



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES – IZTACALA

FÓSFORO, NITRÓGENO Y SÍLICE COMO REGULADORES DE LA BIOMASA Y LA
COMPOSICIÓN DE ESPECIES FITOPLANCTÓNICAS EN EL LAGO ALCHICHICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANDREA DEL PINO BASTIDA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. JAVIER ALCOZER DURAND – FES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DR. MARTÍN MERINO IBARRA – ICMYL, UNAM.

DRA. ELIZABETH ORTEGA MAYAGOITIA – FES IZTACALA, UNAM.

DRA. GLORIA VILA CLARA FATJÓ – FES IZTACALA, UNAM.

DR. JAVIER CARMONA JIMÉNEZ – FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MÉXICO, D. F., NOVIEMBRE 2013



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier Alcocer Durand por brindarme la oportunidad de aprender y contribuir al trabajo que realiza y por todo el apoyo durante la realización de esta tesis. A mi jurado de tutores por su paciencia y ayuda para enriquecer mi aprendizaje, por la dedicación y conocimiento que pusieron en este tema. Al Dr. Martín Merino Ibarra, por darme siempre ánimo; a la Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, por las tardes invertidas en la tesis; a la Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia por las enriquecedoras pláticas y el análisis minucioso de diferentes puntos de la tesis y al Dr. Javier Carmona Jiménez por ayudarme a entender los conceptos más sencillos pero a la vez más importantes. Gracias por todo lo aprendido de ustedes.

Al Proyecto en Investigación en Limnología Tropical de la FES Iztacala, UNAM, por las facilidades otorgadas en el laboratorio y campo; a los Doctores con quienes compartí el día a día en el laboratorio, por tener siempre la disponibilidad para ayudarme cuando lo necesité y que hicieron que mi trabajo de laboratorio fuera agradable y motivante: M. en C. Laura Peralta Soriano, M. en C. Ma. Guadalupe Oliva Martínez, Dra. Ma. del Rosario Sánchez Rodríguez, Dr. Alfonso Lugo Vázquez, Dr. Miroslav Macek, Dr. Jorge Ciros Pérez. Gracias por compartir su conocimiento y tiempo conmigo.

Al Dr. Luis A. Oseguera Pérez y al M. en C. Armando Rodríguez Rocha por el apoyo logístico y su valioso tiempo dedicado a las dudas y contratiempos que tuve en el laboratorio; al Hidrobiólogo Sergio Castillo Sandoval del Laboratorio de Biogeoquímica, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, por la ayuda con el análisis de nutrimentos y a la M. en C. Ma. del Carmen Hernández Fonseca por brindarme un consejo oportuno y su amistad.

Al Programa de Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, por haberme cobijado como alumna durante estos años y brindarme el mejor lugar para realizar un posgrado. A Diana Juárez Bustos, Guadalupe Godoy Medina, Chantal Ruiz Guerrero y Gabriela Almaraz Mejía por su ayuda oportuna y por ser guía esencial para la realización de los trámites en el posgrado.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al proyecto CONACyT -103332 por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar mis estudios de posgrado.

A los proyectos CONACyT-103332 y PAPIIT IN215512 por el apoyo financiero otorgado para el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIA

Llegar a este punto representa un cúmulo de vivencias y sentimientos, por tal motivo dedico este logro a la vida por la oportunidad de permitirme disfrutar del crecimiento profesional y personal adquirido a lo largo de mis estudios de posgrado.

A mis "angelitos" que en donde están me siguen acompañando.

A Oscar por llegar en el momento correcto a hacer más felices mis días, por compartir la vida, la alegría y los sueños, por ser mi más grande apoyo en las decisiones y planes de hoy y mañana.

A mis padres por darme un motivo para ser quien ahora soy, por el apoyo, la paciencia y el cariño brindado, por estar ahí, por el esfuerzo invertido y por darme la libertad de ejercer mis decisiones.

A Everett, Daniela, Regina, Diego y mis sobrinos porque esto es solo una pauta de que pueden lograr cualquier propósito en su vida. Estaré ahí para apoyarlos y verlos triunfar.

A mis tíos por su apoyo, comprensión y por ser parte fundamental de mi formación temprana. Mi vida ha sido afortunada gracias ustedes.

A mis amigos que han estado oportunamente para escucharme, por brindarme su apoyo durante todos estos años, gracias por estar a mi lado.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	4
Antecedentes	5
Objetivo general	8
• Objetivos particulares	8
Hipótesis	8
Material y método	
• Área de estudio	9
• Trabajo en campo	9
• Nutrientes	10
• Nutrientes limitantes	11
• Composición específica, abundancia y biomasa del fitoplancton de la capa de mezcla	12
• Bioensayos de enriquecimiento con nutrientes	13
Análisis estadístico	16
Resultados	17
Capa de mezcla en el ciclo anual.	17
1. Condiciones del medio abiótico.	17
○ Capa de mezcla	17
○ Temperatura	18
○ Oxígeno disuelto	18
○ Nutrientes	19
• Concentraciones absolutas	19
• Proporciones estequiométricas	23
2. Composición específica, abundancia y biomasa (por clorofila <i>a in vivo</i> y biovolumen) del fitoplancton en capa de mezcla.	24
Bioensayos de enriquecimiento con nutrientes.	28
1. Respuesta del fitoplancton a la adición de nutrientes.	28
2. Composición específica, abundancia y biomasa (por clorofila <i>a in vivo</i> y biovolumen) del fitoplancton en bioensayos.	33
○ Muestras iniciales (T0)	33
○ Muestras finales (Tf control, N+P y N+P+Si)	34
Tratamiento final control.	34
Tratamiento final N+P.	36
Tratamiento final N+P+Si.	38
3. Análisis estadísticos de los tratamientos.	40
Discusión	42
Conclusiones	51
Recomendaciones	53
Bibliografía	54

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Agitador orbital en el cuarto de cultivo con los bioensayos. Los colores en el cuello de los matraces Erlenmeyer identifican los distintos tratamientos.	pp 15
Figura 2	Variación de la profundidad de capa de mezcla (Z_{MIX}) (m) en el lago Alchichica.	17
Figura 3	Temperatura promedio (\pm d. e.) de la capa de mezcla del lago Alchichica.	18
Figura 4	Concentración promedio (\pm d.e.) de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) en la capa de mezcla del lago Alchichica.	19
Figura 5	Concentración promedio (\pm d.e.) de fósforo reactivo soluble (FRS) en la capa de mezcla.	20
Figura 6	Concentración promedio (\pm d.e.) de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en la capa de mezcla.	22
Figura 7	Concentración promedio (\pm d.e.) de sílice reactivo soluble (SiRS) en la capa de mezcla.	22
Figura 8	Variación de las proporciones estequiométricas en la capa de mezcla (modificado de Xu <i>et al.</i> , 2008) en el lago Alchichica en el periodo septiembre 2009-septiembre 2010.	23
Figura 9	Contribución en biomasa (%) de los principales grupos fitoplanctónicos al inicio de los bioensayos (T0) antes de agregar nutrientes.	25
Figura 10	Concentración promedio de la clorofila <i>a</i> (\pm d.e.) <i>in vivo</i> para T0 en la capa de mezcla en las diferentes épocas hidrodinámicas del lago.	26
Figura 11	Variación temporal de biomasa (>5%) por especie al comenzar el experimento (T0).	27
Figura 12	Variación de la concentración de clorofila <i>a</i> (promedio \pm d.e.) en los bioensayos durante 2009-2010.	29- 32
Figura 13	Contribución en biomasa (%) de los principales grupos fitoplanctónicos en los tratamientos control al final de los experimentos (Tf control).	34
Figura 14	Variación temporal de la biomasa por especie entre los tratamientos T0 y Tf control para 2009-2010.	35
Figura 15	Contribución en biomasa (%) de los principales grupos fitoplanctónicos en los tratamientos N+P al final de los experimentos (Tf N+P).	36
Figura 16	Variación temporal de la biomasa por especie entre los tratamientos T0 y Tf N+P para 2009-2010.	37
Figura 17	Contribución en biomasa (%) de los principales grupos fitoplanctónicos en los	38

tratamientos N+P+Si al final de los experimentos (Tf N+P+Si).

Figura 18	Variación temporal de la biomasa por especie entre los tratamientos T0 y Tf N+P+Si para 2009-2010.	39
Tabla 1	Concentraciones de nutrientes consideradas limitantes para el crecimiento fitoplanctónico por diversos autores.	11
Tabla 2	Volumen de muestra y nutrientes utilizado en cada tratamiento para los bioensayos.	14
Tabla 3	Taxa identificados en la capa de mezcla de Alchichica para T0.	24
Tabla 4	Taxa identificados en los tiempos finales (Tf).	33
Tabla 5	Valores del análisis ANDEVA realizado para cada mes donde se compara la concentración del Clor <i>a</i> del control y todos los tratamientos al finalizar los bioensayos.	41

Resumen

Alchichica es un lago oligotrófico con una concentración de silicatos (Si) particularmente limitada ($<100 \mu\text{g L}^{-1}$); sin embargo, la biomasa fitoplanctónica se encuentra dominada por diatomeas de gran tamaño ($> 50 \mu\text{m}$). Por lo anterior, la finalidad de este estudio es explorar el papel que juegan los nutrientes, en particular Si, en la limitación de la producción y composición de la biomasa fitoplanctónica.

Para lo anterior, se emplearon diferentes aproximaciones con el fin de identificar la magnitud de la limitación y él o los nutrientes que más frecuentemente limitan el crecimiento fitoplanctónico a lo largo de un ciclo anual (septiembre 2009 a septiembre 2010): a) el análisis de la concentración de los diferentes nutrientes, además de la proporción estequiométrica entre ellos, b) la implementación de una serie de bioensayos de enriquecimiento con diferentes tratamientos, contemplando nitrógeno (N), fósforo (P) y, por vez primera en Alchichica, sílice (Si), y c) la observación y recuento directo de muestras que permitieron conocer la composición y dominancia de las diferentes especies del fitoplancton al finalizar los bioensayos.

En el ciclo anual y con base en las relaciones estequiométricas, el nutriente que limitó el crecimiento fitoplanctónico durante todo el periodo resultó ser el N, seguido del Si; éste último, principalmente en la época de estratificación tardía y circulación cuando se presentan florecimientos de diatomeas, al grado que incluso se puede considerar una co-limitación de N y Si. El P sólo resultó limitante en el mes de julio, que corresponde a la estratificación bien establecida. A lo largo del ciclo anual, la biomasa fitoplanctónica en la zona de mezcla del lago resultó dominada por las diatomeas la mayor parte del tiempo y por algunas cianoprocariontas (*Nodularia spumigena* y *Epiglophaera* sp.) en mayo, julio y septiembre 2010.

Los resultados experimentales muestran que los tratamientos N+P y N+P+Si fueron los que indujeron los mayores incrementos en biomasa fitoplanctónica. Sólo la combinación de los dos o tres nutrientes logró estimular el crecimiento fitoplanctónico en los bioensayos. Lo anterior confirma tanto la oligotrofia del lago como la existencia de co-limitación, ya que es necesaria la adición conjunta de nutrientes para obtener un crecimiento significativamente diferente al del control y al obtenido con la adición de tan solo un nutriente.

En el tratamiento N+P se promovió principalmente el incremento de la biomasa de clorofitas (*Monoraphidium dybowskii*). En el tratamiento N+P+Si fueron dominantes la misma clorofita y la cianoprocarionta *Epiglophaera* sp. Hay que resaltar que en el tratamiento N+P+Si se presentó mayor biomasa de diatomeas que en N+P. Sin embargo, la adición solamente de Si no promovió el crecimiento de las diatomeas, ni de los otros grupos. Por lo tanto, bajo las condiciones experimentales utilizadas, se deduce una co-limitación permanente.

Se observa que las diferentes respuestas a las combinaciones de nutrimentos se relacionan con la composición fitoplanctónica. Mientras que la aproximación del ciclo anual muestra limitación *in situ* (en el lago), donde la biomasa fitoplanctónica se encuentra dominada por las diatomeas y cianoprocariontes, los bioensayos de laboratorio muestran que son algunas especies de clorofitas y cianoprocariontes las que toman ventaja del enriquecimiento proporcionado, dominando la biomasa fitoplanctónica al final de los experimentos.

Abstract

Oligotrophic lake Alchichica is particularly limited in silicates (Si) concentration ($<100 \mu\text{g L}^{-1}$); however, large ($> 50 \mu\text{m}$) diatoms dominate the phytoplankton biomass. The aim of this study was to explore the role nutrients play in limiting phytoplankton growth and composition with particular emphasis in Si.

We used different approaches to identify the nutrient or nutrients that most likely are limiting the phytoplankton growth in Alchichica along an annual cycle (2009-2010): a) through the analysis of concentration of nutrients in addition to the stoichiometry ratio; b) through a series of nutrient enrichment bioassays considering nitrogen (N), phosphorus (P), and for the first time, for Alchichica lake, silica (Si); and c) the observation and direct count of samples that allow us to identify the composition and dominance of the different phytoplankton species at the end of the bioassays.

In the annual cycle and based on stoichiometric ratios, the nutrient that limits the phytoplankton growth throughout the year was N, followed by Si; silicates were limiting particularly during the late stratification and circulation periods when a diatom bloom takes place, even through this period, it could be considered that N and Si co-limited the phytoplankton growth. P limited phytoplankton growth only in July (well-established stratification). Throughout the annual cycle, diatoms dominate the phytoplankton biomass in the mixing zone of the lake most of the time and by some cyanobacteria (i.e., *Nodularia spumigena* and *Epiglosphaera* sp.) in may, july and september 2010.

The nutrient enrichment experiments revealed that N+P and N+P+Si treatments promoted the largest increases in phytoplankton biomass. Only combinations of two or three nutrients stimulated phytoplankton growth. This fact confirms both the oligotrophic status of the lake and the presence of a nutrient co-limitation, since its necessary to provide two or three nutrients to attain a phytoplankton growth above the control treatment and to that obtained with the addition of only one nutrient.

The N+P treatments promoted mostly chlorophytes (i.e., *Monoraphidium dybowskii*). Meanwhile, the N+P+Si treatments stimulated the same chlorophyte species as well as the cyanobacteria *Epiglosphaera* sp. It should be noted that the diatom biomass was larger in N+P+Si than in N+P treatments. Nevertheless, as mentioned before, the single addition of Si failed to promote the diatom –and other phytoplankton groups- growth. Hence, under the experimental conditions herein applied, the conclusion is that lake Alchichica has a permanent nutrient co-limitation.

The different deduction obtained through the two approaches may be related with the phytoplankton composition. While the first method shows an *in situ* limitation where phytoplankton biomass along the annual cycle is dominated by the diatoms and cyanobacteria, the bioassays show that some species of chlorophyte and cyanobacteria took advantage of the experimental conditions and dominate the phytoplankton biomass at the end of experiments.

INTRODUCCIÓN

Un aspecto fundamental de la ecología lacustre o limnoecología es el estudio de la producción primaria -entendida como la generación de materia orgánica mediante la fotosíntesis- que se lleva a cabo, entre otros grupos, por el fitoplancton, esto es, los microorganismos fotosintéticos suspendidos en la columna de agua a merced de los movimientos que se dan en ella. Cuando el fitoplancton realiza la fotosíntesis aumenta su biomasa -entendida como la masa o peso de la materia viva por unidad de área o volumen en un momento dado-, la cual resulta de suma importancia en algunos análisis de la dinámica de producción en poblaciones vegetales (Wetzel, 2001).

Para que el fitoplancton pueda generar su biomasa, es indispensable la disponibilidad de diversos recursos, entre los que se encuentran carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre y fósforo, además de calcio, potasio, cloro, magnesio, hierro y -en algunos casos- sílice. Algunos de estos elementos se clasifican como nutrimentos, entre los cuales el nitrógeno y el fósforo son considerados elementos clave dentro del contexto de los nutrimentos limitantes para el fitoplancton (Lewis, 1996).

Un nutrimento limitante será aquel que limita la tasa de crecimiento o la producción de biomasa debido a la escasez del mismo (Lampert y Sommer, 1997). El concepto de nutrimento limitante se deriva de la ley del mínimo de Liebig (de Baar, 1994), la cual se refiere a que el crecimiento no es controlado por el total de nutrimentos disponibles, sino por el que se encuentra disponible en menor cantidad con respecto a los requerimientos del fitoplancton (Barsanti y Gualtieri, 2006). Esta ley, que tienen su origen en la agronomía, propiamente se aplica a la biomasa final que se alcanza en un tiempo dado más que a la velocidad en que ésta se acumula, en cuyo caso sería necesario referir a la limitación de Blackman, la cual describe el efecto de un factor en la velocidad del proceso o bien a la velocidad del crecimiento y que viene determinado por la disponibilidad del nutrimento limitante (MacIntyre y Cullen, 2005).

En la literatura limnológica es común encontrar que el fósforo, más que el nitrógeno, es el nutrimento que, en la mayor parte de los casos, limita la producción primaria, sobre todo porque la mayoría del conocimiento con el que se cuenta procede de lagos templados. Sin embargo, en el caso específico de lagos y ríos tropicales, numerosos estudios muestran que el nitrógeno actúa frecuentemente como nutrimento limitante de la producción primaria, sobre todo en regiones volcánicas, en donde abunda el fósforo y éste es transportado a los cuerpos de agua debido a su

meteorización; si, además, los cuerpos acuáticos son alcalino-sódicos, carecen de alguno de los mecanismos de eliminación de fósforo en solución (p.ej., co-precipitación de P con CaCO_3 , Golterman 2004).

Por otro lado también puede ocurrir que más de un nutriente limite la producción primaria, en cuyo caso se habla de una "co-limitación", al considerarse más de un nutriente limitante; el concepto se utiliza cuando la tasa de crecimiento se ve influenciada simultáneamente por dos nutrientes limitantes (Saito *et al.*, 2008).

El estudio de la limitación que los nutrientes ejercen sobre el fitoplancton es relevante, ya que su disponibilidad en el medio acuático afectará la producción de biomasa (Lewis y Wurtsbaugh, 2008), provocará un crecimiento deficiente (Barsanti y Gualtieri, 2006) e incluso modificará la composición de especies del fitoplancton (Sakka *et al.*, 1999). De este modo resulta conveniente comprender el papel del fósforo (P), nitrógeno (N) y silice (Si) en un lago tropical monomictico cálido que se caracteriza por ser oligotrófico y así poder entender si esto determina la composición fitoplanctónica en lagos con dichas características como es el caso de Alchichica en Puebla.

ANTECEDENTES

Oliva *et al.* (2001) han catalogado a Alchichica como un lago oligotrófico con base en la concentración promedio de clorofila *a* ($< 5 \mu\text{g l}^{-1}$) y los nutrientes FRS ($0.04 \pm 0.08 \text{ mg l}^{-1}$) y NID ($0.38 \pm 0.27 \text{ mg l}^{-1}$). Utilizando el cociente de Redfield (NID:FRS) estos autores indican que durante el periodo en que analizaron existió limitación por fósforo en enero, mientras que durante febrero y marzo pareció ser por nitrógeno, para luego volver a ser por fósforo otra vez en abril y mayo, cuando se presentó un florecimiento de la cianoprocarionta fijadora de nitrógeno *Nodularia spumigena* Bornet et Flahault 1886, y con ello, un incremento en la concentración de NID. Durante la estratificación, los niveles de NID decrecen, pero el fósforo continúa limitando.

La realización de bioensayos de enriquecimiento con nutrientes es una técnica que ha sido ampliamente usada como indicador del nutriente que tiene el potencial o que posiblemente limita el crecimiento fitoplanctónico (Ault *et al.*, 2000). El procedimiento de estos bioensayos tiene su origen en la modificación del enunciado de la ley del mínimo de Liebig ya que, como se mencionó antes, puede suceder que no sea solo un nutriente el que esté limitando el crecimiento del fitoplancton sino que pueden hacerlo varios nutrientes simultáneamente.

