hibridación durante la estratificación bien establecida y tardía (Fig. 17), se deduce un decremento en la tasa de crecimiento bacteriano en el epilimnion asociado con la depleción de nutrientes. Mientras en otros estratos la alta variabilidad en la hibridación (Fig. 17) dependió de la concentración de nutrientes, la temperatura o las condiciones anaeróbicas del hipolimnion (Figs. 3, 6, 7 y 8). De manera análoga, esto sucede en el lago monomíctico Biwa, donde las bacterias muestran tasas de crecimiento bajo durante el verano en las capas superficiales debido al empobrecimiento de nutrientes, mientras en el hipolimnion la carencia de oxígeno y las bajas temperaturas limitan las tasas de crecimiento (Gurung y Urabe, 1999).

Otros factores que pueden afectar la detección de las células por medio de las pruebas de oligonucleótidos específicas de ARNr son la accesibilidad de los blancos, la penetración de las sondas dentro de la célula y la intensidad de los signos de hibridación (Bouvier y del Giorgio, 2003). Para mejorar la tasas de detección del bacterioplankton cuando tienen bajo contenido de ARNr se puede utilizar una enzima, la peroxidasa de rábano e intensificar la señal de hibridación adicionando tiramida, este método se conoce como depositación de un catalizador reportero (CARD por sus siglas en inglés) (Pernthaler *et al.*, 2002a). Sin embargo, se ha encontrado que el porcentaje de bacterias hibridadas con CARD-FISH pueden ser significativamente menor que el porcentaje de bacterias hibridadas con pruebas fluorescentes mono-específicas (FISH) debido a la presencia de otros grupos que por su abundancia pueden ser importantes, como es el caso de *Actinobacteria*, por lo que resulta necesario adecuar la técnica para ecosistemas acuáticos específicos (Sekar *et al.*, 2003). Aunque particularmente para lagos hiposalinos la abundancia relativa de *Actinobacteria* no excede el 12.5% (Wu *et al.*, 2006), la contribución porcentual de este grupo deberá ser considerada en estudios posteriores que se realicen en el lago Alchichica.

Recientemente, en el lago Alchichica se han analizado muestras de bacterioplancton empleando la técnica de CARD-FISH, encontrando porcentajes de hibridación mayores lo largo del año en comparación con lo obtenido con FISH. Sin embargo, también durante el período de estratificación en el epilimnion se registraron bajos porcentajes de hibridación con esta técnica. Asimismo, se obtuvieron altos porcentajes de hibridación en experimentos con bolsas de diálisis en las que se incrementaban la concentración de nutrientes (Bautista-Reyes, inédito). Esto concuerda con el hecho de que los elevados porcentajes de hibridación registrados en el hipolimnion con FISH en el lago Alchichica, se puede relacionar con el enriquecimiento de nutrientes en los estratos profundos (Figs. 6, 7 y 8).

La suma de detección del porcentaje de hibridación para todas las pruebas bacterianas específicas utilizadas fue en algunos meses igual o mayor que el porcentaje de hibridación de las células del Dominio Bacteria durante el periodo de estratificación. Esto se atribuye a los elevados porcentajes de hibridación de algunos grupos específicos encontrados en el lago como *Planctomycetes* y SRB. Así, para estudios posteriores en el lago, se recomienda emplear una mezcla de las sondas EUB338-II y EUB338-III, que cubre los filos *Planctomycetes* y *Verrucomicrobia*, con lo que se cubriría por arriba del 90% de las entidades bacterianas (Amann y Fuchs, 2008).

En el lago Alchichica a pesar de que se registró el mayor porcentaje de hibridación de *Bacteria* durante el período de circulación, menos del 50% de los grupos específicos bacterianos pudieron ser determinados con FISH (Figs. 17 y 18). Esto puede atribuirse a la elevada abundancia de picocianobacterias que responden rápidamente a la disponibilidad de nutrientes y compiten por ellos con otros grupos bacterianos, como ha sido demostrado en aguas con bajas concentraciones de nutrientes y carbono (Drakare, 2002). Asimismo, se ha encontrado que *Cyanobacteria* domina en lagos ubicados en elevadas altitudes y que presentan una baja concentración de nutrientes y productividad primaria, a lo largo de un gradiente de salinidad (Xing *et al.*, 2009).

En el lago Alchichica se encontró un mayor número de grupos bacterianos durante la estratificación térmica, presentándose altos porcentajes de hibridación en la zona de la oxiclina y/o hipolimnion (Fig. 18). La condición de anoxia creciente en el hipolimnion a lo largo de ocho meses en el lago Alchichica favoreció un incremento en los porcentajes de hibridación de los grupos bacterianos en comparación con la capa de mezcla óxica (Fig. 18). Resultados similares se han reportado en muestras de agua profundas anóxicas en comparación con muestras de agua superficial en el lago sódico Mono, sugiriéndose una mayor diferenciación del nicho ecológico en estratos anóxicos (Humayoun *et al.*, 2003).

El Dominio *Archaea* presentó un bajo porcentaje de hibridación (intervalo 0.14-6%) en el lago Alchichica (Fig. 19), registrándose en mayor abundancia hacia el metalimnion, hipolimnion o cerca del fondo, lo que se relacionó principalmente con las condiciones de anoxia durante el periodo de estratificación bien establecida. En general, este tipo de células se encuentran con menos frecuencia en los lagos, por ejemplo, en el lago Gossenköllesee, presenta un porcentaje de hibridación alrededor del 6% (Glöckner *et al.*, 1999), en el lago monomíctico cálido Bourget, *Archaea* fluctúa entre el 0.04% y 8.9% de hibridación (Comte *et al.*, 2006), mientras en lagos hiposalinos subtropicales se registra entre 0 y 1.6% (Wu *et al.*, 2006). En reservorios de la zona tropical con diferente nivel de eutrofización, la hibridación de este taxón se ha reportado entre el 1% y el 5% de hibridación (Abe *et al.*, 2003).

En el bacterioplancton de las comunidades de agua dulce predomina la clase Betaproteobacteria cuando se evalúa con FISH (Glöckner *et al.*, 1999; Zwart *et al.*, 1998), mientras en lagos salinos, la abundancia relativa de Betaproteobacteria hibridada por FISH nunca excede el 7 % de las células teñidas con DAPI (Wu *et al.*, 2006). Betaproteobacteria está constituido por bacterias aerobias y facultativas que son frecuentemente versátiles en sus capacidades de degradación, a esta clase también pertenecen géneros quimiolitotróficos como por ejemplo *Nitrosomonas* que oxida el amonio.

