



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y ABUNDANCIA DEL  
PROCARIOPLANCTON DURANTE EL FENÓMENO DE  
EMBLANQUECIMIENTO “WHITING EVENT” EN EL LAGO  
VOLCÁNICO LA PRECIOSA, ESTADO DE PUEBLA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÒLOGO:**

**P R E S E N T A:**

**ARANTZA IVONNE DAW GUERRERO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JUSTO SALVADOR HERNÁNDEZ AVILÉS**

**MÉXICO**

**ABRIL, 2016**

**CIUDAD DE MÉXICO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

“La naturaleza nunca hace nada sin motivo.”

Aristóteles (384-322 a. C.)

***A mis padres:***

Hasta este momento de mi vida sigo en la búsqueda de las palabras correctas para poder agradecerles todo lo que han significado en mi corta vida. Y no solamente darles gracias por haberme apoyado en este camino profesional; también el apoyo en el camino personal y espiritual.

A mi mamá Susana Guerrero por siempre estar disponible para mí. Por esas noches de trabajo, desvelo y enfermedad; siempre estuviste para no dejarme caer.

A mi papá Guillermo Daw por impulsarme a llegar cada día más lejos. Por ser un ejemplo de perseverancia y superación. Por la paciencia infinita. Gracias por confiar en mí.

A ambos; gracias infinitas. Porque jamás bajaron la guardia aun cuando las cosas se complicaban.

Porque ustedes son autores también de este trabajo.

Con amor, Arantza.

## **AGRADECIMIENTOS**

Hay demasiadas personas a las cuales agradecer. Porque de cada una de ellas me he llevado un pedacito que me ha permitido llegar hasta este punto. Así que comenzaré por orden cronológico.

Agradezco a mi familia, que, aunque no estuve demasiado tiempo con ellos, son parte importante de este proyecto llamado vida. En este pequeño grupo donde existen distintos tonos de carácter, pero juntos, funcionan como un todo, como un equilibrio, como mi familia. A mis abuelas, a mi abuelo que nos guía desde lejos, a mi hermana, a mis tíos; en especial a mi tío Toño y todos mis primos.

Agradezco al Dr. Salvador, por brindarme un espacio en su laboratorio y siempre contestar cualquier mínima duda que surgía, siempre con paciencia y pasión por transmitir su conocimiento sin pedir nada a cambio. Por siempre ver las cosas buenas de todas las personas y enseñarnos a colaborar y a trabajar en equipo. Gracias Doctor por brindarme su amistad y confianza.

A mis amiguitos de la preparatoria, porque todo este sueño comenzó ahí, con ustedes. A Carla, Nelly, Lola, Señito, Hot y Cure. Porque en ustedes encontré más que una amistad, son los hermanitos que elegí. Y todas esas aventuras que pasé con ustedes jamás saldrán de mi cabeza. Los quiero.

A mis amigos, colegas y ahora también familia: Alberto, Oscar, Marino, Arturo, Iván, Compi, Sebas, Pato, Raúl, Aline, Sole, Mariell, David, César, Shaid, Chuby, Abi (espero no haber olvidado a nadie) por haberme demostrado esa amistad y apoyo incondicional en clases, proyectos, exámenes, etc.

Quiero agradecer especialmente a Alberto, que ha sido mi compañero, amigo y colega desde el inicio de la carrera. Por siempre recordarme el potencial que hay en mí y mucho de eso fue gracias a ti, por tus consejos, enseñanzas y experiencias. Por esas horas infinitas en el microscopio, por esas noches de trabajo sin dormir, por ser los mejores trabajando en equipo (CARD-FISH Team), por esos debates de artículos, por estar siempre para mí y por ser una de las personas más brillantes que he conocido. Tenemos mucho por delante amigo y grandes cosas nos esperan. Gracias por compartir este trabajo conmigo. Aprovecho para agradecer a tu mami Sra. Elizabeth por el apoyo y paciencia durante todas esas noches de trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme abierto las puertas desde la preparatoria, por el desarrollo académico y personal que he desarrollado durante este tiempo.

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

Gracias a mi director de tesis Dr. Salvador Hernández Avilés, por haberme aceptado en el proyecto de Limnología y por transmitir todo el conocimiento necesario para la realización de este trabajo. Así mismo, por siempre alentarme a seguir con futuros proyectos y, además de ser uno de los mejores profesores que tuve en la carrera, por ser un amigo y una de las mejores personas que he conocido.

Al equipo del laboratorio de Limnoecología de FES Zaragoza por su apoyo en campo, durante la toma de muestras y el procesamiento de las mismas. Gracias por toda la enseñanza que me brindaron al ingresar al laboratorio.

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 y material 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, Biól. Angélica Elaine González Schaff, Biól. José Luis Guzmán Santiago y M. en C. Jorge Antonio Valdivia Anistro, por los comentarios y revisiones para el mejoramiento 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 .....	6
OBJETIVOS .....	7
Objetivo general .....	7
Objetivos particulares.....	7
MÉTODO.....	8
Descripción de la zona de estudio.....	8
Muestreo .....	9
Mediciones <i>in situ</i> .....	9
Diversidad microbiana.....	9
Análisis de nutrientes .....	10
Determinación de la densidad y biomasa del picoplancton autotrófico (PPA) y heterotrófico (PPH).....	10
CARD-FISH .....	11
Fijación y filtración.....	11
Incrustación y pre-tratamiento enzimático .....	11
Hibridación y amplificación de la señal de tiramida.....	11
Conteo de células hibridadas .....	13
Análisis estadístico de datos .....	13
RESULTADOS .....	14
Hidrodinámica .....	14
Parámetros físicos y químicos.....	15
Conductividad y salinidad .....	15
pH.....	16
Dureza total, permanente, temporal y de calcio .....	17
Alcalinidad de bicarbonatos y carbonatos.....	18
Nutrientes.....	20
Fósforo Soluble Reactivo ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) .....	20
Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) .....	20
Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) .....	21
Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ).....	22

Sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ).....	23
Silicatos ( $\text{SiO}_2$ ).....	24
Densidad de picoplancton heterótrofo (PPH).....	25
Densidad de picoplancton autotrófico (PPA) .....	26
Biomasa de picoplancton heterotrófico (PPH) .....	27
Biomasa PPA .....	28
Detección bacteriana mediante la técnica de CARD-FISH .....	30
Dominio <i>Bacteria</i> .....	30
Filo: Proteobacteria.....	31
Filo: <i>Actinobacteria</i> .....	37
Filo: <i>Bacteroidetes</i> .....	37
Filo: <i>Planctomycetes</i> .....	38
Familia: <i>Planctomycetaceae</i> .....	38
Dominio <i>Archaea</i> .....	39
Correlación de variables.....	41
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
Comunidad procarioplantónica mediante CARD-FISH .....	47
El papel de la comunidad procarionte en los ciclos biogeoquímicos.....	52
Ciclo del carbono.....	52
Ciclo del nitrógeno .....	53
Ciclo del azufre.....	53
Ciclo del fósforo.....	53
El fenómeno de emblanquecimiento y la comunidad procarionte .....	54
CONCLUSIONES.....	56
LITERATURA CITADA .....	58

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la composición del picoplancton procarionte del lago la Preciosa, antes, durante y después del fenómeno de emblanquecimiento (“Whiting event”), el cual es un proceso en el que se forman cristales de carbonato de calcio, como resultado de la acción de microorganismos capaces de utilizar bicarbonatos para los procesos de fotosíntesis, lo que provoca una coloración blanquecina en el agua y una disminución en la zona eufótica del sistema. Este fenómeno se presenta en ambientes marinos y en algunos sistemas acuáticos interiores. La frecuencia con la que se presenta el fenómeno de emblanquecimiento se ha relacionado con la comunidad biológica que se encuentra en los sistemas particularmente picocianobacterias y bacterias sulfato reductoras, y se infiere que puede estar relacionado con el calentamiento global al vincularse con el ciclo del carbono.

Por medio de la técnica de biología molecular denominada CARD-FISH se realizó la detección de los taxa bacterianos más importantes presentes en los sistemas lacustres. La comunidad bacteriana estuvo dominada por miembros del dominio *Bacteria*, en su mayoría por organismos de la clase *Alfaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*. Para las densidades de ambas clases se registró una sucesión espacio-temporal debido al cambio del pH y, a su vez, de las alcalinidades de carbonatos y bicarbonatos.

Así mismo, los taxa que fueron identificados se relacionaron con los ciclos biogeoquímicos del sistema. En el ciclo del carbono el picoplancton autotrófico (PPA) es el encargado de la fijación de CO<sub>2</sub> mediante fotosíntesis. Mientras diferentes taxa como *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* y LD12-121 participan en la degradación de la materia orgánica. Por otra parte, clases como *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y el filo *Thaumarchaeota* participan activamente en el ciclo de nitrógeno en condiciones aerobias; por otro lado, organismos de la familia *Planctomycetacea* pueden llevar a cabo la oxidación anaerobia del amonio. En el ciclo del azufre las bacterias sulfato reductoras (BSR) como su nombre lo indica realizan la reducción de más oxidada del azufre en el sistema y la clase *Gammaproteobacteria* utiliza las formas reducidas del azufre como donador de electrones. Finalmente, en el ciclo del fósforo, éste macronutriente es utilizado por la comunidad de PPA y las bacterias heterótrofas dando como resultado una relación positiva entre las concentraciones elevadas de fósforo con el aumento de su biomasa.

A partir de esta investigación se concluyó que la comunidad bacteriana principalmente autotrófica, y la heterotrófica, pueden participar activamente en el fenómeno de emblanquecimiento en el lago la Preciosa, lo cual, reduce la posibilidad de que el origen de este fenómeno ocurra debido a factores físicos o químicos.

**Palabras clave:** procarioplancton, bacterias, fenómeno de emblanquecimiento, ciclos biogeoquímicos, distribución, abundancia.

## INTRODUCCIÓN

Hace algunos años, el entendimiento del papel que juegan los microorganismos en los procesos ecológicos y biogeoquímicos comenzó a crecer a un ritmo acelerado. En el siglo XVII, Von Leeuwenhoek fue el primero en observar microorganismos en muestras de agua de lagos, sin embargo, el desarrollo de la Microbiología como disciplina científica fue muy lento y el campo de la Ecología microbiana se dio hasta la mitad del siglo XX. Posteriormente, Vernadsky (1945) reconoció la importancia de los microorganismos en procesos globales y muchos científicos, a inicios del siglo XX, enfatizaron que las bacterias y otros microorganismos eran componentes importantes de los ecosistemas (Cotner & Biddanda., 2002).

Ahora se tiene la capacidad de cuantificar la influencia microbiana en los procesos biogeoquímicos, en gran parte como resultado de grandes avances metodológicos en química ambiental, microscopía de epifluorescencia, análisis de imagen y una gran variedad de tinciones permiten visualizar el mundo microbiano (Cotner & Biddanda., 2002).