En el lago Alchichica también se han realizado ese tipo de experimentos para conocer cuál es el nutrimento que limita a la comunidad fitoplanctónica. Tal es el caso de Ramos-Higuera *et al.* (2008) quienes concluyen, con base en experimentos realizados en microcosmos y su corroboración a través del cociente de Redfield obtenido ($\text{NO}_3:\text{PO}_4 < 16$), que el nitrógeno es el principal nutrimento que limita la producción primaria en este lago; incluso mencionan que se obtiene un crecimiento mayor del fitoplancton con la adición de los dos nutrimentos juntos, N+P, lo que sugiere una co-limitación.

Por otro lado, Ramírez-Olvera *et al.* (2009) encontraron que existe una variación temporal en el nutrimento limitante de la productividad primaria en el lago Alchichica, lo cual explicaría el recambio fitoplanctónico que describen Oliva *et al.* (2001). Además, los primeros autores apuntan que es probable que la alternancia en los nutrimentos limitantes responsables del crecimiento fitoplanctónico de Alchichica sea consecuencia de una combinación de las condiciones naturales y del impacto antropogénico, como el uso de fertilizantes agrícolas, asociadas a la hidrodinámica del cuerpo acuático (monomixis cálida) a lo largo del año.

Por otro lado, Adame *et al.* (2008) consideraron que tanto la disponibilidad de sílice como la proporción Si:N son, al parecer, los factores clave en la regulación de la cantidad de biomasa de diatomeas que se genera en Alchichica durante el florecimiento invernal de diatomeas que se presenta en la etapa de circulación del lago. Ellos sugieren que las bajas concentraciones de sílice registradas en Alchichica pudieran deberse al corto tiempo de residencia hidráulica del lago, el cual no permite la plena meteorización de los materiales ricos en sílice de la cuenca, de manera que no se favorece la liberación del sílice. Por lo anterior, al encontrarse el sílice en baja concentración, los florecimientos de diatomeas tendrán el potencial de remover el total del sílice disponible, con lo cual se regula la presencia y abundancia de diatomeas así como la abundancia y composición del fitoplancton en general.

Por otro lado, Ardiles *et al.* (2012) señalan que los flujos de sílice particulado (exportación por debajo de la termoclina) en Alchichica son muy altos en comparación con otros lagos oligotróficos y que la diatomea *C. alchichicana* Oliva, Lugo, Alcocer *et Cantoral-Uriza* 2006 es la especie más representativa en dichos flujos ya que por su gran tamaño tiene una alta velocidad de sedimentación. También apuntan que las concentraciones absolutas de sílice en Alchichica son menores a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentración limitante propuesta por Reynolds, 1999) en siete de los doce meses muestreados. Como ejemplo de ello, los autores muestran las concentraciones

absolutas obtenidas en el mes de enero ($87 \pm 26 \mu\text{g L}^{-1}$) y mayo ($50 \pm 26 \mu\text{g L}^{-1}$). Sin embargo, según las proporciones N:Si (>1) y Si:P (<16), únicamente existiría limitación de sílice en el mes de enero lo cual coincide con la época del florecimiento de diatomeas en el lago.

A pesar de la evidencia indirecta referida acerca de la relevancia potencial del sílice como limitante del crecimiento fitoplanctónico en Alchichica, hasta el presente estudio no se habían efectuado bioensayos de enriquecimiento que consideraran la adición de sílice. Como se señaló, el sílice es de vital importancia porque modifica marcadamente la estructura de la comunidad fitoplanctónica, al impactar directamente al grupo de las diatomeas, las cuales son el componente dominante de la biomasa fitoplanctónica del lago Alchichica.

OBJETIVO GENERAL

Elucidar el papel de la limitación de nutrientes (NID, FRS, SiRS) en la composición y producción de biomasa fitoplanctónica en la capa de mezcla del lago Alchichica, con particular énfasis en el silice, a lo largo de un ciclo anual (septiembre 2009 a septiembre 2010).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar el medio abiótico (Z_{MIX} , temperatura, oxígeno disuelto) y la concentración de nutrientes (FRS, NID y SiRS) en la capa de mezcla durante el ciclo anual.
2. Describir la composición específica, abundancia y biomasa del fitoplancton en la capa de mezcla durante el ciclo anual.
3. Realizar bioensayos de adición de nutrientes en forma individual y combinada.
4. Identificar cuáles son los nutrientes limitantes para el crecimiento fitoplanctónico a lo largo del ciclo anual y a través de los bioensayos de enriquecimiento en microcosmos de laboratorio.
5. Identificar cuáles son las especies que son limitadas en su crecimiento por la disponibilidad de nutrientes a lo largo del ciclo anual.

HIPÓTESIS

1. Con base en estudios previos, en la capa de mezcla se espera una marcada limitación por NID y SiRS durante las épocas de estratificación del lago y en particular de SiRS durante la circulación cuando dominan las diatomeas.
2. La disponibilidad de nutrientes (cantidad y proporción) tendrá efecto en los cambios en la composición de especies y biomasa del fitoplancton a lo largo del ciclo anual.
3. El tratamiento con adición de N+P favorecerá un aumento de biomasa en los grupos de clorofitas y cianoprocariontas, principalmente, mientras que el tratamiento con adición de N+P+Si favorecerá, además, el aumento de la biomasa en el grupo de las diatomeas.

MATERIAL Y MÉTODO

Área de estudio.

Alchichica se localiza en el estado de Puebla a una latitud de 19° 24' N, una longitud de 97° 24' O y una altitud de 2,350 m s.n.m. Tiene un área superficial de 2.3 km², un perímetro de 5.06 km, una profundidad máxima de 62 m y una profundidad promedio de 40.9 m; su volumen es de 94, 214,080 m³ (Filonov *et al.*, 2006). Es considerado un lago hiposalino ($8.5 \pm 0.2 \text{ g l}^{-1}$) y los iones predominantes son sodio, magnesio, cloruros y bicarbonatos (Vilaclara *et al.*, 1993).

Por su comportamiento térmico se clasifica como un lago monomíctico cálido con circulación en invierno (de fines de diciembre o inicios de enero a finales de marzo o principios de abril), correspondiente a la época fría y seca (Alcocer *et al.*, 2000).

La región en donde se ubica el lago, llamada llanos de San Juan, se ha descrito como desértica fría (Alcocer *et al.*, 2000). Su clima se caracteriza por ser semi-seco templado con lluvias en verano (García, 1980). El régimen de precipitación anual es menor a los 500 mm, por otro lado, la tasa de evaporación anual es de alrededor de 1,690 mm (Adame *et al.*, 2008). La temperatura anual media es de 12.9 °C (Oseguera *et al.*, 2010).

Su origen es volcánico debido a que surgió por explosiones volcánicas que produjeron rompimientos del manto freático formando un cráter que con el paso del tiempo fue ocupado por agua; este tipo de lagos se denominan "maar" (Arredondo *et al.*, 1983).

Trabajo en campo.

Los muestreos en Alchichica se realizaron con una frecuencia aproximadamente mensual a lo largo de un año (septiembre 2009-septiembre 2010) en una estación ubicada en la porción central y más profunda del lago. Las muestras de agua se tomaron de la capa de mezcla (Z_{MIX}). Para determinar el grosor de la capa de mezcla se analizaron los perfiles de temperatura y oxígeno disuelto obtenidos mediante una sonda multiparamétrica Hydrolab modelo Datasonde 4 conectada a un almacenador de datos Hydrolab modelo Surveyor 4.

Con una botella Niskin de 1.5 litros de capacidad se recolectaron muestras de agua de distintas profundidades de la capa de mezcla para así obtener una muestra integrada. La muestra fue filtrada a través de una malla de 100 μm para eliminar el zooplancton de gran tamaño antes de depositarla en un garrafón de plástico semi translúcido de 20 litros.

Para determinar la concentración de los nutrientes disueltos (fósforo reactivo soluble FRS, nitrógeno inorgánico disuelto NID y sílice reactivo soluble SiRS) se requirió filtrar el agua del lago utilizando filtros de membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de apertura de poro, almacenándose en viales de plástico en la oscuridad y congelación. El resto del agua se reservó para los ensayos de enriquecimiento, manteniéndose en la oscuridad durante su transporte al laboratorio.

Nutrientes.

Los nutrientes fueron analizados en el Laboratorio de Biogeoquímica Acuática del ICMYL-UNAM por el Hidrobiól. Sergio Castillo utilizando un auto-analizador de flujo segmentado Skalar San Plus con el que fue posible la determinación simultánea de NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , FRS y SiRS. Para ello, se utilizaron los métodos estándares adaptados por Grasshoff *et al.* (1983) y circuitos sugeridos por Kirkwood (1994). La precisión de los análisis con este sistema fue: nitrato 0.1 μM , nitrito 0.02 μM , amonio 0.1 μM , FRS 0.04 μM , y SiRS 0.1 μM . Cabe destacar que estos métodos son adecuados para el análisis de nutrientes de aguas oligotróficas, como es el caso del lago Alchichica.

Nutrientes limitantes.

Para conocer cuáles son los nutrientes que potencialmente limitan el crecimiento fitoplanctónico en el lago Alchichica se utilizaron los valores de concentraciones absolutas de FRS, NID y SiRS y las proporciones estequiométricas propuestas por varios autores como se indica en la tabla 1:

Tabla 1. Concentraciones de nutrimentos consideradas limitantes para el crecimiento fitoplanctónico por diversos autores.

Autor	Aproximación utilizada	Criterio de limitación
Reynolds (1999)	Concentraciones absolutas	Por N debajo de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Por P debajo de $3 \mu\text{g L}^{-1}$.
Interlandi et al. (1999)	Proporción estequiométrica	40Si:1P y 3Si:1N para diatomeas
Redfield (1958)	Proporción estequiométrica	1P:16N
Xu et al. (2008)	Proporción estequiométrica	Por N al obtener $\text{N:P} < 16$ y $\text{N:Si} < 1$; por P con $\text{N:P} > 16$ y $\text{Si:P} > 16$ y por Si con $\text{N:Si} > 1$ y $\text{Si:P} < 16$.

El empleo de las proporciones estequiométricas existentes entre los nutrimentos se basa en el supuesto de que bajo ciertas condiciones, el fitoplancton tiene una proporción relativamente definida en cuanto a las proporciones de sílice, nitrógeno y fósforo que requiere. Estos elementos fluctúan en los ciclos biogeoquímicos y la cantidad disponible de estos en el agua afectará el crecimiento y la composición del plancton (Hecky et al., 1993; Sterner et al., 2008). La proporción molar Si:N:P que generalmente se utiliza es 16:16:1 la cual se considera para un ambiente en donde existen nutrimentos en abundancia (Xu et al., 2008). Este análisis generalmente se emplea como un indicador del nutrimento que potencialmente limita el crecimiento fitoplanctónico según las concentraciones ambientales (Xu et al., 2008).

Composición específica, abundancia y biomasa (por biovolumen y clorofila *a in vivo*) del fitoplancton en la capa de mezcla.

Para describir la dinámica del fitoplancton en el lago, cada mes se tomó una alícuota de 500 ml del garrafón y se fijó con una solución ácida de lugol (1% concentración final) para su posterior identificación, cuantificación y cálculo de biomasa.

El procedimiento consistió en la revisión exploratoria mediante un microscopio invertido Leica modelo DM IRB de cada muestra antes de comenzar la cuantificación para observar qué especies se encontraban presentes y llevar un registro de la especie correspondiente. Las especies fueron identificadas tomando como base los trabajos de Oliva (2001), Oliva *et al.* (2006, 2008), y Rosiles-González (2005).

Posteriormente, para la cuantificación se empleó el método de Utermöhl (Lund *et al.*, 1958) partiendo de las muestras antes mencionadas de las cuales se sedimentó un volumen variable -desde 0.5 ml para las muestras con más células hasta 100 ml para las que tenían pocas células-, dependiendo de qué tan concentradas se encontraron al momento del muestreo.

Para la observación al microscopio se utilizaron los objetivos de 20x, 40x, 63x y - en algunos casos- 100x, dependiendo del tamaño de los individuos y, considerando sólo aquellas células en aparente buen estado hasta llegar a contabilizar 100 individuos de la especie más abundante en cada objetivo, con lo cual se garantiza un intervalo de confianza del $\pm 20\%$ (Lund *et al.*, 1958) en cada muestra.

Después de que se obtuvieron los registros por especie y por muestra, se procedió a calcular la densidad (cel ml^{-1}). Posteriormente se calculó el biovolumen (μm^3), considerando los modelos geométricos propuestos por Sun y Liu (2003). Finalmente para calcular la biomasa (mg L^{-1}) para cada especie se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa} = (\text{cel ml}^{-1}) (\text{mg cel}^{-1}) * 1000$$

Todas las operaciones se realizaron en una hoja de cálculo Excel. Cabe mencionar que los gráficos de biomasa por muestra consideraron de manera individual solo aquellas especies que contribuyeron con $> 5\%$ de la biomasa total de cada muestra, el resto de las especies con contribuciones $< 5\%$ se conjuntaron en una sola categoría (bajo la denominación de "otras") con el fin de simplificar las gráficas.

Para obtener la concentración de clorofila *a in vivo* ($\mu\text{g L}^{-1}$) se tomó una alícuota de 4 ml aproximadamente de cada uno de los matraces de cada mes para contar con un valor inicial (T0) de referencia para dar inicio a cada uno de los 13 bioensayos. Dicha concentración se obtuvo con un fluorómetro digital de campo (Turner Designs, modelo 8000-001), calibrado con un estándar secundario sólido de clorofila *a* cada vez que se utilizaba.

Bioensayos de enriquecimiento con nutrientes.

El uso de esta aproximación consiste en el mantenimiento de alícuotas de una misma muestra de fitoplancton bajo condiciones controladas, en donde la variable es la adición diferencial de nutrientes para determinar cuál o cuáles se encuentran escasos (Maestrini *et al.*, 1984). La limitación que se ejerza sobre el fitoplancton se reconoce al observar aquellas curvas de mayor crecimiento tras la adición de nutrientes (EPA, 1978), es decir, evaluando los cambios en la concentración de Clor *a* durante los bioensayos.

Previamente al desarrollo de los bioensayos se prepararon las soluciones de nutrientes requeridas. Se consideró que las concentraciones en los tratamientos fueran mayores a las que en promedio se encuentran disueltas en el lago para asegurar la saturación del fitoplancton del nutriente correspondiente, según el tratamiento, para favorecer la máxima tasa de asimilación por parte del fitoplancton en cada caso (López-Anaya, com. pers.). Dichas concentraciones son mayores, como se ha visto, a las referidas por Reynolds (1999) e Interlandi *et al.* (1999) como limitantes para el fitoplancton. Las concentraciones finales de las soluciones de nutrientes se detallan a continuación: NaNO_3 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ y NH_4Cl a $34 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para el tratamiento de N); KH_2PO_4 a $3.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para el tratamiento de P); y NaSiO_3 a $44 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para el tratamiento de Si). Estas soluciones se mantuvieron en refrigeración y oscuridad hasta su utilización para evitar cambios fotoquímicos (EPA, 1978).

Se lavaron los matraces empleados (tipo Erlenmeyer con capacidad de 500 ml) para los diferentes tratamientos utilizando jabón libre de fosfatos, enjuagándose varias veces con agua corriente y luego con agua desionizada (EPA, 1978). Posteriormente se lavaron con HCl al 10% (adicionando 1.85 ml a cada matraz y llenándolos con agua desionizada), dejándolos reposar el mayor tiempo posible para asegurar que no quedara ningún tipo de materia orgánica que pudiera interferir con los experimentos y, posteriormente, se enjuagaron con agua desionizada nuevamente (EPA, 1978).

Los experimentos se llevaron a cabo aproximadamente 24 hrs después del muestreo. Se colocaron 500 ml de agua del lago en cada matraz y se adicionó la solución de cada uno de los nutrientes según el tratamiento con la finalidad de alcanzar las concentraciones antes mencionadas. Los tratamientos incluyeron el control, así como adiciones con N, P, Si, N+P, N+Si, P+Si y N+P+Si, con cuatro réplicas cada uno. El detalle de los tratamientos empleados para cada muestra se presenta en la Tabla 2:

Tabla 2. Volumen de muestra y nutrientes utilizado en cada tratamiento para los bioensayos.

Tratamiento	Muestra de agua (ml)	Solución de nutrientes (ml)	Volumen final (ml)
Control	500	0	500
N	500	1 ml de NaNO ₃ 1 ml de NH ₄ Cl	502
P	500	1 ml de KH ₂ PO ₄	501
Si	500	1 ml de NaSiO ₃	501
N+P	500	1 ml de NaNO ₃ 1 ml de NH ₄ Cl 1 ml de KH ₂ PO ₄	503
N+Si	500	1 ml de NaNO ₃ 1 ml de NH ₄ Cl 1 ml de NaSiO ₃	503
P+Si	500	1 ml de KH ₂ PO ₄ 1 ml de NaSiO ₃	502
N+P+Si	500	1 ml de NaNO ₃ 1 ml de NH ₄ Cl 1 ml de KH ₂ PO ₄ 1 ml de NaSiO ₃	504

A continuación se preparó la cámara de cultivo a una temperatura similar a la temperatura promedio de la capa de mezcla ($18 \pm 3^\circ\text{C}$ promedio anual) y bajo un fotoperiodo también similar al que se presenta en el lago (12 h luz: 12 h oscuridad). Para la iluminación se utilizaron 12 focos de luz blanca (Neolux El espiral 45W/865 E-26), con los cuales se obtuvo una intensidad de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la cual fue corroborada utilizando un sensor de irradiancia escalar marca Biospherical Instruments. Dicho valor se calculó con base en la iluminación promedio presente en la capa de mezcla del lago Alchichica observada en los muestreos que se realizan cada año (López-Anaya, *com. pers.*). Los matraces se colocaron en un agitador orbital marca MaxQ 3000 Barnstead Lab-line a 65 rpm para asegurar una agitación constante y evitar la sedimentación del fitoplancton (Fig. 1).



Figura 1. Agitador orbital en el cuarto de cultivo con los bioensayos. Los colores en el cuello de los matraces Erlenmeyer identifican los distintos tratamientos.

La adición de nutrientes se hizo posterior a la lectura de clorofila *a in vivo* al momento T0. Se consideró como día uno del experimento (T1) aquel en el cual inició el crecimiento de los cultivos después del periodo de aclimatación, lo que normalmente ocurrió un día después a partir de la fecha en que se colocaron los bioensayos, ya que, como se ha visto en cultivos de laboratorio de fitoplancton, existe una fase en la que los organismos se aclimatan para empezar su crecimiento después de uno o dos días (Reynolds, 2006).

A lo largo del experimento se extrajo diariamente una alícuota de 4 ml aproximadamente de cada uno de los matraces para medir la concentración de Clor *a*

($\mu\text{g L}^{-1}$) a la misma hora. Dicho volumen no fue reemplazado. Este procedimiento permitió conocer la evolución del experimento en términos del crecimiento de la biomasa fitoplanctónica, utilizando para ello un fluorómetro digital de campo como se mencionó antes. Se dio por terminado un experimento cuando se observó una disminución en la concentración de Clor a durante dos días consecutivos (EPA, 1978). Al término del experimento (T_f), se fijó con lugol una muestra de agua del control -así como de los tratamientos en que se observó un incremento en la concentración de Clor a (N+P y N+P+Si)- para la observación al microscopio, cuantificación y cálculo de biomasa como ya se ha explicado. Dichos resultados se plasmaron gráficamente en los mismos términos que para las muestras T_0 .

Análisis estadístico.

Las pruebas estadísticas se realizaron con los valores de Clor a *in vivo* registrados para cada tratamiento y el control, en el último día cuando se dio por terminado cada experimento (32 datos por mes).

Previo a la aplicación del análisis de varianza (ANDEVA), se realizó un análisis exploratorio de datos (caja y bigote) por mes para conocer la naturaleza del total de los datos, utilizando el programa SPSS versión 13.0 (SPSS Inc., 2004).

Las pruebas de ANDEVA de una vía se realizaron para detectar si existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada uno de los diferentes tratamientos y el control, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 13.0 (SPSS Inc., 2004). La prueba post hoc que se empleó fue Tukey. Previamente a dicho análisis se verificó que existiera normalidad y homogeneidad de varianzas entre los datos para poder aplicar el estadístico.

