



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



“SELECCIÓN *IN SITU* DE PRESAS DE PROTISTAS PICOPLANCTÍVOROS DEL  
LAGO ALCHICHICA”

# T E S I S

Que para obtener el grado académico de

## Doctor en Ciencias

### (Limnología)

P r e s e n t a

FERNANDO BAUTISTA REYES

Director de Tesis: Dr. Miroslav Macek

Comité Tutorial: Dr. Javier Alcocer Durand  
Dr. Alfonso Lugo Vázquez  
Dra. Celia Bulit Gámez  
Dra. Rosaura Mayén Estrada

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Edo. de Méx. 2011



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.

A mi familia

y a mi hermano Alfredo†

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo agradecer de manera especial al Dr. Miroslav Macek por haberme permitido trabajar bajo su dirección, por haberme transmitido parte de sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo, por el apoyo, la confianza, el aliento y la enorme generosidad que tuvo conmigo, le estoy sinceramente agradecido.

Agradezco profundamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de estudios de Doctorado, bajo el número de becario 165774, registro 190202.

Igualmente, deseo agradecer el apoyo recibido a través de los proyectos CONACYT 52387, CONACYT 102917, UNAM-PAPIIT IN 207206, UNAM-PAPIIT 222709 y PAPCA 2006, bajo responsabilidad del Dr. Miroslav Macek y a través de los cuales fue posible financiar el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología los apoyos económicos otorgados para la presentación de los resultados de este trabajo a nivel nacional e internacional. Igualmente al personal de la Coordinación del Posgrado por el apoyo brindado a lo largo de mi estancia en el mismo.

Agradezco al Dr. Javier Alcocer Durand por los datos físico-químicos proporcionados y usados en este documento, así como su participación, comentarios y correcciones realizadas a lo largo del desarrollo del trabajo de tesis.

Al Dr. Alfonso Lugo Vázquez agradezco su participación, observaciones y correcciones realizadas durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Celia Bulit Gámez deseo expresar mi agradecimiento por el interés en la presente investigación, así como su participación en el desarrollo de la misma y la revisión del presente documento.

A la Dra. Rosaura Mayén Estrada deseo agradecer su interés por el desarrollo de este trabajo, así como el apoyo y los comentarios realizados en la elaboración del presente escrito.

Al equipo de muestreo del Proyecto de Investigación en Limnología Tropical (PILT) deseo agradecer el apoyo en los muestreos realizados a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A Sandrita con mucho aprecio, génesis de mi incursión en estos vericuetos.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	- 1 -
RESUMEN.....	- 3 -
INTRODUCCIÓN.....	- 4 -
ANTECEDENTES.....	- 7 -
HIPÓTESIS.....	- 10 -
OBJETIVOS.....	- 11 -
General.....	- 11 -
Específicos.....	- 11 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 12 -
Muestreo.....	- 12 -
Incubaciones en bolsas de diálisis.....	- 13 -
Fijación de las muestras.....	- 13 -
Determinación taxonómica y agrupamiento trófico.....	- 14 -
Cuantificación de los microorganismos.....	- 14 -
Estimación de biomasa de los protistas.....	- 15 -
Estimación de las células de APP ingeridas por los protistas.....	- 15 -
Hibridación.....	- 16 -
Análisis de los datos.....	- 18 -
RESULTADOS.....	- 19 -
Variables físico-químicas.....	- 19 -

Picoplancton .....	- 21 -
Composición de la comunidad bacteriana .....	- 27 -
Flagelados .....	- 35 -
Ciliados.....	- 39 -
Contenido de vacuolas.....	- 51 -
DISCUSIÓN.....	- 64 -
Variabilidad de los diferentes componentes del picoplancton, relación con el régimen térmico del lago y con otros organismos planctónicos.....	- 64 -
Variabilidad y composición de los protistas, su relación con el régimen térmico del lago e importancia como depredadores y estructuradores del picoplancton.....	- 68 -
El contenido de vacuolas en los protistas, importancia del APP y HPP como presas para diferentes protistas e importancia de la depredación en las redes tróficas microbianas..	- 70 -
CONCLUSIONES.....	- 75 -
REFERENCIAS .....	- 77 -

## RESUMEN

Se estudiaron las interacciones tróficas de ciliados y flagelados con el picoplancton procarionte autotrófico (APP) y principalmente, con el heterotrófico (HPP) a través de una técnica de hibridación *in situ* con pruebas de oligonucleótidos ARNr en un lago oligotrófico, monomítico cálido, durante las fases de estratificación y principio de mezcla en dos ciclos anuales y en diferentes profundidades, tanto en muestras de la columna de agua como en incubaciones *in situ* en bolsas de diálisis. El régimen térmico del lago determina la dinámica del picoplancton en el ciclo anual y en parte la heterogeneidad espacial de la columna de agua, lo que se refleja en la sucesión de ciliados en el ciclo anual. Respecto a los flagelados heterotróficos, su máxima densidad coincide con aquella del picoplancton durante la mezcla, mientras que en la estratificación sólo predominan los flagelados pigmentados. La densidad de ciliados está correlacionada a las proporciones de HPP/APP en el sistema acuático, en la fase de mezcla con alta densidad de APP dominan ciliados peritricos y esticotricos, en la fase de estratificación con mayor cantidad de HPP dominan numéricamente los escuticociliados pequeños. La biomasa sin embargo es dominada por ciliados de mayor tamaño (hipotricos, haptóridos, peritricos, esticotricos y heterotricos). Se encontró una selectividad marcada por parte de los flagelados y por diferentes ciliados (índice de selectividad de Chesson) sobre taxa específicos del ensamblado procarionte, la cual varió a lo largo del tiempo y en las diferentes profundidades estudiadas, así mismo se observaron asociaciones potencialmente simbióticas entre ciliados y procariontes que no pudieron ser determinados con las pruebas ARNr usadas en las hibridaciones. La importancia de las bacterias activas metabólicamente, como presas de los escuticociliados, fue evidente en la fase de estratificación del lago. La importancia directa e indirecta de la depredación de los protistas sobre la estructura del picoplancton y los cambios observados en la composición procarionte se discute en el contexto de las redes tróficas microbianas.

## INTRODUCCIÓN

Las redes tróficas microbianas en sistemas acuáticos, en las que la mayor parte del carbono orgánico es producido y consumido dentro de las mismas (embebidas a su vez en la cadena trófica clásica, algas–zooplancton-peces), incluyen a los virus, a los procariontes organotróficos (HPP, por sus siglas en inglés), los procariontes autotróficos (APP, por sus siglas en inglés) y eucariontes tanto autotróficos como heterotróficos. El picoplancton (tanto el autotrófico como el heterotrófico), constituye una fuente de alimento potencialmente importante que, en términos de biomasa total, tiene la misma importancia que el fitoplancton de mayor talla (nano y microfitoplancton), cuando menos en sistemas oligotróficos (Simon *et al.*, 1992). Sin embargo, existen pocos organismos en los sistemas acuáticos que pueden recolectar eficientemente el picoplancton presente, por lo que la depredación por parte de nanoflagelados heterotróficos (HNFs, por sus siglas en inglés) y ciliados es considerada como el principal factor de mortalidad para el picoplancton (Fenchel, 1986a, b; Sherr y Sherr, 1987). Además, la depredación es uno de los factores que determina la diversidad fenotípica/genotípica de los procariontes en los sistemas acuáticos (Šimek *et al.*, 1999; Jürgens y Matz, 2002; Pernthaler, 2005).

La producción de materia orgánica disuelta (DOM, por sus siglas en inglés) en las redes alimenticias acuáticas, durante el flujo de materia particulada hacia los niveles tróficos superiores y la posterior reincorporación de la DOM, en interacciones que involucran a los procariontes, HNFs y ciliados, fue formalizada por Azam *et al.* (1983) como el concepto de “circuito microbiano”. Los modelos teóricos de las interacciones en las redes alimenticias microbianas, asumen que el papel de la depredación por los protistas tiene poco impacto en la composición de la comunidad bacteriana (BCC, por sus siglas en inglés). Sin embargo, dicha idea está basada en el supuesto de un modo de alimentación carente de selectividad, por lo que existe la duda de si esta idea expresa la realidad en los sistemas acuáticos. Si bien numerosos estudios realizados han logrado avances en la determinación de la actividad depredadora de los picoplanctívoros, estos estudios utilizan una aproximación de “caja negra”, en la que el ensamblado procarionte es considerado como un ensamblado homogéneo. Esta aproximación no es correcta, si se toma en cuenta la



heterogeneidad existente en términos de la composición filogenética y de los estados fisiológicos de los organismos, además de otras propiedades fenotípicas que afectan la vulnerabilidad hacia los depredadores (Jürgens y Matz, 2002), y que afectarían de igual manera la selectividad de los protistas sobre sus presas picoplanctónicas (Montagnes *et al.*, 2008).

De acuerdo con la teoría ecológica, existen dos alternativas que controlan las interacciones alimenticias en las redes tróficas acuáticas microbianas. Por una parte, existe la posibilidad de que a altas densidades bacterianas, los procariontes estarían limitados debido a la competencia por recursos; a su vez, la biomasa de los protistas picoplanctívoros estaría controlada por sus depredadores. La otra alternativa es que, a densidades bacterianas bajas, los procariontes deberían estar controlados por la mortalidad y los protistas deberían estar limitados por las concentraciones típicas de sus presas en el ambiente acuático (Pernthaler, 2005). Por otra parte, el control de los cambios en la composición de especies microbianas, estaría relacionado con el crecimiento y muerte de los mismos organismos a nivel de comunidad, de esta forma, existirían comunidades estables de especies microbianas a diferentes niveles de productividad microbiana (la tasa promedio a la que se produce la biomasa microbiana, que depende de la producción o incremento de biomasa en un periodo de tiempo ajustada a las pérdidas ocurridas en el mismo), si hay un balance entre la producción bacteriana y la bacterivoría por protistas. Los cambios en la composición de especies en el ensamblado microbiano serían producidos por cambios rápidos de los controles descendente y ascendente. Dependiendo de la dirección de esos cambios se favorecería a especies bacterianas que minimizan la depredación (especialistas en defensa), o a especies que responden rápidamente a cambios favorables en las condiciones de crecimiento (especialistas en competencia) (Šimek *et al.*, 2002).

Los protistas fagotróficos son en general, clasificados como organismos filtradores (ciliados y flagelados que producen corrientes), organismos que se alimentan por difusión (heliozoa) y organismos raptorales o que interceptan a las partículas (ciliados, flagelados y amebas desnudas). Aunque el tamaño de la presa quizás sea el factor más importante en cuanto a selectividad de presas procariontes (Fenchel, 1980; Fenchel 1986a, b), existen otros factores que intervienen en el proceso de alimentación de los protistas fagotróficos,

entre los cuales pueden citarse atrayentes químicos, la movilidad de la presa, características de la superficie celular y la concentración de presas (Jürgens y DeMott, 1995; Posch *et al.*, 2001; Boenigk *et al.*, 2002; Matz y Jürgens, 2001; Matz *et al.*, 2002). Generalmente se piensa que la mortalidad por depredación tiene un efecto importante en la disminución de la densidad y biomasa del picoplancton, lo que sería causa de la omnivoría de los protistas heterotróficos, mientras que los cambios en diversidad estarían ligados a la actividad de los virus (Pernthaler, 2005).

La importancia de los ciliados en la transferencia de energía y en la remineralización de nutrientes, cuando menos durante periodos del ciclo anual, ha sido generalizada, pero poco se sabe sobre sus interacciones con otros integrantes del plancton y por tanto, sobre su papel en el circuito microbiano en el ambiente subóxico/anóxico (Massana y Pedrós-Alió, 1994; Yamada *et al.*, 1994), donde los estudios se han enfocado en ambientes someros y eutróficos (Finlay, 1982; Guhl y Finlay, 1991). En el caso de los HNFs se ha enfatizado su importancia como picoplanctívoros en sistemas acuáticos (Boenigk y Arndt, 2002) y en particular se ha resaltado su densidad en la zona fótica de los sistemas acuáticos (Fenchel, 1986a), pero aun falta profundizar sobre sus interacciones tróficas con el picoplancton en el ambiente natural (Calbet *et al.*, 2001; Šimek *et al.*, 2006).

Una de las preguntas que persiste, es si los resultados de experimentos sobre consumo de picoplancton realizados con especies fáciles de cultivar, son representativos para las especies que dominan realmente en los sistemas acuáticos. El empleo de técnicas moleculares para la identificación de aquellos organismos utilizados como presas por parte de los protistas picoplanctívoros, puede proporcionar información sobre el papel de los mismos como depredadores y modeladores de la estructura del picoplancton procarionte (Šimek *et al.*, 2001, 2003; Jezbera *et al.*, 2003, 2005). El objetivo de este proyecto fue estudiar la composición del ensamblado de ciliados y flagelados picoplanctívoros (formas heterótrofas y/o mixótrofas), la relación trófica con las potenciales presas procariontes, la determinación de los potenciales simbioses de los ciliados, así como entender los factores que determinan la variabilidad de los protistas picoplanctívoros en el circuito microbiano del lago Alchichica, un lago monomítico cálido de la Cuenca Oriental.

## ANTECEDENTES

El lago Alchichica es un maar cráter, con agua de origen atalasoalino (sólidos disueltos totales en un intervalo de 8.3 a 9 g L<sup>-1</sup>), localizado a 19° 24' Norte, 97° 24' Oeste y situado a 2340 metros sobre el nivel del mar, clasificado como lago monomítico cálido de acuerdo con el sistema de Lewis (1996). El lago tiene forma circular (diámetro 1.8 km, Figura 1), con profundidades máxima y media de 62 y 40.9 m respectivamente (Filonov *et al.*, 2006). Las aguas del lago son alcalinas (pH 8.7 a 9.2) dominadas por iones de sodio y cloro (Vilaclara *et al.*, 1993). El clima de la región es semiárido, con una temperatura media de 12.9° C y una precipitación promedio anual menor de 500 mm (García, 1988; Adame *et al.*, 2008).



Figura 1 Ubicación de la Cuenca Oriental y batimetría del lago Alchichica (Filonov *et al.*, 2006)

En particular para los protistas picoplanctívoros, se han realizado investigaciones que conciernen a los protozoos del ambiente litoral (Lugo *et al.*, 1998), y a la variación estacional y temporal de los mismos en el ambiente pelágico (Lugo, 2000). En estos estudios se ha reportado la presencia de crisomonadinas (*Spumella* spp.), kinetoplástidos (*Bodo* spp.), *Rhynchomonas* y *Pleuromonas*, así como el coanoflagelado (*Monosiga* sp.) para los organismos flagelados.

En el caso de los protozoos ciliados, Lugo (2000) ha reportado la presencia de peritricos como los ciliados más abundantes (*Vorticella* complejo *octava* y complejo *aquadulcis*), *Rhabdostyla* cf. *nebulifera*, además de los escuticociliados *Cyclidium glaucoma* y *Uronema* sp. Por otra parte, Macek *et al.* (2006, 2008) mencionan que el ensamblado de ciliados no es muy diverso, y que está dominado numéricamente por ciliados picoplanctívoros. Adicionalmente, la biomasa de los ciliados en Alchichica está dominada por los gimnostomátidos (Macek *et al.*, 2006, 2008).

Es bien sabido que la selectividad de presas por parte de los protistas, depende primordialmente del tamaño de las presas (Fenchel, 1986a, b), el cual es susceptible a cambios en las condiciones ambientales, tanto de la disponibilidad de nutrientes, como de la actividad de depredación (Pernthaler, 2005). Además se sabe que los protistas son capaces de diferenciar entre presas potenciales; por ejemplo, en el caso de estudios con HNF's, se han considerado diferentes características de las potenciales presas, tales como la composición bioquímica de la superficie celular (Matz y Jürgens, 2001), propiedades electrostáticas y motilidad celular (Matz *et al.*, 2002), pero no han sido concluyentes para distinguir factores adicionales que determinen la selectividad de los depredadores. Si bien se reconoce la importancia de la actividad de depredación en la conformación de la estructura de las presas bacterianas (Pernthaler, 2005), existen pocos estudios relacionados con la selectividad e impacto de la actividad depredadora de los protistas en ambientes naturales.

Estudios que mostraron avances importantes en este rubro son los trabajos de Šimek *et al.* (1999), Diederichs *et al.* (2003), Medina-Sánchez *et al.* (2005) y Jezbera *et al.* (2005) en el primero se estudiaron los cambios en la composición de los procariontes, asociados a diferentes fracciones de microzooplancton. En los otros tres trabajos, el propósito fue identificar y cuantificar a los procariontes en el interior de células de protozoos. En estos tres estudios, se utilizó un protocolo de hibridación *in situ* que permitió mantener la integridad celular de los organismos, la integridad de los plástidos, así como evitar la pérdida de células y la egestión de presas.

En estos estudios que usaron la técnica de hibridación *in situ*, fue posible observar células tanto de *Bacteria* como de *Archaea* (Medina-Sánchez *et al.*, 2005) en el interior de

los organismos, así como conocer la composición y selectividad de organismos picoplanctívoros tanto en estudios de laboratorio como en experimentos de campo (Jezbera *et al.*, 2005) donde con respecto a los ciliados, sólo se hicieron observaciones en trabajos de laboratorio, con bacterias provenientes de medios de cultivo, y quedó por tanto la interrogante sobre el comportamiento alimenticio de estos protistas en el ambiente natural, puesto que en el laboratorio no se observó selectividad. Otra investigación con un objetivo similar, no mostró evidencia de alimentación selectiva en los ciliados por un taxón o morfotipo particular usando experimentos *in vitro* (Neubacher *et al.*, 2008). En el caso de los flagelados, en los trabajos de laboratorio pudieron observarse diferentes tasas de digestión, según la afiliación taxonómica de la presa, así como un cambio en la selectividad de las presas procariontes a través del tiempo en los experimentos de campo, el cual estuvo asociado al cambio en la estructura de tamaños de los procariontes.

En general, se acepta que los flagelados son los organismos bacterívoros más importantes en los sistemas acuáticos. Sin embargo, en Alchichica la presencia de los flagelados no parece ser importante a lo largo del ciclo anual, y sus densidades más altas se han observado en la fase de mezcla del lago, en contraste con otros cuerpos de agua (Šimek *et al.*, 2001; Callieri *et al.*, 2002). Respecto al papel de los ciliados en el circuito microbiano del lago Alchichica, se ha observado que la actividad depredadora no puede explicar más del 10% de la eliminación del picoplancton autotrófico (Peštová *et al.*, 2008). Asimismo, poco se sabe sobre las estrategias de alimentación de los ciliados en el ambiente hipóxico-anóxico del lago en cuestión, por lo que se estudiaron las interacciones tróficas de estos protistas picoplanctívoros con el picoplancton procarionte.

## HIPÓTESIS

La densidad y biomasa de los ciliados y flagelados picoplanctívoros tanto heterótrofos como mixótrofos, reflejan los ciclos de disponibilidad y proporción APP/ HPP en el lago Alchichica.

La composición del HPP presente tanto en las vacuolas digestivas o como simbiontes de los ciliados, es similar a la composición del HPP *in situ*.

La composición del HPP en el contenido de las vacuolas de los flagelados no es similar a la composición del HPP *in situ* y refleja la selectividad de los organismos<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Fenchel, 1986a, 1986b

## OBJETIVOS

### General

Estudiar, a través de una aproximación semi-cuantitativa (importancia relativa de las diferentes grupos filogenéticos como presas de los protistas) las relaciones tróficas de los ciliados y flagelados picoplanctívoros con las presas picoplanctónicas procariontes, enfatizando tanto los cambios en sus densidades como el papel ecológico de los mismos en el circuito microbiano del lago Alchichica, durante dos ciclos del régimen térmico de la columna de agua, enero 2008 a enero 2010.

### Específicos

1. Caracterizar el papel del metazooplancton en el desarrollo del ensamblado de ciliados y flagelados.
2. Determinar taxonómicamente los ciliados presentes en el lago.
3. Determinar el modo de alimentación predominante (heterótrofo / autótrofo) a través de la presencia/ausencia de pigmentos fotosintéticos en los flagelados.
4. Cuantificar los ciliados y flagelados picoplanctívoros presentes en el ensamblado.
5. Determinar la biomasa de los ciliados y flagelados picoplanctívoros.
6. Estimar la fracción del total de presas, perteneciente al APP, en las vacuolas digestivas de los ciliados y flagelados picoplanctívoros.
7. Identificar y estimar las presas heterótrofas (HPP) (según los siguientes grupos filogenéticos: *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, *Sulfato reductoras* y *Archaea*) en las vacuolas digestivas de los ciliados y flagelados picoplanctívoros.
8. Determinar la afiliación filogenética de los simbiontes de los ciliados.
9. Comparar la composición del ensamblado procarionte *in situ* (HPP) con el contenido de las vacuolas digestivas y con la composición de los procariontes aparentemente simbiontes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Antes de realizar el muestreo, se hicieron mediciones de temperatura y oxígeno disuelto (OD) de la columna de agua (Hydrolab DS4/SVR4, sistema de monitoreo de calidad del agua). Las muestras fueron tomadas mensualmente en el periodo de enero de 2008 hasta enero de 2010 (exceptuando enero y noviembre de 2009, cuando, por razones logísticas, se realizaron dos muestreos, uno en la primera semana y el otro en la última semana del mes correspondiente) usando una botella para muestreo Niskin (USA) o IHE (República Checa). Cuando menos diez muestras fueron tomadas de la columna de agua durante la fase de mezcla del lago; durante la fase de estratificación del lago, el muestreo incluyó el epilimnion o capa de mezcla, el metalimnion y el hipolimnion.

Del total de las profundidades muestreadas en la columna de agua, dos a tres diferentes muestras fueron seleccionadas durante la fase de mezcla (año 2009 y enero 2010) ubicadas en la zona eufótica y afótica de la columna de agua. Durante la fase de estratificación, tres diferentes profundidades fueron seleccionadas (años 2008 y 2009) ubicadas en el metalimnion e hipolimnion del lago. El propósito fue examinar tanto la composición de procariontes presentes en las vacuolas de los protistas (enfocado principalmente en el HPP), así como la composición del HPP *in situ* (potenciales presas procariontes, disponibles a una profundidad específica en la columna de agua). En las profundidades habría potencialmente, una densidad suficiente de organismos protistas y una composición taxonómica diferente tanto de protistas como de presas procariontes.

A través del periodo de muestreo en la fase de estratificación, las muestras seleccionadas fueron tomadas de tres zonas: 1) parte superior del metalimnion (MS), definido usando las diferencias máximas y mínimas en temperatura a través de la columna de agua, localizada sobre la zona donde la diferencia de temperatura es máxima (termoclina planar); 2) Base del metalimnion (BM), localizada bajo la zona donde el gradiente de temperatura es máximo, una zona con un marcado decremento en las concentraciones de



OD, sin llegar a la anoxia y 3) hipolimnion, zona con diferencias mínimas en temperatura y en condiciones anóxicas durante las fases de estratificación establecida y tardía.

### **Incubaciones en bolsas de diálisis**

Para caracterizar el desarrollo de los protistas en ausencia del metazooplancton adulto (copépodos calanoides, principalmente), se realizaron experimentos de incubación (Šimek *et al.*, 1999, 2001). Los experimentos fueron realizados durante la fase de mezcla del año en enero de 2009 y enero de 2010 en las zonas eufótica y afótica de la columna de agua, así como en la estratificación bien establecida y tardía del lago (años 2008 y 2009), y se realizaron a las mismas profundidades seleccionadas y mencionadas en la sección anterior. Las incubaciones realizadas permitieron observar cambios en la composición de procariontes presentes en las muestras, potencialmente relacionados con la actividad de alimentación de los protistas. Por otra parte, también permitieron observar el crecimiento de flagelados y/o taxones específicos de ciliados.

Para impedir la presencia del metazooplancton adulto dentro de las bolsas de diálisis (1 L, límite de peso molecular 12 a 14 kDa, Spectra/Por VWR Scientific), el agua recolectada de las profundidades seleccionadas fue filtrada a través de una malla de 100  $\mu\text{m}$  de apertura. Las bolsas de diálisis (por triplicado en cada profundidad), fueron colocadas en su respectiva profundidad e incubadas durante seis días. Después del periodo de incubación, se tomaron muestras de cada bolsa de diálisis para enumerar los organismos presentes. Simultáneamente, se recolectó y fijó una muestra integrada a partir del triplicado de las bolsas, con el propósito de revisar la composición del HPP *in situ* y la composición del contenido de las vacuolas de los protistas.

### **Fijación de las muestras**

Las muestras (150 mL), tanto de la columna de agua como de las incubaciones, fueron fijadas con formalina a una concentración final del 2%  $v/v$  para el picoplancton y para los flagelados (Straškrabová *et al.*, 1999). Para los ciliados (150 mL y 600 mL) se usó una solución de Lugol alcalino como fijador; posteriormente las muestras se decoloraron con tiosulfato de sodio y se post-fijaron con formalina (Sherr y Sherr, 1996; Jezbera *et al.*,

2005; Medina-Sánchez *et al.*, 2005), o bien con Bouin 7<sup>v</sup>/<sub>v</sub> para determinar taxonómicamente a los ciliados.

### **Determinación taxonómica y agrupamiento trófico**

Para determinar los flagelados se utilizó la muestra fijada con formalina. La presencia/ausencia de pigmentos fotosintéticos en los flagelados se analizó en muestras teñidas con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia (Leica DMLB, Alemania). En el caso de los flagelados, el agrupamiento trófico sólo se hizo considerando la presencia o ausencia de los pigmentos fotosintéticos.

Para la determinación taxonómica de los ciliados, las muestras se post-fijaron con el líquido de Bouin y se realizó la tinción de protargol cuantitativa sobre filtros de membrana de ésteres de celulosa (1.2 µm), de acuerdo a la modificación de Skibbe (1994) del método de Montagnes y Lynn (1987); la propuesta taxonómica de los ciliados se basó principalmente en el trabajo de Foissner *et al.* (1999) y literatura especializada. El agrupamiento taxonómico-ecológico de los ciliados se basó en Macek *et al.* (2006). La determinación de la presencia de plastos o de organismos fotosintéticos asociados a los ciliados se realizó en muestras teñidas con DAPI, con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia.

### **Cuantificación de los microorganismos**

Las células de APP fueron enumeradas con base en la autofluorescencia de sus pigmentos fotosintéticos, después de ser concentradas en membranas de policarbonato (0.2 µm) y montadas en aceite de inmersión. Las células fueron visualizadas usando un juego de filtros Leica Y3 (excitación verde y luz de observación naranja). Al menos 300 células, tanto de APP como de HPP, fueron contadas por muestra, en campos seleccionados al azar en el filtro. Para cuantificar el HPP, las células fueron concentradas en membranas de policarbonato negras (0.2 µm), teñidas con DAPI (Porter y Feig, 1980) y enumeradas usando un microscopio de epifluorescencia.