El procarioplanton se define como organismos unicelulares que no cuentan con un núcleo celular diferenciado pertenecientes a los dominios *Bacteria* y *Archaea* presentes en sistemas acuáticos supeditados a su hidrodinámica. Son un componente importante de las comunidades microbianas y de la estructura funcional de los ecosistemas por sus rutas metabólicas únicas y elementos moleculares específicos que forman un eje central de los procesos biogeoquímicos de todos los ecosistemas (Falkowski, 1994). Existe un criterio de separar a los organismos del plancton por su tamaño. Sieburth *et al.*, (1978) agregó el término picoplancton donde incluye organismos de tamaño 0.02-0.2  $\mu\text{m}$ . El picoplancton incluye organismos tanto procariontes (picocianobacterias) y eucariontes fototróficos y heterotróficos (Stockner & Shortreed, 1991).

El emblanquecimiento, evento de emblanquecimiento o fenómeno blanco (Whitings o Whiting events según Thompson *et al.*, 1997) es un proceso que se ha observado en sistemas de agua dulce y marina de regiones tropicales y subtropicales, en el cuál, ocurre la precipitación de pequeñas partículas de carbonato de calcio (1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro) que generan un color blanquecino en el agua, a lo que debe su nombre dicho fenómeno (Cloud, 1962).

Anteriormente se habían desarrollado, principalmente, dos teorías que explican el origen del emblanquecimiento, la primera se refiere a un proceso inorgánico en la cual se presenta la precipitación de carbonato como una respuesta a los cambios en la temperatura del agua y a la actividad de los iones relacionados con cambios climáticos estacionales y la segunda que habla de un proceso inducido biológicamente por la remoción de  $\text{CO}_2$  durante la fotosíntesis (Thompson *et al.*, 1997). Se ha propuesto que la precipitación espontánea de carbonatos sucede bajo condiciones físicas y químicas favorables, sin embargo, se ha demostrado que el proceso de formación de carbonatos no debe ser descrito solo desde el punto de vista inorgánico de precipitación, ya 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).

En la actualidad se proponen tres posibles mecanismos por los cuáles el procarioplancton podría relacionarse con la mineralización del carbonato de calcio (Kosamu & Obst, 2009):

- 1) La inducción biológica de la precipitación debido a cambios químicos en el medio circundante a la pared celular por efecto de la fotosíntesis.
- 2) La biomineralización biológicamente controlada donde la superficie de la célula funciona como sitio de nucleación.
- 3) Un proceso dominado por el organismo en el que el intercambio iónico activo de la célula permite la formación de carbonato de calcio.

Los estudios sobre el fenómeno blanco se han centrado principalmente en la cantidad de materia que se incorpora durante éste, y no al proceso como tal; a pesar de esto, recientemente se descubrió un nuevo mecanismo de formación intracelular de carbonato de calcio por parte de microorganismos procariotas del grupo de las cianobacterias (Couradeau *et al.*, 2012).

Uno de los aspectos de mayor interés en ecología ha sido el estudio de los factores bióticos y abióticos que regulan la dinámica y la estructura de las comunidades naturales. Conocer las interacciones entre estos factores y cuantificar su importancia relativa representa uno de los principales retos a los que se enfrenta esta disciplina (Conde-Porcuna *et al.*, 2004, Martínez *et al.*, 2010).

La diversidad, abundancia y la actividad de los microorganismos en la columna de agua es fundamental en los estudios de microbiología acuática (Amann *et al.*, 1990). En particular, el enfoque del RNA ribosomal para la ecología y evolución microbiana se ha convertido en una parte integral de la microbiología ambiental (Amann & Fuchs, 2008). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ha probado ser una herramienta muy eficiente para dicho análisis en diversos ambientes (Amann *et al.*, 2001), como en lagos templados y boreales, así como en océanos (Glöckner *et al.*, 2000; Jürgens *et al.*, 2000; Pernthaler *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2010).

La técnica de FISH-CARD (Fluorescence In situ Hybridization and Catalized Reporter Deposition) desarrollada por Pernthaler (2002) para ambientes marinos fue modificada por Sekar *et al.* (2003) para ambientes interiores. Estas modificaciones permitieron un mayor rango de detección de taxa bacterianos en el procedimiento, por lo que, la determinación de los taxa bacterianos, presentes en la columna de agua, se ha vuelto más precisa.

Clasificación taxonómica de los taxa bacterianos estudiados. Los taxa analizados se presentan en negritas.

Dominio ***Bacteria***

Filo: *Cyanobacteria*

Género: ***Synechococcus*** (*Callieri et al.*, 2013)

Filo: *Proteobacteria*

Clase: ***Alfaproteobacteria***

Género: ***Candidatus pelagibacter*** LD12

Género: ***Paracoccus***

Clase: ***Betaproteobacteria***

Clase: ***Gammaproteobacteria***

Clase: ***Deltaproteobacteria***

Filo: ***Actinobacteria***

Filo: ***Bacteroidetes***

Filo: *Planctomycetes*

Familia: ***Planctomycetaceae***

Dominio: ***Archaea***

Filo: ***Thaumarchaeota***

## ANTECEDENTES

Los lagos alojados en las depresiones formadas por la expulsión violenta del magma forman cráteres de origen explosivo, que se denominan “Maars”. Los lagos tipo “Maar” tienen normalmente una forma casi circular y pueden ser muy profundos con relación a su pequeña área superficial. Estos lagos presentan características específicas y, dada su importancia ecológica y su relación con la actividad volcánica que les origina, han sido objeto de diversos estudios. La química del agua de estos lagos y de los reservorios vinculados a algún volcán dentro o fuera del Eje Volcánico Mexicano, ha sido determinada por varios años y examinada con respecto a los factores ambientales y geológicos (Armienta *et al.*, 2008).

Con respecto a la comunidad bacteriana, se ha reportado que estos organismos y el contenido de materia orgánica disuelta se han usado para examinar el crecimiento, biomasa, eficiencia de crecimiento y la composición de la comunidad bacteriana a partir de la concentración de las fuentes de carbono en el sistema (Eiler *et al.*, 2003).

Glöckner *et al.*, (1999) utilizaron la técnica de FISH para realizar una comparación de bacterioplancton en diferentes lagos y océanos. En este estudio obtuvieron como resultado una dominancia de células de los dominios *Bacteria* y *Archaea*; de los cuales, fueron identificados algunos grupos bacterianos con oligonucleótidos específicos que se relacionaron con algunas clases de *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*.

En México, Hernández *et al.*, (2010) realizaron un estudio sobre la composición del picoplancton procarótico usando FISH en el lago tropical Alchichica. En donde registraron que el picoplancton autotrófico y heterotrófico aumentaron durante el periodo de mezcla (durante el invierno) en el sistema. Así mismo, determinaron la composición microbiana de los dominios *Bacteria* y *Archaea*, identificando taxa específicos como *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, del género *Paracoccus* y bacterias reductoras del azufre.

Sarmento (2012) realizó una revisión sobre la importancia de la red trófica microbiana en lagos tropicales durante el proceso de reciclamiento de nutrientes, ya que existe una mayor actividad de los organismos autótrofos durante periodos de tiempo más largos que en lagos templados.

Dittrich & Obst (2004) realizaron un estudio sobre la participación de la fotosíntesis realizada por las picocianobacterias en la precipitación de calcita en diferentes sistemas acuáticos; concluyendo que las picocianobacterias pueden realizar la calcificación en aguas oligotróficas, carbonatadas y ricas en calcio y que la precipitación ocurre cuando aumenta la densidad de picoplancton autotrófico.

## HIPÓTESIS

- Se espera que, durante el fenómeno de emblanquecimiento, se presente una mayor abundancia de grupos procariontes autótrofos en el estrato superficial de la columna de agua debido a la relación de la fotosíntesis oxigénica y la nucleación de los bicarbonatos. Así mismo, se espera observar un grupo bacteriano, o más, dominando la estructura de la comunidad procarionte durante el fenómeno de emblanquecimiento.
- Una mayor disponibilidad de materia orgánica y de nutrientes, además de la formación de gradientes químicos en la termoclina favorecerán un aumento en la diversidad y abundancia de grupos procariontes heterótrofos y autótrofos dentro de la termoclina.
- La cantidad de carbonato de calcio que precipite como resultado del fenómeno de emblanquecimiento responderá fundamentalmente a factores físicos y químicos; como el incremento de la temperatura del agua, cambios en el pH y en la conductividad eléctrica, que modificarían las formas de carbono del agua en el sistema.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la composición y la abundancia espacio-temporal de taxa procariontes antes, durante y después del fenómeno de emblanquecimiento en el lago La Preciosa y su relación con la dinámica limnológica.

### Objetivos particulares

- Determinar la variación espacio-temporal de la abundancia relativa (Cél. mL<sup>-1</sup>) de los Dominios *Archaea* y *Bacteria*, así como de los taxa *Thaumarchaeota*, *Alpha*, *Beta* y *Gamma Proteobacteria*, *Planctomycetales*, *Cytophaga-Flavobacterium* y *Actinobacteria* durante el fenómeno de emblanquecimiento.
- Evaluar la variación espacio-temporal y biomasa (mg [C org] mL<sup>-1</sup>) del picoplancton autotrófico (picocianobacterias) y del picoplancton heterotrófico en el lago volcánico “La Preciosa” durante el fenómeno de emblanquecimiento.
- Estimar la importancia biogeoquímica de los procariontes en los ciclos del carbono, nitrógeno, azufre y fósforo en el lago.

## MÉTODO

### Descripción de la zona de estudio

El lago La Preciosa, también conocido como “Las Minas”, está ubicado en el estado de Puebla y es uno de los seis lagos tipo “Maar” o axalapascos (del náhuatl “ollas de arena con agua”) que se encuentran en la Cuenca Oriental, y cuyo origen se remonta al Pleistoceno tardío (Armienta *et al.*, 2008). El clima de la cuenca es de tipo semiárido tropical (lluvias en verano) (Vilaclara *et al.*, 1993) con una temperatura media anual de 12-16 °C y una precipitación total anual de 400-800 mm (Arriaga *et al.*, 1998).

El lago La Preciosa se encuentra entre las coordenadas 19° 22' N y 97° 23' W a una altitud promedio de 2,330 m s.n.m. (Armienta *et al.*, 2008) (Fig. 1). Su longitud máxima es de 1.34 Km con orientación noreste-suroeste, la anchura máxima es de 920 m y tiene una profundidad máxima de 45 m (Arredondo *et al.*, 1983), presenta un pH predominantemente alcalino (Arredondo, 2002).