RESULTADOS

Capa de mezcla en el ciclo anual.

1. Condiciones del medio abiótico.

A continuación se describen de manera general las características de la capa de mezcla de donde se obtuvieron las muestras empleadas para los bioensayos, considerando la clasificación del lago: estratificación temprana, estratificación bien establecida, estratificación tardía y circulación (Adame *et al.*, 2008; Alcocer *et al.*, 2000).

- o Capa de mezcla.

La profundidad de la capa de mezcla (Fig. 2) varió desde los 7 m, cuando el lago se encontró en estratificación temprana, hasta los 62 m cuando se presentó la circulación. La profundidad promedio de la capa de mezcla fue de 27 ± 17 m. A partir de que el lago se estratifica, la Z_{MIX} alcanza mayor profundidad continuamente a lo largo de todo el periodo de estratificación y se extiende a toda la columna de agua cuando el lago vuelve a circular.

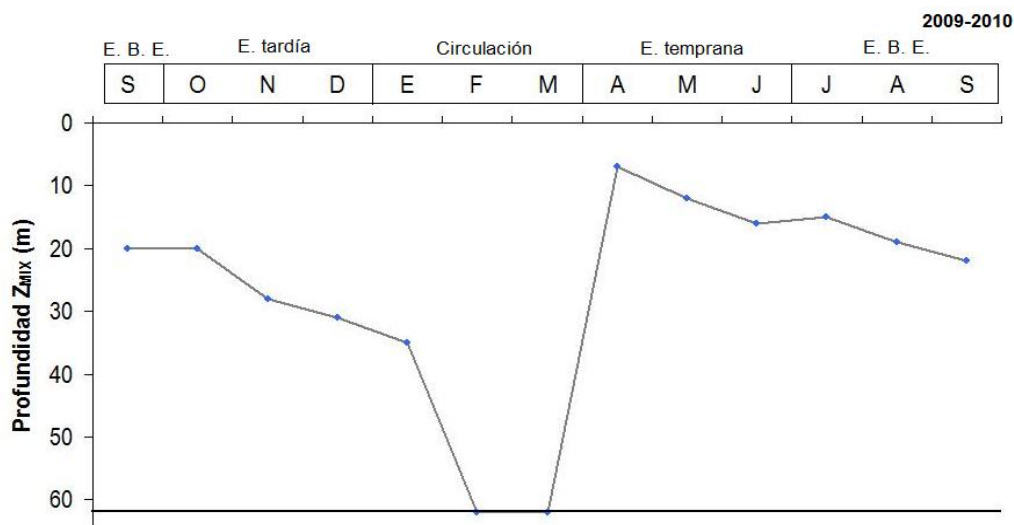


Figura 2. Variación de la profundidad de capa de mezcla (Z_{MIX}) (m) en el lago Alchichica. Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida.

- Temperatura.

La temperatura de la capa de mezcla (Fig. 3) mostró un descenso desde septiembre de 2009 ($19.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$) hasta alcanzar las mínimas en febrero y marzo ($14.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en ambos meses), para aumentar posteriormente hasta alcanzar su máximo en junio y julio (19.2 ± 0.5 y $19.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$, respectivamente), a partir del cual comenzó a descender. El promedio anual de temperatura de la capa de mezcla fue de $17.4 \pm 1.8^\circ\text{C}$.

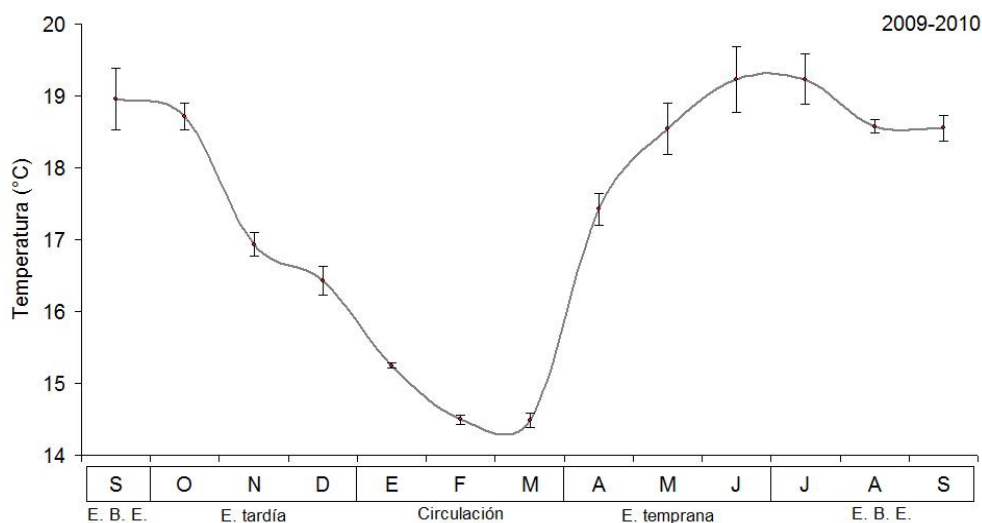


Figura 3. Temperatura promedio (\pm d. e.) de la capa de mezcla del lago Alchichica. Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida.

- Oxígeno disuelto.

La concentración mínima de oxígeno disuelto en la capa de mezcla ($4.5 \pm 1.4 \text{ mg L}^{-1}$) se registró en el mes de febrero durante la circulación (Fig. 4) y paulatinamente fue aumentando hasta alcanzar la concentración máxima ($7.5 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$) en mayo durante la estratificación temprana. El promedio anual de la concentración del oxígeno disuelto de la capa de mezcla fue de $6.3 \pm 0.8 \text{ mg L}^{-1}$. En relación con la saturación, se observó que el epilimnion se encontró alrededor del 100% durante septiembre 2009 y diciembre a excepción de octubre que estuvo justo en el 100%. Durante la circulación, cuando se considera toda la columna de agua, se observó una subsaturación. En la estratificación temprana se dio una sobresaturación en el epilimnion, por arriba del 100% y

paulatinamente, en la estratificación bien establecida se conservó alrededor del 100% de saturación.

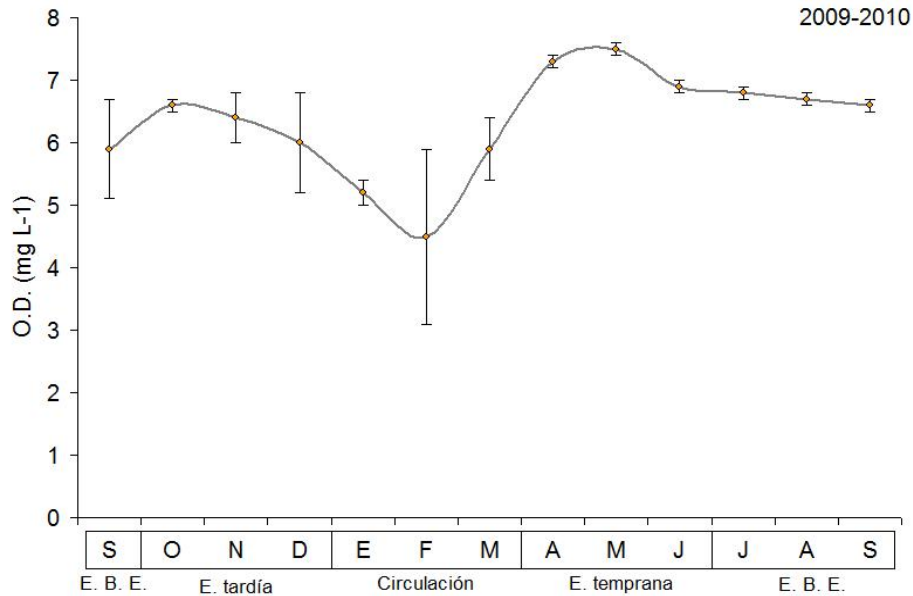


Figura 4. Concentración promedio (\pm d.e.) de oxígeno disuelto (mg L^{-1}) en la capa de mezcla del lago Alchichica. Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida.

- Nutrientes.
- Concentraciones absolutas.

La concentración en la capa de mezcla de los nutrientes considerados se obtuvo mediante el promedio de las muestras disponibles (tres a diez muestras aproximadamente) dependiendo de la profundidad que se observó en dicha capa según el mes de muestreo.

Las concentraciones de FRS (Fig. 5) en la capa de mezcla variaron desde $3.1 \pm 1.4 \mu\text{g L}^{-1}$ (valor mínimo para el mes de julio) hasta $20.4 \pm 3.9 \mu\text{g L}^{-1}$ (máximo para el mes de febrero). El promedio anual para todo el periodo fue de $11.6 \pm 5.6 \mu\text{g L}^{-1}$. Por otro lado, se observó una limitación potencial de FRS en el mes de julio según Reynolds (1999).

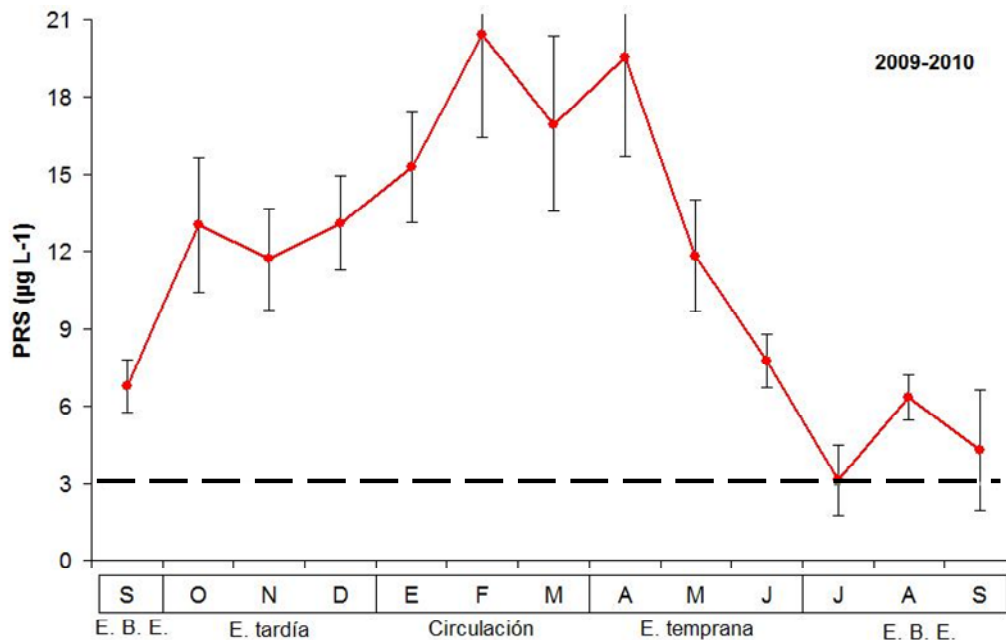


Figura 5. Concentración promedio (\pm d.e.) de fósforo reactivo soluble (FRS) en la capa de mezcla. Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida. La línea punteada indica la concentración por debajo de la cual existe limitación potencial del fitoplancton propuesta por Reynolds (1999).

Para la concentración de NID en la capa de mezcla, se observó una variación de $6.3 \pm 3.8 \mu\text{g L}^{-1}$ (septiembre 2009) hasta $71.3 \pm 2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ (mayo 2010) (Fig. 6). La concentración anual promedio fue de $30.3 \pm 17.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Durante todo el año existió limitación potencial de este nutriente para el fitoplancton según Reynolds (1999).

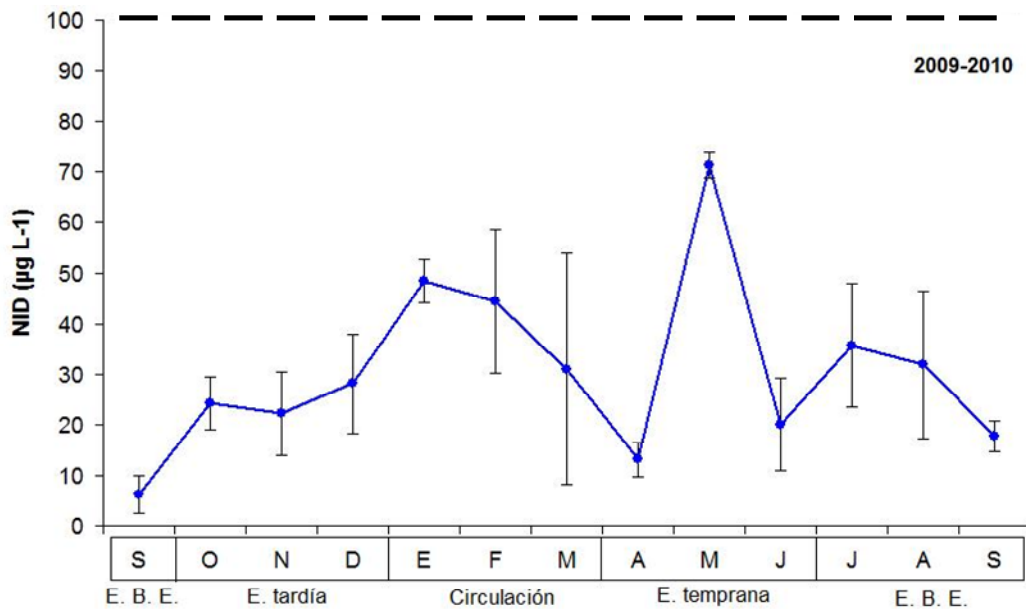


Figura 6. Concentración promedio (\pm d.e.) de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en la capa de mezcla. Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida. La línea punteada indica la concentración por debajo de la cual existe limitación potencial del fitoplancton propuesta por Reynolds (1999).

La variación en las concentraciones del SiRS (Fig. 7) en la capa de mezcla fueron de $14.6 \pm 4.8 \mu\text{g L}^{-1}$ (septiembre 2009) hasta $294.1 \pm 67.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (abril 2010). El promedio anual de este nutriente fue de $93.5 \pm 75.2 \mu\text{g L}^{-1}$. Existió limitación potencial para las diatomeas de marzo a septiembre 2010 considerando que junio, agosto y septiembre se encuentran alrededor del límite según la concentración propuesta por Interlandi *et al.*, (1999).

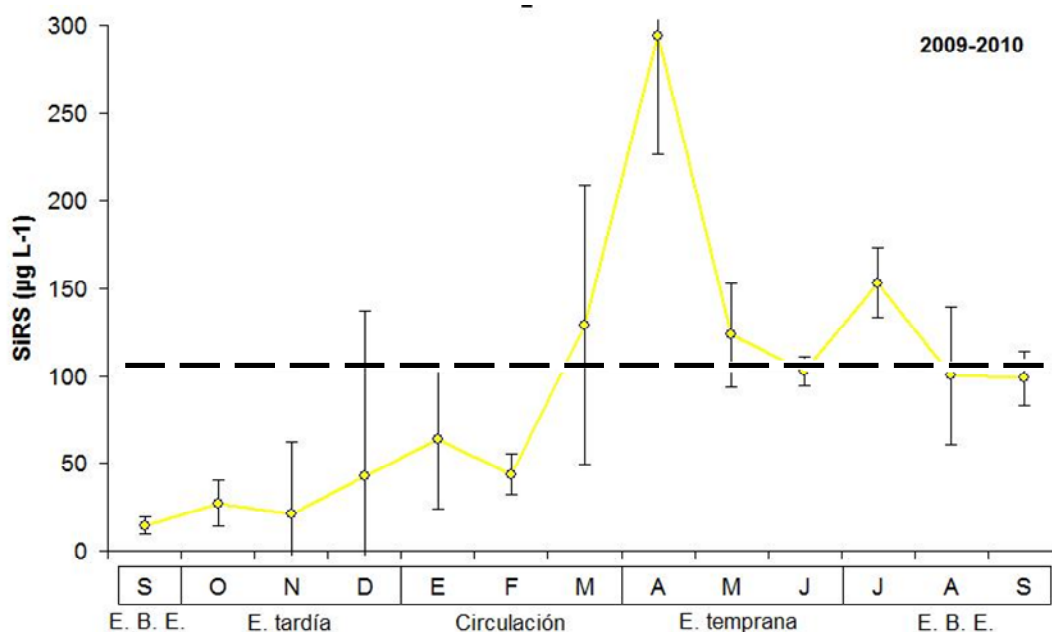


Figura 7. Concentración promedio (\pm d.e.) de sílice reactivo soluble (SiRS) en la capa de mezcla. Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida. La línea punteada indica la concentración por debajo de la cual existe limitación potencial para diatomeas propuesta por Interlandi *et al.*, (1999).

Por época hidrodinámica (circulación= enero, febrero y marzo; estratificación temprana= abril, mayo, junio; estratificación bien establecida= julio, agosto, septiembre y estratificación tardía= octubre, noviembre, diciembre; Adame *et al.*, 2008; Alcocer *et al.*, 2000) se observa en las concentraciones de nutrientes que para el FRS se encontraron diferencias significativas ($F=43.09$, $p<0.000$) entre los valores registrados para la circulación con respecto al resto del año, siendo en esta época cuando se alcanzaron los valores más altos. En el caso del NID las diferencias significativas ($F=3.795$, $p<0.014$) se dan en la estratificación tardía, etapa en que se obtuvieron las concentraciones más bajas. Para el SiRS hay diferencias significativas ($F=10.116$, $p<0.00$) entre todas las épocas hidrodinámicas. En la estratificación tardía se registran los valores más bajos y durante la estratificación temprana los valores más altos.

- Proporciones estequiométricas.

Partiendo de los datos antes descritos se calcularon las proporciones estequiométricas de NID:FRS, SiRS:FRS y NID:SiRS, de acuerdo a los diferentes autores que se han mencionado en la metodología.

De acuerdo a Interlandi *et al.*, (1999), la proporción Si:P indicó que las diatomeas estuvieron limitadas por sílice la mayor parte del año, excepto julio de 2010; y para Si:N resultó limitante el sílice de octubre a febrero y en mayo.

Según Redfield (1958) existió limitación por nitrógeno todos los meses excepto en julio y para ese mes se dio limitación por fósforo.

Citando a Xu *et al.* (2008) la ubicación del valor obtenido para cada uno de los meses se colocó en los diferentes cuadrantes del gráfico correspondiente (Fig. 8). Siendo limitante el NID en seis meses (septiembre 2009, marzo, abril, junio, agosto y septiembre 2010); el SiRS de igual forma en seis meses (octubre, noviembre, diciembre, enero, febrero y mayo) y por FRS en julio.

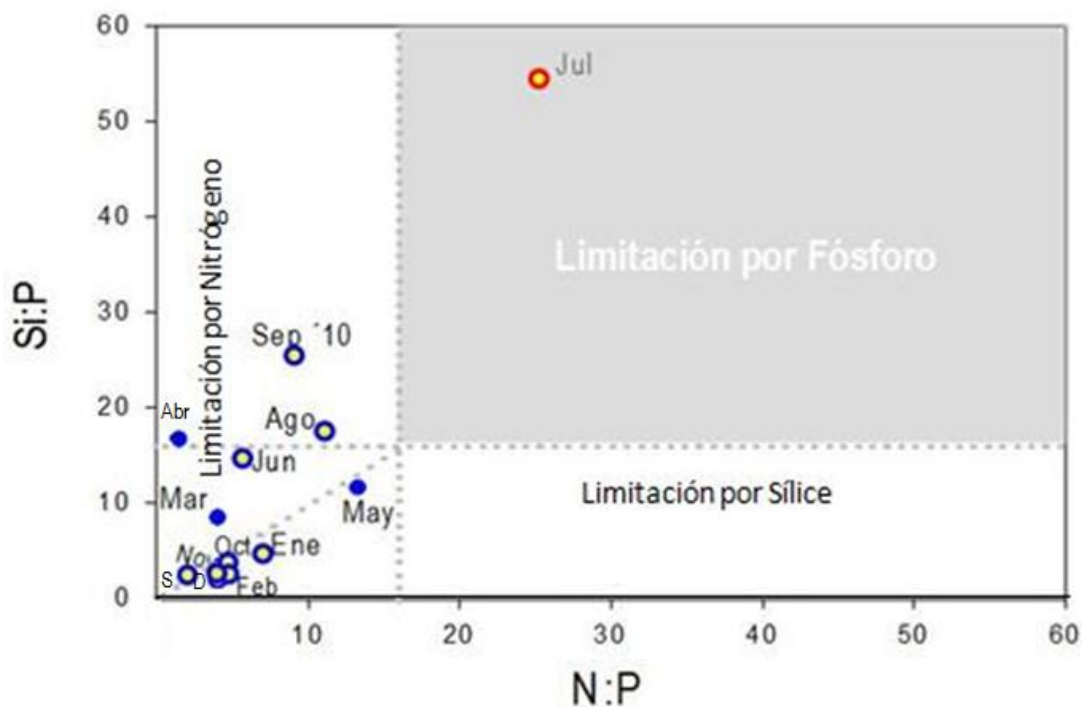


Figura 8. Variación de las proporciones estequiométricas en la capa de mezcla (modificado de Xu *et al.*, 2008) en el lago Alchichica en el periodo septiembre 2009-septiembre 2010. Se muestran en color azul los meses en que se dio limitación por nitrógeno, según las

concentraciones absolutas propuestas por Reynolds (1999); en azul-amarillo cuando existió co-limitación de nitrógeno-sílice y en amarillo-rojo co-limitación de sílice-fósforo.

