



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.

EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL PROCARIOPLANCTON DURANTE EL FENÓMENO DE EMBLANQUECIMIENTO "WHITING EVENT" EN EL LAGO VOLCÁNICO ATEXCAC, ESTADO DE PUEBLA.

Tesis que para obtener el Título de Biólogo presenta:

LUIS ALBERTO VIZUET MARTINEZ

Director de tesis:

Dr. JUSTO SALVADOR HERNÁNDEZ AVILÉS.

Laboratorio de Limnoecología

México, D.F.

Diciembre, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

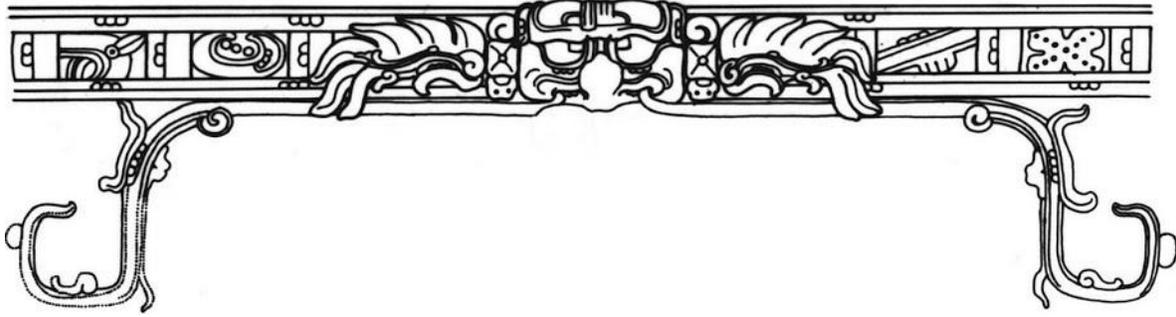


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.



#### TOCHIN IN METZTIC

*Yohualtotomeh  
inchan omanqueh:  
cenca quiahuia yohualnepantla.  
In ihcuac oyahqueh in tilmixtli,  
yohualtotomeh patlantinemih,  
azo quittayah tochin in metztic.  
Nehhuatl huel oniquimittac  
in yohualtotomeh  
ihuan tochin in metztic.*

#### EL CONEJO EN LA LUNA

Los pájaros de la noche  
se quedaron en su casa;  
mucho llovía a la mitad de la noche.  
Cuando las nubes negras se fueron,  
los pájaros estuvieron revoloteando,  
tal vez veían al conejo en la Luna.

Yo pude contemplar  
a los pájaros de la noche  
y también al conejo en la Luna.

Autor: Miguel León Portilla

*A mi madre:*

*Tu fuerza, tu carácter, tu apoyo y tu guía me han llevado hasta este punto del camino. Estamos cansados desde hace tiempo, lo sé, pero has sido tu quien me ha enseñado que no podemos descansar y que lo único útil ante cualquier situación es seguir adelante. Mamá, este logro es tan tuyo como mío. Gracias por tanto, perdón por tan poco.*

*A ese ser:*

*A ese ser intangible, sin forma, sin rostro, que puede ser uno o cualquiera. Ese ser cuya voz se ha quedado en mi memoria, mientras que su rostro ha sido borrado de mis recuerdos ante el ímpetu del tiempo cual si fuera una lágrima derramada bajo la lluvia. A ti, que me ayudaste, me enseñaste y me serviste de ejemplo y que probablemente hoy ya te he olvidado. A ti también te dedico este trabajo.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia. Una colección de personas con las sombras más oscuras que resaltan el brillo de sus virtudes. Algunos unidos por sangre y otros simplemente por un lazo más fuerte; su compañía, cariño y apoyo llenan mi corazón y me recuerdan que no es la vida lo que importa sino las personas con las que esa vida se comparte. Elizabeth, Vania, Ever, Ale, Raúl, Víctor, Yolanda, Paty, gracias por estar siempre ahí.

Agradezco mi mentor, el Doctor, gracias por todo su apoyo, su amistad, sus enseñanzas y la fe que deposita en cada persona por el simple hecho de ser humano, ha sido un ejemplo en mi vida y un incentivo para ser mejor persona cada día. No hay mucho que decir, hay mucho por hacer.

Gracias a mis amigos, Coni, Wendy, Less y John que en mi corazón estarán por siempre.

Gracias a mis compañeros Ary, Raúl, Jorge, Arturo, Oscar, Marino, mi cría Mariell, Duly, Pato, Tayra, Daniel, Shaid, Oswaldo, César, David, a todas las Beres, Lore, Yisus... por haber compartido conmigo el camino del aprendizaje, hacer de la escuela un hogar y convertirse en mis amigos.

Arantza, te agradezco especialmente a ti, sin tu apoyo este trabajo jamás se hubiera realizado. Hemos recorrido juntos un sendero largo y difícil de explicar, uno que solo nosotros entendemos y te agradezco por ser parte de mi presente, por alimentar mi futuro, y por nunca quedarte en mi pasado.

Gracias, Raúl. Por inspirarme a plantar firmes mis pies y a caminar sin perderme, por ser mi mejor amigo, mi hermano.

Gracias a ti, amor, que nunca me has fallado, siempre me acompañas y vives conmigo, que te esparces en mi vida, desde lo más fino de la ciencia hasta lo más sutil de cada día. Eres mi mayor virtud.

Y gracias a Dios, que mantiene su ojo omnisciente sobre mí y nunca permite que mi fortuna se esfume... aunque le guste mantener el suspenso casi todo el tiempo.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por el desarrollo académico y personal que he recibido dentro de sus puertas.

Agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por la formación integral que recibí en esta institución.

Gracias al Dr. Salvador Hernández Avilés, director de mi trabajo de tesis, por enseñarme la forma de trabajar dentro del ámbito científico, con una perspectiva constante de innovación y refinamiento metodológico, apelando siempre al crecimiento humano y profesional de aquellos que lo rodean.

Al equipo del laboratorio de Limnoecología de la FES Zaragoza por su apoyo durante la toma de muestras y el procesamiento de las mismas. Destacando, además, el ambiente de trabajo que promovió la colaboración y el compañerismo.

Agradezco a los integrantes del Proyecto de Investigación en Limnología Tropical de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Miroslav Macek por su constante colaboración con nuestro equipo de trabajo, otorgando el uso del equipo necesario para el procesamiento de muestras y por su disposición para compartir información y realizar comentarios que fueron clave para mejorar la calidad de este trabajo.

A la M. en C. Laura Peralta Soriano, por su apoyo sincero en la parte logística, que resulto crucial para obtener de forma oportuna los resultados de este trabajo.

Agradezco a mis sinodales: Dra. Alejandrina Graciela Ávila Ortiz, Dr. Justo Salvador Hernández Avilés, Dr. José Luis Gómez Márquez, Biól. Angélica Elaine González Schaff y M. en C. Jorge Antonio Valdivia Anistro, por la revisión de esta tesis y por sus comentarios y observaciones contribuyeron significativamente a mejorar la calidad de este trabajo.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN219313 con el proyecto: Dinámica del plancton procariota en lagos monomícticos cálidos volcánicos en la Cuenca Oriental Puebla. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida para la elaboración de esta tesis.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
ANTECEDENTES .....	5
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	7
Objetivo general:.....	7
Objetivos particulares: .....	7
MÉTODO .....	8
Zona de estudio y muestreo.....	8
Muestreo.....	8
Mediciones <i>in situ</i> .....	8
Procesamiento de muestras.....	9
Densidad y Biomasa del picoplancton autotrófico y heterotrófico .....	9
CARD-FISH .....	10
Incrustación y pre-tratamiento enzimático .....	10
Hibridación y amplificación de la señal de tiramida .....	10
Conteo de células hibridadas .....	12
Análisis estadístico de datos .....	12
RESULTADOS .....	13
Hidrodinámica.....	13
Parámetros físico-químicos.....	13
Nutrientes .....	15
Densidad de PPH.....	18
Densidad de PPA .....	18
Cuantificación de la biomasa del PPH y PPA .....	18
Detección de grupos procariontes mediante CARD-FISH .....	20
Dominios Bacteria y Archaea.....	20
Filo Proteobacteria .....	22
Filo Actinobacteria .....	24
Filo Bacteroidetes.....	24
Filo Planctomycetes .....	24
Filo Thaumarchaeota.....	25

Control negativo.....	25
Composición de la comunidad bacteriana .....	27
Análisis estadístico de datos .....	28
Correlación de variables .....	34
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	38
Dinámica del lago antes del evento de emblanquecimiento.....	38
Precipitación espontánea de carbonato de calcio.....	39
Precipitación de carbonatos inducida por fotosíntesis.....	42
Relación densidad-biomasa del PPA .....	44
El papel de la comunidad heterotrófica .....	44
Determinación del ensamblaje del procarioplancton .....	45
Composición de la comunidad del procarioplancton .....	47
La actividad bacteriana como modeladora de los ciclos biogeoquímicos en el lago Atexcac.....	54
El fenómeno de emblanquecimiento en el Lago Atexcac.....	56
CONCLUSIONES.....	58
Literatura citada:.....	59

## RESUMEN

Esta investigación presenta el primer estudio de la comunidad bacteriana antes, durante y después del fenómeno de emblanquecimiento (Whiting event) y la primera evaluación de la composición del procarioplancton del lago Atexcac. Este fenómeno se debe a la formación de microcristales de carbonato de calcio en el agua, lo que provoca una coloración blanquecina en el agua y una reducción de la zona eufótica, este evento se presenta tanto en ambientes marinos como cuerpos acuáticos interiores. La duración y frecuencia de este fenómeno pueden relacionarse con el calentamiento global, por lo que su estudio es de vital importancia.

A través de la técnica de CARD-FISH se identificaron los taxa bacterianos de mayor importancia en los sistemas acuáticos. Se encontró que la comunidad bacteriana en el lago Atexcac estuvo dominada por organismos del dominio *Bacteria* principalmente por la clase *Alfaproteobacteria* y específicamente por los géneros LD12 y *Paracoccus*. Además, se encontraron cambios en la densidad de las clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* en relación con los cambios en las formas predominantes de carbono. Se observó también, un florecimiento de picoplancton autotrófico (filo *Cyanobacteria*) durante el fenómeno de emblanquecimiento en el epilimnion.

De acuerdo con los cambios en la composición de la comunidad bacteriana se propone el mecanismo por el cual la actividad bacteriana, autotrófica y heterotrófica, desencadena y participa activamente en la precipitación de carbonatos y se descarta la posibilidad de que el fenómeno de emblanquecimiento en el sistema se deba a causas únicamente inorgánicas.

**Palabras clave:** fenómeno de emblanquecimiento, precipitación de carbonatos, comunidad bacteriana, procarioplancton, ciclos biogeoquímicos.

## INTRODUCCIÓN

Desde que se originaron los primeros organismos, la actividad biológica ha modelado las características del medio ambiente a través del consumo de nutrientes, intercambio gaseoso, arresto de materiales y modificación química de diferentes sustratos. Un claro ejemplo del impacto de la actividad de los seres vivos es el cambio de una atmósfera reductora a una oxidante, producido por las cianobacterias (Holland, 1984). Durante décadas se ha llevado a cabo el estudio de los procesos biológicos que podrían contener las claves de la evolución química de la atmósfera y la hidrósfera; además de la relación de estos procesos con los cambios estructurales en la biosfera (Każmierczak *et al.*, 2011). Hasta el momento se sabe que la vida se originó en el agua y que éste medio es el que mantiene la vida, ya que todos los organismos la requieren y para muchos representa su hábitat. El papel que juegan los microorganismos en los cuerpos acuáticos es fundamental para determinar la composición química del sistema y el impacto de esta fuerte actividad biológica se puede extender incluso al nivel global (Cotner & Biddanda, 2002).

El análisis de los ambientes más representativos del planeta indica que los microorganismos se distribuyen principalmente en tres sistemas: el agua de los mares, el suelo y el estrato subsuperficial de los sedimentos (Delille *et al.*, 1997; Sánchez-Andrea *et al.*, 2011; Zinger *et al.*, 2011; Van Elsas *et al.*, 2012). Hasta el momento se desconoce el número total de especies bacterianas presentes en la naturaleza (Whitman *et al.*, 1998). Sin embargo, el número de especies descritas oficialmente asciende a 10,599 y tal cifra incrementa anualmente (Parte, 2013). Además de esta gran diversidad, que no ha sido analizada, los microorganismos representan la mayor parte de la biomasa total del planeta y canalizan una gran cantidad de la materia y energía a niveles tróficos superiores (Cole, 1999; Piqueras, 2010).

Debido a su enorme abundancia, los microorganismos constituyen los mayores reservorios de carbono y de nitrógeno en el planeta (Whitman *et al.*, 1998; Jiao *et al.*, 2010). De tal forma que las tasas de reciclado de carbono (C) y nitrógeno (N) en la escala global, están determinadas por la actividad microbiana, ya sea de forma directa mediante degradación hidrolítica de compuestos orgánicos, o indirecta modificando la retención o movimientos de los nutrientes (Ehrlich, 1998). La comunidad microbiana procarionte es un elemento fundamental de la estructura funcional de los ecosistemas, debido a sus exclusivas rutas metabólicas y elementos moleculares específicos (Falkowski, 1994); que les permiten actuar como componentes funcionales únicos dentro de los ciclos biogeoquímicos de mayor relevancia para la dinámica del planeta como los ciclos del C, N, fósforo (P) y azufre (S) (Sorokin *et al.*, 2014).

En la actualidad, la importancia del ciclo del C ha cobrado mayor fuerza, como resultado del aumento de la temperatura del planeta por el efecto invernadero (Kondratyev & Varotsos, 1995). Diferentes estudios han demostrado que la contribución de los lagos, ríos y embalses al flujo global del carbono es comparable a la realizada por el suelo o el océano (Battin *et al.*, 2009). Pese a que los sistemas acuáticos epicontinentales representan una pequeña fracción de la superficie terrestre (Downing *et al.*, 2006) la capacidad que podrían tener para transportar, transformar y almacenar materiales estaría desproporcionada (Tranvik *et al.*, 2009) y podrían hasta cierto punto, modificar el clima, no sólo localmente, sino a una escala mayor (Cole *et al.*, 2007). Como resultado

de su tamaño, la sensibilidad de los lagos, ríos y otros cuerpos de agua es mucho mayor ante los cambios del medio ambiente como son el aumento de temperatura atmosférica, la precipitación y la evaporación. Por lo que son puntos clave para el estudio del impacto del calentamiento global (Williamson *et al.*, 2008; Adrian *et al.*, 2009).

Un componente significativo del ciclo del C es la formación mineral de carbonato de calcio, ya que es un paso intermedio entre la formación de sedimentos carbonatados y el arresto de carbono en océanos, lagos, agua superficial y subterránea (Dittrich & Obst, 2004; Higgins *et al.*, 2009). La biomineralización de carbonatos es la formación de carbonatos como resultado de la actividad biológica; siendo uno de los principales procesos que regulan los niveles de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmósfera (Bundeleva *et al.*, 2012).

El emblanquecimiento, fenómeno de emblanquecimiento o fenómeno blanco (Whiting o Whiting event según Bathurst (1975)) es un fenómeno que se ha observado en agua dulce y los océanos de regiones tropicales y subtropicales, durante el cual ocurre la precipitación de pequeñas partículas de carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) (cristales de 1-2 µm de diámetro) cuya saturación en la superficie del sistema genera una coloración blanquecina en el agua, a la que debe su nombre dicho fenómeno. La precipitación de carbonatos se ha explicado principalmente a través de dos vías, una sostiene que la precipitación es un proceso espontáneo en el agua y otra que implica un cierto nivel de acción biológica necesaria para desencadenar la precipitación (Thompson *et al.*, 1997; Kienel *et al.*, 2009). La primera ruta para explicar el emblanquecimiento se trata de un proceso inorgánico en el que se presenta la precipitación de carbonatos como una respuesta a los cambios en la temperatura del agua y en la actividad de los iones relacionados con los cambios climáticos estacionales que generan condiciones físico-químicas favorables (Otsuki & Wetzel, 1974; García Ruiz, 1998; Shiraishi, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que el proceso de formación de carbonatos no debe ser descrito solamente desde el punto de vista inorgánico sino que debe estar relacionado con la actividad biológica durante eventos específicos en un sistema (Thompson *et al.*, 1997; Hodell *et al.*, 1998; Sondi & Juračić, 2010).

El componente autotrófico de la comunidad procarionte ha sido considerado el principal agente responsable de la precipitación de carbonatos en los cuerpos acuáticos (Thompson *et al.*, 1997; Kosamu & Obst, 2009; Shiraishi, 2012). Por otro lado hay estudios que señalan la importancia de la actividad de las bacterias heterotróficas por favorecer o provocar, y realizar el emblanquecimiento del agua (Arp *et al.*, 1999; Thompson, 2000; Tribovillard *et al.*, 2010). Desde un punto de vista más integral, donde se enlazan las fracciones heterotróficas y autotróficas como modeladoras de las condiciones químicas del medio acuático, se han propuesto tres posibles mecanismos mediante los cuales el procarioplancton se relaciona con el proceso de mineralización del carbonato de calcio:

- 1) La inducción biológica de la precipitación debida a cambios químicos en el medio circundante de la pared celular por efecto de la remoción de CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis (Thompson *et al.*, 1997; Shiraishi, 2012).

2) La mineralización biológicamente controlada donde la superficie de la célula funciona como un sitio de la nucleación o bien, de forma intracelular como se ha descubierto recientemente (Bosak & Newman, 2003; Kosamu & Obst, 2009; Couradeau *et al.*, 2012).

3) La liberación de calcio (Ca) del mucilago de las cianobacterias o de los exopolímeros de su pared celular (Spadafora *et al.*, 2010).

En lagos de aguas duras (dureza total  $>120 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ ) se ha estudiado la precipitación de carbonatos desde hace algunas décadas obteniéndose resultados muy diversos (Küchler-Krischun & Kleiner, 1990). En algunos de estos sistemas, la carga del sodio (Na) es equivalente o mayor a la de carbonatos y bicarbonatos; por lo que, son denominados lagos sódicos (Grant, 2006). La elevada alcalinidad, salinidad y pH, hace que estos sistemas presenten condiciones químicas muy particulares bajo las cuáles se favorece una gran abundancia y diversidad de grupos bacterianos, lo que genera una gran cantidad de procesos fisiológicos distintos que se relacionan con el reciclado de nutrientes y la incorporación de sustratos inorgánicos a la cadena trófica (Sorokin *et al.*, 2014). Esta actividad bacteriana al estar relacionada con los ciclos biogeoquímicos, sitúa a los lagos sódicos como laboratorios naturales (Sorokin *et al.*, 2014).

El estudio del componente microbiano esta sesgado, debido la dificultad de manejar directamente a los organismos (Casamayor, 2010). Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha permitido nuevos acercamientos al estudio de los microorganismos en diferentes sistemas.

Muchos de los procesos que han sido descritos en el océano, han sido estudiados en los cuerpos epicontinentales y se han extrapolado la función de los diferentes grupos bacterianos del océano a dichos cuerpos acuáticos interiores (Glöckner *et al.*, 1999). Los constantes esfuerzos para obtener resultados más detallados sobre la abundancia, distribución y composición de la comunidad bacteriana, asociada con las características físicas y parámetros químicos de diferentes sistemas naturales han favorecido la aparición de técnicas como la hibridación fluorescente *in situ* de bacterias (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) (Glöckner *et al.*, 2000; Urbach *et al.*, 2001). Esta técnica molecular que emplea sondas de oligonucleótidos específicos es ampliamente utilizada en la ecología microbiana (Bryukhanov *et al.*, 2011; Hesham & Alamri, 2012). La técnica de FISH-CARD (Fluorescence *In situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition) desarrollada por Pernthaler *et al.* (2002) para ambientes marinos fue modificada por Sekar *et al.* (2003) para ser aplicada en cuerpos de agua interiores. Las modificaciones realizadas permitieron un mayor rango de detección bacteriana en el procedimiento; por lo que, la determinación de los grupos bacterianos presentes en la columna de agua se ha vuelto una tarea más cercana a la realidad.

El uso de esta novedosa técnica ha permitido la determinación de la composición de la comunidad bacteriana en un momento específico combinado con la determinación de otras variables limnológicas de forma simultánea ofrece un enfoque integral para el estudio de los sistemas acuáticos. Por lo tanto, determinar la composición de la comunidad bacteriana en el marco de investigación del fenómeno de emblanquecimiento hace de este trabajo un aporte de alto impacto para la Limnología y particularmente para el estudio de este fenómeno, con implicaciones a largo plazo que todavía no conocemos.

## ANTECEDENTES

El estudio de la comunidad bacteriana ha sido de particular importancia desde el momento en el que la comunidad bacteriana se fue colocada como el componente basal de la cadena trófica en los sistemas acuáticos (Azam *et al.*, 1983). Azam *et al.* (1983) propusieron que la comunidad bacteriana es la principal responsable de la reincorporación de nutrientes y a su vez, permite la integración de estos nutrientes a niveles superiores de la cadena trófica.

Aunque comúnmente se asocia a los organismos procariontes con la descomposición de materia orgánica, estos microorganismos participan activamente en los ciclos biogeoquímicos. Uno de los taxa procariontes de mayor importancia en los sistemas acuáticos, son las cianobacterias (procariontes que realizan la fotosíntesis oxigénica). En ambientes con un bajo nivel trófico, las cianobacterias de menor tamaño ( $\leq 2 \mu\text{m}$  de diámetro), conocidas como picocianobacterias (Pcy) generan el mayor aporte a la biomasa y la productividad primaria (Callieri & Stockner, 2000, 2002); ya que, gracias a su tamaño reducido, presentan una mayor facilidad para aprovechar los recursos (nutrientes y luz) bajo condiciones limitantes para otros grupos (Raven, 1998).

El estudio de los organismos con base en la secuenciación de la subunidad ribosomal 16S ha hecho posible la clasificación de los organismos en tres dominios diferentes (Woese *et al.*, 1990). Sin embargo, las bacterias carecen de una clasificación oficial (Parte, 2013), pero su nomenclatura y sistemática se mantienen bajo un consenso estricto (Lapage *et al.*, 1992; Garrity *et al.*, 2004).

El dominio *Bacteria* alberga a organismos que se ha observado que llevan a cabo funciones importantes en la columna de agua en sistemas marinos y de agua dulce como son los procesos de nitrificación, desnitrificación y la reducción y oxidación del azufre (Cole, 1999; Cotner & Biddanda, 2002; Wu *et al.*, 2006; Sorokin *et al.*, 2014). Además, se ha observado que algunos taxa bacterianos mantienen relaciones funcionales estrechas con otros grupos planctónicos (zoo y fitoplancton), manifestando cambios en su abundancia, biomasa y características morfológicas en respuesta a la depredación y florecimientos algales (Newton *et al.*, 2011).

Además del filo *Cyanobacteria*, dentro del dominio *Bacteria* se encuentran agrupadas bacterias heterotróficas como los fila *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Planctomycetes* cuya presencia y función dentro de los cuerpos acuáticos es ampliamente reconocida (Kowalchuk *et al.*, 1997; Cottrell & Kirchman, 2000; Zwart *et al.*, 2002; Fuerst, 2004; Lemarchand *et al.*, 2006; Ghai *et al.*, 2014)

Dentro del dominio *Archaea* han resaltado los organismos cuya capacidad principal radica en proliferar en ambientes con condiciones extremas de temperatura y salinidad (Woese *et al.*, 1990; Brochier-Armanet *et al.*, 2008). Sin embargo, recientemente se ha descrito a un grupo de arqueas que proliferen en sistemas que no presentan condiciones extremas y cuya principal función radica en la oxidación de compuestos de nitrógeno (Callieri *et al.*, 2015). Además, las arqueas realizan la metanogénesis, que se considera el proceso final de la descomposición de la materia orgánica.

En esta investigación se incluyeron los taxa procariontes de mayor importancia ecológica para los sistemas acuáticos (Diagrama 1).

Diagrama 1. Clasificación taxonómica de los grupos bacterianos estudiados en este trabajo. Los taxa analizados se muestran en negritas.

---

Dominio **Bacteria**

Filo **Cyanobacteria**

Filo *Proteobacteria*

Clase **Alfaproteobacteria**

Género **Candidatus LD12**

Género **Paracoccus**

Clase **Betaproteobacteria**

Clase **Gammaproteobacteria**

Clase **Deltaproteobacteria**

Filo **Actinobacteria**

Filo **Bacteroidetes**

Filo *Planctomycetes*

Familia **Planctomycetaceae**

Dominio **Archaea**

Filo **Thaumarchaeota**

## HIPÓTESIS

- Se encontrará una mayor densidad de procariontes fotoautotróficos en el estrato superficial de la columna de agua por la relación entre la fotosíntesis oxigénica y la nucleación de carbonatos.
- Se espera observar un cambio en la composición del procarioplancton durante el fenómeno blanco como resultado tanto de la participación de uno o más taxa heterotróficos en la nucleación como efecto del cambio en las formas de carbono en el agua.
- La disponibilidad de materia orgánica y de nutrientes en la termoclina favorecerán una mayor diversidad y abundancia de grupos procariontes heterotróficos y autotróficos en la profundidad donde se encuentre el mayor gradiente de densidad.
- La cantidad de carbonato de calcio que precipite como resultado del evento blanco responderá fundamentalmente a factores físico-químicos como el incremento de la temperatura del agua, cambios en el pH y en la conductividad eléctrica.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

- Determinar la estructura, composición, biomasa y variación espacio-temporal de taxa procariotas, antes, durante y después del fenómeno de emblanquecimiento en el lago Atexcac y su relación con la dinámica limnológica.

### Objetivos particulares:

- Determinar la variación espacio-temporal de la abundancia de los Dominios *Archaea* y *Bacteria*, así como de algunos grupos bacterianos específicos antes, durante y después del fenómeno de emblanquecimiento.
- Evaluar la variación del plancton procariota autotrófico y heterotrófico en el lago Atexcac durante el periodo de estudio.
- Estimar la importancia de los grupos procariontes en los ciclos biogeoquímicos.

## MÉTODO

### Zona de estudio y muestreo

El lago Atexcac (19°20'04.65" N y 97°26'57.48" W) es uno de seis lagos tipo maar, también llamados Axalapascos los cuales, se ubican en la cuenca Oriental, en el estado de Puebla. La cuenca Oriental se localiza entre el Eje Neovolcánico Transmexicano (ENV) y la Sierra Madre Oriental (SMO) en el altiplano mexicano. En esta región el régimen de precipitación pluvial (400 mm, media anual) es superado por la tasa de evaporación (500-600 mm, media anual) lo que provoca un déficit de agua (Alcocer *et al.*, 2005). La temperatura media anual es de 12.9 ° C.

El lago Atexcac se encuentra a un costado del poblado San Luis Atexcac, en la región de los Llanos de San Juan, al norte de las montañas Las Derrumbadas y en el extremo suroeste de la sierra de Techachalco a una altitud de 2340 m s.n.m. (Figura 1). El lago se ubica dentro de un cráter, compuesto principalmente por material de origen volcánico, con una profundidad total de 160 m cuyas paredes poseen una pendiente muy pronunciada (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007). El lago tiene 39 m de profundidad máxima y una superficie de 0.31 Km<sup>2</sup>, albergando un volumen de 6.5 millones de m<sup>3</sup> (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983). La composición química del agua está dominada por iones sodio y cloro, presentándose una salinidad de 6.086 mg L<sup>-1</sup>, una elevada alcalinidad de 1501 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> (Armienta *et al.*, 2008) y un pH que varía de 8.1 a 9.3. Estas características del lago lo clasifican como un lago sódico según los criterios de Grant (2006).

### Muestreo

Se realizaron muestreos mensuales en el lago Atexcac a partir del mes de febrero del 2014 para detectar el fenómeno de emblanquecimiento, dado que este evento se presentó en el mes de septiembre, las muestras utilizadas en este trabajo fueron las correspondientes a los meses de agosto, septiembre y octubre del año 2014, considerados como el antes, durante y después del evento de emblanquecimiento. Se tomaron muestras de agua con una botella toma muestras tipo Van Dorn de 3 L de capacidad en una sola estación que corresponde a la zona más profunda del lago en intervalos de 5 m aproximadamente, a partir de la superficie considerando el epilimnion, metalimnion e hipolimnion cuyos límites fueron establecidos con base en los perfiles de temperatura y oxígeno disuelto. Los perfiles verticales se determinaron *in situ* con un oxímetro digital HACH hq-140 con sensor LBDO 101 (Light Dissolved Oxygen, ± 0.2 mg · L<sup>-1</sup>, HACH). Se estableció la profundidad eufótica como el promedio de la visibilidad al disco de Secchi multiplicado por la constante de Margalef (1983) de 3.5.