En el lago Alchichica, Betaproteobacteria fue abundante a través de la columna de agua y del tiempo, particularmente en el metalimnion y el hipolimnion durante el periodo de estratificación. Este grupo presentó en el lago Alchichica un porcentaje promedio de hibridación menor (4 a 11%) y una desviación estándar (DS) mayor (3% a 16%) en comparación con lo registrado en otros lagos: Gossenköllesee, Cagno, Grosser Ostersee y Baikal (medias de 3 a 21% y DS 2 a 4%) (Glöckner *et al.*, 1999). Asimismo, los porcentajes de hibridación de Betaproteobacteria fueron similares o mayores que los encontrados en lagos hiposalinos (1.9 a 3.6 g L⁻¹) de la región del Altiplano del Tibet, China, en el cual Betaproteobacteria fluctúa entre 2.2 y 6.8% (Wu *et al.*, 2006). Se ha reportado que Betaproteobacteria presenta una elevada heterogeneidad espacial y temporal durante la estratificación en el lago monomíctico cálido Estanya y se vincula con bacterias oxidantes del azufre cerca de los sedimentos (Martínez-Alonso *et al.*, 2008).

En el lago Alchichica durante la estratificación el porcentaje promedio de Gammaproteobacteria fue siempre menor que Betaproteobacteria en todas las profundidades (Fig. 18). Se ha reportado que Gammaproteobacteria tiene preferencia por elevadas concentraciones de nutrientes y fácilmente asimila fuentes de carbón orgánico (Pinhansi y Berman, 2003), lo que explica su abundancia relativa mayor hacia el hipolimnion del lago Alchichica, donde se dio un incremento consecutivo de nutrientes. La composición particular de los grupos de Proteobacteria en el lago Alchichica se relaciona con su condición hiposalina y su composición iónica, y/o las condiciones de anoxia en el lago. Se ha reportado para lagos hiposalinos que el porcentaje de Gammaproteobacteria (entre 0 y 3.3%) es menor que Betaproteobacteria. En general, la abundancia relativa de Gammaproteobacteria se incrementa con el aumento de la salinidad (Wu *et al.*, 2006). En general, se ha propuesto que la abundancia relativa de las clases de *Proteobacteria* muestran una marcada sucesión a lo largo de un gradiente de salinidad en lagos (Wu *et al.*, 2006). Asimismo, las capas de transición entre la condición óxica-anóxica del lago explica la diferente

composición del bacterioplancton entre estratos, como ha sido propuesto para el lago tropical Tanganyika (De Wever *et al.*, 2005).

El grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* fue escaso durante el bienio en el lago, registrando una abundancia relativamente mayor en la oxiclina y en el metalimnion (Fig. 18). Los porcentajes registrados en el lago Alchichica fueron similares o inferiores a lo que se ha encontrado en lagos hiposalinos donde los porcentajes de hibridación fluctúan entre 0.7 y 2.4 % (Wu *et al.*, 2006). Este grupo puede ser un componente numéricamente abundante en ambientes marinos (Eilers *et al.*, 2001, Matthew y Kirchman, 2000), así como en algunos lagos polisalinos o hipersalinos (Demergasso *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2006), y está asociado con una fracción de morfotipos filamentosos largos (Pernthaler *et al.*, 1998), los cuales se ven favorecidos por la depredación selectiva de protistas bacterívoros (Pernthaler *et al.*, 2004). En general en el lago Alchichica, las formas filamentosas no fueron comunes, con excepción en el hipolimnion anóxico durante el período de estratificación tardía. En esta zona se han reportado abundancias elevadas de ciliados bacterívoros (Peštová *et al.*, 2008) que en principio favorecerían el desarrollo de bacterias filamentosas. El utilizar el protocolo de FISH (Pernthaler *et al.*, 2001) con tinción de DAPI en membranas blancas permitió que bacterias filamentosas muy delgadas fueran observadas. De hecho con el protocolo tradicional de Porter y Feig (1980) en que se utilizan membranas de policarbonato negras las formas filamentosas son prácticamente indetectables (Macek *et al.*, 2009), lo cuál explica porque solo una fracción reducida de ellas resultaron CFB positivas.

Planctomycetes fue uno de los grupos más abundantes en la capa de mezcla en el lago Alchichica, siendo su contribución menor en otros estratos (Fig. 18). Su abundancia relativa en general fue mayor en comparación con lo registrado para otros lagos (Glöckner *et al.*, 1999). Al ser el orden Planctomycetales el grupo más cercano en la base del árbol filogenético del Dominio *Bacteria* (Brochier y Philippe 2002), la prueba EUB338 ha resultado no ser suficiente para el conteo de bacterias totales en ambientes que presentan

una elevada proporción de este grupo (Amann y Fuchs, 2008). De aquí deriva también el hecho de que los porcentajes de hibridación con EUB fueron bajos en ciertos momentos del año. Siendo para este caso, una mejor aproximación de la eficiencia de hibridación de bacterias totales la suma de EUB y PLA.

Dentro de *Planctomycetes*, algunas especies son aerobias quimio-organoheterótrofas, y otras son quimio-litoautotróficas anaerobias, las cuales llevan a cabo la oxidación anaerobia del amonio (anammox) en sistemas marinos y dulceacuícolas (Jetten *et al.*, 2003). Por ejemplo, en el lago Tanganyika, por encima del 13% del nitrógeno molecular gaseoso puede ser atribuido a los procesos de anammox (Schubert *et al.*, 2006). De acuerdo con la existencia de *Planctomycetes* en todos los estratos del lago Alchichica, éste puede relacionarse con la presencia de especies de bacterias aerobias y anaerobias, particularmente con la probable actividad de bacterias anammox, debido a las condiciones anóxicas en el hipolimnion en ocho meses del año (Fig. 4).

En lagos monomícticos cálidos durante la estratificación térmica ocurren cambios químicos que son causados mediante reacciones biológicas. La diferenciación química en la columna de agua incluye reducción del oxígeno disuelto por respiración, desnitrificación y sulfato reducción, como ha sido observado en el lago monomíctico cálido Kinneret, Israel (Eckert *et al.*, 2002).

Así, en lagos monomícticos, cuando el oxígeno se consume en los estratos profundos, los nitratos son utilizados para la respiración bacteriana antes de que la reducción del sulfato comience a ser el proceso dominante (Eckert *et al.*, 2002). Algunos grupos que están asociados con los procesos de desnitrificación son las bacterias respiratorias Gram-negativas del género *Paracoccus* perteneciente a la clase Alphaproteobacteria y las bacterias Gram-positivas *Actinobacteria* (formalmente conocidas como las de alto contenido de G+C (Hahn *et al.*, 2003)). Estas presentan una amplia distribución, abundancia y alta biomasa en ecosistemas de agua dulce (Glöckner *et al.*, 2000), y en lagos salinos (Wu *et al.*, 2006) así como también las bacterias anaerobias Gram-positivas. De éstas, dos grupos específicos fueron característicos en el lago

Alchichica durante la estratificación: *Paracoccus* el cual fue abundante en casi todos los estratos y meses de este período, y las bacterias Gram-positivas que mostraron una mayor contribución en la oxiclina y el hipolimnion.