2. Composición específica, abundancia y biomasa (por clorofila *a in vivo* y biovolumen) del fitoplancton en capa de mezcla.

Para este cometido se revisaron 13 muestras de fitoplancton que fueron utilizadas como punto inicial (T0) para cada uno de los experimentos mensuales de enriquecimiento. En ellas se identificaron un total de 11 taxa: 4 pertenecientes a la clase Bacillariophyceae, 4 a Chlorophyceae y 3 a Cyanoprokariota (Tabla 3).

Tabla 3. Taxa identificados en la capa de mezcla de Alchichica para T0.

CLASE	TAXA
Bacillariophyceae	<i>Amphora</i> sp. Ehrenberg ex Kützing 1844. <i>Cyclotella alchichicana</i> Oliva, Lugo, Alcocer et Cantoral-Uriza 2006 <i>Cyclotella choctawhatcheeana</i> Prasad 1990 <i>Chaetoceros elmorei</i> Boyer 1914
Chlorophyceae	<i>Monoraphidium dybowskii</i> Hindák et Komárková-Legnerová 1969 <i>Monoraphidium minutum</i> Komárková-Legnerová 1969 <i>Oocystis parva</i> West et G.S. West 1898 <i>Oocystis submarina</i> Lagerheim 1886
Cyanoprokariota	<i>Epigloeosphaera</i> sp. Komárková-Legnerová 1991 <i>Nodularia spumigena</i> Bornet et Flahault 1886 <i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau 1892

La composición del fitoplancton en el lago en la capa de mezcla (Fig. 9) reflejó una frecuencia importante de las diatomeas que, como grupo taxonómico, aparecieron en un 85% del año. Las cianoprocariontas se encontraron en un 54% del año. Las clorofitas se registraron solo en un 31% del año, siendo así el grupo menos representado en el lago al momento del muestreo.

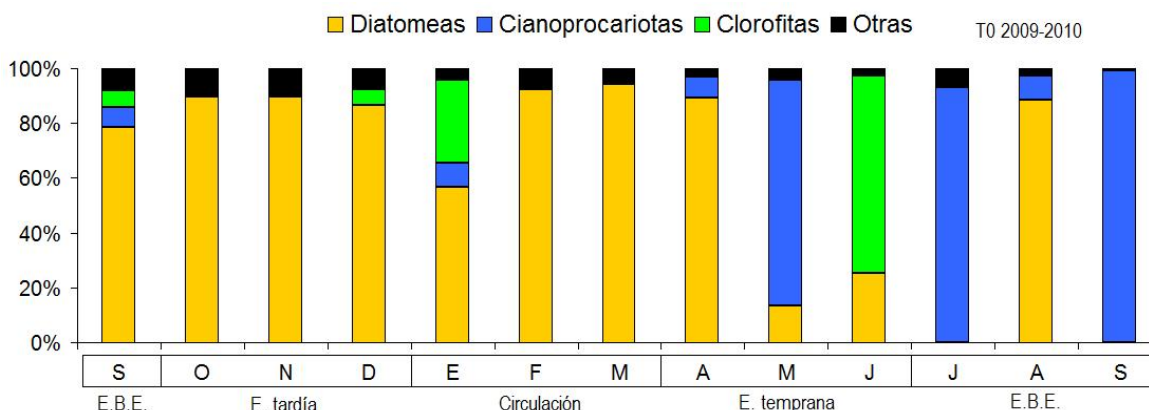


Figura 9. Contribución en biomasa (%) de los principales grupos fitoplanctónicos al inicio de los bioensayos (T0) antes de agregar nutrientes. Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida. Todas aquellas especies que contribuyeron con < 5% en biomasa se consideraron dentro de la categoría "otras".

En contexto con la hidrodinámica del lago, la biomasa por clorofila *a in vivo* reflejó que en la estratificación tardía el promedio fue de $1.2 \pm 0.6 \mu\text{g Clor a L}^{-1}$ (Fig. 10). En la circulación, las concentraciones fueron más elevadas, alcanzando un promedio de $2.8 \pm 1.3 \mu\text{g Clor a L}^{-1}$. En la época de estratificación temprana el promedio fue de $0.9 \pm 0.4 \mu\text{g Clor a L}^{-1}$. Finalmente en la estratificación bien establecida se obtuvo un promedio de $1.1 \pm 0.6 \mu\text{g Clor a L}^{-1}$.

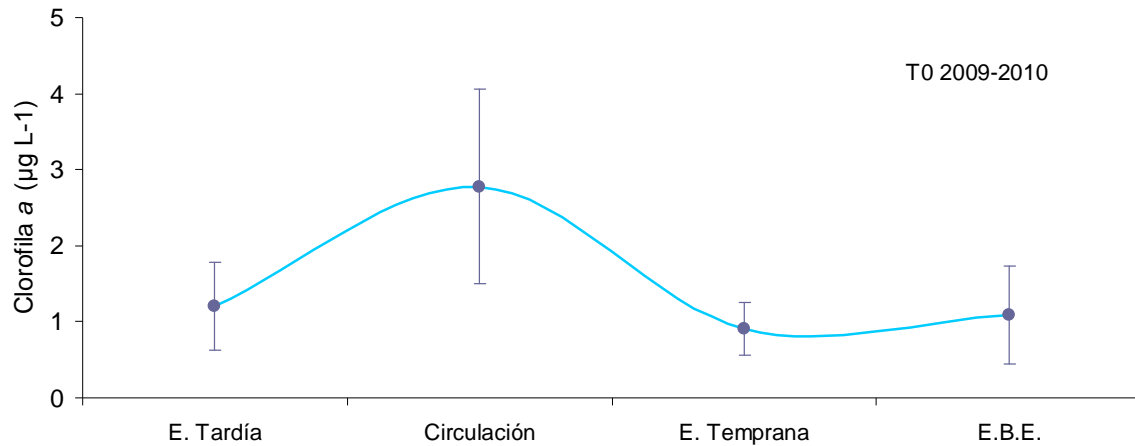


Figura 10. Concentración promedio de la clorofila a (\pm d.e.) *in vivo* para T0 en la capa de mezcla en las diferentes épocas hidrodinámicas del lago. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida.

El promedio anual de biomasa por biovolumen fue de $5.5 \pm 16.2 \text{ mg L}^{-1}$, valor comprendido dentro del intervalo observado, que varió desde 0.04 hasta 59 mg L^{-1} (Fig. 11). En junio fue el mes que se alcanzó la biomasa menor (0.04 mg L^{-1}). Los meses en donde se alcanzaron las mayores biomásas fueron septiembre 2010 (59 mg L^{-1}), seguido muy por debajo por julio (6 mg L^{-1}). La mayor biomasa de septiembre 2010 estuvo representada en su totalidad por *Nodularia spumigena*.

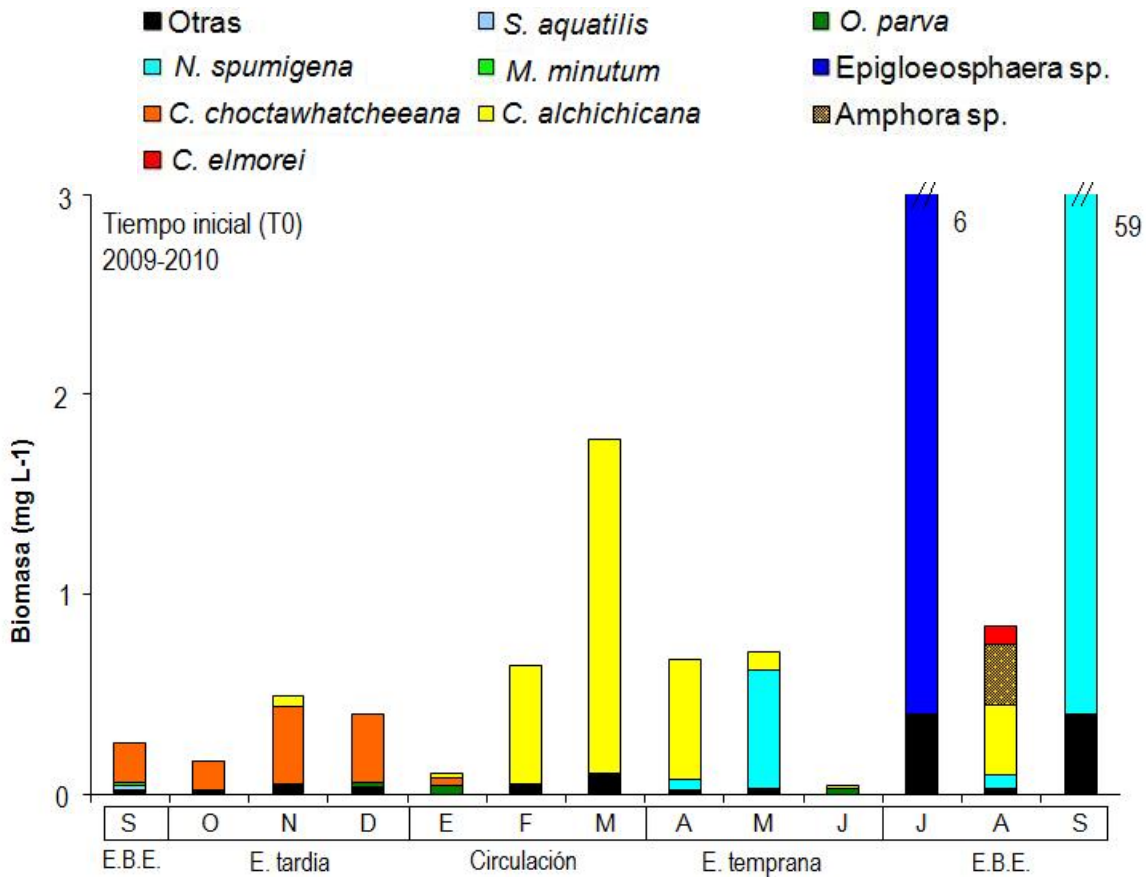


Figura 11. Variación temporal de biomasa (>5%) por especie al comenzar el experimento (T0). Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida.

El grupo dominante en biomasa (por estima a partir de densidades y biovolumen) observado en la mayoría de los meses fueron las diatomeas, lo cual corresponde al periodo comprendido de septiembre 2009 a abril y en agosto (Fig. 11). En segundo lugar las cianoprocaritas, que fueron dominantes en biomasa en tres meses (mayo, julio y septiembre 2010). Las clorofitas fueron el grupo con menor aporte de biomasa, siendo dominantes solo en el mes de junio.

El reemplazo temporal de las especies –por biomasa- para T0 (Fig. 11) estuvo representado por: *C. choctawhatcheeana*, *C. alchichicana*, *N. spumigena*, *Epigloeosphaera*

sp. y *N. spumigena*. Estas especies corresponden a aquellas que fueron dominantes al momento de su observación en los diferentes meses.

Bioensayos de enriquecimiento con nutrimentos.

1. Respuesta del fitoplancton a la adición de nutrimentos.

En todos los bioensayos se observó un periodo de aclimatación de entre 2 y 3 días. Los tratamientos con adición de N+P y N+P+Si mostraron crecimiento exponencial en las curvas (de al menos tres veces mayor que el del control) en la mayoría de los meses (Fig. 12). Existieron meses (febrero, marzo, julio, agosto y septiembre 2010; Figs. 12 F-G-K-L-M respectivamente) en donde dichos tratamientos mostraron un crecimiento menor o igual al valor promedio registrado al tiempo inicial (T0). El resto de los tratamientos en su mayoría no mostraron crecimiento superior al control. En el mes de abril los tratamientos N y Si mostraron crecimientos superior al control pero menor al de los tratamientos N+P y N+P+Si (Fig. 12 H).

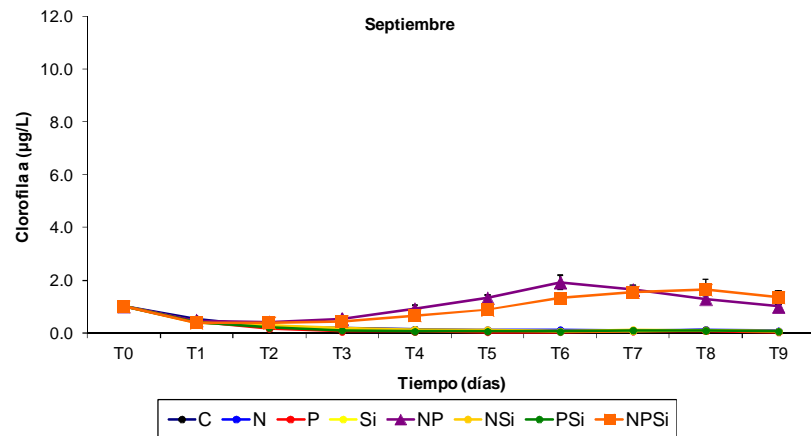
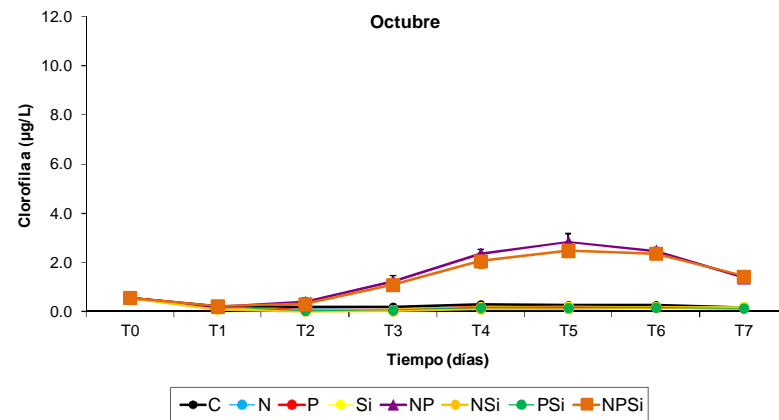
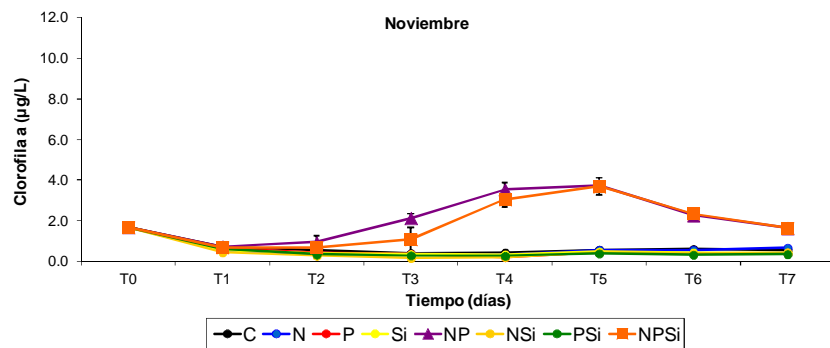
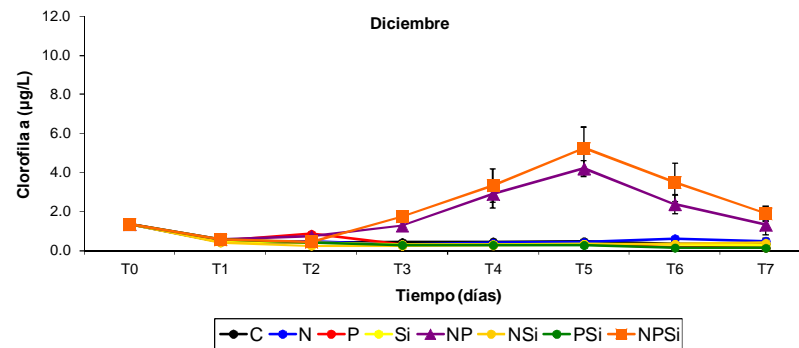
A**B****C****D**

Figura 12. Variación de la concentración de clorofila a (promedio \pm d.e.) en los bioensayos durante 2009-2010; A-septiembre 2009; B-octubre; C-noviembre; D-diciembre; E-enero; F-febrero; G-marzo; H-abril; I-mayo; J-junio; K-julio; L-agosto y M-septiembre 2010.