### Mediciones *in situ*

Se tomaron muestras de 1 L de agua, para la determinación *in situ* de conductividad, alcalinidad, dureza de calcio y dureza total por métodos colorimétricos (APHA, 2012). Se midió el pH de las muestras utilizando un potenciómetro digital tipo pluma (±0.1, PHMETER); mientras que la conductividad y cantidad de sólidos disueltos se midieron con un sensor multiparámetro CORNING (±0.01 mS · cm<sup>-1</sup> y ±0.01 g · L<sup>-1</sup> respectivamente, CORNING, USA). Adicionalmente se tomaron muestras de 125 ml de agua, en las mismas profundidades, y fueron fijadas con 6.75mL de

solución de formaldehído libre de partículas (concentración final 2% [Vol/Vol]) para realizar diferentes análisis de la componente microbiana.

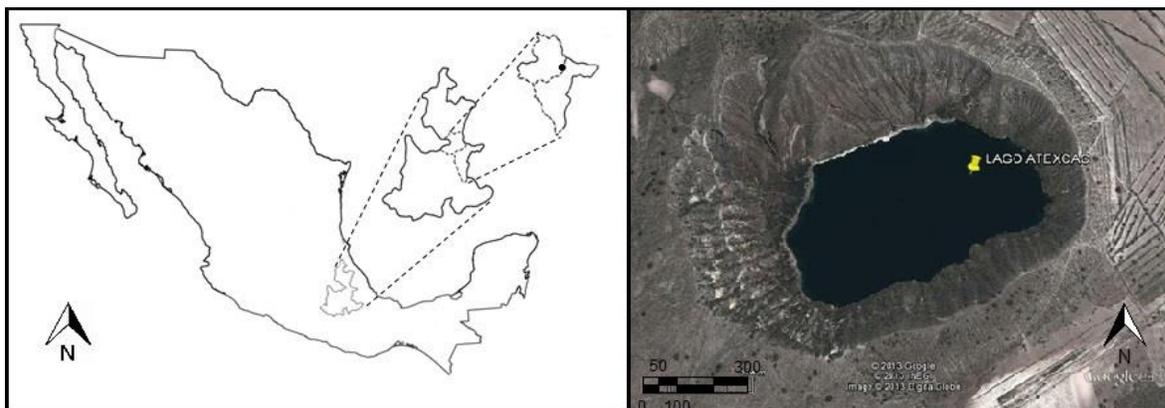


Figura 1. Derecha: Localización geográfica del lago Atexcac en la cuenca Oriental, estado de Puebla. Izquierda: Vista aérea del lago señalando la estación de muestreo.

### Procesamiento de muestras

Con las muestras tomadas en botellas de 1 L se determinó la concentración de fósforo soluble reactivo (FSR), fósforo total (FT), amonio, nitritos, nitratos, sulfatos y silicatos a través de métodos colorimétricos (APHA, 2012).

### Densidad y Biomasa del picoplancton autotrófico y heterotrófico

La abundancia del picoplancton total (PPT) (picoplancton autotrófico y heterotrófico), previamente fijado fue evaluada por conteos directos en membranas negras de policarbonato (diámetro de poro: 0.2  $\mu\text{m}$ ), teñidas con DAPI (por su nombre IUPAC en inglés: 4',6-diamidino-2-phenylindole) y montadas en aceite de inmersión. El picoplancton autotrófico (APP) fue concentrado en membranas blancas de policarbonato (diámetro de poro: 0.2  $\mu\text{m}$ ) y se realizaron conteos directos por autofluorescencia en un microscopio de epifluorescencia (Leica, Alemania). Se utilizó el filtro CY3, que es permeable al espectro de luz de color verde, para obtener una fluorescencia máxima de las células. El picoplancton heterotrófico (PPH) se calculó como la diferencia entre el PPT y el PPA.

Por otra parte, la biomasa bacteriana fue evaluada para las profundidades de muestreo utilizando fotografías de las muestras marcadas con DAPI y fotografías de las preparaciones de APP que fueron tomadas con una cámara digital a color (Canon S45). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (USA) con macros de aproximación de volumen adicionales. El contenido de carbono orgánico celular para el PPH se calculó de acuerdo con la fórmula alométrica de Loferer-Krößbacher *et al.* (1998) al ser la más adecuada para muestras teñidas con este fluorocromo (Posch *et al.*, 2001) y para el PPA de acuerdo al volumen celular multiplicado por la constante de Weisse (1993).

## **CARD-FISH**

La técnica de hibridación *in situ* se llevó a cabo con base en el protocolo establecido por Pernthaler *et al.* (2002) y las modificaciones al mismo elaboradas por Sekar *et al.* (2003).

En el laboratorio se filtraron al vacío de 20 a 25 mL de las muestras fijadas con solución de formaldehído, en un plazo menor a 24 horas de realizado el muestreo, con una unidad de filtración (Milipore) utilizando una membrana de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para concentrar las bacterias y una membrana de policarbonato de 0.45  $\mu\text{m}$  como membrana de soporte. Los filtros se enjuagaron con 5mL de agua Mili-Q (MQ) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las membranas se filtraron por duplicado, un juego de membranas se utilizó para llevar a cabo la técnica y el otro se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para realizar repeticiones en caso de ser necesarias.

### **Incrustación y pre-tratamiento enzimático**

Se preparó una solución de agarosa al 0.1% y se calentó en un horno de microondas hasta una temperatura aproximada de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las membranas de policarbonato se sumergieron en la solución de agarosa y se colocaron en cajas de Petri a una temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  dentro de una campana hasta que se secaron por completo. Los filtros fueron removidos de las cajas añadiendo 1.5 ml de etanol (EtOH) con una micropipeta y se dejaron secar nuevamente a temperatura ambiente.

Una vez secas, las membranas se incubaron en una solución de ácido clorhídrico 0.01 M durante 10 min a temperatura ambiente, enseguida, se lavaron con solución búfer de fosfato (SFB) y agua MQ.

Las membranas fueron incubadas en una solución de lisozima, preparada al momento, durante una hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este periodo se lavaron las membranas con búfer SFB y agua MQ.

Posteriormente, se cortó una sección equivalente a  $1/8$  de cada membrana para llevar a cabo un tratamiento enzimático distinto para esta pieza, que consistió en incubarlas en una solución de acromopeptidasa, preparada al momento, durante 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El resto de la membrana fue incubada en una solución de Proteinasa K durante 30 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente se lavaron las membranas con MQ y EtOH y se dejaron secar a temperatura ambiente.

### **Hibridación y amplificación de la señal de tiramida**

Después del tratamiento enzimático las membranas fueron cortadas en secciones del mismo tamaño formando banderines. Los fragmentos tratados con acromopetidasa se cortaron en dos secciones y el resto de la membrana se dividió en catorce secciones. Uno de los fragmentos tratados con acromopetidasa y dos de los que fueron tratados con Proteinasa K se almacenaron para ser utilizados en caso de que fuera necesario realizar alguna repetición. Las secciones de los filtros se etiquetaron con lápiz indicando la profundidad de la provenían así como el número de sección para organizarlos después en viales de 1.5 ml de tal manera que en cada vial se colocó una sección de membrana de cada profundidad.

Una vez que se tuvieron organizados los banderines se mezclaron 300 µl de búfer de hibridación y 2µl de la sonda a utilizar para cada vial (Tabla 1). Las sondas utilizadas de oligonucleótidos marcados con peroxidasa de rábano (HRP, Horseradish peroxidase) fueron elaboradas por encargo en Thermo Fisher Scientific (Alemania). Se añadió la solución de hibridación a los viales y se colocaron en un termorregulador (Thermomixer comfort, Eppendorf) durante 24 horas a 35 °C.

**Tabla 1: Sondas de oligonucleótidos utilizadas para la hibridación de los diferentes taxa bacterianos.**

Sonda	Especificidad*	Secuencia	Referencia
<b>EUB I-III</b>	La mayoría de las bacterias, Dominio <i>Bacteria</i> , Orden <i>Planctomycetales</i> , Orden <i>Verrucomicrobiales</i> .	5'-GCW GCC WCC CGW AGG AGW GT-3'	Daims <i>et al.</i> (1999)
<b>ARCH915</b>	Dominio <i>Archaea</i> .	5'- GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT -3'	Stahl & Amann (1991)
<b>ALF968</b>	<i>Alfaproteobacteria</i> , excepto <i>Rickettsiales</i> .	5'- GGT AAG GTT CTG CGC GTT -3'	Neef (1997)
<b>BET42a**</b>	<i>Betaproteobacteria</i> .	5'- GCC TTC CCA CTT CGT TT -3'	Manz <i>et al.</i> (1992)
<b>GAM42a**</b>	<i>Gammaproteobacteria</i> .	5'- GCC TTC CCA CAT CGT TT -3'	Manz <i>et al.</i> (1992)
<b>HGC-69a</b>	<i>Actinobacteria</i> .	5'- TAT AGT TAC CAC CGC CGT -3'	Roller <i>et al.</i> (1995)
<b>CF3-19a</b>	La mayoría de las <i>Flavobacterias</i> , algunos <i>Bacteroidetes</i> , algunos <i>Sphingobacteria</i> .	5'- TGG TCC GTG TCT CAG TAC -3'	Manz <i>et al.</i> (1996)
<b>LD12-121</b>	Familia SAR11, Género <i>Candidatus LD12</i> .	5'- CAC AAG GCA GAT TCC CAC AT-3'	Salcher <i>et al.</i> (2011)
<b>PAR1457</b>	Género <i>Paracoccus</i> .	5'- CTA CCG TGG TCC GCT GCC -3'	Neef <i>et al.</i> (1996)
<b>PLA886</b>	Familia <i>Planctomycetaceae</i> .	5'- GCC TTG CGA CCA TAC TCC C -3'	Neef <i>et al.</i> (1998)
<b>SRB385</b>	La mayoría de los <i>Desulfovibrionales</i> y otras Bacterias	5'- CGG CGT CGC TGC GTC AGG -3'	Amann <i>et al.</i> (1990)
<b>CREN537</b>	Filo <i>Crenearchaeota</i>	5'- TGA CCA CTT GAG GTG CTG -3'	Teira <i>et al.</i> (2004)
<b>NON338</b>	Sonda utilizada como control complementario a EUB 338.	5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC -3'	Amann <i>et al.</i> (1990)

\* Especificidad de las sondas actualizada de acuerdo con RDP base, consultado el 19/08/2015

\*\* Sondas utilizadas con un oligonucleótido no marcado como competidor

Una hora antes de terminar el ciclo de hibridación se preparó una solución búfer de lavado que fue calentada en baño de agua hasta 37°C. Al término de la hibridación, los banderines se lavaron

con el búfer de lavado durante 20-30 minutos a 37°C y posteriormente se incubaron en solución búfer de fosfato con detergente Tritón X-100® (SFBT) por 45 min a 37°C. Los banderines fueron incubados en una solución de tiramida marcada con el fluorocromo ALEXA-448 (Molecular probes®, Life Technologies™) durante 30 min a 37°C en la oscuridad. Al final de esta incubación se eliminó el exceso de líquido colocando rápidamente cada banderín en papel absorbente. Los banderines fueron colocados en nuevos viales con SFBT y se incubaron en ésta solución durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego de la incubación, los banderines fueron lavados con agua MQ y EtOH en la oscuridad y a temperatura ambiente.

Finalmente, se dejaron secar los filtros en la oscuridad y fueron agrupados en cajas de Petri indicando la sonda con la que fueron hibridados y la fecha de muestreo a la que correspondían. Las cajas de Petri fueron envueltas en papel aluminio y se almacenaron a -20 °C hasta su conteo al microscopio.

### **Conteo de células hibridadas**

Las preparaciones de CARD-FISH fueron montadas en medio de montaje especial Vectashield con DAPI (Linaris Biologische Produkte). Utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leica, Alemania) se contaron las células hibridadas utilizando el filtro azul y en el mismo campo, con el filtro de luz ultravioleta, se contabilizaron las células totales marcadas con DAPI.

### **Análisis estadístico de datos**

Se comprobó si los datos cumplían con los supuestos de normalidad a través de métodos estadísticos como diagramas de probabilidad normal y análisis de varianza de Levene. Los datos de biomasa y densidades bacterianas fueron transformados con la función logaritmo (log) para cumplir con los supuestos de normalidad. En el caso de los datos que se ajustaron a la distribución normal se realizaron pruebas de hipótesis para determinar la existencia de diferencias significativas entre las medias de diferentes muestreos, a lo largo de la columna de agua y en los diferentes estratos durante los tres muestreos, empleando el análisis de varianza de Fisher (ANOVA de una vía). Cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En caso de encontrar diferencias significativas para las pruebas paramétricas se realizó el análisis de rangos múltiples de Tukey. En el caso de las pruebas no paramétricas se utilizaron diagramas de caja y bigote con muescas para determinar cuáles grupos de datos eran diferentes.

Para determinar la correlación entre los parámetros limnológicos y de los distintos grupos bacterianos se utilizó un análisis de correlación no paramétrica de Spearman.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS® (Statgraphics plus™, Centurion XVI, Versión 16.1.11).

## RESULTADOS

### Hidrodinámica

De acuerdo con estudios realizados anteriormente en el Lago Atexcac se ha clasificado como monomítico cálido, de acuerdo con su dinámica térmica, de tal manera que el sistema presenta un periodo de mezcla durante el invierno hemisférico y permanece estratificado durante el resto del año que equivale a un periodo de alrededor de ocho meses (Lewis, 1983; Arellano & Gonzáles, 2011; Lagunas & Martínez, 2015).

El presente estudio fue realizado durante el periodo de estratificación (de abril a noviembre de 2014). Correspondió de forma más específica a una parte de la estratificación bien establecida (agosto y septiembre) y al comienzo de la estratificación tardía del sistema (octubre). Durante el periodo de estudio que comprendió la estratificación bien establecida, durante los meses de agosto y septiembre, la columna de agua presentó un epilimnion con una profundidad promedio de 13 m, un metalimnion de 6 m de profundidad aproximadamente, con un gradiente de temperatura de 0.75 °C por metro de profundidad. Finalmente, el hipolimnion alcanzó una amplitud de 14 m. Durante el comienzo de la estratificación tardía el epilimnion alcanzó una profundidad de 20 m, el metalimnion redujo su amplitud hasta 3 m con una máxima variación de temperatura de 0.4 °C por metro de profundidad. El hipolimnion se redujo a una amplitud de 10 m en la columna de agua. La temperatura del agua fue desde  $19.75 \pm 0.49$  °C en la superficie hasta los  $16.6 \pm 1.09$  °C en el fondo del lago (Figura 2).

En los muestreos realizados durante la estratificación bien establecida la concentración de oxígeno disuelto en el agua fue de  $7.2 \pm 0.1$  mg O<sub>2</sub> · L<sup>-1</sup> en el epilimnion, disminuyendo hasta  $4 \pm 0.38$  mg O<sub>2</sub> · L<sup>-1</sup> en el metalimnion. El hipolimnion presentó una mínima concentración de oxígeno con una concentración de  $0.4 \pm 0.02$  mg O<sub>2</sub> · L<sup>-1</sup>. En el mes de septiembre, en la estratificación tardía la concentración de oxígeno disminuyó a lo largo de toda la columna de agua, presentando una concentración de 4.6 mg O<sub>2</sub> · L<sup>-1</sup> en el epilimnion y de 2.9 mg O<sub>2</sub> · L<sup>-1</sup> en el metalimnion mientras que la concentración en el hipolimnion se mantuvo en 0.4 mg O<sub>2</sub> · L<sup>-1</sup> (Figura 2).

La temperatura ambiental promedio durante los muestreos realizados fue de  $19.4 \pm 0.75$  °C con una nubosidad media del 20 % en promedio. En el mes de agosto, la penetración de luz en la columna de agua alcanzó una profundidad de 17 m, mostrando una notable reducción durante el mes de septiembre, alcanzando los 7.4 m de profundidad. Finalmente, la zona eufótica se extendió hasta los 11.7 m durante el mes de octubre (Figura 2).

### Parámetros físico-químicos

El pH en el sistema presentó una ligera y gradual reducción lo largo del tiempo de análisis, con ligeras variaciones a lo largo de la columna de agua que alcanzaron valores de 9 a 9.2 unidades. La salinidad ( $5.99 \pm 0.15$  g · L<sup>-1</sup>) y conductividad ( $12.01 \pm 0.28$  g · L<sup>-1</sup>) del lago presentaron una mínima variación. La concentración de sólidos en disolución se tomó como una medida directa de la salinidad, obteniendo un valor de  $5.99 \pm 0.11$  g · L<sup>-1</sup> en los tres muestreos realizados. La conductividad eléctrica del agua fue de  $11.97 \pm 0.32$  mS · cm<sup>-1</sup> hasta los  $12.29 \pm 0.15$  mS · cm<sup>-1</sup> al final del periodo de estudio (Figura 3).

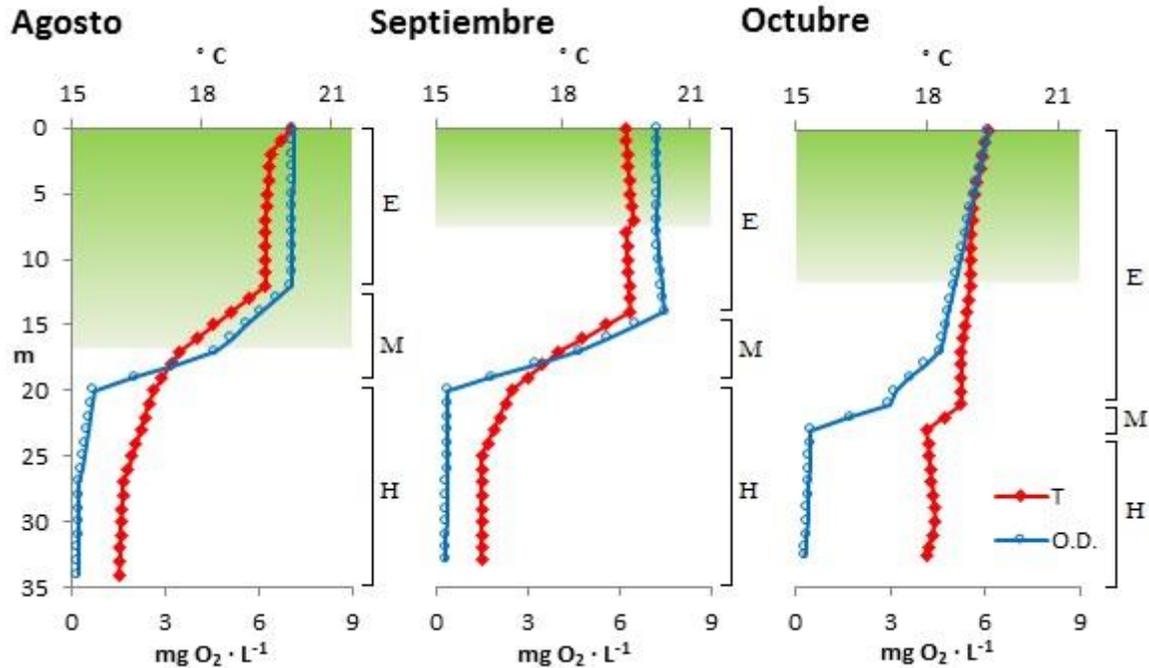
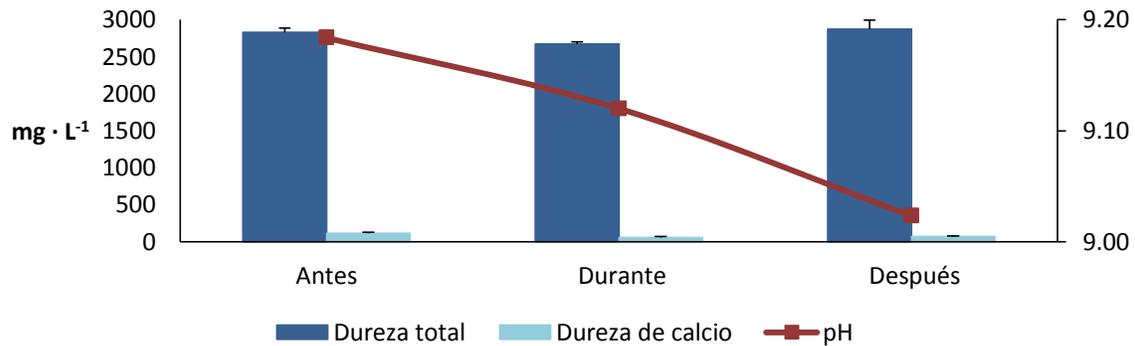


Figura 2. Perfiles verticales de oxígeno y temperatura durante el periodo de estudio. La barra de color verde representa la profundidad de la zona eufótica. Se muestran los estratos definidos para cada perfil señalados como E= epilimnion, M= metalimnion y H= hipolimnion.

De la determinación de la dureza total del agua, interpretada como la concentración de sales formadas de la asociación aniónica con cationes divalentes presentes en la muestra, presentó una concentración que va desde los 2834 a los 2878  $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$  (Figura 3) lo que caracteriza al sistema como agua dura (Wetzel, 2001). Por lo que una mínima parte de esta dureza correspondió a los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $83.42 \pm 29.07 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ ). Por otra parte, la alcalinidad es un parámetro, que representa la capacidad del agua para neutralizar un ácido en función de la concentración de aniones provenientes de sales de ácidos y otras bases, estuvo dada por los carbonatos a lo largo de este estudio. Durante el mes de agosto la alcalinidad de carbonatos fue de  $787.5 \pm 74.79 \text{ mg CO}_3^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$  y la alcalinidad de bicarbonatos fue de  $341.25 \pm 108.82 \text{ mg HCO}_3^{-} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Durante los muestreos de septiembre y octubre la alcalinidad de carbonatos se redujo y la de bicarbonatos se incrementó, de tal forma que la alcalinidad en el mes de agosto fue de  $683.3 \pm 38.8 \text{ mg CO}_3^{2-} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $503.3 \pm 68.31 \text{ mg HCO}_3^{-} \cdot \text{L}^{-1}$  (Figura 3).

## A. Dureza



## B. Alcalinidad

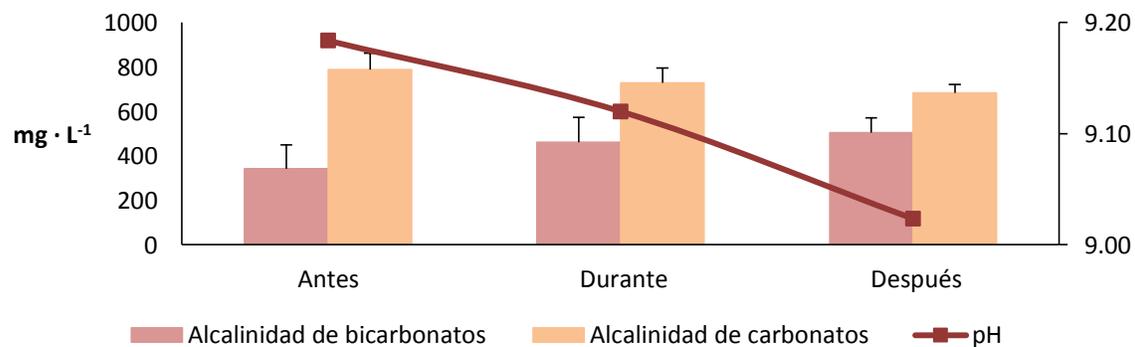


Figura 3. A. Dureza total y dureza de calcio, promedio y desviación estándar, en la columna de agua antes, durante y después del evento de emblanquecimiento. B. Alcalinidad de carbonatos y bicarbonatos, promedio y desviación estándar, a lo largo de la columna de agua para el mismo periodo. En ambas gráficas se muestra la variación del pH promediado a lo largo de la columna de agua.

## Nutrientes

Durante el periodo de estudio la concentración de fósforo total (FT) en el agua fue muy elevada, en el mes de agosto la concentración fue de  $0.1 \pm 0.03 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ . Mientras que en el mes de octubre alcanzó una concentración de hasta  $0.23 \pm 0.07 \text{ mg P} \cdot \text{L}^{-1}$ . Aunque la cantidad de fósforo fue alta, la concentración de fósforo disponible para los organismos, es decir, el fósforo soluble reactivo (FSR) se encontró en una menor proporción alcanzando una concentración máxima de  $0.004 \pm 0.001 \text{ mg PO}_4^- \cdot \text{L}^{-1}$  en los meses de agosto y septiembre. El FSR disminuyó en toda la columna de agua en septiembre; por otro lado, durante y después del fenómeno de emblanquecimiento la concentración de este nutriente en la columna de agua fue mayor, alcanzando su máximo en octubre (Figuras 4 a y 4b).

Así también, se determinó la concentración de tres formas químicas diferentes del nitrógeno: los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Se observó que la concentración de las formas más reducidas de nitrógeno fueron las dominantes en el lago. La concentración de nitratos en el sistema fue máxima en el epilimnion e hipolimnion durante el mes de agosto y se redujo de forma

contrastante a lo largo de todo el perfil durante los meses de septiembre y octubre. De manera que la concentración de nitratos en la columna de agua en el mes de agosto fue de  $0.098 \pm 0.221 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$  y disminuyó hasta  $0.003 \pm 0.002 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$  y  $0.008 \pm 0.003 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$  en el mes de septiembre y octubre respectivamente (Figura 4 c).

En el mes de agosto, la concentración de  $\text{NO}_2^-$  se redujo a mayor profundidad en la columna de agua mientras que en el mes de septiembre presentó un comportamiento inverso, encontrándose la mayor concentración de nitritos en el hipolimnion y disminuyendo gradualmente hacia estratos inferiores en la columna de agua. Esta misma relación se mantuvo durante el mes de octubre con la particularidad de que la concentración de este nutriente alcanzó concentraciones incluso dos veces más altas que en el mes de septiembre (Figura 4 d).

La concentración de amonio en el lago fue la forma más abundante de nitrógeno. La máxima concentración de éste nutrimento,  $0.124 \pm 0.033 \text{ mg NH}_4^- \cdot \text{L}^{-1}$  se registró durante el mes de agosto con una mayor acumulación en la zona del metalimnion. De forma inversa a la concentración de nitritos en el agua el amonio tuvo una reducción durante los meses de septiembre y octubre. La mínima concentración de amonio se determinó durante el mes de septiembre con una concentración de  $0.006 \pm 0.002 \text{ mg NH}_4^- \cdot \text{L}^{-1}$  y se incrementó hasta los  $0.049 \pm 0.021 \text{ mg NH}_4^- \cdot \text{L}^{-1}$  en el mes de octubre (Figura 4 e).

Por otro lado, la concentración de sulfatos y silicatos en el lago fue muy elevada; mostrando una mínima variación de ambos en los diferentes estratos de la columna de agua durante los meses de agosto y octubre. Sin embargo, se observó una disminución en la concentración de ambos nutrientes hacia el fondo del sistema durante el mes de septiembre (Figuras 4f y 4g).