La clase Alfacaproteobacteria es dominante en ambientes tropicales eutróficos que presentan procesos intensos de desnitrificación (Abe *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de que el lago Alchichica tenga un nivel oligotrófico como se ha determinado de acuerdo con la concentración de clorofila *a* (Adame *et al.*, 2009). *Paracoccus* perteneciente a esta clase fue particularmente abundante cuando se presentaron condiciones de anoxia hipolimnética asociada con el proceso de descomposición de la materia orgánica principalmente de origen autóctono, favoreciéndose el proceso de desnitrificación.

Alchichica es un lago hiposalino dominado por los iones sodio-magnesio y cloruro-bicarbonato, aunque también presenta altas concentraciones de sulfato (ca. 10 mmol L⁻¹, Vilaclara *et al.*, 1993). Durante la estratificación, cuando el hipolimnion comienza a ser anóxico, éste se caracteriza por la reducción desasimilatoria de sulfato a sulfhídrico. Las bacterias sulfato-reductoras (SRB) relacionadas con este proceso, fueron particularmente abundantes en la oxiclina y en el hipolimnion (Fig. 18), donde este grupo especializado de bacterias usan los recursos externos de azufre como aceptor de electrones y pueden llevar a cabo la casi completa oxidación de la materia orgánica detrítica a bióxido de carbono (Jørgensen, 1982).. De manera similar a lo registrado en Alchichica en el lago monomíctico cálido Kinneret una proporción significativa de SRB se han encontrado en el hipolimnion como *Desulfovibrio* sp. (Hadas y Berman, 1998).

En el lago Alchichica, la presencia de SRB también se encontraron aunque en menor concentración en otros estratos, como el metalimnion y el epilimnion donde existían condiciones aerobias (Fig. 18), esto coincide con lo reportado para el lago oligotrófico y meromíctico Gek-Gel (Karnachuk *et al.*, 2006). Inclusive, se ha propuesto que las BSR tienen una amplia distribución en la zona aeróbica y que llevan a acabo la oxidación de varios substratos orgánicos con oxígeno como aceptor de electrones (Karnachuk *et al.*, 2005). Además, la prueba SRB385 utilizada en Alchichica es específica para las SRB

de la familia *Desulfovibrionaceae* y, en particular, *Desulfovibrio* que tiene una extensa distribución en una amplia variedad de ecosistemas, siempre que su presencia no esté restringida por la disponibilidad de sulfatos en el sistema (Stahl *et al.*, 2002).

Aunque la salinidad es un factor ambiental que fuertemente influye en la composición taxonómica del bacterioplancton en aguas interiores (Wu *et al.*, 2006), en el lago hiposalino Alchichica, la composición del picoplancton procarionte resultó más característico de aguas dulces que de lagos más salado o aguas marinas. Esto se respalda por el hecho de que la mayoría de secuencias obtenidas de lagos hiposalinos están más relacionadas con el bacterioplancton de agua dulce (Xing *et al.*, 2009). Una razón que sustenta estas diferencias estriba en que la composición iónica de las aguas atalasoalinas es muy diferente que las marinas, y que aunque ambos tipos de agua están dominados por cloruros y sodio, Alchichica tiene una alcalinidad total de 42 a 42.5 meq L⁻¹ de CaCO₃ (Armienta *et al.*, 2008), la cual es muy superior a la de las aguas marinas que fluctúa entre 2.2 y 2.5 meq L⁻¹ (Key *et al.*, 2004), donde los bicarbonatos quedan incluidos dentro de los iones menores (Libes, 1992), lo que da como resultado un ambiente químico muy diferente que coadyuva a explicar el por qué el bacterioplancton del lago Alchichica tenga una afinidad dulceacuícola.

De las variables ambientales, los nutrientes orgánicos particulados (nitrógeno y fósforo) fueron los que mostraron las relaciones más consistentes con la abundancia de diversos grupos taxonómicos (Cuadros 3 y 4; Figs. 20 y 21). En el lago Alchichica, la concentración de materia orgánica y su dinámica espacial y temporal a través de los años estudiados fueron muy importantes en la determinación de la composición y abundancia del ensamblado procarionte.

La relación entre los nutrientes orgánicos y la abundancia del picoplancton fue positiva (Cuadros 3 y 4). En contraste, con los nutrientes inorgánicos, que se incrementaron en el hipolimnion, los nutrientes orgánicos decrecieron en este estrato durante la estratificación (Figs. 9 y 10). Cabe la posibilidad que los nutrientes orgánicos sean un factor limitante en el desarrollo

del picoplancton heterotrófico, en relación con la oxidación de la materia orgánica. Por ejemplo, se ha reportado que el crecimiento bacteriano en los ecosistemas acuáticos parece estar limitado principalmente por sustratos de carbono orgánico lábil (Cole *et al.*, 1988), además de otros factores como la disponibilidad de nutrientes y la temperatura, los cuales varían de acuerdo con el grupo de procariontes (Boucher *et al.*, 2006). De acuerdo con el DCCA, se encontró una relación positiva entre el picoplancton autotrófico y el Dominio *Bacteria* con el OD y el POP, y una correlación negativa con el cociente NID:PSR y los nitratos (Fig. 20).

Se ha reportado que las relaciones estequiométricas conducen la estructura en los ecosistemas acuáticos, de manera que la relación NID:PSR se correlaciona especialmente con la abundancia de varios grupos taxonómicos bacterianos (Rubin y Leff, 2007).

En el lago Alchichica, el picoplancton autotrófico estuvo limitado por la concentración de nutrientes inorgánicos y la disponibilidad de luz en la columna de agua, de acuerdo con las correlaciones encontradas con estas variables ambientales. Además altas abundancias de picocianobacterias ricas en ficoeritrina se registraron por debajo del 0.1% de PAR, coincidiendo con metalimnion e hipolimnion superior, cuando se exhibía baja disponibilidad de nutrientes en el epilimnion. Fenómeno que coincide con lo reportado por Camacho *et al.* (2003) para lagos estratificados.

En general, las abundancias tanto del picoplancton autotrófico como del heterotrófico siguieron una distribución asociada con los gradientes físicos y químicos en la columna de agua. El gradiente más importante fue el relacionado con la estratificación térmica, el cual favorece una variación importante de la concentración de oxígeno a lo largo de la columna de agua. Esta estratificación química define condiciones óxicas en el epilimnion, oxiclina con diferencias máximas de 0.5 a 4 mg L⁻¹m⁻¹, que tienden a acoplarse con la base del metalimnion, pero se continúan unos metros (hasta más de 10 m) por debajo de la termoclina, y con condiciones microaeróbicas (OD ≤ 1 mg L⁻¹) y anóxicas en el hipolimnion.