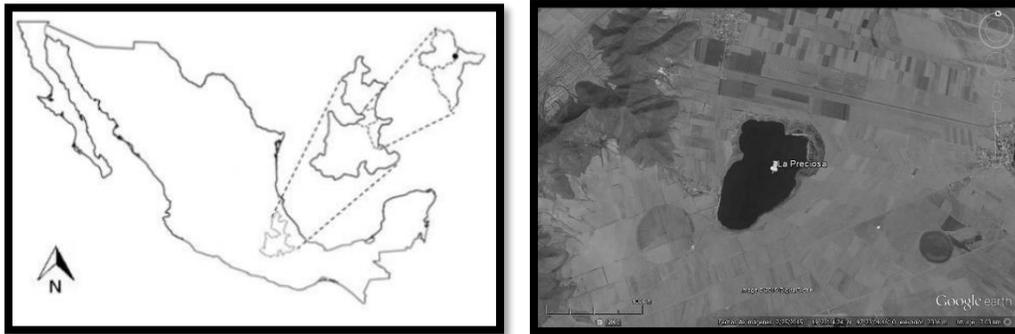


Figura 1.- Izquierda: localización geográfica del lago La Preciosa en la cuenca Oriental (tomado y modificado de Vizuet, 2015). Derecha: vista aérea del lago la Preciosa.

## Muestreo

Se realizaron muestreos mensuales a partir del mes de febrero del 2014 para detectar el fenómeno de emblanquecimiento. Este fenómeno se presentó en el mes de agosto, por lo cual, se utilizaron las muestras correspondientes a los meses de julio (antes), agosto (durante) y septiembre (después) del 2014.

Con una botella Van Dorn (con capacidad de 2.5 L) se tomaron muestras de agua en un solo punto de muestreo, esto con el objetivo de obtener el perfil vertical de la zona limnética del lago y este punto de muestreo corresponde a una zona cercana a la máxima profundidad del lago (45 m). Los perfiles de temperatura y oxígeno fueron determinados con un oxímetro digital HACH hq-140 con sensor LBDO 101 (Light Dissolved Oxygen,  $\pm 0.2 \text{ mg/L}^{-1}$ ). La zona eufótica se estableció como el promedio de la visibilidad del disco de Secchi multiplicado por la constante de 3.8; la cual, fue determinada con un perfilador (Biospherical Instruments PNF-300).

## Mediciones *in situ*

Se tomaron muestras de 1 L de agua de profundidades representativas de cada estrato (Tabla 1) para la determinación de conductividad, alcalinidad, dureza de calcio y dureza total por medio de métodos colorimétricos (APHA, 2012). Se midió el pH de las muestras utilizando un potenciómetro digital tipo pluma ( $\pm 0.1$ , PHMETER), la conductividad ( $\pm 0.01 \text{ mS cm}^{-1}$ ) y total de sólidos disueltos ( $\pm 0.01 \text{ g L}^{-1}$ ) se midieron con un sensor multiparámetro CORNING, USA.

Tabla 1.- Profundidades consideradas para la toma de muestras de cada mes.

	Julio	Agosto	Septiembre
<b>z</b> <b>(m)</b>	2	2	4
	7	4	8
	11	8	12
	14	13	16
	17	16	20
	18	25	25
	26	35	30
	39.5	39.5	39.5

## Diversidad microbiana

Así mismo, se tomaron muestras de agua en botellas de 125 mL, de las mismas profundidades para la determinación de nutrientes (Tabla 1) y fueron fijadas con 6.75 mL de solución de formaldehído libre de bacterias (concentración final 2% [Vol/Vol]) para realizar los análisis de la composición microbiana.

### Análisis de nutrientes

De las muestras contenidas en botellas de 1 L de agua se determinaron las concentraciones de fósforo soluble reactivo (FSR) ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y silicatos ( $\text{SiO}_2$ ) por medio de métodos colorimétricos (APHA, 2012).

### Determinación de la densidad y biomasa del picoplancton autotrófico (PPA) y heterotrófico (PPH)

La abundancia del picoplancton heterotrófico (PPH) fue evaluada por conteos directos al microscopio de membranas negras de policarbonato (diámetro de poro: 0.2  $\mu\text{m}$ ), marcadas con DAPI (por su nombre IUPAC en inglés: 4',6-diamidino-2phenylindole) el cual es un marcador muy específico para teñir DNA que puede estar contenido en el núcleo, mitocondria o cloroplastos de las células (Porter & Fieg, 1980). Por último, las membranas fueron montadas en aceite de inmersión. Se utilizó el filtro de luz UV para obtener la fluorescencia color azul de las células de PPH marcadas con DAPI.

El picoplancton autotrófico (PPA) fue concentrado en membranas blancas de policarbonato (diámetro de poro: 0.2  $\mu\text{m}$ ). Se utilizó el filtro CY3, que es permeable al espectro de luz color verde para obtener una autofluorescencia máxima color anaranjado de las células de PPA.

Tanto las abundancias de PPH y PPA fueron contadas en un microscopio de epifluorescencia (Leica, modelo DMLB, Alemania).

La biomasa bacteriana de PPH y PPA fue evaluada por medio de fotografías de campos al azar, las cuales tomadas con una cámara digital a color (Canon S45). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ (USA) con macros de aproximación de volumen adicionales. El contenido de carbono orgánico, para el caso del PPH fue calculado 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 la biomasa se calculó multiplicando el volumen celular por la constante de Weisse (1993) (Cuadro 1).

Loferer-Krößbacher	Weisse
$CC = 218 \times V^{0.86}$	$CC = V \times 200$
Dónde:	Dónde:
CC= Contenido de carbono (fg $C_{org}$ Cél. <sup>-1</sup> ).	CC= Contenido de carbono (fg $C_{org}$ Cél. <sup>-1</sup> ).
V= Volumen celular ( $\mu\text{m}^3$ Cél. <sup>-1</sup> ).	V= Volumen celular ( $\mu\text{m}^3$ Cél. <sup>-1</sup> ).

Cuadro 1.- Ecuaciones para calcular el contenido de carbono de PPH y PPA.

La biomasa para PPH y PPA fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Biomasa} = \text{Densidad celular (Cél. mL}^{-1}\text{)} \times \text{Contenido de carbono (fg } C_{org} \text{ Cél.}^{-1}\text{)}.$$

## **CARD-FISH**

La técnica de hibridación *in situ* se realizó con base al protocolo establecido por Pernthaler *et al.*, (2002) y las modificaciones al mismo elaboradas por Sekar *et al.*, (2003).

### **Fijación y filtración**

En el laboratorio, se filtraron al vacío de 15 a 25 mL de las muestras fijadas con la solución de formaldehído, en un plazo menor a 24 horas después de haber realizado el muestreo, en una unidad de filtración (Milipore) utilizando una membrana de policarbonato de 0.2  $\mu\text{m}$  y una membrana de policarbonato de 0.45  $\mu\text{m}$  como membrana de soporte. Los filtros se enjuagaron con agua Mili-Q (MQ) utilizando el mismo volumen y se dejaron secar a temperatura ambiente.

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

Se preparó una solución de agarosa al 0.1% y se calentó en un horno de microondas a una temperatura de 30 - 40 °C. Cada membrana fue sumergida en la solución de agarosa. Posteriormente, las membranas se colocaron en cajas de Petri dentro de una campana a una temperatura de 30 - 40 °C durante 10 - 20 min hasta que se secan por completo. Las membranas fueron removidas cuidadosamente de la caja de Petri añadiendo 1.5 mL de etanol (EtOH) con una micropipeta y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las membranas fueron incubadas en una solución de ácido clorhídrico 0.01 M durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron los filtros con solución búfer de fosfato (PBS) y agua MQ.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas en una solución de lisozima (preparada al momento) durante 60 min a una temperatura de 37 °C. Transcurrido este tiempo, se lavaron las membranas con PBS y agua MQ a temperatura ambiente.

Se cortó una sección equivalente a 1/8 de la membrana, la cual fue tratado con una solución de acromopeptidasa (preparada al momento) durante 30 min a 37 °C; el resto de la membrana se incubó en una solución de proteinasa K durante 30 min a 37 °C. Finalmente se lavaron las membranas con agua MQ y EtOH y se dejaron secar a temperatura ambiente.

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

El fragmento tratado con acromopeptidasa fue cortado en dos secciones iguales y el resto de la membrana fue cortado en 14 secciones del mismo tamaño. Cada banderín se etiquetó de acuerdo a profundidad, mes de muestreo y oligonucleótido específico. Los banderines fueron colocados en viales de 1.5 mL. Posteriormente, se mezclaron 300  $\mu\text{l}$  de búfer de hibridación y 2  $\mu\text{l}$  de la sonda a utilizar (Thermo Fisher Scientific, Alemania) (Tabla 2). Esta solución fue añadida a los viales y se hibridaron las secciones de los filtros por 24 horas a 35°C en un termorregulador (Thermomixer confort, Eppendorf).

Tabla 2.- Sondas de oligonucleótidos utilizadas para la hibridación.

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>ARC915</b>	Dominio <i>Archaea</i> .	5'- GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT -3'	Stahl & Amann (1991)
<b>ALF968</b>	<i>Alfaproteobacteria</i> , <i>Rickettsiales</i> .	excepto 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> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Sphingobacteria</i> .	algunos algunos 5'- TGG TCC GTG TCT CAG TAC -3'	Manz <i>et al.</i> (1996)
<b>LD12-121</b>	Familia SAR11, <i>Candidatus</i> LD12.	Género 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>Thaumarchaeota</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 la base de datos Ribosomal Database Project (RDP), consultada el 19/08/2015.

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

Transcurrido el tiempo de hibridación, se preparó un búfer de lavado y se calentó en baño de agua hasta alcanzar los 37 °C. Luego de la hibridación se lavaron los banderines con búfer de lavado durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, los banderines fueron incubados en solución búfer de fosfato con detergente (Tritón X-100®) (PBST) por 45 min a 37 °C. Después, 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. Posterior al tiempo de incubación en tiramida, se retiró el exceso de líquido con papel absorbente y se incubaron inmediatamente en PBST por 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego de la incubación, los banderines se lavaron con agua MQ y EtOH en la oscuridad y secaron a temperatura ambiente.

Finalmente, los banderines se dejaron secar en la oscuridad y fueron ordenados en cajas de Petri, indicando la sonda con la que fueron tratados y fechas de muestreo correspondientes. Las cajas de Petri fueron envueltas en papel aluminio (para evitar el deterioro por la luz) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior conteo al microscopio.

### **Conteo de células hibridadas**

Las preparaciones de CARD-FISH se montaron en medio de montaje especial de Vectashield con DAPI (Linaris Biologische Produkte). Utilizando un microscopio de epifluorescencia, se contaron las células hibridadas usando el filtro azul y en el mismo campo, con el filtro UV, se contaron las células totales marcadas con DAPI, esto con el fin de calcular las densidades relativas de cada taxa bacteriano.

### **Análisis estadístico de datos**

A través de métodos estadísticos como diagramas de probabilidad normal y análisis de varianza de Levene, se comprobó si los datos cumplían con los supuestos de normalidad. Algunos de los datos fueron transformados con la función logarítmica (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 los diferentes estratos durante el periodo de estudio empleando el análisis de varianza de una vía.