Para analizar la composición del HPP *in situ* así como el ingerido por los protistas, se usó la técnica CARD-FISH, las células fueron concentradas en membranas de policarbonato (diámetro 47 mm, tamaños de poro 0.2 µm para el HPP, 1 µm para

flagelados y 2  $\mu\text{m}$  para ciliados; GTTP Millipore, USA u Osmonics, Alemania) dentro de las 24 h después del muestreo. Los filtros fueron colocados en cajas de Petri, secados al aire y almacenados en congelación hasta su procesamiento (Pernthaler *et al.*, 2001; Sekar *et al.*, 2003).

Los flagelados fueron incluidos posteriormente a este trabajo y en consecuencia, sólo se contaron en el año 2009 y se utilizaron membranas de policarbonato negras (1  $\mu\text{m}$ ). Se usó la tinción de DAPI para visualizar a los organismos y con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia se contaron los organismos presentes en 50 campos escogidos al azar en el filtro. Los ciliados fueron contados en muestras teñidas con DAPI concentradas en membranas de policarbonato (2  $\mu\text{m}$ ) teñidas con Negro de Irgalan (Sigma) y se contaron todos los organismos presentes en el filtro.

#### **Estimación de biomasa de los protistas**

La estimación de la biomasa se realizó calculando los biovolúmenes y el contenido de carbono de las células. Para ello se midieron la longitud y el ancho de al menos 30 células (tanto para ciliados como para flagelados, cuando fue posible). Con la media de estos datos se calculó el volumen de las mismas por medio de la aproximación a esferoides alargados. Los resultados obtenidos se multiplicaron por un factor de 1.4, sugerido para células de ciliados conservadas en Lugol y observadas en epifluorescencia con tinción por DAPI (Müller y Geller, 1993; Jerome *et al.*, 1993).

#### **Estimación de las células de APP ingeridas por los protistas**

Durante el ciclo anual 2009, se estimó el número de células de APP ingerido por los protistas, a partir de las muestras fijadas con formalina. Las células de APP se visualizaron usando su propia autofluorescencia con ayuda de un microscopio de epifluorescencia. En el caso de los flagelados, se contó el total de células observadas en el interior de los mismos. Los conteos se realizaron en todos los organismos observados en 50 campos seleccionados al azar, sobre un filtro de policarbonato (1  $\mu\text{m}$ ), y se calculó el promedio por tipo de flagelado (la ausencia de APP se consideró como cero APP ingerido y fue incluida en los conteos). En los ciliados que se alimentan principalmente de APP, se seleccionó una vacuola en la que fuese posible realizar el conteo de las células presentes. Posteriormente se

contó el número de vacuolas visibles en el organismo y se estimó el total de células de APP ingeridas al multiplicar el número de vacuolas observadas por el total de células observadas en la vacuola seleccionada. En los ciliados de menor tamaño se contó el total de células presentes en el organismo, posteriormente se calculó el promedio de células ingeridas para cada tipo de ciliado. Los conteos de células de APP ingeridas por los ciliados se realizaron en todos los organismos observados sobre un filtro de policarbonato (2 µm).

### **Hibridación**

Para analizar la composición de la comunidad bacteriana en las muestras de agua así como en las vacuolas de los protistas (Jezbera *et al.*, 2005), se utilizó un protocolo para CARD-FISH (Pernthaler *et al.*, 2001; Sekar *et al.*, 2003). Se usaron pruebas de oligonucleótidos (Tabla 1), separadas para marcar a grupos específicos y mezclas dirigidas a la mayoría de las bacterias (EUBmix, mezcla de las pruebas EUB338, PLA886 y EUB338-III), para marcar al total de bacterias susceptibles de ser hibridadas. Adicionalmente se usó la prueba ARCH915 para marcar a los miembros de *Archaea* que pudieran estar presentes en las muestras, y la prueba PAR 1457 para marcar a miembros de *Paracoccus* spp., potenciales simbiontes de algunos ciliados de las zonas subóxica y anóxica. En lo que sigue del texto las pruebas son designadas por sus acrónimos. Después de la hibridación, las secciones de filtro fueron teñidas con DAPI. En el caso de los procariontes, las proporciones de células hibridadas fueron enumeradas usando un microscopio de autofluorescencia, con aumento de 1000×. Para determinar la BCC, cuando menos 300 células hibridadas fueron contadas en cada sección de filtro sometido al proceso de hibridación. Todos los conteos fueron corregidos sustrayendo los conteos obtenidos con el control negativo NON338. Las muestras analizadas corresponden al periodo de estratificación del año 2008 y al ciclo anual 2009.

Para el análisis del contenido de las vacuolas de los flagelados, se observaron los organismos presentes en 50 campos escogidos al azar para determinar la presencia y contar las células hibridadas. En el caso de los ciliados, todos los organismos presentes en las secciones de filtro fueron revisados para ver la presencia y contar las células hibridadas; la ausencia de hibridación fue considerada como cero e incluida en los conteos. Debido a que, durante el ciclo anual, el número total de flagelados y ciliados presentes en las muestras

dependió de sus densidades naturales, los datos de algunos organismos no fueron suficientes para obtener un comportamiento alimenticio que pudiera ser considerado representativo. Por lo tanto, para realizar el cálculo del índice de selectividad, correspondiente a cada uno de los organismos mencionados más adelante en la sección de resultados sólo se usaron observaciones de cuando menos 15 organismos. Las correcciones con la prueba NON338 fueron hechas, cuando fue posible, usando los conteos correspondientes al mismo organismo, o bien tomando el porcentaje de la prueba NON338 mejor representado, obtenido para la muestra y profundidad correspondientes.

**Tabla 1 Pruebas de oligonucleótidos usados en este estudio**

<b>Prueba</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Secuencia (5'- 3')</b>	<b>Sitio Blanco (posiciones ARNr)</b>	<b>Referencia</b>
EUB338	<i>Bacteria</i>	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16S (338-355)	Amann <i>et al.</i> , 1990
PLA886	<i>Planctomycetes</i>	GCC TTG CGA CCA TAC TCC C	16S (886-904)	Neef <i>et al.</i> , 1998
EUB338-III	<i>Verrucomicrobia</i>	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	16S (338-355)	Daims <i>et al.</i> , 1999
NON338	Control Negativo	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	16S (338-355)	Wallner <i>et al.</i> , 1993
BET42A	<i>Betaproteobacteria</i>	GCC TTC CCA CTT CGT TT	23S (1027-1043)	Manz <i>et al.</i> , 1992
GAM42a	<i>Gammaproteobacteria</i>	GCC TTC CCA CAT CGT TT	23S (1027-1043)	Manz <i>et al.</i> , 1992
ALF968	<i>Alphaproteobacteria</i>	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	16S (968-985)	Neef, 1997
CF319A	grupo <i>Cytophaga-Flavobacteria</i> del Phylum <i>Bacteroidetes</i>	TGG TCC GTG TCT CAG TAC	16S (319-336)	Manz <i>et al.</i> , 1996
SRB385	Bacterias sulfato reductoras	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	16S (385-402)	Amann <i>et al.</i> , 1990
ARCH915	<i>Archaea</i>	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	16S (915-935)	Stahl y Amman, 1991
PAR1457	<i>Paracoccus</i> sp.	CTA CCG TGG TCC GCT GCC	16S (1457 – 1474)	Neef <i>et al.</i> , 1996

## Análisis de los datos

Todos los conteos se integraron a bases de datos con el fin de analizar gráficamente las dinámicas anuales de los organismos y buscar correlaciones entre los mismos (paquetes GraphPad - Prism e InStat) (Motulsky, 1999). Para saber si existieron diferencias significativas en las densidades de HPP y APP, o en las densidades de flagelados y ciliados entre las diferentes muestras *in situ* y aquellas obtenidas al final en los experimentos de incubación, se realizó una prueba de *t* para muestras dependientes. Con el fin de conocer si existieron diferencias entre años de muestreo y estratos de la columna de agua, se realizó un análisis de varianza factorial (año × estrato) para la densidad de los organismos a partir del periodo de estratificación establecida. Para las dinámicas anuales de los diferentes organismos, se usaron los datos calculados como promedios por columna o promedios según las diferentes capas del lago en la época de estratificación. Los datos sobre BCC *in situ* y el contenido de vacuolas fueron usados para calcular el índice de selectividad alfa de Chesson (1978, 1983), usando la fórmula:

$$\alpha_i = \frac{r_i/p_i}{\sum_{i=1}^n \frac{r_i}{p_i}} \quad i = 1, \dots, n \quad \sum_{i=1}^n \alpha_i = 1$$

Donde:  $r_i$  = porcentaje del ítem alimenticio  $i$  presente en las vacuolas del organismo

$p_i$  = porcentaje del mismo ítem  $i$  presente en el total de alimento disponible

$n$  = número total de ítems alimenticios disponibles

Cuando  $\alpha_i = 1/n$ , no ocurre alimentación selectiva. Cuando  $\alpha_i < 1/n$ , ocurre selección negativa, es decir aparece menor cantidad del ítem alimenticio  $i$  en la dieta de lo que se esperaría si hubiese alimentación al azar. Cuando  $\alpha_i > 1/n$  ocurre selección positiva, o sea que hay mayor cantidad del ítem  $i$  en la dieta de lo que se esperaría si hubiese alimentación al azar. Los porcentajes usados para realizar el cálculo del índice de selectividad, fueron porcentajes relativos a los conteos EUBmix correspondientes.

## RESULTADOS

### VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS

El régimen térmico de la columna de agua en el lago Alchichica es el propio de un lago monomítico cálido (Figura 2). Puede decirse, en general, que la fase de mezcla se mantuvo desde finales de diciembre o principios de enero y persistió hasta finales de marzo o comienzos de abril. Por otra parte, la fase de estratificación ocurrió desde el mes de abril y persistió hasta noviembre o diciembre.

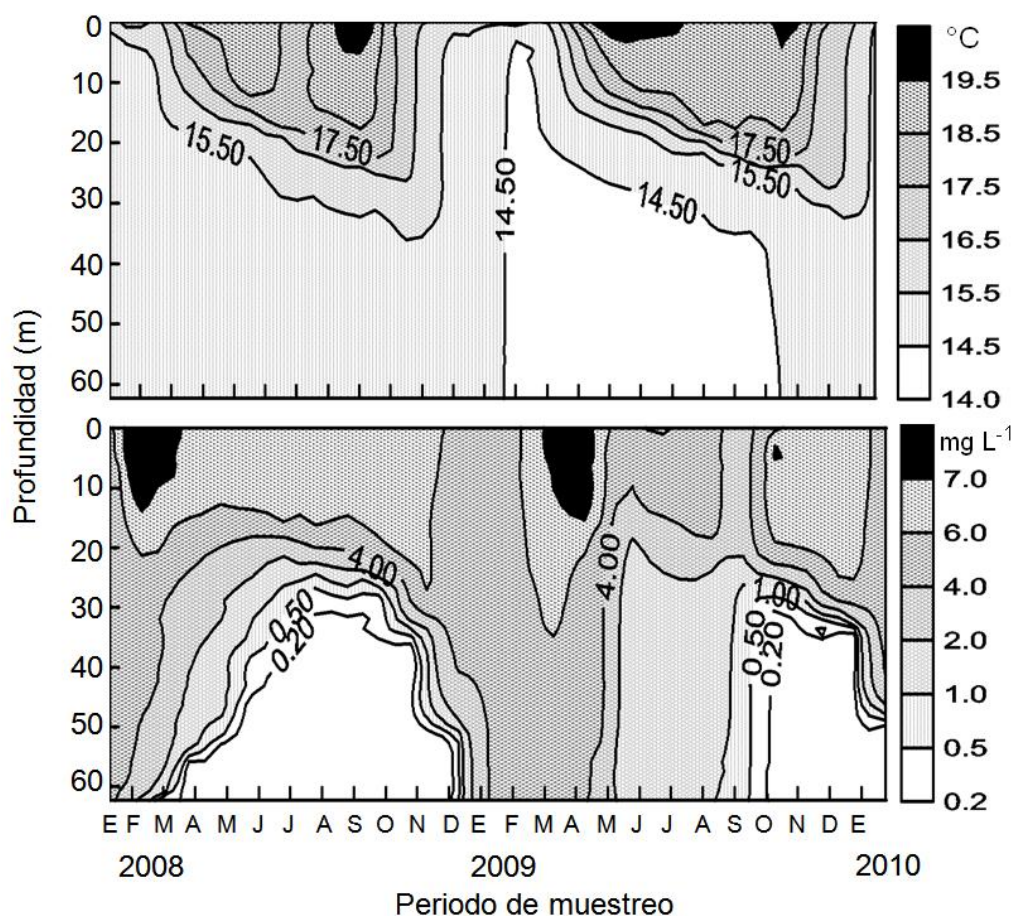


Figura 2 Régimen térmico (panel superior) y del oxígeno disuelto (panel inferior) para la columna de agua del lago Alchichica durante el periodo de muestreo

En lo referente al oxígeno disuelto en la columna de agua, se registró el inicio de las condiciones anóxicas a principios de abril, cerca del fondo del lago. Posteriormente, con el avance de la etapa de estratificación, la zona anóxica se localizó a menor profundidad en la

columna de agua. Ya en la estratificación tardía, esta zona anóxica de la columna se estrechó paulatinamente, hasta presentar una concentración homogénea de oxígeno disuelto en la columna de agua en la etapa de mezcla del lago. Es necesario señalar que en diciembre de 2008, se registraron 15.5° C de temperatura en la superficie y 14.8° C en el fondo por lo que no hubo estratificación térmica. Sin embargo, las concentraciones de OD en la columna de agua (5.8 a 0 mg L<sup>-1</sup> desde la superficie hasta el fondo) mostraron un marcado decremento desde los 40 m hasta los 50 m. Por lo tanto, los datos biológicos generados en diciembre de 2008 fueron asignados para su análisis a las capas BM e hipolimnion, donde se ajustaron a los criterios de zonación de acuerdo con el perfil de OD, descrito con anterioridad.

Cabe mencionar que, en el muestreo de 2009, durante el desarrollo de la estratificación temprana y su establecimiento, la sonda multiparamétrica con la cual se realizaron los perfiles, no funcionó correctamente. Por ello en las zonas que con frecuencia son subóxicas ( $\leq 0.5$  mg L<sup>-1</sup> de OD) o anóxicas, se registró una concentración de OD en un intervalo entre 0.5 a 1 mg L<sup>-1</sup>, que no representa el comportamiento típico del lago. Las profundidades a las cuales se localizaron las diferentes capas del lago durante la fase de estratificación se observan en la Figura 3.

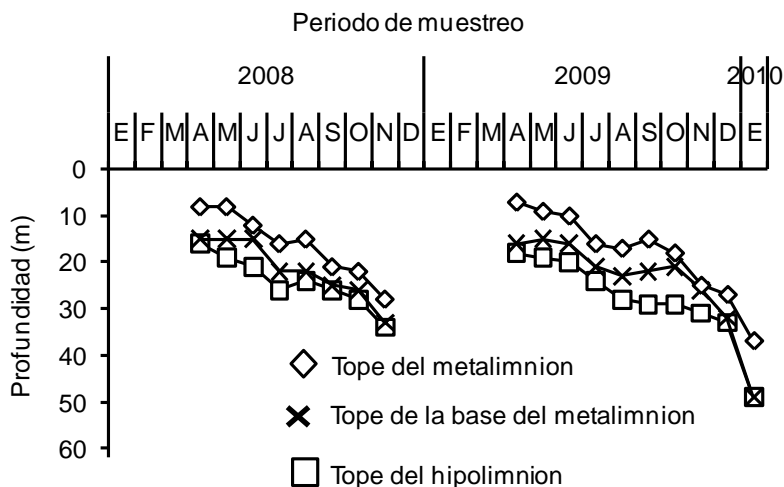


Figura 3 Profundidades a las cuales se localizaron las diferentes capas del lago durante la estratificación térmica

En Alchichica se ha observado que existe un acoplamiento de la termoclina y la oxiclina, el cual fue muy estrecho durante los meses de muestreo de 2008. En contraste,



durante la estratificación de 2009, el desarrollo de la oxiclina continuó a mayor profundidad que en 2008, internándose en el hipolimnion. Además se observó un metalimnion de mayor grosor comparado con el de 2008, particularmente en el periodo de estratificación bien establecida y estratificación tardía. El establecimiento de las condiciones anóxicas en la columna de agua comenzó en la estratificación temprana, cerca del fondo del lago. Posteriormente, en el periodo de estratificación bien establecida, las condiciones anóxicas dominaron la columna de agua desde los 25 m hasta el fondo, y desde los 35m hasta el fondo, en la etapa de estratificación tardía en ambos años.

### Picoplancton

El picoplancton alcanzó la máxima densidad durante la fase de mezcla (Figura 4). En el caso del APP, la densidad máxima en la columna de agua se observó en el mes de febrero ( $1.07 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>) de 2008, y en febrero y abril de 2009 (alrededor de  $1.14 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>). Después del inicio de la estratificación, la densidad de APP comenzó a disminuir y alcanzó las densidades mínimas en los meses de la estratificación bien establecida y estratificación tardía.

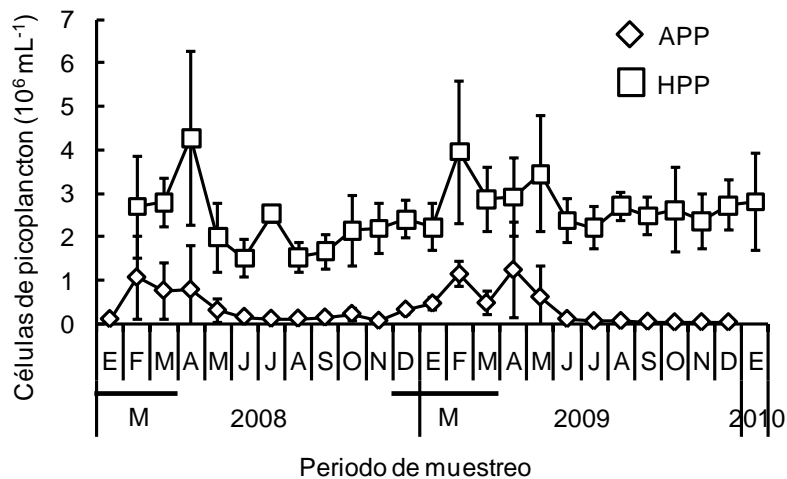


Figura 4 Tendencias del picoplancton autotrófico (APP) y el heterotrófico (HPP) (media ± error estándar), en la columna de agua durante el periodo de muestreo, M, Fase de mezcla

A diferencia del APP, el HPP (Figura 4) alcanzó la densidad máxima en abril de 2008 ( $4.27 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>) y en febrero de 2009 ( $3.95 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>). Al igual que el APP, el HPP comenzó a disminuir al comienzo de la estratificación del lago, y alcanzó la

densidad mínima en los meses de junio y agosto de 2008, mientras que en el 2009 la densidad mínima ocurrió en julio. Esta variabilidad manifiesta la importancia del régimen térmico del lago en la dinámica general del picoplancton en la columna de agua.

Por otra parte, en la dinámica del APP basada en las diferentes capas consideradas en este estudio, (Figura 5a) se observó que en 2008 al inicio de la estratificación las densidades máximas de APP se encontraron en el MS, seguidas de la capa de mezcla, la BM y finalmente el hipolimnion. Durante la estratificación bien establecida y tardía, el intervalo de densidad de células de APP en la capa de mezcla fue  $6.98 \times 10^4$  a  $3.2 \times 10^5$  cél. mL<sup>-1</sup>, en el MS fue  $1.57 \times 10^5$  a  $8.15 \times 10^4$  cél. mL<sup>-1</sup>, en la BM fue  $1.65 \times 10^5$  a  $9.31 \times 10^4$  cél. mL<sup>-1</sup> y en el hipolimnion  $5.78 \times 10^4$  a  $3.46 \times 10^4$  cél. mL<sup>-1</sup>.

En 2009, durante el comienzo de la estratificación, el valor máximo en la densidad de APP se encontró en la capa de mezcla, seguido del MS, la BM y el hipolimnion. Posteriormente, durante la estratificación bien establecida y tardía, las medias para las diferentes capas fueron muy similares: en la capa de mezcla las densidades estuvieron en el intervalo  $6.91 \times 10^4$  a  $3.94 \times 10^4$  cél. mL<sup>-1</sup>, en el MS el intervalo fue  $1.55 \times 10^5$  a  $3.94 \times 10^4$  cél. mL<sup>-1</sup>, en la BM fue de  $1.36 \times 10^5$  a  $2.47 \times 10^4$  cél. mL<sup>-1</sup>, y finalmente en el hipolimnion fue de  $2.34 \times 10^4$  a  $3.4 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup>.

Las densidades de APP de los experimentos de incubación en bolsas de diálisis, en 2008 (Figura 5b), en el MS se encontraron en el intervalo  $2.24 \times 10^5$  a  $5.97 \times 10^4$  cél. mL<sup>-1</sup>, en la base del metalimnion el intervalo fue  $2.23 \times 10^5$  a  $4.0 \times 10^5$  cél. mL<sup>-1</sup> y en el hipolimnion el intervalo fue  $2.01 \times 10^5$  a  $2.13 \times 10^5$  cél. mL<sup>-1</sup>. Las densidades de APP en los experimentos de incubación mostraron un incremento conforme avanzó el periodo de estratificación. Pero durante la estratificación tardía, con excepción de las incubaciones en la BM en octubre, se observó un decremento en las densidades, con un mínimo para todas las incubaciones en noviembre. Posteriormente, en diciembre se observó un aumento en las densidades de APP de los experimentos.

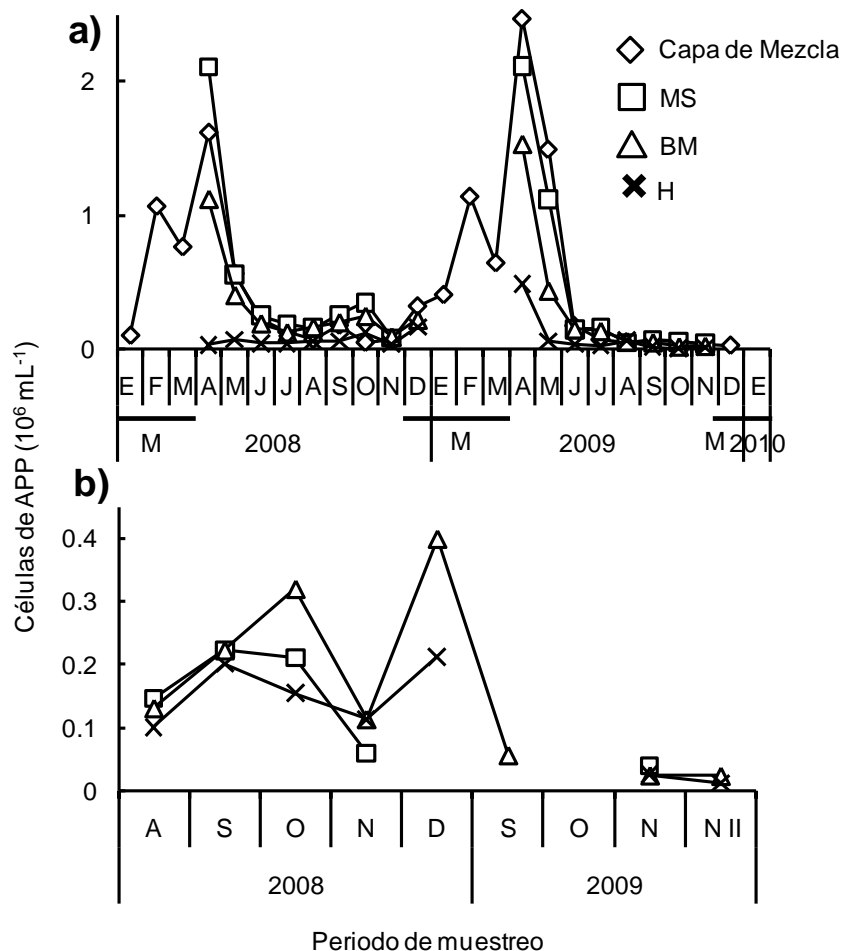


Figura 5 Tendencias en la densidad media del picoplancton autotrófico (APP), en las diferentes capas de la columna de agua (a) y en las incubaciones (b), a las profundidades durante el periodo de muestreo; MS, metalimnion superior; BM, base del metalimnion; H, hipolimnion; M, fase de mezcla; N II segundo muestreo en noviembre

En los experimentos de incubación de 2009, el APP mostró densidades muy bajas. En la gráfica sólo se presentan datos de las incubaciones en las que se obtuvo una densidad celular que permitiera realizar los conteos con base en imágenes digitales. Las incubaciones en el MS en agosto y septiembre se perdieron y por tanto no hay datos. A diferencia de las incubaciones de 2008, la densidad de APP en las incubaciones de 2009 fue muy homogénea. No se encontraron diferencias significativas en la densidad de APP (Tabla 2) entre las muestras de la columna de agua y las incubaciones durante la estratificación. No obstante, en las incubaciones de la zona eufótica durante el periodo de mezcla, en enero de 2009, se encontraron diferencias en las densidades de APP.

Al comparar el promedio por columna entre los años de muestreo, se encontró que en el año 2009 hubo en promedio menor cantidad de APP que en el año 2008 (ANOVA,  $F(1, 22) = 16.048$   $p = 0.0005$ ), por otra parte entre las capas consideradas en este estudio sólo se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F(2, 18) = 4.7045$   $p = 0.02$ ) en el hipolimnion, con una densidad de células de APP menor que las existentes en el MS y la BM, durante la estratificación bien establecida.

**Tabla 2 Diferencias entre las muestras de la columna de agua vs incubaciones**

Capa	2008						2009					2010	
	MS/ZE	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Ago	Sep	Oct	Nov	Nov II	Ene
APP		ns	ns	ns	ns	ns	0.04	P	P	ns	ns	ns	ns
HPP		ns	ns	ns	0.04	ns	0.01	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Densidad Ciliados		ns	ns	ns	0.002	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>Cyclidium</i> sp.		ns	ns	0.04	0.004	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HNF		ns	ns	ns	ns	ns	0.04	ns	ns	0.04	ns	ns	ns
<b>BM/ZA</b>													
APP		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HPP		ns	ns	ns	0.021	0.02	0.001	ns	0.02	ns	ns	ns	ns
Densidad Ciliados		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>Cyclidium</i> sp.		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ciliado N Ident		ns	ns	ns	ns	0.01	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HNF		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.03	0.02	ns	0.03
<b>Hipolimnion</b>													
APP		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HPP		ns	0.013	ns	ns	0.02	ns	ns	0.003	ns	ns	ns	ns
Densidad Ciliados		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0.04</b>	0.03	ns	ns	ns
<i>Cristigera</i> sp.		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
HNF		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.01	ns	ns	ns	ns

Los números indican los valores  $p$  ( $\alpha, 0.05$ ) prueba de  $t$  para muestras dependientes: ns, no significativo; APP, picoplancton autotrófico; HPP, picoplancton heterotrófico; HNF, nanoflagelados heterotróficos; MS, metalimnion superior; ZE, zona eufótica; BM, base del metalimnion; ZA, Zona afótica; N II, segundo muestreo en noviembre; números sin resaltar, crecimiento en la incubación; números en negrilla, decremento en las incubaciones

La dinámica del HPP en las diferentes capas consideradas (Figura 6a) mostró que en 2008 durante el inicio de la estratificación, la mayor densidad de HPP se encontró en el MS, seguida de la capa de mezcla, de la BM y del hipolimnion. Sin embargo, conforme

avanzó la temporada de estratificación, las densidades de las diferentes capas fueron muy similares durante la estratificación bien establecida y la estratificación tardía, excepto en octubre cuando se observó el mínimo en densidad de HPP para la capa de mezcla. En general, es a partir de agosto que se observó un paulatino incremento en las densidades de HPP en las diferentes capas, el cual duró hasta la fase de mezcla del lago. Durante la estratificación bien establecida de 2008, las densidades de HPP en la capa de mezcla estuvieron en el intervalo  $2.63 \times 10^6$  a  $2.02 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, en el MS el intervalo fue  $2.45 \times 10^6$  a  $2.31 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, en la BM el intervalo fue  $2.35 \times 10^6$  a  $2.46 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup> y en el hipolimnion el intervalo se encontró entre  $2.68 \times 10^6$  a  $2.19 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>.