En lagos monomícticos cálidos y durante la estratificación, se presenta una clase de variabilidad por reacciones de tipo biológicas, que suceden en periodos de tiempo relativamente cortos (días a semanas). Aunque el presente estudio no hace hincapié en procesos de corto plazo, estos bioprocesos son la causa de una diferenciación química de las formas oxidadas o reducidas de los nutrientes en la columna de agua a la que responde el PPT. Entre ellos se incluyen el agotamiento del OD por descomposición de la materia orgánica, la desnitrificación y la reducción del sulfato tal como lo ha propuesto Eckert *et al.* (2002).

En general, este estudio mostró que la variabilidad de los grupos taxonómicos del picoplancton procarionte en el lago Alchichica estuvieron directamente relacionados con la hidrodinámica del lago (monomixis cálida), disponibilidad de nutrientes y la transición entre las condiciones óxicas y anóxicas en la columna de agua. Así durante el período de mezcla, con la homogeneización de los nutrientes a lo largo de toda la columna de agua, las picocianobacterias fueron más abundantes que otros grupos bacterianos (Fig. 22).

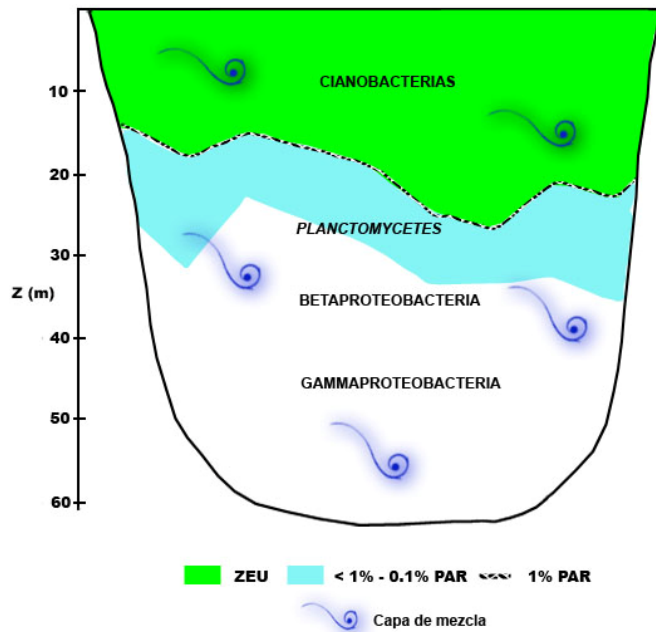


Fig. 22 Distribución del picoplancton procarionte a lo largo de la columna de agua durante el período de mezcla en el lago Alchichica (la dominancia por grupo bacteriano aparece en orden decreciente dentro del diagrama).

Durante el periodo de estratificación, el epilimnion mostró una reducción consecutiva de los nutrientes mientras estos se incrementaban en los estratos profundos. El patrón de distribución de los nutrientes determinó una elevada variabilidad en los porcentajes de hibridación de los grupos procariontes. En el epilimnion y en el metalimnion que se correspondieron con la zona eufótica del lago donde se favorecen los procesos de producción primaria las picocianobacterias tienen una distribución preferencial. También en el metalimnion se distribuyen Betaproteobacteria relacionada con el proceso de nitrificación. En esta etapa la formación de un gradiente pronunciado de oxígeno disuelto favoreció la presencia de grupos relacionados con la desnitrificación como *Paracoccus* y bacterias Gram-positivas, mientras las BSR se vincularon con la reducción del sulfato. Finalmente, Betaproteobacteria, *Archaea* y *Planctomycetes* predominan en el hipolimnion anóxico el primer grupo se puede asociar con bacterias oxidantes del azufre y el último con la oxidación anaerobia del amonio producida por la descomposición de la materia orgánica en el hipolimnion (Fig. 23).

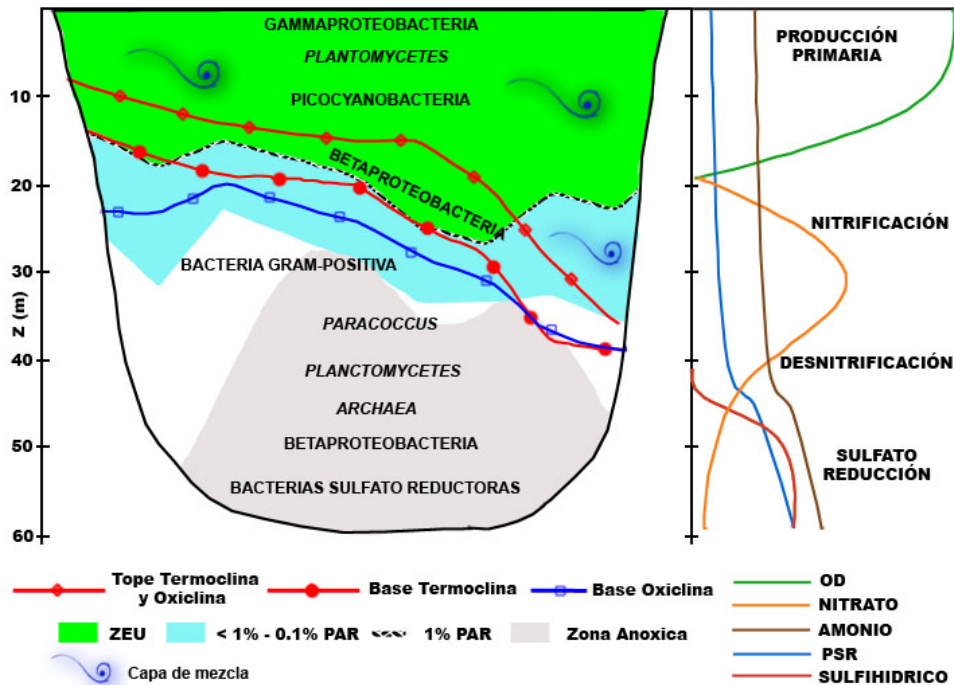


Fig. 23. Distribución vertical de grupos de picoplancton procariontes en la columna de agua en el lago Alchichica asociado con la estructura térmica y química durante el periodo de estratificación. En el margen derecho se muestran los gradientes de los parámetros químicos y los procesos biogeoquímicos asociados.