Si los datos no cumplieron los supuestos de homocedasticidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Si la prueba arrojaba diferencias significativas entre las medianas de las muestras, se utilizaron diagramas de caja y bigote con muescas para determinar entre qué estratos se encontraron las diferencias significativas.

Para determinar la correlación entre los parámetros limnológicos y las densidades de los 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 previos que se han realizado en el lago La Preciosa y que se corrobora con el presente estudio, el lago se clasifica como un lago monomítico cálido. Es decir, que el sistema se mantiene estratificado la mayor parte del año y presenta una etapa de mezcla durante el invierno hemisférico (Lewis, 1983).

Los meses en los que se realizó el estudio correspondieron a los meses de julio, agosto y septiembre del 2014. De acuerdo con los perfiles obtenidos del sistema, el lago se encontraba en la fase de estratificación bien establecida, donde la capa superficial de agua cálida y con movimiento corresponde al epilimnion, mientras que la capa de agua fría y estancada que se encuentra hacia al fondo es el hipolimnion. Un fuerte gradiente de temperatura (termoclina) se forma en la zona de contacto entre estas capas (Boehrer *et al.*, 2008). Este período se caracterizó en general por una mayor profundización de la termoclina, condiciones cercanas a la anoxia en el hipolimnion y es la fase previa a la estratificación tardía que da paso al rompimiento de los estratos para dar paso a la mezcla.

Durante el mes de julio el epilimnion alcanzó una profundidad de 14 m, un metalimnion con 6 m de amplitud y temperaturas que fluctuaron de los 18.6° a los 16.2° C; con un gradiente de temperatura de 0.4° C por metro de profundidad y un hipolimnion de aproximadamente 23 m de amplitud. La zona eufótica registró a los 12.2 m de profundidad, lo que implica que ésta se ubicó dentro de la capa de mezcla. Mientras que, para el oxígeno disuelto, se registró una concentración promedio de  $6.93 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$  en la zona del epilimnion, en el metalimnion la concentración promedió disminuyó a los  $1.24 \pm 0.55 \text{ mg L}^{-1}$  y una concentración promedio de  $0.28 \text{ mg L}^{-1}$  para la zona del hipolimnion; la cual se mantiene constante al fondo de la columna de agua. Para este mes de muestreo, la profundidad superior de la termoclina y la oxiclina coincidieron a los 14 m (Fig. 1).

Durante el mes de agosto, se presentó el fenómeno de emblanquecimiento, por lo que la zona eufótica redujo su amplitud, a 8.7 m de profundidad. El epilimnion se redujo en un metro; es decir, a 13 m de profundidad. Mientras que el metalimnion registró una amplitud de 12 m con un gradiente de temperatura promedio de 0.2° C por metro de profundidad y una reducción del hipolimnion a 18 m de profundidad. Los niveles de oxígeno promedio en las tres zonas fueron los siguientes: epilimnion  $6.84 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$ , metalimnion  $1.51 \pm 2.05 \text{ mg L}^{-1}$  y el hipolimnion  $0.28 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ . De igual forma, la capa superficial de la termoclina y de la oxiclina coincidieron en los 13 m de profundidad, al igual que su amplitud en la columna de agua (Fig. 1).

Para el mes de septiembre la zona eufótica aumentó su amplitud hasta los 17 m de profundidad. El epilimnion se profundizó hasta los 20 m, el metalimnion tuvo una amplitud de 10 m con un gradiente de temperatura de 0.3° C por metro de profundidad y el hipolimnion redujo su amplitud a 13 m de profundidad. Las concentraciones de oxígeno disuelto para cada estrato fueron las siguientes: epilimnion  $6.4 \pm 1.7 \text{ mg L}^{-1}$ , metalimnion  $0.3 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$  y el hipolimnion de  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 1).

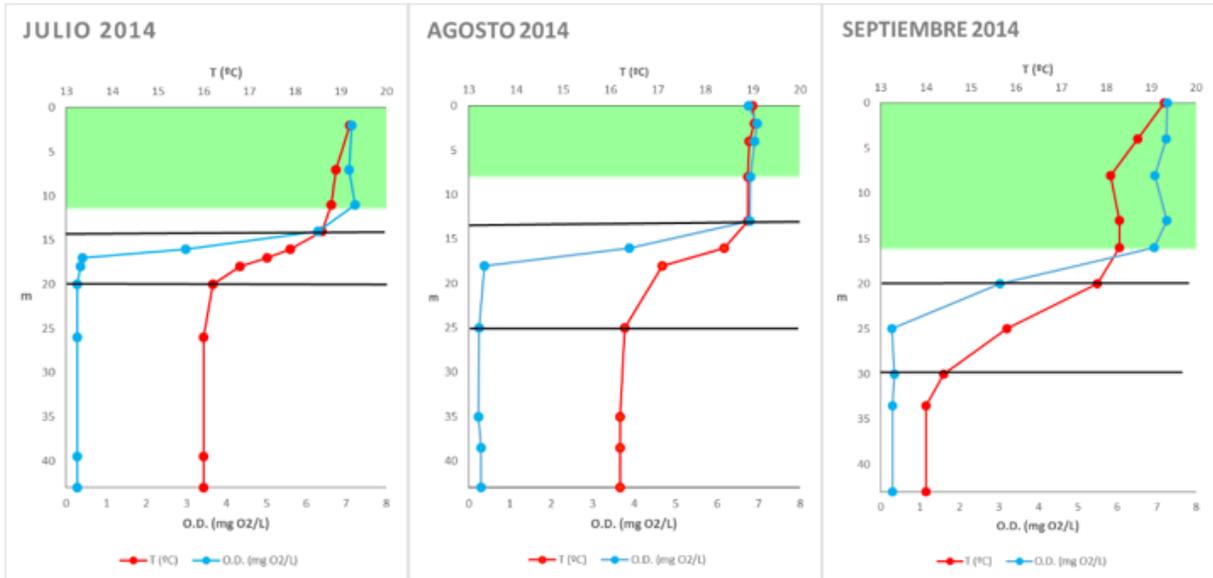


Fig. 1.- Perfiles verticales de oxígeno y temperatura durante el periodo de estudio. El área color verde representa la zona eufótica. Las líneas negras representan la división de los estratos: epilimnion, metalimnion e hipolimnion.

## Parámetros físicos y químicos

### Conductividad y salinidad

Para el caso de la salinidad, durante los tres meses de muestreo se registraron concentraciones que se encontraban entre los 1.01 y 1.11 g L<sup>-1</sup>, la mayor concentración promedio registró para el mes de julio con una concentración de 1.11 ± 0.007 g L<sup>-1</sup>, con una ligera disminución en las concentraciones para los dos meses siguientes.

La conductividad no presentó fluctuaciones considerables durante el periodo de estudio. Las concentraciones promedio se encontraron entre 2.09 y 2.19 mS cm<sup>-1</sup>, en donde, la mayor concentración se registró durante el mes de julio con una concentración de 2.19 ± 0.035 mS cm<sup>-1</sup> y fue disminuyendo para los siguientes meses (Tabla 3).

Tabla 3- Salinidad y conductividad eléctrica promedio y su desviación estándar entre los meses de estudio.

	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE
<b>SALINIDAD</b>	1.11 ± 0.007 g L <sup>-1</sup>	1.08 ± 0.014 g L <sup>-1</sup>	1.04 ± 0.024 g L <sup>-1</sup>
<b>CONDUCTIVIDAD</b>	2.19 ± 0.035 mS cm <sup>-1</sup>	2.12 ± 0.037 mS cm <sup>-1</sup>	2.09 ± 0.057 mS cm <sup>-1</sup>

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis (K=17.26, p<0.05) existen diferencias significativas entre las medianas de conductividad. Se pudo observar que el epilimnion

después del fenómeno de emblanquecimiento fue diferente al de los muestreos anteriores. El metalimnion antes del fenómeno tuvo diferencias significativas con respecto a durante y después del fenómeno. Para el caso del hipolimnion, la conductividad fue diferente durante los 3 muestreos (Fig. 2).

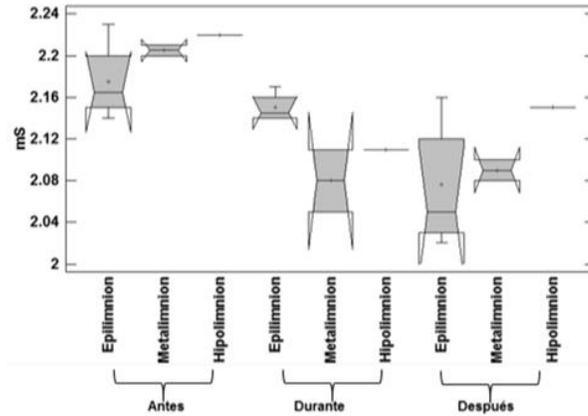


Fig. 2.- Diagrama de caja y bigote con muesca de los valores de conductividad durante el periodo de estudio.

### pH

Con respecto al pH se encontró una tendencia general a valores mayores en el epilimnion (9.1 a 9.4), con una reducción conforme se incrementa la profundidad hasta valores de 8.9 a 9. Los valores promedio de éste parámetro tuvieron una tendencia a incrementar durante el emblanquecimiento del lago con una disminución consecutiva al mes posterior (Fig. 4).

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Walis ( $K= 18.37, p>0.05$ ) el metalimnion después del fenómeno presentó diferencias significativas con respecto a los muestreos anteriores (Fig. 3).

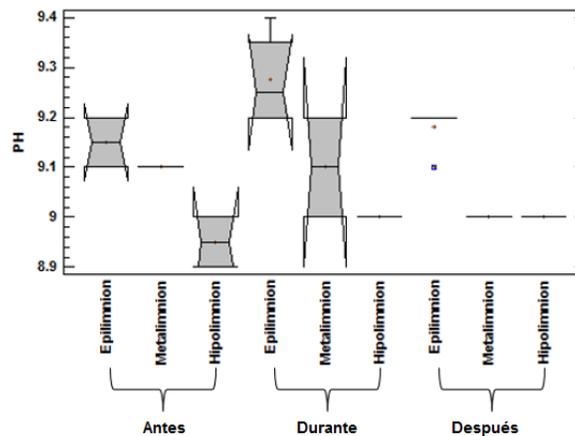


Fig. 3.- Diagrama de caja y bigote con muesca de los valores de pH durante el periodo de estudio.