En 2009 la máxima densidad de HPP, durante el comienzo de la estratificación, se encontró en el MS, seguida de la BM, la capa de mezcla y el hipolimnion. Durante la estratificación bien establecida y tardía, las densidades de HPP en la capa de mezcla estuvieron en el intervalo  $2.67 \times 10^6$  a  $1.94 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, en el MS el intervalo fue  $2.08 \times 10^6$  a  $2.85 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, en la BM el intervalo fue  $1.76 \times 10^6$  a  $2.78 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, y en el hipolimnion el intervalo fue  $2.09 \times 10^6$  a  $2.35 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>.

Respecto de los experimentos de incubación de 2008, las densidades de HPP fueron mayores que en la columna de agua. En el MS las densidades estuvieron en el intervalo  $2.82 \times 10^6$  a  $3.87 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, en la BM el intervalo fue  $2.8 \times 10^6$  a  $1.7 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup> y en el hipolimnion las densidades estuvieron en el intervalo  $2.37 \times 10^6$  a  $6.24 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>. En las incubaciones realizadas en el MS y la BM las densidades de HPP tendieron a incrementar conforme se aproximó la fase de mezcla. Las diferencias principales en las densidades de HPP entre incubaciones individuales ocurrieron en diciembre, entre la capa oxigenada y la anóxica.

En los experimentos de 2009, el HPP en las incubaciones mostró densidades similares a aquellas presentes en la columna de agua. Igual que con el APP, las densidades del HPP en los experimentos de este año mostraron poca variación entre las incubaciones de las diferentes capas. En las incubaciones del MS las densidades de HPP se encontraron entre  $1.56 \times 10^6$  a  $2.56 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>, en la BM el intervalo fue  $2.1 \times 10^6$  a  $3.4 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup> y en el hipolimnion el intervalo fue  $2.26 \times 10^6$  a  $2.1 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>.

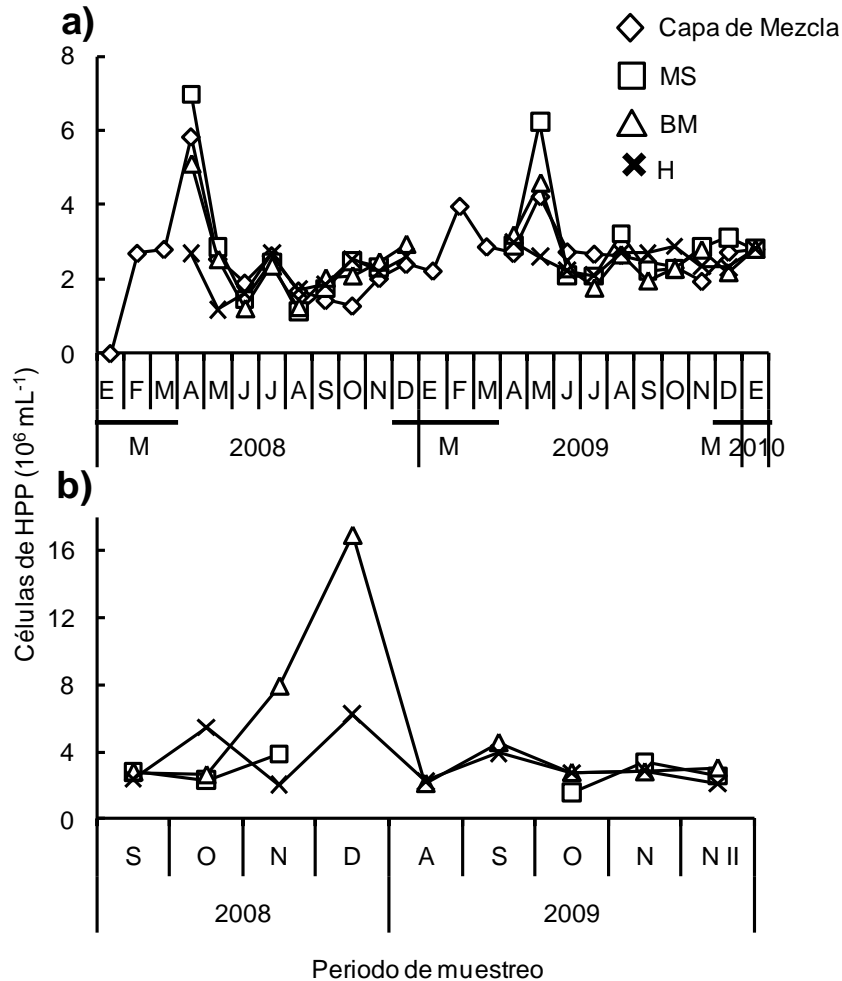


Figura 6 Tendencias en la densidad media del picoplancton heterotrófico (HPP), en las diferentes capas de la columna de agua (a) y en las incubaciones (b), a las correspondientes profundidades durante el periodo de muestreo; MS, metalimnion superior; BM, base del metalimnion; H, hipolimnion; M, fase de mezcla; N II, segundo muestreo en el mes de noviembre

Por otra parte, al comparar el promedio por columna en cuanto al HPP, se encontró que en el año 2009 hubo mayor cantidad de HPP (ANOVA,  $F(1, 18) = 10.524$   $p = 0.0045$ ) en comparación al año 2008, pero no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes capas consideradas en este trabajo durante la etapa de estratificación bien establecida.

En las incubaciones realizadas en 2008 durante el periodo de mezcla (Figura 7), se observó que la densidad del HPP en las incubaciones fue mayor que en la columna de agua, pero similar entre las incubaciones a las diferentes profundidades. Sin embargo, en 2009 las densidades de HPP en las incubaciones y en la columna fueron similares. Las diferencias

significativas para el HPP (Tabla 2) se encontraron en las incubaciones del MS en diciembre de 2008, en la BM de noviembre y diciembre del mismo año, y en el hipolimnion en diciembre de 2008. En septiembre de 2009 en las incubaciones de la BM y del hipolimnion se encontraron diferencias significativas.

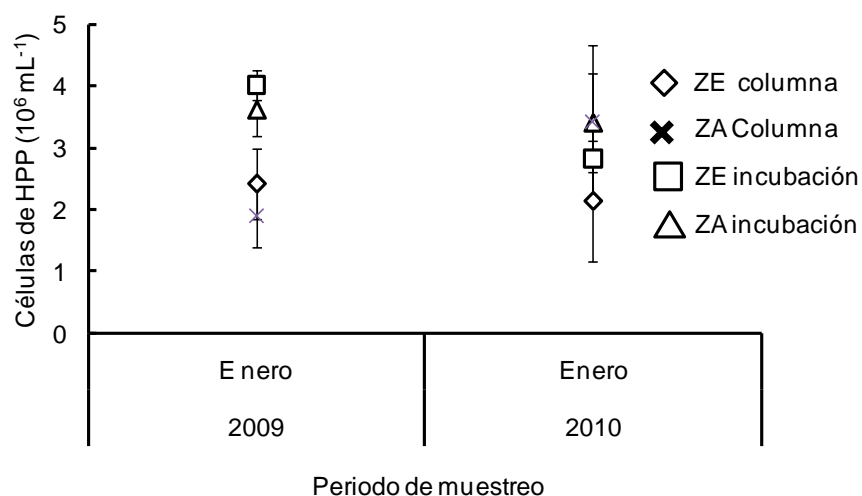


Figura 7 Picoplancton heterotrófico (HPP) (media  $\pm$  desviación estándar), en la columna de agua y en las incubaciones en enero; ZE, zona eufótica; ZA, zona afótica

### Composición de la comunidad bacteriana

En general, el promedio de los porcentajes de hibridación total en la columna de agua (Figura 8), osciló entre 20% y 50%. Los mayores porcentajes de hibridación se presentaron en septiembre de 2008, marzo de 2009 y enero de 2010 (55.4%, 83.1% y 69.3% respectivamente). Los menores porcentajes de hibridación se observaron durante los meses de estratificación o comienzo de la mezcla de 2008 y fueron 23.5% y 24.8% en agosto y diciembre respectivamente. En 2009 los porcentajes de hibridación más bajos alcanzaron 18.6% y 24.8% respectivamente en junio y diciembre respectivamente.

Respecto de los porcentajes de hibridación en las diferentes capas de la columna de agua (Figura 9a), se observó que durante la etapa de estratificación de 2008, los porcentajes de hibridación de la BM y del hipolimnion fueron muy similares y fue en diciembre cuando se observaron diferencias entre la parte oxigenada y la parte anóxica de la columna de agua. En el MS de ese mismo año se observó que los porcentajes de hibridación en septiembre y

noviembre fueron menores que en la BM y el hipolimnion, excepto en octubre cuando ocurrió lo contrario.

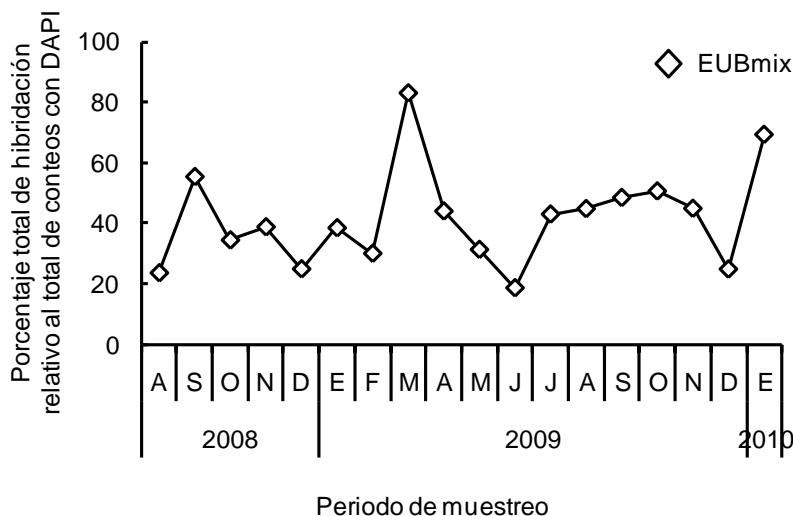


Figura 8 Porcentaje total de bacterias hibridadas con el uso de la mezcla EUBmix en la columna de agua

En 2009 se observó una disminución paulatina en los porcentajes de hibridación en el MS (58% a 28% de septiembre a noviembre respectivamente; Figura 9a). Los porcentajes de hibridación en la BM tuvieron un incremento de agosto a septiembre (36% a 56%) y después permanecieron entre el 46% y 50%. Finalmente, en el hipolimnion los porcentajes de hibridación permanecieron constantes en agosto y septiembre (alrededor de 36%), aumentaron en octubre y noviembre (48% y 53%, respectivamente) y finalmente en el segundo muestreo de noviembre, el porcentaje disminuyó a 28%.

En los experimentos de incubación de 2008 (Figura 9b), se encontró que el porcentaje de hibridación en el MS disminuyó, en comparación con la columna de agua, en septiembre y octubre (41% a 15.4% y 45% a 34%, respectivamente), mientras que noviembre aumentó de 28% a 33%. Por otra parte, en la BM las muestras de las incubaciones de septiembre mostraron una disminución notable respecto de la columna de agua (68% a 19%), lo mismo que en octubre (32% a 15%), sin embargo, en noviembre hubo un aumento de 45% a 69%. Finalmente, en el hipolimnion se observó una disminución de 56% a 37% en septiembre, un incremento de 24% a 39% en octubre y un decremento de 42% a 25% en noviembre.



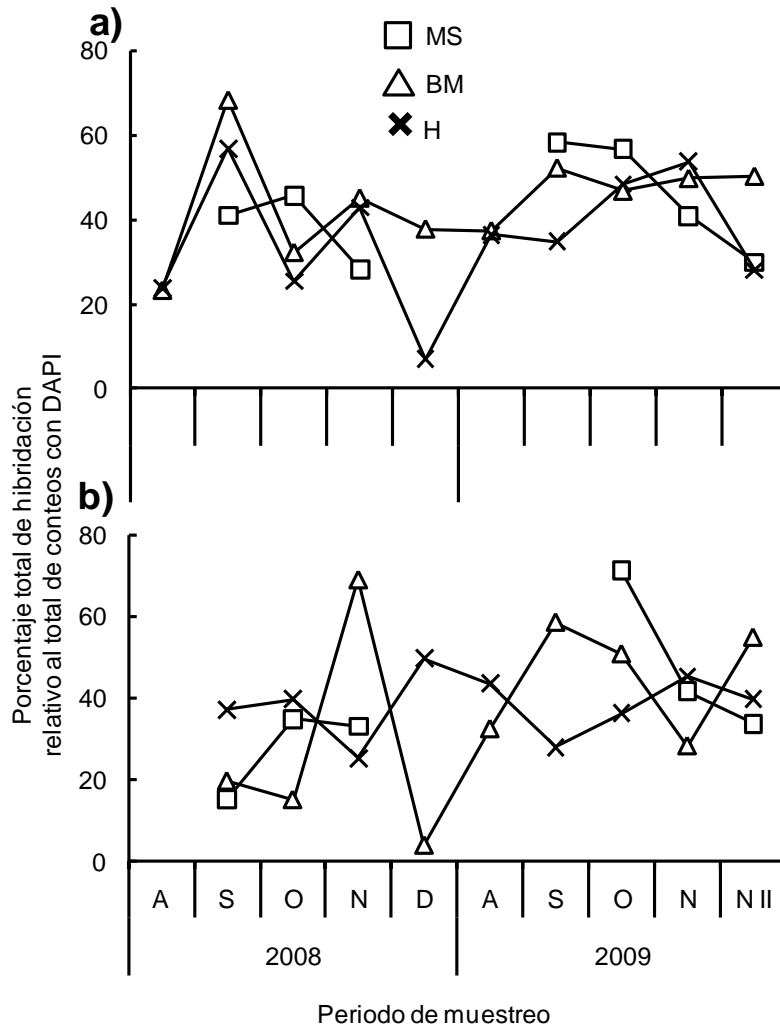


Figura 9 Porcentaje total de bacterias hibridadas con la mezcla EUBmix en las diferentes capas de la columna de agua (a) y en las incubaciones (b) a las correspondientes profundidades durante el periodo de muestreo; MS, metalimnion superior; BM, base del metalimnion; H, hipolimnion; M, fase de mezcla; N II, segundo muestreo de noviembre

En 2009, las incubaciones en el MS mostraron un aumento de 56% a 71% en el mes de octubre, mientras que en noviembre el porcentaje de hibridación permaneció sin cambios, y en el segundo experimento de noviembre se observó un aumento de 29% a 33%. En las incubaciones en la BM, en agosto se registró una disminución de 36% a 32%, en septiembre un aumento de 52% a 58%, en octubre un aumento de 46% a 50%, en noviembre una disminución de 49% a 28% y en el segundo experimento de noviembre un aumento de 50% a 54%. En las incubaciones del hipolimnion se observó en agosto un aumento de 36% a 43%, en septiembre una disminución de 34% a 28%, en octubre una

disminución de 48% a 36%, en noviembre una disminución de 53% a 45% y en el segundo experimento de noviembre un aumento de 28% a 39%.

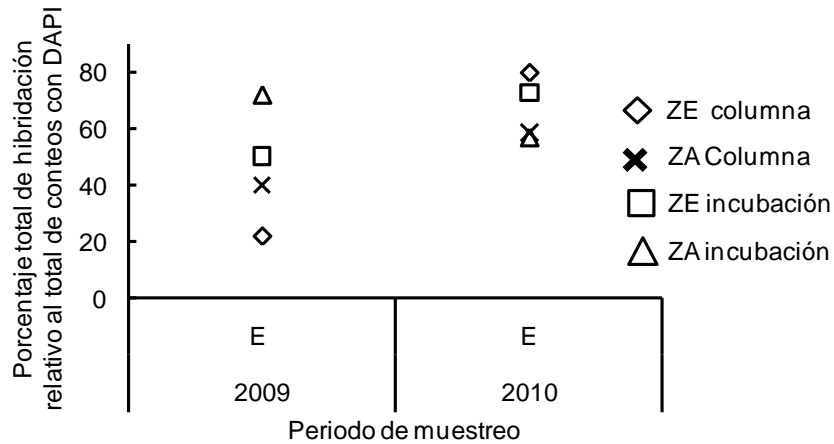


Figura 10 Porcentaje total de bacterias hibridadas en la columna de agua y en las incubaciones durante enero; ZE, zona eufótica; ZA, zona afótica

En enero de 2009 durante la fase de mezcla, se observó que el porcentaje de hibridación en la columna de agua fue diferente entre las zonas eufótica y afótica (22% y 40%, respectivamente, Figura 10) mientras que en las incubaciones los porcentajes fueron 50% y 71% en las zonas eufótica y afótica, respectivamente. En las incubaciones de enero de 2010, se registraron porcentajes de hibridación de 80% en la zona eufótica y de 58% en la zona afótica de la columna de agua, mientras que en las incubaciones los porcentajes fueron 72% en las incubaciones en la zona eufótica y 56% en las incubaciones de la zona afótica.

La composición promedio de grupos bacterianos en la columna de agua a través del periodo de muestreo se presenta en la Figura 11. Las proporciones fueron calculadas respecto al porcentaje total de hibridación obtenido con los conteos usando la mezcla EUBmix. Durante la fase de estratificación de 2008, prácticamente no se observó dominancia de ninguno de los grupos bacterianos determinados con las pruebas. En agosto *Alphaproteobacteria* y en septiembre *Gammaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria* mostraron una proporción mayor que el resto de los grupos. Fue hasta la fase de mezcla en enero de 2009 cuando el grupo *Cytophaga-Flavobacteria* dominó en la columna de agua, mientras que *Planctomycetes* dominó en abril al comienzo de la fase de estratificación.

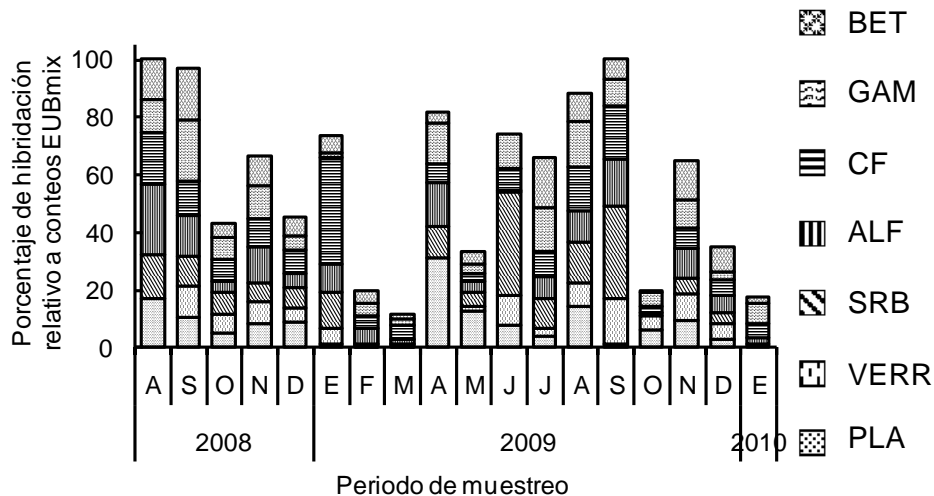


Figura 11 Contribución relativa de cada uno de los grupos bacterianos determinados con la técnica CARD-FISH, en la columna de agua; BET, *Betaproteobacteria*; GAM, *Gammaproteobacteria*; CF, *Cytophaga-Flavobacteria*; ALF, *Alphaproteobacteria*; SRB, bacterias sulfato-reductoras; VERR, *Verrucomicrobia*; PLA, *Planctomycetes*

Una vez establecida la estratificación en 2009, en mayo continuó la dominancia de *Planctomycetes*. En junio las bacterias sulfato-reductoras dominaron en la columna de agua, mientras que en julio *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* dominaron la composición. Posteriormente, en agosto, no hubo dominancia clara de algún tipo bacteriano, en septiembre nuevamente dominaron las bacterias sulfato-reductoras y en el resto del periodo de muestreo lo hizo *Betaproteobacteria*.

La composición de las muestras de la columna de agua y de los experimentos de incubación se muestra en la Figura 12. En el MS (Figura 12a), se observaron cambios en la composición bacteriana entre las muestras de la columna de agua y las de los experimentos de incubación. En septiembre de 2008, se observó una disminución en el porcentaje acumulado por los diferentes grupos bacterianos determinados en este estudio, lo que sugiere el desarrollo de bacterias que no pudieron ser hibridadas con las sondas usadas. Por otra parte, se registró una disminución importante en el porcentaje relativo de *Gammaproteobacteria* y la desaparición de *Verrucomicrobia* en las muestras de incubación. En octubre aumentaron los porcentajes de *Cytophaga-Flavobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Verrucomicrobia* y el porcentaje acumulado en las muestras de incubación. En noviembre disminuyó tanto el porcentaje acumulado como los porcentajes de bacterias sulfato-reductoras, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes*.

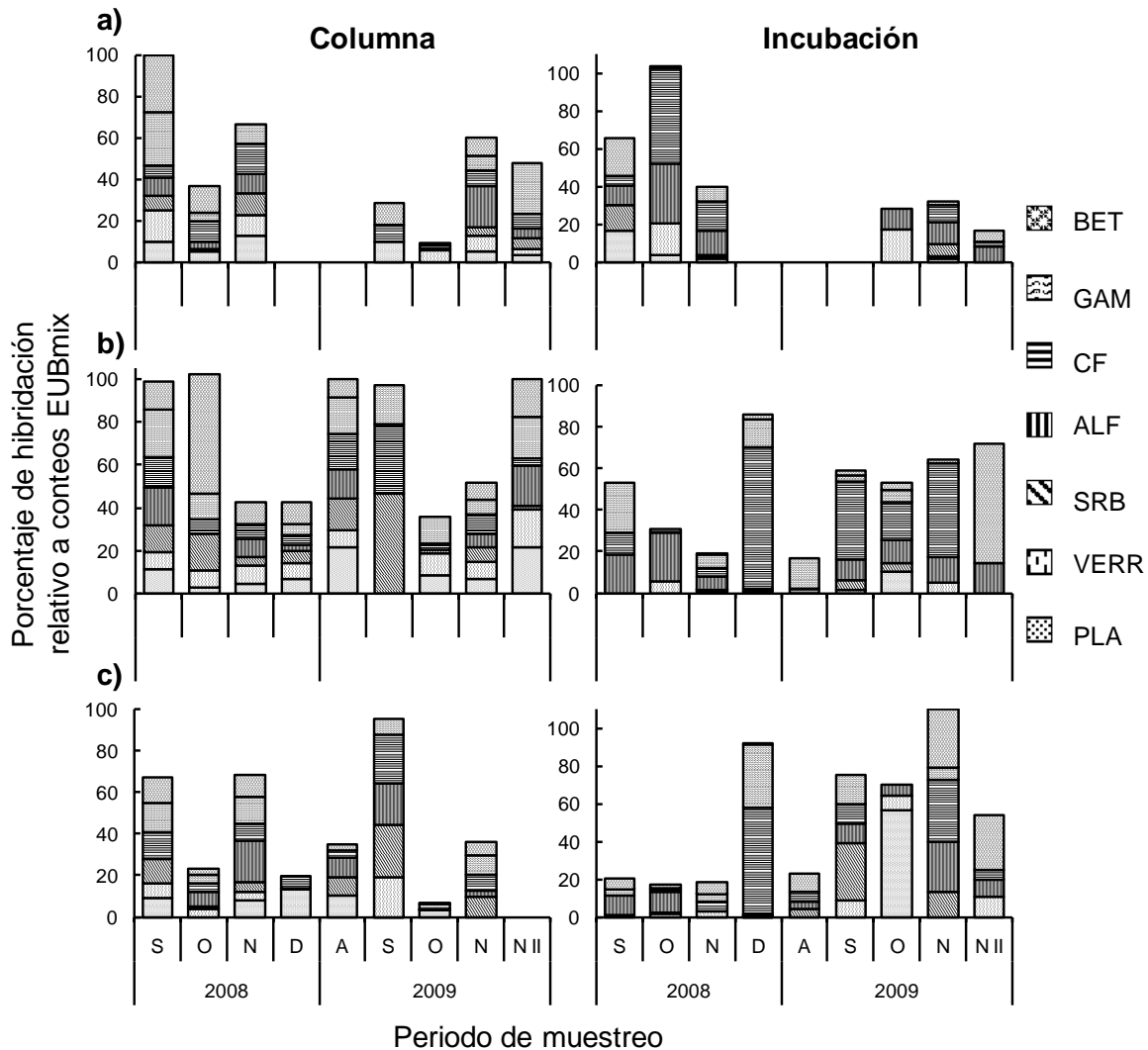


Figura 12 Contribución relativa de cada uno de los grupos bacterianos determinados con la técnica CARD-FISH, en la columna de agua y en las incubaciones en las diferentes capas: a) metalimnion superior; b) base del metalimnion; c) hipolimnion; BET, *Betaproteobacteria*; GAM, *Gammaproteobacteria*; CF, *Cytophaga-Flavobacteria*; ALF, *Alphaproteobacteria*; SRB, bacterias sulfato-reductoras; VERR, *Verrucomicrobia*; PLA, *Planctomycetes*

En octubre de 2009 en las muestras del MS se observaron organismos de *Verrucomicrobia*, mientras que en las muestras de las incubaciones *Alphaproteobacteria* y *Verrucomicrobia* fueron los grupos característicos. En noviembre en la columna se observaron principalmente *Alphaproteobacteria*, pero en las incubaciones aparecieron *Cytophaga-Flavobacteria*, *Alphaproteobacteria* y bacterias sulfato-reductoras. Finalmente,

en el segundo experimento de noviembre en las incubaciones se observó una importante disminución de *Gammaproteobacteria* respecto de la columna de agua.