10 CONCLUSIONES

1) La composición de la comunidad bacteriana del picoplancton procarionte en el lago Alchichica fue más similar a los sistemas de agua dulce que a los lagos más salinos o sistemas marinos, al ser este hiposalino y atalasoalino.

2) De acuerdo con el intervalo de densidad del picoplancton autotrófico, éste es comparable con ambientes mesotróficos, mientras que el picoplancton heterotrófo se aproxima más a un nivel mesotrófico o eutrófico. Sin embargo, y en función de su biomasa ambos grupos funcionales quedan englobados dentro de sistemas oligo-mesotrófico.

3) La abundancia, biomasa y composición del picoplancton procarionte estuvo directamente determinada por la dinámica de monomixis cálida del lago, asociada con disponibilidad de nutrientes y el establecimiento de gradientes químicos durante el periodo estratificación térmica.

4) Durante el período de mezcla y al inicio de la estratificación con el incremento de los nutrientes en la columna de agua predominaron las picocianobacterias distribuidas principalmente hacia la zona eufótica del lago. Las picocianobacterias y *Planctomycetes* constituyeron la fracción dominante del bacterioplancton en este período de tiempo.

5) Durante el período de estratificación se encontró una distribución diferencial de los grupos bacterianos asociados con el gradiente térmico y los gradientes químicos (del oxígeno disuelto y los nutrientes). Así en el epilimnion, predominaron *Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, y Gammaproteobacteria. En la termoclina las bacterias nitrificantes (Betaproteobacterias), en el hipolimnion superior las bacterias desnitrificantes (Gram-positivas y *Paracoccus*), mientras en el hipolimnion inferior *Planctomycetes* que puede asociarse con el proceso de oxidación anaerobia del amonio y las bacterias sulfato reductoras. El Dominio *Archaea* se presentó en baja abundancia en el hipolimnion anóxico principalmente.

11 Referencias

- Aaike, DW, Muylaer, K, van der Gucht, K, Pirlot, S, Cocquyt, Ch, Descy, JP, Plisnier, PD, Vyverman, W (2005) Bacterial community composition in Lake Tanganyika: Vertical and horizontal heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 71: 5029-5037.
- Abe, DS, Matsamura-Tundisi, T, Rocha, O, Tundisi, JG (2003) Denitrification and bacterial community structure in the cascade of six reservoirs on a tropical river in Brazil. *Hydrobiologia* 504: 67-76.
- Acheubach, LA, Carey, J, Madigan, MT (2001) Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Appl Environ Microbiol* 67: 2922-2926.
- Adame, M F, Alcocer, J, Escobar, E (2008) Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshw Biol* 53: 22-31.
- Alcocer, J Escobar, E (1993) Athalassohalinity (On the concept of salinity in inland waters) *Hidrobiológica* 3: 81-88.
- Alcocer, J, Lugo, A, Escobar, E, Sánchez, MR, Vilaclara, G (2000) Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Verh Internat Verein Limnol* 27: 3166-3169.
- Amann, R, Fuchs, BM (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nature Rev Microbiol* 6: 339-348.
- Amann, RI, Binder, BJ, Olson, R J, Chisholm, SW, Devereux, R, Stahl, DA, (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56: 1919-1925.
- Amann, R, Glöckner, FO, Neef, A (1997) Modern methods in subsurface microbiology - *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol Rev* 20: 191-200.
- Amann, R, Fuchs, BM, Behrens, S (2001) The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* 12: 231-236.

- Arndt, H (1993) Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) –a review. *Hydrobiologia* 1: 231-246.
- Armienta, MA, Vilaclara, G, De la Cruz-Reyna, S, Ramos, S, Cenicerros, N, Cruz, Olivia, Aguayo, A, Arceaga-Cabrera, F (2008) Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *J Volcanol Geotherm Res* 178: 249-258.
- Azam, F, Fenchel, T, Field, JG, Gray, JS, Meyer-Reil, L, Thingstad, F (1983) The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10: 257-263.
- Belkova, NL, Dryukker, VV, Hong, SH, Ahn TS (2003) A study of the composition of the aquatic bacterial community of Lake Baikal by the *in situ* hybridation method. Short communications. *Microbiol* 72: 244-245.
- Benloch, S, López-López, A., Casamayor, E O, Øvreås, L, Goddard, V, Daae, F L, Smerdon, G, Massana, R, Joint I, Thingstad, F, Pedrós-Alió, C, Rodríguez-Valera, F (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ Microbiol* 4: 349-360.
- Bernardet, JFP, Segers, M, Vancanneyt, F, Berthe, K, Kerster, Vandamme, P (1996) Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga quatilis* Stohtl and Tailt 1978. *Int J Syst Bacteriol* 46: 128-148.
- Bertoni, R, Callieri, C (1999). Effects of UVB radiation of freshwater autotrophic and heterotrophic picoplankton in a subalpine lake. *J Plankton Res* 21: 1373-1388.
- Boucher, D, Richardot, M, Aurélie, Th, Debroas, D (2006) Incorporation of ³H-Thymidine by different prokaryotic groups in relation to temperature and nutrients in a lacustrine ecosystem. *Microb Ecol* 52: 399-407.
- Bouvier, T, del Giorgio, PA (2003) Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 3-15.

- Brochier, C, Philippe, H (2002) Phylogeny- a non hyperthermophilic ancestor for bacteria. Nature 417: 244.
- Caldell, DE, Tiedje, JM (1975) The structure of anaerobic bacterial communities in the hypolimnion of several Michigan lakes. Can J Microbiol 21: 377-385.
- Callieri, C., Pinolini, ML (1995) Picoplankton in Lake Maggiore, Italy. Int Revue ges Hydrobiol 80: 491-501.
- Callieri, C., Stockner, JG (2000) Picocyanobacteria success in oligotrophic lakes: fact or fiction? J Limnol 59: 72-76.
- Callieri, C., Stockner, JG (2002) Freshwater autotrophic picoplankton: a review. J Limnol 61: 1-14.
- Camacho, A, Miracle, MR, Vicente, E (2003) Which factors determine the abundance of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. Arch Hydrobiol 3: 321-338.
- Caron, DA, Lim, EL, Miceli, G., Waterbury, JB, Valois, FW (1991) Grazing and utilization of chroococcoid cyanobacteria and heterotrophic bacteria by protozoa in laboratory cultures and a coastal plankton community. Mar Ecol Prog Ser 76: 205-217.
- Cole, JJ, Findlay, S, Pace ML (1988) Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross –system overview. Mar Ecol Prog Ser 43: 1-108.
- Cole, JJ, Pace, ML, Caraco, NF, Steinhart, GS (1993). Bacterial biomass and cell size distributions in lakes: More and larger cells in anoxic waters. Limnol Oceanogr 38: 1627-1632.
- Comte, J, Jacquet, S, Viboud, S, Fontvieille, D, Millery, A, Paolini, G, Domaizon, I (2006) Microbial community structure and dynamic in the largest natural French lake (Lake Bourget). Microb Ecol 52: 72-89.
- Cottrell, MT, Kirchman, DL (2000). Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. Appl Environ Microbiol 66: 5116-5122.