### **Dureza total, permanente, temporal y de calcio**

Las concentraciones promedio de las diferentes formas de durezas medidas en el lago se mantuvieron casi constantes durante los meses de estudio. Destaca que la dureza temporal dada por carbonatos y bicarbonatos asociados a cationes divalentes siempre fue mayor que la dureza permanente donde los cationes se asocian con aniones tales como los cloruros y los sulfatos. Así mismo, la dureza de calcio fue muy pequeña con una concentración promedio de  $38.2 \pm 7.8 \text{ mg L}^{-1}$ . La dureza total tuvo un promedio de  $1023.6 \text{ mg} \pm 69.8 \text{ mg L}^{-1}$  durante los meses de muestreo. Para la dureza temporal presentó un promedio de  $580 \pm 140.9 \text{ L}^{-1}$  y una concentración promedio de dureza permanente de  $444 \pm 27.4 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 4). De acuerdo a la prueba ANOVA, no se encontraron diferencias significativas para los datos de dureza total ( $F_{(2, 21)} = 1.54, p > 0.05$ ). De igual forma, no se encontraron diferencias significativas entre las medias de dureza de calcio ( $F_{(2, 21)} = 0.3, p > 0.05$ ).

Las fórmulas que se utilizaron para calcular los diferentes tipos de dureza se muestran a continuación:

- Dureza total:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{(\text{mL EDTA}) (\text{M EDTA}) (100.1) (100)}{\text{mL muestra}}$$

- Dureza de calcio:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = \frac{(\text{mL EDTA}) (\text{M EDTA}) (100.1) (100)}{\text{mL muestra}}$$

- Dureza temporal:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = \sum \text{alcalinidad de CO}_3^{2-} + \text{alcalinidad de HCO}_3^-$$

- Dureza permanente:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = \text{dureza total} - \text{dureza temporal}$$

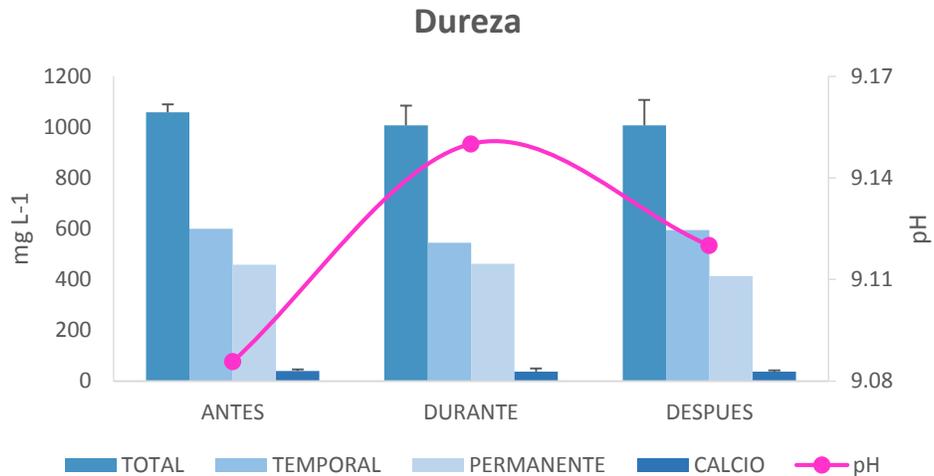


Fig. 4.- Variación promedio y desviación estándar de dureza total, temporal, permanente, de calcio y pH promedio durante el periodo de estudio.

#### Alcalinidad de bicarbonatos y carbonatos

La alcalinidad de bicarbonatos tuvo dominancia sobre la alcalinidad de carbonatos antes y después del evento de emblanquecimiento. Por otra parte, durante el fenómeno de emblanquecimiento el comportamiento de las alcalinidades fue inverso al de los meses antes mencionados. La alcalinidad de bicarbonatos tuvo una concentración promedio para los tres meses de muestreo de  $295.7 \pm 84.1 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que la alcalinidad de carbonatos tuvo un promedio durante el periodo de estudio de  $283.8 \pm 56.7 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 5).

Las fórmulas que se utilizaron para calcular los dos tipos de alcalinidad se muestran a continuación:

- Alcalinidad a la fenoftaleína (carbonatos):

$$\text{mg CaCO}_3 = \frac{(\text{vol. Titulante}) (\text{N titulante}) (50) (1000)}{\text{mL de muestra}}$$

- Alcalinidad total (bicarbonatos):

$$\text{mg CaCO}_3 = \frac{(\text{vol. Titulante}) (\text{N titulante}) (50) (1000)}{\text{mL de muestra}}$$

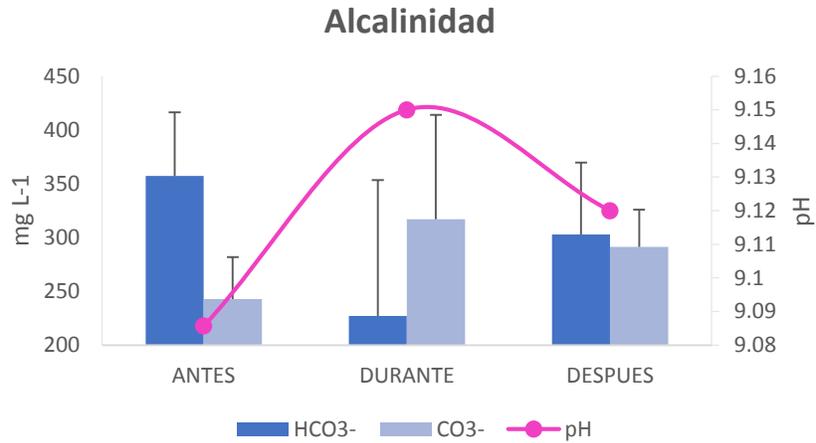


Fig. 5.- Variación promedio y desviación estándar de alcalinidad de bicarbonatos, carbonatos y pH durante el periodo de estudio.

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Walis ( $K = 15.79$ ,  $p < 0.05$ ), para la alcalinidad de bicarbonatos, se encontraron diferencias significativas entre las medianas de los estratos. Estas diferencias se encontraron en el epilimnion antes y durante el emblanquecimiento, las concentraciones fueron diferentes entre los tres muestreos en el metalimnion y el hipolimnion después del fenómeno mostró diferencias respecto a los dos meses de muestreo restantes (Fig. 6). Por otro lado, la alcalinidad de carbonatos no presentó diferencias significativas ( $F_{(2, 21)} = 3.21$ ,  $p > 0.05$ ).

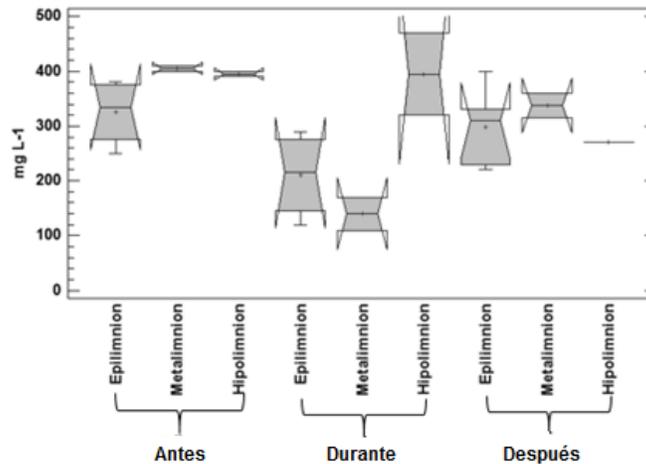


Fig. 6.- Diagrama de cajas y bigotes de las concentraciones de alcalinidad de bicarbonatos durante el periodo de estudio.

## Nutrientes

### Fósforo Soluble Reactivo ( $\text{PO}_4^{-3}$ )

Las concentraciones de fósforo soluble reactivo (FSR) fueron más altas en la zona del epilimnion con una concentración promedio de  $0.006 \pm 0.003 \text{ mg L}^{-1}$  y tuvieron un comportamiento a disminuir hacia la zona del metalimnion con un promedio de  $0.0005 \pm 0.0006 \text{ mg L}^{-1}$ . En la zona del hipolimnion las concentraciones tendieron a aumentar con un promedio de  $0.002 \pm 0.0002 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 7). Para las concentraciones de PSR no se encontraron diferencias significativas de acuerdo al análisis de varianza ( $F_{(8, 14)} = 1.38$ ,  $p > 0.05$ ).

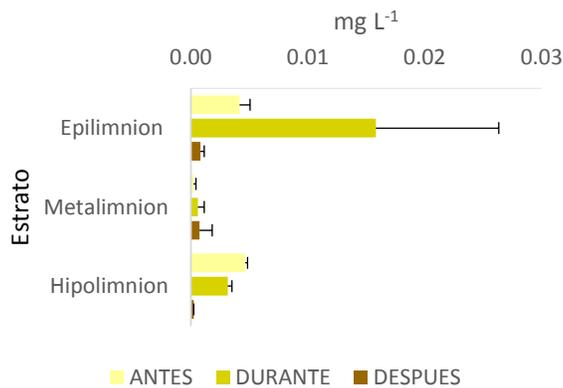


Fig. 7.- Concentración promedio y desviación estándar de las concentraciones de fósforo soluble reactivo durante el periodo de estudio.

### Amonio ( $\text{NH}_4^+$ )

En cuanto a las concentraciones de amonio durante el mes de julio se obtuvo un promedio de  $0.04 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$  y se observó una tendencia a disminuir hacia el metalimnion. Durante el mes de agosto la tendencia fue a aumentar hacia el metalimnion y se mantuvo constante hacia el hipolimnion con un valor promedio en toda la columna de agua de  $0.04 \pm 0.005 \text{ mg L}^{-1}$ . Las concentraciones para el mes de septiembre tuvieron un comportamiento a aumentar de manera considerable hacia el hipolimnion, con un promedio de  $0.09 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 8).

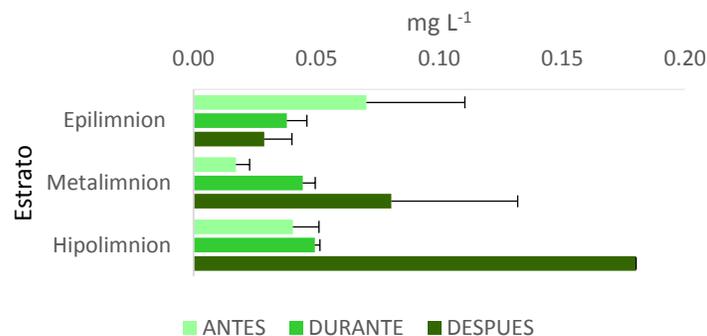


Fig. 8.- Concentración promedio y desviación estándar de las concentraciones de amonio durante el periodo de estudio.

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, los tres estratos presentaron diferencias significativas ( $K= 15.82, p<0.05$ ) durante los meses de muestreo. La zona del metalimnion antes del emblanquecimiento, presentó diferencias en comparación de los dos muestreos posteriores. Para el caso del epilimnion e hipolimnion, todos los muestreos fueron diferentes entre sí (Fig. 9).