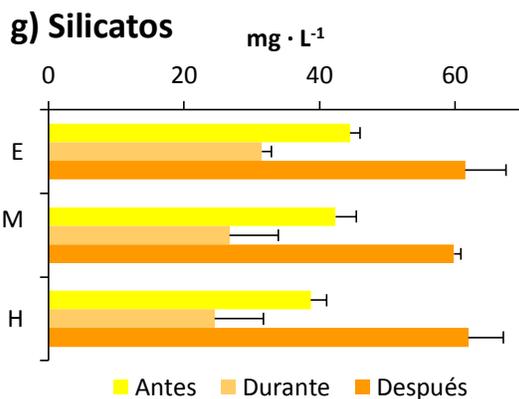
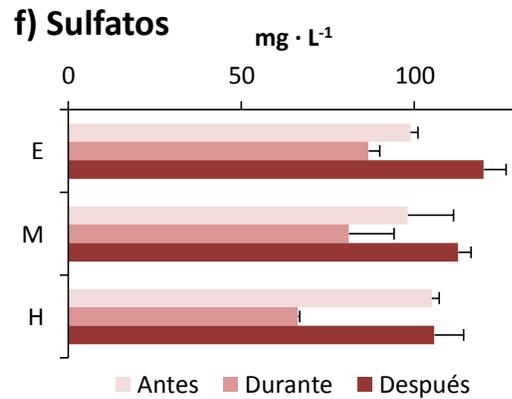
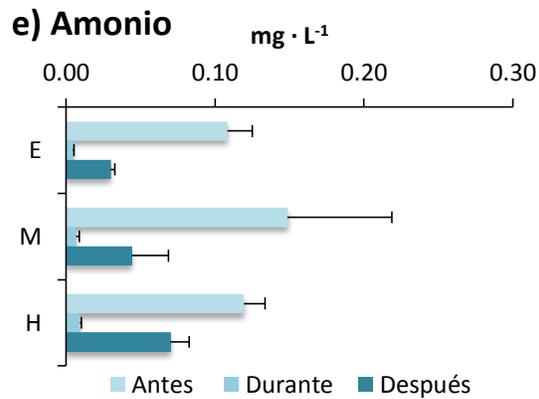
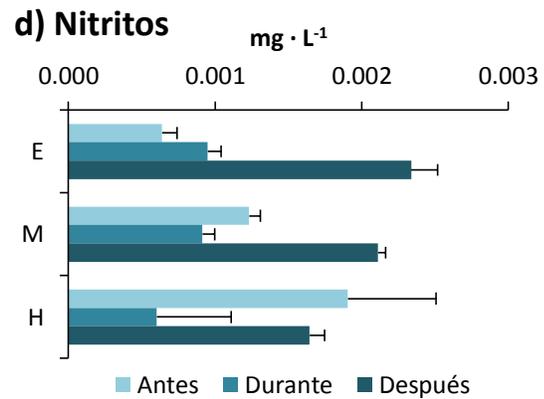
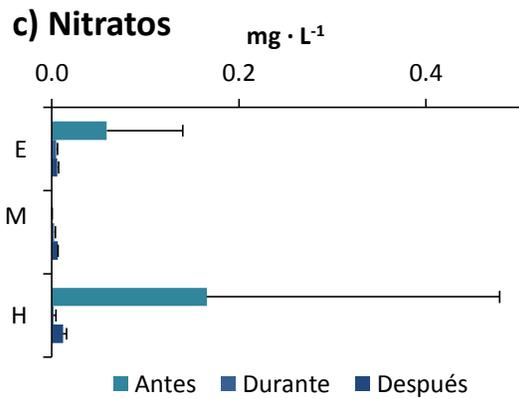
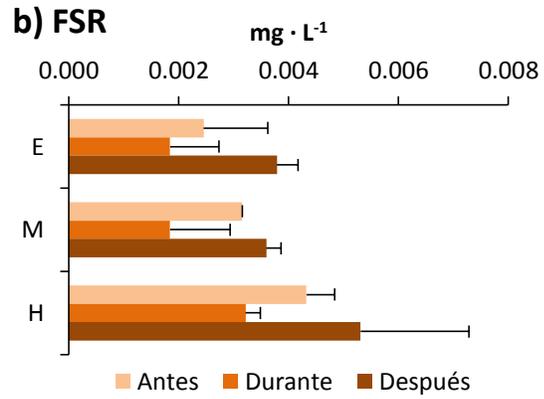
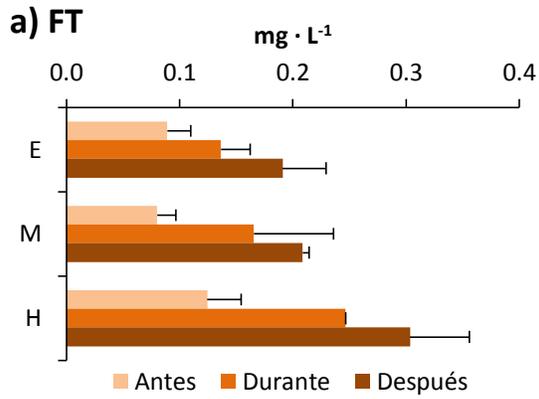


Figura 4. Concentración promedio de nutrientes evaluados en el epilimnion (E), metalimnion (M) e hipolimnion (H) antes durante y después del evento de emblanquecimiento. Fósforo total (a), fósforo soluble reactivo (b), nitratos (c), nitritos (d), amonio (e), sulfatos (f) y silicatos (g).

### **Densidad de PPH**

Durante el mes de agosto se registró la mayor densidad de picoplancton heterotrófico (PPH) en la zona del metalimnion con una abundancia de  $3 \times 10^6$  cél · ml<sup>-1</sup>. Por otra parte, la densidad de PPH en la zona del epilimnion e hipolimnion se observó un 22% por debajo de la máxima encontrada en el metalimnion (Figura 5a.).

Durante el fenómeno de emblanquecimiento la densidad de PPH disminuyó en la zona del epilimnion y metalimnion, aunque se mantuvo casi constante en la zona hipolimnética. De tal forma que fue posible observar una relación directamente proporcional entre la abundancia de PPH y la profundidad, siendo el hipolimnion el estrato con una mayor concentración de microorganismos, excepto durante el mes de agosto, cuando la máxima densidad se localizó en el metalimnion. Después del fenómeno de emblanquecimiento se observó un incremento de la densidad de PPH a lo largo de la columna de agua, manteniendo la misma tendencia que se presentó durante el evento de emblanquecimiento, de tal forma que la abundancia de PPH en el epilimnion y metalimnion fue de  $2 \times 10^6$  cél · ml<sup>-1</sup> y  $3 \times 10^6$  cél · ml<sup>-1</sup> respectivamente y de  $\sim 4 \times 10^6$  cél · ml<sup>-1</sup> en la zona del hipolimnion (Figura 5a).

### **Densidad de PPA**

La dinámica del picoplancton autotrófico (PPA) en el sistema a lo largo del presente estudio fue distinta durante los tres muestreos realizados. Durante los meses de septiembre y octubre, la mayor densidad de PPA se ubicó en el metalimnion y la mínima en el hipolimnion (Figura 5b).

Durante el mes de septiembre, cuando se presentó el evento de emblanquecimiento, la mayor densidad de PPA se observó en el epilimnion, alcanzando un valor de  $375 \times 10^3$  cél · ml<sup>-1</sup>. Por debajo de este estrato, la presencia del PPA se redujo gradualmente hacia el hipolimnion. Además de la tendencia descrita se encontró una gran variabilidad en la densidad de PPA entre diferentes muestreos. La densidad de PPA antes del fenómeno fue de  $147 \times 10^3$  cél · ml<sup>-1</sup> y se incrementó hasta  $310 \times 10^3$  cél · ml<sup>-1</sup> durante el evento de emblanquecimiento; posteriormente ocurrió una disminución considerable, alcanzando una densidad de  $65500$  cél · ml<sup>-1</sup> de PPA (Figura 5b).

### **Cuantificación de la biomasa del PPH y PPA**

La biomasa bacteriana en el sistema presentó una dinámica similar a la densidad. A lo largo de los tres muestreos la biomasa aumentó a mayor profundidad de la columna de agua, se observó una disminución de la biomasa bacteriana durante el mes de septiembre en la zona del epilimnion y metalimnion. La máxima cantidad de carbono orgánico fue encontrada en el hipolimnion, durante el mes de octubre, a los 30 m de profundidad alcanzando una concentración de hasta  $101.93 \mu\text{g C org cél}^{-1}$  (Figura 6a).

Mientras que la densidad y biomasa del PPH tuvo un comportamiento similar, aumentando ambas hacia el fondo del lago, la distribución de la biomasa del PPA fue distinta a la de su densidad. Durante el mes de agosto la mayor biomasa de PPA se encontró en el estrato más superficial, además fue la máxima biomasa encontrada para el periodo de estudio ( $19.78 \mu\text{g C org cél}^{-1}$ ). En los meses de septiembre y octubre la mayor biomasa se encontró en el estrato del metalimnion con una consecuente disminución en el hipolimnion. Durante el mes de septiembre se presentó un

floreCIMIENTO de PPA; sin embargo, la biomasa no se incrementó, lo cual indica que las células redujeron su tamaño durante el fenómeno de emblanquecimiento (Figura 6b) y se corrobora por el volumen celular calculado mediante análisis de imagen (volumen celular de  $0.4 \mu\text{m}^3$  en agosto,  $0.3 \mu\text{m}^3$  durante septiembre y  $0.5 \mu\text{m}^3$  en octubre).

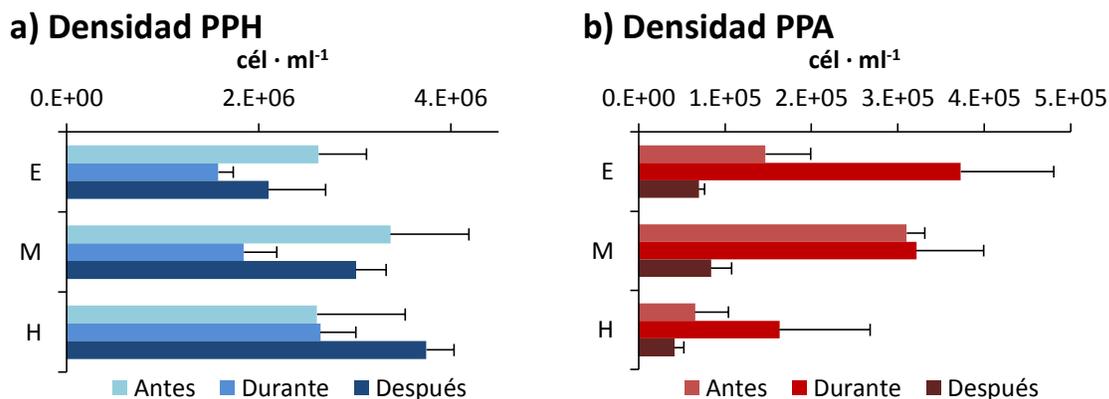


Figura 5. a) Densidad promedio por estrato del PPH. b) Densidad promedio por estrato del PPA. Los estratos se muestran como E= epilimnion, M= metalimnion y H= hipolimnion.

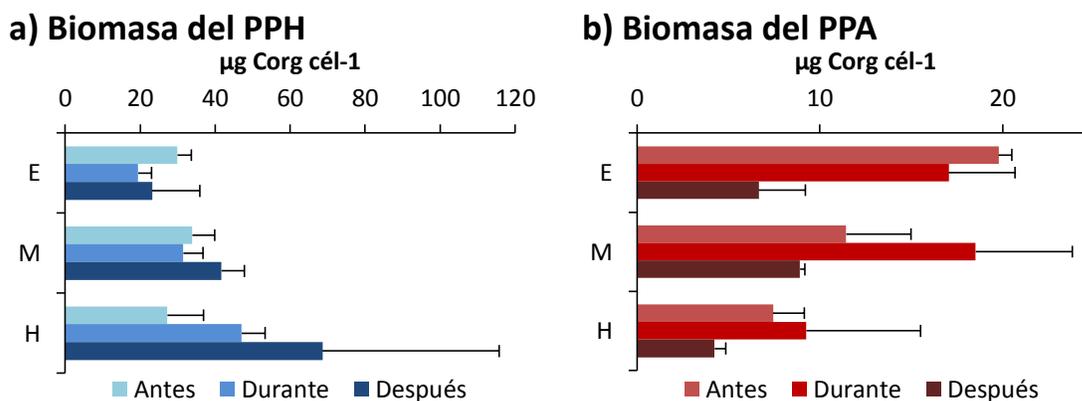


Figura 6. a) Promedio de la biomasa del PPH por estrato. B) Biomasa promedio del PPA por estrato. Los estratos se muestran como E= epilimnion, M= metalimnion y H= hipolimnion.

## Detección de grupos procariontes mediante CARD-FISH

### Dominios *Bacteria* y *Archaea*

El porcentaje de células hibridadas con las diferentes sondas utilizadas tuvo una alta variabilidad para cada grupo, encontrando diferencias en la hibridación a lo largo de la columna de agua y entre los distintos muestreos. El porcentaje total de células hibridadas con las sondas generales, EUB I-III y ARCH915, para los dominios *Bacteria* y *Archaea* respectivamente, que corresponde a la suma del porcentaje de hibridación obtenido con cada sonda, fue de casi 40 % durante el mes de agosto e incrementó durante el mes de septiembre hasta un 66 %, posteriormente, en el mes de octubre se observó 47 % de células hibridadas (Figura 7).

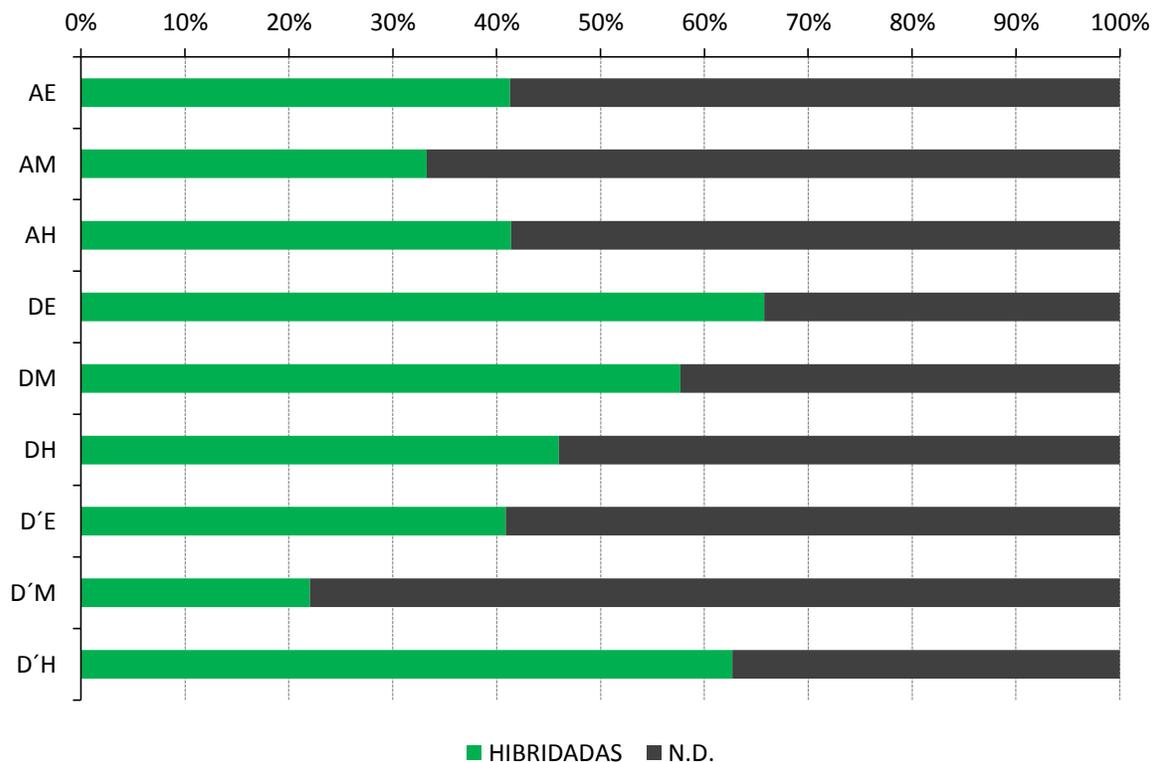
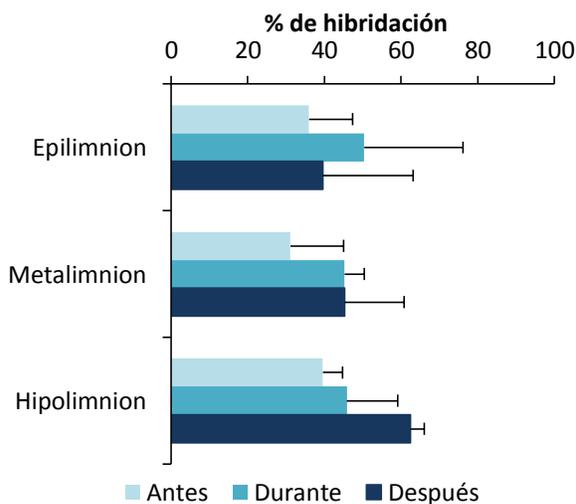


Figura 7. Porcentaje de células hibridadas con las sondas generales para los dominios *Archaea* (ARCH915) y *Bacteria* (EUBI-III) y porcentaje de células no detectadas mediante CARD-FISH en el epilimnion (E), metalimnion (M) e hipolimnion (H) durante los muestreos realizados antes (A) durante (D) y después (D') del fenómeno de emblanquecimiento. N.D.= No detectadas.

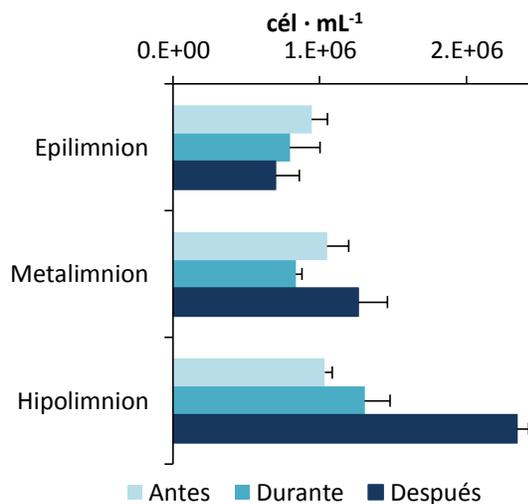
Los mayores porcentajes de hibridación obtenidos con la sonda EUB I-III se encontraron en la zona del hipolimnion. Este patrón se observó con mayor claridad durante el mes de octubre, donde se alcanzó una hibridación del  $62.5 \pm 3.5$  % en el estrato más profundo del lago, que equivale a 2 millones de  $\text{cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  hibridadas. Por su parte, la hibridación con la sonda ARCH915 fue baja durante el mes de agosto, cuantificando 8.3 % en el epilimnion; el cual disminuyó hasta un 1.9 % en el hipolimnion; durante el fenómeno de emblanquecimiento el número de células hibridadas

con esta sonda se disparó hasta un 28.22 % en el epilimnion lo que significó un incremento de  $200 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$  a  $400 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$  de agosto a septiembre en el estrato superficial del sistema. Durante el mes de septiembre se observó un incremento en la abundancia de arquea a lo largo de la columna de agua, con una mayor acentuación en la zona epi y metalimnética. Después del mes de septiembre, se observó un descenso considerable de la densidad de arqueas reflejándose en los bajos porcentajes de hibridación obtenidos con esta sonda; nuevamente, se obtuvo una mayor hibridación en el epilimnion con un total de  $50 \text{ mil cél} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Figura 8).

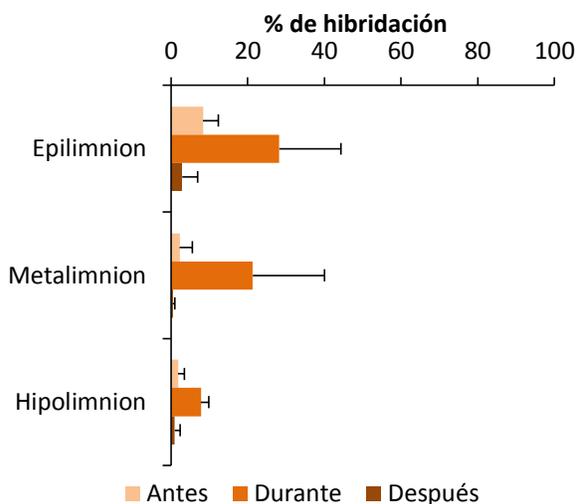
**a) EUBI-III**



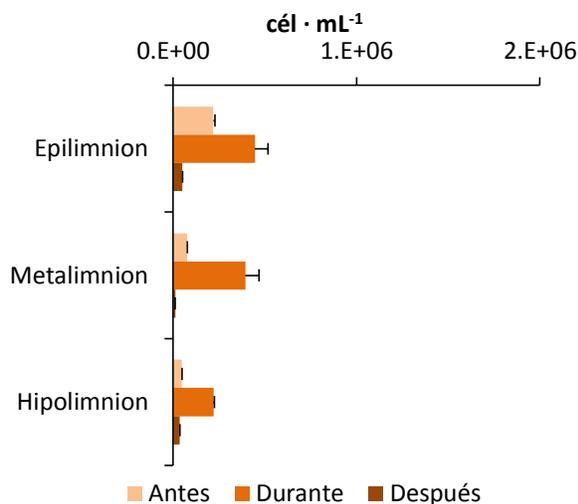
**b) EUBI-III**



**c) ARCH915**



**d) ARCH915**



**Figura 8. a) Porcentaje de hibridación y b) células hibridadas con la sonda general EUBI-III, c) Porcentaje de hibridación obtenido con la sonda general ARCH915 y d) número de células hibridadas con esta sonda.**

## **Filo *Proteobacteria***

### **Clase *Alfaproteobacteria***

La clase *Alfaproteobacteria* presentó un bajo porcentaje de hibridación durante el mes de agosto que no llegó a rebasar el 2 % en el epilimnion, donde el porcentaje de hibridación se vio reflejado en una mayor densidad que llegó a las 42 mil cél · ml<sup>-1</sup>. Durante el fenómeno de emblanquecimiento fue imposible detectar la presencia de organismos de este grupo por lo que el porcentaje de hibridación durante este mes fue de cero a lo largo de toda la columna de agua. Para el último muestreo se observó un incremento en el porcentaje de hibridación de *Alfaproteobacteria* de hasta el 5 % en el epilimnion y metalimnion; lo cual representó un máximo de 140 mil cél · ml<sup>-1</sup> en la zona del metalimnion (Figura 9a).

### **Género *Candidatus* LD12**

Mediante el uso de la sonda LD12-121 se detectaron a los microorganismos que pertenecen al género *Candidatus* LD12 de la familia *SAR11* agrupada en la clase *Alfaproteobacteria*. La abundancia de este género en el lago se mantuvo entre las 70 y 185 x 10<sup>3</sup> cél · ml<sup>-1</sup>, con una hibridación que osciló entre el 3 y 5 % de las células totales. La mayor densidad promedio de este grupo se encontró en el mes de agosto a lo largo de toda la columna de agua con una distribución que mostró un pico de densidad en el metalimnion. Los organismos del género *Candidatus* se encontraron concentrados en la zona del hipolimnion durante los meses posteriores. Aunque la densidad promedio fue mayor durante el mes de agosto, la mayor densidad celular encontrada para este grupo se localizó en el hipolimnion durante el mes de octubre (Figura 9b).

### **Género *Paracoccus***

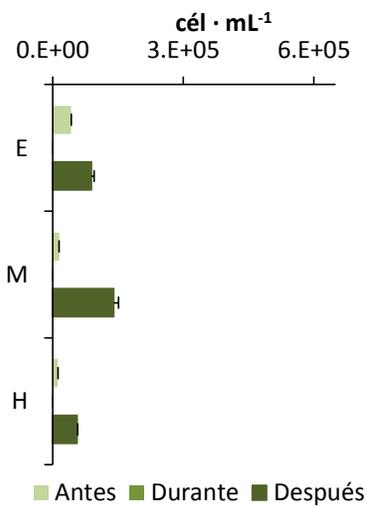
Este género bacteriano fue identificado con la sonda PAR1457. En el mes de agosto se encontró el mayor porcentaje de células hibridadas (19.47 ± 1.27 %) representaron >500 x 10<sup>3</sup> cél · ml<sup>-1</sup> en todos los estratos de la columna de agua. Para los siguientes muestreos, la hibridación fue de ~11 %. Durante agosto y septiembre los miembros de este grupo se localizaron en mayor abundancia en la zona del metalimnion aunque este patrón este dado por una diferencia aproximada de 130 y 80 mil cél · ml<sup>-1</sup> respectivamente. En octubre, se apreció un cambio en la distribución de los organismos, dado que la mayor abundancia se encontró en el hipolimnion con 388 mil cél · ml<sup>-1</sup> a diferencia de las 193 mil cél · ml<sup>-1</sup> en el epilimnion y las 342 x 10<sup>3</sup> cél · ml<sup>-1</sup> en el metalimnion (Figura 9c).

### **Clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria***

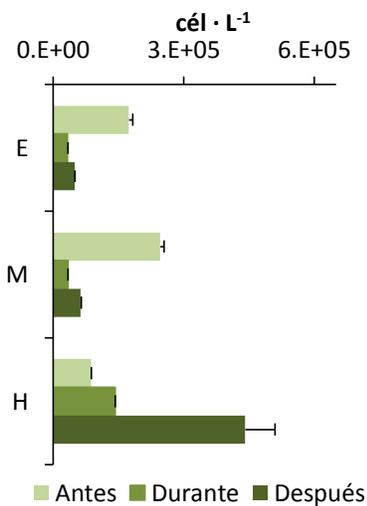
Las clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* tuvieron una mayor representación dentro de la composición de la comunidad bacteriana en el periodo de estudio. El porcentaje máximo de hibridación alcanzado con la sonda BET42a fue durante el mes de septiembre, cuando se obtuvo un 17 ± 5.2 % de células hibridadas, lo que difirió del 6.02 ± 2.2 % obtenido en el mes previo y que contrastó aún más con el 0.07 ± 0.11 % que se encontró durante el mes de octubre. La densidad máxima cuantificada para este grupo fue en el epilimnion durante el mes de septiembre, con un

total de  $356 \cdot 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  (Figura 9d). Por otra parte, la hibridación del grupo *Gammaproteobacteria* con la sonda GAM42a demostró una dinámica temporal y espacial muy distinta. La mayor abundancia de este grupo se encontró durante el mes de agosto en el metalimnion con una densidad de  $420 \cdot 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ . La densidad de este grupo fue disminuyendo paulatinamente a lo largo de la columna de agua en el mes de octubre, mostrando diferentes cambios en la distribución del grupo. De agosto a septiembre la mayor abundancia de este grupo pasó del metalimnion al epilimnion y, finalmente, al metalimnion otra vez en el mes de octubre (Figura 9e).

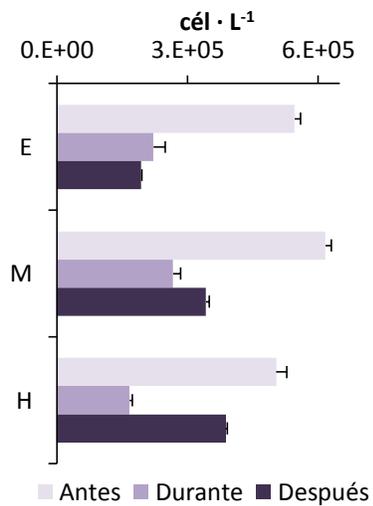
### a) ALF968



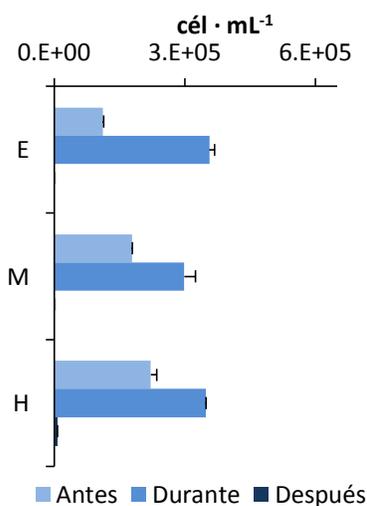
### b) LD12-121



### c) PAR1457



### d) BET42a



### e) GAM42a

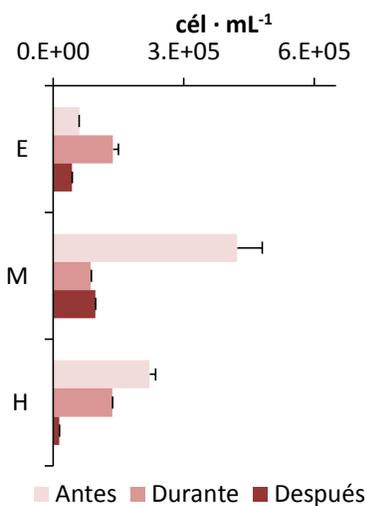


Figura 9. Densidad de diferentes grupos bacterianos identificados mediante CARD-FISH. a) Clase *Alfaproteobacteria*, b) Género *LD12*, c) Género *Paracoccus*, d) Clase *Betaproteobacteria* y e) Clase *Gammaproteobacteria*.

### **Clase *Deltaproteobacteria***

Como parte importante de la comunidad bacteriana del lago Atexcac por ser un sistema de origen volcánico y tener una alta concentración de sulfatos, se evaluó la presencia de grupos de bacterias sulfato-reductoras (BSR) con la sonda SRB385, cuya especificidad permite detectar a la mayoría de los miembros de la clase *Deltaproteobacteria*. Durante el mes de agosto, la densidad de bacterias de este grupo fue mayor en el hipolimnion, alcanzando una concentración de  $189 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ , y la menor densidad cuantificada se ubicó en el metalimnion. Durante el mes de septiembre la abundancia de este grupo descendió a lo largo de la columna de agua y se concentró en el epilimnion. La densidad de este grupo presentó un incremento durante el mes de octubre que alcanzó las  $81 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  en el epilimnion y hasta  $270 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  en el hipolimnion; lo que significó un incremento de más de 100 veces la densidad encontrada en el muestreo anterior (Figura 10a).

### **Filo *Actinobacteria***

En relación con este grupo microbiano, se observó una baja abundancia en el sistema, alcanzando su máxima densidad durante el mes de agosto con un valor cercano a las  $380 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  cerca de la superficie. En los muestreos posteriores se observó un descenso en su abundancia, llegando al  $0.67 \pm 0.6 \%$  de células hibridadas en el mes de octubre, que equivalió únicamente a  $19.5 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  aproximadamente. La distribución de los organismos que se detectaron con la sonda HGC69a fue sesgada hacia la zona superficial y en el hipolimnion durante los meses de agosto y octubre. En septiembre se observó una dinámica diferente, la abundancia fue de  $30 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  en el epilimnion, y el máximo se observó en el metalimnion, con una abundancia de alrededor de  $92 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Finalmente, en el hipolimnion la abundancia de este grupo fue nula (Figura 10b).