En septiembre de 2008, en las incubaciones de la BM (Figura 12b) se observó una marcada disminución en el porcentaje acumulado así como en la composición. El grupo *Betaproteobacteria* no fue registrado en las incubaciones, lo mismo las bacterias sulfato-reductoras, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes*. En octubre no aparecieron las *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y bacterias sulfato-reductoras en las incubaciones, mientras que el porcentaje de *Alphaproteobacteria* aumentó. En noviembre nuevamente disminuyó el porcentaje acumulado de las incubaciones y no se registraron *Betaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, bacterias sulfato-reductoras, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes*. En diciembre aumentó el porcentaje acumulado de las incubaciones, al igual que la dominancia de *Cytophaga-Flavobacteria* en las mismas.

En los experimentos de agosto de 2009, se observó un importante decremento en el porcentaje acumulado en las incubaciones, y no aparecieron la mayoría de los grupos bacterianos observados en la columna, a excepción de *Gammaproteobacteria*. En septiembre, la columna de agua estuvo dominada por *Gammaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* y bacterias sulfato-reductoras, pero en la incubación dominó el grupo *Cytophaga-Flavobacteria*. En octubre, los cambios en la composición involucraron un aumento en el porcentaje de *Cytophaga-Flavobacteria* y *Alphaproteobacteria*, así como la disminución de *Gammaproteobacteria*. En noviembre, la principal diferencia en la composición entre muestras de la columna y de las incubaciones fue, que en éstas últimas, se observó la dominancia de *Cytophaga-Flavobacteria*. De forma similar, en el segundo experimento de noviembre, la principal diferencia fue la dominancia de *Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*, en comparación con la columna de agua.

En septiembre de 2008 en septiembre, en las incubaciones realizadas en el hipolimnion (Figura 12c), se observó una disminución en el porcentaje acumulado así como la desaparición de *Gammaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* y bacterias sulfato-reductoras. En octubre, la principal diferencia fue la dominancia de *Alphaproteobacteria*; en noviembre existió una disminución importante en el porcentaje acumulado y los porcentajes de los grupos bacterianos encontrados, así como

la desaparición de *Alphaproteobacteria*. En diciembre, en la columna de agua dominó *Planctomycetes* y en las incubaciones, *Gammaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria*.

Finalmente, en las incubaciones de agosto de 2009 no apareció el grupo *Planctomycetes*, y en septiembre se observó un decremento en el porcentaje acumulado así como en los porcentajes de *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Verrucomicrobia*. En octubre, además del aumento del porcentaje acumulado destacó la dominancia de *Planctomycetes*. En noviembre se observó nuevamente un aumento en el porcentaje acumulado de bacterias híbridadas y la composición de las mismas estuvo dominada por *Betaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* y *Alphaproteobacteria*. Por último, en el segundo experimento de noviembre no se registró hibridación en las muestras de la columna de agua, mientras en las incubaciones dominó el grupo *Betaproteobacteria*.

En la figura 13 se observa la composición de las diferentes muestras en incubaciones durante la fase de mezcla del lago. En enero de 2009 la columna de agua en la zona eufótica estuvo dominada por *Cytophaga-Flavobacteria*, pero la composición posterior a la incubación mostró crecimiento de *Alphaproteobacteria* y de bacterias sulfato-reductoras. En la zona afótica se observó a *Verrucomicrobia* como grupo dominante, pero al término de la incubación, *Alphaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, y *Betaproteobacteria* dominaron la composición. En enero de 2010, se observaron pocas bacterias híbridadas tanto en la columna de agua como en las incubaciones de la zona eufótica. En la incubación de la zona afótica de ese mismo año se observó el desarrollo de *Gammaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, y *Alphaproteobacteria*.

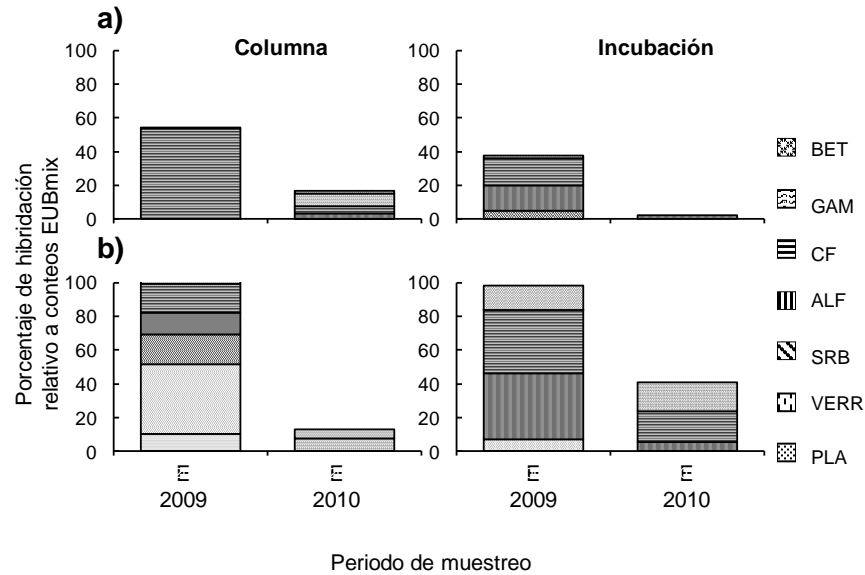


Figura 13 Contribución relativa de cada uno de los grupos bacterianos determinados con la técnica CARD-FISH, en la columna de agua y en las incubaciones en las diferentes capas: a) Zona eufótica; b) Zona afótica; BET, *Betaproteobacteria*; GAM, *Gammaproteobacteria*; CF, *Cytophaga-Flavobacteria*; ALF, *Alphaproteobacteria*; SRB, bacterias sulfato-reductoras; VERR, *Verrucomicrobia*; PLA, *Planctomycetes*

## Flagelados

La tendencia en la densidad de flagelados totales (autotróficos más heterotróficos) se muestra en la Figura 14. La máxima densidad se registró en marzo ( $3.86 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup>), después hubo una disminución que alcanzó el mínimo en junio ( $9.62 \times 10^2$  cél. mL<sup>-1</sup>). Un segundo máximo se observó en agosto ( $3.57 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup>) y un tercer máximo en diciembre ( $3.71 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup>), finalmente en enero de 2010 se observó la disminución de la densidad a números similares a los de enero de 2009.

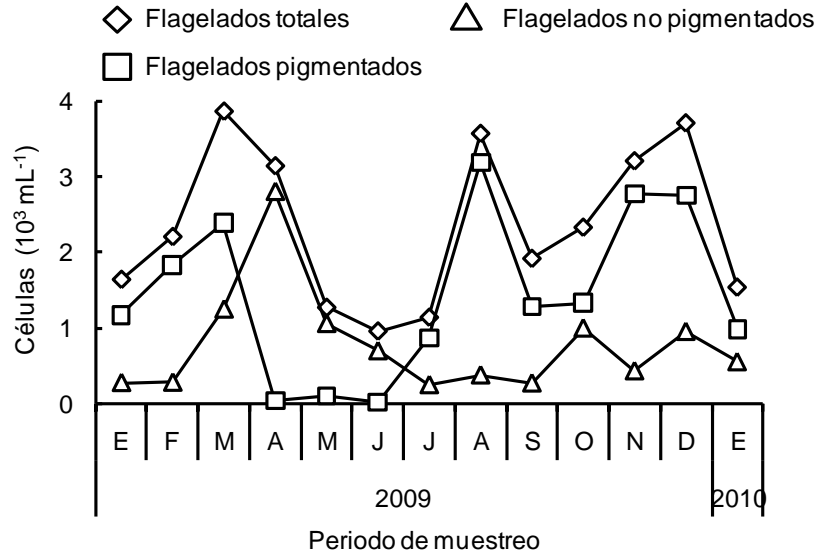


Figura 14 Tendencia en el promedio de densidades de flagelados en la columna de agua en el ciclo anual 2009

La separación por grupos en los flagelados se basó en la presencia/ausencia de pigmentos fotosintéticos. Los flagelados pigmentados presentaron tres máximos de densidad, el primero en marzo ( $2.39 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup>), el segundo en agosto ( $3.19 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup>) y el tercero en noviembre-diciembre ( $2.78 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup>), de tal forma que coincidieron con los máximos del total de flagelados presentes en la columna de agua. Los flagelados no pigmentados tuvieron un máximo durante el ciclo anual, en abril ( $2.8 \times 10^3$  cél. mL<sup>-1</sup>), al comienzo de la etapa de estratificación. Posteriormente, las densidades disminuyeron conforme avanzó la estratificación, y hacia el final de la misma se observaron fluctuaciones en las densidades conforme se acercó la fase de mezcla.

La variabilidad de la biomasa total de los flagelados se observa en la Figura 15. En el ciclo anual se registró un máximo en el mes de abril, posteriormente hubo una disminución de la biomasa total al establecerse la estratificación. El mínimo de biomasa ocurrió en julio y a partir de este mes hubo fluctuaciones en el promedio de la biomasa total. Los flagelados pigmentados fueron importantes en el aporte de biomasa en febrero, agosto y noviembre, cuando superaron a los flagelados no pigmentados.



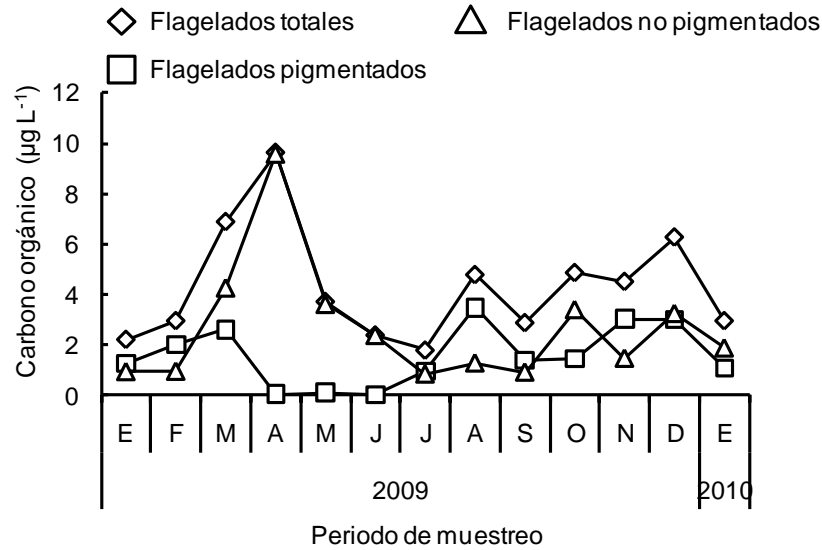


Figura 15 Tendencia en la biomasa de flagelados en el ciclo anual 2009

En septiembre de 2009 (Figura 16) en la columna de agua, no se observaron flagelados en las profundidades escogidas, éstos normalmente se localizaron preferentemente en la zona eufótica del lago. En contraparte, en las incubaciones se observó el crecimiento de los flagelados (flagelados no pigmentados) en las diferentes profundidades. En las muestras incubadas en el MS en octubre, se observó una disminución del total de flagelados presentes. En noviembre se observó un incremento en los flagelados totales, en las muestras incubadas en el hipolimnion. En el segundo muestreo de noviembre, se observaron en las muestras del MS de la columna de agua mientras que en las incubaciones no aparecieron. En las incubaciones de la BM, los flagelados fueron más abundantes que en la columna de agua, y en el hipolimnion se registraron densidades muy bajas de flagelados en las incubaciones mientras que no se observaron en la columna de agua.

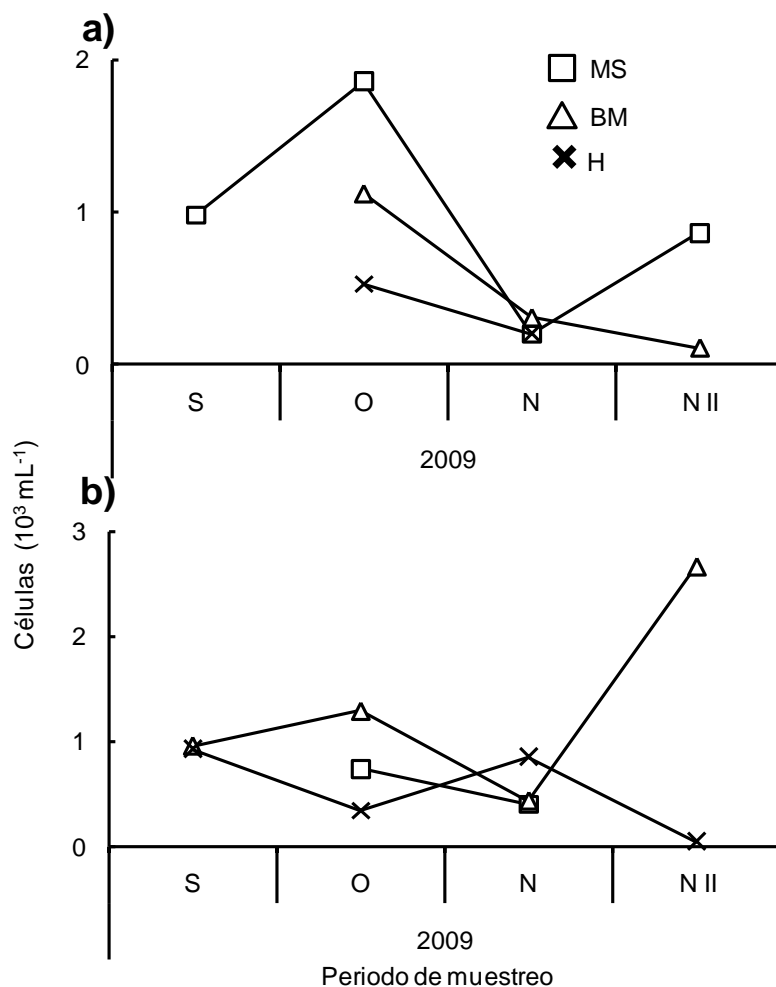


Figura 16 Comportamiento de la densidad total de flagelados en la columna de agua (a) y en las incubaciones (b) en las diferentes capas; MS, metalimnion superior; BM, base del metalimnion; H, hipolimnion

En las incubaciones realizadas en la fase de mezcla de lago (enero de 2009, Figura 17) se observó un incremento en la densidad de flagelados en la zona eufótica. En el experimento de enero de 2010 hubo un incremento en las densidades de flagelados de las muestras incubadas tanto en la zona eufótica como en la zona afótica. Las diferencias significativas entre la columna de agua y las incubaciones (Tabla 2), se hallaron en las incubaciones de enero de 2009 en las zonas eufótica y afótica de la columna de agua. En ese mismo año, durante el periodo de estratificación en las incubaciones en el MS, se encontraron diferencias significativas en octubre. En cambio, en las incubaciones de la BM las diferencias significativas aparecieron en octubre y noviembre y en el hipolimnion se

encontraron diferencias en septiembre. En el 2010, sólo en las incubaciones de la zona afótica se encontraron diferencias significativas en las densidades de flagelados, entre las muestras de la columna de agua y las incubaciones.

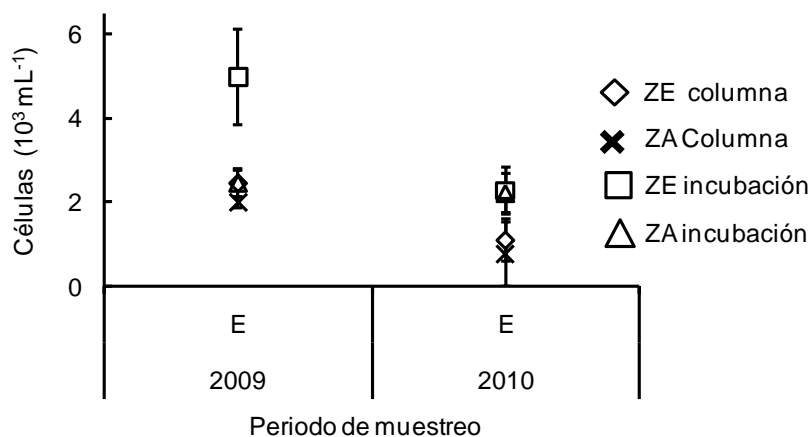


Figura 17 Comportamiento del total de flagelados en la columna de agua y en las incubaciones en enero; ZE, zona eufótica; ZA, zona afótica

### Ciliados

La variación de la densidad de ciliados en el ciclo anual se observa en la Figura 18. Durante la fase de mezcla de lago, se observaron las menores densidades de ciliados en la columna de agua. Posteriormente, a partir del establecimiento de la fase de estratificación, se observó que las densidades de ciliados aumentaron alcanzando un máximo en octubre de los dos años de muestreo, y a partir de entonces las densidades disminuyeron.

La variación de la biomasa de los ciliados fue similar a la de la densidad (Figura 19). El máximo de biomasa se alcanzó en octubre de ambos años y los mínimos se presentaron durante la fase de mezcla en marzo.

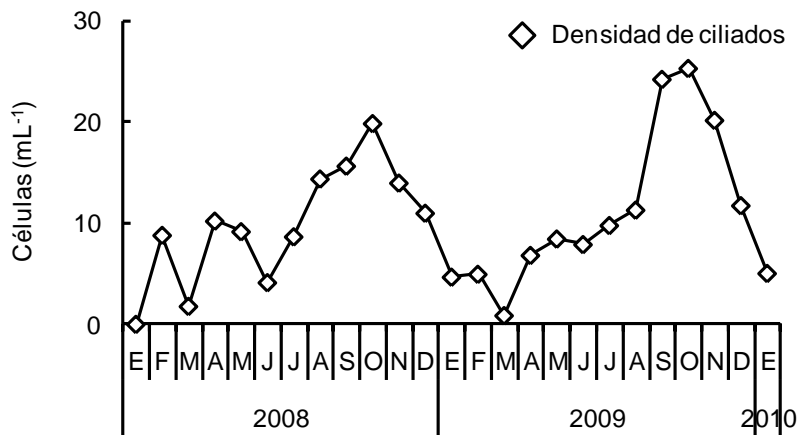


Figura 18 Densidad total de ciliados en la columna de agua

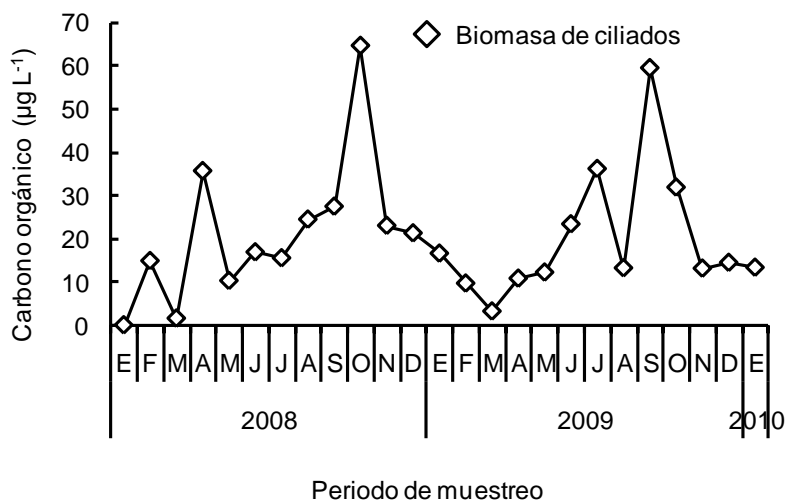


Figura 19 Variación del promedio de biomasa de los ciliados en la columna de agua

La composición taxonómica de los ciliados se presenta en la Figura 20. Durante la fase de mezcla de 2008 predominaron organismos pertenecientes a Stichotrichia (*Halteria* sp.) y Peritrichia (*Vorticella* spp. y *Pelagovorticella* sp.) asociados a diatomeas y cianobacterias filamentosas. Posteriormente, una vez establecida la estratificación del lago, organismos pertenecientes a Scuticociliatia se hicieron presentes en las partes profundas del lago (*Cristigera* sp. e *Isocyclidium* sp.) y en el metalimnion (*Cyclidium* sp. e *Isocyclidium* sp.). Ya en la estratificación bien establecida, se hizo manifiesto el dominio numérico de los escuticociliados en la columna de agua, además de la aparición de miembros de Hypotrichia (*Euplotopsis* sp. y otro euplotido no determinado), Armophorida

(*Caenomorpha* sp.), Heterotrichida (*Spirostomum* sp.) y Haptoria (*Phialina* sp., *Uroleptus* sp. y *Litonotus* sp.). Hacia el final de la estratificación nuevamente aparecieron ciliados peritricos en la capa de mezcla.

En 2009, durante la fase de mezcla, dominaron los peritricos y los ciliados esticotricos, los cuales estuvieron presentes a lo largo de la etapa de estratificación, aunque en bajas densidades. Durante la estratificación, dominaron los escuticociliados hasta el comienzo de la fase de mezcla del lago.

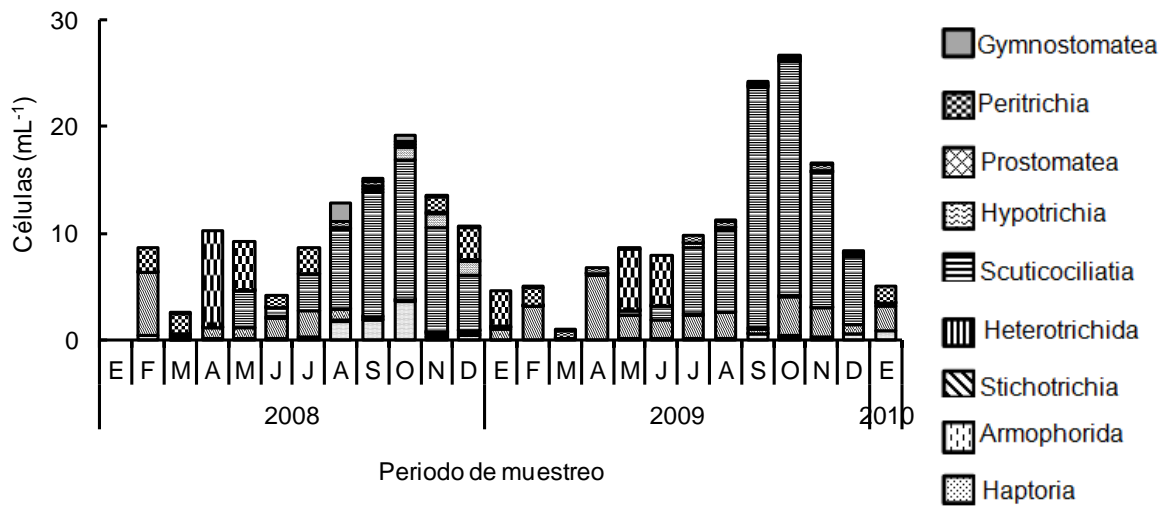


Figura 20 Composición taxonómica de los ciliados en la columna de agua

En el caso de la biomasa de los ciliados (Figura 21), en 2008 durante la fase de mezcla y comienzo de la estratificación dominaron los peritricos y esticotricos. Durante la estratificación bien establecida y tardía dominaron los ciliados haptóridos, un heterotrico y los hipotricos, al igual que en la transición de la estratificación y la fase de mezcla.

En 2009 desde la fase de mezcla hasta la estratificación temprana, dominaron los ciliados peritricos y los esticotricos, el heterotrico *Spirostomum* sp. particularmente en julio, septiembre y octubre, ya en la estratificación bien establecida. En ese año los haptóridos sólo tuvieron una contribución menor a la biomasa total de los ciliados, particularmente en la estratificación tardía y en los comienzos de la fase de mezcla.

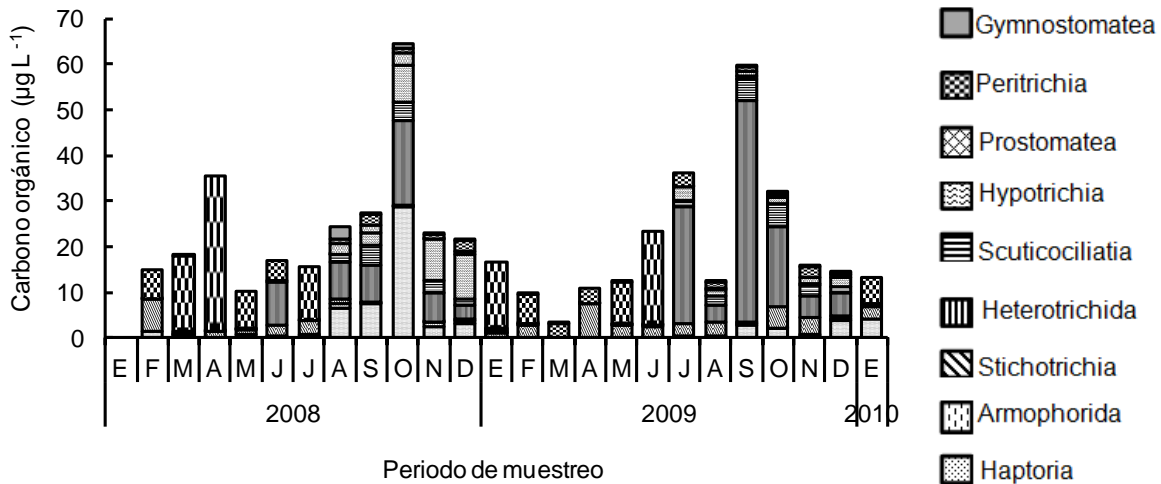


Figura 21 Aporte de biomasa de los ciliados, por grupo taxonómico, en la columna de agua

La densidad de los ciliados en cada una de las respectivas capas de la columna de agua se encuentra en la Figura 22. Se aprecia que en la capa de mezcla, la densidad de ciliados fue baja en comparación con las capas más profundas del lago, y que estuvo dominada por esticotricos y en menor medida, por peritricos en la fase de mezcla y principios de la estratificación. Posteriormente, en la estratificación bien establecida y tardía dominaron los haptóridos y particularmente en 2008 se observaron escuticociliados en esta capa, además de los gimnostomátidos hacia la transición a la fase de mezcla. Sin embargo en el ciclo anual 2009, dominaron los esticotricos y los gimnostomátidos, tanto en la fase de mezcla como en la estratificación establecida y tardía. En el metalimnion superior, durante 2008, se observó una clara dominancia de los ciliados peritricos en la etapa inicial de la estratificación. Posteriormente dominaron los escuticociliados en la estratificación establecida y tardía, pero en la transición a la fase de mezcla dominaron los ciliados gimnostomátidos. En el ciclo anual 2009 fue clara la dominancia de esticotricos en esta capa a lo largo del año, seguida de gimnostomátidos y en menor medida por los escuticociliados.

En la base del metalimnion, en el ciclo anual 2008, a comienzos de la estratificación fue posible observar peritricos y esticotricos, reemplazados a partir de agosto por escuticociliados, que dominaron prácticamente durante el resto del ciclo anual, con excepción de diciembre, cuando se observaron hipotricos en altos números. En el ciclo

anual 2009, durante la fase de mezcla y el comienzo de la etapa de estratificación, dominaron los esticotricos y gimnostomátidos; sin embargo, a partir de septiembre el dominio numérico de los escuticociliados se hizo evidente, y persistió hasta enero cuando se observaron nuevamente ciliados esticotricos en esta profundidad. En el hipolimnion, en el comienzo de la estratificación se encontraron ciliados peritricos, pero a partir del establecimiento de las condiciones anóxicas el dominio de los escuticociliados se hizo evidente, además de algunos haptóridos que estuvieron presentes en octubre de 2008. En el ciclo 2009 a comienzos de la estratificación, los esticotricos dominaron esta capa, pero posteriormente los escuticociliados reemplazaron a los esticotricos durante el resto del ciclo anual.