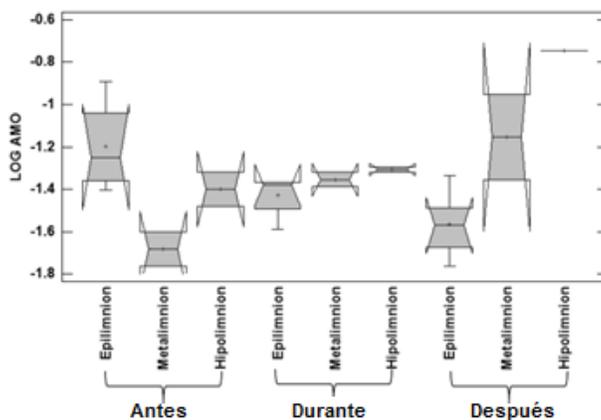


Fig. 9.- Diagrama de caja y bigote con muesca de las concentraciones de log de amonio durante el periodo de estudio.

### Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )

El comportamiento de las concentraciones de nitratos fue similar durante los meses de julio y agosto, en el cual, presentó una disminución hacia el metalimnion y se mantuvieron constantes hacia el hipolimnion, con concentraciones promedio de  $0.009 \pm 0.006 \text{ mg L}^{-1}$  para el mes de julio y  $0.028 \pm 0.005 \text{ mg L}^{-1}$ . Sin embargo, durante el mes de septiembre las concentraciones tendieron a aumentar hacia el metalimnion y disminuyeron hacia la parte del hipolimnion, con una concentración promedio a lo largo de la columna de agua de  $0.017 \pm 0.005 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 10).

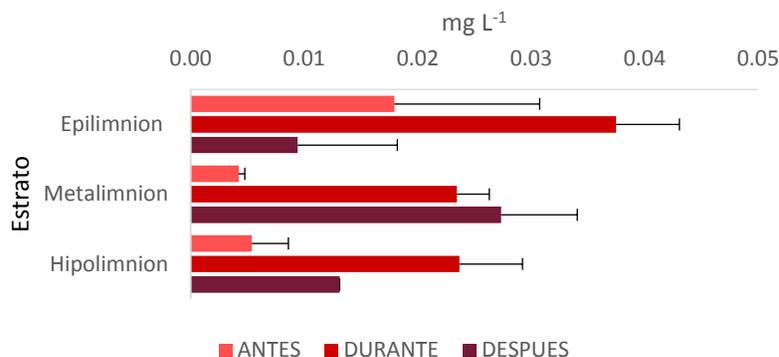


Fig. 10.- Concentración promedio y desviación estándar de las concentraciones de nitratos durante el periodo de estudio.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre las medianas de los datos ( $K=16.79$ ,  $p<0.05$ ). El epilimnion durante el fenómeno fue diferente al de los dos muestreos restantes. El metalimnion antes del emblanquecimiento presentó diferencias significativas con respecto a los dos muestreos posteriores. Y el hipolimnion fue diferente entre los tres muestreos (Fig. 11).

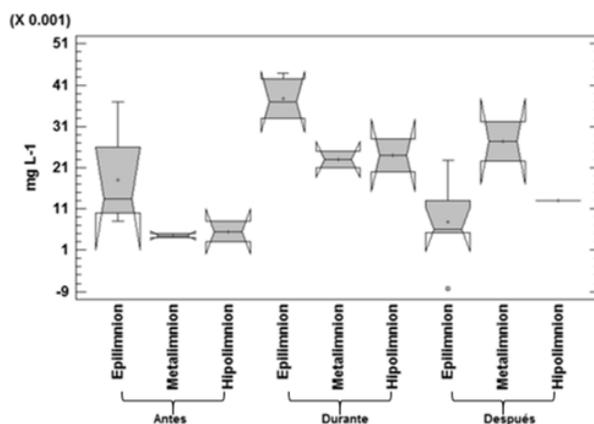


Fig. 11.-Diagrama de caja y bigote con muesca de las concentraciones de nitratos durante el periodo de estudio.

### Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )

Para el caso de los nitritos, las concentraciones tuvieron un comportamiento diferente entre los meses de muestreo. Julio tuvo una tendencia a disminuir hacia el metalimnion, incrementando hacia la zona del hipolimnion; estrato en el cual se registró un promedio de  $0.0016 \pm 0.0004 \text{ mg L}^{-1}$  a lo largo de la columna de agua. Durante el fenómeno de emblanquecimiento las concentraciones tendieron a aumentar hacia el metalimnion con un promedio de  $0.0015 \pm 0.0003 \text{ mg L}^{-1}$  y disminuyeron en el hipolimnion. En el mes de septiembre las concentraciones tuvieron una tendencia a disminuir conforme aumentó la profundidad (Fig. 12).

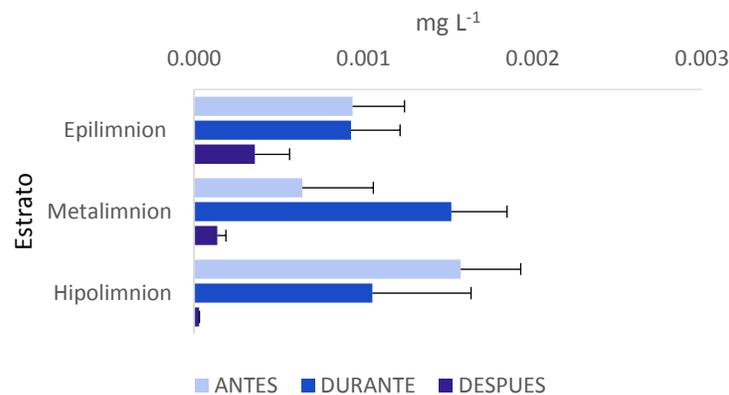


Fig. 12.- Concentración promedio y desviación estándar de las concentraciones de nitritos durante el periodo de estudio.

De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis ( $K= 20.8848$ ,  $p<0.05$ ), se encontraron diferencias significativas entre estratos. Las diferencias se presentaron después del fenómeno con respecto a los dos muestreos anteriores (Fig. 13).

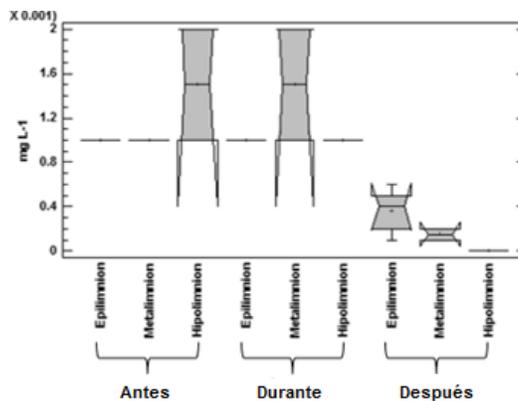


Fig. 13.- Diagrama de caja y bigote con muesca de las concentraciones de nitritos durante el periodo de estudio.

### Sulfatos ( $SO_4^{2-}$ )

Las concentraciones de sulfatos se mantuvieron constantes a lo largo de los meses de muestreo. Únicamente cabe destacar una disminución durante el mes de septiembre con un promedio de  $31.5 \pm 0.4$  mg L<sup>-1</sup>. Mientras que en julio y agosto la concentración promedio de los dos meses fue de  $39.2 \pm 1.5$  mg L<sup>-1</sup> (Fig. 14).

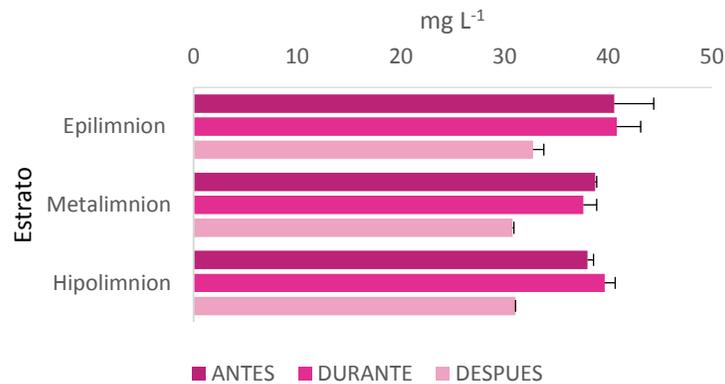


Fig. 14.- Concentración promedio y desviación estándar de las concentraciones de sulfatos durante el periodo de estudio.

Se registraron diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis ( $K=18.9$ ,  $p<0.05$ ). El epilimnion y metalimnion después del emblanquecimiento tuvo diferencias con respecto a los muestreos anteriores. El hipolimnion fue diferente entre los tres muestreos (Fig. 15).

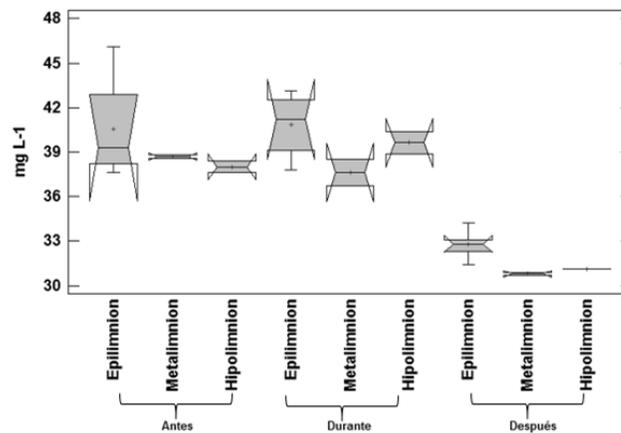


Fig. 15.- Diagrama de caja y bigote con muesca de las concentraciones de sulfatos durante el periodo de estudio.

### Silicatos ( $\text{SiO}_2$ )

Las concentraciones de silicatos tuvieron un comportamiento similar durante julio y agosto ya que tuvieron una tendencia a aumentar las concentraciones conforme aumentaba la profundidad, con valores promedio de  $16.9 \pm 6.5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $24.1 \pm 21 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente. En septiembre las concentraciones se mantuvieron casi constantes, con una ligera disminución hacia la zona del hipolimnion (Fig. 16). No se encontraron diferencias significativas para las concentraciones de silicatos de acuerdo al análisis de varianza ( $F_{(8, 15)} = 2.39$ ,  $p>0.05$ ).

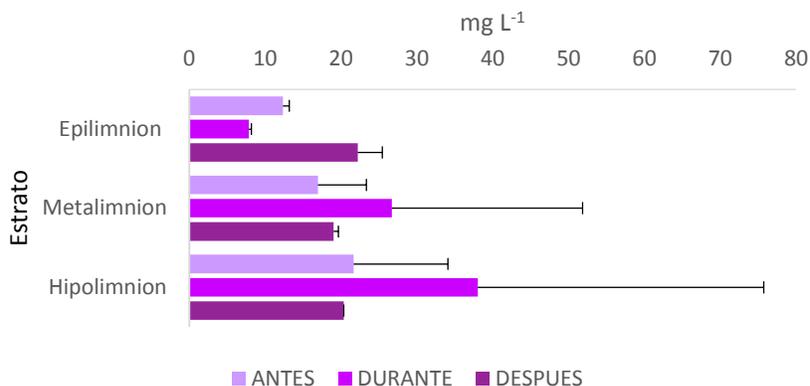


Fig. 16.- Concentración promedio y desviación estándar de las concentraciones de silicatos durante el periodo de estudio.