- DeLong, EF (1993) Single-cell identification using fluorescently labeled ribosomal RNA-specific probes. In: Kemp, P, Sherr, B, Sherr, E, Cole, J (Eds.): *Handbook of methods in aquatic microbiology*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 285-294.
- DeLong, EF, Taylor, LT, Marsh, TL, Preston, CM (1999) Visualization and enumeration of marine planktonic Archaea and Bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65: 5554-5563.
- De Wever, A, Koenraad, M, van der Gucht, K, Pirlot S, Cocquyt, C, Descy, JP, Plisnier PD, Vyverman, W (2005) Bacterial community composition in Lake Tanganyika: vertical and horizontal heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 71: 5029-5037.
- Demergasso, C, Casamayor, EO, Chong, G, Galleguillos, P, Escudero, L, Pedrós-Alió, C (2004) Distribution of prokaryotic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. *FEMS Microbiol Ecol* 48: 57-69.
- Drakare, S (2002) Competition between picoplanktonic cyanobacteria and heterotrophic bacteria along crossed gradients of glucose and phosphate. *Microb Ecol* 44: 327-335.
- Dussart, BH (1965) Les different categories de plankton. *Hydrobiologia* 26: 72-74.
- Eckert, W, Imberger J, Saggio, A (2002) Biogeochemical response to physical forcing in the water column of a warm monomictic lake. *Biogeochemistry* 61: 291-307.
- Eilers, H, Pernthaler, J, Peplies, J, Glöckner, FO, Gerds, G, Amann, R (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Appl Environ Microbiol* 67: 5134-5142.
- Filonov, A, Alcocer, J (2002) Internal waves in a tropical crater-lake: Alchichica, Central Mexico. *Verh Int Ver Limnol* 28: 1857-1860.
- Filonov, A, Tereshchenko, I, Alcocer, J (2006) Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophys Res Lett* 33: 1-4.
- Fröstl, JM, Overmann, J (2000) Phylogenetic affiliation of bacteria which constitute phototrophic consortia. *Arch Microbiol* 174: 50-58.

- García, E (1988). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). García, México. 217 p.
- Glöckner, FO, Fuchs, BM, Amann R (1999). Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridisation. Appl Environ Microbiol 65: 3721-3726.
- Glöckner, FO, Zaichikov, E, Belkova, N, Denissova, L, Pernthaler, J, Pernthaler, A, Amann, R (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveal globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. Appl Environ Microbiol 66: 5053-5065.
- Gurung, TB, Urabe, J (1999) Temporal and vertical difference in factors limiting growth rate of heterotrophic bacteria in Lake Biwa. Microb Ecol 38: 136-145.
- Hadas, O, Berman, T (1998) Seasonal abundance and vertical distributions of protozoa (flagellates, ciliates) and bacteria in Lake Kinneret, Israel. Aquat Microb Ecol 14: 161-170.
- Hahn, M. W. (2006). The microbial diversity of inland waters. Curr Opin Biotechnol 17: 256-261.
- Hahn, M, W, Lünsdorf, H, Wu, QL, Schauer, M, Högle, MG, Boenigk, J, Stadler, P (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *Actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. Appl Environ Microbiol 69: 1442-1451.
- Hobbie, JD, Daley, RJ, Jasper, S (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl Environ Microbiol 22: 1225-1228.
- Humayoun, SB, Bano, N, Hollibaugh, JT (2003) Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. Appl Environ Microbiol 69: 1030-1042.
- Jasser, I (2002) Autotrophic picoplankton (APP) in four lakes of different trophic status: Composition, dynamics and relation to phytoplankton. Polish j Ecol 50: 341-355.

- Jetten MS, Sliemers O, Kuypers M, Dalsgaard T, van Niftrik L, Cirpus I, van de Pas-Schoonen K, Lavik G, Thamdrup B, Le Paslier D, Op den Camp HJ, Hulth S, Nielsen LP, Abma W, Third K, Engström P, Kuenen JG, Jørgensen BB, Canfield DE, Sinninghe Damste JS, Revsbech NP, Fuerst J, Weissenbach J, Wagner M, Schmidt I, Schmid MC, Strous M (2003) Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 107-114.
- Jiang, H, Dong H, Yu B, Lv G, Deng S, Wu Y, Dai M, Jiao, N (2009) Abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in saline lakes on the Tibetan Plateau. *FEMS Microbiol Ecol* 67: 268-278.
- Jørgensen, BB (1982) Ecology of the bacteria of the sulfur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Phil Trans R Soc London* 298 :543-561.
- Jürgens, K, Güde, H (1994) The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Mar Ecol Prog Ser* 112: 169-188.
- Jürgens, G, Pernthaler, J, Schalla S, Amann, R (1999). Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* 56: 1241-1250.
- Jürgens, G, Glöckner, FO, Amann, R, Saano, A, Montonen, L, Likolammi, M, Münster, U (2000) Identification of novel Archaea in Bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol Ecol* 34: 45-56.
- Karnachuk, OV, Pimenov, NV, Yusupov, SK, Frank, YA, Kaksonene, AH, Puhakka, JA, Ivanov, MV, Lindström, E B, Tuovinen, OH (2005) Sulfate reduction potential in sediments in the Norilsk mining area, Northern Siberia. *Geomicrobiol J* 33: 11-25.
- Karnachuk, OV, Pimenov, NV, Yusupov, SK, Frank, YA., Puhakka, JA, Ivanov, MV (2006) Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan. *Microbiology* 75: 82-89.
- Kemp, PF, Lee, S, LaRoch, J (1993) Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. *Appl Environ Microbiol* 59: 2594-2601.