El aporte de biomasa de ciliados, diferenciado por grupo taxonómico, en las diferentes capas de la columna de agua se muestra en la Figura 23. En la capa de mezcla en 2008, dominaron los peritricos y los esticotricos durante la mezcla y comienzo de la estratificación, pero en la estratificación bien establecida dominaron los haptóridos y los gimnostomátidos. En 2009 nuevamente dominaron los peritricos durante la mezcla e inicio de la estratificación, pero en la estratificación bien establecida en julio dominaron los hipotricos, esticotricos y un heterotrico. En la transición a la fase de mezcla nuevamente se pudo observar dominancia de los haptóridos en el aporte de biomasa. En 2008, en el MS dominaron los peritricos en el inicio de la estratificación, pero en la estratificación establecida y tardía dominaron los esticotricos, los hipotricos, un heterotrico y en menor medida, los haptóridos. En 2009 la biomasa estuvo dominada por peritricos y esticotricos al comienzo de la estratificación, pero en el resto del ciclo anual prácticamente dominaron los esticotricos.

En la BM, al comienzo de la estratificación, dominaron los peritricos y haptóridos, ya en la estratificación bien establecida y tardía, la biomasa estuvo compuesta por esticotricos, escuticociliados, haptóridos, un heterotrico e hipotricos; estos últimos dominaron la biomasa en diciembre de 2008. En el ciclo anual 2009, en el comienzo de la estratificación, dominaron los peritricos y los esticotricos, durante la estratificación bien establecida y tardía la biomasa estuvo dominada por escuticociliados, un heterotrico y en menor medida, por haptóridos. En diciembre los hipotricos dominaron la biomasa de esta

capa. En el hipolimnion, durante el comienzo de la estratificación de 2008, dominaron la biomasa los peritricos y esticotricos, en octubre prácticamente dominaron un heterotrico y los haptóridos. En el ciclo anual 2009, la biomasa estuvo dominada por el ciliado heterotrico, con aportes menores de los escuticociliados, y en la transición a la mezcla, de los haptóridos.



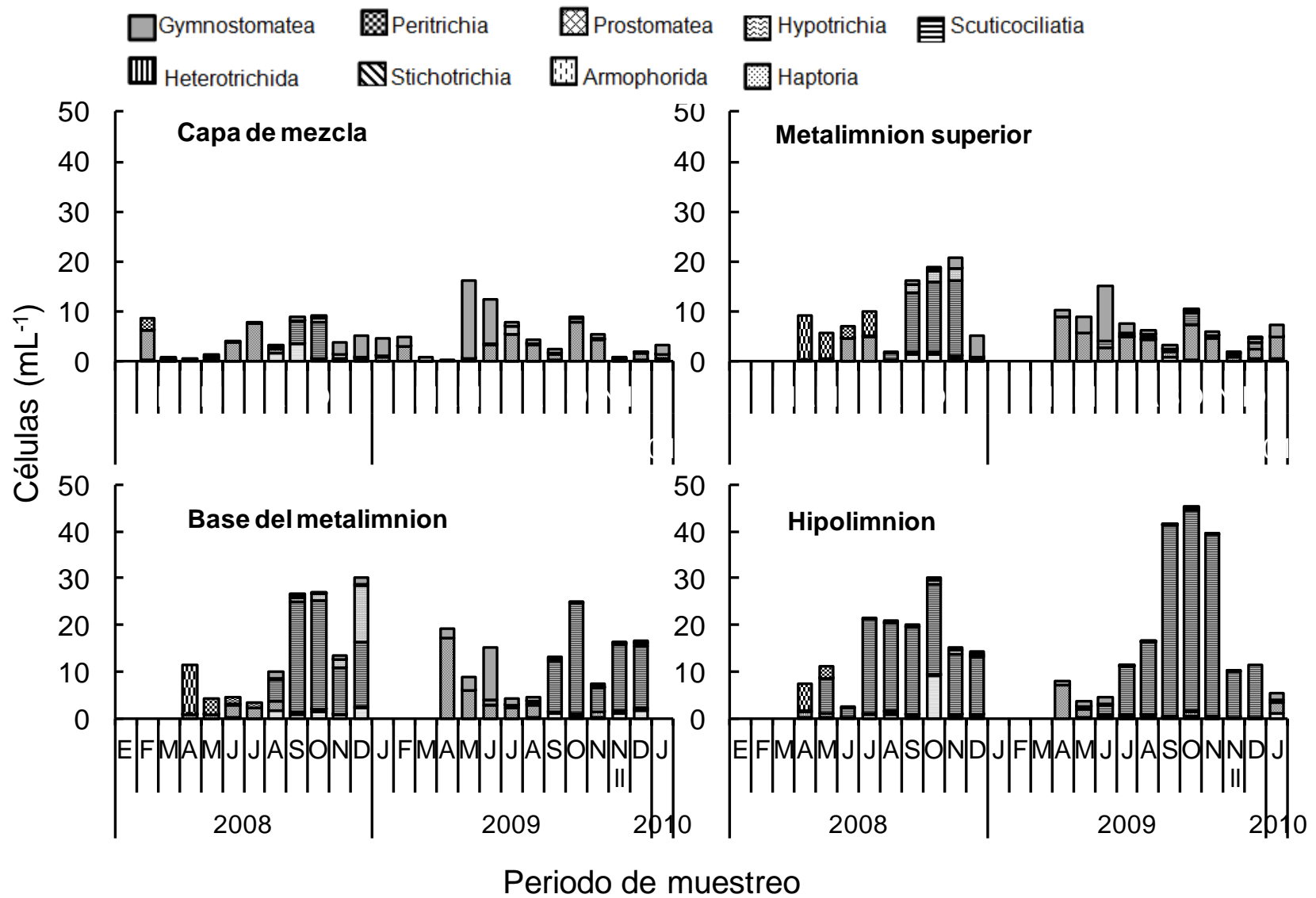


Figura 22 Composición taxonómica de los ciliados en las diferentes capas

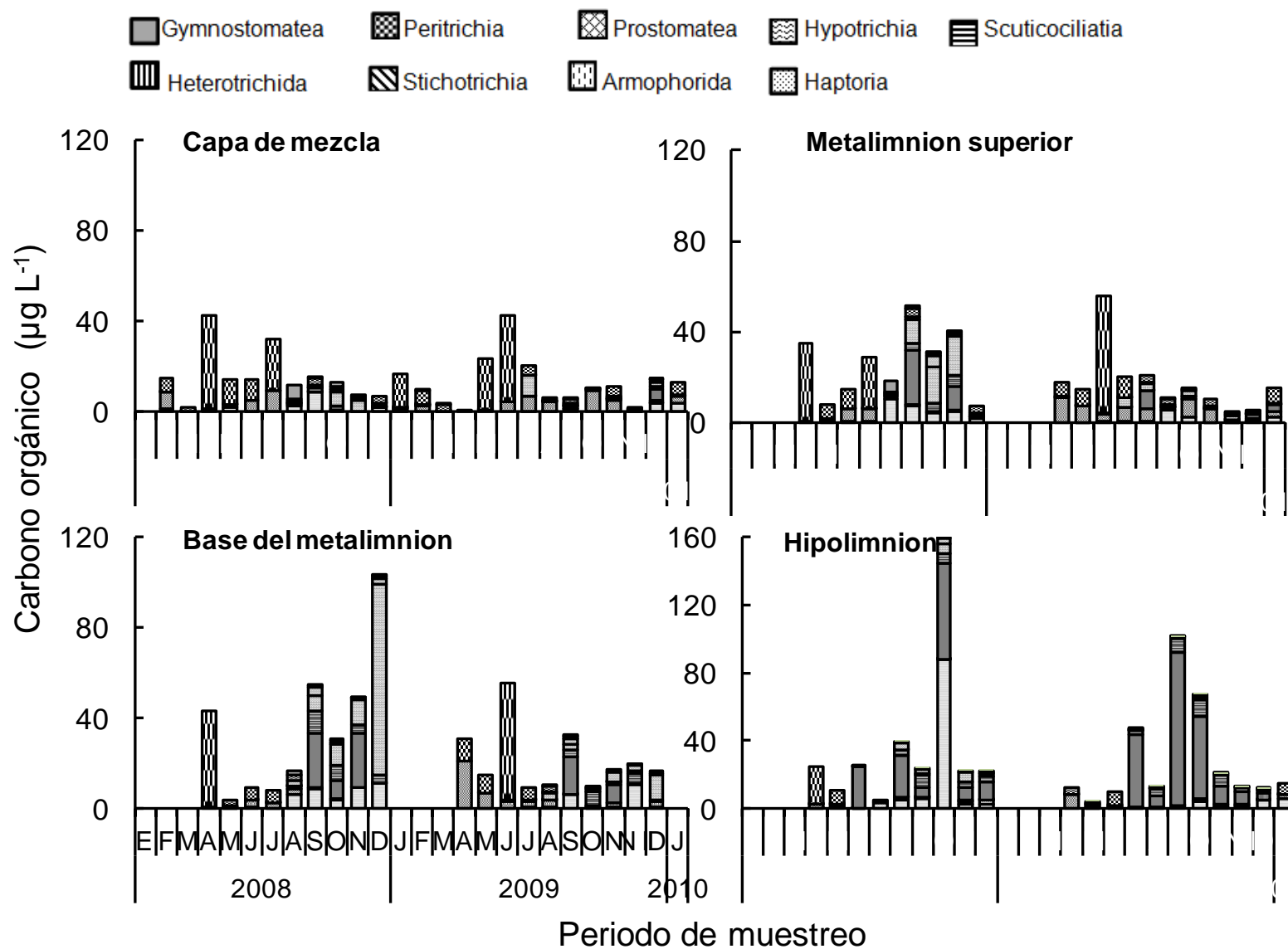


Figura 23 Aporte de biomasa por grupo taxonómico en las diferentes capas

La comparación en las tendencias de la densidad de ciliados en las diferentes capas de la columna de agua y en los experimentos de incubación se muestra en la Figura 24. En 2008 en las muestras del metalimnion superior, en las incubaciones aumentó la densidad, comparada con la de la columna de agua, sobre todo en las incubaciones de noviembre. En las muestras de la base del metalimnion, la densidad en la columna de agua y en las incubaciones fue prácticamente la misma con excepción de las incubaciones de septiembre en las que se observó una disminución de la densidad en las incubaciones. En las muestras del hipolimnion en todas las incubaciones se observó una disminución de la densidad hacia el final de los experimentos.

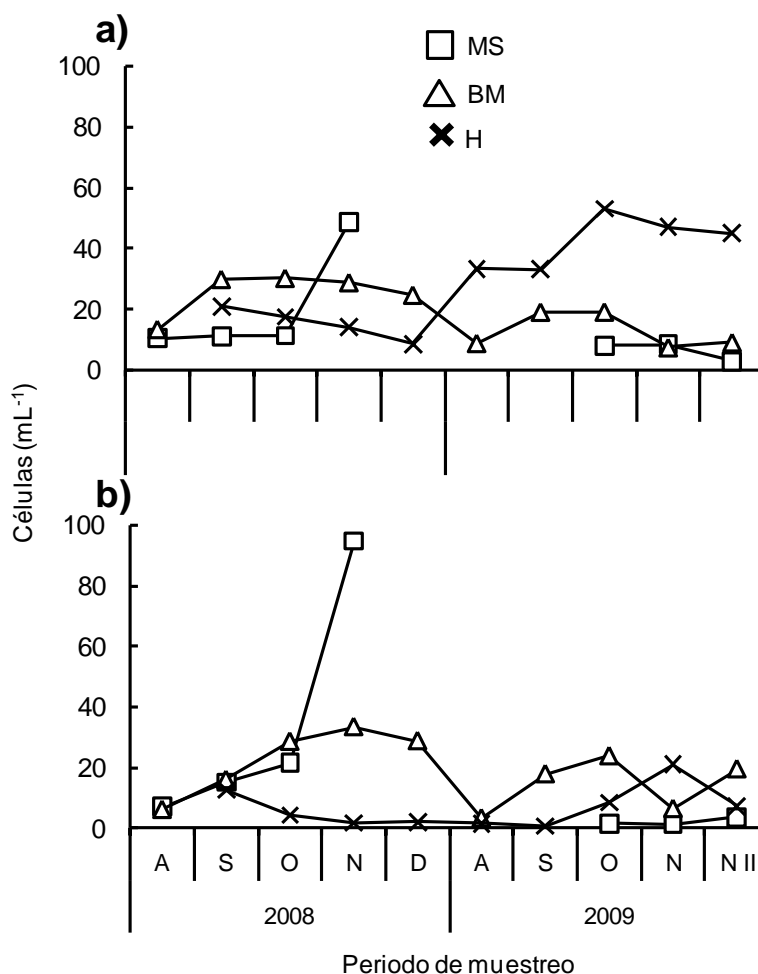


Figura 24 Tendencias en la densidad de ciliados en la columna de agua (a) y en las incubaciones (b) en las diferentes capas; MS, metalimnion superior; BM, base del metalimnion; H, hipolimnion

Las incubaciones de agosto y septiembre de 2009 en el MS se perdieron. En el resto de los experimentos se observó una disminución en la densidad, comparada con la de la columna de agua. En las muestras de la BM, de agosto a noviembre, las densidades en la columna de agua y en las incubaciones fueron prácticamente las mismas; en cambio, en el segundo experimento de noviembre, aumentó la densidad de ciliados. En todos los experimentos del hipolimnion disminuyó la densidad de organismos al final de los experimentos.

En las incubaciones realizadas en la fase de mezcla en enero de 2009 (Figura 25), se observó igualmente una disminución en densidad de ciliados. En los experimentos de enero de 2010 ocurrió algo similar. Hubo diferencias significativas entre muestras de la columna de agua y de las incubaciones (Tabla2), en octubre de 2008 con respecto a *Cyclidium* sp. y en noviembre con respecto a *Cyclidium* sp. y a la densidad total de ciliados. En las incubaciones de diciembre en la BM se observó el crecimiento de un ciliado no determinado taxonómicamente. Durante las incubaciones del año 2009 se encontraron diferencias significativas en septiembre y octubre en el hipolimnion.

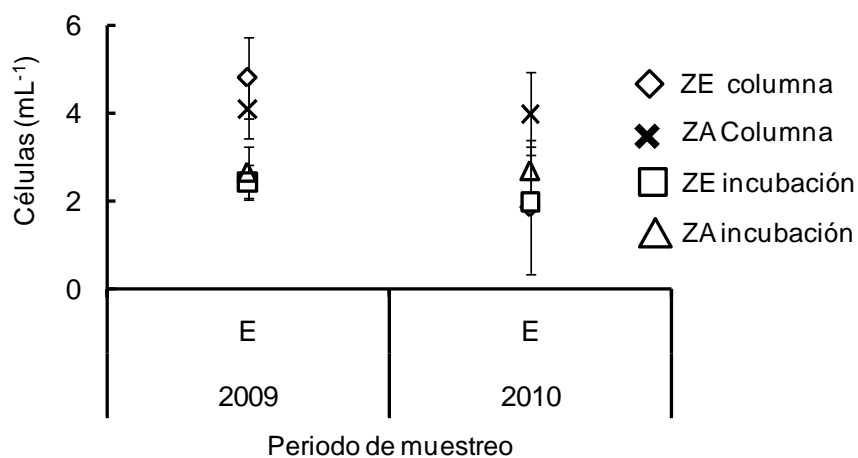


Figura 25 Variación de la densidad de ciliados en la columna de agua y en las incubaciones en los meses de enero; ZE, zona eufótica; ZA, zona afótica

Con respecto a la determinación taxonómica de los ciliados, se lograron mejores tinciones de protargol en muestras provenientes de la zona anóxica de la columna. Esto

permitió realizar mejores observaciones en los escuticociliados presentes en el hipolimnion y se pudo establecer la presencia de escuticociliados del género *Cristigera* (Figura 26) en el lago Alchichica, antes determinado como *Trimyema* sp. En las tinciones con DAPI para realizar el conteo de los ciliados en las muestras, fue posible diferenciar a estos dos escuticociliados por la posición y tamaño del macronúcleo y del micronúcleo. Adicionalmente, mientras *Cristigera* sp. se encontró principalmente en el hipolimnion y en condiciones anóxicas, *Cyclidium* sp. se encontró en la BM en condiciones subóxicas.

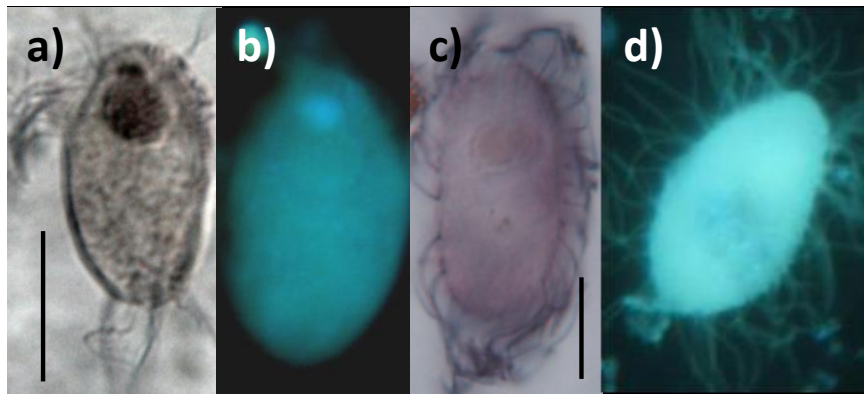


Figura 26 a) *Cristigera* sp. en tinción con protargol, b) *Cristigera* sp. en tinción con DAPI, c) *Cyclidium* sp. en tinción con protargol, d) *Cyclidium* sp. en tinción con DAPI

Adicionalmente, se logró la determinación de *Euplotopsis* sp. (Borror y Hill, 1995), anteriormente determinado como *Euplotes* cf. *daidaleos*, debido a la presencia de algas ingeridas que parecen tener una asociación simbiótica con este ciliado (Figura 27). Teniendo en cuenta la posición y el número de los cirros frontoventrales, es posible ubicar al ciliado dentro del género *Euplotopsis*. Morfológicamente el ciliado coincide con la descripción de *Euplotopsis affinis* (Dujardin 1842; Borror y Hill 1995), pero para el género *Euplotopsis* no se han reportado endosimbiontes algales ni procariontes. Por esta razón, en este trabajo se presenta sólo como *Euplotopsis* sp. ya que se ha observado a este ciliado en una posible asociación simbiótica con diatomeas. Por lo que se debe recabar mayor información sobre esta posible asociación simbiótica, así como información con técnicas de biología molecular. Lo que permitirá lograr una mejor determinación taxonómica y descripción de la ecología de este ciliado.

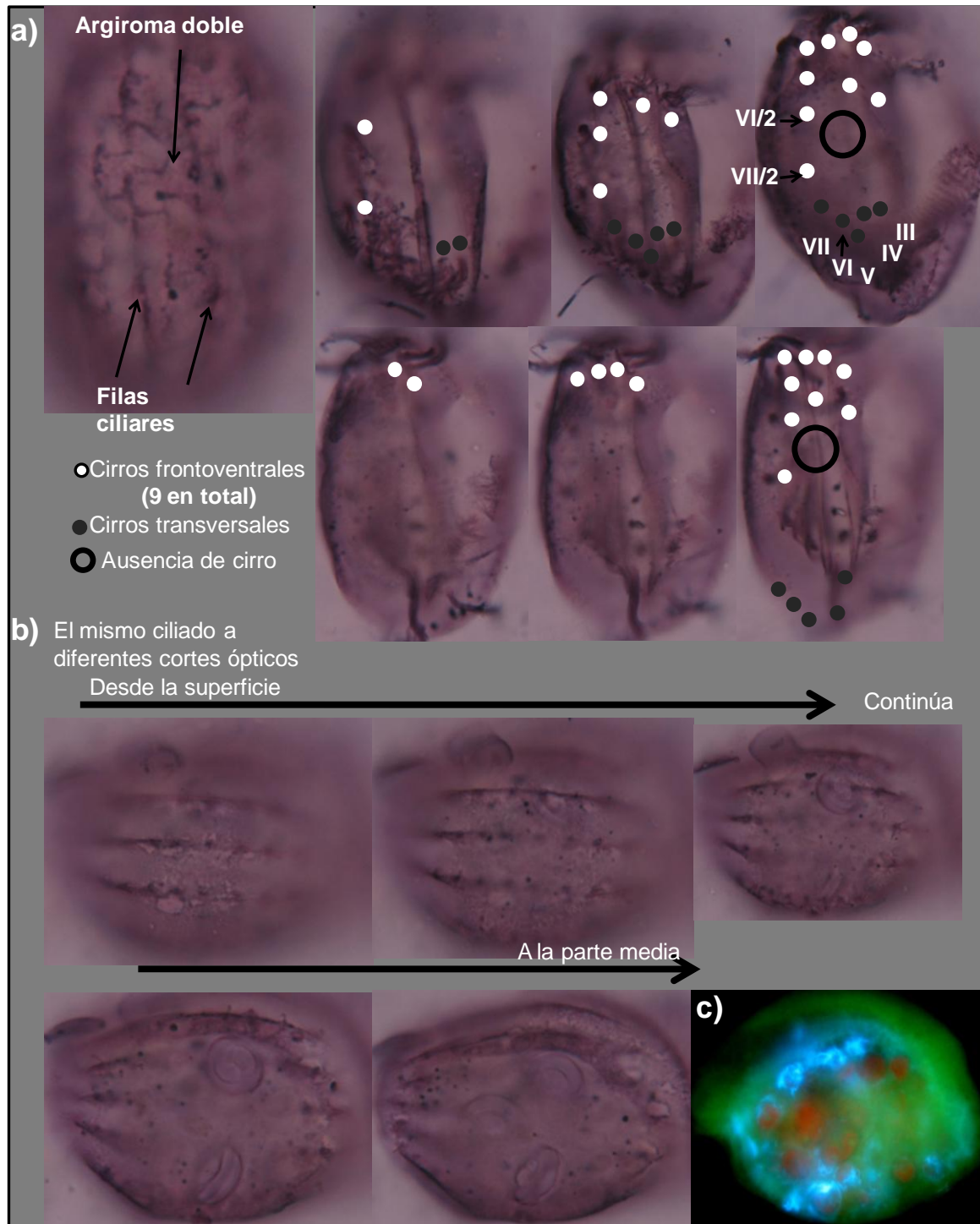


Figura 27 a) *Euplotopsis* sp. en tinción con protargol, se muestra el argioma y una serie fotos en diferentes cortes ópticos que permiten apreciar los cirros, enumerados con números romanos e indicando con flechas los que son importantes en la determinación taxonómica; b) *Euplotopsis* sp. en tinción con protargol mostrado en diferentes cortes ópticos que permiten apreciar diatomeas ingeridas, c) *Euplotopsis* sp. en tinción con DAPI que permite observar a las diatomeas ingeridas

### Contenido de vacuolas

En el caso de los flagelados, el promedio de células de APP ingeridas se observa en la Figura 28. En los flagelados pigmentados prácticamente no se observaron células ingeridas, con excepción de abril, julio, octubre y noviembre. Los flagelados no pigmentados mostraron poca ingestión de APP durante la fase de mezcla y estratificación temprana. El máximo de células de APP ingeridas ocurrió en junio y posteriormente casi no se observó APP ingerido por estos organismos.

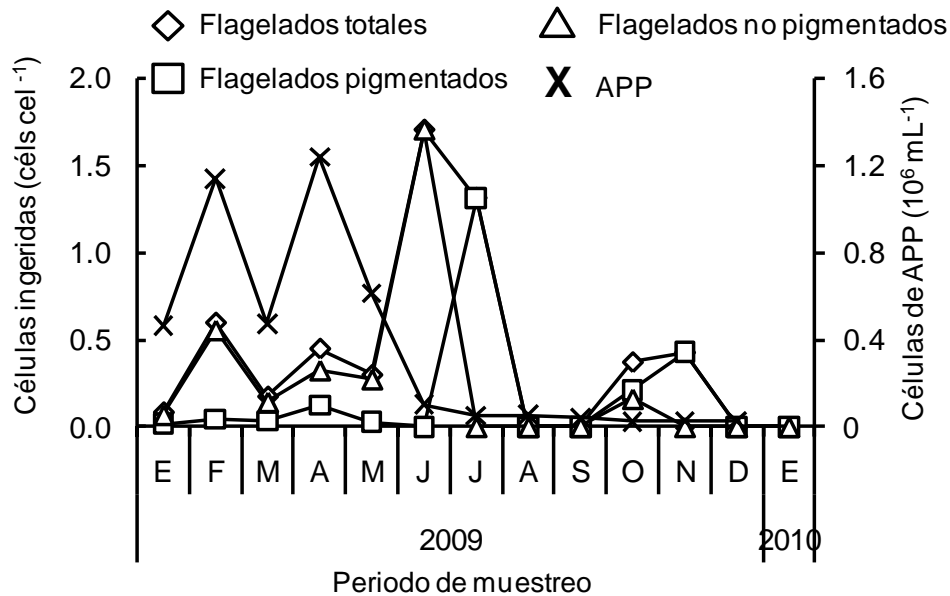


Figura 28 Estimación del promedio de células de APP ingeridas por los flagelados y promedio de APP disponible en la columna de agua

En el caso de los ciliados, se observó que los organismos que más consumieron APP fueron los peritricos (*Pelagovorticella* sp., y *Vorticella* spp.) y el esticotrico *Halteria* sp. (Figura 29), principalmente durante la fase de mezcla y en la fase de estratificación temprana. Posteriormente, los hipotricos fueron los que consumieron las células de APP durante la estratificación bien establecida. En diciembre se observó que *Cristigera* sp. consumió células de APP en la parte subóxica-anóxica de la columna de agua y finalmente en enero, ya en la fase de mezcla, nuevamente *Pelagovorticella* sp. fue el principal organismo que consumió APP.