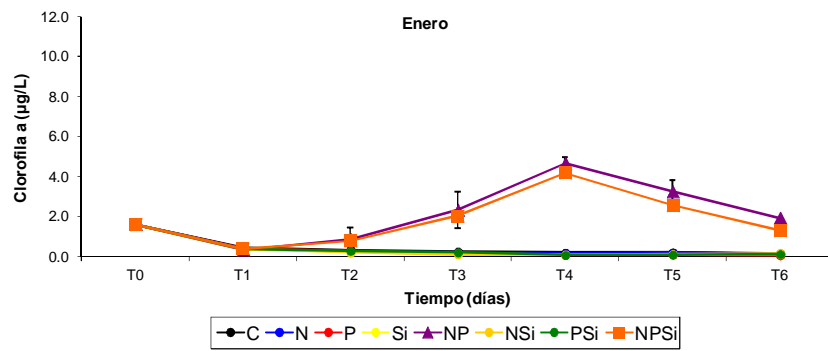
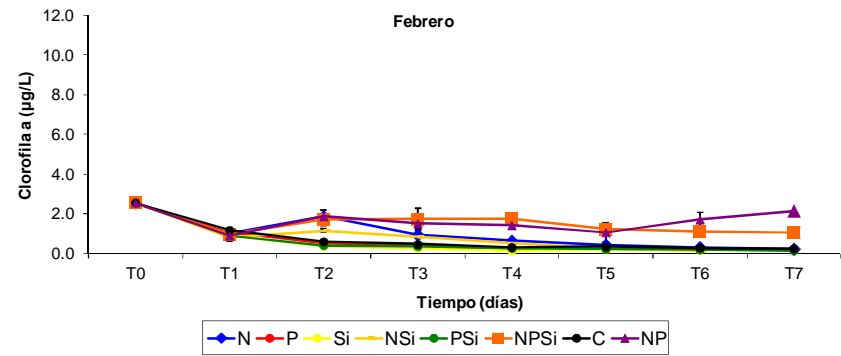
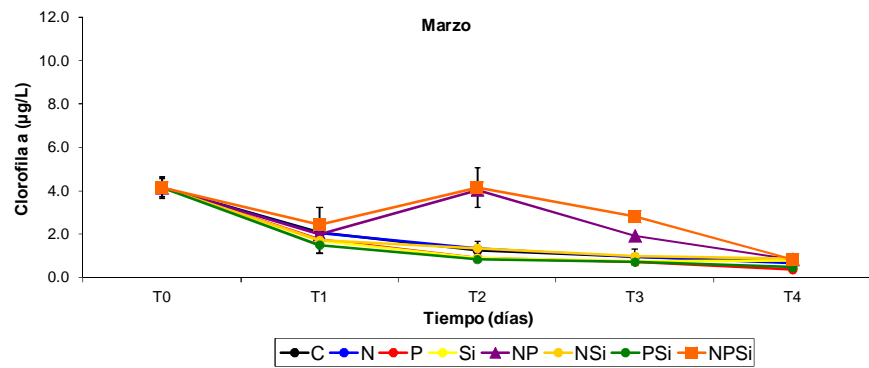
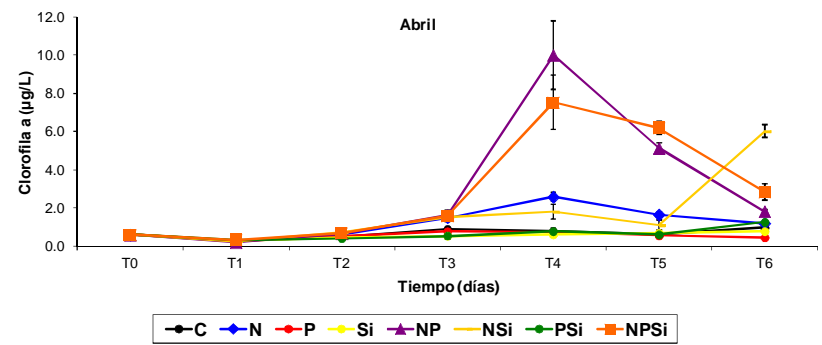
E**F****G****H**

Figura 12. (Continuación)

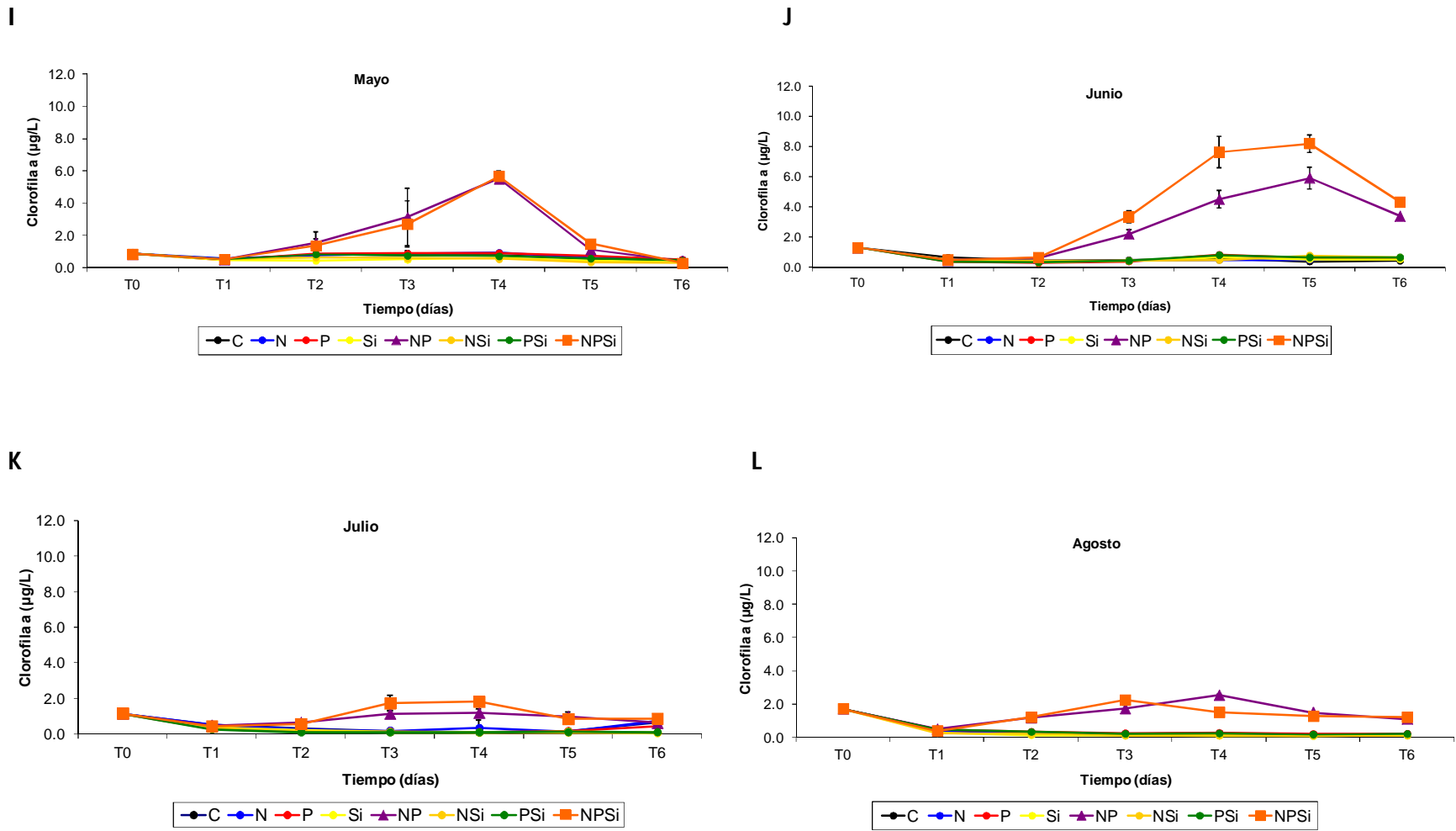


Figura 12. (Continuación)

M

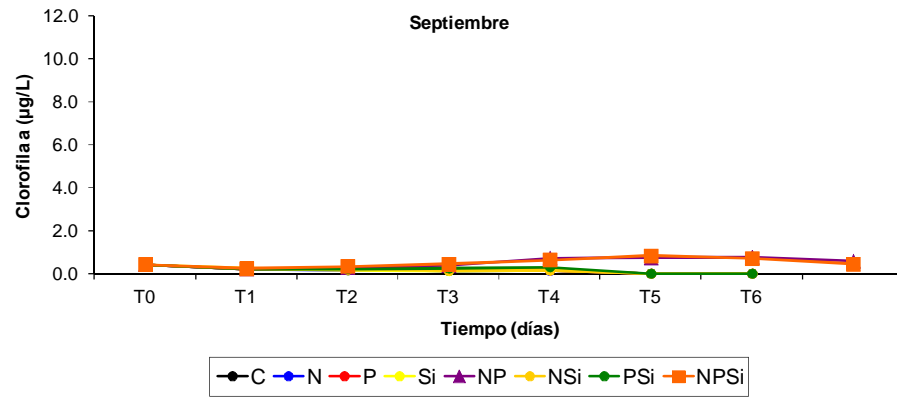


Figura 12. (Continuación)

2. Composición específica, abundancia y biomasa (por clorofila *a in vivo* y biovolumen) del fitoplancton en bioensayos.

Con el propósito de reconocer los cambios en la composición fitoplanctónica inducidos por la adición de nutrientes, se observaron un total de 39 muestras cuando finalizaron los bioensayos.

El número total de taxa identificados fue de 13, de los cuales 5 representan a la clase Bacillariophyceae, 5 a Chlorophyceae y 3 a Cyanoprokariota (tabla 4). Todas las especies registradas en las muestras iniciales se encontraron presentes también en las finales. Se encontraron dos especies más que no estaban presentes al tiempo inicial T0, las cuales fueron una diatomea del género *Nitzschia* y una clorofita del género *Oocystis*, pero de una especie probablemente diferente a *O. parva* y a *O. submarina*.

Tabla 4. Taxa identificados en los tiempos finales (Tf).

CLASE	TAXA
Bacillariophyceae	<i>Amphora</i> sp. <i>Cyclotella alchichicana</i> <i>Cyclotella choctawhatcheeana</i> <i>Chaetoceros elmorei</i> <i>Nitzschia</i> sp.
Chlorophyceae	<i>Monoraphidium dybowskii</i> <i>Monoraphidium minutum</i> <i>Oocystis parva</i> <i>Oocystis submarina</i> <i>Oocystis</i> sp.
Cyanoprokariota	<i>Epigloeosphaera</i> sp. <i>Nodularia spumigena</i> <i>Synechocystis aquatilis</i>

o Muestras iniciales (T0)

Las condiciones de estas muestras fueron expuestas anteriormente en la sección de las condiciones para la capa de mezcla dado que son el punto inicial de los bioensayos.

- Muestras finales (Tf control, NP y NPSi)

Tratamiento control.

Para Tf control el grupo de las diatomeas se mantuvo presente durante todo el año. Para el caso de las cianoprocariotas y las clorofitas se observó su presencia en 54% del tiempo para ambos grupos (Fig.13).

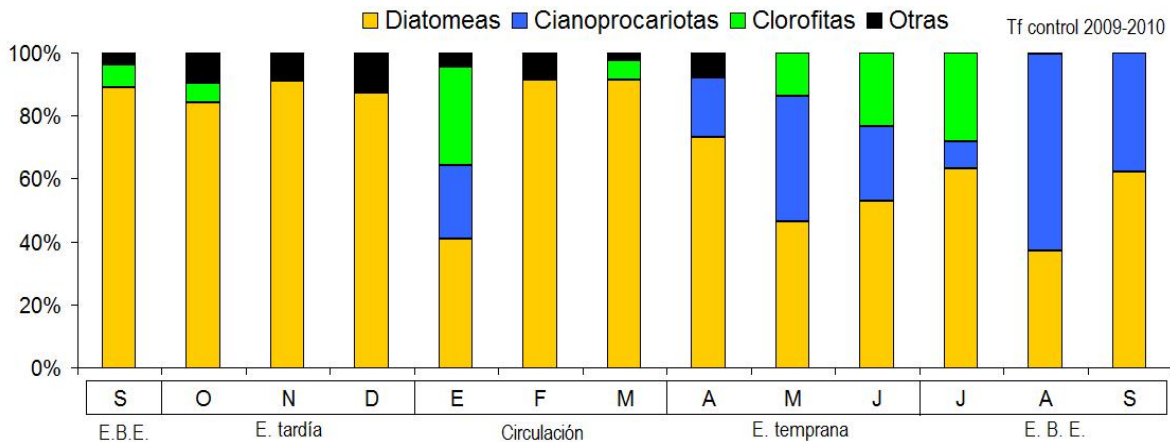


Figura 13. Contribución en biomasa (%) de los principales grupos fitoplanctónicos en los tratamientos control al final de los experimentos (Tf control). Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida. Las especies que contribuyeron con < 5% se agruparon bajo la denominación "otras".

En relación a los valores de biomasa en las muestras de Tf del control se puede decir que la gran mayoría se encontró por debajo de los 4 mg L⁻¹. Se observa que solo con los nutrientes propios del agua del lago y bajo las condiciones en los bioensayos de laboratorio se registraron aumentos de la biomasa. Resulta necesario señalar que en casi todos los meses, excepto julio y septiembre de 2010, la biomasa en Tf control es mayor que la inicial T0. En julio y septiembre 2010 (Fig. 14) la biomasa del fitoplancton fue menor porque los bioensayos fueron dominados en densidad por la presencia de fitoflagelados y/o ciliados, grupos no objeto de estudio de este trabajo.

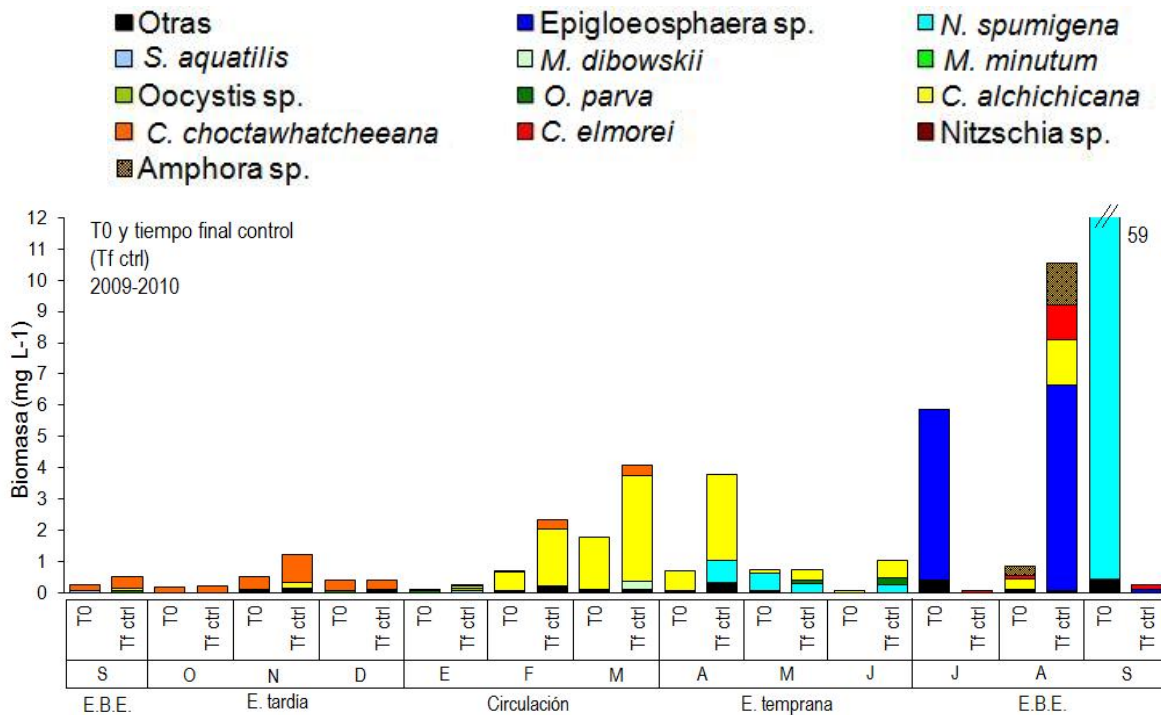


Figura 14. Variación temporal de la biomasa por especie entre los tratamientos T0 y Tf control para 2009-2010. Solo se representan las especies que contribuyeron con > 5% a la biomasa total. Las especies que contribuyeron con < 5% se agruparon bajo la denominación "otras". Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida.

La biomasa mínima alcanzada (0.04 mg L^{-1}) se registró en julio, cuando la muestra estuvo compuesta principalmente por *C. elmorei*, *O. parva*, y *N. spumigena*. La biomasa máxima para Tf control (10.5 mg L^{-1}) se registró en el mes de agosto siendo en este caso, las especies dominantes presentes *Epigloeosphaera sp.*, *C. alchichicana*, *Amphora sp.* y *C. elmorei*. El promedio anual de la biomasa en Tf control fue de $2 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$.

En relación a la dominancia por grupos en estas muestras se observó que las diatomeas fueron abundantes en casi todo el año (Fig. 14). Las cianoprocaritas lo fueron sólo en un mes (agosto) y las clorofitas no mostraron dominancia en ningún momento. La composición de especies en Tf control fueron *C. choctawhatcheana*, *C. alchichicana*, *Epigloeosphaera sp.*, *N. spumigena* (Fig. 14).

La diferencia más notable de lo descrito antes radica que en Tf control no se observó un predominio particular de alguna especie del grupo de las clorofitas, como fue en las muestras de T0.

Tratamiento N+P.

La composición fitoplanctónica de las muestras Tf N+P estuvo dominada en términos de frecuencia de aparición, por las clorofitas en un 85%, seguidas por las diatomeas con un 78% y, con la menor frecuencia, las cianoprocaritotas en un 54% de los meses (Fig. 15).

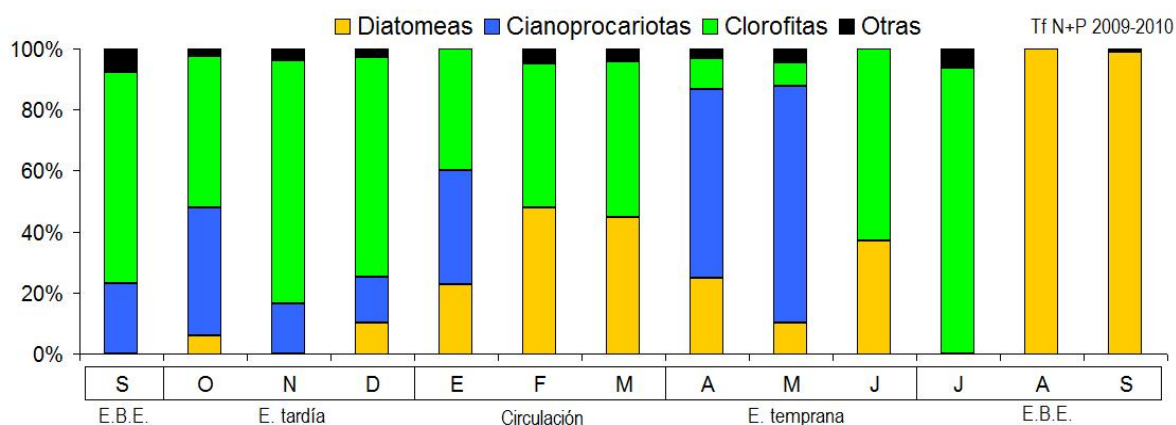


Figura 15. Contribución en biomasa (%) de los principales grupos fitoplanctónicos en los tratamientos N+P al final de los experimentos (Tf N+P). Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida. Las especies que contribuyeron con < 5% se agruparon bajo la denominación "otras".

Las concentraciones máximas de *Clor a* correspondientes al tratamiento N+P final (Tf) alcanzaron su máximo en los meses de abril ($10.0 \pm 1.8 \mu\text{g Clora L}^{-1}$; Fig. 20) aumentando 50 veces más sobre el inicial (T0), mayo ($5.5 \pm 1.8 \mu\text{g Clora L}^{-1}$; Fig. 21) creciendo 18 veces más y junio ($5.9 \pm 0.6 \mu\text{g Clora L}^{-1}$; Fig. 22) aumentando 13 veces con respecto al inicio (T0). Los menores valores promedio mínimos de clorofila *a* encontrados al final de los experimentos para el tratamiento N+P fueron en los meses de septiembre 2009 ($1.3 \pm 0.1 \mu\text{g Clora L}^{-1}$), julio ($1.2 \pm 0.2 \mu\text{g Clora L}^{-1}$) y septiembre 2010 ($0.8 \pm 0.1 \mu\text{g Clora L}^{-1}$).

La biomasa mínima (0.064 mg L⁻¹) se registró en el mes de julio, cuando dominaron *C. elmorei* y *M. dibowskii*. En contraste, la biomasa máxima (8.3 mg L⁻¹) se dio en el mes de febrero, siendo *C. alchichicana*, *M. dibowskii*, *M. minutum* y *C. choctawhatcheana* quienes más contribuyeron a ella. El promedio anual alcanzó 3.9 ± 2.2 mg L⁻¹. El promedio anual de biomasa para estas muestras no considera los meses julio, agosto y septiembre de 2010, ya que se observó la presencia de flagelados y/o ciliados en las muestras.

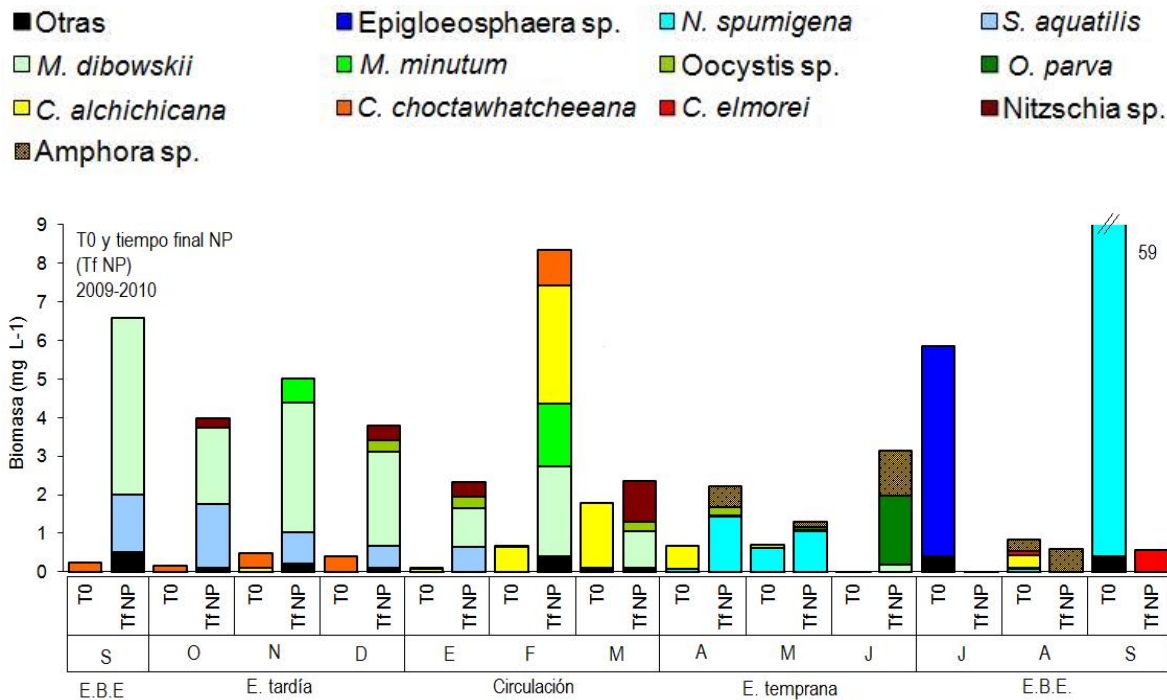


Figura 16. Variación temporal de la biomasa por especie entre los tratamientos T0 y Tf N+P para 2009-2010. Solo se representan las especies que contribuyeron con > 5% a la biomasa total. Las especies que contribuyeron con < 5% se agruparon bajo la denominación "otras". Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida.