### Densidad de picoplancton heterótrofo (PPH)

Para la densidad del PPH el mes de julio se observó una tendencia a aumentar hacia el fondo de la columna de agua; donde en la zona del hipolimnion se registró la mayor cantidad de células, con una concentración promedio de  $1.07 \pm 1.54$  millones Cél. mL<sup>-1</sup>. Durante el evento de emblanquecimiento, se registró la mayor abundancia de células en la zona del metalimnion con una concentración promedio de  $1.15 \pm 1.14$  millones Cél. mL<sup>-1</sup>, con tendencia a disminuir hacia la zona del hipolimnion. Septiembre mostró la misma tendencia que el mes de julio; en donde la abundancia general de células tuvo concentraciones más altas que el mes de julio; la abundancia aumentó hacia la zona del hipolimnion con una concentración de  $1.16 \pm 1.41$  millones Cél. mL<sup>-1</sup> (Fig. 17).

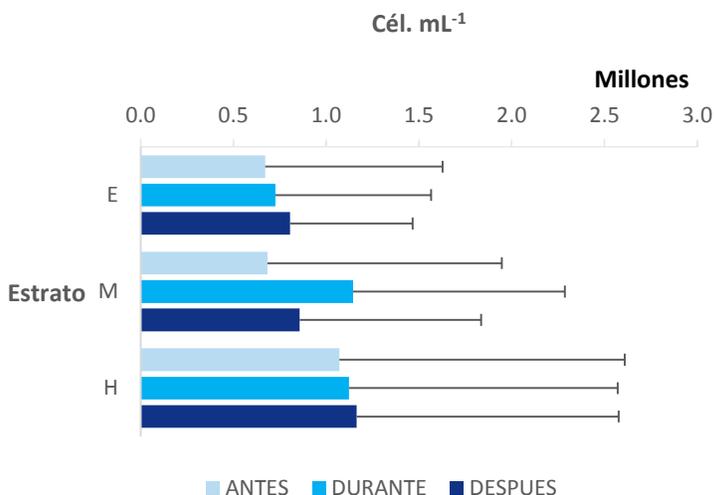


Fig. 17.- Promedio y desviación estándar de la densidad de PPH durante el periodo de estudio.

De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis ( $K= 18.6547$ ,  $p<0.05$ ) se registraron diferencias significativas (Fig. 18). Estas diferencias correspondieron al metalimnion, donde los tres muestreos tuvieron diferencias entre sí. La zona del hipolimnion las diferencias se presentaron antes y después del fenómeno de emblanquecimiento.

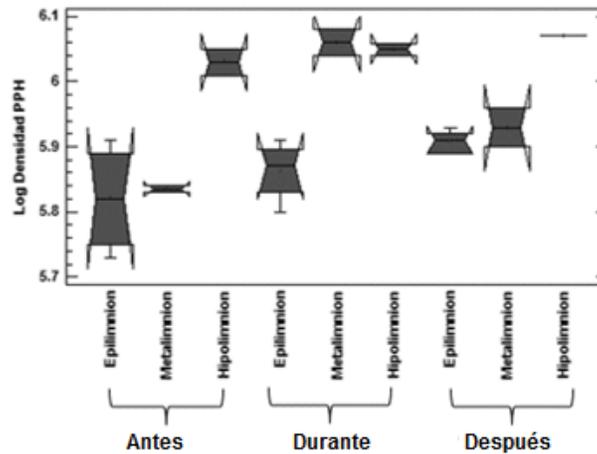


Fig. 18.- Diagrama de caja y bigote con muesca de log de la densidad de PPH durante el periodo de estudio.

### Densidad de picoplancton autotrófico (PPA)

Las densidades de picoplancton autotrófico (PPA) en el mes de julio presentaron una tendencia a aumentar hacia la zona del metalimnion, en donde se registró la mayor abundancia de PPA con una concentración promedio de  $275 \pm 253$  mil Cél.  $\text{ml}^{-1}$ . Durante el fenómeno de emblanquecimiento, las densidades de PPA presentaron una tendencia a disminuir hacia el fondo del sistema, en la zona de epilimnion se registró la mayor abundancia con una concentración promedio de  $156 \pm 211$  mil Cél.  $\text{ml}^{-1}$ . Septiembre presentó la misma tendencia a disminuir hacia la parte del hipolimnion, la concentración máxima se ubicó en la zona del epilimnion con una concentración de  $123 \pm 120$  mil Cél.  $\text{mL}^{-1}$  (Fig.19).

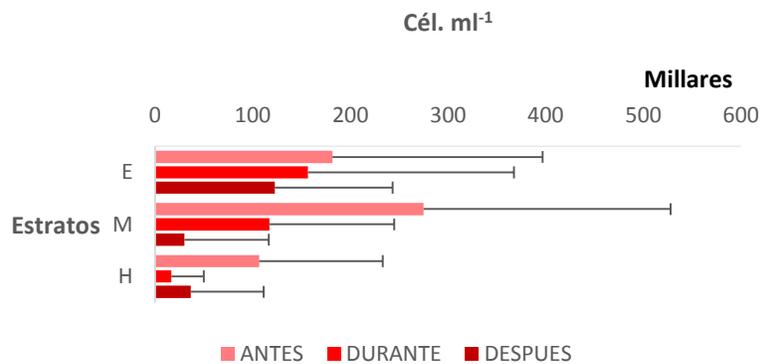


Fig. 19.- Promedio y desviación estándar de la densidad de PPA durante el periodo de estudio.

La prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas ( $K= 16.85$ ,  $p<0.05$ ) en el epilimnion entre los muestreos correspondientes al antes y después del fenómeno de emblanquecimiento. En el metalimnion e hipolimnion, los tres muestreos fueron diferentes entre sí (Fig. 20).

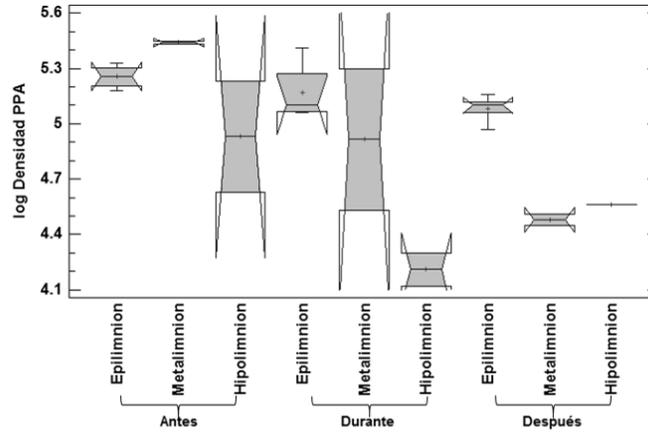


Fig. 20.- Diagrama de caja y bigote con muesca de log de la densidad de PPA durante el periodo de estudio.

### Biomasa de picoplancton heterotrófico (PPH)

La biomasa que se registró para los meses de julio y agosto tuvo una tendencia a disminuir hacia el fondo del sistema, las mayores concentraciones se registraron en la zona del hipolimnion con una concentración promedio de  $11.9 \pm 18.6 \mu\text{g Corg. L}^{-1}$  para el mes de julio y una concentración promedio de  $22.9 \pm 47.5 \mu\text{g Corg. L}^{-1}$  para el mes de agosto. En el mes de septiembre hubo una tendencia a aumentar hacia el metalimnion donde se registró la mayor cantidad de biomasa con un promedio de  $15.9 \pm 26.1 \mu\text{g Corg. L}^{-1}$ , posteriormente el contenido de carbono disminuyó hacia el hipolimnion (Fig. 21).

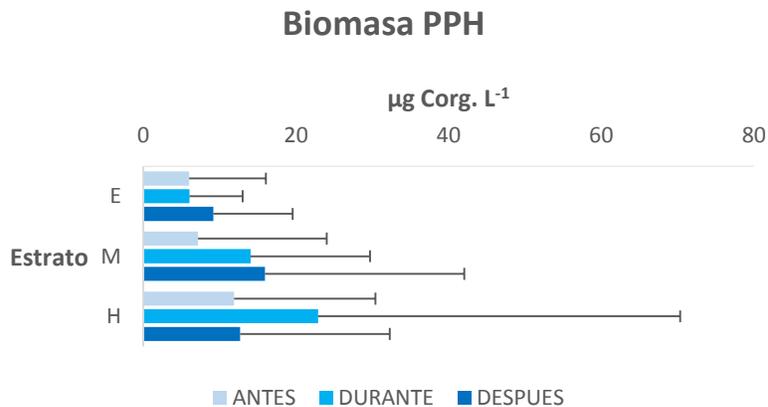


Fig. 21.- Promedio y desviación estándar de la biomasa de PPH durante el periodo de estudio.

Se registraron diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Kruskal.Walis ( $K= 20.42$ ,  $p<0.05$ ). En el epilimnion, después del fenómeno de emblanquecimiento presentó diferencias con respecto a los demás muestreos. En el metalimnion, antes del fenómeno de emblanquecimiento presentó diferencias con respecto a los dos muestreos posteriores. Y con respecto al hipolimnion, las diferencias fueron significativas entre los tres muestreos (Fig. 22).

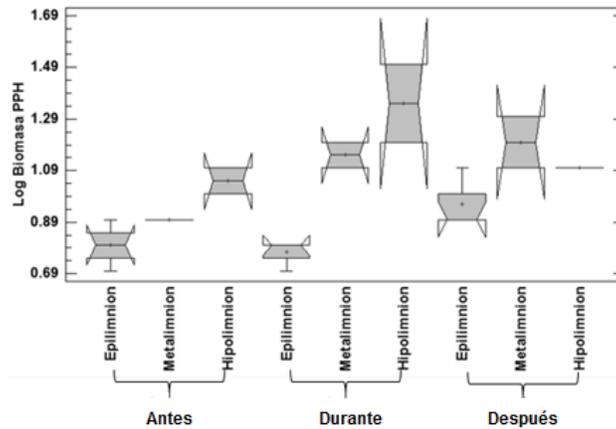


Fig. 22.- Diagrama de caja y bigote con muesca de log biomasa de PPH durante el periodo de estudio.

### Biomasa PPA

Para las concentraciones de biomasa de PPA, los meses de julio y agosto tuvieron la misma tendencia a aumentar hacia el metalimnion, con concentraciones promedio de  $35.7 \pm 24.6 \mu\text{g Corg. L}^{-1}$  y  $45.6 \pm 14.7 \mu\text{g Corg. L}^{-1}$  respectivamente. En septiembre las concentraciones fueron casi constantes, tendiendo a aumentar hacia el fondo del sistema con un valor promedio de  $5.2 \pm 7.0 \mu\text{g Corg. L}^{-1}$  (Fig. 23).