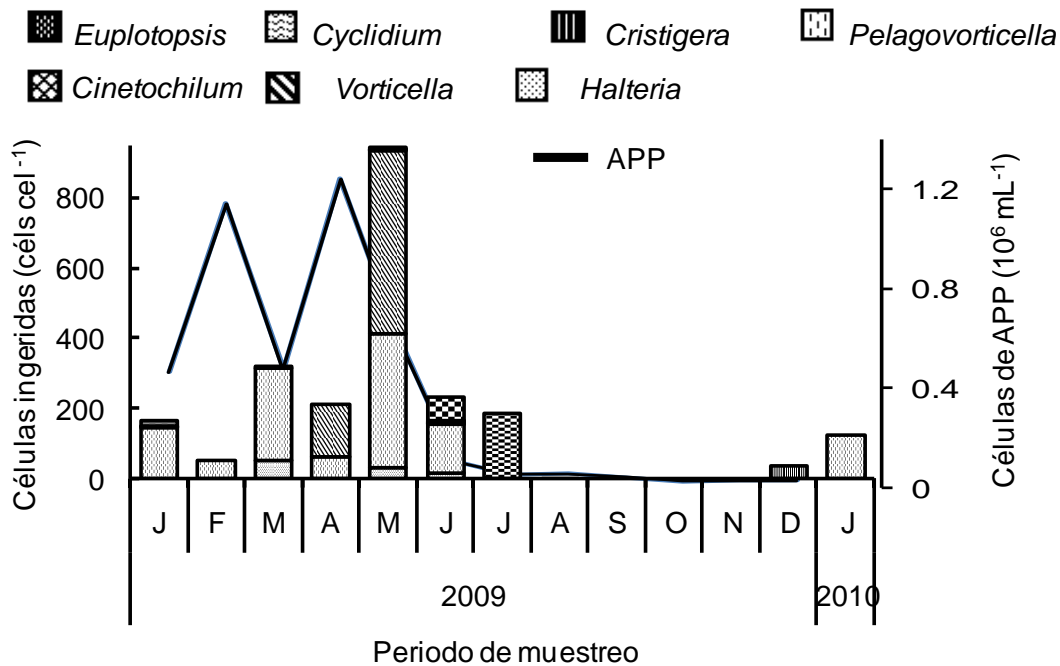


Figura 29 Estimación del promedio de células de APP ingeridas por los ciliados

Los resultados de la selectividad en ingestión de presas pertenecientes al HPP, medidos a través del índice de selectividad de Chesson, se muestran en la Figura 30 y corresponden a flagelados en los meses de mezcla. Sólo los flagelados no pigmentados mostraron células hibridadas por medio de la técnica CARD-FISH. En diciembre de 2008 en la zona eufótica se observaron organismos *Gammaproteobacteria* en el interior de los flagelados de la columna de agua, pero no en los de las bolsas de diálisis. Lo mismo sucedió con las muestras de la zona afótica en el mismo mes, y en las muestras tomadas cerca del fondo del lago, además de *Gammaproteobacteria* se detectaron *Planctomycetes* al interior de los organismos de la columna de agua, pero en las incubaciones no se encontraron flagelados.

En enero de 2009 se hicieron dos muestreos: en el primero sólo se muestreó la columna de agua y en el segundo, se realizaron además experimentos de incubación. En el primer muestreo de enero, en las muestras de la zona eufótica sólo *Betaproteobacteria* fue seleccionado positivamente por los flagelados; en la zona afótica sólo organismos del grupo *Cytophaga-Flavobacteria* fueron seleccionados como alimento por los flagelados, mientras que cerca del fondo, bacterias del grupo *Planctomycetes* fueron las ingeridas con mayor



frecuencia. A partir de este muestreo ya no se analizaron muestras provenientes del fondo para observar la presencia de bacteria ingeridas, debido a la baja densidad de flagelados a esa profundidad.

En el segundo muestreo de enero, no se observaron flagelados con bacterias hibridadas en las muestras de la columna de agua en la zona fótica, pero en las incubaciones se observaron *Planctomycetes* y *Gammaproteobacteria* al interior de los flagelados. En las muestras de la zona afótica de la columna de agua sólo se observaron a bacterias sulfato-reductoras al interior de los flagelados, mientras que en las muestras de las incubaciones organismos de las *Gammaproteobacteria* fueron observados en los flagelados.

En febrero en las muestras provenientes de la zona fótica no se observaron flagelados con bacterias hibridadas en su interior. En marzo fue posible detectar organismos pertenecientes a *Alphaproteobacteria* como seleccionados positivamente por los flagelados, además de *Gammaproteobacteria*, que se ubicaron apenas sobre el límite del umbral de selectividad. En diciembre, en la siguiente fase de mezcla, no aparecieron flagelados con células hibridadas en su interior. Lo mismo sucedió en enero de 2010 en las muestras de la columna de agua, sin embargo, en las incubaciones realizadas en ese mes, se observaron organismos de *Gammaproteobacteria* al interior de los flagelados.

En las muestras de la zona afótica, en febrero, organismos de *Cytophaga-Flavobacteria* fueron seleccionados positivamente por los flagelados. En diciembre, al comienzo de la siguiente fase de mezcla del lago, organismos de *Verrucomicrobia* fueron positivamente seleccionados por los flagelados en esta zona de la columna de agua. En enero de 2010, en la columna de agua no se observaron flagelados con bacterias hibridadas en su interior, mientras que en las muestras de las incubaciones, los flagelados mostraron células de *Alphaproteobacteria* en su interior.

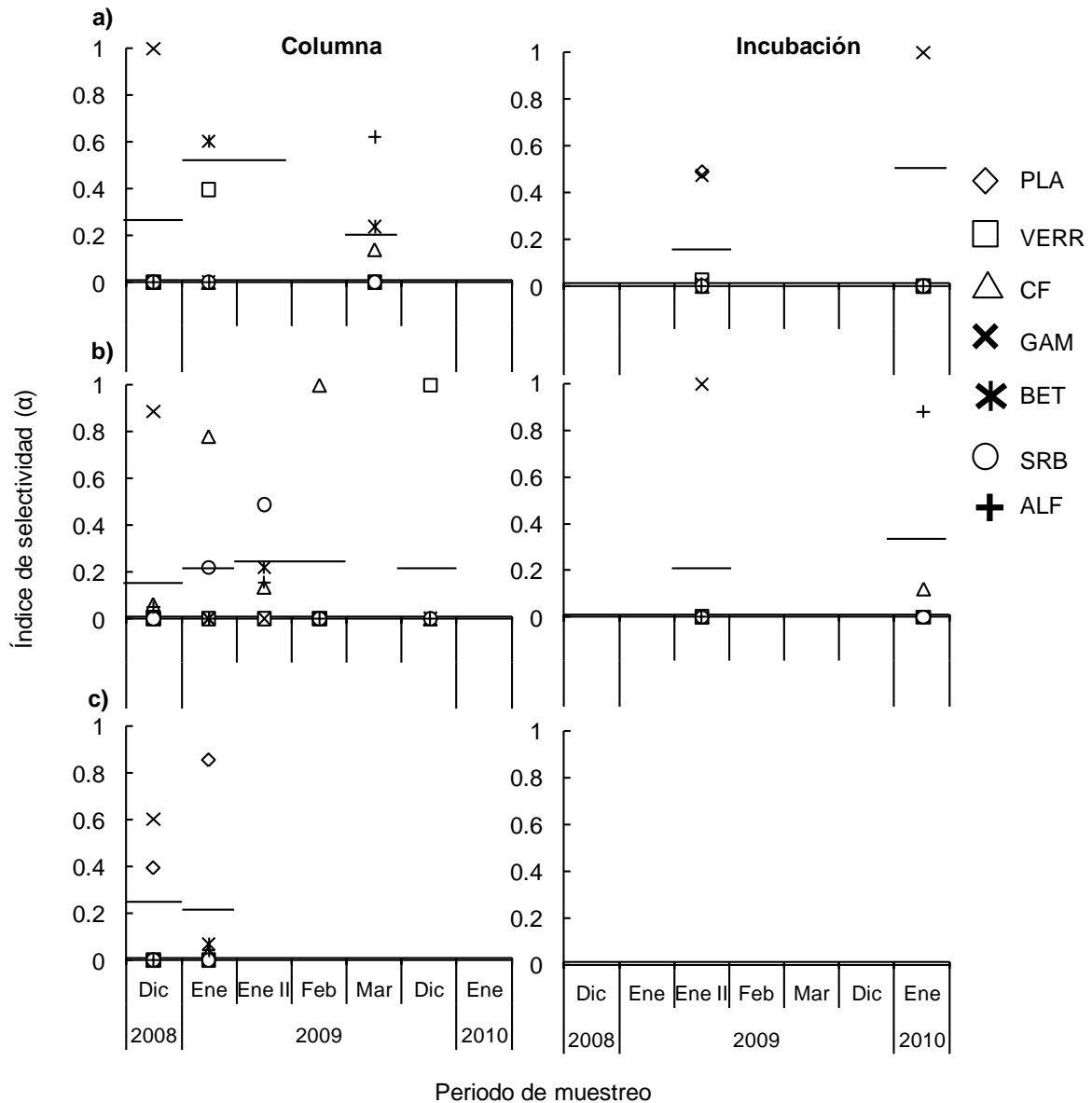


Figura 30 Índice de selectividad ( $\alpha$ ) para los flagelados no pigmentados en la columna de agua y en las incubaciones durante el periodo de mezcla, a diferentes profundidades: a) Zona eufótica, b) Zona afótica y c) Fondo del lago; líneas horizontales valores aproximados del umbral  $1/n$ ; Ene II segundo muestreo en enero de 2009 BET, *Betaproteobacteria*; GAM, *Gammaproteobacteria*; CF, *Cytophaga-Flavobacteria*; ALF, *Alphaproteobacteria*; SRB, bacterias sulfato-reductoras; VERR, *Verrucomicrobia*; PLA, *Planctomycetes*

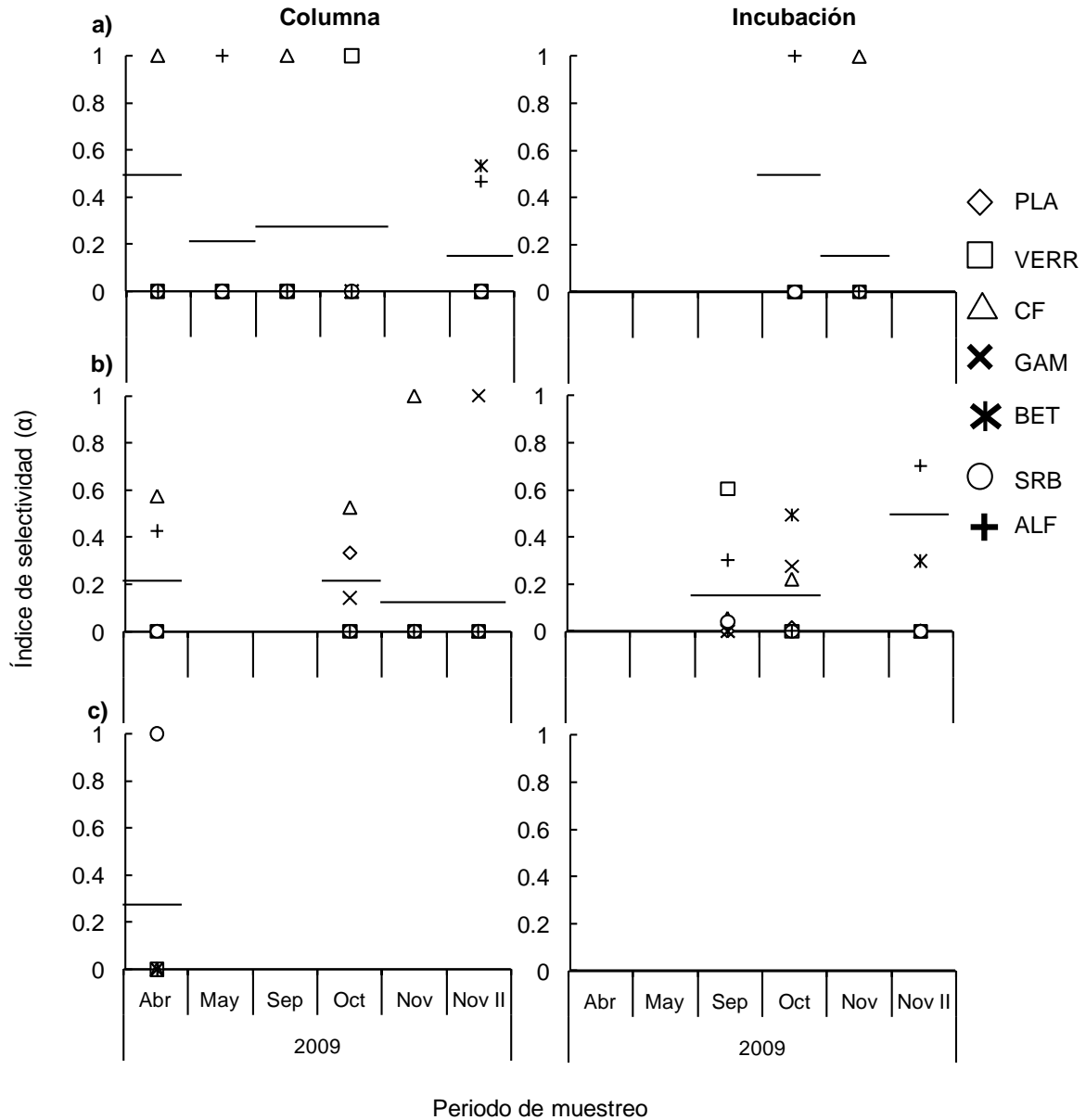


Figura 31 Índice de selectividad ( $\alpha$ ) para los flagelados no pigmentados en la columna de agua y en las incubaciones durante el periodo de estratificación, a diferentes profundidades: a) Metalimnion superior, b) Base del metalimnion y c) Hipolimnion, líneas horizontales valores aproximados del umbral  $1/n$ ; N II, segundo muestreo en noviembre; BET, *Betaproteobacteria*; GAM, *Gammaproteobacteria*; CF, *Cytophaga-Flavobacteria*; ALF, *Alphaproteobacteria*; SRB, bacterias sulfato-reductoras; VERR, *Verrucomicrobia*; PLA, *Planctomycetes*

El índice de selectividad para los flagelados, en las muestras de la fase de estratificación del lago, se muestra en la Figura 31. En las muestras de la columna de agua, en la parte superior del metalimnion, se observó a miembros de *Cytophaga-Flavobacteria* al interior de los flagelados en abril de 2009. En mayo, organismos de *Alphaproteobacteria* fueron seleccionados por los flagelados, en esta zona de la columna de agua. En la base del metalimnion, en abril se observaron organismos de *Alphaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria* al interior de los flagelados. En el hipolimnion sólo se observaron bacterias-sulfato-reductoras dentro de los flagelados.

Es importante señalar, que a partir de mayo, la densidad de flagelados en la columna de agua disminuyó y en consecuencia ya no fue posible observar células hibridadas en su interior, en las muestras de la columna de agua. Por esta razón sólo se presentan aquellos meses en los que fue posible obtener datos. Así, fue en septiembre cuando se observaron nuevamente células hibridadas al interior de los flagelados. En las muestras del MS se observaron células de *Cytophaga-Flavobacteria* al interior de los flagelados, en la columna de agua. En las muestras de la BM no aparecieron flagelados con células hibridadas en las muestras provenientes de la columna de agua, mientras que en las muestras de las incubaciones se observaron células de *Alphaproteobacteria* y de *Verrucomicrobia* al interior de los flagelados.

En octubre, las células ingeridas por los flagelados en las muestras de la columna de agua del MS pertenecieron a *Verrucomicrobia*, mientras que en los flagelados presentes en las bolsas de diálisis sólo se observaron células de *Alphaproteobacteria*. En las muestras de la BM de la columna de agua se pudieron ver células de bacterias sulfato-reductoras y *Cytophaga-Flavobacteria* ingeridas por los flagelados. En noviembre, en las muestras del MS, no se observaron flagelados con células hibridadas al interior; sin embargo, en las muestras las incubaciones, células de *Cytophaga-Flavobacteria* fueron seleccionadas por los flagelados. En las muestras de la columna de agua de la BM, células de *Cytophaga-Flavobacteria* se observaron dentro de los flagelados, mientras que en las muestras de las incubaciones no se observaron células hibridadas al interior de los flagelados.

En el segundo experimento de noviembre, en las muestras de la columna de agua del MS, células de *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* fueron visualizadas al

interior de los flagelados, pero en los flagelados de las incubaciones no se encontraron células hibridadas en su interior. En las muestras de la BM de la columna de agua sólo se observaron células de *Gammaproteobacteria* al interior de los flagelados, pero en las incubaciones aparecieron células ingeridas de *Alphaproteobacteria*.

El índice de selectividad de los ciliados se muestra en la Figura 32. En este caso, y dada la posibilidad de distinguir los géneros de ciliados, los datos se muestran por año, mes y ciliado para el cual se pudo reunir información suficiente para el cálculo del índice de selectividad. Durante 2008 en el MS, se encontró una alta presencia de *Alphaproteobacteria* en los ciliados, principalmente en *Cyclidium* sp. tanto en la columna de agua como en los experimentos. Sin embargo, en los experimentos de noviembre los altos valores del índice alfa para *Alphaproteobacteria* disminuyeron, y miembros de otros grupos como *Verrucomicrobia*, *Cytophaga-Flavobacteria* y bacterias sulfato-reductoras, pudieron ser detectados en el interior de los ciliados. Algunos de estos grupos, como *Verrucomicrobia* pueden ser considerados como ingeridos al azar, de acuerdo al criterio de interpretación del índice de selectividad, en la columna de agua en el mes de octubre, *Cytophaga-Flavobacteria* ingerido por *Cyclidium* sp. en los experimentos de septiembre y *Gammaproteobacteria* y *Verrucomicrobia* ingeridos por el mismo género de ciliado y otro no identificado, respectivamente, en noviembre.

En las muestras de la base del metalimnion, en la columna de agua, *Cyclidium* sp. una vez más, mostró una alta preferencia por *Alphaproteobacteria* (excepto en el mes de agosto, cuando *Gammaproteobacteria* fue el grupo dominante dentro de sus células), y adicionalmente por *Gammaproteobacteria* en septiembre. En octubre, otros ciliados diferentes aparecieron en las muestras, y organismos de *Alphaproteobacteria* y *Planctomycetes* fueron su principal alimento. En noviembre, organismos de *Alphaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* y *Planctomycetes* predominaron como alimento dentro de los ciliados. En diciembre no se encontraron ciliados con células hibridadas en su interior.

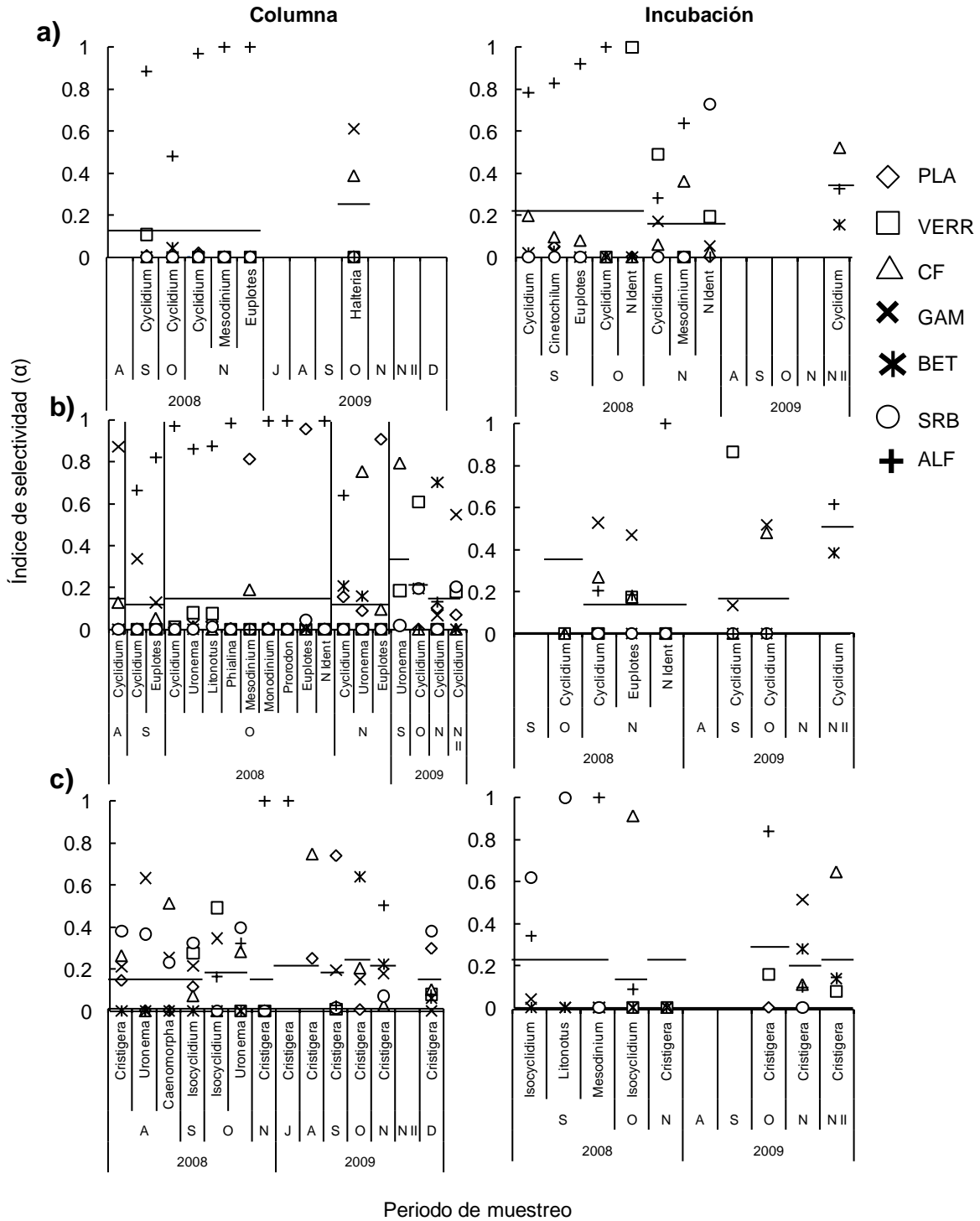


Figura 32 Índice de selectividad ( $\alpha$ ) de los ciliados en la columna de agua y de las incubaciones durante el periodo de estratificación, a diferentes profundidades: a) Metalimnion superior, b) Base del metalimnion y c) Hipolimnion. Líneas horizontales valores aproximados del umbral  $1/n$ ; BET, *Betaproteobacteria*; GAM, *Gammaproteobacteria*; CF, *Cytophaga-Flavobacteria*; ALF, *Alphaproteobacteria*; SRB, bacterias sulfato-reductoras; VERR, *Verrucomicrobia*; PLA, *Planctomycetes*

En los experimentos de la base del metalimnion, en septiembre y octubre, no se encontraron ciliados con células híbridadas en su interior. En noviembre, *Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* fueron los principales organismos encontrados dentro de los ciliados, seguidos por *Cytophaga-Flavobacteria*. De forma similar a lo que se observó en las muestras del MS, algunas bacterias pueden entrar en la definición de selección al azar, y ese fue el caso de *Cytophaga-Flavobacteria* en agosto y octubre, *Gammaproteobacteria* en septiembre y *Planctomycetes* y *Betaproteobacteria* en noviembre en muestras de la columna de agua. La alimentación al azar en los experimentos en la base del metalimnion fue observada en noviembre para *Alphaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria*.

En el caso de las muestras del hipolimnion de la columna de agua, *Gammaproteobacteria*, bacterias sulfato-reductoras y *Cytophaga-Flavobacteria*, fueron seleccionadas preferentemente por los ciliados, en agosto. Bacterias sulfato-reductoras, *Verrucomicrobia* y *Gammaproteobacteria* fueron observadas en el interior de *Isocyclidium* sp. en septiembre. *Verrucomicrobia*, *Gammaproteobacteria*, bacterias sulfato-reductoras, *Alphaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria* fueron observadas en el interior de los ciliados en octubre; en noviembre sólo se encontraron células de *Alphaproteobacteria* en el interior de los ciliados.

En los experimentos del hipolimnion, las bacterias sulfato-reductoras y *Alphaproteobacteria*, se encontraron dentro de los ciliados en septiembre, *Cytophaga-Flavobacteria*, en octubre, y en noviembre no se encontraron bacterias híbridadas al interior de los ciliados. En los experimentos de diciembre, de forma similar a lo sucedido en las muestras de la columna de agua, no se encontraron ciliados con bacterias híbridadas en su interior. En 2009, en las muestras tomadas en el MS de la columna de agua, sólo en octubre pudieron observarse ciliados con bacterias híbridadas. Sólo *Halteria* sp. mostró bacterias híbridadas al interior, de los grupos *Gammaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria*. Mientras que, en las muestras de las incubaciones, sólo en el segundo experimento de noviembre, se pudieron observar células híbridadas al interior del escuticociliado *Cyclidium* sp., fundamentalmente organismos de *Cytophaga-Flavobacteria* como alimento seleccionado y *Alphaproteobacteria* consumido al azar.

Las observaciones de las muestras de la BM de la columna de agua en septiembre de 2009 mostraron que *Uronema* sp. tuvo alta preferencia por ingerir bacterias del grupo *Cytophaga-Flavobacteria*. En octubre, se observó a *Cyclidium* sp. con bacterias del grupo *Verrucomicrobia* en su interior, mientras que en noviembre *Betaproteobacteria* fue el grupo observado al interior de las células de *Cyclidium* sp. Finalmente, en el segundo muestreo de noviembre, las células de *Gammaproteobacteria* dominaron la composición al interior de *Cyclidium* sp., seguidas por bacterias sulfato-reductoras y *Verrucomicrobia* como organismos ingeridos al azar.

En los experimentos de incubaciones realizados en agosto en la BM, no fue posible observar ciliados con células hibridadas en su interior. En septiembre, se observó que *Cyclidium* sp. tuvo una alta proporción de células de *Verrucomicrobia* en las vacuolas, mientras que el mismo organismo, en octubre presentó células de *Gammaproteobacteria* y *Cytophaga-Flavobacteria* como presas seleccionadas. En el primer experimento de noviembre no se observaron células de ciliados con bacterias hibridadas en su interior. Sin embargo, en el segundo experimento de noviembre fue posible observar que *Cyclidium* sp. tenía células de *Alphaproteobacteria* como alimento.

En las muestras del hipolimnion de la columna de agua en julio, pudo observarse a *Cristigera* sp. con células exclusivamente de *Alphaproteobacteria* en su interior mientras que, en agosto, las células más abundantes fueron de *Cytophaga-Flavobacteria*, seguidas por *Planctomycetes*. En septiembre, los organismos más abundantes observados al interior de *Cristigera* sp., fueron *Planctomycetes* seguidos de *Gammaproteobacteria* como alimento ingerido al azar, mientras que en octubre, los organismos seleccionados fueron *Betaproteobacteria*. En el primer muestreo de noviembre, *Cristigera* sp. mostró bacterias de *Alphaproteobacteria* como presas seleccionadas, seguido por *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* como presas ingeridas al azar. En el segundo muestreo de noviembre no se observaron células hibridadas al interior de los ciliados y finalmente en diciembre, *Cristigera* sp. mostró células de bacterias sulfato-reductoras y de *Planctomycetes* como organismos seleccionados.

En el caso de los experimentos de incubación en el hipolimnion, durante agosto y septiembre no se observaron ciliados con células hibridadas al interior. En octubre



*Cristigera* sp. mostró células de *Alphaproteobacteria* como organismo seleccionado. En noviembre se observaron *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* como alimentos seleccionados, mientras que en el segundo experimento de noviembre, se pudo ver mayor proporción de *Cytophaga-Flavobacteria* al interior de los ciliados.