- Key, RM, Kozyr, A, Sabine, CL, Lee, K, Wanninkhof, R, Bullister, J, Feely, RA, Millero, F, Mordy, C, Peng, TH (2004) A global ocean carbon climatology: Results from Global Ocean Data Analysis Project (GLODAP). *Global Biogeochem Cycles* 18, GB4031.
- Kilham, P (1981) Pelagic bacteria: Extreme abundance in African saline lakes. *Naturwissenschaften* 67: 380-381.
- Klinkenberg, G, Schumman, R (1995) Abundance changes of autotrophic and heterotrophic picoplankton in the Zingster Strom, a shallow, tideless estuary south of the Darss-Zingst Peninsula (Southern Baltic Sea). *Arch Hydrobiol* 134: 359-377.
- Kirkwood, DS (1994) Sanplus segmented flow analyzer and its applications. *Seawater Analysis*. Skalar. 51 p.
- Komárek J (1996) Towards a combined approach for the taxonomic and species delimitation of picoplanktic cyanoprokaryotes. *Algological Stud* 83: 377-401.
- Komárková, J (2002) Cyanobacterial picoplankton and its colonial formations in two eutrophic canyon reservoirs (Czech Republic). *Arch Hydrobiol* 154: 605-623.
- Konopka, AT, Bercot, R, Naktsu, C (1999) Bacterioplankton community diversity in a series of thermally stratified lakes. *Microb Ecol* 38: 126-135.
- Lewis, WM (1983) A revised classification of lakes based on mixing. *Can J Fish Aquat Sci* 40: 1779-1787.
- Lewis, WM (1996) Tropical lakes: how altitude makes a difference. In: Shiemer F. y K. T. Boland (Eds.). *Perspectives in tropical limnology*. Amsterdam. pp. 43-64.
- Lewis, WM, Jr, Frost, R, Morris, D (1986) Studies of planktonic bacteria in Lake Valencia; Venezuela. *Arch Hydrobiol* 106: 289-305.
- Libes, SM (1992) An introduction to marine biogeochemistry. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 242-260.
- Lind, OT, Dávalos-Lind, L (1991) Association of turbidity and organic carbon with bacterial abundance and cell in a large, turbid, tropical lake. *Limnol Oceanogr* 36: 1200-1208.

- Lind, OT, Dávalos-Lind, L, Rutherford K B (2000) Hypolimnion oxygen concentrations and the abundance and size of bacteria. *Verh Internat Verein Limnol* 27: 1-4.
- Lugo, A., Alcocer, J, Sánchez, MR, Escobar, E, Macek, M (2000) Temporal and spatial variation of bacterioplankton abundance in a tropical, warm-monomictic, saline lake: Alchichica, Puebla, Mexico. *Verh Int Ver Limnol* 27: 2968-2971.
- MacGregor, BJ, Toze, S, Alm, EW, Sharp, R, Ziemer, CJ, Stahl, DA (2001) Distribution and abundance of Gram-positive bacteria in the environment: development of a group-specific probe. *J Microb Methods* 44: 193–203.
- Macek M, Alcocer DJ, Lugo VA, Martínez-Pérez, ME, Peralta, SL, Vilaclara F, G (2009) Long term picoplankton dynamics in a warm-monomictic, tropical high altitude lake. *J Limnol* 68: 183-192.
- Manz, W, Amann, R, Ludwig, W, Wagner, M, Schleifer KH (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 15: 593-600.
- Manz W, Amann, R, Ludwig, W, Vancanneyt, M. Schleifer, KH (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment. *Microbiol* 142: 1097-1106.
- Márquez, SM J (1991). *Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas*. McGraw-Hill. México. 657 p.
- Martínez-Alonso, M, Méndez-Álvarez, S, Ramírez-Moreno, S, González-Toril, E, Amils, R, Gaju, N (2008) Spatial heterogeneity of bacterial populations in monomict Lake Estanya (Huesca, Spain). *Microb Ecol* 55: 737-750.
- Matthew, TC, Kirchman, D. L. (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 66: 5116-5122.

- Medina-Sánchez, JM, Villar-Argaiz, M, Carrillo P (2002) Modulation of the bacterial response to spectral solar radiation by algae and limiting nutrients. *Freshw Biol* 47: 2191-2204.
- Moter, A., Göbel, UB (2000) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microb Methods* 41: 85-112.
- Neef, A, Zaglauer, A, Meier, H, Amann, R, Lemmer, H, Schleifer, KH (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol* 62: 4329-4339.
- Neef, A, Amann, R, Schlesner, H, Schleifer, KH (1998) Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144: 3257-3266.
- Newton, RJ, Stuart, EJ, Matthew, RH, McMahon, KD (2007) Phylogenetic ecology of the freshwater Actinobacteria acI Lineage. *Appl Environ Microbiol*, 73: 7169-7176.
- Norland S (1993) The relation between biomass and volume of bacteria. In: P. Kemp, B. Sherr, E. Sherr y J. Cole (Eds), *Handbook of methods in aquatic microbiology*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 303-308.
- Oliva, MG, Lugo, A, Alcocer, J, Peralta, L, Sánchez, Ma del R (2001) Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia* 466: 299-306.
- Pernthaler, J (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Rev* 3: 1-10.
- Pernthaler, J, Šimek, K, Sattler, B, Schwarzenbacher, A, Bobková J, Psenner, R (1996) Short-term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligo-mesotrophic lake. *J Plankton Res* 18: 443-462.
- Pernthaler, J, Glöckner, FO, Unterholzner, S, Alfreider, A, Psenner, R, Amann R (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic Bacteria and Archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ Microbiol* 64: 4299-4306.

- Pernthaler, J, Glöckner, FO, Schönhuber, W, Amann, R (2001) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods Microbiol* 30: 207-226.
- Pernthaler A, Preston, ChM, Pernthaler, J, DeLong, EF, Amann, R, (2002)a. Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine Bacteria and Archaea. *Appl Environ Microbiol* 68: 661-667.
- Pernthaler, A, Pernthaler, J, Amann, R, (2002)b Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of Marine Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68: 3094-3101.
- Pernthaler, J, Zöllner, E, Warnecke, F, Jürgens, K (2004) Bloom of filamentous bacteria in a mesotrophic lake: identity and potential controlling mechanism. *Appl Environ Microbiol* 70: 6272-6281.
- Peřtová, D, Macek, M, Martínez-Pérez, ME (2008) Ciliates and their picophytoplankton-feeding activity in a high-altitude warm-monomictic saline lake. *Europ J Protistol* 44: 13-25.
- Pinhassi, J, Berman, T, (2003) Differential Growth Response of Colony-Forming- and -Proteobacteria in Dilution Culture and Nutrient Addition Experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. *Appl Environ Microbiol* 69: 199-211.
- Porter KG, Feig, YS, (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25: 943-948.
- Psenner, R. (1993) Determination of size and morphology of aquatic bacteria by automated image analysis. In: Kemp, PF, Sherr, BF, Sherr EB, Cole, JJ (Eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbiology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL., pp. 339-345.
- Pujo-Pay, M, Raimbault, P (1994) Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Mar Ecol Prog Ser* 105: 203-207.