La composición fitoplanctónica para Tf N+P se dio de la siguiente forma: *M. dibowskii*, *C. alchichicana*, *N. spumigena*, *O. parva*, *Amphora sp.* y *C. elmorei* (Fig. 16). En dicha figura resalta que en los primeros siete meses de Tf N+P, las clorofitas son dominantes en comparación con T0. Para mayo y junio hubo dominancia por parte de cianoprocaritas y clorofitas, y se observó el mismo patrón que en T0. En los meses

posteriores se dio una alternancia en la dominancia, primero por clorofitas y después por diatomeas en Tf N+P.

En cuanto a los grupos fitoplanctónicos, la mayor biomasa estuvo dada por las clorofitas en el periodo comprendido de septiembre 2009 a enero y en junio y julio. Las cianoprocarioras fueron dominantes en abril y mayo. Las diatomeas en agosto y septiembre 2010. En los meses de febrero y marzo, correspondientes a la circulación, se observó una dominancia similar entre diatomeas y clorofitas.

Tratamiento N+P+Si.

Para las muestras Tf N+P+Si el grupo de las clorofitas fue el más frecuente en estas muestras (69%), las diatomeas ocuparon un segundo lugar (62%) y, con menor frecuencia, las cianoprocarioras (54%) (Fig. 17).

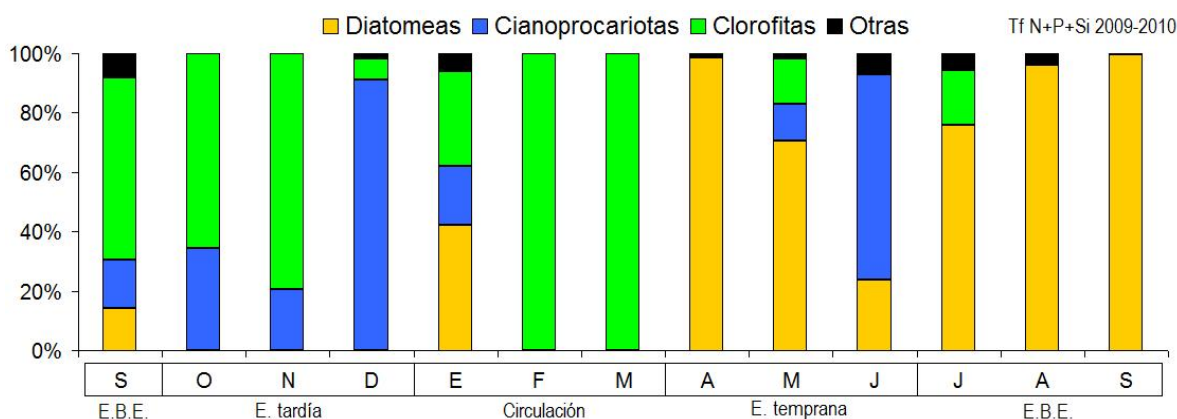


Figura 17. Contribución en biomasa (%) de los principales grupos fitoplanctónicos en los tratamientos N+P+Si al final de los experimentos (Tf N+P+Si). Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida. Las especies que contribuyeron con < 5% se agruparon bajo la denominación "otras".

Las concentraciones máximas de *Clor a* alcanzadas también se registraron en los mismos meses que para el tratamiento N+P. En abril ($7.5 \pm 1.4 \mu\text{g Clor a L}^{-1}$) creciendo 22 veces, en mayo ($5.7 \pm 1.5 \mu\text{g Clor a L}^{-1}$) aumentado 10 veces y en junio ($8.2 \pm 1.1 \mu\text{g Clor a L}^{-1}$) creciendo 16 veces más con respecto al inicial. Las concentraciones mínimas de *Clor a*

de $0.9 \pm 0.1 \mu\text{g Clora L}^{-1}$ se presentaron en septiembre 2009, $1.8 \pm 0.2 \mu\text{g Clora L}^{-1}$ en julio y $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g Clora L}^{-1}$ en septiembre 2010.

La biomasa mínima (0.06 mg L^{-1}) se registró en el mes de octubre, con *M. dybowskii*, *S. aquatilis* y *M. minutum*. En junio, la biomasa máxima (33 mg L^{-1}) estuvo representada principalmente por *Epigloeosphaera sp.* y *Amphora sp.* Para todo el año se alcanzó un promedio de $8.5 \pm 10.9 \text{ mg L}^{-1}$. En 9 de los 13 meses de experimentos aumentó la biomasa de estas muestras en relación con los valores iniciales T0. Los aumentos más notables en biomasa se dieron en la estratificación tardía, circulación y estratificación temprana. En comparación con Tf control, cuando existió dominancia de diatomeas, en Tf N+P+Si se observó una dominancia de clorofitas hasta la circulación.

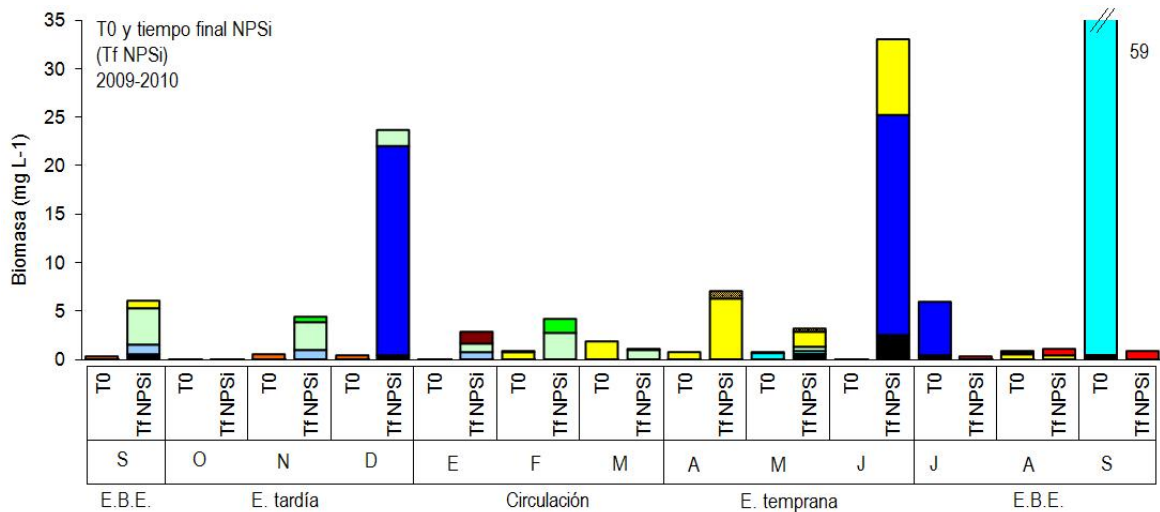
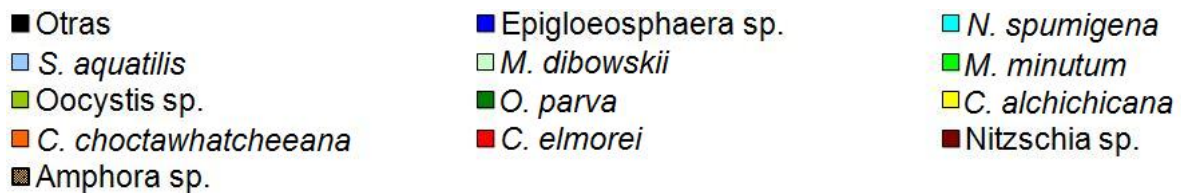


Figura 18. Variación temporal de la biomasa por especie entre los tratamientos T0 y Tf N+P+Si para 2009-2010. Solo se representan las especies que contribuyeron con > 5% a la biomasa total. Las especies que contribuyeron con < 5% se agruparon bajo la denominación "otras". Las letras mayúsculas indican cada uno de los meses, p. ej.: S-septiembre, O-octubre, etc. E.B.E. se refiere a la estratificación bien establecida.

Las clorofitas dominaron de septiembre a noviembre de 2009, en diciembre fueron las cianoprocariotas, en enero las diatomeas, en febrero y marzo las clorofitas, en abril y mayo las diatomeas, en junio las cianoprocariotas y de julio a septiembre 2010, las diatomeas (Fig. 18).

La composición de especies en Tf N+P+Si fue *M. dibowskii*, *Epigloeosphaera* sp., *M. dibowskii*, *C. alchichicana*, *Epigloeosphaera* sp. y *C. elmorei*.

Respecto a T0, se observó que en los primeros meses se dio un cambio de diatomeas a clorofitas que duró hasta el término de la circulación. Posteriormente, las diatomeas cobran mayor relevancia en las muestras N+P+Si respecto a T0 lo que se esperaría hubiese ocurrido en todos los meses.

3. Análisis estadísticos de los tratamientos.

El análisis exploratorio de datos (caja y bigote) realizado con los datos de todos los meses mostró que los tratamientos N+P y N+P+Si siempre resultaron diferentes al control y al resto de los tratamientos.

El ANDEVA realizado con la concentración de Clor a en el conjunto de todos los meses mostró que los tratamientos N+P y N+P+Si siempre mostraron diferencias significativas ($p= 0.00$) con respecto al control (Tabla 5). Es decir, los tratamientos N+P y N+P+Si fueron estadísticamente mayores al resto de los tratamientos y también del control.

Del mismo modo, al realizar el ANDEVA con la concentración de clorofila a entre los tratamientos N+P y N+P+Si para cada mes, los resultados fueron significativamente diferentes entre sí en 8 ocasiones: septiembre 2009, octubre, abril y agosto (Tf N+P con mayores crecimientos); diciembre, junio, julio y septiembre 2010 (Tf N+P+Si con mayores crecimientos). Más adelante se verá que, según el análisis estadístico, se dieron diferencias significativas entre N+P y N+P+Si, confirmando que este último tratamiento generó un crecimiento mayor al finalizar la estratificación temprana y en la bien establecida.

Tabla 5. Valores del análisis ANDEVA realizado para cada mes donde se compara la concentración del Clor a del control y todos los tratamientos al finalizar los bioensayos (Los valores en gris representa aquellos tratamientos en donde no existieron diferencias significativas con el control y en negritas donde si existieron. Los subíndices muestran los subgrupos homogéneos arrojados por la prueba de Tukey).

MES	TRATAMIENTOS								ANOVA	
	control	N	P	Si	N+P	N+Si	P+Si	N+P+Si	F	P
Septiembre 2009	0.1 ± 0.0a	0.1 ± 0.2a	0.1 ± 0.1a	0.1 ± 0.0a	1.3 ± 0.1c	0.1 ± 0.0a	0.1 ± 0.0a	0.9 ± 0.1b	174.2	<0.001
Octubre	0.3 ± 0.1a	0.2 ± 0.0a	0.2 ± 0.1a	0.2 ± 0.0a	2.8 ± 0.2c	0.1 ± 0.0a	0.2 ± 0.0a	2.5 ± 0.3b	363.3	<0.001
Noviembre	0.6 ± 0.1a	0.6 ± 0.1a	0.4 ± 0.1a	0.5 ± 0.1a	3.7 ± 0.3b	0.4 ± 0.1a	0.4 ± 0.0a	3.7 ± 0.4b	268.8	<0.001
Diciembre	0.5 ± 0.1a	0.4 ± 0.1a	0.3 ± 0.0a	0.4 ± 0.0a	4.2 ± 0.4b	0.3 ± 0.1a	0.3 ± 0.0a	5.3 ± 1.1c	101.4	<0.001
Enero	0.2 ± 0.1a	0.2 ± 0.1a	0.1 ± 0.0a	0.1 ± 0.0a	4.7 ± 0.9b	0.1 ± 0.1a	0.1 ± 0.0a	4.2 ± 0.8b	81.2	<0.001
Febrero	0.3 ± 0.1a	0.6 ± 0.1a	0.3 ± 0.1a	0.2 ± 0.0a	2.2 ± 0.4b	0.5 ± 0.3a	0.3 ± 0.1a	1.8 ± 0.5b	22.8	<0.001
Marzo	1.2 ± 0.2a	1.3 ± 0.3a	1 ± 0.1a	0.9 ± 0.2a	4.0 ± 0.4b	1.3 ± 0.6a	0.8 ± 0.3a	4.1 ± 0.8b	45.6	<0.001
Abril	0.8 ± 0.1a, b	2.6 ± 0.2b	0.7 ± 0.2a, b	0.6 ± 0.1a	10.0 ± 1.8d	1.8 ± 0.4a, b	0.8 ± 0.2a, b	7.5 ± 1.4c	75.5	<0.001
Mayo	0.8 ± 0.1a	0.9 ± 0.2a	0.9 ± 0.2a	0.6 ± 0.2a	5.5 ± 1.8b	0.6 ± 0.1a	0.7 ± 0.1a	5.7 ± 1.4b	29.5	<0.001
Junio	0.4 ± 0.0a	0.5 ± 0.1a	0.6 ± 0.1a	0.5 ± 0.1a	5.9 ± 0.6b	0.8 ± 0.1a	0.6 ± 0.0a	8.2 ± 1.1c	207.5	<0.001
Julio	0.1 ± 0.0a	0.3 ± 0.5a	0.1 ± 0.0a	0.1 ± 0.0a	1.2 ± 0.2b	0.1 ± 0.0a	0.1 ± 0.0a	1.8 ± 0.2c	49.3	<0.001
Agosto	0.2 ± 0.0a	0.2 ± 0.1a	0.3 ± 0.1a	0.1 ± 0.0a	2.5 ± 0.2b	0.1 ± 0.0a	0.2 ± 0.0a	1.5 ± 0.0c	327.7	<0.001
Septiembre 2010	0a	0a	0a	0a	0.7 ± 0.1b	0a	0a	0.8 ± 0.1c	586.9	<0.001

DISCUSIÓN

Ciclo anual septiembre 2009 a septiembre 2010.

Las condiciones encontradas en el ciclo anual ratifican la clasificación de Alchichica como un lago monomítico cálido, con un periodo de circulación en la época fría y estratificación el resto del año (Lewis, 1983). De esta manera, el patrón encontrado se corresponde con lo que describen otros autores para Alchichica (p. ej., Alcocer *et al.*, 2000). Asimismo, se encontraron similitudes en la variación del grosor de la capa de mezcla (5-62 m) con autores previos (7-62 m, Rodríguez-Rocha, 2011). A semejanza de Adame *et al.* (2008) y Oseguera *et al.* (2011), también se observó que la temperatura más baja se dio en la circulación (febrero y marzo) y la mayor temperatura en el epilimnion, cuando se da la transición de estratificación temprana a bien establecida (junio y julio); la temperatura promedio encontrada en la columna de agua durante la circulación para el ciclo anual de este estudio (14.5 ± 0.1 °C) coincide respectivamente con la que reportan dichos autores (14.8 ± 0.4 y 14.9 ± 0.3 °C).

El hecho de que las máximas temperaturas del lago se den en los meses previos al inicio de lluvias, se atribuye a la transferencia de calor por parte de la insolación y las relativamente elevadas temperaturas del aire, lo que se relaciona con el comportamiento registrado por Adame (2005), quien muestra en sus resultados que las máximas se dieron también en la estratificación temprana.

De acuerdo con los porcentajes de saturación de oxígeno en Alchichica en estratificación, el epilimnion se encontró siempre cercano al 100% de saturación, coincidiendo con Macek *et al.* (2009); o bien mostró sobresaturación, ya que este estrato favorece una apropiada actividad fotosintética (Ortega-Murillo *et al.*, 2011) que facilita la liberación de oxígeno al medio. En el hipolimnion, el oxígeno disuelto se agota tempranamente debido a la descomposición bacteriana (Alcocer *et al.*, 2000), alcanzando rápidamente valores de anoxia. Esto genera que, al mezclarse toda la columna de agua (Oseguera *et al.*, 2011), estas aguas carentes de oxígeno se mezclen y la concentración disminuya en la circulación, cuando se dan valores de subsaturación. Como se analizará posteriormente, llama la atención que un lago oligotrófico muestre una anoxia consistente en su hipolimnion, pues se esperaría que una relativamente baja generación de biomasa no alcance a agotar totalmente el oxígeno del fondo (Lewis, 2002). Se sabe que las temperaturas registradas en lagos tropicales, incluso en los oligotróficos, favorecen tanto un metabolismo microbiano más acelerado, como una

menor disolución del oxígeno, favoreciendo así la anoxia en el hipolimnion (Lewis, 1987).

- **Limitación por nutrientes en el ciclo anual**

Las concentraciones máximas de NID y FRS en Alchichica se observan en la época de circulación y las mínimas en estratificación. Dicho patrón evidencia que la disponibilidad de nutrientes está controlada, en gran medida, por los cambios en la profundidad de la capa de mezcla (Lewis, 1978). Oliva *et al.* (2001) y Ramírez-Olvera *et al.* (2009) también han observado ese patrón temporal en la concentración de nutrientes, lo cual es común para otros lagos tropicales (p. ej., lago Victoria, Crul, 1995). El hecho de que la concentración máxima de SiRS en Alchichica no se da en circulación sino en estratificación temprana, se debería a que la circulación promueve una liberación del recurso a lo largo de toda la columna de agua y rápidamente es aprovechado por las diatomeas en su florecimiento lo que da por resultado que su concentración disminuya (Adame *et al.*, 2008; Ardiles *et al.*, 2012).

En cuanto a la limitación de nutrientes en Alchichica, los resultados muestran que el NID resulta ser limitante (con base a las concentraciones absolutas y las proporciones estequiométricas) la mayor parte del ciclo anual; sin embargo, se sugiere una co-limitación potencial en la mayor parte del periodo ejercida por NID y SiRS. Este hecho se explica porque, muy probablemente, el nitrógeno tiende a perderse en lagos tropicales por procesos como la desnitrificación, que es promovida por las temperaturas relativamente altas y la anoxia (Lewis, 2002). Para el caso del SiRS, además de su baja concentración general, parece mostrar un tiempo de reciclaje lento en Alchichica, como lo sugieren Adame *et al.* (2008).

Las concentraciones registradas para Alchichica por Ramírez-Olvera *et al.* (2009) y Ramos-Higuera *et al.* (2008) también respaldan una limitación por NID, cuando se comparan con el valor propuesto por Reynolds (1999). Ardiles *et al.* (2012) encuentran que el NID es el nutriente limitante para el fitoplancton, seguido del SiRS, que sería limitante solo para las diatomeas.

La limitación potencial por SiRS en el lago seguramente está relacionada con la baja disponibilidad de este nutriente en la capa de mezcla antes de que se dé la circulación de toda la columna de agua. Sin embargo, aunque en los meses de enero y febrero, cuando el lago se encuentra circulando, aumenta la concentración de SiRS, aparentemente se mantiene la limitación por este elemento debido posiblemente a

que el florecimiento de diatomeas es de tal intensidad que tiene la capacidad de secuestrar el SiRS disponible (Adame et al., 2008). Por otro lado, Ardiles et al. (2012) muestran que tanto el flujo de diatomeas como de sílice particulado se presenta con mayor intensidad en la época de circulación en forma asociada al florecimiento de diatomeas.