### **Filo *Bacteroidetes***

Este filo, antes conocido como el filo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* fue cuantificado con la sonda CF3-19a. Durante el mes de agosto, se obtuvo el menor porcentaje de hibridación y su menor densidad; sin embargo, el porcentaje de hibridación y su abundancia aumentaron gradualmente a lo largo del tiempo. En el mes de agosto se observó un mayor porcentaje de células hibridadas en la superficie y, en segundo lugar, en el hipolimnion, dejando el metalimnion con el porcentaje de hibridación más bajo. El patrón de distribución del grupo no mostró un cambio visible desde el mes de septiembre. En general, la mayor densidad celular se encontró en el hipolimnion durante los meses de septiembre y octubre, donde finalmente se encontró la mayor densidad en el hipolimnion con cerca de  $495 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  (Figura 10c).

### **Filo *Planctomycetes***

#### **Familia *Planctomycetaceae***

En el mes de agosto la distribución de los miembros de esta familia mostró una menor densidad celular en el epilimnion. En septiembre la distribución de este grupo presentó una tendencia a aumentar su densidad a mayor profundidad en el sistema además de un incremento en la densidad total a lo largo de la columna de agua. Por otro lado en el mes de octubre, se observó

una caída en la densidad y un descenso específicamente en la zona del metalimnion. De esta forma, la mayor densidad de células de este grupo se encontró a lo largo de todo el sistema durante el fenómeno de emblanquecimiento con  $307 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  en promedio, que significó una diferencia cercana a las  $130 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  con respecto a los meses contiguos (Figura 10d).

### **Dominio *Archaea***

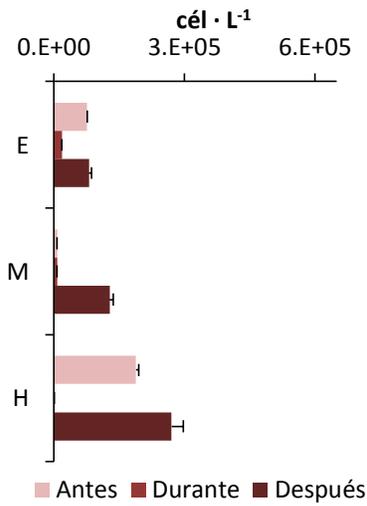
#### **Filo *Thaumarchaeota***

Estas bacterias fueron identificadas con la sonda CREN537, y mostraron un porcentaje de hibridación y una densidad celular muy bajos. De esta forma, se identificó un total de  $35 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  en la zona del metalimnion; siendo la única zona en que se encontraron. De manera análoga a la dinámica observada con la sonda general ARCH915, se encontró un aumento en la densidad del grupo en toda la columna de agua durante el evento de emblanquecimiento. De esta forma, la densidad total en la columna de agua pasó de  $11 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  en el mes de agosto y de  $55 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  al mes de septiembre; la cual se redujo a  $13 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  durante el mes de octubre (Figura 10e).

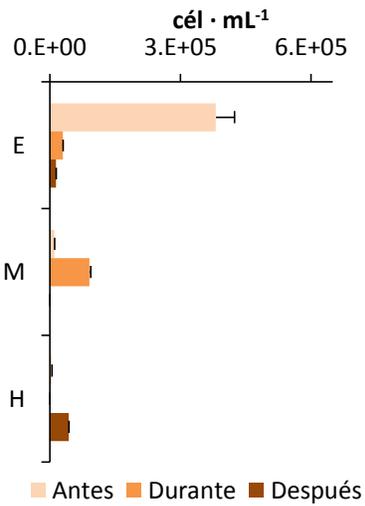
#### **Control negativo**

La sonda NON338 fue utilizada como control negativo de la hibridación, al estar constituida por una secuencia aleatoria de oligonucleótidos permite establecer la efectividad de la hibridación. De tal forma que el uso de esta sonda de forma control para cada profundidad, complementaria a EUB338 (Incluida en la sonda EUBI-III), confirmó que la hibridación fue llevada a cabo con éxito. De la revisión de éstas preparaciones no se encontraron células hibridadas. Sólo fue posible observar algunas partículas amorfas con la coloración característica del fluorocromo.

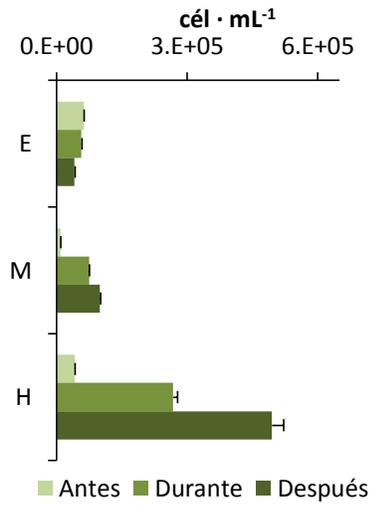
a) SRB385



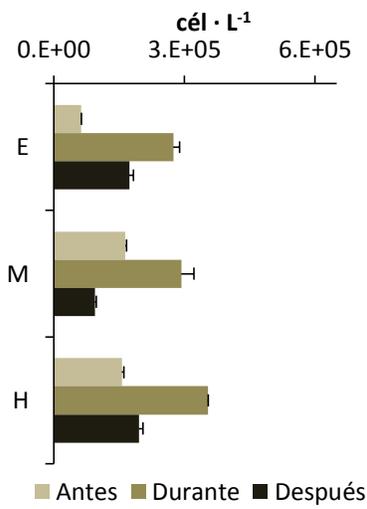
b) HGC69a



c) CF3-19a



d) PLA886



e) CREN537

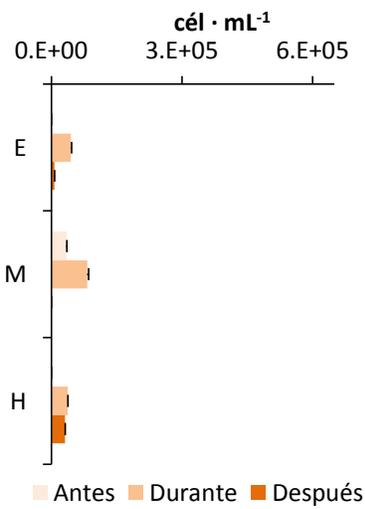


Figura 10. Densidad de taxa procariontes específicos detectados mediante CARD-FISH. a) Clase *Deltaproteobacteria*, b) filo *Actinobacteria*, c) filo *Bacteroidetes*, d) familia *Planctomycetaceae* y e) filo *Thaumarchaeota*.

### Composición de la comunidad bacteriana

De acuerdo con los resultados obtenidos, la comunidad bacteriana del lago Atexcac está constituida por el dominio *Bacteria* durante el periodo de estudio; mientras que el aporte del grupo *Archaea* fue mínimo, excepto durante el fenómeno de emblanquecimiento (Figura 11).

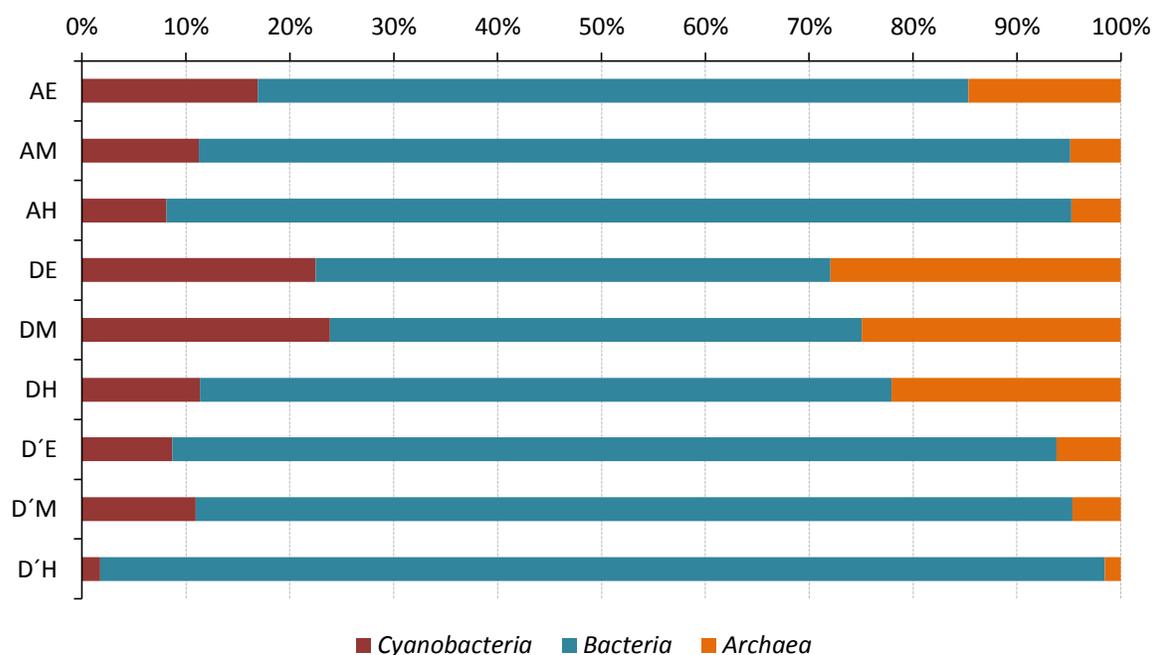


Figura 11. Aporte porcentual a la comunidad procarionte de los dominios *Archaea* y *Bacteria* así como del filo *Cyanobacteria* (PPA) con base en las densidades determinadas mediante CARD-FISH para los dominios y con conteos directos para el PPA en el epilimnion (E), metalimnion (M) e hipolimnion (H) durante los muestreos realizados antes (A) durante (D) y después (D') del fenómeno de emblanquecimiento.

En el mes de agosto, antes del evento de emblanquecimiento, la comunidad bacteriana estuvo dominada por la clase *Alfaproteobacteria*, teniendo el principal aporte los géneros LD12 y *Paracoccus*. En segundo lugar se ubicaron los miembros de la clase *Gammaproteobacteria*. El último componente más representativo de la comunidad bacteriana estuvo constituido por el PPA y la clase *Betaproteobacteria* (Figura 12).

Durante el fenómeno de emblanquecimiento se observó que la comunidad procarionte estuvo dominada por el PPA. La clase *Betaproteobacteria* y la familia *Planctomycetaceae* tuvieron un aporte similar a la comunidad bacteriana, mayor al que presentaron durante el mes de agosto. La clase *Alfaproteobacteria*, aunque no fue la dominante durante el fenómeno de emblanquecimiento, siguió siendo una parte importante de la comunidad, mientras que la clase *Gammaproteobacteria* fue desplazada al reducir su densidad en toda la columna de agua (Figura 12).

Después del evento de emblanquecimiento, en el mes de octubre, la comunidad bacteriana de nuevo presentó un cambio en su estructura dado que el grupo dominante volvió a ser *Alfaproteobacteria* y el PPA aportó menos del 10 % de la densidad bacteriana. Además, se observó además un fuerte incremento en la densidad del filo *Bacteroidetes* en la zona del hipolimnion y representó el 40 % de la densidad bacteriana. Finalmente, la densidad de *Planctomycetaceae* se mantuvo constante en el epilimnion y disminuyó hacia el fondo de la columna de agua (Figura 12).

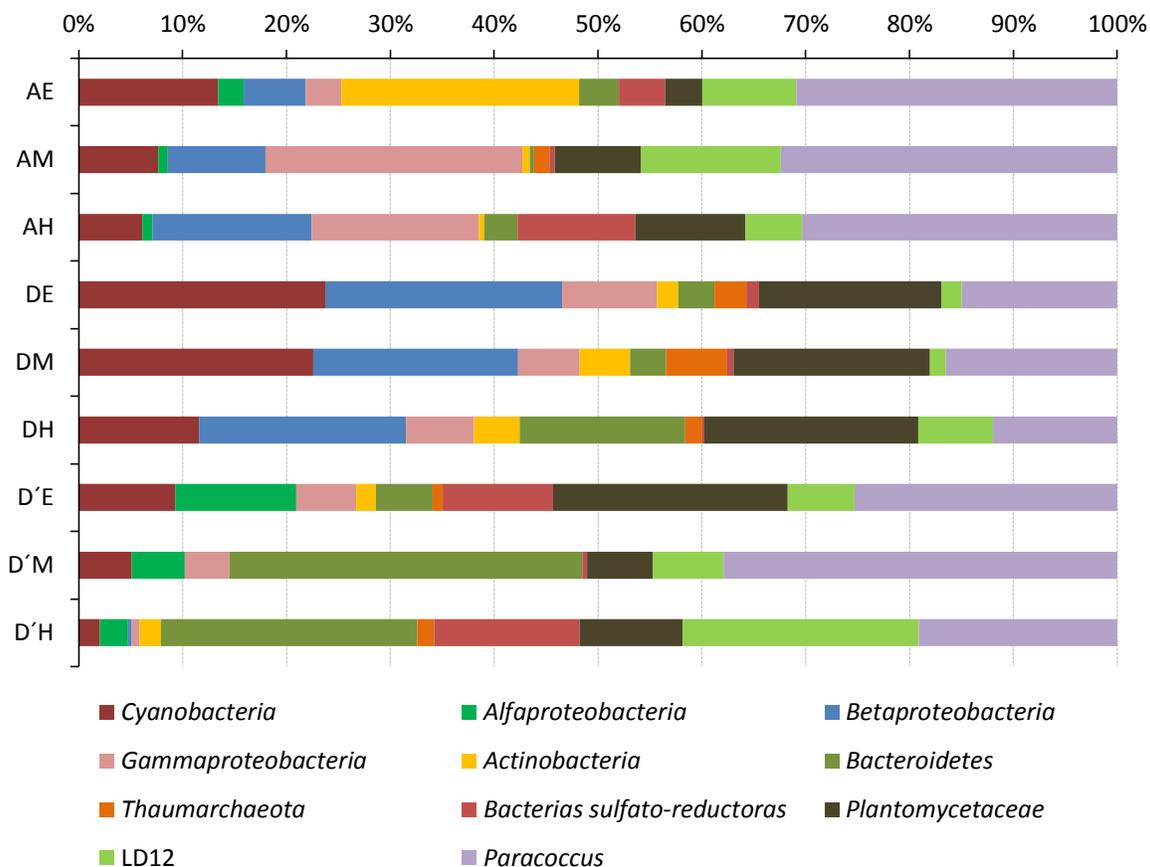


Figura 12. Composición y estructura del procarioplankton en función del aporte porcentual de la densidad de los diferentes grupos bacterianos determinados mediante CARD-FISH y de la densidad del picoplancton autotrófico (PPA) durante los muestreos realizados antes (A) durante (D) y después (D') del fenómeno de emblanquecimiento en el epilimnion (E), metalimnion (M) e hipolimnion (H).

### Análisis estadístico de datos

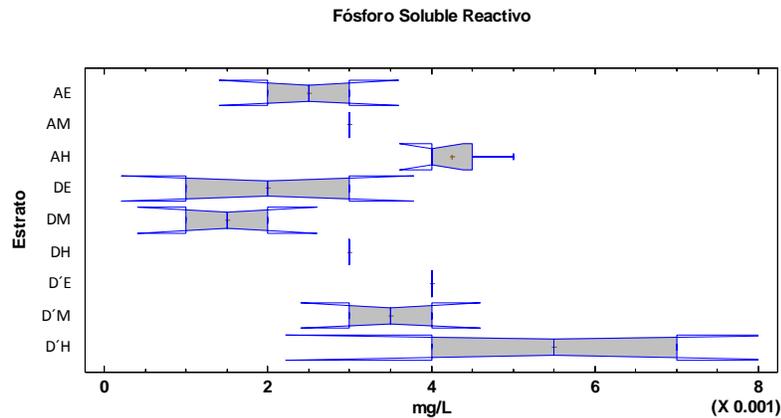
La primera parte del análisis estadístico consistió en la búsqueda de diferencias significativas entre los estratos a lo largo del tiempo de muestro y entre los estratos de todos los perfiles. Para esto, se analizó la variación temporal y espacial de los diferentes parámetros, así como la variación en la estratificación física, química y biológica de la columna de agua.

A partir del análisis de los parámetros físico-químicos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los cambios de pH entre los distintos muestreos ( $F_{(2, 18)} = 2.63$ ,  $p > 0.05$ ) ni entre los diferentes estratos de la columna de agua ( $F_{(2, 12)} = 1.82$ ,  $p > 0.05$ ). Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en la conductividad entre los diferentes muestreos ( $F_{(2, 18)} = 6.56$ ,  $p < 0.05$ ), pero no se encontraron diferencias entre los estratos de la columna de agua ( $F_{(8, 12)} = 2.41$ ,  $p > 0.05$ ). La diferencia se encontró, según el análisis de Tukey, entre el mes de agosto y los muestreos posteriores.

La alcalinidad de carbonatos presentó diferencias significativas entre los diferentes muestreos realizados ( $F_{(2, 18)} = 4.65$ ,  $p < 0.05$ ), particularmente entre los meses de agosto y septiembre. Las diferencias observadas entre los tres muestreos para la alcalinidad de bicarbonatos ( $F_{(2, 18)} = 5.07$ ,  $p < 0.05$ ) se detectaron entre los meses de agosto y septiembre así como entre agosto y octubre.

La dureza de calcio mostró diferencias significativas tanto entre los tres muestreos ( $F_{(2, 18)} = 25.84$ ,  $p < 0.001$ ) y entre los estratos de cada perfil ( $F_{(2, 12)} = 5.96$ ,  $p < 0.01$ ). La dureza de calcio fue distinta entre agosto y septiembre y entre agosto y octubre. Por otra parte, la diferencia de la dureza entre los diferentes estratos fue significativa entre el hipolimnion en agosto y el epilimnion y metalimnion durante el mes de septiembre así como con el hipolimnion del mes de octubre.

La variación del FT en el sistema presentó diferencias significativas entre los diferentes muestreos ( $F_{(2, 18)} = 10.03$ ,  $p < 0.01$ ). El incremento consecutivo de la concentración de FT concuerda con la diferencia encontrada entre agosto y octubre. La concentración de este nutrimento presentó diferencias significativas entre estratos ( $F_{(2, 12)} = 15.02$ ,  $p < 0.001$ ), particularmente entre los estratos de agosto y septiembre, lo que demuestra un cambio en toda la columna de agua. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas entre el epilimnion y los estratos inferiores de la columna de agua durante los meses de septiembre y octubre. La dinámica del FSR mostró ser estadísticamente distinta entre los diferentes muestreos ( $F_{(2, 18)} = 7.17$ ,  $p < 0.01$ ) las diferencias se registraron entre los meses de septiembre y octubre de acuerdo con el análisis de Tukey. Además, se encontraron diferencias en la distribución de este nutriente entre el epilimnion e hipolimnion de los tres muestreos ( $F_{(2, 18)} = 4.46$ ,  $p < 0.05$ ). Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis se encontraron diferencias significativas entre los estratos ( $H = 17.36$ ,  $p < 0.05$ ), utilizando un diagrama de caja y bigote con muesca (Figura 13) se definieron las diferencias estadísticamente significativas entre el hipolimnion del mes de agosto y el mismo estrato del mes de septiembre así como entre el epilimnion del mes de octubre y la concentración encontrada en los demás perfiles.



**Figura 13.** Diagrama de caja y bigote con muesca (Función Pseudosigma  $p \approx 0.05$ ) de la concentración de FSR en el epilimnion (E), metalimnion (M) e hipolimnion (H) antes (A), durante (D) y después (D') del evento de emblanquecimiento.

En cuanto a la concentración de nitratos no se observaron diferencias significativas entre los diferentes muestreos ( $H = 4.23$ ,  $p > 0.05$ ) ni en su distribución a lo largo de la columna de agua ( $H = 10.19$ ,  $p > 0.05$ ). Por otra parte, se obtuvieron diferencias significativas entre los diferentes muestreos para la concentración de nitritos ( $F_{(2, 18)} = 9.9$ ,  $p < 0.05$ ) entre septiembre y octubre y para la concentración de amonio ( $F_{(2, 18)} = 48.37$ ,  $p < 0.001$ ) en todos los meses. Así también, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes estratos de cada muestreo tanto para los nitritos ( $H = 0.94$ ,  $p > 0.05$ ) como para el amonio ( $H = 18.75$ ,  $p < 0.05$ ). De acuerdo con el diagrama de caja y bigote con muesca (Figura 13), se estableció la existencia de diferencias significativas entre la concentración de nitritos en el epilimnion durante los tres muestreos y entre los diferentes estratos del mes de octubre. En el caso del amonio se registraron diferencias significativas entre los estratos de agosto y septiembre, entre el epilimnion de septiembre y el resto de los estratos así como entre el hipolimnion de los diferentes muestreos (Figura 13).

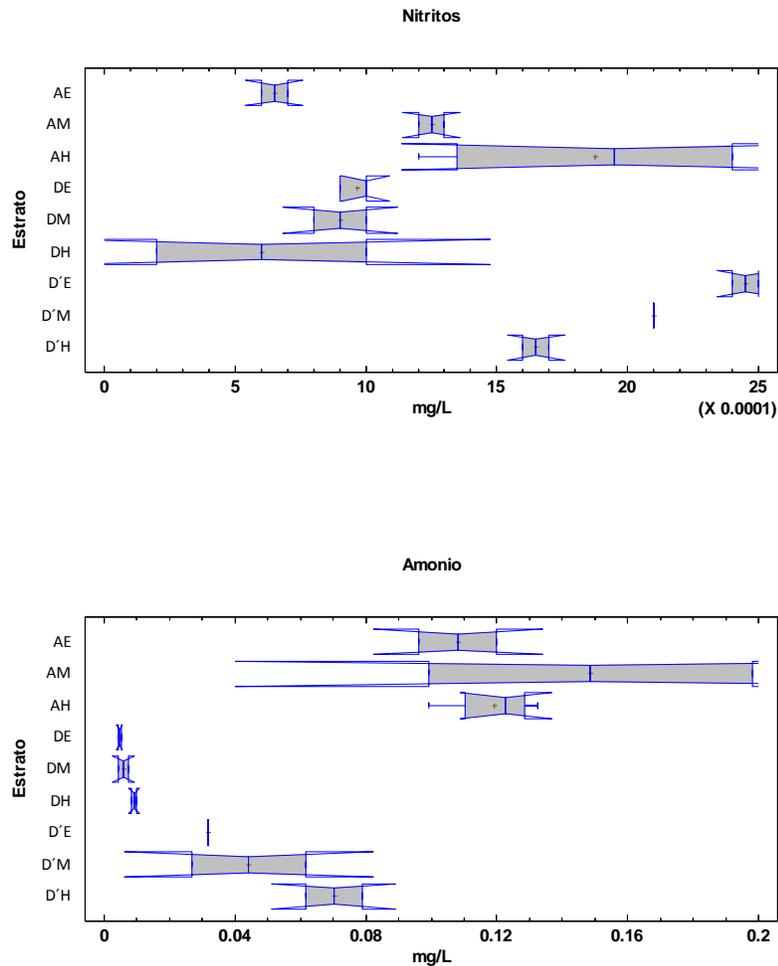


Figura 14. Arriba Diagrama de caja y bigote con muesca (Función Pseudosigma  $p \approx 0.05$ ) de la concentración de nitritos. Abajo: Diagrama de caja y bigote con muesca (Función Pseudosigma  $p \approx 0.05$ ) de la concentración de Amonio. Ambos análisis se realizaron considerando el epilimnion (E), metalimnion (M) e hipolimnion (H) antes (A), durante (D) y después (D') del evento de emblanquecimiento.

La concentración de los sulfatos y silicatos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres momentos de muestreo (sulfatos  $F_{(2, 18)} = 23.18$ ,  $p < 0.001$ ; silicatos  $F_{(2, 18)} = 96.4$ ,  $p < 0.001$ ). Las diferencias, según el análisis de Tukey, fueron encontradas para los sulfatos tanto entre agosto y septiembre como entre septiembre y octubre. Para los silicatos se observó lo mismo entre los tres muestreos. Además, se encontraron, diferencias significativas entre los diferentes estratos de los distintos muestreos para los sulfatos ( $H = 17.68$ ,  $p < 0.02$ ) y silicatos ( $H = 18.73$ ,  $p < 0.05$ ). Estas diferencias se localizaron de forma particular para los sulfatos, en el epilimnion entre los tres muestreos y el hipolimnion del mes de septiembre (Figura 15). En el caso de la distribución de los silicatos, se encontraron diferencias significativas entre todos los estratos de agosto y octubre con respecto a los tres estratos del mes de septiembre, lo que habla de un fuerte cambio

durante este muestreo y corresponde con el descenso en la concentración de este nutriente en todas las profundidades de trabajo (Figura 15).

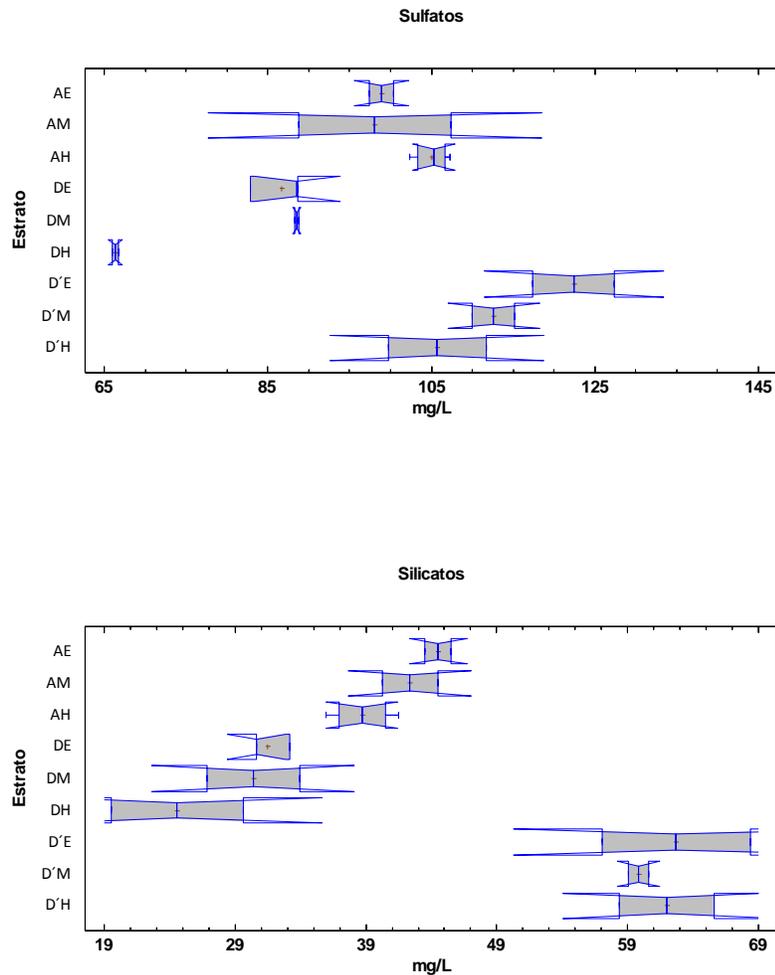


Figura 15. Arriba Diagrama de caja y bigote con muesca (Función Pseudosigma  $p \approx 0.05$ ) de la concentración de sulfatos. Abajo: Diagrama de caja y bigote con muesca (Función Pseudosigma  $p \approx 0.05$ ) de la concentración de silicatos. Ambos análisis se realizaron considerando el epilimnion (E), metalimnion (M) e hipolimnion (H) antes (A), durante (D) y después (D') del evento de emblanquecimiento.

La densidad del PPH tuvo diferencias significativas únicamente entre los estratos ( $F_{(8, 12)} = 3.95$ ,  $p < 0.05$ ), de tal forma que la densidad bacteriana en el epilimnion durante el mes de septiembre presentó diferencias con respecto al hipolimnion del mes de octubre. La densidad del APP tuvo una variación cuya diferencia fue significativa entre los diferentes muestreos ( $F_{(2, 18)} = 13.94$ ,  $p < 0.05$ ), particularmente entre agosto y septiembre, y entre septiembre y octubre. También se apreciaron diferencias significativas entre los diferentes estratos ( $F_{(2, 18)} = 23.18$ ,  $p < 0.001$ ), de

acuerdo con la prueba de Tukey entre el epilimnion durante el mes de septiembre con respecto a todos los estratos de los demás perfiles.