- Reynolds, C (2006). *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge. 564 p.
- Rubbin, MA, Leff, LG (2007) Nutrients and other abiotic factors affecting bacterial communities in an Ohio River (USA). *Microb Ecol* 53: 374-383.
- Salgado-Ugarte, IH (1992) El análisis exploratorio de datos biológicos, fundamentos y aplicaciones. ENEP Zaragoza, UNAM. Ediciones Marc. México. 243 p.
- Salka, I, Moulisová, V, Koblížek, M, Jost, G, Jürgens, K, Labrenz, M (2008) Abundance, depth distribution, and composition of aerobic bacteriochlorophyll *a* - producing bacteria in four basin of the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* 74: 4398-4404.
- Sánchez, SR (2006) Dinámica vertical y temporal de los nutrimentos (N, P, Si) en un lago monomíctico cálido tropical: Alchichica, Puebla, México. Tesis de Maestría en Ciencias (Limnología), Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 105 p.
- Sarvala, J, Salonen, K, Järvinen, M, Aro, E, Huttula, T, Kotilainen, P, Kurki, H, Langenberg, V, Mannini, P, Peltonen, A, Plisnier, PD, Vuoriene, H, Mölsa, H, Lindqvist, OV (1999) Trophic structure of Lake Tanganyika: carbon flows in the pelagic food web. *Hydrobiologia* 407: 149-173.
- Schubert, CJ, Durisch-Kaiser, E, Wehrli, B, Thamdrup, B, Lam, P, Kuypers, MMM (2006) Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika). *Environ. Microbiol* 10: 1857-1863.
- Sekar, R, Pernthaler, A., Pernthaler, J, Warnecke, F, Posch, T, Amann, R (2003) An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69: 2928-2935.
- Sherr, EB, Sherr, BF, Barman, T, Hadas, O (1991) High abundance of picoplankton-ingesting ciliates during late fall in Lake Kinneret, Israel. *J. Plankton. Res.* 13, 789-799.
- Šimek, K, Bobková, J, Macek, M, Nedoma, J, Psenner, R (1995) Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: a study at the species and community level. *Limnol Oceanogr* 40:1077-1090.

- Sieburth, Mc J, Smetacek, V, Lenz, J (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol Oceanogr* 23: 1256-1263.
- Šimek, K, Bobková, J, Macek, M, Nedoma J, Psenner, R (1995) Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: a study at the species and community level. *Limnol Oceanogr* 40: 1077-1090.
- Šimek, K, Kojecká, P, Nedoma, J, Hartman, P, Vrba, J, Dolan, DR (1999) Shifts in bacterial community composition associate with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnol Oceanogr* 44: 1634-1644.
- Šimek, K, Pernthaler, J, Weinbauer, MG, Horňák, K, Dolan, JR, Nedoma, J, Mašín, M, Amann, R (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl Environ Microbiol* 67: 2723-2733.
- Šimek, K, Horňák, K, Mašín, M, Christaki, U, Nedoma, J, Weinbauer MG, Dolan, J R (2003) Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquat Microb Ecol* 31: 123-135.
- Snyder L, Champness, W (1997) *Molecular genetics of Bacteria*. American Society of Microbiology. Washington. 504 p.
- Sommer, U, Gliwicz, ZM, Lampert, W, Duncan, A (1986). The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. Hydrobiol.* 106: 433-471.
- Sorokin, YI (1999) *Aquatic microbial ecology*. Backhuys Publisher. Leiden. 248 p.
- Sorokin, DY, Gorlenko, VM, Namsaraev, BB, Namsaraev ZB, Lysenko AM, Eschinimaev BTs, Khmlenina VN, Trotsenko YA , Kueven, JG (2004) Prokaryotic communities of the north-eastern Mongolian soda lakes. *Hydrobiologia* 522: 235-248.
- Stahl, DA, Amann, R. (1991) Development and application of nucleic acid probes. 205-248. In Stackebrandt, E, Goodfellow, M, (Ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

- Stahl, DA, Fishbain, S, Klein, M, Baker, BJ, Wagner M (2002) Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 89-195.
- Stockner, JG (1991). Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: The view from the summit. *Int Rev ges Hydrobiol* 76: 483-492.
- Stockner J, Callieri, C, Cronberg, G (2000). Picoplankton and other non-bloom-forming Cyanobacteria in lakes. In: Whitton, BA, Potts, M (Eds). *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 195-231.
- Straškrabová, V, Šimek, K, Komárková, J (1990) Modelling seasonal changes of epilimnetic bacteria on the basis of phyto- and zooplankton dynamics. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol* 34: 229-235.
- Straškrabová, V, Callieri, C, Cruz-Pizarro, L, Hartman, P, Macek, M, Nedoma, J, Šimek K (1999) Investigations on microbial food webs in mountain lakes –aims and methods. In Straškrabová, V, Callieri, C, Fott J. (Eds.) *Pelagic food web in mountain lakes. Mountain Lakes Research program*. *J Limnol* 58: 77-87.
- Ter Braak, CJF (1986) Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 5: 1167-1179.
- Tortora, GJ, Funke, BR, Case, ChL (2001) *Microbiology. An Introduction*. Benjamin Cummings. San Francisco. 887 p.
- Vilaclara, G, Chávez, M, Lugo, A, González, H, Gaytán, M (1993) Comparative description basic chemistry of crater-lakes in Puebla State, Mexico. *Verh Int Ver Limnol* 25: 435-440.
- Wallner G, Amann, R, Beisker, W, (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14: 136-143.
- Wakabayashi, T, Ichise, S (2004) Seasonal variation of phototrophic picoplankton in lake Biwa (1994-1998). *Hydrobiologia* 528: 1-16.

- Weisse, T (1990) Trophic interactions among heterotrophic microplankton, nanoplankton, and bacteria in Lake Constance. *Hydrobiologia* 191: 111-122.
- Weisse, T (1993) Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. *Adv Microb Ecol* 13:327-370.
- Wetzel, RG (2001) *Limnology. Lake and River Ecosystems*. 3rd. Edition. Academic Press. Elsevier Science. 1006 p.
- Wu, Q L, Zwart, G, Schauer, M, Agterveld, MPK, Hahn, MW (2006) Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Appl Environ Microbiol* 72: 5478-5485.
- Xing, P, Hahn, MW, Qinglong, LW (2009) Low taxon richness of bacterioplankton in high-altitude lakes of the Eastern Tibetan Plateau, with a predominance of Bacteroidetes and *Synechococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* 75: 7017-7025.
- Zwart, G, Hiorns, WD, Methe, BA, van Agterveld, MP, Huismans, R, Nold, SC, Zehr JP, Laanbroek, HJ (1998). Nearly identical 16S rRNA sequences recovered from lakes in North America and Europe indicate the existence of clades of globally distributed freshwater bacteria. *Syst Appl Microbiol* 21: 546-556.
- Zwiler, W, Selje, N, Simon, M (2003) Seasonal patterns of the bacterioplankton community composition in a large mesotrophic lake. *Aquat Microb Ecol* 31: 211-225.