Según la proporción Si:P (40:1) las diatomeas están limitadas por sílice la mayor parte del ciclo anual; sin embargo, este grupo es dominante en biomasa la mayor parte del tiempo, lo cual podría implicar que el uso que hacen de este recurso para generar su biomasa contribuya a que sea un recurso limitante. La idea anterior puede relacionarse con los resultados que encontró Tilman (1977), el cual observó que *Cyclotella meneghiniana*, especie del mismo género que las dos especies de diatomeas planctónicas de Alchichica, fue dominante a pesar de existir una proporción Si:P < 10, indicando con esto que existía una limitación por sílice; asimismo, define que el valor de la constante de saturación media es más bajo en comparación con el valor para otras diatomeas que compiten también por este elemento, lo que le da a *C. meneghiniana* una ventaja competitiva ante una limitación por Si. La característica de *C. meneghiniana* de poder desarrollarse en aguas con disponibilidad limitada de Si (Tilman, 1977), podría asociarse con *C. alchichicana*, y si así fuera, justificaría su dominancia, en particular en los meses en los que Si:P < 10 en el lago (septiembre 2009 – marzo 2010). Desafortunadamente, la disponibilidad de información experimental de aspectos funcionales del fitoplancton son raras (Kruk et al., 2010) y, específicamente, aún no se genera la información suficiente en relación a la constante de saturación media de *C. alchichicana* (Alcocer y Oseguera, com. pers.)

Por otro lado, la proporción Si:N podría ser más importante que la propia concentración absoluta de Si, precisamente porque el NID fue limitante todo el ciclo anual. Dicha proporción reveló que en 6 de los meses muestreados, el que limitó fue el SiRS, a pesar de existir una dominancia de diatomeas; por otro lado, en los otros 6 meses en que limitó el NID, no siempre dominaron las cianoprocaritas. Lo anterior podría reflejar que quizá las diatomeas, por ejemplo, tienen mayor dificultad para generar biomasa cuando están limitadas por NID, pues sus requerimientos de SiRS se pueden cubrir incluso con concentraciones bajas como lo menciona Tilman (1977).

La tendencia muestra que existe limitación potencial por SiRS de octubre a febrero, cuando se pasa de un estado de estratificación tardía a la circulación, y después por NID en marzo y abril, en la transición de la circulación a la estratificación.

En los meses de mayo a septiembre, entre la estratificación temprana y bien establecida, no hay un patrón claro ya que se da una alternancia entre NID, FRS y SiRS. En esta última fase se presenta, además de una baja densidad fitoplanctónica en la capa de mezcla, baja disponibilidad de nutrientes debido a su agotamiento así como a la interrupción del flujo de nutrientes reciclados al estar estratificada la columna de agua. Durante esta época podría ser importante el hecho de que al encontrarse *N. spumigena* en el lago se favorezca la liberación de nitrógeno y por lo tanto, el fósforo se vuelva limitante.

En relación con lo anterior y considerando la hipótesis 1 (en la capa de mezcla se esperaba una marcada limitación por NID y SiRS durante las épocas de estratificación del lago y en particular del sílice para diatomeas durante la circulación), se observa que los resultados muestran un panorama bastante más complejo que el planteado inicialmente. Efectivamente se observan dichas limitaciones, pero se concluye que más bien se da una co-limitación potencial de NID y SiRS y, en temporadas cortas, también de FRS, y que dicha limitación se ve modulada por la composición dominante de especies de fitoplancton en cada temporada, así como por la hidrodinámica del lago expresada a través de las épocas de mezcla y estratificación.

- **Composición específica, abundancia y biomasa (por clorofila *a* *in vivo* y biovolumen) en capa de mezcla durante el ciclo anual.**

Es pertinente señalar que el número total de taxa (11) encontrado en las muestras tomadas en la capa de mezcla durante el ciclo anual es menor al referido (22) por Rosiles-González (2005). La razón es que dicha autora consideró especies flageladas e incluso algunas muy pequeñas. Dichas especies no se consideraron en el presente estudio porque son difíciles de observar con la técnica de fijación empleada, y más difíciles todavía de determinar. Asimismo, porque el pequeño tamaño de algunas especies y en general escasa abundancia, hizo que no se observaran usualmente como dominantes ni en el ciclo anual (ni en los bioensayos). Sin embargo, las especies previamente registradas para el lago pero que no fueron consideradas en el presente estudio, no afectan la validez de lo encontrado en este estudio debido a que la contribución de éstas a la biomasa global es muy reducida lo que de ninguna manera invalida los hallazgos y conclusiones mencionados.

El patrón de reemplazo fitoplanctónico observado en Alchichica coincide con el descrito por Rodríguez-Rocha (2011), quien también definió el reemplazo de especies en términos de biomasa, así como la presencia de los florecimientos peculiares que se

presentan en circulación (diatomeas) y en la estratificación temprana (cianoprocariotas).

Los resultados de biomasa por concentración de clorofila *a* ratifican que Alchichica es un lago oligotrófico, ya que presenta concentraciones menores a los 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, tal y como lo mencionan Oliva *et al.* (2001) y Alcocer *et al.* (2008). El análisis realizado según la hidrodinámica del lago permite observar la relación esperada con las concentraciones de clorofila *a*, siendo en circulación cuando se presentan las mayores concentraciones, asociado con una mayor disponibilidad de nutrientes en la columna de agua para ser asimilados por el fitoplancton, como demuestran Ramírez-Olvera *et al.* (2009) en Alchichica.

Con relación al florecimiento de *Nodularia spumigena* en Alchichica, este se da comúnmente en la estratificación temprana (Oliva *et al.*, 2009); sin embargo, también reportan otro florecimiento en septiembre de 2002. Dichos autores indican que los florecimientos de esa cianoprocariota pueden variar en intensidad y tiempo, por lo que los resultados encontrados en este trabajo muestran que se trata de un florecimiento lo que se observa en el mes de septiembre 2010. Para aportar datos acerca de que los parámetros fisicoquímicos son los que promueven la proliferación de cianoprocariotas fijadoras de nitrógeno atmosférico (Alcocer *et al.*, 2008), se constató que en dicho mes se presentó una de las mayores temperaturas registradas, así como una mayor disponibilidad de luz en el lago (Oseguera, com. pers.) y una muy baja concentración de nitrógeno, en comparación con las concentraciones registradas para la estratificación temprana. Por lo anterior, la presencia de *Nodularia spumigena* en el mes de septiembre de 2010 puede ser explicada por factores favorables (temperatura y limitación de N y, probablemente, una falta de competencia por parte de otras especies, Sykes, 1974).

La razón de que el hipolimnion del lago se torne rápidamente anóxico, a pesar de ser oligotrófico, se puede explicar por diversas causas. Lewis (1987) menciona que la concentración de oxígeno en la estratificación, la productividad y profundidad de un lago, son factores que determinan la concentración de oxígeno disuelto en el hipolimnion. En un lago tropical con temperaturas relativamente altas (favorece altas tasas de consumo de oxígeno), que presenta una baja productividad y un periodo de estratificación extenso, como el caso de Alchichica, se favorece a que el hipolimnion se torne anóxico rápidamente, como lo expone Lewis (2002). Específicamente en Alchichica, se ha observado que el momento del año en que el hipolimnion se vuelve anóxico se relaciona con el tamaño y cantidad de fitoplancton que domina en el lago. Así, por ejemplo, cuando la fracción grande se desarrolla -entre mayo-junio (Adame *et*

al., 2008)- es difícil que sea comida por el zooplancton, por lo tanto, aunado a su facilidad de hundimiento, llegará con más facilidad al fondo; por el contrario cuando la fracción pequeña domina entre marzo-abril (Adame *et al.*, 2008), es mucho más fácil aprovechada por el zooplancton además de que tarda mucho en llegar al fondo, o bien, se degrada mucho antes en la columna de agua.

Los resultados encontrados permiten aceptar la hipótesis 2 la cual implica que la disponibilidad de nutrimentos en la capa de mezcla modifica la composición de especies y la biomasa del fitoplancton, ratificando lo que estudios previos (Oliva *et al.*, 2001; Adame *et al.*, 2008) asumían.

Modificaciones de las condiciones naturales (ciclo anual) por enriquecimientos (bioensayos).

Las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo y sin adición de nutrimentos, propició una dominancia de las diatomeas en Tf control durante la mayoría de los meses (excepto en agosto). La persistencia de dicho grupo ante las condiciones experimentales podría deberse a que son algas que requieren una baja concentración de nutrimentos -puesto que están adaptadas a un ambiente oligotrófico-, debido a las reservas internas que acumulan en su interior, logrando subsistir ante un déficit de nutrimentos en el sistema, como sugiere Tilman (1977). Parecería llamar la atención que en este medio sean las diatomeas las dominantes, por motivo de adaptarse mejor a condiciones de limitación, cuando usualmente se considera que el grupo que presenta mejores condiciones de adaptabilidad serían las cianoprocaritas. Sin embargo, esto es así en condiciones de mayor concentración de nutrimentos, al menos de FRS, lo que no se observa en Alchichica. Si se comparan las concentraciones máximas de FRS en Alchichica ($20.4 \pm 3.1 \mu\text{g L}^{-1}$ en febrero) con las de lagos eutróficos típicamente dominados por cianoprocaritas (30.8 ± 23.2 a $96.2 \pm 130.2 \mu\text{g L}^{-1}$, Carrasco-Gata, 2007; $79.98 \mu\text{g L}^{-1}$, Jiménez-Arreola, 2010), se observa que en Alchichica dichas concentraciones son menores, a pesar de ser un lago alcalino-sódico (condición química que favorece mayores concentraciones de fósforo en la columna, Blomqvist *et al.*, 2004), lo que -en todo caso- resulta acorde con la condición de oligotrofia del lago.

Al realizarse los enriquecimientos, se observa que N+P y N+P+Si son los tratamientos que provocaron una mayor respuesta del fitoplancton. Numerosas investigaciones dan muestra de ello (Levine *et al.*, 1997; López y Dávalos-Lind, 1998;

Bernal-Brooks *et al.*, 2002; Bernal-Brooks *et al.*, 2003; Ramírez-Olvera *et al.*, 2009; Ramos-Higuera *et al.*, 2008). Sin embargo, únicamente Levine *et al.* (1997) utilizaron sílice en sus tratamientos, aunque sin obtener el crecimiento importante que ellos esperaban de las diatomeas.

El hecho de que el tratamiento N+P es uno de los que promueven una respuesta importante en el crecimiento de la biomasa del fitoplancton ha sido explicado por diversos autores. Harpole *et al.* (2011) mencionan que puede darse una co-limitación simultánea, esto es, cuando se dan respuestas en la biomasa solo si dos recursos se añaden simultáneamente. Levine *et al.* (1997) observaron una respuesta importante en el crecimiento del fitoplancton debido a que en una comunidad pueden existir especies dominantes limitadas por fósforo y que también tienen un pobre aporte de nitrógeno, por lo cual, al añadir solo fósforo, se induce automáticamente una limitación por nitrógeno. Elser *et al.* (1990) resumen con claridad este efecto al decir: “la baja frecuencia en las respuestas detectables al enriquecimiento de un solo nutriente, en comparación con las respuestas obtenidas en los enriquecimientos combinados, resulta consistente con el punto de vista de que el nitrógeno y el fósforo se encuentran en el medio en escasez relativa, por lo que el enriquecimiento de uno de ellos sin el otro genera únicamente una breve mejoría en el crecimiento, esto es, hasta que se produce la escasez del otro nutriente. Pero cuando se adicionan tanto nitrógeno como fósforo, la mejoría en el crecimiento algal se sostiene al grado de generar respuestas substanciales, por ende, detectables”. Dicho efecto fue precisamente lo que se observó en el presente trabajo.

Ahondando en esto, los grupos que resultaron beneficiados tras el enriquecimiento N+P en Alchichica fueron las clorofitas seguidas de las cianoprocariontas, mientras que en el enriquecimiento N+P+Si fueron las cianoprocariontas y clorofitas en la primera parte del estudio y las diatomeas en la segunda. Lo anterior se interpreta en forma diferencial dependiendo de los grupos y especies involucradas.

El éxito de las clorofitas seguramente radica en las diferentes estrategias fisiológicas que poseen. Por ejemplo, Aparecida *et al.* (2011) muestran en sus resultados que el fósforo resuspendido del sedimento es una fuente importante para las clorofitas. La clorofita *Monoraphidium dibowskii*, del mismo modo que *Monoraphidium minutum*, se caracteriza por aprovechar muy bien los pulsos de nutrimentos (Ramos-Higuera, 2008), por lo que muestran un rápido crecimiento. De hecho, el género *Monoraphidium* se asocia a ambientes enriquecidos, altas concentraciones de fósforo y

proporciones N:P bajas (Aparecida *et al.*, 2011). Tanto Ramos-Higuera *et al.* (2008) como Ramírez-Olvera *et al.* (2009) registraron una mayor biomasa de clorofitas al término de los bioensayos en el tratamiento N+P.

En el caso de las cianoprocariontes (en este caso, *Nodularia spumigena*), que son dominantes en abril y mayo para N+P, además de presentar la habilidad de fijar N₂ atmosférico, pueden almacenar nutrientes metabólicos esenciales dentro del citoplasma (p. ej., gránulos de polifosfatos, Carrasco-Gata, 2007), tanto en condiciones de suministro excesivo como ante limitación de nitrógeno (Aparecida *et al.*, 2011). Adicionalmente, *N. spumigena* presenta aerotopos (Oliva *et al.*, 2009), estructuras que tienden a llenarse de gas (proporcionando flotabilidad) con la fotosíntesis lo cual además contribuye a que se encontrara a la especie en la Z_{MIX} durante dichos meses.

Rosiles-González (2005) encontró en Alchichica una dominancia o al menos altas densidades de *Epigloeosphaera* sp. (con la característica de presentar colonias mucilaginosas) en época de estratificación, al mismo tiempo que concentraciones relativamente altas de nutrientes (NID en un intervalo de 0.4 a 11.5 µM y FRS de 0.1 a 0.4 µM). Esto mismo coincide con la dominancia de *Epigloeosphaera* que se registró en este estudio en los meses de diciembre 2009 y julio 2010 y durante los cuales las concentraciones promedio de NID fueron de 2 y 2.5 µM, respectivamente para diciembre y julio, adicional a 0.42 y 0.10 µM de FRS para cada mes. Dichos valores se encuentran dentro de los intervalos obtenidos por Rosiles-González (2005), por lo que la dominancia de *Epigloeosphaera* sp. queda explicada.

Tien *et al.* (2002) mencionan que la presencia de mucílago en el fitoplancton, como en el caso de *Epigloeosphaera* sp., se relaciona con una mayor acumulación de nutrientes en éste en comparación con la del medio, por lo que no sería de extrañar ver cianoprocariontes con presencia abundante de mucílago creciendo en condiciones de deficiencia de nutrientes.

De este modo, las cianoprocariontes dominantes en los bioensayos demuestran que mediante diferentes adaptaciones logran asegurar su sobrevivencia ante un escenario en donde diferentes características del medio son modificadas (p. ej., luz y nutrientes) como lo es en los bioensayos.

Se esperaba que el tratamiento N+P+Si fuera especialmente ventajoso para las diatomeas debido a que se adiciona sílice que, como se mencionó anteriormente, en Alchichica se encuentra en bajas concentraciones. Este elemento es indispensable para construir las frústulas de las diatomeas (Falciatore y Bowler, 2002; Reynolds, 2006). Sin

embargo, otras investigaciones han encontrado que las diatomeas no muestran crecimiento con la adición de sílice. Por ejemplo, Ault et al. (2000) encontraron que al cuarto día de bioensayos se dio una disminución importante ($<10 \text{ cel ml}^{-1}$) de *Cyclotella* sp. en relación con la muestra inicial (150 cel ml^{-1}), tanto en el tratamiento N+P como en N+P+Si. A pesar de ello, dichos autores no aportaron una explicación concluyente para sus hallazgos.

En otros trabajos similares en donde se incluyó sílice (p. ej., Levine et al., 1997), tampoco existió un impacto aparente en el crecimiento de diatomeas. Se atribuye este hecho a que no se registraron concentraciones de sílice menores a $3.5 \mu\text{M}$ (o bien, $48.4 \mu\text{g L}^{-1}$) durante la investigación, ya que se considera que dicho valor es limitante para las diatomeas (Schelske y Stoermer, 1972). Para el presente trabajo las concentraciones de sílice registradas en el lago se encontraron por debajo o cerca del valor antes mencionado ($48.4 \mu\text{g L}^{-1}$) en seis meses (septiembre 2009-febrero). Por otro lado, tomando en cuenta la concentración propuesta por Interlandi et al. (1999; $100 \mu\text{g L}^{-1}$), pudo existir limitación potencial por sílice en el mismo periodo de septiembre 2009 a febrero y también en junio, agosto y septiembre de 2010; se esperaría que el tratamiento N+P+Si hubiera ejercido un efecto positivo para las diatomeas en los nueve meses en que ocurrió esto, lo cual no fue totalmente así ya que solo para agosto y septiembre se observó una dominancia de diatomeas aunque alcanzaron una biomasa relativamente escasa.

Otro factor que pudo haber afectado negativamente el crecimiento de las diatomeas en los bioensayos es la intensidad de luz utilizada, ya que -como se mencionó antes- pudo haber ejercido algún efecto inhibitorio para las diatomeas. Específicamente, en Alchichica parece haberse detectado que *C. alchichicana* muestra una "preferencia" por condiciones de poca luz (Rodríguez-Rocha, 2011), ya que ante tal escenario es como se observan las mayores densidades en la época de circulación invernal donde la luz es más tenue, hay menos horas luz al día y mayor turbidez (Oliva et al., 2006), o bien, en la época de estratificación cuando forma el máximo profundo de clorofila (DCM, por sus siglas en inglés; Ardiles et al., 2012) en el metalimnion, donde se registran valores $\sim 1\%$ del PAR superficial (Alcocer et al., 2008). Rodríguez-Rocha (2011) señala que, del total de clorofila a en la columna de agua, casi el 50% se atribuye al DCM, donde domina en biomasa *Cyclotella* spp. (Rosiles-González, 2005).

Además existe evidencia de que a pesar de que algunas especies de diatomeas desarrollan la capacidad de fotoprotección cuando son sometidas a estrés por luz (Zhu

y Green, 2010), no logran aumentar considerablemente su crecimiento con el enriquecimiento en sílice.

Lo descrito hasta aquí permite aceptar parcialmente la hipótesis 3, pues el tratamiento N+P favorece la biomasa de clorofitas y cianoprocariotas; sin embargo, la adición de N+P+Si no parece favorecer sustancialmente la de diatomeas.

CONCLUSIONES

Con relación a la primera hipótesis que enunciaba *“en la capa de mezcla se espera una marcada limitación de nutrientes por NID y SiRS durante las épocas de estratificación del lago, y en particular del SiRS para diatomeas durante la circulación”*:

1. Los resultados de los bioensayos confirman solo parcialmente la hipótesis. Por un lado, los incrementos más marcados, tanto de biomasa como de concentración de clorofila *a*, se dieron en los bioensayos correspondientes a la época de estratificación indicando que es la época en la que el fitoplancton está más limitado. Sin embargo, los resultados mostraron que:
2. Existe una co-limitación de NID y FRS (y no por NID y SiRS) durante la estratificación, mientras que en la circulación, tanto la concentración del SiRS como la proporción estequiométrica indicaron que fue limitante en dos de los tres meses de la circulación del mismo modo que para NID.
3. Sólo cuando fueron adicionados conjuntamente varios nutrientes se promovió un aumento notable en la biomasa fitoplanctónica; ningún nutriente adicionado en formato individual promovió un crecimiento fitoplanctónico superior al registrado en el control.

Con relación a la segunda hipótesis que enunciaba que *“la disponibilidad de nutrientes (cantidad y proporción) tendrá efecto en los cambios en la composición de especies y biomasa del fitoplancton a lo largo del ciclo anual”*:

4. Se evidenció que la adición combinada de nitrógeno y fósforo con o sin sílice (tratamientos N+P y N+P+Si) promovieron un incremento en la concentración de clorofila *a* y la biomasa fitoplanctónica.
5. Se indujeron cambios considerables en la composición del fitoplancton con respecto al control. El cambio más notable fue el reemplazo de una dominancia de diatomeas (T0 y Tf del tratamiento control) a una dominancia de clorofitas y

cianoprocariotas (Tf de los tratamientos N+P y N+P+Si), principalmente en épocas de estratificación.