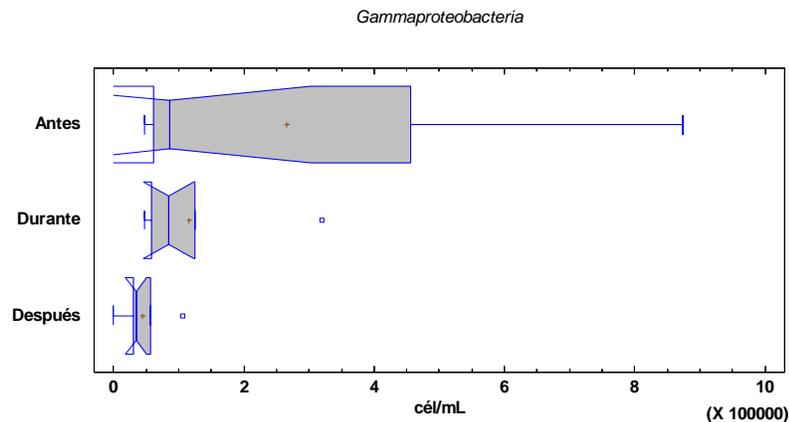
La biomasa del PPH no mostró diferencias significativas entre los diferentes muestreos ( $F_{(2, 18)}= 0.94$ ,  $p > 0.05$ ), ni entre diferentes estratos ( $F_{(8, 12)}= 1.63$ ,  $p > 0.05$ ). Por otra parte, la biomasa del PPA en el lago fue diferente entre los diferentes muestreos ( $F_{(2, 18)}= 5.08$ ,  $p < 0.05$ ). Las diferencias fueron observadas entre el mes de septiembre y octubre ( $p < 0.05$ ), por el fuerte descenso que se apreció en esta variable al final del periodo de estudio. El descenso en la biomasa del PPA durante el mes de octubre, confirmó las diferencias significativas que se encontraron entre los distintos estratos, que de acuerdo con la prueba de Tukey fueron entre el epilimnion de septiembre con respecto al hipolimnion del mes de octubre.

Con respecto a la densidad bacteriana de cada grupo, obtenida mediante CARD-FISH, se requirió de la transformación de dichas densidades bacterianas mediante la función logaritmo; excepto para los grupos *Planctomycetaceae* y *Paracoccus* que mostraron una distribución normal sin necesidad de transformar los datos. La densidad de casi todos los grupos cumplió con la característica de homocedasticidad, con excepción de la densidad del grupo *Gammaproteobacteria* que fue analizada sin transformación alguna y de forma no paramétrica. El resultado del tratamiento estadístico de los datos mostró una diferencia significativa en la densidad de los grupos *Archaea* ( $F_{(2, 14)}= 7.52$ ,  $p < 0.05$ ), *Betaproteobacteria* ( $F_{(2, 18)}= 10.27$ ,  $p < 0.05$ ), *Gammaproteobacteria* ( $H= 6.68$ ,  $p < 0.05$ ), *Planctomycetaceae* ( $F_{(2, 18)}= 4.12$ ,  $p < 0.05$ ), *Paracoccus* ( $F_{(2, 18)}= 5.51$ ,  $p < 0.05$ ) y de las BSR ( $F_{(2, 14)}= 8.15$ ,  $p < 0.05$ ) durante los diferentes muestreos.

El dominio *Archaea* tuvo su mayor variación durante el mes de septiembre por el aumento en la densidad de células detectadas con la sonda ARCH915. Este cambio se corrobora por la diferencia significativa que se observa entre los meses de septiembre y octubre cuando la densidad de este grupo disminuyó a niveles similares a los encontrados durante el mes de agosto.

La clase *Betaproteobacteria* mostró una diferencia significativa entre los primeros dos meses y octubre como resultado de una drástica baja en la densidad celular del grupo durante el mes de octubre, momento en que únicamente se detectaron organismos del grupo en el fondo del lago.

Por su parte, la clase *Gammaproteobacteria* presentó una dinámica similar a la de la clase *Betaproteobacteria*, siendo que su densidad disminuyó durante el mes de octubre, aunque en una medida mucho menor. Las diferencias estadísticas se observaron para los meses de agosto y septiembre con respecto al mes de octubre de acuerdo con lo observado en el diagrama de caja y bigote con muesca (Figura 16).



**Figura 16. Diagrama de caja y bigote con muesca (Función Pseudosigma  $P \approx 0.05$ ) de la densidad celular del grupo *Gammaproteobacteria* durante los muestreos realizados antes, durante y después del evento de emblanquecimiento.**

La densidad de la familia *Planctomycetaceae* tuvo una gran representación a lo largo del presente estudio y su densidad tuvo un máximo a lo largo de la columna de agua durante el mes de septiembre; este incremento se observó en el análisis estadístico al encontrarse diferencias significativas entre la densidad del grupo durante el mes de septiembre con respecto a la obtenida durante el mes de agosto.

La reducción gradual en la densidad del género *Paracoccus* se confirmó al encontrar diferencias significativas entre el mes de agosto y septiembre, ya que el descenso más marcado en la densidad de este grupo se dio entre este periodo de tiempo.

La densidad de organismos detectados con la sonda SRB385 presentó diferencias estadísticamente significativas entre agosto y septiembre al igual que entre septiembre y octubre. Este resultado enfatiza el incremento en la densidad de este grupo a lo largo de la columna de agua durante el mes de septiembre.

Esta parte del análisis estadístico arrojó que la composición de la comunidad procarionte se mantiene en la columna de agua, pero, la estructura de la comunidad cambia al modificarse la dominancia de los grupos a lo largo del tiempo.

### **Correlación de variables**

Se estableció la correlación de la biomasa y entre las densidades del PPH y PPA, con los parámetros físico-químicos y los nutrientes. A través de esta misma vía se determinó la correlación entre la densidad de los grupos bacterianos con los parámetros físicos y químicos, la concentración de nutrientes y con la densidad y biomasa del PPA.

El análisis de correlación demostró que la densidad del PPA se relacionó directamente con la concentración de oxígeno disuelto ( $r_s= 0.66$ ,  $p< 0.05$ ) e inversamente con la conductividad eléctrica del agua ( $r_s= -0.61$ ,  $p< 0.05$ ) así como con la dureza total ( $r_s= -0.55$ ,  $p<0.05$ ). Además, la densidad del PPA se relacionó de forma inversa con la concentración de FSR ( $r_s= -0.81$ ,  $p< 0.05$ ), la concentración de nitritos ( $r_s=-0.06$ ,  $p< 0.05$ ) y con la concentración de los iones sulfato ( $r_s= -0.66$ ,  $p< 0.05$ ) y silicato ( $r_s= -0.63$ ,  $p< 0.05$ ). Asimismo, la biomasa de este grupo presentó el mismo comportamiento inverso con respecto a la concentración de FSR ( $r_s= -0.72$ ,  $p< 0.05$ ), con el fósforo total ( $r_s= -0.5$ ,  $p< 0.05$ ) y de igual manera con la concentración de nitritos ( $r_s= -0.49$ ,  $p< 0.05$ ) (Tabla 2).

La densidad del PPH se relacionó de forma directa con la conductividad eléctrica ( $r_s= 0.45$ ,  $p< 0.05$ ) y con la dureza total ( $r_s= 0.5$ ,  $p< 0.05$ ); además, se encontró asociada de forma directa con la concentración de FSR ( $r_s= 0.49$ ,  $p< 0.05$ ) y la concentración de amonio ( $r_s= 0.61$ ,  $p< 0.05$ ), mientras que la biomasa del grupo no mostró relación con ningún nutriente pero si con la conductividad eléctrica ( $r_s=0.45$   $p< 0.05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Se muestran las correlaciones entre la densidad del PPH y el PPA y la biomasa de ambos grupos con los parámetros físico-químicos y la concentración de nutrientes. El símbolo “+” indica una relación positiva, la letra N una relación negativa y N.S. indica una correlación no significativa.

Variables	PPH	PPA	PPH Biom	PPA Biom
Z	+0.53	-0.65	N.S.	-0.71
T	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
O.D.	N.S.	+0.66	N.S.	+0.76
pH	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Cond	+0.45	-0.60	+0.45	N.S.
A. $\text{CO}_3^{=}$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
A. $\text{HCO}_3^-$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
D. Calcio	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
D. Total	+0.5	-0.55	N.S.	N.S.
FT	N.S.	-0.45	N.S.	-0.50
FSR	+0.49	-0.80	N.S.	-0.72
Nitratos	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Nitritos	N.S.	-0.60	N.S.	-0.49
Amonio	+0.60	N.S.	N.S.	N.S.
Sulfatos	N.S.	-0.66	N.S.	N.S.
Silicatos	+0.46	-0.63	N.S.	N.S.

Se obtuvo que no existe relación directa o inversa entre los parámetros físico-químicos y la densidad del dominio *Bacteria* mientras que para el dominio *Archaea* fue observada una relación inversa con la conductividad eléctrica ( $r_s = -0.47$ ,  $p < 0.05$ ) y la dureza total ( $r_s = -0.68$ ,  $p < 0.05$ ). Por otra parte, se encontró una correlación negativa entre la densidad del dominio *Archaea* con la concentración de PRS ( $r_s = -0.67$ ,  $p < 0.05$ ), nitritos ( $r_s = -0.68$ ,  $p < 0.05$ ), sulfatos ( $r_s = -0.7$ ,  $p < 0.05$ ) y silicatos ( $r_s = -0.62$ ,  $p < 0.05$ ). La densidad de arqueas mostró además una relación directa, tanto con la densidad ( $r_s = 0.67$ ,  $p < 0.05$ ) como con la biomasa del PPA ( $r_s = 0.58$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

La clase *Alfaproteobacteria* presentó una correlación positiva con la dureza total ( $r_s = 0.61$ ,  $p < 0.05$ ), con la concentración de FSR ( $r_s = 0.43$ ,  $p < 0.05$ ), sulfatos ( $r_s = 0.49$ ,  $p < 0.05$ ) y silicatos ( $r_s = 0.57$ ,  $p < 0.05$ ). La clase *Betaproteobacteria* se relacionó de forma inversa con la conductividad ( $r_s = -0.48$ ,  $p < 0.05$ ), la dureza total ( $r_s = -0.59$ ,  $p < 0.05$ ), las concentraciones de FSR ( $r_s = -0.57$ ,  $p < 0.05$ ), nitratos ( $r_s = -0.5$ ,  $p < 0.05$ ), nitritos ( $r_s = -0.48$ ,  $p < 0.05$ ), sulfatos ( $r_s = -0.7$ ,  $p < 0.05$ ) y silicatos ( $r_s = -0.7$ ,  $p < 0.05$ ) y se relacionó de forma positiva con la densidad del APP ( $r_s = 0.65$ ,  $p < 0.05$ ) y con su biomasa ( $r_s = 0.44$ ,  $p < 0.05$ ). Por su parte, la clase *Gammaproteobacteria* estuvo relacionada de forma directa con el pH ( $r_s = 0.46$ ,  $p < 0.05$ ) y con la alcalinidad de carbonatos ( $r_s = 0.44$ ,  $p < 0.05$ ), mientras que se relacionó de forma inversa con el FT ( $r_s = -0.51$ ,  $p < 0.05$ ), la concentración de nitratos ( $r_s = -0.54$ ,  $p < 0.05$ ) y la de silicatos ( $r_s = -0.46$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

El filo *Actinobacteria* se relacionó positivamente con la concentración de oxígeno disuelto ( $r_s = 0.48$ ,  $p < 0.05$ ), así como con la biomasa del PPA ( $r_s = 0.21$ ,  $p < 0.05$ ). Por su parte, el filo *Bacteroidetes* presentó una correlación inversa con el pH ( $r_s = -0.53$ ,  $p < 0.05$ ) así como con la alcalinidad de carbonatos ( $r_s = -0.48$ ,  $p < 0.05$ ). Para este mismo grupos se encontró una relación directa con la alcalinidad de bicarbonatos ( $r_s = 0.52$ ,  $p < 0.05$ ) y la concentración de FT ( $r_s = 0.63$ ,  $p < 0.05$ ). Las BSR se relacionaron de manera positiva con el pH ( $r_s = 0.51$ ,  $p < 0.05$ ) y con la alcalinidad de carbonatos ( $r_s = 0.44$ ,  $p < 0.05$ ).

El filo *Thaumarchaeota* presentó una correlación inversa con la concentración de dureza total ( $r_s = -0.63$ ,  $p < 0.05$ ), de calcio ( $r_s = -0.62$ ,  $p < 0.05$ ), las concentraciones FSR ( $r_s = -0.54$ ,  $p < 0.05$ ), amonio ( $r_s = -0.55$ ,  $p < 0.05$ ), sulfatos ( $r_s = -0.5$ ,  $p < 0.05$ ) y silicatos ( $r_s = -0.47$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

La familia *Planctomycetaceae* mostró una correlación de tipo inversa con la dureza total ( $r_s = -0.58$ ,  $p < 0.05$ ) y la concentración de silicatos ( $r_s = -0.57$ ,  $p < 0.05$ ). A su vez el género *Candidatus* LD12 y el género *Paracoccus* mostraron una correlación de tipo directa con la concentración de amonio ( $r_s = 0.44$ ,  $p < 0.05$  y  $r_s = 0.61$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de las correlaciones encontradas entre los grupos bacterianos y las variables físico-químicas así como con los nutrientes evaluados en este estudio. El símbolo “+” indica una relación positiva, la letra N una relación negativa y N.S. indica una correlación no significativa. Los grupos están denotados por el nombre de la sonda utilizada para realizar la hibridación de CARD-FISH como se describió anteriormente.

Variabes	ARCH915	ALF968	LD12-121	PAR1457	BET42a	GAM42a	SRB385	HGC69a	CF319a	CREN537	PLA886
O.D.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	+0.48	N.S.	N.S.	N.S.
pH	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	+0.46	+0.51	N.S.	-0.53	N.S.	N.S.
Cond	-0.47	+0.47	N.S.	N.S.	-0.48	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
A. CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	+0.44	+0.44	N.S.	-0.48	N.S.	N.S.
A. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	+0.52	N.S.	N.S.
D. Calcio	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.62	N.S.
D. Total	-0.68	+0.61	N.S.	N.S.	-0.59	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.63	-0.58
FT	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.51	N.S.	N.S.	+0.63	N.S.	N.S.
FSR	-0.67	+0.43	N.S.	N.S.	-0.57	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.54	N.S.
Nitratos	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.50	-0.54	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Nitritos	-0.68	N.S.	N.S.	N.S.	-0.48	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Amonio	N.S.	N.S.	+0.44	+0.61	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.55	N.S.
Sulfatos	-0.70	+0.49	N.S.	N.S.	-0.74	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.50	N.S.
Silicatos	-0.62	+0.57	N.S.	N.S.	-0.76	-0.46	N.S.	N.S.	N.S.	-0.47	-0.44
PPA	+0.67	N.S.	N.S.	N.S.	+0.65	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
PPA Biom	+0.58	N.S.	N.S.	N.S.	+0.44	N.S.	N.S.	+0.52	N.S.	N.S.	N.S.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Dinámica del lago antes del evento de emblanquecimiento

El año 2014 representó un cambio en la dinámica del lago Atexcac de acuerdo con lo registrado en otros ciclos anuales (Arellano & Gonzáles, 2011; Lagunas & Martínez, 2015). El acontecimiento del fenómeno de emblanquecimiento presentó un desfase temporal al presentarse en el mes de septiembre (Figura 17); que corresponde a la estratificación tardía, de acuerdo con lo registrado en el año 2011 cuando se presentó en el mes de junio (Arellano & Gonzáles, 2011) y en el año 2013 durante el mes de mayo (Lagunas & Martínez, 2015). En ambos estudios, el sistema se encontraba en la fase de hidrodinámica de estratificación temprana cuando se presentó el emblanquecimiento. Se piensa que este retraso en la aparición del emblanquecimiento se debió, entre otros posibles factores, a un desfase en el proceso de sucesión de grupos algales en el sistema (Vizuet-Martinez & Hernández-Avilés, Com. Pers.). Anualmente, en el lago Atexcac se desarrollan diferentes florecimientos algales en las distintas etapas hidrodinámicas en respuesta a la disponibilidad de distintos nutrientes. Así, durante la etapa de mezcla se desarrolla un florecimiento de diatomeas que consumen el nitrógeno inorgánico en forma de nitratos que se encuentra disponible en la columna de agua como resultado de la reincorporación de materiales generada por la circulación de la masa de agua, al agotarse este nutrimento y comenzar la estratificación térmica. Por lo que la densidad de diatomeas decae y el lago presenta en ese momento un déficit de nitrógeno. El incremento de la temperatura ambiental que desencadena el comienzo de la estratificación, aunado al déficit de nitrógeno disponible promueve la proliferación de la cianobacteria filamentosa *Nodularia spumigena*, ya que las condiciones de temperatura y salinidad que favorecen su desarrollo se presentan en el lago (temperatura superficial mayor a 17 °C, salinidad de 6.086 mg L<sup>-1</sup> y la proporción N:P <1 en la superficie durante la estratificación temprana) (Cook & Holland, 2012; Holland *et al.*, 2012). La limitación de nitrógeno genera un estado de limitación para los grupos algales pero no para esta cianobacteria oportunista dado que tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. El florecimiento de esta cianobacteria provoca que el lago alcance sus niveles máximos de productividad primaria y genera un gran aporte de materia orgánica al sistema que se acumula en el fondo del lago en etapas más avanzadas de la estratificación, como se ha reportado en el lago Alchichica, perteneciente a la misma formación de lagos volcánicos tipo maar (Adame *et al.*, 2008; Alcocer *et al.*, 2014). El florecimiento de *Nodularia* durante el año 2014 se presentó con una intensidad mucho mayor con respecto a eventos previos, esto se reflejó tanto en la densidad de filamentos en la superficie, lo que representó una concentración de clorofila de 7 mg L<sup>-1</sup> en la zona pelágica y de 125 mg L<sup>-1</sup> en la zona litoral (Vizuet-Martinez & Hernández-Avilés, Com. Pers.). La duración del florecimiento también fue mayor dado que se mantuvo desde el mes de febrero hasta el mes de junio (5 meses); por otra parte, en el lago Alchichica se ha observado que la duración de este florecimiento es de tres meses aproximadamente (Oliva *et al.*, 2009). La desaparición del florecimiento de *Nodularia* se asocia con el agotamiento de CO<sub>2</sub> en el agua causado por la elevada actividad fotosintética (Villarreal-Quintero, 2013). El agotamiento del CO<sub>2</sub> además está favorecido por las condiciones de pH, alcalinidad y durezas en el lago, lo cual define su alcalinidad, con dominancia de bicarbonatos y de agua dura. Con el decaimiento del florecimiento de *Nodularia*, la disponibilidad de nutrientes en el

la superficie del lago es mínima y la concentración de CO<sub>2</sub> también es escasa. En este epilimnion deficiente en nutrientes prospera el PPA, ya que por su reducido tamaño presentan una mayor proporción superficie-volumen que les permite maximizar la absorción de nutrientes y consecuentemente tener una mejor eficiencia para aprovecharlos (Raven, 1998; Callieri & Stockner, 2000, 2002).

Así, el aumento de la intensidad del florecimiento de *Nodularia* y la aparición tardía del PPA como componente dominante de la comunidad autotrófica en el lago son las causas del retraso en la aparición del evento del emblanquecimiento. Lo cual se sustenta con los cambios químicos que se producen como resultado de la actividad fotosintética en el agua que favorecen la formación y precipitación de carbonatos como ha sido ampliamente documentado (Delille *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1997; Riding, 2006; Kosamu & Obst, 2009; Shiraishi, 2012; Geilfus *et al.*, 2013) Con base en su papel de productores primarios se ha asociado este fenómeno de precipitación con la dinámica del PPA (Thompson *et al.*, 1997; Dittrich & Obst, 2004; Riding, 2006; Aloisi, 2008; Couradeau *et al.*, 2012; Couradeau *et al.*, 2013).

Con el componente biológico se puede explicar el desfase temporal de la precipitación de carbonatos registrada en el lago; sin embargo, no se puede asumir que la asociación del retraso en la sucesión de grupos algales y la aparición del fenómeno de emblanquecimiento responda en *sensu stricto* a una relación causal. Además de la connotación biológica que se ha dado al fenómeno de emblanquecimiento se ha explicado la precipitación de carbonatos en función de las características físico-químicas del agua como una mayor actividad iónica derivada de una mayor temperatura superficial que en un momento dado podrían resultar favorables para que la formación de carbonatos y su precipitación ocurra (Kienel *et al.*, 2009). El 2014 ha sido el año históricamente más cálido en el planeta desde 1980 (N.A.S.A., 2015). Durante este año el lago Atexcac registró un incremento en la temperatura ambiental promedio (de 14.01 ± 5.74 °C en 2013; 18.74 ± 1.97 °C en 2014) y se registró una disminución en la precipitación pluvial durante la época de lluvias (de 226.35 ± 92.8 mm en 2013; 170.2 ± 41.35 en 2014). Lo que provoca un incremento en la evaporación y favorece la concentración de iones, proceso que se ve potenciado además por la ubicación del lago dentro de una cuenca endorreica, lo que trae como consecuencia la precipitación de carbonatos como ha sido propuesto por Kienel *et al.* (2009).

#### **Precipitación espontánea de carbonato de calcio**

Durante el tiempo de estudio en el lago Atexcac se observó un proceso de cambio de la coloración del agua de verde esmeralda a azul neón, esto se atribuyó a la formación mineral de carbonato de calcio en la superficie del sistema. El fenómeno de emblanquecimiento y la precipitación de carbonatos han sido considerados como procesos consecuentes y de igual forma se asume que el mineral formado en ambos casos es carbonato de calcio y aún más importante, se asume la precipitación física de esta sal. Para el lago Atexcac no se conoce con certeza si esta coloración es causada por la saturación de esta sal o de otra, o si el fenómeno está restringido únicamente a la zona superficial y sí su consecuencia final es la precipitación de carbonato de calcio.

El lago Atexcac puede ser considerado como un lago sódico (Grant, 2006) dado que se encuentra en una región donde el índice de precipitación es rebasado por el de evaporación, lo que produce un déficit de agua que podría abatir el nivel del sistema en unas cuantas décadas. Sin embargo, los lagos volcánicos de la Cuenca Oriental se mantienen gracias a los aportes de agua provenientes del manto acuífero (Alcocer *et al.*, 2005). Cuando los influjos de agua del acuífero contienen una alta concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se podría generar el abatimiento de la alcalinidad y el pH debido a la reacción del  $\text{Ca}^{2+}$  con los carbonatos, formando compuestos insolubles. La concentración de Ca en los lagos sódicos siempre es muy baja ( $5 \text{ mmol L}^{-1}$  a menos de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Arp *et al.*, 1999) y la sobresaturación de carbonato de calcio se alcanza incluso con niveles muy bajos de Ca dado que la actividad iónica necesaria para producir la precipitación se compensa por la alta concentración de carbonatos.

De esta forma, la precipitación de carbonatos en el lago Atexcac estaría sujeta tanto a los aportes externos de Ca (provenientes del manto acuífero) como a los cambios químicos en la columna de agua que incrementarían la concentración de carbonatos como puede ser un aumento en la tasa de evaporación.

Entre los factores que pueden modificar la concentración de las formas químicas del carbono se encuentran la fotosíntesis (Shiraishi, 2012), la actividad bacteriana (Bundeleva *et al.*, 2012) y las estrategias de adquisición de carbono que poseen algunas cianobacterias (Riding, 2006). La probabilidad de que el fenómeno de emblanquecimiento en el lago Atexcac tenga sus causas en variables meramente abióticas disminuye cuando se toma en cuenta que en los meses de agosto, septiembre y octubre se presenta la mayor precipitación pluvial en la región; por lo que, la concentración de sales sería diluida por el aporte de agua, más no aumentada debido a la evaporación. Se podría pensar entonces en el acarreo de materiales de la microcuenca debido a la precipitación pluvial. Sin embargo, en primer lugar, aunque el cráter está formado por materiales sedimentarios y volcánicos, son estos últimos los que dominan (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007) y el aporte iónico de ambos tipos de roca sería de carbonatos, sulfatos, cloro y boratos. En segundo lugar, una parte del aporte de Ca que podría ser incluido en el lago por efecto del acarreo sería atrapado por las sustancias mucilaginosas que secretan las cianobacterias, de tal forma que esta fracción del calcio permanecería atrapada y solo hasta después de rebasar la capacidad de acumulación del mucilago cianobacteriano se observaría la formación de carbonato de calcio en el agua (Arp *et al.*, 1999). Esto último implicaría un cierto nivel de acción biológica en el fenómeno de emblanquecimiento aunque solo fuera de forma indirecta. Por estas razones se descartaría que en el lago Atexcac el fenómeno de emblanquecimiento se presente de forma espontánea y que sus causas sean exclusivamente abiogénicas.



**Figura 17. Lago Atexcac el día 22 de agosto de 2014, antes del fenómeno de emblanquecimiento (arriba) y el 26 de septiembre de 2014, durante el emblanquecimiento (abajo). La coloración del lago en el mes de octubre fue muy similar a la observada en agosto, la duración de éste fenómeno podría ser de 1-2 semanas.**

### Precipitación de carbonatos inducida por fotosíntesis

Se sabe que la actividad fotosintética favorece o provoca directamente la formación de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) como se muestra en la siguiente ecuación:



Esta reacción tiene lugar cuando se incorporan bicarbonatos del medio acuoso como fuente de carbono inorgánico involucrando el intercambio de Ca en la cubierta celular. De esta forma, al hidrolizar el bicarbonato se genera  $\text{OH}^-$  que reacciona con una parte del  $\text{CO}_2$  que se expulsa al medio acuoso formando bicarbonatos, otra parte de este  $\text{CO}_2$  se utiliza en el metabolismo celular y finalmente, el producto principal de la hidrólisis del bicarbonato es el carbonato (Dittrich & Obst, 2004). Estos carbonatos son expulsados al medio acuoso donde se combinan con el Ca formando  $\text{CaCO}_3$  en la superficie celular (Figura 18).

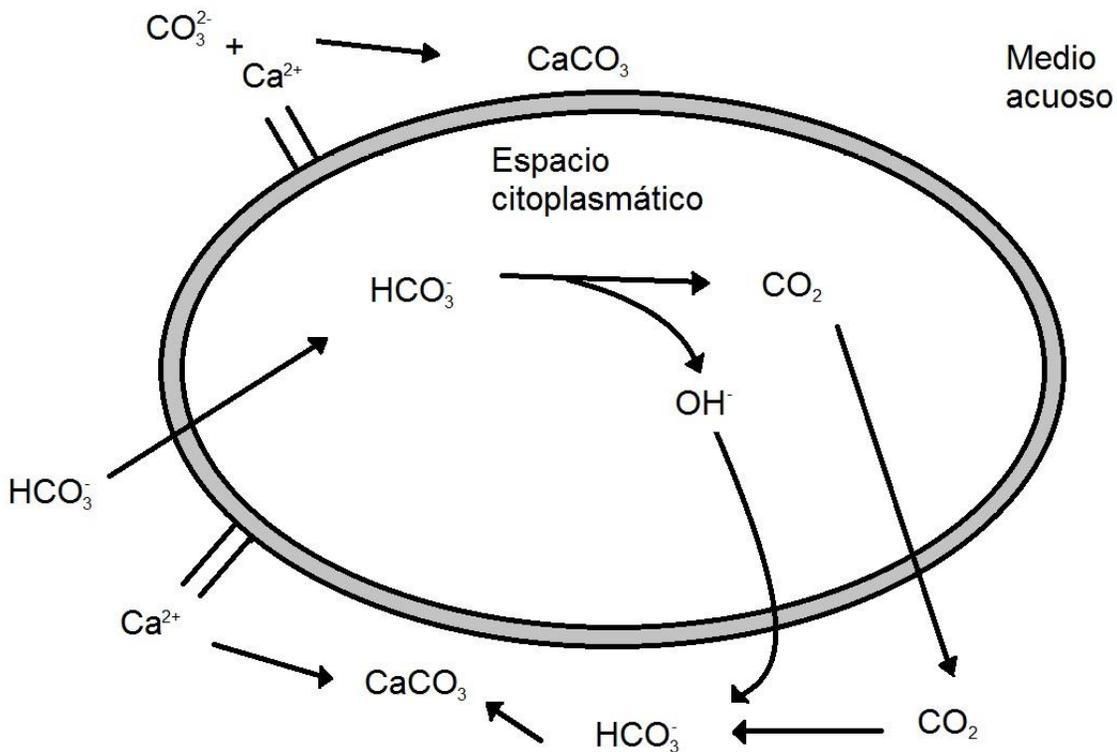


Figura 18. Modelo esquemático del proceso de adquisición de bicarbonatos por una cianobacteria que desencadena la precipitación de carbonatos en su superficie. Basado en Thompson *et al.* 1997.