<b>Tabla 3 Correlación Producto Momento (Pearson)</b>	
<b>Elementos correlacionados</b>	<b>Correlación a <math>p &lt; 0.5</math></b>
<b>Ciclos anuales</b>	
VERR, APP	-0.55
CF, ALF	0.52
Densidad Haptorida, densidad Prostomatea	0.91
Densidad ciliados, densidad APP	-0.4
<b>Estratificación</b>	
Biomasa escuticociliados, % EUB	0.6
Densidad F Ox, % EUB	0.58
Densidad F An, HPP/APP	0.7

Las correlaciones presentadas son significativas a  $p$  ( $\alpha$ , 0.05), comprenden los valores promedio para los elementos mencionados tanto en los ciclos anuales como en la estratificación (datos de abril a noviembre). APP, picoplancton autotrófico; HPP, picoplancton heterotrófico; VERR, *Verrucomicrobiales*; CF, *Cytophaga-Flavobacteria*; ALF, *Alphaproteobacteria*; EUB, porcentaje total de bacterias hibridadas; F Ox, ciliados filtradores en capas oxigenadas; F An, ciliados filtradores en capas anóxicas

El contenido de vacuolas en los protistas fue muy variable entre meses y profundidades, sólo se encontraron correlaciones entre el porcentaje total de hibridación y la biomasa de los escuticociliados y la densidad de los mismos organismos en la BM (Tabla 3). Lo que establece la importancia de las bacterias metabólicamente activas como fuente de alimento para los ciliados pequeños y su potencial papel como depredadores en el control de la cantidad de bacterias activas en capas específicas de la columna de agua. La ausencia de correlación entre el porcentaje de total de hibridación y los ciliados en las zonas anóxicas, puede significar la predominancia de procesos diferentes a la depredación en el control de la fracción de bacterias activas en el hipolimnion.

En la Figura 33 se muestran algunos ciliados con bacterias hibridadas en su interior. En el caso de la Figura 33a se trata de *Caenomorpha* sp. teñido con DAPI, y en la Figura 33b se observan las bacterias hibridadas en su interior, aparentemente asociadas a un organelo del ciliado (probablemente un hidrogenosoma). Estas bacterias, potencialmente simbiotes, sólo hibridaron con la prueba EUB338, por lo que no se pudo determinar el grupo filogenético al que pertenecen.

En la Figura 33c se observa al ciliado *Cristigera* sp., teñido con DAPI, y en la Figura 33d se observa al mismo ciliado con bacterias simbiotes en su superficie. Al igual que en el caso de *Caenomorpha* sp., sólo se pudo observar a estas bacterias hibridadas con la prueba EUB338 por lo que su afiliación filogenética se ignora. En las Figuras 33e y f se observa a un ciliado no determinado en las muestras de octubre de 2008 y que creció en las incubaciones de noviembre del mismo año, y mostró una alta preferencia por la ingestión de células de *Alphaproteobacteria*. En las figuras 33g y h se observa a un escuticociliado teñido con DAPI, que muestra bacterias en su interior, que no son tan brillantes como en las hibridaciones, y que posiblemente sean picocianobacterias.

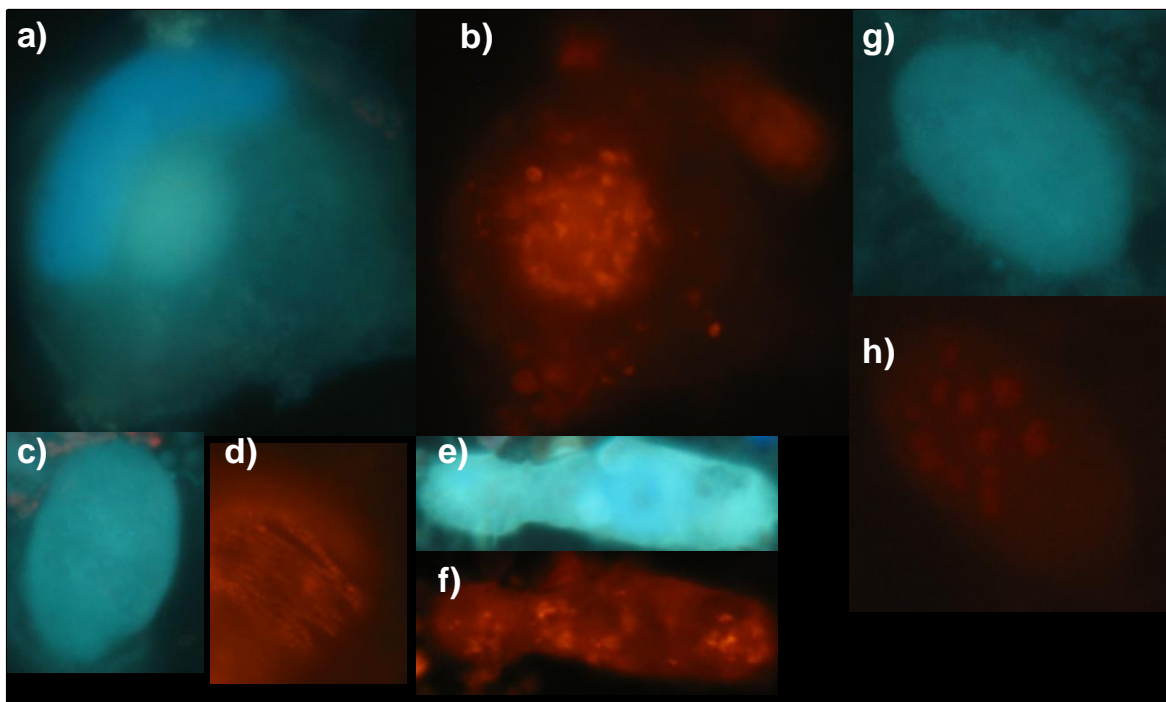


Figura 33 Algunos ciliados con bacterias hibridadas en su interior, a) *Caenomorpha* sp. teñido con DAPI, b) *Caenomorpha* sp. con bacterias hibridadas, aparentemente asociadas a un hidrogenosoma, c) *Cristigera* sp. teñida con DAPI, d) *Cristigera* sp. con bacterias simbiotas en su superficie, e) Un ciliado no determinado teñido con DAPI, f) El mismo ciliado con bacterias hibridadas en el interior de las vacuolas, g) Un escuticociliado teñido con DAPI y h) El mismo escuticociliado con algunas bacterias en su interior (presumiblemente picocianobacterias), que no tienen la fluorescencia del fluorocromo CY5 usado en el proceso de hibridación

En la Figura 34a se observa un flagelado que fue el más abundante en junio y julio; en la Figura 34b se observa un flagelado con pigmentos fotosintéticos y en las Figuras 34c y d se observan flagelados que normalmente se desarrollaron en las incubaciones en bolsas de diálisis.

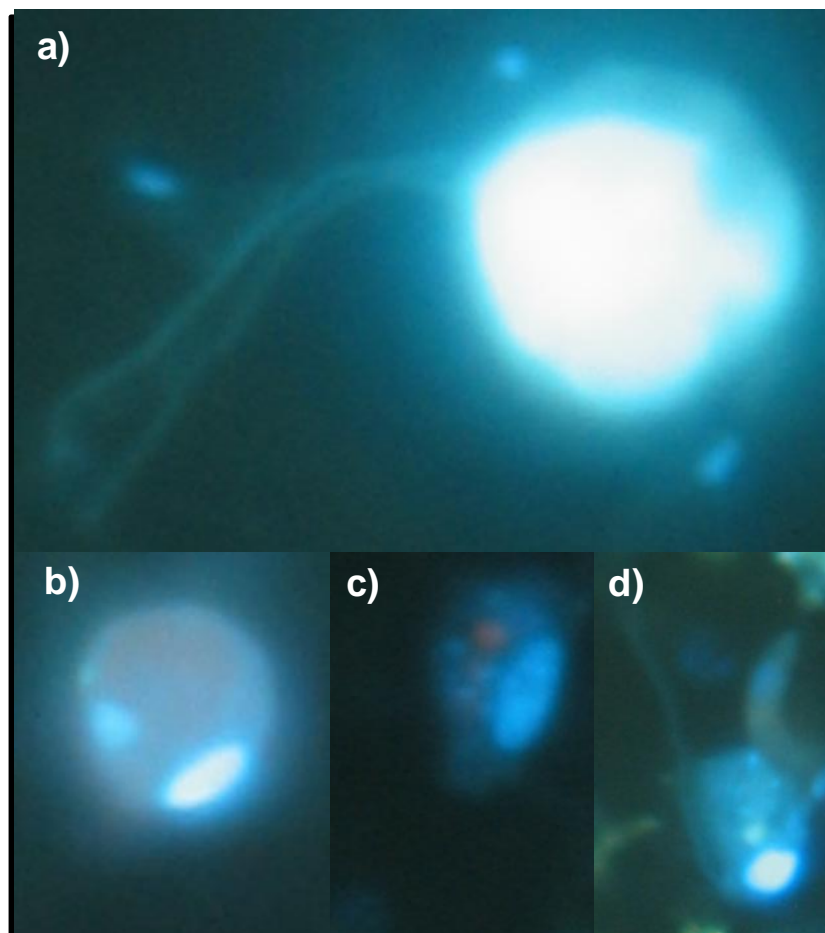


Figura 34 Algunos flagelados observados durante el ciclo anual 2009, a) Flagelado heterotrófico observado en junio y julio, teñido con DAPI, b) Flagelado con pigmentos fotosintéticos, c) y d) Flagelados heterotróficos que se observaron en las bolsas de incubación al término de los experimentos

## DISCUSIÓN

A continuación se comentan brevemente los diferentes aspectos del presente trabajo en tres secciones. En la primera, se discute el picoplancton total y las fracciones APP y HPP, enfocando la argumentación en la variabilidad en el ciclo anual y su relación al régimen térmico del lago. Posteriormente, se comenta la variabilidad en los porcentajes de hibridación, asumida como la fracción del HPP con actividad metabólica en la columna de agua, y su relación tanto con el régimen térmico del lago como con la presencia de depredadores protistas en capas específicas de la columna de agua. A continuación se comenta la variabilidad en la composición del HPP, según la técnica CARD-FISH su posible relación con el régimen térmico de la columna de agua y con otros componentes del plancton. En la segunda sección, se discute la variabilidad y composición de los protistas y el papel del ciclo térmico del lago en la estructuración espacial de la columna de agua y en consecuencia, en la distribución espacial y temporal de los protistas en la columna de agua. Finalmente, en la tercera sección se discute el papel de los protistas como depredadores y estructuradores del picoplancton.

### **Variabilidad de los diferentes componentes del picoplancton, relación con el régimen térmico del lago y con otros organismos planctónicos**

En el lago Alchichica el régimen térmico, determinante de la hidrodinámica del lago, es de importancia fundamental en la variabilidad del picoplancton, cuya densidad total es similar a la observada en cuerpos acuáticos meso-eutróficos (Sherr *et al.*, 1991; Šimek *et al.*, 1995). La mayor densidad del picoplancton se observó durante el periodo de mezcla, y tendió a decrecer conforme se estratificó la columna de agua. En el caso del picoplancton total presente en la capa de mezcla, se esperaba encontrar bajas densidades debido al agotamiento de recursos o a la competencia con el fitoplancton (Morris y Lewis, 1992; Weisse, 1993; Vrede *et al.*, 1999; Alcocer *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2001) debido a que el establecimiento de la estratificación favorece la acumulación de materia orgánica en las partes profundas del lago, donde ocurre la remineralización, pero evita que los nutrientes regresen a las capas menos profundas.

La densidad del picoplancton autotrófico APP, durante la fase de estratificación, fue alta en el metalimnion y baja para las capas de mezcla y del hipolimnion, y estos resultados coinciden con trabajos anteriores (Peřtová *et al.*, 2008). Se sabe que el APP responde fácilmente a cambios pequeños en la disponibilidad de nutrientes, y aun cuando esas respuestas son muy complejas (Frenette *et al.*, 1998; Callieri y Stockner, 2007), en el lago Alchichica se ha encontrado una correlación positiva de su densidad con la concentración del fósforo particulado (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). Por lo tanto, la mayor densidad de APP en la capa del metalimnion de la columna de agua, como en las incubaciones, puede estar relacionada con la disponibilidad de nutrientes o con las condiciones lumínicas. El crecimiento del APP probablemente es favorecido en las partes más profundas de la zona fótica debido a su tamaño pequeño, a su baja demanda de radiación y un mejor ambiente nutricional (Frenette *et al.*, 1998; Callieri y Stockner, 2007).

La densidad promedio del picoplancton heterótrofo observada en la columna de agua concuerda con observaciones previas, sin embargo en este estudio se observaron altas densidades de HPP y su contribución al picoplancton total fue muy importante, con pequeños aportes del APP en los meses de octubre y diciembre, contrario a lo registrado por Peřtová *et al.* (2008), quienes encontraron que la densidad máxima de HPP se encontró en la superficie (20 m), y sus densidades y contribución al picoplancton total en la termoclina o en el máximo profundo de clorofila fueron bajas, lo mismo que en el hipolimnion donde el HPP reportado fue de menos de  $1 \times 10^6$  céls. mL<sup>-1</sup>. Los hallazgos en el presente trabajo son consistentes con el decaimiento de la producción primaria, lo que se reflejaría en las densidades bacterianas, especialmente en el metalimnion durante el desarrollo del máximo profundo de clorofila. Adicionalmente, en las latitudes tropicales la temperatura promedio de la columna de agua es más alta que en los lagos templados (Lewis, 1987), por lo que se esperaría un aumento en las velocidades de las reacciones bioquímicas, altas tasas de crecimiento y mayor productividad.

En este trabajo se encontró un alto porcentaje total de hibridación durante los meses de mezcla, con una clara tendencia a disminuir durante el establecimiento de la estratificación, al igual que en el estudio de Hernández-Avilés *et al.*, (2010). Los porcentajes totales de hibridación de las bacterias obtenidos en este estudio y en el

antecedente de Hernández–Avilés *et al.* (2010) concuerdan con aquellos obtenidos en muchos otros estudios (revisado en del Giorgio y Gasol, 2008; Lennon y Jones, 2011) en los que se ha observado que las células activas son sólo una fracción del total en el ambiente. La variabilidad en los porcentajes totales de hibridación, pueden explicarse por la limitación de nutrientes que se presenta con el establecimiento de la estratificación, como lo sugieren los resultados de estudios en los que se encontró una correlación positiva entre el porcentaje total de bacterias hibridadas con el fósforo particulado (Hernández–Avilés *et al.*, 2010) y al hecho de que en las células bacterianas el contenido de fósforo en las bacterias se encuentra sub-saturado (Jürgens y Güde, 1990), lo que permite la posibilidad de que el picoplancton se encuentre limitado por fósforo, debido a que sus reservas son sólo para corto plazo, contrario a aquellas del fitoplancton (Morris y Lewis, 1992, Vrede *et al.*, 1999; Agawin *et al.*, 2000).

Si bien la limitación por fósforo explica la variabilidad observada en el porcentaje total de hibridación en la columna de agua y en la parte superior del metalimnion, no explica los porcentajes de hibridación registrados en la base del metalimnion, ni en el hipolimnion. A estas profundidades, las condiciones físico-químicas serían favorables para el crecimiento de las bacterias, (Lewis, 1987; Psenner y Puczko, 1988), pero la presencia de escuticociliados tendría un impacto negativo en los porcentajes de hibridación de las bacterias en las capas subóxica y anóxica de la columna de agua. Se sabe que el protozooplancton consume preferentemente las células procariontes más grandes, que se hallan en proceso de división y que tienen actividad metabólica, lo que afectaría las densidades de bacterias activas y sus tasas específicas de crecimiento (González *et al.*, 1990). Adicionalmente, al comparar los porcentajes totales de hibridación entre las muestras de la columna de agua y las incubaciones en bolsas de diálisis, frecuentemente se observaron reducciones en el porcentaje de hibridación en los experimentos de incubación. Aunque estos decrementos en los porcentajes de hibridación podrían estar relacionados con cambios en la disponibilidad de nutrientes, debido al tamizado previo de la muestra para eliminar al metazooplancton adulto, también podrían estar relacionados a la presión por depredación ejercida por el protozooplancton. La correlación positiva, encontrada en este estudio, entre la biomasa de los escuticociliados y el porcentaje total de hibridación, apoya el punto de vista de la depredación por parte de los escuticociliados como un factor que

controla el porcentaje de bacterias activas en el ambiente subóxico de la columna de agua y establece la importancia de estas bacterias activas como fuente de alimento para los escuticociliados.

Con respecto a la composición taxonómica del picoplancton heterótrofo en la columna de agua se observó que, conforme se aproximó el periodo de mezcla, disminuyó la suma acumulada de los grupos filogenéticos bacterianos que fue posible determinar. Es posible que organismos de diferente afiliación taxonómica, a los determinados con las pruebas usadas, se desarrollaran y formaran parte importante del picoplancton, uno de los principales grupos candidatos es *Actinobacteria*, para el cual no se obtuvo la prueba de oligonucleótidos, y que ha mostrado ser un grupo bacteriano importante en ambientes dulceacuícolas y resistente a la digestión en las vacuolas de los protistas (Sekar *et al.*, 2003). De forma semejante a lo observado en los promedios para la columna de agua, en las diferentes capas e incubaciones, la composición taxonómica del picoplancton heterótrofo tuvo variaciones importantes, pero no se encontraron correlaciones con las densidades de ciliados, o flagelados.

Junto con la depredación por parte de los protistas, los virus son igualmente importantes en la conformación de la composición taxonómica final del picoplancton en experimentos de incubación, como lo han mostrado los resultados de Šimek *et al.* (2001). La actividad lítica de los virus es importante cuando menos en las zonas por encima de la termoclina, ya que debajo de la termoclina los números de virus tienden a disminuir notablemente, al menos en ambientes marinos (de  $\sim 10^{6-7}$  en la zona de mezcla a  $10^4$  debajo de la termoclina) (Breitbart *et al.*, 2008; Clasen *et al.*, 2008). Debido a las limitaciones metodológicas, no se hizo la determinación de los taxa bacterianos que podrían ser afectados por lisis vírica en las muestras y, por tanto, el papel de la lisis por virus en la estructura del picoplancton en Alchichica es desconocido. Adicionalmente, los porcentajes intermedios de hibridación, sugieren una importante proporción de células en estado inactivo, generando un “banco de semillas” cuya importancia en las dinámicas procariontes aun no es bien comprendida, pero que potencialmente afectan la composición del picoplancton procarionte y las interacciones con los protozoos y los bacteriófagos, a través de una estrategia conocida como “escape críptico”. Por lo que los cambios observados en la

BCC pueden estar relacionados a bacterias oportunistas, capaces de crecimiento rápido bajo condiciones cambiantes y favorables, quizá mediadas por la depredación del protozooplancton (Haga *et al.*, 1995; Yooseph *et al.*, 2010; Lennon y Jones, 2011).

### **Variabilidad y composición de los protistas, su relación con el régimen térmico del lago e importancia como depredadores y estructuradores del picoplancton**

En el caso de la densidad total de los flagelados, la variabilidad en el ciclo anual observada en este estudio mostró números bajos en enero, un máximo en marzo y picos en agosto y diciembre, lo que contrasta con lo reportado por Lugo (2000), quien registró alta densidad de flagelados en enero, un decremento marcado en la etapa de circulación, con densidades altas en mayo y picos en junio y julio. En este trabajo el agrupamiento de los flagelados sólo se realizó en base a la presencia/ausencia de pigmentos fotosintéticos; sin embargo, Lugo (2000) realizó la determinación taxonómica de estos organismos y reportó la presencia de crisomonadinas (*Spumella* spp.), kinetoplástidos (*Bodo* spp.), *Rhynchomonas* y *Pleuromonas*, así como el coanoflagelado (*Monosiga* sp.), así que en Alchichica los principales flagelados son bacterívoros.

Desafortunadamente, en este estudio sólo se incluyó a los flagelados en un ciclo anual y las altas densidades de nanoflagelados heterotróficos durante la fase corta de mezcla del lago no aportan mucha información sobre la actividad de depredación sobre el picoplancton. Por otra parte no se encontraron diferencias significativas entre la columna de agua y las incubaciones, aunque en general sí se observó un aumento en las densidades de nanoflagelados heterotróficos en las incubaciones. En consecuencia, la importancia de los flagelados, como bacterívoros y potenciales estructuradores del picoplancton, aún queda por ser explorada con mayor detalle en el lago Alchichica, tanto la predominancia de flagelados bacterívoros como las altas densidades de nanoflagelados heterotróficos en la fase de mezcla, permiten suponer un papel importante de estos organismos como consumidores de bacterias metabólicamente activas y tener un papel importante en la remineralización de nutrientes en la capa eufótica de la columna de agua, profundidad en la que mayormente se encuentra a estos organismos, como se ha mostrado en otros estudios (Fenchel, 1986a, b; Sherr y Sherr, 1987; Jürgens y Matz, 2002).



En el caso de los ciliados la dominancia de esticotricos (*Halteria* spp.) y peritricos (*Pelagovorticella* sp., *Vorticella* spp.) (en la columna de agua durante la fase de mezcla, y en el epilimnion y parte superior del metalimnion durante el comienzo de la estratificación), puede estar relacionada tanto a la disponibilidad de picoplancton autotrófico como a la presencia de diatomeas. Por una parte, las altas densidades de APP en la fase de mezcla son usadas como fuente de alimento por los esticotricos y los peritricos, cuando las densidades de APP disminuyen, igualmente lo hacen las densidades de ciliados que muestran principalmente APP ingerido en las vacuolas. En el caso de los peritricos, la presencia de diatomeas (*Chaetoceros* en el inicio de la mezcla y *Cyclotella* en el inicio de la estratificación) provee un sustrato para que las células puedan establecerse, con el inicio de la etapa de estratificación disminuyen las densidades de diatomeas en la columna de agua e igualmente sucede con los peritricos.

Durante la fase de estratificación, los escuticociliados dominaron numéricamente y se encontraron alrededor de la oxiclina (*Uronema* sp., *Cyclidium* sp.) y cerca del fondo (*Cristigera* sp. e *Isocyclidium* sp.) del lago. Esto ocurre como consecuencia de una sucesión en la composición de ciliados en la columna de agua, iniciada con el establecimiento de la estratificación y el consecuente desarrollo de las zonas subóxica y anóxica en la columna de agua. La importancia del gradiente de oxígeno disuelto reside en que permite la partición de nicho para especies funcionalmente similares, la mayoría de los ciliados en Alchichica son filtradores que se alimentan primordialmente del picoplancton procarionte. La dominancia numérica y composición de los escuticociliados en las zonas subóxica y anóxica, es consecuencia de las diferentes tolerancias a las concentraciones ambientales de oxígeno debido a que: i) organismos de diferentes tamaños tienen diferentes requerimientos de oxígeno para la respiración, lo que permite que organismos aerobios pequeños tengan un nicho en condiciones subóxicas (Fenchel y Finlay, 1995); ii) el compromiso entre la necesidad/disponibilidad de oxígeno, la toxicidad de oxígeno y los costos de detoxificación de las peroxidasas, lo que refleja la separación de nicho entre especies con una biología similar (Fenchel *et al.*, 1989; Fenchel y Finlay, 1995; Fenchel y Finlay, 2008).

## **El contenido de vacuolas en los protistas, importancia del APP y HPP como presas para diferentes protistas e importancia de la depredación en las redes tróficas microbianas**

En cuanto al APP ingerido, las observaciones realizadas no son una tasa de ingestión (células célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), sino sólo el promedio de células de APP ingeridas (promedio para un tipo de organismo) que fue posible observar en un momento determinado. El bajo promedio de células de APP que fue observado en los flagelados pigmentados, sugiere la importancia de la actividad fotosintética como medio de obtención de carbono para estos organismos (Domaizon *et al.*, 2003). Igualmente en el caso de los flagelados heterotróficos se observó poco APP ingerido, lo que sugiere la importancia del picoplancton heterótrofo como fuente de alimento para estos flagelados en la fase de mezcla del lago, cuando alcanzan su mayor densidad. Los promedios de células de APP ingeridas (Figura 27) en el caso de los ciliados, se encuentran dentro del intervalo reportado por Peštová *et al.* (2008), quién sí midió las tasas de depredación sobre el APP. Por lo tanto, los datos obtenidos en este estudio pueden considerarse como una aproximación razonable del comportamiento de depredación de los ciliados sobre el APP. Parece que la importancia del APP como alimento, sólo es manifiesta cuando se halla en altos números en la columna de agua, y su consumo es particularmente importante por los ciliados de mayor tamaño que los escuticociliados.

La alta densidad de escuticociliados y la correlación hallada entre la biomasa de estos ciliados y los porcentajes de hibridación total, confirman la importancia del picoplancton heterótrofo como fuente de carbono durante la estratificación del lago, como han sugerido los trabajos de Callieri *et al.* (2002) y Peštová *et al.* (2008). Esta correlación sugiere la importancia de las células bacterianas metabólicamente activas (si asumimos que la presencia de ribosomas está relacionada a la actividad metabólica de las células) como una fuente importante de alimento para los escuticociliados. Se ha observado que estos ciliados se alimentan de manera preferente de las bacterias planctónicas de mayor tamaño (Šimek *et al.*, 1994; Ayo *et al.*, 2001), ya sea por su mejor calidad nutrimental o por un aumento en la probabilidad de intercepción de la partícula debido a su mayor tamaño. En consecuencia, los protistas, al alimentarse de las células con óptimo crecimiento, afectan directamente la estructura por tamaños e indirectamente la composición del picoplancton.

Tanto ciliados como flagelados seleccionaron pocos grupos bacterianos, de acuerdo a lo observado con la técnica CARD-FISH, en su actividad de depredación. Por esta razón se esperaría haber encontrado un impacto de la actividad depredadora en la composición final del picoplancton heterótrofo en los experimentos de incubación. En principio, si un determinado grupo bacteriano estuviera bajo presión de depredación, el resultado esperado al final de la incubación sería: i) una reducción si el grupo bacteriano no fuera resistente a la depredación, ii) un incremento si fuera resistente a la depredación y iii) sin cambios si existiera un balance entre la producción del grupo bacteriano y el consumo por depredación por parte de los protistas. Sin embargo, considerando solamente la depredación por protistas y el contenido de sus vacuolas, los cambios en la composición del picoplancton heterótrofo parecieron haber ocurrido al azar. Se ha sugerido que la magnitud de los cambios en la BCC pueden ser deducidos a partir de los cambios en las proporciones de la tasa de mortalidad bacteriana total y la tasa de crecimiento (Šimek *et al.*, 2002). Por lo tanto, es necesario conocer la producción de grupos bacterianos particulares, el tiempo que permanecen las bacterias en las vacuolas y el papel de la densidad de presas en la selectividad de los protistas (Jürgens y DeMott, 1995; Boenigk *et al.*, 2002; Jezbera *et al.*, 2005), así como el estatus fisiológico de los depredadores (Christaki *et al.*, 1998) para comprender mejor las posibles relaciones entre la presión de depredación y la composición bacteriana.