Con relación a la tercera hipótesis, que propone que “el tratamiento con adición de N+P favorecerá un aumento de biomasa en los grupos de clorofitas y cianoprocariotas, principalmente, mientras que el tratamiento con adición de N+P+Si favorecerá, además, el aumento de biomasa en el grupo de las diatomeas” se encontró que:

6. Efectivamente el enriquecimiento con N+P favoreció el aumento en la biomasa de clorofitas y cianoprocariotas, particularmente la clorofita *Monoraphidium dybowskii* y la cianoprocariota *Epigloeosphaera* sp.
7. Por otro lado, el enriquecimiento con N+P+Si tuvo un efecto similar al mencionado para el N+P, favoreciendo el aumento en la biomasa de clorofitas y cianoprocariotas, aunque la biomasa de diatomeas en el tratamiento N+P+Si también fue mayor a la que alcanzaron en el tratamiento N+P. Esto es, el tratamiento N+P+Si no favoreció particularmente a las diatomeas.
8. Cabe hacer notar que los mayores incrementos en la biomasa de las diatomeas en el tratamiento N+P+Si se presentaron durante la estratificación temprana y bien establecida, más que en la circulación. Lo anterior es probablemente debido a que, sobre todo en la estratificación temprana, existe una mayor disponibilidad tanto de NID y SiRS en el lago, además de una relativa estabilidad en la columna de agua.
9. La falta de la respuesta de las diatomeas esperada ante la adición de sílice, en particular durante la circulación, parece ser más atribuible a una disminución en la disponibilidad de nitrógeno en particular y quizás de fósforo, que por la disminución del sílice al nivel limitante. Otra posibilidad es que la intensidad lumínica utilizada, aún siendo la promedio de la Z_{MIX} haya sido muy elevada, considerando que los dos desarrollos masivos de diatomeas que se presentan en el lago (floreamiento invernal y DCM) se realizan bajo condiciones particularmente tenues de luz.

RECOMENDACIONES

En este apartado se pretende exponer algunos aspectos que se cree son importantes considerar en trabajos próximos respecto al tema desarrollado con anterioridad y que se considera, por la experiencia, deben manejarse con especial atención.

De las condiciones ambientales manejadas en los bioensayos y que se observó pudo haber causado algún tipo de estrés en las especies, en particular en las diatomeas que son dominantes en biomasa, es la intensidad de luz utilizada puesto que, como se ha mencionado antes, es una intensidad que parece encontrarse por encima de la que se ha utilizado en otros trabajos sobre bioensayos de enriquecimiento con nutrimentos. Asimismo, las condiciones bajo las cuales se desarrollan de mejor manera las diatomeas en Alchichica, son característicamente de luz tenue.

De mayor ayuda sería contar con las concentraciones de nutrimentos al finalizar los bioensayos con la finalidad de conocer el estado de los mismos y que sirva de referencia para conocer la cantidad que posiblemente fue aprovechada por el fitoplancton.

Durante la revisión de bibliografía relacionada con el tema fue posible detectar que en los últimos años es común la utilización de una metodología novedosa en la investigación del papel que juegan los nutrimentos sobre el fitoplancton. Algunas de ellas tienen que ver con la utilización de monocultivos de especies cuando se requiere estudiar una especie en particular, lo cual vendría bien para generar este tipo de información para las especies de Alchichica. Otros estudios utilizan la biología molecular (p. ej., actividad de la fosfatasa alcalina o las proporciones proteínas-carbohidratos; Amand *et al.*, 1989), que aplicados a la par con bioensayos de enriquecimiento, permite comparar y complementar los resultados que se obtienen.

Lo anterior es posible ya que, por un lado se evalúa la respuesta fisiológica de las especies que da información de las condiciones dentro de las células, y por otro, los cambios que se presentan en la composición de especies lo cual refleja la influencia del ambiente sobre las diferentes especies. El manejo de NIFTs (nutrient-induced fluorescent transient, por sus siglas en inglés) también son recomendables dado que indican la limitación de nutrimentos particulares mediante la detección de cambios en la fluorescencia tras la adición de nutrimentos (Holland *et al.*, 2004).

BIBLIOGRAFÍA

1. Adame, M. F., J. Alcocer y E. Escobar. 2008. Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology* 53: 22-31.
2. Alcocer, J, A. Lugo, E. Escobar, M. R. Sánchez y G. Vilaclara. 2000. Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, México. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*. 27: 3166-3169.
3. Alcocer, J. y A. Lugo. 2003. Effects of El Niño on the dynamics of Lake Alchichica, central Mexico. *Geofísica Internacional*. 42(3): 523-528.
4. Alcocer, J., E. Escobar y L. A. Oseguera. 2008. Acoplamiento pelágico-bentónico: respuesta de la zona bentónica profunda a la sedimentación del florecimiento invernal de diatomeas en el lago oligotrófico Alchichica, Puebla, México. *Hidrobiológica* 18 (1 suplemento): 115-122.
5. Amand, A. L., P. A. Soranno y S. R. Carpenter. 1989. Algal nutrient deficiency: Growth bioassays versus physiological indicators. *Lake and Reservoir Management* 5(1): 27-35.
6. Aparecida, F. S., J. Aparecida L. y L. Rodrigues. 2011. Effects of nutrients enrichment on algal communities: an experimental in mesocosms approach. *Acta Limnologica Brasiliensia*. 23(2): 128-137.
7. Ardiles, V., J. Alcocer, G. Vilaclara, L. A. Oseguera y L. Velasco. 2012. Diatom fluxes in a tropical, oligotrophic lake dominated by large-sized phytoplankton. *Hydrobiologia*. 679: 77-90.
8. Arredondo, F. J. L., E. L. E. Borrego, D. R. M. Castillo y L. M. A. Valladolid. 1983. Batimetría y morfometría de los lagos "maars" de la Cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biótica*. 8(1): 37-47.
9. Ault, T., R. Velzeboer y R. Zammit. 2000. Influence of nutrient availability on phytoplankton growth and community structure in the Port Adelaide River, Australia: bioassay assessment of potencial nutrient limitation. *Hydrobiologia* 429: 89-103.

10. Barsanti, L. y P. Gualtieri. 2006. *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Press. 301 p.
11. Bernal-Brooks, F. W., L. Dávalos-Lind y O. T. Lind. 2003. Seasonal and spatial variation in algal growth potencial and growth-limiting nutrients in a shallow endorheic lake: Lake Pátzcuaro (México). *Lake and Reservoirs Research and Management*. 8: 83-93.
12. Bernal-Brooks, F. W., L. Dávalos-Lind y O.T. Lind. 2002. Assessing trophic state of an endorheic tropical lake: the algal growth potential and limiting nutrients. *Archiv für Hydrobiologie*. 153(2): 323-338.
13. Blomqvist, S., A. Gunnars y R. Elmgren. 2004. Why the limiting nutrient differs between temperate coastal seas and freshwater lakes: A matter of salt. *Limnology and Oceanography*. 49(6): 2236-2241.
14. Carrasco-Gata, D. F. 2007. *Cianobacterias plantónicas y cianotoxinas en embalses españoles*. Tesis de doctorado. Universidad autónoma de Madrid. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. Madrid. 320 p.
15. Collins, C. D. 1988. Interaction of nitrogen/phosphorus and silica/phosphorus ratios in determining phytoplankton species composition and abundance in Lake George, New York. *Lake and Reservoir Management*. 4(2): 261-269.
16. Crul, R. C. M. 1995. *Limnology and hydrology of Lake Victoria. Comprehensive and comparative study of Great Lakes*. UNESCO/IHP-N Project M-5.7. UNESCO Pub. Paris. 76 p.
17. De Baar, H. J. W. 1994. von Liebig's Law of the Minimum and plankton ecology (1899-1991). *Progress in Oceanography*. 33: 347-386.
18. De la Peña, 2007. Cell growth and nutritive value of the tropical benthic diatom, *Amphora* sp., at varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. *Journal of Applied Phycology*. 19: 647-655.
19. Elser, J. J., E. R. Marzolf y C. R. Goldman. 1990. Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwater of North America: a review and critique of experimental enrichments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 47: 1468-1477.

20. Environmental Protection Agency (EPA). 1978. *The Selenastrum capricornutum printz. Algal assay bottle test. Experimental design, application and data interpretation protocol*. EPA-600/9-78-018. Corvallis Environmental Research Laboratory. Oregon. 122 p.
21. Falciatore, A. y C. Bowler. 2002. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annual Reviews of Plant Biology*. 53: 109-130.
22. Filonov, A., I. Tereshchenko y J. Alcocer. 2006. Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophysical Research Letters* 33. L07404, DOI: 10.1029/2006GL025901.
23. García, E., 1980. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. Instituto de Geografía. UNAM. 254 p.
24. Gerber, D. W. y J. E. Burris. 1981. Photoinhibition and P700 in the marine diatom *Amphora* sp. *Plant Physiology*. 68: 699-702.
25. Golterman, H. L. 2004. *The chemistry of phosphate and nitrogen compounds in sediments*. Kluwer Academic Pub. Netherlands. 251 p.
26. Grasshof, K., Ehrhardt, M. y Kremling, K. 1983. *Methods of seawater analysis* (2a. ed.). Weinheim: Verlag Chemie, 419pp.
27. Harpole, W. S., J. T. Ngai, E. E. Cleland, E. W. Seabloom, E. T. Borer, M. E. S. Bracken, J. J. Elser, D. S. Gruner, H. Hillebrand, J. B. Shurin y J. E. Smith. 2011. Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecology Letters*. 14: 852-862.
28. Hecky, R. E. y P. Kilham. 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography*. 33(4): 796-822.
29. Hecky, R.E., P. Campbell y L.L. Hendzel. 1993. The stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus in particulate matter of lakes and oceans. *Limnology and Oceanography*. 38(4): 709-724.
30. Holland, D., R. Simon y J. Beardall. 2004. Assessment of the nutrient status of phytoplankton: a comparison between conventional bioassays and nutrient-induced fluorescence transients (NIFTs). *Ecological Indicators*. 4: 149-159.

31. Interlandi, S. J., S. S. Kilham y E. C. Theriot. 1999. Responses of phytoplankton to varied resource availability in large lakes of the Greater Yellowstone Ecosystem. *Limnology and Oceanography*. 44(3): 668-682.
32. Jiménez-Arreola, G. 2010. Variaciones en la dominancia de grupos fitoplanctónicas en la capa de mezcla/zona trofógena de un embalse tropical eutrófico con cambios significativos de nivel. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 78 p.
33. Kirkwood, D.S. 1994. Sanplus Segmented Flow Analyzer and its Applications, Seawater analysis. Amsterdam, Skalar. 51pp.
34. Kruk, C., V. L. M. Huszar, E. T. H. Peeters, S. Bonilla, L. Costa, M. Lürling, C. S. Reynolds y M. Scheffer. 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater biology*. 55: 614-627.
35. Lampert, W. y U. Sommer. 1997. *Limnoecology. The ecology of lakes and streams*. Oxford University Press, Oxford. 382 p.
36. Levine, S. N., A. d. Shambaugh, S. E. Pomeroy y M. Braner. 1997. Phosphorus, Nitrogen and Silica as controls on phytoplankton biomass and species composition in Lake Champlain (USA-Canada). *Journal of Great Lakes Research*. 23 (2): 131-148.
37. Lewis, W. M. 1978. Dynamics and succession of the phytoplankton in a tropical lake: Lake Lanao, Philippines. *Journal of Ecology*. 66: 849-880.
38. Lewis, W. M. 1996. Tropical lakes: How latitude makes a difference. En: Schiemer F. y K. T. Boland (Eds.). *Perspectives in tropical limnology*. SPB, Amsterdam, pp. 43-64.
39. Lewis, W. M. 2002. Causes for the high frequency of nitrogen limitation in tropical lakes. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*. 28: 210-213.
40. Lewis, W. M. Jr. y W. A. Wurstbaugh. 2008. Control of lacustrine phytoplankton by nutrients: erosion of the phosphorus paradigm. *International Review of Hydrobiology*. 93 (4-5): 446-465.
41. Lewis, W.M. 1983. A revised classification of lakes based on mixing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 40: 1779-1787.

42. López, L. E. y L. Dávalos-Lind. 1998. Algal growth potencial and nutrient limitation in a tropical river-reservoir system of the Central Plateau, México. *Aquatic Ecosystem Health and Management*. 1: 345-351.
43. Lund, J. W.G., Kipling, C., y E. D. LeCren. 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations of counting. *Hydrobiologia* 11: 143-70.
44. Macek, M., Alcocer, J., Lugo Vázquez, A., Martínez-Pérez, Ma. E., Peralta Soriano, L., y G. Vilaclara Fatjó. 2009. Long term picoplankton dynamics in a warm-monomictic, tropical high altitude lake. *Journal of Limnology*. 68(2): 183-192.
45. Macek, M., D. Pestová y M. E. Martínez-Pérez. 2008. Dinámica temporal y espacial de la comunidad de ciliados en un lago monomictico-cálido Alchichica (Puebla, México). *Hidrobiológica* 18(1): 25-35.
46. MacIntyre, H. L. y J. J. Cullen. 2003. Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. En: Andersen, R. A. (ed.) *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, pp. 287-326.
47. Maestrini, S. Y., D. J. Bonin y M. R. Droop. 1984. Phytoplankton as indicators of sea water quality: Bioassay approaches and protocols. En: Shubert, L.E. (ed.) *Algae as ecological indicators*. Academic Press Inc. London. pp. 71-132.
48. Oliva, M. G. 2001. *Estudio de la variación vertical y temporal de las comunidades fitoplanctónicas durante el florecimiento de cianofíceas en el Lago Cráter Alchichica, Puebla*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 133 p.
49. Oliva, M. G., A. Lugo, J. Alcocer y E. A. Cantoral-Uriza. 2006. *Cyclotella alchichicana* sp. nov. from a saline Mexican lake. *Diatom Research*. 21(1): 81-89.
50. Oliva, M. G., A. Lugo, J. Alcocer y E. A. Cantoral-Uriza. 2008. Morphological study of *Cyclotella choctawhatcheana* Prasad (Stephanodiscaceae) from a saline Mexican lake. *Saline Systems*. 4: 1-17.
51. Oliva, M. G., A. Lugo, J. Alcocer, L. Peralta y L. A. Oseguera. 2009. Planktonic Bloom-Forming *Nodularia* in the Saline Lake Alchichica, Mexico. En: Wurtsbaugh, W., D. Naftz, A. Oren y P. Palacios (Eds.) *Saline lakes around the world: unique*

- systems with unique values. *Natural Resources and Environmental Issues*, Vol. XV, pp 121-126.
52. Oliva, M. G., A. Lugo, J. Alcocer, L. Peralta y M. R. Sánchez. 2001. Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia* 466: 299-306.
 53. Oliva, M. G., G. Garduño-Solórzano, G. Vilaclara-Fatjó, M. M. Ortega-González, Ma. L. García-Gómez y A. Pliego-Avedaño. 2009. Diatomeas: Bacillariophyceae. Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM. México. 110 p.
 54. Ortega-Murillo, Ma. R., R. Alvarado-Villanueva, J. D. Sánchez-Heredia, R. Hernández-Morales, M. Arredondo-Ojeda e I. Martínez-Sánchez. 2011. Abundancia y distribución del fitoplancton en un lago hiposalino, Michoacán, México. *Biológicas*. 13(2): 15-20.
 55. Oseguera, L. A., J. Alcocer y G. Vilaclara. 2010. Relative importance of dust inputs and aquatic biological productions as sources of lake sediments in an oligotrophic lake in a semi-arid area. *Earth Surface Processes and Landforms*. DOI: 10.1002/esp.2062 (www.interscience.wiley.com).
 56. Ramírez-Olvera, M. A., J. Alcocer, M. Merino-Ibarra y A. Lugo. 2009. Nutrient limitation in a tropical saline lake: a microcosm experiment. *Hydrobiologia* 626: 5-13.
 57. Ramos-Higuera, E. 2008. *Determinación del nutriente limitante de la comunidad fitoplanctónicas del lago Alchichica, Puebla, evaluado como potencial del crecimiento algal, bajo condiciones experimentales en microcosmos y mesocosmos*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM. México. 79 p.
 58. Ramos-Higuera, E., J. Alcocer, E. Ortega-Mayagoitia y A. Camacho. 2008. Nitrógeno: elemento limitante para el crecimiento fitoplanctónico en un lago oligomítico tropical. *Hidrobiológica* 18 (1 suplemento): 105-113.
 59. Reynolds, C. S. 1999. Non-determinism to probability, or N:P in the community ecology of phytoplankton. *Archiv für Hydrobiologie*. 146(1): 23-35.
 60. Reynolds, C.S. 2006. *The ecology of phytoplankton. Ecology, biodiversity and conservation*. Cambridge University Press. 535 p.

61. Rodríguez-Rocha, A. 2011. *Composición, estructura y biomasa en un lago monomíctico cálido*. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 81 p.
62. Rosiles-González, G. 2005. *Estudio comparativo del picofitoplancton y fitoplancton de talla mayor en el Lago Alchichica*. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México. 103 p.
63. Saito, M. A., T. J. Goepfert y J. T. Ritt. 2008. Some thoughts on the concept of colimitation: Three definitions and the importance of bioavailability. *Limnology and Oceanography*. 53 (1): 276-290.
64. Sakka, A., L. Legendre, M. Gosselin, B. LeBlanc, B. Delesalle y N. M. Price. 1999. Nitrate, phosphate and iron limitation of the phytoplankton assemblage in the lagoon of Takapoto Atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Aquatic Microbial Ecology*. 19: 149-161.
65. Schelske, C. L. y Stoermer, E. F. 1972. Phosphorus, silica and eutrophication of Lake Michigan. En: G. E. Likens (Ed.), *Nutrients and Eutrophication*. Special Symposium Vol. 1, American Society of Limnology and Oceanography, Allen Press, Lawrence, KS, pp. 157-171.
66. Sterner, R.W., T. Andersen, J.J. Elser, D.O. Hessen, J.M. Hood, E. McCauley y J. Urabe. 2008. Scale-dependent carbon: nitrogen: phosphorus seston stoichiometry in marine and freshwaters. *Limnology and Oceanography*. 53(3): 1169-1180.
67. Sun, J. y D. Liu. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25: 1331-1346.
68. Sykes, R. M. 1974. Competition for nutrients among the plankton. *The American naturalist* 108(962): 578-579.
69. Tien, C. J., V. Krivtson, E. Levado, D. C. Sigee y K. N. White. 2002. Occurrence of cell-associated mucilage and soluble extracellular polysaccharides in Rostherne Mere and their possible significance. *Hydrobiologia*. 485: 245-252.
70. Tilman, D. 1977. Resource competition between Plankton Algae: An Experimental and Theoretical Approach. *Ecology* 58(2): 338-348.

71. Vilaclara, G., M. Chavez, A. Lugo, H. González y M. Gaytan. 1993. Comparative description of crater-lakes Basic chemistry in Puebla state, Mexico. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*. 25: 435-440.
72. Wetzel, R. G. 2001. *Limnology. Lakes and river ecosystems*. 3rd edition. Academic Press. 1006 p.
73. Xu, J., A. Y. T. Ho, K. Yin, X. Yuan, D. M. Anderson, J. H. W. Lee y P. J. Harrison. 2008. Temporal and spatial variations in nutrient stoichiometry and regulation of phytoplankton biomass in Hong Kong waters: Influence of the Pearl River outflow and sewage inputs. *Marine Pollution Bulletin*. 57: 335-348.
74. Yoshiyama, K., J. P. Mellard, E. Litchman, C. A. Klausmeier. 2009. Phytoplankton competition for nutrients and light in a stratified water column. *The American Naturalist*. 174(2): 190-203.
75. Zhu, S-H. y B. R. Green. 2010. Photoprotection in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Role of LI818-like proteins in response to high light stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797: 1449-1457.