Esto último deriva en dos nuevas cuestiones, la nucleación de carbonatos y la saturación mineral de la cubierta celular. Dado que el cambio de pH y la formación de  $\text{CaCO}_3$  suceden en el microambiente de la célula, entonces la formación del núcleo mineral ocurre de igual forma en la superficie de la misma. Las cianobacterias y bacterias heterotróficas en general, pueden presentar una cubierta celular en la cual se formaría el mineral, no directamente en la membrana de la célula. Sí la cubierta celular se rodea de  $\text{CaCO}_3$ , el peso podría afectar la flotabilidad, y por lo tanto,

la distribución de las bacterias en la columna de agua. En el caso particular del PPA, una reducción de su flotabilidad conllevaría a una desventaja, puesto que se vería desplazado a mayor profundidad donde la cantidad de luz sería limitante para el proceso de fotosíntesis.

La capa más externa de la cubierta celular de las cianobacterias está constituida por polímeros que ellas excretan para amortiguar los cambios químicos del medio circundante, para fijarse a un sustrato y como medio de protección. Estos exopolímeros tienen cargas negativas debido a la presencia de grupos sulfato en su estructura que ayudan a la fijación de  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto permiten que la célula funcione como sitio de reacción para llevar a cabo la nucleación (Arp *et al.*, 1999; Dittrich & Obst, 2004).

Se ha planteado que el PPA puede presentar estrategias para combatir la precipitación de minerales en su superficie (Martinez *et al.*, 2010); por lo que, los estudios apuntan a la formación de una cubierta con carga positiva para evitar la acumulación de cationes. Aunque este proceso no se ha estudiado a fondo, este tipo de mecanismos que evitan la formación de  $\text{CaCO}_3$  se contraponen con la relación existente entre el PPA y el fenómeno de emblanquecimiento. Martinez *et al.* (2010) proponen que el papel del APP en la precipitación de carbonatos no radica en funcionar como sitios de nucleación, sino más bien en favorecer la formación de  $\text{CaCO}_3$  al incrementar el pH y reducir la disponibilidad de FSR, el cual es un inhibidor de la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  (Lin & Singer, 2006). Por otra parte se propone que el PPA tiene la capacidad de reemplazar la cubierta celular una vez que esta se ha saturado de  $\text{CaCO}_3$  (Schultze-Lam *et al.*, 1992), por lo que de no contar con algún mecanismo para evitar la precipitación de carbonatos en su cubierta celular, la cubierta misma sería desechada para no comprometer la integridad del organismo.

Durante el fenómeno de emblanquecimiento del lago Atexcac se encontró una reducción en la concentración del FSR relacionada con la densidad del PPA; la misma relación inversa se observó entre la densidad del PPA y la concentración de sulfatos. Es posible que el florecimiento de PPA en el epilimnion durante el fenómeno de emblanquecimiento contribuya al consumo del FSR y la formación de polímeros que son excretados en la superficie de las células del PPA que exige el consumo de sulfatos corresponde con el descenso de este nutriente durante el evento de emblanquecimiento. Esto último indica que para el caso particular del lago Atexcac la función del PPA en el fenómeno de emblanquecimiento recae en la eliminación del FSR del agua para desinhibir la formación de  $\text{CaCO}_3$  y la formación de exopolímeros que permiten que la nucleación se lleve a cabo en la superficie de la célula.

En la presente investigación se planteó de forma hipotética que se observaría la dominancia de un grupo de productores primarios antes o durante el fenómeno de emblanquecimiento, particularmente el picoplancton autotrófico. Esta hipótesis se comprobó al encontrar la presencia de un florecimiento de PPA en los primeros 5 m de profundidad del sistema durante el evento de emblanquecimiento. Lo que hace suponer que este fenómeno se presenta principalmente en las capas más superficiales de la columna de agua (Figura 5).

### **Relación densidad-biomasa del PPA**

El florecimiento de PPA en el lago Atexcac no implicó un incremento en la biomasa, por el contrario estuvo acompañado por una reducción de la misma en el epilimnion. Esto implicó una reducción en el tamaño celular. Se ha observado que la reducción de tamaño bacteriano está asociado con la disminución de la concentración de FSR (Hernandez-Avilés *et al.*, 2012) por lo que la reducción de tamaño de las Pcy en el mes de septiembre puede estar sujeta a la misma demanda de fósforo que provoca el incremento de la densidad celular, como se explicó anteriormente.

La división del plancton en función de su tamaño genera que al caracterizar el grupo del PPA se agrupen tanto organismos eucariontes como procariontes. Durante los conteos al microscopio se pudo observar, en función de la coloración de las células, que la presencia de eucariontes en la fracción del PPA fue prácticamente nula. Sin embargo, aunque es posible determinar que el PPA en el lago Atexcac está compuesto principalmente por organismos procariontes no es posible indicar que todos pertenezcan a la misma especie. De acuerdo con lo reportado, el fenómeno de emblanquecimiento se ha observado únicamente en dos lagos de la formación de los Axalapascos, el lago Atexcac y el lago La Preciosa. De acuerdo con un estudio filogenético reciente el lago Atexcac alberga grupos de cianobacterias con una relación genética cercana a los clústers marinos de *Synechococcus* (Callieri *et al.*, 2013). Además, con base en el mismo estudio, en estos dos lagos se encuentran las cepas de Pcy 6A2 (Atexcac) y 8C7 (La Preciosa). Estas cepas se distribuyen exclusivamente en estos dos lagos y se encuentran relacionadas entre sí. Es posible que estas cepas de Pcy sean las que se relacionan directamente con el emblanquecimiento en sus respectivos sistemas de origen. La disminución del tamaño celular durante el florecimiento de PPA podría indicar que la cepa 6A2 sea la especie dominante en ese momento y que la densidad de las cepas de mayor tamaño decae, reduciendo la biomasa del PPA pese al incremento de la densidad.

Finalmente, el papel del PPA en el fenómeno de emblanquecimiento del lago Atexcac es evidente en cuanto a la reducción del FSR aunque no se cuenta con información suficiente para determinar que las Pcy funcionen como sitios de reacción ni para determinar la composición del PPA durante el florecimiento de septiembre.

### **El papel de la comunidad heterotrófica**

El estudio del emblanquecimiento se ha enfocado en la actividad de la comunidad autotrófica y se ha dejado de lado la función de los organismos heterótrofos. En el lago Atexcac la comunidad heterotrófica juega un papel fundamental en el reciclado de nutrientes al descomponer la materia orgánica autóctona que se acumula como resultado tanto de los florecimientos algales previos como de la incorporación de la materia alóctona de la cuenca. Mientras que el PPA domina los primeros estratos de la columna de agua por su relación con la luz, el PPH prevalece en el hipolimnion. Este patrón se observa, tanto para la densidad, como para la biomasa de ambos grupos. El PPA se relaciona con el emblanquecimiento porque la distribución del PPA corresponde con el supuesto de que el fenómeno de emblanquecimiento es de ocurrencia superficial.

En el lago Atexcac, la densidad del PPH en el sistema fue mayor a la del PPA hasta en un orden de magnitud, y alcanzó una biomasa equivalente a más del doble de la biomasa del PPA (Figura 5). Cotner & Biddanda (2002) mencionan que en sistemas oligotróficos la proporción entre el carbono inorgánico disuelto y los nutrientes disueltos es el principal factor que determina una mayor abundancia de organismos heterótrofos. De acuerdo con estos autores las bacterias son capaces de aprovechar el fósforo que se libera de la descomposición de la materia orgánica con una mayor facilidad que los autótrofos; por esta razón, los requerimientos nutricionales de las bacterias se encuentran satisfechos antes que los de los productores primarios y esto se refleja en una mayor densidad y biomasa heterotrófica.

La función restrictiva del fósforo soluble contra la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  que se mencionó anteriormente, podría ser abatida tanto por el florecimiento de PPA como por el consumo del PPH. La dominancia del PPH en la comunidad procarionte del lago Atexcac es evidente a partir de los resultados y sería incorrecto no considerar los diferentes efectos de la actividad bacteriana como un conductor fundamental de los cambios químicos en columna de agua.

En sistemas con características similares al sistema de estudio se ha planteado que la comunidad bacteriana participa como el principal componente en los procesos de mineralización y reincorporación del C, N y P (Jones *et al.*, 2001; Falcón *et al.*, 2002; Sorokin *et al.*, 2014; Valdespino-Castillo *et al.*, 2014) así como en los ciclos biogeoquímicos del azufre y silicio (Sorokin *et al.*, 2006; Lanzen *et al.*, 2013) y muy probablemente en la precipitación de carbonatos (Thompson, 2000). Por lo que, se plantea que la fracción autotrófica y heterotrófica de la comunidad bacteriana mantienen y regulan los ciclos biogeoquímicos en el lago Atexcac y, por lo tanto, presentan una estrecha relación con el fenómeno de emblanquecimiento en el sistema.

#### **Determinación del ensamblaje del procarioplancton**

Con el objetivo de establecer la dinámica de la comunidad bacteriana en relación con el fenómeno de emblanquecimiento se determinó su composición mediante el método de CARD-FISH.

La técnica de FISH (Hibridación fluorescente *in situ*, FISH por sus siglas en inglés) se basa en el uso de sondas de oligonucleótidos marcados con un fluorocromo que se adhieren al ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) de las bacterias (Volpi & Bridger, 2008). Las modificaciones a la técnica han permitido su aplicación en diferentes áreas del conocimiento. La combinación de FISH con el TSA™ (tiramide signal amplification) conocido también como CARD (Catalyzed reporter deposition) ha permitido la detección de células con un bajo contenido de rRNA (Pernthaler *et al.*, 2002; Sekar *et al.*, 2003). La técnica de CARD-FISH consiste, en general, en el proceso de permeabilización de la pared celular y la hibridación de una sonda de rRNA con su secuencia complementaria en el ribosoma bacteriano (FISH). La sonda utilizada se marca con HRP (peroxidasa de rábano) y utilizando la acción catalítica de la HRP se favorece la acumulación consecutiva de moléculas de tiramida marcada con un fluorocromo (TSA o CARD). El método de CARD-FISH se encuentra sujeto a cambios constantes que buscan optimizar la hibridación de diferentes grupos utilizando sondas cada vez más específicas e igualmente disminuir lo más posible la detección errónea de la hibridación (falsos positivos y falsos negativos). Aunque el método de CARD-FISH no es perfecto

(Amann & Fuchs, 2008), permite establecer con un margen de confianza la composición de la comunidad bacteriana en muestras naturales.

Una forma de estimar la calidad de la hibridación es comparar el porcentaje de hibridación de la sonda EUBI-III con la suma del porcentaje de células hibridadas con sondas de mayor especificidad. A través de este método se encontró que la suma del porcentaje de hibridación de las sondas para los grupos *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, BSR, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* ( $26.52 \pm 12.2$  %) fue menor a la hibridación obtenida con la sonda EUBI-III durante los meses de muestreo ( $41.83 \pm 15.49$ ). Al utilizar en el cálculo la hibridación obtenida con las sondas para familia y género, el porcentaje de hibridación de la sonda EUBI-III es superado alcanzando incluso el 100 %. Esto porque la mayor especificidad de las sondas para familias y géneros que tienen una mayor probabilidad de lograr una hibridación exitosa.

El porcentaje de células hibridadas con las sondas generales EUBI-III y ARCH915 durante este estudio fue de  $51.05 \pm 23.49$  %, lo que se puede atribuir a diferentes factores. La vía principal para obtener bajos porcentajes de hibridación es una mala aplicación de la técnica y en segundo lugar la sobreestimación de la densidad bacteriana teñida con DAPI. Al realizar repeticiones de la técnica y obtener los mismos resultados se puede llegar a descartar el error en la aplicación de la hibridación. Asimismo la técnica de CARD-FISH se validó siguiendo el protocolo propuesto por Pernthaler *et al.* (2002) y utilizando el mismo lote de sondas de oligonucleótidos con muestras procedentes de un sistema de tratamiento de aguas residuales, donde se registró arriba del 90% de hibridación con la sonda EUBI-III. Esto se atribuye a que estas células presentan una mayor actividad metabólica por las condiciones donde se desarrollan, como por ejemplo la elevada carga de materia orgánica, y nutrientes inorgánicos (Hernández-Velázquez y Hernández-Avilés, Com. Pers.).

Por otra parte, los muestreos realizados en esta investigación se llevaron a cabo durante la fase de estratificación bien establecida del lago. Durante esta etapa, la acumulación y descomposición química de la materia orgánica provoca que el hipolimnion se vuelva anóxico. La baja cantidad de oxígeno aunada a una probable proporción de carbono orgánico particulado – carbono orgánico disuelto mayor a uno, reduciría la actividad bacteriana. La oxidación de la materia orgánica es necesaria para poder obtener compuestos orgánicos de menor tamaño y a su vez ser asimilados por los organismos heterótrofos. Se ha explicado que si bien los organismos de menor tamaño tienen una mayor facilidad para adquirir y optimizar los recursos en menores concentraciones, también presentan una dificultad por su reducido tamaño para adquirir partículas más grandes (Cotner & Biddanda, 2002).

La disminución en la actividad bacteriana genera un gran número de células metabólicamente inactivas que no son detectadas mediante la técnica de hibridación pero si pueden ser contadas por el método de tinción con DAPI (Zweifel & Hagstrom, 1995; Heissenberger *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 2007). Esto puede generar una sobreestimación de la densidad relativa del PPH en la preparación de CARD-FISH y por lo tanto una subestimación del porcentaje de hibridación.

Otros factores que afectan la hibridación son el bajo contenido de ribosomas y la degradación de los sitios de reacción durante el proceso de permeabilización de la pared celular (Wilhartitz *et al.*, 2007) y las alteraciones en la pared celular que impiden su permeabilización (Nyström *et al.*, 1992; Gounot & Russell, 1999).

En trabajos publicados donde se utiliza la técnica de CARD-FISH el porcentaje de hibridación de diferentes sondas es comparable a lo encontrado en este trabajo (Tabla 4); por lo que los resultados obtenidos se aceptaron como adecuados para su posterior análisis.

**Tabla 4. Porcentaje de hibridación de sondas comúnmente utilizadas en CARD-FISH.**

Sistema	EUB*	ARCH915	BET42a	GAM42a	CF3-19a	SRB385	Cita
L. Atexcac	41 ± 15	9 ± 12	9 ± 9	6 ± 6	5 ± 7	3 ± 4	Este estudio
Agua subterránea	74	10	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	(Wilhartitz <i>et al.</i> , 2007)
L. Maggiore	49	47	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	(Callieri <i>et al.</i> , 2009)
L. Gossenköllesee	51 ± 4	N.A.	18 ± 2	1 ± 1	16 ± 2	N.A.	(Glöckner <i>et al.</i> , 1999)
L. di Cadagno	46 ± 9	N.A.	21 ± 4	0 ± 3	3 ± 5	N.A.	
L. Baikal	44 ± 5	N.A.	4 ± 4	0 ± 2	4 ± 1	N.A.	

\* Porcentaje de *Bacteria* obtenido con la sonda EUB338 y con la mezcla EUBI-III

Los valores mostrados corresponden al porcentaje de hibridación ± desviación estándar, cuando fue disponible

L.= Lago, N.A.= No analizado.

### Composición de la comunidad del procarioplancton

El presente estudio se realizó durante el periodo de estratificación y abarcó un periodo de transición progresiva de la misma etapa (de la estratificación bien establecida a la tardía); Por lo que, resultó necesario distinguir al menos, dos zonas en donde la composición bacteriana podría ser distinta, el epilimnion y el hipolimnion. Los lagos sódicos son conocidos por su elevada productividad primaria (Melack, 2009) y aunque no todos presentan esta característica es posible encontrar una elevada actividad fotosintética (Melack & Kilham, 1974); la cual, favorece que en el epilimnion exista una alta concentración de oxígeno y, por lo tanto, un potencial redox diferente al que se ubicaría en la zona hipolimnética, donde la descomposición de la materia orgánica abate la concentración de oxígeno generando una condición anóxica que favorece la disminución del potencial redox y la actividad heterotrófica. Por esta razón se analizó la estructura de la comunidad bacteriana al mismo tiempo que la distribución de cada grupo en la columna de agua. El metalimnion es una zona de transición donde se favorece la presencia de las Pcy pues pueden aprovechar los nutrientes pese a la baja disponibilidad de luz dado que pueden realizar la fotosíntesis por debajo del límite de la zona eufótica (Camacho *et al.*, 2003; Callieri *et al.*, 2007). Esto apuntaría a una dominancia de la comunidad autotrófica en esta zona, aunque se ha planteado que por el ritmo de asimilación de nutrientes, tanto del PPA, como del PPH, podría haber un estado de equilibrio entre la producción de oxígeno vía fotosíntesis y su consumo a

través de la respiración (Cotner & Biddanda, 2002); por lo que, este estrato no representa un ambiente contrastante como se mencionó para el epilimnion y el hipolimnion sino posiblemente una zona en equilibrio.

La comunidad bacteriana del lago fue dominada por microorganismos del dominio *Bacteria* durante el periodo de estudio mientras que el aporte del grupo *Archaea* fue mínimo excepto durante el fenómeno de emblanquecimiento (Figura 10). Esta proporción se ha observado también en algunos lagos sódicos del Este del Valle del Rift en África (Lanzen *et al.*, 2013; Tiodjio *et al.*, 2014).

En el océano se ha observado un incremento en la densidad de arqueas a mayor profundidad en la columna de agua mientras que la abundancia de *Bacteria* se ve disminuida (Karner *et al.*, 2001); sin embargo, el lago Atexcac presentó una distribución inversa. Los estudios sobre la distribución vertical de las arqueas es escasa en sistemas epicontinentales, ya que el análisis de su distribución ha sido realizada en los sedimentos tanto del océano como de sistemas de agua dulce y en algunos casos adicionalmente con muestras superficiales ( $\leq 1$  m de profundidad) (Ye *et al.*, 2009). Por otra parte, la mayoría de los estudios sobre las arqueas apuntan principalmente a su análisis filogenético más que a su distribución (Pouliot *et al.*, 2009).

Los organismos del dominio *Archaea* son conocidos por su capacidad para desarrollarse en ambientes con condiciones extremas de temperatura, salinidad, pH o en combinación de algunas de las mismas. Aunque no todas las arqueas viven en ambientes extremos, presentan rutas metabólicas y procesos fisiológicos únicos que las diferencian de las bacterias del dominio *Bacteria*. Una de las funciones metabólicas que manifiesta exclusivamente el dominio *Archaea* es la metanogénesis, que es considerado el proceso final en la descomposición de la materia orgánica y que conlleva la reducción del carbono. Además de la metanogénesis, se conoce la relación de las arqueas con el proceso de oxidación anaerobia de sulfatos. La oxidación anaerobia de sulfatos provee a las BSR con el sustrato para llevar a cabo su actividad reductora, que a su vez se encuentra acoplada con la metanogénesis (Arp *et al.*, 1999). Todos estos procesos se llevan a cabo, primordialmente, en la fase anóxica de la columna de agua principalmente; lo cual, justificaría la escasez de información sobre la distribución de las arqueas en la zona oxigenada de los sistemas acuáticos, aunque en este trabajo se presenta un acercamiento de la función de las arqueas en la columna de agua y su relación con el fenómeno de emblanquecimiento.

En este trabajo se estudiaron tres clases de las seis que conforman el filo *Proteobacteria*. Este filo agrupa a la mayoría de los grupos bacterianos con alguna importancia para la agricultura, medicina y la industria, sin embargo, en los sistemas acuáticos, las clases *Alfa*, *Beta* y *Gammaproteobacteria* son las de mayor relevancia ecológica (Newton *et al.*, 2011) y fueron incluidas en este trabajo. El filo *Proteobacteria* representó una fracción importante de la comunidad bacteriana por la abundancia de las clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* mientras que la densidad de *Alfaproteobacteria* detectada con la sonda ALF968 fue mínimo.

La clase *Alfaproteobacteria* no presentó relación alguna con las variables medidas en este estudio y su abundancia fue mínima en la columna de agua en los diferentes muestreos. Los organismos

de esta clase son cosmopolitas, con formas de vida parasitas y simbiontes y además presentan una alta plasticidad genética (Newton *et al.*, 2011). Si bien se ha observado que en los sistemas de agua dulce la abundancia de este grupo es menor, aunque ubicua, se sabe que la densidad de esta clase incrementa en presencia de depredadores (Jürgens & Jeppesen, 2000), y que géneros pertenecientes a este grupo tienen la capacidad de adquirir recursos en condiciones limitantes (Eiler *et al.*, 2003) y que también pueden aprovechar la materia orgánica recalcitrante (Hutalle-Schmelzer *et al.*, 2010). Dado que la depredación en el lago no ha sido estudiada, no es posible discutir los efectos que se podrían generar de la presencia de depredadores en el sistema. Por otro lado, el florecimiento de APP durante el fenómeno de emblanquecimiento podría significar un nivel de escasez de recursos que no resultaría tan bajo aun para provocar la alta competitividad de la clase *Alfa*. De la misma forma, si bien se postuló la posibilidad de que las bacterias de esta clase puedan degradar materia orgánica de mayor peso molecular, que estaría disponible en el fondo del lago, es posible que estos géneros no sean muy abundantes en el sistema. Esto se sustenta con la distribución de la clase que durante el mes de octubre se encontró en el epilimnion y metalimnion del lago. De manera que durante agosto y septiembre, la disponibilidad de recursos hacía que los demás grupos de bacterias tuvieran ritmos de crecimiento mayores a los de estas proteobacterias, mientras que en la estratificación tardía (octubre), la disponibilidad de nutrientes desde la superficie hasta el *top* del hipolimnion fue mínima, presentando las condiciones necesarias para que los organismos de este grupo mejor adaptados a la baja disponibilidad de nutrientes, característica de ambientes oligotróficos y ultraoligotróficos, pudieran optimizar su ritmo de crecimiento y por lo tanto incrementar su densidad.

Adicionalmente, al utilizar una sonda de oligonucleótidos, la capacidad para identificar a los organismos se ve sujeta al supuesto de que los organismos de la muestra natural presenten la secuencia complementaria de la misma; aunado a la gran plasticidad genética del grupo los lagos presentan el llamado “efecto isla” que promueve la especiación y genera una alta diversidad biológica. Esto último podría afectar la compatibilidad de la sonda ALF968 y los organismos del lago Atexcac; por lo que, no se descarta que la clase *Alfaproteobacteria* forme una parte importante de la composición bacteriana del lago.

El género *Candidatus* LD12 se encontró en bajas densidades a lo largo del periodo de estudio. Este género es el grupo hermano de la familia SAR11, la cual representa el componente principal de la comunidad bacteriana en la zona pelágica del océano y se considera como la especie bacteriana más abundante del planeta (Morris *et al.*, 2002; Rappe *et al.*, 2002; Carlson *et al.*, 2008). Contrario a lo observado en el ambiente marino, la distribución de estas bacterias se vio sesgada hacia estratos más profundos del sistema, lo que corresponde con la distribución general de la clase *Alfaproteobacteria* en sistemas de agua dulce (Salcher *et al.*, 2011). Se ha planteado que el grupo LD12 se encuentra en todos los sistemas de agua dulce (Bahr *et al.*, 1996; Zwart *et al.*, 2002); sin embargo, no se ha podido realizar un cultivo puro de esta bacteria, esto ha dificultado la incorporación de su genoma a bases de datos y más aún el estudio de las funciones de esta bacteria en el ecosistema.

Por otro lado, su grupo hermano en sistemas marinos, SAR11, está implicado en la remineralización de materia orgánica de bajo peso molecular como glucosa y aminoácidos (Malmstrom *et al.*, 2004; Alonso & Pernthaler, 2006). Además de requerir de compuestos exógenos sulfato-reducidos para su crecimiento (Tripp *et al.*, 2008). En este estudio se encontró una relación positiva entre la densidad del grupo LD12 y la concentración de amonio. Estas bacterias al igual que su grupo hermano, SAR11, presentan genomas con bajo contenido de G+C (Guanina y Citosina); teóricamente esto funciona como una estrategia para evitar la limitación de nitrógeno (Ghai *et al.*, 2011) que afectaría a otros grupos bacterianos, por lo que en la etapa de estratificación tardía la acumulación de distintos nutrientes podría favorecer su desarrollo. La mayor abundancia de este grupo correspondió con las zonas de mayor concentración de amonio (hacia el fondo del lago) lo cual, de forma análoga, corresponde con la zona en la que las BSR tuvieron su mayor densidad. Aunque no se encontró ninguna correlación entre ambos grupos, es posible que las BSR provean de compuestos reducidos a las LD12 favoreciendo su crecimiento mientras que las LD12 aprovechan los aminoácidos que se liberan de la materia orgánica en descomposición en el hipolimnion.

El género *Paracoccus* estuvo presente en la columna de agua durante todo el periodo de estudio y formó la fracción principal de las bacterias heterotróficas durante el mes de agosto. Durante y después del fenómeno de emblanquecimiento su densidad se redujo a lo largo de la columna de agua de igual forma que la concentración de amonio, nutrimento con el cual se encontró relacionada la densidad de éste género. *Paracoccus* está asociado al proceso de desnitrificación y esto explicaría el por qué su densidad depende de la concentración de nitrógeno en su forma más reducida. En los lagos sódicos, el nitrógeno suele ser el nutrimento limitante dado que el amonio que se forma de la descomposición de las células muertas se volatiliza debido al elevado pH o bien es oxidado por arqueas y bacterias desnitrificantes (Jiang *et al.*, 2009; Vissers *et al.*, 2013) como sería el caso de *Paracoccus*. En el lago Atexcac se incorpora una gran cantidad de nitrógeno durante el florecimiento de *Nodularia*, tal como sucede en la zona oxigenada de otros lagos sódicos por acción de bacterias diazotróficas (Sorokin *et al.*, 2014). La descomposición de los filamentos de esta cianobacteria libera una alta concentración de nitrógeno en forma de amonio que puede ser aprovechado por las bacterias del género *Paracoccus*, de tal forma que el papel antagónico de ambos grupos completa la incorporación y remoción de nitrógeno en el lago.

La densidad de las clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* en los sistemas acuáticos se ha relacionado con la salinidad del agua (Glöckner *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006; Biers *et al.*, 2009) siendo mayor la abundancia de la clase *Betaproteobacteria* en sistemas de agua dulce (baja salinidad) mientras que la clase *Gammaproteobacteria* presenta una mayor abundancia en sistemas marinos y lagos sódicos (mayor salinidad).

La comunidad bacteriana en los sistemas de agua dulce está dominada por organismos de los grupos *Actinobacteria* y *Betaproteobacteria* principalmente (Glöckner *et al.*, 1999; Glöckner *et al.*, 2000; Zwart *et al.*, 2002). La abundancia de las clases *Beta* y *Gammaproteobacteria* guarda una relación con la salinidad del sistema, aunque no se ha mencionado explícitamente qué componente de la salinidad afecta la distribución de estas bacterias. En este estudio se encontró

una correlación negativa entre la densidad del grupo *Betaproteobacteria* y gran parte de los nutrientes, así como con la conductividad eléctrica y la dureza total, lo que concuerda con el hecho de que dominen la comunidad procarionte en sistemas de agua dulce. En tanto, la clase *Gammaproteobacteria* presentó una relación positiva con el pH y la alcalinidad de carbonatos, cuyos valores elevados son característicos de los lagos sódicos, ambientes, donde este es uno de los grupos más abundantes y diversos (Jones *et al.*, 1998; Lanzen *et al.*, 2013). Esta relación indica una dependencia de la densidad bacteriana con respecto a las formas de carbono predominantes en el sistema que determinan la dureza y la alcalinidad. Así, la abundancia de proteobacterias de las clases *Beta* y *Gamma* estaría sujeta a los cambios en el sistema búfer del lago, así como al fenómeno de emblanquecimiento por el cambio de las especies químicas del carbono.

La densidad de la clase *Betaproteobacteria* guarda una relación directa con las cianobacterias (Eiler *et al.*, 2006), tal como lo reveló en este estudio el análisis estadístico con respecto a la densidad y biomasa del PPA. Esta relación se basa en el aprovechamiento de compuestos de bajo peso molecular derivados de fitoplancton (compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos, ácidos grasos y carbohidratos con un peso molecular <1000 Da) (Šimek *et al.*, 2010), aunque en general, el grupo es sumamente competitivo en sistemas fotosintéticamente activos (Šimek *et al.*, 2008). Esta relación se observó durante el mes de septiembre cuando ocurrió el florecimiento de PPA y asimismo la clase *Betaproteobacteria* alcanzó su máxima densidad.