Adicionalmente, la composición del picoplancton heterótrofo en la columna de agua fue muy dinámica. Claramente hubo grupos bacterianos que no pudieron ser determinados con las pruebas de oligonucleótidos usadas en este estudio, cuya importancia en la composición del picoplancton heterótrofo y como presas de los protistas permanece ignorada. Es necesario llevar a cabo una investigación detallada, empleando técnicas de biología molecular para profundizar en el conocimiento de la diversidad procarionte en el lago Alchichica y así diseñar pruebas de oligonucleótidos basadas en y dirigidas específicamente hacia la diversidad procarionte existente en el lago. Esto permitirá revelar la importancia de grupos filogenéticos específicos y sus interacciones con otros componentes de la biota en el lago. No solamente los grupos bacterianos dominantes deben ser tomados en cuenta, se ha visto que en ambientes oligotróficos una alta proporción de bacterias está inactiva (Yooseph *et al.*, 2010; Lennon y Jones, 2011). Por lo tanto, los

grupos bacterianos menos dominantes tienen un papel importante en las interacciones con el ambiente.

En el contexto de las redes tróficas microbianas se ha propuesto que a densidades bacterianas bajas, los procariontes estarían regulados por la depredación y, sin importar las densidades de bacterias, la tasa específica de crecimiento permanecería aproximadamente constante. En otro escenario, con densidades bacterianas altas, los procariontes estarían limitados por los recursos y, conforme aumentan las densidades bacterianas, la tasa de crecimiento disminuiría (Pernthaler, 2005). Si los porcentajes de hibridación encontrados en Alchichica (niveles bajos a intermedios de hibridación), son debidos a la limitación por la disponibilidad de nutrientes (como sugiere el estudio de Hernández-Avilés *et al.*, 2010) en la producción bacteriana, esto indicaría que en general los escuticociliados estarían en teoría, limitados la mayor parte del tiempo. Esto debido que el control descendente en ambientes nutricionales pobres, implica que el crecimiento de los depredadores está limitado por la disponibilidad de las presas, lo cual es el escenario más probable en el circuito microbiano del lago Alchichica y concuerda con hallazgos recientes en ambientes con depleción de oxígeno (Saccà *et al.*, 2009).

Sin embargo, durante la etapa de estratificación, cuando ocurre el máximo profundo de clorofila en el lago y existe por tanto un aporte de nutrientes en las capas subóxica y anóxica, los porcentajes de hibridación observados serían producto de la depredación por parte de los escuticociliados. Los escuticociliados estarían sometidos a una alta presión de depredación ejercida por niveles tróficos superiores (Pernthaler, 2005) y formarían un vínculo importante en el flujo de carbono. Esto debido a que en un ambiente rico en nutrientes, el sistema podría sostener una comunidad de depredadores en niveles tróficos superiores, que controlarían la densidad de los protistas y liberarían a los procariontes del potencial control por depredación. Si bien en general las densidades de los copépodos en la fase de estratificación del lago Alchichica son muy bajas como para apoyar esta alternativa, la aparición de rotíferos durante la estratificación apoyaría este escenario. Por otra parte al comparar la variabilidad de los porcentajes de hibridación en las capas subóxica y anóxica en los años del estudio, es claro que en 2008 hubo mayor variabilidad en el porcentaje de

bacterias híbridadas que en 2009, lo que coincide con una mayor densidad de escuticociliados en 2008.

La importancia del metazooplancton, específicamente de los copépodos calanoides adultos, sobre las densidades de ciliados no es clara. Sólo en algunos experimentos de incubación se observó el incremento en las densidades de escuticociliados que, por su tamaño, podrían ser presas del metazooplancton. Se ha observado que en Alchichica incrementa la densidad del metazooplancton y la producción de huevos subitáneos durante la transición de la fase de estratificación a la fase de mezcla. Igualmente durante esta transición de fases en el lago, se observó que la densidad de escuticociliados disminuyó y que los porcentajes totales de hibridación aumentaron. Esto sugiere un aparente vínculo entre los escuticociliados y el metazooplancton en la transferencia de carbono (los flagelados aparecen en altas densidades hasta avanzada la fase de mezcla), pero también un papel importante del cambio en las condiciones ambientales propicias para los escuticociliados. Por lo tanto, aun falta profundizar en las relaciones tróficas entre el metazooplancton y las potenciales presas protistas, para establecer el potencial vínculo entre los componentes del circuito microbiano y la llamada “cadena trófica clásica”.

En el caso de los ciliados se han reportado respuestas mecano-sensoriales y quimio-sensoriales por diferentes autores (Ayo *et al.*, 2001; Kamiyama y Arima, 2001; Olson y Strom, 2002). En este estudio, se observó una gran proporción de diferentes grupos filogenéticos bacterianos dentro de los ciliados, contrario a lo que se esperaría por azar de acuerdo a las proporciones en el ensamblado natural, y asumiendo un comportamiento alimenticio no selectivo de los ciliados en un determinado grupo bacteriano. Es necesario tener en cuenta la posibilidad de un cambio dinámico en la calidad nutrimental del picoplancton, debido a la variabilidad y disponibilidad de nutrientes, que afectaría las propiedades de la pared celular y la digestibilidad (Sterner y Hessen, 1994), lo que puede explicar la selección de ciliados y flagelados por diferentes grupos bacterianos a lo largo del periodo de estudio. Tomando en cuenta que sólo una parte del total de las bacterias en el ambiente acuático es activa, se ha propuesto que esas bacterias serían capaces de un lento crecimiento en ambientes limitados, pero de rápido crecimiento en ambientes ricos,

adaptadas a cambios rápidos en el ambiente nutricional (Yooseph et al., 2010; Lennon y Jones, 2011).

En este sentido, se propone que el contenido de vacuolas en los protistas refleja a las bacterias que en un momento determinado, crecían bien bajo esas condiciones ambientales y que por lo tanto eran en ese momento y espacio la mejor opción nutricional; si esto es cierto, el contenido de vacuolas estaría relacionado a los cambios de biomasa de grupos bacterianos específicos, reflejando una dinámica “killing the winner” (*sensu* Thingstad y Lignell, 1997), mediada no por virus, sino por protistas. Si la actividad de depredación tiene influencia en la magnitud y estabilidad de procesos biogeoquímicos específicos, es una pregunta abierta para la que se requiere medir las actividades fisiológicas de determinados taxa *in situ* (Cotrell y Kirchman, 2000). Finalmente, se ha mostrado la importancia de diferentes características como, el tiempo de residencia en las vacuolas, digestibilidad, selectividad de acuerdo a la concentración de presas (Jürgens y DeMott, 1995; Boenigk *et al.*, 2002; Jezbera *et al.*, 2005) y el estatus fisiológico de los depredadores (Christaki *et al.*, 1998). Estos factores deben ser considerados para entender el contenido de las vacuolas en los protistas, y el papel de estos en la estructuración del picoplancton.

## CONCLUSIONES

El régimen térmico del lago Alchichica afecta la estructura espacial de la columna de agua y parece determinar la dinámica del picoplancton autotrófico y heterotrófico a través del ciclo anual. La sucesión de ciliados en el ciclo anual está vinculada por una parte al desarrollo de las fases de estratificación y mezcla del lago, y por otra, a las proporciones del picoplancton heterotrófico y autotrófico en el ambiente. En las fases de mezcla y principios de la estratificación, con alta densidad de APP, dominaron los ciliados que pueden alimentarse de este tipo de picoplancton. Con el establecimiento de la estratificación, desarrollo de la heterogeneidad espacial en la columna de agua y abatimiento en las densidades de APP, aparecen los ciliados de menor tamaño que se alimentan de procariontes más pequeños que el APP, y que dominan numéricamente la composición.

No se encontraron correlaciones significativas, que pudieran explicar la variabilidad de los flagelados durante el ciclo anual (altas densidades en la mezcla y estratificación de los flagelados pigmentados, y altas densidades de flagelados heterótrofos hacia el final de la mezcla), lo que posiblemente se deba que los flagelados en su desarrollo tienen dinámicas temporales más cortas que las usadas en el periodo de muestreo y por tanto no fue posible registrarlas, sin embargo, sus densidades parecen estar vinculadas a las densidades de alimento potencial en la columna de agua. La marcada densidad de protistas en capas específicas de la columna de agua, apoya la idea de que el principal mecanismo de selección en la ingestión de alimento es el tamaño de la partícula. Sin embargo, las bacterias con presencia de ribosomas y, posiblemente con alta actividad metabólica, son importantes para los escuticociliados, que mostraron una correlación positiva con el porcentaje total de hibridación, en la etapa de estratificación establecida y tardía del lago. Esto parece indicar que los escuticociliados se encuentran limitados por la disponibilidad de presas procariontes susceptibles de ser ingeridas, cuya densidad estaría entonces controlada por los escuticociliados. Si bien es posible que la aparente selectividad de los protistas sólo refleje la selectividad basada en el tamaño de las bacterias, ese tamaño está asociado al crecimiento de la misma y podría significar una alta calidad nutrimental. El efecto directo o indirecto de la depredación sobre la composición de la comunidad bacteriana, no pudo ser

determinado, y se propone medir la producción bacteriana y la actividad lítica de los virus para profundizar en el papel de los protistas como estructuradores de la comunidad bacteriana.

No obstante la dominancia numérica de los ciliados pequeños, la biomasa está dominada por ciliados de mayor tamaño que no parecen alimentarse preferentemente del HPP. Entre estos ciliados se encuentran un hipotrico aún por determinar y *Euplotopsis* sp. ambos consumidores de APP, y el segundo con una asociación simbiótica que aparentemente le confiere capacidades mixótrofas; *Prorodon* sp., y *Phialina* sp. ambos consumidores de algas; y *Litonotus* sp., *Uroleptus* sp y *Spirostomum* sp., que al parecer se alimentan de partículas de mayor tamaño que el HPP. Sólo en muy pocas ocasiones se observó algún ciliado con partículas parecidas a detrito en las vacuolas. Hay otros de alimentación entre los protistas en la columna de agua, cuya importancia queda aún por investigarse.

Se observaron asociaciones aparentemente simbióticas entre los ciliados *Caenomorpha* sp. y *Cristigera* sp., con procariontes del dominio *Bacteria*. Sin embargo, no fue posible hibridar a estas bacterias con las sondas usadas en este estudio, por lo que se desconoce la afiliación taxonómica de estos procariontes y su posible papel en la asociación con los ciliados. De igual forma, no fue posible determinar taxonómicamente, con las sondas disponibles, un porcentaje variable e importante de bacterias a lo largo de la etapa de estratificación y la transición a la fase de mezcla, por lo que es necesario realizar métodos moleculares complementarios a fin de profundizar en la diversidad y función de los procariontes presentes en el lago Alchichica.



## REFERENCIAS

- Adame, M.F., Alcocer, J., y Escobar, E. 2008. Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshw. Biol.* **53**: 22-31.
- Agawin, N.S.R., Duarte, C.M. y Agustí, S. 2000. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnol. Oceanogr.* **45**: 591-600.
- Alcocer, J., Lugo, A., Escobar, E., Sánchez, M.R. y 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.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., y Stahl, D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1919-1925.
- Ayo, B., Santamaria, E., Latatu, A., Artolozaga, I., Azua, I. e Iriberry, J. 2001. Grazing rates of diverse morphotypes of bacterivorous ciliates feeding on four allochthonous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 455-460.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A. y Thingstad, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **10**: 257-263.
- Boenigk, J. y Arndt, H. 2002. Bacterivory by heterotrophic flagellates: Community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 465-480.
- Boenigk, J., Matz, C., Jürgens, K. y Arndt, H. 2002. Food concentration-dependent regulation of food selectivity of interception-feeding bacterivorous nanoflagellates. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 195-202.
- Borror, A. C., y Hill B.F. 1995. The order Euplotida (Ciliophora): Taxonomy, with division of *Euplotes* into several genera. *J. Euk. Microbiol.* **42**: 457 - 466.

- Breitbart, M., Middelboe, M. y Rohwer, F. 2008. Marine viruses: Community dynamics diversity and impact on microbial processes. *Microbial Ecology of the Oceans, 2<sup>nd</sup> Edition* (Kirchman DL, ed) pp. 243 - 285. Wiley –Blackwell.
- Calbet, A., Landry, M. R. y Nunnery, S. 2001. Bacteria-flagellate interactions in the microbial food web of the oligotrophic subtropical North Pacific. *Aquat. Microb. Ecol.* **23**: 283–292.
- Callieri, C. y Stockner, J.G. 2007. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *J. Limnol.* **61**:1-14.
- Callieri, C., Karjalainen, S.M. y Passoni, S. 2002. Grazing by ciliates and heterotrophic nanoflagellates on picocyanobacteria in Lago Maggiore, Italy. *J. Plankton. Res.* **8**: 785–796.
- Chesson, J. 1983. The estimation and analysis of preference and its relationship to foraging models. *Ecology* **64**: 1297-1304.
- Chesson, J. 1978. Measuring preference in selective predation. *Ecology* **59**: 211-215.
- Christaki, U., Dolan, R.J., Pelegri, S. y Rassoulzadegan, F. 1998. Consumption of picoplankton-size particles by marine ciliates: Effects of physiological state of the ciliate and particle quality. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 458-464.
- Clasen, J. L., Brigden, S. M. Payet, J. P. y Curtis, A. S. 2008. Evidence that viral abundance across oceans and lakes is driven by different biological factors. *Freshw. Biol.* **53** (6): 1090 – 1100.
- Cotrell, M. y Kirchman, D. L. 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of Cytophaga-Flavobacteria cluster consuming low- and high- molecular weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1692 – 1697.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., y Wagner, M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444.

- del Giorgio, P.A. y Gasol, J.M. 2008. Physiological structure and single cell activity in marine bacterioplankton. *Microbial Ecology of the Oceans, 2<sup>nd</sup> Edition* (Kirchman DL, ed) pp. 243 - 285. Wiley –Blackwell.
- Diederichs, S., Beardsley, C. y Cleven E.J. 2003. Detection of ingested bacteria in benthic ciliates using fluorescence *in situ* hybridization. *System. Appl. Microbiol.* **26**: 624 – 630.
- Domaizon, I., Viboud, S. y Dominique Fontvieille. 2003. Taxon-specific and season variations in flagellates grazing on heterotrophic bacteria in the oligotrophic Lake Annecy – importance of mixotrophy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 317 -329.
- Fenchel, T. 1986a. Protozoan filter feeding. *Progr. Protistol.* **1**: 65-113.
- Fenchel, T. 1986b. The ecology of heterotrophic microflagellates. *Adv. Microb. Ecol.* **9**: 57–97.
- Fenchel, T. 1980. Relation between particle size selection and clearance in suspension-feeding ciliates. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 733.738.
- Fenchel, T. y Finlay, B. 2008. Oxygen and the spatial structure of microbial communities. *Biol. Rev.* **83**: 553-569.
- Fenchel, T. y Finlay, B.J. 1995. Ecology and evolution in anoxic worlds. Oxford University Press.
- Fenchel, T., Finlay, B.J. y Gianni, A. 1989. Microaerophily in ciliates: responses of an *Euplotes* species (Hypotrichida) to oxygen tension. *Arch. Protistenk.* **137**: 317 – 330.
- Filonov, A. Tereshchenko, I, y Alcocer, J. 2006. Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophys. Res. Lett.* **33**: 1-4.
- Finlay, B.J. 1982. Effect of seasonal anoxia on the community of benthic ciliated protozoa in a productive lake. *Arch. Protistenk.* **125**: 215-222.

- Foissner, W., Berger, H. y Schaumburg, J. 1999. *Identification and ecology of limnetic plankton ciliates*. Informationsberichte des Bayer. Landesamtes für Wasserwirtschaft 3/99, 793 pp.
- Frenette, J.J., Warwick, F. y Legendre, L. 1998. Size-dependent C:N uptake by phytoplankton as a function of irradiance: Ecological implications. *Limnol. Oceanogr.* **43**: 1362-1368.
- García, E. 1988. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. Offset Larios, S. A. 4ª Edición. México, D. F. México. 217 p.
- González, J.M., Sherr, E.B. y Sherr, B.F. 1990. Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 583-589.
- Guhl, B. E. y Finlay, B. J. 1991. Anaerobic predatory ciliates track seasonal migrations of planktonic photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**: 313-316.
- Haga, H., Nagata, T. y Sakamoto, M. 1995. Size-fractionated  $\text{NH}_4^+$  regeneration in the pelagic environments of two mesotrophic lakes. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1091-1099.
- Hernández-Avilés, J.S., Macek, M., Alcocer, J., López-Trejo, B. y Merino-Ibarra, M. 2010. Prokaryotic picoplankton dynamics in a warm-monomictic saline lake: temporal and spatial variation in structure and composition. *J. Plankton. Res.* **32**: 1301-1314.
- Jerome, C. A., Montagnes, D. J. S. y Taylor, F. J. R. 1993. The effect of the quantitative protargol stain and Lugol's and Bouin's fixatives on cell size: a more accurate estimate of ciliate species biomass. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 254 – 259.
- Jezbera, J., Horňák, K., y Šimek, K. 2005. Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence *in situ* hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 351-363.

- Jezbera, J., Nedoma J. y Šimek, K. 2003. Longitudinal changes in protistan bacterivory and bacterial production in two canyon-shaped reservoirs in different trophic status. *Hydrobiologia*. **504**: 115-130.
- Jürgens, K. y Matz, C. 2002. Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**: 413–434.
- Jürgens, K. y DeMott, W.R. 1995. Behavioral flexibility in prey selection by bacterivorous nanoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1503-1507.
- Jürgens, K. y Güde, H. 1990. Incorporation and release of phosphorus by planktonic bacteria and phagotrophic flagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **59**: 271-284.
- Kamiyama, T. y Arima, S. 2001. Feeding characteristics of two tintinnid ciliate species on phytoplankton including harmful species: effects of prey size on ingestion rates and selectivity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **257**: 281–296.
- Lennon, J.T. y Jones, S.E. 2011. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 119 – 130.
- Lewis, W.M.Jr. 1996. Tropical lakes: how altitude makes a difference. *Perspectives in tropical limnology* (F Schlener y K.T. Boland, eds.) pp. 43 – 64. SPB Academic Publishing bv, Amsterdam, The Netherlands.
- Lewis, W.M.Jr. 1987. Tropical Limnology. *Ann. Rev. Ecol. Sys.* **18**: 159-184.
- Lugo, A. 2000. *Variación espacial y temporal de la estructura de la comunidad planctónica del lago Alchichica, Puebla, con algunos aspectos de interacciones tróficas*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias División de Estudios de Posgrado, UNAM.
- Lugo, A., Alcocer, J., Sánchez, M. del R. y Escobar, E. 1998. Litoral protozoan assemblages from two Mexican hyposaline lakes. *Hydrobiologia*. **381**: 9 – 13.

- Macek, M., Peřtová, D. y Martínez-Pérez, M.E. 2008. Seasonal and spatial dynamics of a ciliate assemblage in a warm-monomictic lake Alchichica (Puebla, Mexico). *Hidrobiológica*. **18 Suppl. 1**: 25-35.
- Macek, M., Callieri, C., řimek, K. y Lugo-Vázquez., A. 2006. Seasonal dynamics, composition and feeding patterns of ciliate assemblages in oligotrophic lakes covering a wide pH range. *Archiv. Hydrobiol.* **166**: 261-287.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., y Schleifer, K.H. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**: 1097-1106.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., y Schleifer, K.H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
- Massana, R. y Pedrós- Alió, C. 1994. Role of anaerobic ciliates in planktonic food webs: abundance, feeding, and impact on bacteria in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1325-1334.
- Matz, C. y Jürgens, K. 2001. Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 814-820.
- Matz, C., Boenigk, J., Arndt, H. y Jürgens, K. 2002. Role of bacterial phenotypic traits in selective feeding of the heterotrophic nanoflagellate *Spumella* sp. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**: 137-148.
- Medina-Sánchez, M.J., Felip, M. y Casamayor, O.E. 2005. Catalyzed reported deposition - fluorescence *in situ* hybridization protocol to evaluate phagotrophy in mixotrophic protists. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7321-7326.

- Montagnes, D.J.S. y Lynn, D.H. 1987. A quantitative protargol staining (QPS) for ciliates: method description and test of its quantitative nature. *Mar. Microb. Food Webs* **2**: 83- 93.
- Montagnes, D.J.S., Barbosa, A.B., Boenigk, J., Davidson, K., Jürgens, K., Macek, M., Parry, J.D., Roberts, E.C. y Šimek, K. 2008. Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study. *Aquat. Microb. Ecol.* **53**: 83–98.
- Morris, D.P. y Lewis, W.M.Jr. 1992. Nutrient limitation of bacterioplankton growth in Lake Dillon, Colorado. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 1179 – 1192.
- Motulsky, H.J. 1999. *Analyzing data with GraphPad Prism*. GraphPad Software inc., San Diego SA, USA.
- Müller, H. y Geller, W. 1993. Maximum growth rates of aquatic ciliated protozoa: the dependence on body size and temperature reconsidered. *Arch. Hydrobiol.* **126**: 315-327.
- Neef, A. 1997. *Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen*. PhD Thesis, Technische Universität München.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., y Schleifer, K.H. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* **144**: 3257-3266.
- Neef A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Lemmer H. y Schleifer K.-H. 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.
- Neubacher, E., Prast, M., Cleven, E.J. y Berninger, U.G. 2008. Ciliate grazing on *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira moscoviensis*: Is selectivity a factor for the nitrogen cycle in natural aquatic systems? *Hydrobiologia* **596**: 241 – 250.

- Oliva, M.G., Lugo, A., Alcocer, J., Peralta, L. y Sánchez, Ma. del R. 2001. Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia* **466**: 299-306.
- Olson, M.B. y Strom, S.L. 2002. Phytoplankton growth, microzooplankton herbivory and community structure in the southeast Bering Sea: insight into the formation and temporal persistence of an *Emiliania huxleyi* bloom. *Deep-Sea Res. II - Topical Stud. Oceanogr.* **49**: 5969–5990.
- Pernthaler, J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 537–546.
- Pernthaler, J., Glöckner, F.O., Schönhuber, W., y Amann, R. 2001. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods Microbiol.* **30**: 207-226.
- Peřtová, D., Macek, M. y Martínez-Pérez, M.E. 2008. Ciliates and their picophytoplankton-feeding activity in a high-altitude warm-monomictic saline lake. *Europ. J. Protistol.* **44**: 13-25.
- Porter, K.G. y Feig, Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943-948.
- Posch, T., Jezbera, J., Vrba, J. Šimek, K., Pernthaler, J., Andreatta, S. y Sonntag, B. 2001. Size selective feeding in *Cyclidium glaucoma* (Ciliophora, Scuticociliatida) and its effects on bacterial community structure: A study from a continuous cultivation system. *Microb. Ecol.* **42**: 217 – 227.
- Psenner, R. y Puczko, R. 1988. Phosphorus fractionation: advantages and limits of the method for the study of sediment P origins and interactions. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* **30**: 43-49.
- Saccà, A., Borrego, C.M., Renda, R., Triadó-Margarit, X., Bruni, V. y Guglielmo, L. 2009. Predation impact of ciliated and flagellated protozoa during a summer bloom of brown sulfur bacteria in a meromictic coastal lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **70**: 42 – 53.



- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T., y Amann, R. 2003. Improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2928–2935.
- Sherr, E. B. y Sherr, B. F. 1987. High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates. *Nature* **325**:710–711.
- Sherr, E.B. y Sherr, B.F. 1996. Protistan grazing rates via uptake of fluorescently labeled prey. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* (Kemp P, Sherr BF, Sherr EB y Cole J eds), pp 695–701. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., Berman, T. y Hadas, O. 1991. High abundance of picoplankton-ingesting ciliates during late fall in Lake Kinneret, Israel. *J. Plankton Res.* **13**: 789–799.
- Šimek, K., Horňák, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Vrba, J., Straškrábová, V., Macek, M., Dolan, J.R. y Hahn, M.W. 2006. Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ. Microbiol.* **8 (9)**: 1613–1624.
- Šimek, K., Nedoma, J., Pernthaler, J., Posch, T. y Dolan, J. R. 2002. Altering the balance between bacterial production and protistan bacterivory triggers shifts in freshwater bacterial community composition. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**: 453 – 463.
- Šimek, K., Horňák, K., Mašín, M., Christaki, U., Nedoma, J., Weinbauer, G.M. y Dolan, R., J. 2003. Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.* **31**: 123–125.
- Šimek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, G.M., Horňák, K., Dolan, R.J., Nedoma, J., Masín, M., y Amman, 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., Kojecká, P., Nedoma, J., Hartman, P., Vrba, J. y Dolan, J.R. 1999. Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1634-1644.
- Šimek, K., Bobková, J., Macek, M., Nedoma, J. y 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., Vrba, J. y Hartman, P. 1994 Size-selective feeding by *Cyclidium* sp. on bacterioplankton and various sizes of cultured bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **14**: 157–168.
- Simon, M., Cho, B. C. y Azam, F. 1992. Significance of bacterial biomass in lakes and the ocean: Comparison to phytoplankton biomass and biogeochemical implications. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **86**: 103–110.
- Skibbe, O. 1994. An improved quantitative protargol stain for ciliates and other planktonic protists. *Arch. Hydrobiol.* **130**: 339-347.
- Stahl, D.A. y Amann, R. 1991. Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic acid techniques in bacterial systematic* (Stackebrandt E y Goodfellow M, eds), pp 205-248. John Wiley y Sons, Ltd, Chichester, England.
- Sterner, R.W. y Hessen, D.O. 1994. Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **25**: 1-29.
- Straškrabová, V., Callieri, C., Cruz-Pizarro, L., Hartman, P., Macek, M., Nedoma, J. y Šimek, K. 1999. Investigations on microbial food webs in mountain lakes: aims and methods. In: Straškrabová, V., Callieri, C. y Fott, J. (eds.), Pelagic food web in mountain lakes. Mountain Lakes Research Program. *J. Limnol.* **58**: 77-87.
- Thingstad, T.F. y Lignell, R. 1997. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquat. Microb. Ecol.* **13** (1): 19 – 27.

- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., González, H., y Gaytán, M. 1993. Comparative description basic chemistry of crater-lakes in Puebla State, Mexico. *Verh. Int. Ver. Limnol.* **25**: 435-440.
- Vrede, K., Vrede, T., Isaksson, A., y Karlsson, A. 1999. Effects of nutrients (phosphorus, nitrogen, and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton: a seasonal study. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1616-1624.
- Wallner, G., Amann, R., y Beisker, W. 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136-143.
- Weisse, T. 1993. Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. *Adv. Microb. Ecol.* (Jones JG, ed), pp **13**: 327-370. Plenum Press.
- Yamada, K., Kamagata, Y., Nakamura, K., Inamori, Y. y Nakamura, I. 1994. Selectivity of food bacteria for the growth of anaerobic ciliate *Trimyema compressum*. *Arch. Hydrobiol.* **161**: 229-233.
- Yooseph, S., Neelson, K., Rusch, D.B., et al. 2010. Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature* **468**: 60 – 67.