Las BSR en el lago tuvieron un aporte muy pequeño en cuanto a densidad dentro de la comunidad bacteriana. Sin embargo, se plantea que la actividad de estas bacterias es indispensable en la zona anóxica de los sistemas acuáticos, y de mayor relevancia en los lagos sódicos por generar el sustrato químico que puede ser aprovechado por las bacterias metanogénicas (Arp *et al.*, 1999). Se encontró además, que la distribución de las BSR no estuvo limitada a la zona anóxica tal como se ha reportado en diferentes sistemas (Bryukhanov *et al.*, 2011; Hesham & Alamri, 2012). A este grupo se le atribuye además el control de la concentración de sulfatos en los lagos sódicos (Jones *et al.*, 1998) por lo que, pese a su baja densidad, no se descarta que jueguen un papel fundamental en el ciclo del azufre.

El filo *Actinobacteria* representó una parte consistente y abundante de la comunidad bacteriana a lo largo de este estudio. Este filo es uno de los grupos más diverso en el sentido taxonómico (Ventura *et al.*, 2007) y se distribuye en una amplia variedad de sistemas de agua dulce con diferentes características químicas y biológicas (Newton *et al.*, 2007). Este filo estuvo asociado directamente con la variación del pH en el agua, lo cual se vio reflejado en el abatimiento gradual de la abundancia de este grupo. Este grupo se ha encontrado como uno de los componentes principales de la comunidad procarionte de otros lagos sódicos con un pH de  $\approx 11.5$  (Jones *et al.*, 1998); dado que el pH del lago Atexcac es mucho menor ( $\approx 9$ ), es de esperarse que el aporte de este grupo a la comunidad bacteriana del lago sea menor a la observada en otros sistemas.

La mayor densidad de este filo bacteriano se encontró en la parte superficial del lago durante el mes de agosto, lo cual corresponde con lo observado en otros sistemas donde este los organismos de este filo presentan el pigmento rodopsina (Ghai *et al.*, 2013); este carácter propicia el

aprovechamiento de la luz, que explicaría su distribución en la zona con mayor penetración lumínica en el lago. Por otra parte, durante el mes de septiembre, la distribución de este grupo se concentró en la zona del metalimnion y prácticamente desapareció en el mes de octubre. Con respecto a esto, se ha comprobado que la abundancia de este grupo guarda una relación inversa con la concentración de clorofila, mientras que su actividad incrementa cuando la cantidad de clorofila en el sistema incrementa (Warnecke *et al.*, 2005). Es posible que un incremento de la concentración de clorofila en la columna de agua durante la estratificación pueda afectar la densidad del filo *Actinobacteria* como pudo suceder en el mes de octubre, cuando la densidad de este taxón descendió a lo largo de la columna de agua posiblemente relacionado con un incremento en la concentración de clorofila en el lago (Vizuet-Martinez & Hernández-Avilés, Com. Pers.).

Los bajos niveles de detección del grupo se contraponen con la amplia distribución y las observaciones donde forman una gran parte de la comunidad bacteriana (Glöckner *et al.*, 2000; Warnecke *et al.*, 2005). Estas bacterias son de las más abundantes en el suelo y se plantea que su gran abundancia en los sistemas acuáticos es resultado de su incorporación desde la cuenca de captación (Warnecke *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha encontrado que existe una gran cantidad de grupos específicos de este filo en diferentes ambientes, demostrando que estas bacterias no son arrastradas desde la cuenca (Allgaier & Grossart, 2006; Ghai *et al.*, 2013). La formación de nuevos grupos específicos del filo *Actinobacteria* en diferentes ambientes podría coadyuvar a la no detección de estos organismos como efecto de una hibridación defectuosa con la sonda utilizada, generando falsos negativos que arrojan un menor porcentaje de hibridación.

La mayor abundancia del filo *Bacteroidetes* se distribuyó en la zona hipolimnética del lago. Se ha asociado a los miembros de este grupo con la degradación de materia orgánica de alto peso molecular, es decir, las formas más complejas del carbono orgánico disuelto (Kirchman, 2002; Reichenbach, 2006). Esto es sumamente importante, pues el aprovechamiento del carbono orgánico disuelto es el primer paso en el circuito microbiano para la mineralización de la productividad primaria de los sistemas acuáticos (Ducklow, 2000). La localización de este grupo en el lago Atexcac se contrapone al hecho de que la mayoría de los linajes bacterianos comprendidos en este filo son aerobios (Manz *et al.*, 1996). Pese a esto último se debe tomar en cuenta que la sonda CF319a es la más general para este grupo e hibrida a miembros del grupo *Cytophaga-Flavobacteria* pero tiene una afinidad aun mayor a los miembros del grupo *Bacteroidetes-Prevotella*, cuyos principales grupos son anaerobios (Weller *et al.*, 2000).

El filo *Bacteroidetes* se encontró relacionado de forma positiva con la alcalinidad de bicarbonatos y negativamente con la alcalinidad de carbonatos. Ya que se ha mencionado la capacidad que presenta este grupo para degradar materia orgánica cabe destacar que la degradación bacteriana de compuestos orgánicos genera CO<sub>2</sub> como producto secundario. El CO<sub>2</sub> en el medio acuoso reacciona con los carbonatos (CaCO<sub>3</sub>, principalmente) provocando su disociación y de esta reacción se genera un incremento en la alcalinidad de bicarbonatos y consecuentemente un descenso en el pH, parámetro con el cuál este filo se encontró relacionado de forma inversa.

Dentro del dominio *Archaea*, la abundancia del filo *Thaumarchaeota* presentó una distribución similar a la que se encontró para todo el dominio. Sin embargo, la densidad del filo fue menor a la del dominio hasta en un orden de magnitud. Esta diferencia en el rango de detección celular se puede atribuir a la diferencia en la sensibilidad de cada sonda y principalmente a la composición del dominio *Archaea*.

Recientemente, se dividió al dominio *Archaea* en tres filos, el que se formó más recientemente fue *Thaumarchaeota*, que posee características que lo separan del filo *Crenearchaeota* donde se encontraba agrupado anteriormente (Brochier-Armanet *et al.*, 2008). La sonda CREN537 fue diseñada para detectar bacterias del filo *Crenearchaeota*, sin embargo, actualmente su especificidad es para el grupo *Thaumarchaeota*. Aunque se pueda pensar que existe un cierto nivel de error en la detección de organismos con el uso de esta sonda, existe una cuestión de mayor importancia, en los lagos sódicos se ha observado que son más importantes los miembros del grupo Euryarchaeota por su función metabólica relacionada con el ciclo del metano, mientras que el grupo *Thaumarchaeota* se encuentra en menor proporción (Jones *et al.*, 1998), por lo que la detección del grupo con el uso de la sonda CREN537 sería *per se* prácticamente nulo.

La familia *Planctomycetaceae* se encuentra dentro de los grupos más abundantes en el océano y en el agua dulce (Pizzetti *et al.*, 2011). Aunque han sido poco estudiados al no estar bien representados en las bibliotecas genéticas (Newton *et al.*, 2011). Este grupo es de particular importancia en el lago Atexcac pues se ha encontrado que su densidad incrementa en relación a los florecimientos bacterianos (Janse *et al.*, 2000; Brümmer *et al.*, 2004; Eiler & Bertilsson, 2004; Tadonlélé, 2007). Esta respuesta se encuentra un tanto desfasada pues estas bacterias aprovechan los carbohidratos que se almacenan dentro de las células de los autótrofos (Rabus *et al.*, 2002; Woebken *et al.*, 2007) por lo que pueden aprovechar estas sustancias de reserva hasta que se alcanza cierto punto de la degradación de las células fitoplanctónicas muertas.

Las bacterias de la familia *Planctomycetaceae* estuvieron relacionadas de forma inversa con el silicio. En un estudio realizado en el océano este grupo se relacionó de la misma forma con un florecimiento de diatomeas (Pizzetti *et al.*, 2011). Las diatomeas remueven el silicio disuelto en el agua y lo mineralizan en sus estructuras características. Durante este estudio se observó una reducción en la concentración de silicatos durante el mes de septiembre, que corresponde con la mayor densidad de la familia *Planctomycetaceae*. Se desconoce la presencia de un florecimiento tardío de diatomeas en el lago Atexcac, ya que se piensa que este sucede en el invierno, durante la temporada de mezcla, de forma similar a lo reportado en el lago Alchichica (Ardiles *et al.*, 2012). Sin embargo, destaca la relación negativa entre la densidad del grupo y la concentración de silicatos, esto apunta a que posiblemente existe un efecto negativo del silicio sobre la actividad de estas bacterias.

Aparte de la función que juegan estas bacterias en el ciclo del carbono, este grupo se caracteriza por la capacidad de realizar la oxidación del amonio en condiciones anaerobias. Este proceso denominado *Anammox* (Anaerobic ammonium oxidation) se ha vuelto de particular importancia para la tecnología de bio-reactores. Este proceso es realizado por bacterias de diferentes géneros

*Candidatus* (Fuerst, 2004) que se encontrarían dentro de la familia *Planctomycetaceae* (Pizzetti *et al.*, 2011). Aunque el análisis estadístico de los datos no demostró correlación alguna entre este grupo y la concentración de amonio es de mayor interés, dentro del marco de investigación del fenómeno de emblanquecimiento, la presencia de grupos con la capacidad de almacenar magnesio ya que esto determinaría una mayor disponibilidad de calcio con respecto a la de magnesio; lo cual, indica que la sal formada durante el fenómeno de emblanquecimiento es carbonato de calcio. Las bacterias con la capacidad de almacenar  $Mg^{2+}$  fueron consideradas en este trabajo dada la relación negativa de la densidad del grupo con la dureza total.

### **La actividad bacteriana como modeladora de los ciclos biogeoquímicos en el lago Atexcac**

Los lagos sódicos presentan características químicas que resultan favorables para la presencia y concatenación de los ciclos biogeoquímicos del C, N, P, y S (Schlesinger *et al.*, 2011) tanto por su origen como por los procesos de concentración de sales. El lago Atexcac es un sistema con una salinidad moderada (oligosalino) y una elevada alcalinidad, la salinidad afecta principalmente el ciclo del nitrógeno, incluso inhibiéndolo en sistemas hipersalinos (Sorokin *et al.*, 2014) mientras que la elevada alcalinidad amortigua los cambios en el pH producidos por procesos fisiológicos como la nitrificación y desnitrificación. La actividad de los diferentes grupos procariontes, como se mencionó anteriormente, modela los compartimentos de los ciclos biogeoquímicos que toman lugar dentro de los sistemas acuáticos y en el lago Atexcac la actividad biológica es el principal conductor del reciclado de materiales, puesto que el lago se encuentra en una cuenca cerrada y el acarreo de materiales solo sucede en la temporada de lluvias (alrededor de tres meses al año). De esta forma, la incorporación de carbono y fósforo particulado se da desde la cuenca y, a su vez, el N y  $CO_2$  son incorporados al lago desde la atmósfera. Elementos como el azufre y el silicio se encuentran disueltos en el agua en grandes cantidades debido a que el lago se sitúa sobre rocas de origen volcánico principalmente (Armienta *et al.*, 2008).

El aire está constituido principalmente por nitrógeno (78 %) seguido del oxígeno (21 %) mientras que el  $CO_2$  constituye apenas ~0.038 %, sin embargo, su solubilidad en el agua es mucho mayor ya que el  $CO_2$  reacciona con el agua formando ácido carbónico, bicarbonato y carbonato. El  $CO_2$  que se incorpora desde la atmósfera es aprovechado por los grupos de fitoplancton y bacterioplancton fotoautótrofo en el lago, sobre todo durante los florecimientos de cianobacterias (*Nodularia* y PPA). Los florecimientos sucesivos de fitoplancton o bacterioplancton autotrófico aportan materia orgánica al sistema que es degradada a lo largo de toda la columna de agua por grupos degradadores de materia orgánica que hidrolizan polímeros principalmente (Sorokin *et al.*, 2014). Esta función en los lagos sódicos es realizada por *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Reichenbach, 2006; Grant & Sorokin, 2011). Después de esta fase de degradación primaria, grupos tales como LD12 y *Betaproteobacteria* continuarían el proceso de degradación dado que el metabolismo de estos grupos se ha relacionado principalmente con la descomposición de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Malmstrom *et al.*, 2004; Alonso & Pernthaler, 2006; Šimek *et al.*, 2010). Como resultado de la degradación de la materia orgánica la concentración de oxígeno disuelto es abatida y el  $CO_2$  es generado como producto residual.

El florecimiento de *Nodularia* es crucial para el desarrollo de la comunidad biológica del lago pues es a través de los heterocistes de esta cianobacteria que se fija nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) que posteriormente será liberado en el sistema por efecto de la lisis celular. Este amonio será utilizado en la zona oxigenada por las bacterias nitrificantes para producir nitritos ( $NO_2^-$ ) y nitratos ( $NO_3^-$ ) por bacterias de los grupos *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* como se ha visto en otros lagos sódicos (Sorokin & Kuenen, 2005). En el lago Atexcac, la oxidación del amonio y de los nitritos podría estar siendo realizada principalmente por el grupo *Betaproteobacteria* ya que presentó correlaciones negativas con ambos parámetros.

Los nitratos formados durante la nitrificación serían utilizados como sustrato por las bacterias del género *Paracoccus*, conocido por realizar el proceso de desnitrificación, y que además fue encontrado en altas densidades durante este estudio. El amonio formado en la zona anóxica del sistema podría ser aprovechado por la familia *Planctomycetaceae* para realizar el proceso de oxidación anaerobia del amonio (Anammox) formando  $N_2$  que será removido del sistema por volatilización.

El fósforo en los sistemas de agua dulce (salinidad  $< 3 \text{ g L}^{-1}$ ) suele ser el nutriente limitante (Spivakov *et al.*, 1999), sin embargo, en los lagos sódicos este elemento se encuentra en grandes concentraciones (Kharaka *et al.*, 1984). Durante la temporada de lluvias (de agosto a septiembre) una gran cantidad de materia orgánica y terrígenos son acarreados hasta el lago, de esta manera se incorpora una alta concentración de fósforo particulado cuya fracción soluble (FSR) es aprovechado por el fitoplancton, Pcy (PPA) y bacterias heterótrofas. El resto del fósforo particulado es utilizado por las bacterias del filo *Bacteroidetes* que han sido relacionadas directamente con la degradación de material particulado (células y compuestos orgánicos complejos) (Rosselló-Mora *et al.*, 1999). Esto se puede asociar con el incremento de la densidad de este grupo durante el mes de octubre, ya que corresponde con la temporada de lluvias e implica una mayor cantidad de material particulado en el sistema. El fósforo en el agua es acumulado por los organismos, reciclado por los heterótrofos y reincorporado en la columna de agua durante la mezcla.

Uno de los procesos de mayor importancia en los lagos sódicos es la reducción de compuestos oxidados de azufre (Sorokin *et al.*, 2010) ya que la elevada concentración de sulfatos y la salinidad (que suprime la actividad de las bacterias metanogénicas) favorecen la presencia de un ciclo biogeoquímico del azufre muy activo (Ryu *et al.*, 2004; Waldron *et al.*, 2007). Aunque los estudios sobre las BSR son escasos en lagos sódicos (Sorokin *et al.*, 2011), se sabe que las que se encuentran en esos sistemas son del grupo *Desulfovibrionales*, que realizan la reducción completa del sulfato ( $SO_4^- \rightarrow H_2S$ ) y que no tienen la capacidad de reducir azufre elemental (Sorokin *et al.*, 2014). La oxidación del azufre es realizada por algunos géneros de la clase *Gammaproteobacteria* en la zona oxigenada de los lagos (Sorokin *et al.*, 2014) y se considera que la reducción del azufre se lleva a cabo en la zona anóxica, dado que un bajo potencial redox favorece la reacción. Sin embargo la distribución de las BSR en el lago Atexcac no estuvo limitada al hipolimnion lo que corresponde con lo encontrado en otros sistemas (Hernández-Avilés *et al.*, 2010; Bryukhanov *et al.*, 2011; Hesham & Alamri, 2012). Por otra parte, Hesham & Alamri (2012) detectaron bacterias

reductora del azufre en un medio aerobio mediante FISH y en este estudio se detectaron con CARD-FISH, al tener detección positiva de los organismos con esta técnicas se puede decir que estas bacterias eran metabólicamente activas. Esto indica que el ciclo del azufre en el lago no está delimitado por la concentración de oxígeno del medio y que las BSR en este sistema poseen características que les permiten realizar sus procesos metabólicos sin ser afectados por la concentración de oxígeno. El descenso en la concentración de sulfatos durante el fenómeno de emblanquecimiento podría responder a una mayor actividad de las BSR. Sin embargo la reducción de sulfatos no está ligada a la densidad de BSR y el incremento en la reducción de sulfatos se ha relacionado principalmente con la densidad del grupo *Cytophaga-Flavobacteria* (Rosselló-Mora et al., 1999), agrupado dentro del filo *Bacteroidetes*.

### **El fenómeno de emblanquecimiento en el Lago Atexcac**

Riding (2000), reporta que la nucleación de carbonatos puede ser realizada igualmente por bacterias autotróficas y heterotróficas. En este estudio, el florecimiento de PPA durante el fenómeno de emblanquecimiento coloca al PPA como el presunto grupo responsable de la precipitación de carbonatos. Este florecimiento coincidió también con el máximo de la dureza temporal (Figura 17).

El carbonato de calcio forma parte de la dureza temporal y los picos en la concentración de esta sal se han explicado por la actividad del PPA (Dittrich & Obst, 2004). La asociación entre el PPA y la precipitación radica en la remoción de CO<sub>2</sub> por efecto de la fotosíntesis. Kosamu & Obst (2009) mencionan que no existe una relación química directa entre la fotoasimilación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y la precipitación de carbonatos, pues demostraron experimentalmente que las alteraciones en el microambiente debidas a la fotosíntesis no tuvieron ningún efecto sobre la nucleación. De manera similar, durante un fenómeno de emblanquecimiento en el Mar Mediterráneo se observó que las partículas en suspensión no correspondían a ninguna estructura de origen biológico y se concluyó que los florecimientos algales desencadenan la precipitación inorgánica de carbonatos (Sondi & Juračić, 2010). La precipitación inorgánica requeriría de condiciones físico-químicas favorables como un incremento en la temperatura y una mayor actividad iónica (concentración de sales debida a la temperatura) (Kienel *et al.*, 2009); por lo cual, el emblanquecimiento del Mar Mediterráneo ocurrió a principios de junio cuando la temperatura superficial era de 25 °C, sin embargo, en Atexcac el emblanquecimiento se dio durante el mes de septiembre, bajo una temperatura superficial de 19.5 °C. Esto apunta a que la precipitación de carbonatos en Atexcac ocurre como consecuencia de la actividad biológica y sería poco probable que sucediera de forma inorgánica.

Un escenario que explicaría el fenómeno de emblanquecimiento en Atexcac como un proceso inorgánico se basa en la fuente de calcio que podría detonar la precipitación. El radio de evaporación-precipitación que domina en la región donde se sitúa el lago Atexcac favorece la concentración de sales mientras que la fuente de calcio en estos lagos podría ser principalmente el manto acuífero. El nivel de agua de los lagos de esta región se mantiene principalmente por influjos del manto acuífero (Alcocer *et al.*, 2005). A este respecto, de acuerdo con la sedimentología del lago Atexcac (Carrasco-Núñez *et al.*, 2007), el agua proveniente del manto

acuífero podría contener una alta cantidad de calcio. Dado que el fenómeno de emblanquecimiento ocurrió en plena temporada de lluvias, un influjo importante de agua del manto acuífero es muy probable. Esta teoría estaría apoyada además con el incremento de la abundancia de arqueas durante el fenómeno de emblanquecimiento, que se contraponen con la participación de estos organismos en la precipitación de carbonatos en consorcios microbianos donde su densidad y diversidad es prácticamente nula (Couradeau *et al.*, 2011) y se ha observado que del 1-20 % de la abundancia total de la comunidad procarionte en agua subterránea corresponde a arqueas (Wilhartitz *et al.*, 2007). Esto explicaría la correlación negativa de este dominio con una gran cantidad de parámetros físico-químicos y nutrientes del sistema, pues implicarían condiciones ajenas a su ambiente natural.

La alternativa más probable es que las condiciones para que se lleve a cabo la precipitación de carbonatos en Atexcac son inducidas por la comunidad heterotrófica y la nucleación es realizada por la componente autotrófica. La reducción de sulfatos, la reducción del nitrato y el proceso de amonificación así como la liberación de amonio resultante de la descomposición aerobia de aminoácidos contribuyen significativamente al incremento de la alcalinidad (Arp *et al.*, 1999). Dentro del intervalo de pH registrado en este estudio, la disponibilidad de CO<sub>2</sub> en el lago sería nula o mínima, si bien, el PPA no realiza la nucleación cuando tiene suficiente CO<sub>2</sub> (Kosamu & Obst, 2009). Bajo estas condiciones de pH, las Pmys pueden aprovechar los bicarbonatos como una estrategia para obtener CO<sub>2</sub> (Riding, 2006). Como se mencionó anteriormente, la remoción de bicarbonatos libera carbonatos en el medio circundante de la célula y este reacciona con el calcio desencadenando la nucleación. El calcio que se encuentra en baja concentración en los lagos sódicos puede ser atrapado en el mucilago bacteriano formado por polímeros (extracellular polymeric substances EPS, por sus siglas en inglés) con cargas negativas que son afines a los cationes polivalentes como el calcio Ca<sup>2+</sup> y el magnesio Mg<sup>2+</sup> (Obst *et al.*, 2009). La degradación de los EPS juega un papel de mayor importancia que la misma bacteria en la precipitación de carbonatos según Spadafora *et al.* (2010), pues a partir de su degradación se forman nanoglóbulos que funcionan como centros de nucleación y constituyen la primer etapa para la formación del carbonato mineral, y en cierto punto la célula misma se convierte en el centro de reacción (Couradeau *et al.*, 2011). Asimismo, se propone que la reducción de sulfatos no tiene un efecto significativo sobre la precipitación de CaCO<sub>3</sub>, ya que la presencia de BSR puede favorecer la nucleación pero la presencia de bacterias muertas tiene un efecto similar e incluso mayor que el de las bacterias metabólicamente activas (Bosak & Newman, 2003).

El procarioplankton del lago Atexcac mostró una estructura cambiante durante el periodo de estudio, a lo largo de este análisis se han propuesto las relaciones principales de los diferentes taxa bacterianos en la dinámica del lago antes durante y después del evento de emblanquecimiento. Realizar estudios más finos apuntando al metabolismo bacteriano y al análisis de partículas durante el fenómeno de emblanquecimiento podrían revelar nuevas claves para el entendimiento completo de este proceso; tal como el papel del silicio en la formación de distintas estructuras cristalinas de carbonato de calcio y magnesio (García Ruiz, 1998). La gran diversidad bacteriana detectada mediante CARD-FISH y las relaciones funcionales encontradas entre los

diferentes tipos de bacterias y las variables limnológicas corroboran la importancia de los lagos sódicos como ambientes únicos para el estudio de la comunidad procarionte y su relación con los ciclos biogeoquímicos. El estudio del fenómeno de emblanquecimiento podría ofrecer información sobre las rutas de formación de sedimentos calcáreos en el océano, las condiciones químicas del océano primigenio y los efectos del calentamiento global. Esto último gracias a la gran cantidad de procesos biológicos y físico-químicos con los que se relaciona este fenómeno.

## CONCLUSIONES

La comunidad bacteriana del lago está constituida principalmente por el dominio *Bacteria* mientras que el aporte del dominio *Archaea*, aunque constante, fue mínimo excepto durante el evento de emblanquecimiento.

A lo largo de este estudio, el metalimnion albergó una mayor densidad de los taxa relacionados con el metabolismo del nitrógeno. Sin embargo, la mayor diversidad y densidad de bacterias se encontró en el epi e hipolimnion, debido al contraste en las características de temperatura y oxígeno disuelto, propias de cada estrato, y a las relaciones de los diferentes tipos de bacterias con los productores primarios y la materia orgánica en decaimiento que generó la formación de dos nichos ecológicos distintos en el mismo sistema.

En el lago Atexcac la actividad biológica es la causa principal del reciclado de nutrientes, el fósforo y una fracción del carbono son incorporados desde la cuenca de captación por efecto de la precipitación pluvial mientras que el nitrógeno y el CO<sub>2</sub> son incorporados al lago desde la atmósfera. El florecimiento de *Nodularia* es crucial para el desarrollo de los organismos en el lago pues esta cianobacteria incorpora materia orgánica al sistema que es aprovechada por bacterias heterotróficas cuya actividad hidrolítica libera el nitrógeno atmosférico fijado previamente por *Nodularia* y produce CO<sub>2</sub> completando así el ciclo de carbono en el lago.

Durante el fenómeno de emblanquecimiento la fracción heterotrófica de la comunidad procarionte es dominante, aunque el filo Cyanobacteria es el taxón más abundante. El florecimiento de cianobacterias (PPA) que fue observado en el epilimnion del lago durante el mes de septiembre juega un papel fundamental en el fenómeno de emblanquecimiento formando exopolímeros que permiten que la nucleación se lleve a cabo en la superficie de la célula y consumiendo el FSR que tiene un efecto inhibitor de la precipitación.

En Atexcac, el fenómeno de emblanquecimiento sucedió a una temperatura superficial de 19.5 °C durante la temporada de lluvias. Esto apunta a que la precipitación de carbonatos en el sistema ocurre como consecuencia de la actividad biológica y no de forma inorgánica. El incremento del pH, la alcalinidad y la concentración de calcio son resultado de la actividad metabólica de diferentes bacterias, estas condiciones propician la ocurrencia del fenómeno de emblanquecimiento tomando la superficie de bacterias autotróficas y heterotróficas como el sitio donde tiene lugar la nucleación.

### Literatura citada:

- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., & W.E.F. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22 ed. American Public Health Association.
- Adame M.F., Alcocer J., & Escobar E., 2008. Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology* 53:22-31.
- Adrian R., O'reilly C.M., Zagarese H., Baines S.B., Hessen D.O., Keller W., Livingstone D.M., Sommaruga R., Straile D., Van Donk E., Weyhenmeyer G.A., & Winder M., 2009. Lakes as sentinels of climate change. *Limnology and Oceanography* 54:2283-2297.
- Alcocer J., Escolero F., & Marín L.E. 2005. Problemática del agua de la Cuenca Oriental, estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala, p. 57-77. En: B. Jiménez, & L.E. Marín (eds.), *El agua en México vista desde la academia*. Academia Mexicana de Ciencias.
- Alcocer J., Ruiz-Fernández A.C., Escobar E., Pérez-Bernal L.H., Oseguera L.A., & Ardiles-Gloria V., 2014. Deposition, burial and sequestration of carbon in an oligotrophic, tropical lake. *Journal of Limnology* 73(2):223-235.
- Aloisi G., 2008. The calcium carbonate saturation state in cyanobacterial mats throughout Earth's history. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72:6037-6060.
- Alonso C., & Pernthaler J., 2006. Roseobacter and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology* 8:2022-2030.
- Allgaier M., & Grossart H.-P., 2006. Diversity and Seasonal Dynamics of Actinobacteria Populations in Four Lakes in Northeastern Germany. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5):3489-3497.
- Amann R., & Fuchs B.M., 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology* 6:339-348.
- Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., & Stahl D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1919-1925.
- Ardiles V., Alcocer J., Vilaclara G., Oseguera L., & Velasco L., 2012. Diatom fluxes in a tropical, oligotrophic lake dominated by large-sized phytoplankton. *Hydrobiologia* 679:77-90.
- Arellano J., & Gonzáles E. 2011. Dinámica espacio-temporal del picoplancton procarionte y su relación con la variabilidad limnológica del lago volcánico Atexcac, Puebla. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Armienta M.A., Vilaclara G., De La Cruz-Reyna S., Ramos S., Cenicerros N., Cruz O., Aguayo A., & Arcega-Cabrera F., 2008. Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178:249-258.
- Arp G., Reimer A., & Reitner J., 1999. Calcification in cyanobacterial biofilms of alkaline salt lakes. *European Journal of Phycology* 34:393-403.
- Arredondo-Figueroa J.L., Borrego-Enríquez L., Castillo-Domínguez R., & Valladolid-Laredo M., 1983. Batimetría y morfometría de los lagos "maars" de la cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biótica* 8:37-47.
- Azam F., Fenchel T., Field J., Gray J., Meyer-Reil L., & Thingstad F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series*. Oldendorf 10:257-263.
- Bahr M., Hobbie J., & Sogin M., 1996. Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR 11 cluster. *Aquatic Microbial Ecology* 11:271-277.
- Bathurst R.G. 1975. *Development in sedimentology 12: carbonate Sediments and their diagenesis*. Elsevier Science, Inc.
- Battin T.J., Luysaert S., Kaplan L.A., Aufdenkampe A.K., Richter A., & Tranvik L.J., 2009. The boundless carbon cycle. *Nature Geoscience* 2:598-600.

- Biers E.J., Sun S., & Howard E.C., 2009. Prokaryotic Genomes and Diversity in Surface Ocean Waters: Interrogating the Global Ocean Sampling Metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* 75:2221-2229.
- Bosak T., & Newman D.K., 2003. Microbial nucleation of calcium carbonate in the Precambrian. *Geology* 31:577-580.
- Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., & Forterre P., 2008. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6:245-252.
- Brümmer I.H.M., Felske A.D.M., & Wagner-Döbler I., 2004. Diversity and Seasonal Changes of Uncultured Planctomycetales in River Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 70:5094-5101.
- Bryukhanov A., Korneeva V., Kanapatskii T., Zakharova E., Men'ko E., Rusanov I., & Pimenov N., 2011. Investigation of the sulfate-reducing bacterial community in the aerobic water and chemocline zone of the Black Sea by the fish technique. *Microbiology* 80:108-116.
- Bundeleva I.A., Shirokova L.S., Bénézech P., Pokrovsky O.S., Kompantseva E.I., & Balor S., 2012. Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemical Geology* 291:116-131.
- Callieri C., Coci M., Corno G., Macek M., Modenutti B., Balseiro E., & Bertoni R., 2013. Phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 85:293-301.
- Callieri C., Corno G., Caravati E., Galafassi S., Bottinelli M., & Bertoni R., 2007. Photosynthetic characteristics and diversity of freshwater *Synechococcus* at two depths during different mixing conditions in a deep oligotrophic lake. *Journal of Limnology* 66:81-89.
- Callieri C., Corno G., Caravati E., Rasconi S., Contesini M., & Bertoni R., 2009. Bacteria, Archaea, and Crenarchaeota in the epilimnion and hypolimnion of a deep holo-oligotrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7298-7300.
- Callieri C., Hernández-Avilés S., Salcher M., Fontaneto D., & Bertoni R., 2015. Distribution patterns and environmental correlates of Thaumarchaeota abundance in six deep subalpine lakes. *Aquatic Sciences* 1:1-11.
- Callieri C., & Stockner J.G., 2000. Picocyanobacteria success in oligotrophic lakes: fact or fiction? *Journal of Limnology* 59:72-76.
- Callieri C., & Stockner J.G., 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology* 61:1-14.
- Camacho A., Miracle M.R., & Vicente E., 2003. Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. *Archiv für Hydrobiologie* 157:321-338.
- Carlson C.A., Morris R., Parsons R., Treusch A.H., Giovannoni S.J., & Vergin K., 2008. Seasonal dynamics of SAR11 populations in the euphotic and mesopelagic zones of the northwestern Sargasso Sea. *ISME Journal* 3:283-295.
- Carrasco-Núñez G., Ort M.H., & Romero C., 2007. Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 159:179-197.
- Casamayor E.O., 2010. Diversidad bacteriana en lagos de alta montaña: Biogeografía y mecanismos de dispersión por aerosoles atmosféricos en el contexto del cambio global. *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales* 1:77-90.
- Cole J.J., 1999. Aquatic microbiology for ecosystem scientists: new and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems* 2:215-225.
- Cole J.J., Prairie Y.T., Caraco N.F., McDowell W.H., Tranvik L.J., Striegl R.G., Duarte C.M., Kortelainen P., Downing J.A., Middelburg J.J., & Melack J., 2007. Plumbing the Global

- Carbon Cycle: Integrating Inland Waters into the Terrestrial Carbon Budget. *Ecosystems* 10:172-185.
- Cook P.L., & Holland D.P., 2012. Long term nutrient loads and chlorophyll dynamics in a large temperate Australian lagoon system affected by recurring blooms of cyanobacteria. *Biogeochemistry* 107:261-274.
- Cotner J.B., & Biddanda B.A., 2002. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5:105-121.
- Cottrell M.T., & Kirchman D.L., 2000. Natural Assemblages of Marine Proteobacteria and Members of the Cytophaga-Flavobacter Cluster Consuming Low- and High-Molecular-Weight Dissolved Organic Matter. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1692-1697.
- Couradeau E., Benzerara K., Gérard E., Estève I., Moreira D., Tavera R., & López-García P., 2013. Cyanobacterial calcification in modern microbialites at the submicrometer scale. *Biogeosciences* 10:5255-5266.
- Couradeau E., Benzerara K., Gérard E., Moreira D., Bernard S., Brown G.E., & López-García P., 2012. An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. *Science* 336:459-462.
- Couradeau E., Benzerara K., Moreira D., Gérard E., Kaźmierczak J., Tavera R., & López-García P., 2011. Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE* 6:e28767.
- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.-H., & Wagner M., 1999. The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all Bacteria: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. *Systematic and Applied Microbiology* 22:434-444.
- Delille D., Marty G., Cansemi-Soullard M., & Frankignoulle M., 1997. Influence of subantarctic Macrocytis bed metabolism in diel changes of marine bacterioplankton and CO<sub>2</sub> fluxes. *Journal of Plankton Research* 19:1251-1264.
- Dittrich M., & Obst M., 2004. Are picoplankton responsible for calcite precipitation in lakes? *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 33:559-564.
- Downing J.A., Prairie Y.T., Cole J.J., Duarte C.M., Tranvik L.J., Striegl R.G., Mcdowell W.H., Kortelainen P., Caraco N.F., Melack J.M., & Middelburg J.J., 2006. The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnology and Oceanography* 51:2388-2397.
- Ducklow H., 2000. Bacterial production and biomass in the oceans. *Microbial Ecology of the Oceans* 1:85-120.
- Ehrlich H.L., 1998. Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews* 45:45-60.
- Eiler A., & Bertilsson S., 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology* 6:1228-1243.
- Eiler A., Langenheder S., Bertilsson S., & Tranvik L.J., 2003. Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3701-3709.
- Eiler A., Olsson J.A., & Bertilsson S., 2006. Diurnal variations in the auto- and heterotrophic activity of cyanobacterial phycospheres (*Gloeotrichia echinulata*) and the identity of attached bacteria. *Freshwater Biology* 51:298-311.
- Falcón L., Escobar-Briones E., & Romero D., 2002. Nitrogen fixation patterns displayed by cyanobacterial consortia in Alchichica crater-lake, Mexico. *Hydrobiologia* 467:71-78.
- Falkowski P.G., 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research* 39:235-258.
- Fuerst J., 2004. Planctomycetes: a phylum of emerging interest for microbial evolution and ecology. *World Federation for Culture Collections Newsletter* 38:1-11.

- García Ruiz J., 1998. Carbonate precipitation into alkaline silica-rich environments. *Geology* 26:843-846.
- Garrity G.M., Bell J.A., & Lilburn T.G., 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- Geilfus N.X., Carnat G., Dieckmann G.S., Halden N., Nehrke G., Papakyriakou T., Tison J.L., & Delille B., 2013. First estimates of the contribution of CaCO<sub>3</sub> precipitation to the release of CO<sub>2</sub> to the atmosphere during young sea ice growth. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 118:244-255.
- Ghai R., Mizuno C.M., Picazo A., Camacho A., & Rodriguez-Valera F., 2013. Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Scientific reports* 3(2471):1-8.
- Ghai R., Mizuno C.M., Picazo A., Camacho A., & Rodriguez-Valera F., 2014. Key roles for freshwater Actinobacteria revealed by deep metagenomic sequencing. *Molecular Ecology* 23:6073-6090.
- Ghai R., Rodriguez-Valera F., McMahon K.D., Toyama D., Rinke R., Cristina Souza De Oliveira T., Wagner Garcia J., Pellon De Miranda F., & Henrique-Silva F., 2011. Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. *PLoS ONE* 6:e23785.
- Glöckner F.O., Fuchs B.M., & Amann R., 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology* 65:3721-3726.
- Glöckner F.O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A., & Amann R., 2000. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66:5053-5065.
- Gounot A.M., & Russell N.J. 1999. Physiology of cold-adapted microorganisms, p. 33-55. En: R. Margesin, & F. Schinner (eds.), *Cold-Adapted Organisms*. Springer Berlin Heidelberg.
- Grant W., 2006. Alkaline environments and biodiversity. *Extremophiles*. Oxford, UK: UNESCO, Eolss Publishers.
- Grant W., & Sorokin D. 2011. Distribution and Diversity of Soda Lake Alkaliphiles, p. 27-54. En: K. Horikoshi (ed.), *Extremophiles Handbook*. Springer Japan.
- Heissenberger A., Leppard G.G., & Herndl G.J., 1996. Relationship between the Intracellular Integrity and the Morphology of the Capsular Envelope in Attached and Free-Living Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4521-4528.
- Hernandez-Avilés J.S., Bertoni R., Macek M., & Callieri C., 2012. Why bacteria are smaller in the epilimnion than in the hypolimnion? A hypothesis comparing temperate and tropical lakes. *Journal of Limnology* 71:104-111.
- Hernández-Avilés J.S., Macek M., Alcocer J., López-Trejo B., & Merino-Ibarra M., 2010. Prokaryotic picoplankton dynamics in a warm-monomictic saline lake: temporal and spatial variation in structure and composition. *Journal of Plankton Research* 32:1301-1314.
- Hesham A.E.-L., & Alamri S.A., 2012. Application of fluorescence in situ hybridization(FISH) to the analysis of sulfate reducing bacterial community in an oily bench scale reactor. *African Journal of Biotechnology* 11:10221-10226.
- Higgins J.A., Fischer W.W., & Schrag D.P., 2009. Oxygenation of the ocean and sediments: Consequences for the seafloor carbonate factory. *Earth and Planetary Science Letters* 284:25-33.
- Hodell D.A., Schelske C.L., Fahnenstiel G.L., & Robbins L.L., 1998. Biologically induced calcite and its isotopic composition in Lake Ontario. *Limnology and Oceanography* 43:187-199.

- Holland D.P., Van Erp I., Beardall J., & Cook P.L., 2012. Environmental controls on the nitrogen-fixing cyanobacterium *Nodularia spumigena* in a temperate lagoon system in SE Australia. *Marine Ecology Progress Series* 461:47-57.
- Holland H.D. 1984. *The chemical evolution of the atmosphere and oceans*. Princeton University Press.
- Hutalle-Schmelzer K.M.L., Zwirnmann E., Krüger A., & Grossart H.-P., 2010. Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions. *FEMS Microbiology Ecology* 72:58-73.
- Janse I., Zwart G., Van Der Maarel M.J., & Gottschal J., 2000. Composition of the bacterial community degrading *Phaeocystis* mucopolysaccharides in enrichment cultures. *Aquatic Microbial Ecology* 22:119-133.
- Jiang H., Dong H., Yu B., Lv G., Deng S., Berzins N., & Dai M., 2009. Diversity and Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Qinghai Lake, Northwestern China. *Geomicrobiology Journal* 26:199-211.
- Jiao N., Herndl G.J., Hansell D.A., Benner R., Kattner G., Wilhelm S.W., Kirchman D.L., Weinbauer M.G., Luo T., Chen F., & Azam F., 2010. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat Rev Micro* 8:593-599.
- Jones B.E., Grant W.D., Duckworth A.W., & Owenson G.G., 1998. Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2:191-200.
- Jones R.I., Grey J., Quarmby C., & Sleep D., 2001. Sources and fluxes of inorganic carbon in a deep, oligotrophic lake (Loch Ness, Scotland). *Global Biogeochemical Cycles* 15:863-870.
- Jürgens K., & Jeppesen E., 2000. The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake. *Journal of Plankton Research* 22:1047-1070.
- Karner M.B., Delong E.F., & Karl D.M., 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409:507-510.
- Kaźmierczak J., Kempe S., Kremer B., López-García P., Moreira D., & Tavera R., 2011. Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies* 57:543-570.
- Kharaka Y.K., Robinson S.W., Law L.M., & Carothers W.W., 1984. Hydrogeochemistry of Big Soda Lake, Nevada: an alkaline meromictic desert lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48:823-835.
- Kienel U., Bowen S., Byrne R., Park J., Böhnelt H., Dulski P., Luhr J., Siebert L., Haug G., & Negendank J.W., 2009. First lacustrine varve chronologies from Mexico: impact of droughts, ENSO and human activity since AD 1840 as recorded in maar sediments from Valle de Santiago. *J Paleolimnol* 42:587-609.
- Kirchman D.L., 2002. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* 39:91-100.
- Kondratyev K.Y., & Varotsos C., 1995. Atmospheric greenhouse effect in the context of global climate change. *Il Nuovo Cimento C* 18:123-151.
- Kosamu I.B.M., & Obst M., 2009. The influence of picocyanobacterial photosynthesis on calcite precipitation. *International Journal of Environmental Science & Technology* 6:557-562.
- Kowalchuk G.A., Stephen J.R., De Boer W., Prosser J.I., Embley T.M., & Woldendorp J.W., 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1489-1497.
- Küchler-Krischun J., & Kleiner J., 1990. Heterogeneously nucleated calcite precipitation in Lake Constance. A short time resolution study. *Aquatic Sciences* 52:176-197.

- Lagunas M., & Martínez J. 2015. Estructura de la comunidad del plancton procarionte en el lago volcánico, hiposalino y monomítico cálido Atexcac, Puebla. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Lanzen A., Simachew A., Gessesse A., Chmolowska D., Jonassen I., & Øvreås L., 2013. Surprising prokaryotic and eukaryotic diversity, community structure and biogeography of Ethiopian soda lakes. *PLoS ONE* 8:e72577.
- Lapage S.P., Sneath P.H., Lessel E.F., Skerman V., Seeliger H., & Clark W. 1992. International code of nomenclature of bacteria: bacteriological code, 1990 revision. ASM Press.
- Lemarchand C., Jardillier L., Carrias J.-F., Richardot M., Debroas D., Sime-Ngando T., & Amblard C., 2006. Community composition and activity of prokaryotes associated to detrital particles in two contrasting lake ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* 57:442-451.
- Lewis W.M., 1983. A revised classification of lakes based on mixing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40:1779-1787.
- Lin Y.-P., & Singer P.C., 2006. Inhibition of calcite precipitation by orthophosphate: Speciation and thermodynamic considerations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70:2530-2539.
- Loferer-Krößbacher M., Klima J., & Psenner R., 1998. Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 64:688-694.
- Malmstrom R.R., Kiene R.P., Cottrell M.T., & Kirchman D.L., 2004. Contribution of SAR11 Bacteria to Dissolved Dimethylsulfoniopropionate and Amino Acid Uptake in the North Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4129-4135.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., & Schleifer K.-H., 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142:1097-1106.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., & Schleifer K.-H., 1992. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15:593-600.
- Margalef R. 1983. *Limnología*. Omega Barcelona.
- Martinez R.E., Gardés E., Pokrovsky O.S., Schott J., & Oelkers E.H., 2010. Do photosynthetic bacteria have a protective mechanism against carbonate precipitation at their surfaces? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74:1329-1337.
- Melack J.M., 2009. Diel variability and community metabolism in African soda lakes. *Natural Resources and Environmental Issues* 15:153-160.
- Melack J.M., & Kilham P., 1974. Photosynthetic rates of phytoplankton in East African alkaline, saline lakes. *Limnology and Oceanography* 19:743-755.
- Morris R.M., Rappe M.S., Connon S.A., Vergin K.L., Siebold W.A., Carlson C.A., & Giovannoni S.J., 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420:806-810.
- N.A.S.A. 2015. NASA, NOAA Find 2014 Warmest Year in Modern Record, p. <https://www.nasa.gov/press/2015/january/nasa-determines-2014-warmest-year-in-modern-record>. In K. Northon [ed.].
- Neef A. 1997. Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Tesis doctoral. Technische Universität München.
- Neef A., Amann R., Schlesner H., & Schleifer K.-H., 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144:3257-3266.

- Neef A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Lemmer H., & Schleifer K.H., 1996. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4329-4339.
- Newton R.J., Jones S.E., Eiler A., McMahon K.D., & Bertilsson S., 2011. A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75:14-49.
- Newton R.J., Jones S.E., Helmus M.R., & McMahon K.D., 2007. Phylogenetic Ecology of the Freshwater Actinobacteria *aci* Lineage. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7169-7176.
- Nyström T., Olsson R.M., & Kjelleberg S., 1992. Survival, stress resistance, and alterations in protein expression in the marine vibrio sp. strain S14 during starvation for different individual nutrients. *Applied and Environmental Microbiology* 58:55-65.
- Obst M., Wehrli B., & Dittrich M., 2009. CaCO<sub>3</sub> nucleation by cyanobacteria: laboratory evidence for a passive, surface-induced mechanism. *Geobiology* 7:324-347.
- Oliva M.G., Lugo A., Alcocer J., Peralata L., & Oseguera L.A., 2009. Planktonic bloom-forming *Nodularia* in the saline Lake Alchichica, Mexico. *Natural Resources and Environmental Issues* 15:121-126.
- Otsuki A., & Wetzel R.G., 1974. Calcium and total alkalinity budgets and calcium-carbonate precipitation of a small hard-water lake. *Archiv für Hydrobiologie* 73:14-30.
- Parte A.C., 2013. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research* 41:1-4.
- Pernthaler A., Pernthaler J., & Amann R., 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3094-3101.
- Piqueras M., 2010. International Symposium “The Microbe’s Contribution to Biology”, Fundación Ramon Areces, Barcelona, April 27–28, 2006. *International Microbiology* 9:151-153.
- Pizzetti I., Fuchs B.M., Gerdt G., Wichels A., Wiltshire K.H., & Amann R., 2011. Temporal Variability of Coastal Planctomycetes Clades at Kabeltonne Station, North Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 77:5009-5017.
- Posch T., Loferer-Krossbacher M., Gao G., Alfreider A., Pernthaler J., & Psenner R., 2001. Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. *Aquatic Microbial Ecology* 25:55-63.
- Pouliot J., Galand P.E., Lovejoy C., & Vincent W.F., 2009. Vertical structure of archaeal communities and the distribution of ammonia monooxygenase A gene variants in two meromictic High Arctic lakes. *Environmental Microbiology* 11:687-699.
- Rabus R., Gade D., Helbig R., Bauer M., Glöckner F.O., Kube M., Schlesner H., Reinhardt R., & Amann R., 2002. Analysis of N-acetylglucosamine metabolism in the marine bacterium *Pirellula* sp. strain 1 by a proteomic approach. *PROTEOMICS* 2:649-655.
- Rappe M.S., Connon S.A., Vergin K.L., & Giovannoni S.J., 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418:630-633.
- Raven J., 1998. The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Functional Ecology* 12:503-513.
- Reichenbach H. 2006. The Order Cytophagales, p. 549-590. En: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York.
- Riding R., 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial–algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47:179-214.

- Riding R., 2006. Cyanobacterial calcification, carbon dioxide concentrating mechanisms, and Proterozoic–Cambrian changes in atmospheric composition. *Geobiology* 4:299-316.
- Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W., & Schleifer K.-H., 1995. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 141:1267-1267.
- Rosselló-Mora R., Thamdrup B., Schäfer H., Weller R., & Amann R., 1999. The Response of the Microbial Community of Marine Sediments to Organic Carbon Input under Anaerobic Conditions. *Systematic and Applied Microbiology* 22:237-248.
- Ryu J.-H., Dahlgren R.A., Gao S., & Tanji K.K., 2004. Characterization of Redox Processes in Shallow Groundwater of Owens Dry Lake, California. *Environmental Science & Technology* 38:5950-5957.
- Salcher M.M., Pernthaler J., & Posch T., 2011. Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria /'that rule the waves/' (LD12). *ISME Journal* 5:1242-1252.
- Sánchez-Andrea I., Rodríguez N., Amils R., & Sanz J.L., 2011. Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Applied and Environmental Microbiology* 77:6085-6093.
- Schlesinger W.H., Cole J.J., Finzi A.C., & Holland E.A., 2011. Introduction to coupled biogeochemical cycles. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9:5-8.
- Schultze-Lam S., Harauz G., & Beveridge T.J., 1992. Participation of a cyanobacterial S layer in fine-grain mineral formation. *Journal of Bacteriology* 174:7971-7981.
- Sekar R., Pernthaler A., Pernthaler J., Warnecke F., Posch T., & Amann R., 2003. An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2928-2935.
- Shiraishi F., 2012. Chemical conditions favoring photosynthesis-induced CaCO<sub>3</sub> precipitation and implications for microbial carbonate formation in the ancient ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 77:157-174.
- Šimek K., Hornak K., Jezbera J., Nedoma J., Znachor P., Hejzlar J., & Sed'a J., 2008. Spatio-temporal patterns of bacterioplankton production and community composition related to phytoplankton composition and protistan bacterivory in a dam reservoir. *Aquatic Microbial Ecology* 51:249-262.
- Šimek K., Kasalický V., Jezbera J., Jezberová J., Hejzlar J., & Hahn M.W., 2010. Broad Habitat Range of the Phylogenetically Narrow R-BT065 Cluster, Representing a Core Group of the Betaproteobacterial Genus *Limnohabitans*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:631-639.
- Sondi I., & Juračić M., 2010. Whiting events and the formation of aragonite in Mediterranean Karstic Marine Lakes: new evidence on its biologically induced inorganic origin. *Sedimentology* 57:85-95.
- Sorokin D., Banciu H., Robertson L., & Kuenen J.G. 2006. Haloalkaliphilic Sulfur-Oxidizing Bacteria, p. 969-984. En: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York.
- Sorokin D.Y., Berben T., Melton E.D., Overmars L., Vavourakis C.D., & Muyzer G., 2014. Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles* 18:791-809.
- Sorokin D.Y., & Kuenen J., 2005. Alkaliphilic chemolithotrophs from sodas lakes. *FEMS Microbiol Ecology* 52:287-295.
- Sorokin D.Y., Kuenen J.G., & Muyzer G., 2011. The Microbial Sulfur Cycle at Extremely Haloalkaline Conditions of Soda Lakes. *Frontiers in Microbiology* 2(44):1-16.

- Sorokin D.Y., Rusanov I.I., Pimenov N.V., Tourova T.P., Abbas B., & Muyzer G., 2010. Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions in soda lakes of Kulunda Steppe (Altai, Russia). *FEMS Microbiology Ecology* 73:278-290.
- Spadafora A., Perri E., Mckenzie J.A., & Vasconcelos C., 2010. Microbial biomineralization processes forming modern Ca:Mg carbonate stromatolites. *Sedimentology* 57:27-40.
- Spivakov B.Y., Maryutina T., & Muntau H., 1999. Phosphorus speciation in water and sediments. *Pure and Applied Chemistry* 71:2161-2176.
- Stahl D., & Amann R. 1991. Development and application of nucleic acid probes, p. 205-248. En: E. Stackebrandt, & M. Goodfellow (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley & Sons.
- Tadonlécé R.D., 2007. Strong coupling between natural Planctomycetes and changes in the quality of dissolved organic matter in freshwater samples. *FEMS Microbiology Ecology* 59:543-555.
- Teira E., Reinthaler T., Pernthaler A., Pernthaler J., & Herndl G.J., 2004. Combining Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization and Microautoradiography To Detect Substrate Utilization by Bacteria and Archaea in the Deep Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4411-4414.
- Thompson J. 2000. Microbial Whitings, p. 250-260. En: R. Riding, & S. Awramik (eds.), *Microbial Sediments*. Springer Berlin Heidelberg.
- Thompson J.B., Schultze-Lam S., Beveridge T.J., & Des Marais D.J., 1997. Whiting events: Biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnology and Oceanography* 42:133-141.
- Tiodjio R.E., Sakatoku A., Nakamura A., Tanaka D., Fantong W.Y., Tchakam K.B., Tanyileke G., Ohba T., Hell V.J., Kusakabe M., Nakamura S., & Ueda A., 2014. Bacterial and archaeal communities in Lake Nyos (Cameroon, Central Africa). *Scientific Reports* 4:6151.
- Tranvik L.J., Downing J.A., Cotner J.B., Loiselle S.A., Striegl R.G., Ballatore T.J., Dillon P., Finlay K., Fortino K., Knoll L.B., Kortelainen P.L., Kutser T., Larsen S., Laurion I., Leech D.M., Mccallister S.L., Mcknight D.M., Melack J.M., Overholt E., Porter J.A., Prairie Y., Renwick W.H., Roland F., Sherman B.S., Schindler D.W., Sobek S., Tremblay A., Vanni M.J., Verschoor A.M., Von Wachenfeldt E., & Weyhenmeyer G.A., 2009. Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnology and Oceanography* 54:2298-2314.
- Tribovillard N., Récourt P., & Trentesaux A., 2010. Bacterial calcification as a possible trigger for francolite precipitation under sulfidic conditions. *Comptes Rendus Geoscience* 342:27-35.
- Tripp H.J., Kitner J.B., Schwalbach M.S., Dacey J.W.H., Wilhelm L.J., & Giovannoni S.J., 2008. SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth. *Nature* 452:741-744.
- Urbach E., Vergin K.L., Young L., Morse A., Larson G.L., & Giovannoni S.J., 2001. Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnology and Oceanography* 46:557-572.
- Valdespino-Castillo P.M., Alcántara-Hernández R.J., Alcocer J., Merino-Ibarra M., Macek M., & Falcón L.I., 2014. Alkaline phosphatases in microbialites and bacterioplankton from Alchichica soda lake, Mexico. *FEMS Microbiology Ecology* 90:504-519.
- Van Elsas J.D., Chiurazzi M., Mallon C.A., Elhottová D., Křišťůfek V., & Salles J.F., 2012. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:1159-1164.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., & Van Sinderen D., 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71:495-548.

- Villarreal-Quintero E. 2013. Producción primaria en un lago oligotrófico tropical, p. 322-327. En: F. Paz-Pellat, J. Wong, M. Bazan, & V. Saynes (eds.), Estado Actual del Conocimiento del Ciclo del Carbono y sus Interacciones en México: Síntesis a 2013. Programa Mexicano del Carbono.
- Vissers E.W., Blaga C.I., Bodelier P.L.E., Muyzer G., Schleper C., Sinninghe Damsté J.S., Tourna M., & Laanbroek H.J., 2013. Seasonal and vertical distribution of putative ammonia-oxidizing thaumarchaeotal communities in an oligotrophic lake. *FEMS Microbiol Ecology* 83:515-526.
- Volpi E.V., & Bridger J.M., 2008. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques* 45:385-386.
- Waldron P.J., Petsch S.T., Martini A.M., & Nüsslein K., 2007. Salinity Constraints on Subsurface Archaeal Diversity and Methanogenesis in Sedimentary Rock Rich in Organic Matter. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4171-4179.
- Warnecke F., Sommaruga R., Sekar R., Hofer J.S., & Pernthaler J., 2005. Abundances, Identity, and Growth State of Actinobacteria in Mountain Lakes of Different UV Transparency. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5551-5559.
- Weisse T. 1993. Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems, p. 327-370. *Advances in microbial ecology*. Springer.
- Weller R., Glöckner F.O., & Amann R., 2000. 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for the in situ Detection of Members of the Phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. *Systematic and Applied Microbiology* 23:107-114.
- Wetzel R.G., 2001. *Limnology: Lake and river ecosystems*. Limnology, Academic Press, London:1006.
- Whitman W.B., Coleman D.C., & Wiebe W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:6578-6583.
- Wilhartitz I., Mach R.L., Teira E., Reinthaler T., Herndl G.J., & Farnleitner A.H., 2007. Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water. *Journal of Applied Microbiology* 103:871-881.
- Williamson C.E., Dodds W., Kratz T.K., & Palmer M.A., 2008. Lakes and streams as sentinels of environmental change in terrestrial and atmospheric processes. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6:247-254.
- Woebken D., Teeling H., Wecker P., Dumitriu A., Kostadinov I., Delong E.F., Amann R., & Glockner F.O., 2007. Fosmids of novel marine Planctomycetes from the Namibian and Oregon coast upwelling systems and their cross-comparison with planctomycete genomes. *ISME J* 1:419-435.
- Woese C.R., Kandler O., & Wheelis M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:4576-4579.
- Wu Q.L., Zwart G., Schauer M., Kamst-Van Agterveld M.P., & Hahn M.W., 2006. Bacterioplankton Community Composition along a Salinity Gradient of Sixteen High-Mountain Lakes Located on the Tibetan Plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology* 72:5478-5485.
- Ye W., Liu X., Lin S., Tan J., Pan J., Li D., & Yang H., 2009. The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiology Ecology* 70:263-276.
- Zinger L., Amaral-Zettler L.A., Fuhrman J.A., Horner-Devine M.C., Huse S.M., Welch D.M., Martiny J.B., Sogin M., Boetius A., & Ramette A., 2011. Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS ONE* 6:e24570.

- Zwart G., Crump B.C., Kamst-Van Agterveld M.P., Hagen F., & Han S.-K., 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology* 28:141-155.
- Zweifel U.L., & Hagstrom A., 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Applied and Environmental Microbiology* 61:2180-2185.

Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una persona, aunque estuviera toda ella dedicada al cielo, será insuficiente para investigar una materia tan vasta... Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar.

Séneca (4 a. C. – 65 d. C.), *Cuestiones naturales*, libro 7.