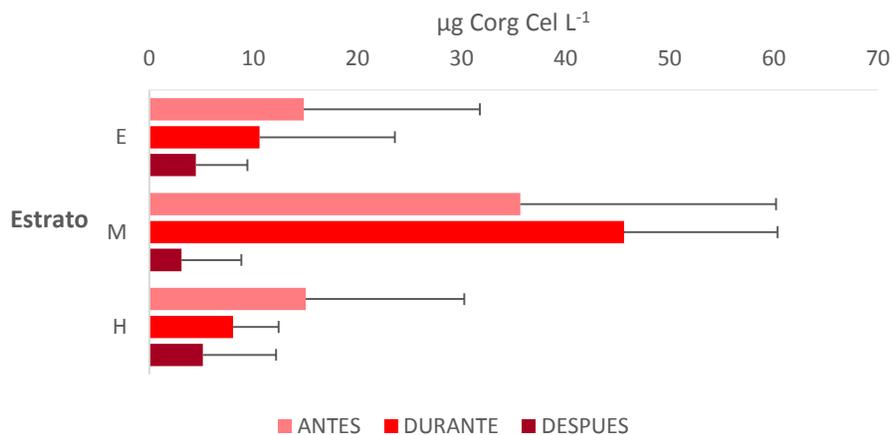


Fig. 23.- Promedio y desviación estándar del contenido de carbono de PPA durante el periodo de estudio.

Se encontraron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis ( $K=18.40$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 24). El epilimnion, metalimnion e hipolimnion presentaron diferencias significativas entre sí.

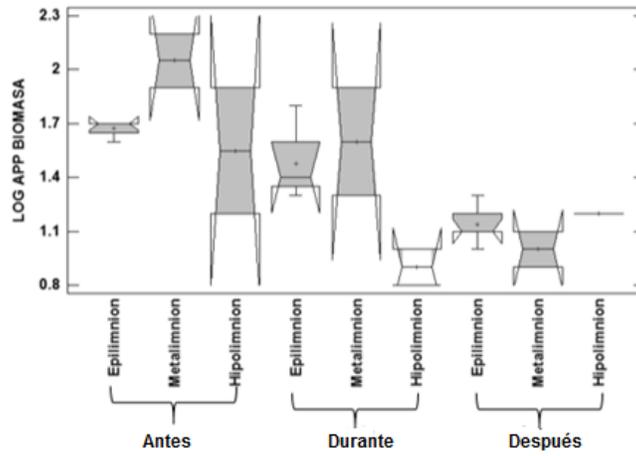


Fig. 24.- Diagrama de caja y bigote con muesca de log biomasa de PPA durante el periodo de estudio.

## Detección bacteriana mediante la técnica de CARD-FISH

### Dominio *Bacteria*

Los porcentajes que se presentaron para el mes de julio se mantuvieron casi homogéneos a lo largo de la columna de agua con porcentajes que fluctuaron entre 39.5 a 41.9 %. El mayor porcentaje se registró en el epilimnion con un porcentaje promedio de  $41.9 \pm 8.5$  %. En cuanto a densidad del dominio *bacteria* las concentraciones se mantuvieron constantes en el epilimnion y metalimnion, con una tendencia a aumentar hacia el fondo del sistema; con una concentración promedio de  $447 \pm 311$  mil Cél. mL<sup>-1</sup>.

Para el mes de agosto, los porcentajes de hibridación en epilimnion y metalimnion no presentaron mucha fluctuación, siendo el metalimnion el estrato con mayor porcentaje de hibridación donde, de igual manera, se registró la mayor abundancia de células, con una concentración de  $580 \pm 583$  mil Cél. mL<sup>-1</sup>.

En septiembre la abundancia tuvo un comportamiento a disminuir hacia el metalimnion; sin embargo, en el fondo del sistema registró la mayor abundancia con un valor de  $489 \pm 403$  mil Cél. mL<sup>-1</sup> (Fig. 25).

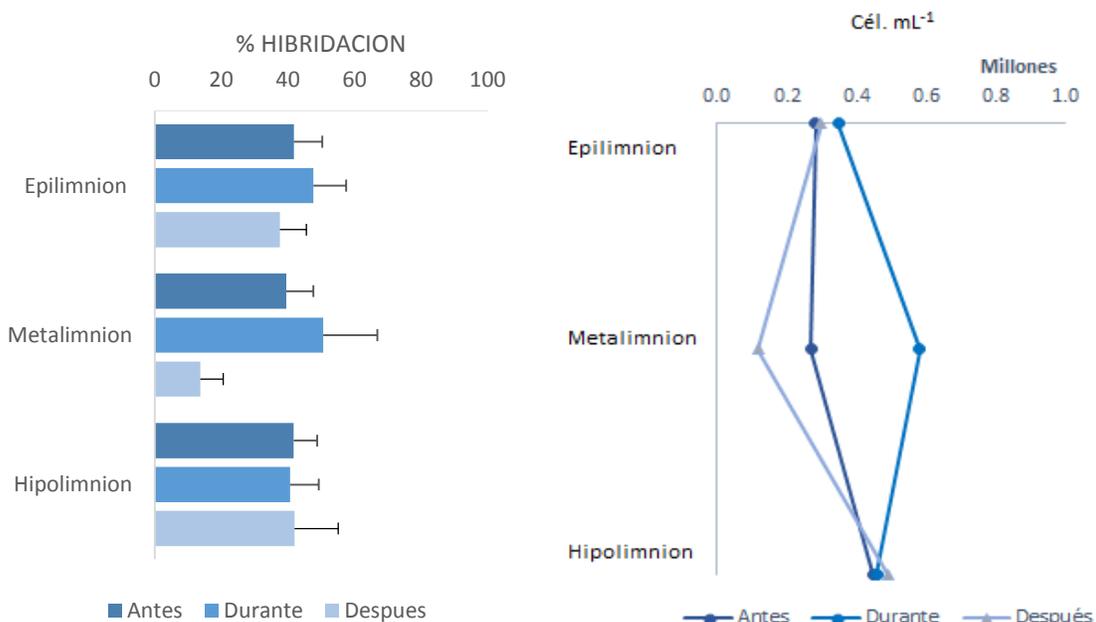


Fig. 25.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda EUB I\_III.

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas ( $K=19.36$ ,  $p<0.05$ ) entre el epilimnion correspondiente a los muestreos del durante y después del fenómeno de emblanquecimiento. Las densidades en el metalimnion tuvieron diferencias significativas entre sí. Las densidades después del fenómeno fueron diferentes con respecto a los muestreos anteriores (Fig. 26).

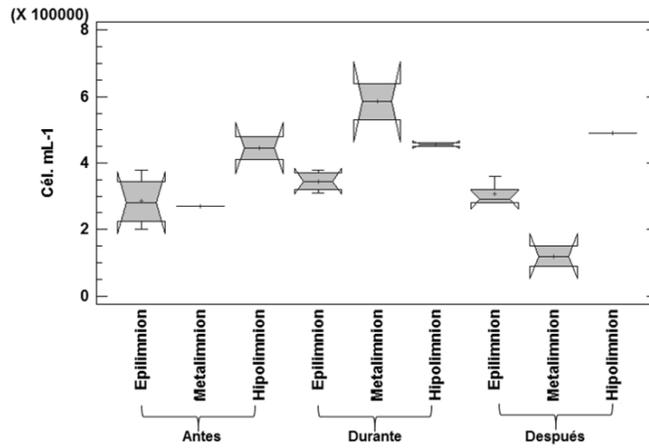


Fig. 26.- Diagrama de caja y bigote con muesca de la densidad de EUB I\_III durante el periodo de estudio.

**Filo: Proteobacteria**

**Clase: Alfaproteobacteria.**

Los porcentajes de hibridación que se registraron durante los tres meses de muestreo de *Alfaproteobacteria* únicamente se ubicaron en la zona del epilimnion con porcentajes de hibridación que van de los 0.5 al 2.2 %. Cabe destacar que en el mes de agosto se registró el mayor porcentaje y la mayor abundancia de células durante el periodo de estudio, con una densidad de  $15,800 \pm 13,700$  Cél. mL<sup>-1</sup> (Fig. 27). El análisis de varianza indicó no haber diferencias significativas ( $F_{(2, 5)} = 2.66$   $p > 0.05$ ) entre las medias del logaritmo de *Alfaproteobacteria*.

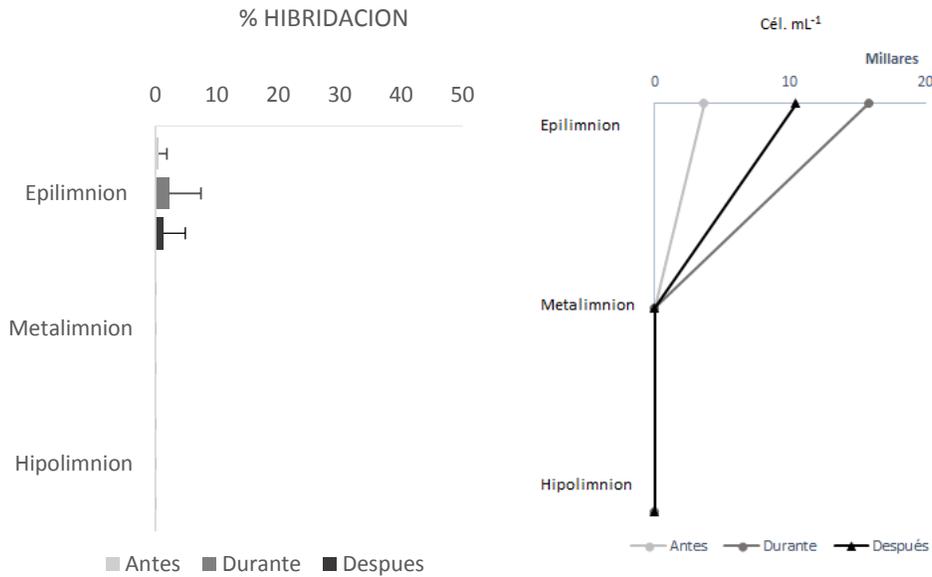


Fig. 27.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda ALF986.

**Género: *Candidatus pelagibacter* LD12**

Dentro de la clase *Alfaproteobacteria*, se incluyó el género *Candidatus pelagibacter* LD12. Este género estuvo presente en toda la columna de agua. En julio se registró la mayor abundancia en la zona del epilimnion y tuvo una tendencia a disminuir hacia el hipolimnion. Durante el mes de agosto las densidades se mantuvieron constantes en la zona del epilimnion y metalimnion con tendencia a aumentar hacia el hipolimnion, en donde se registró la mayor abundancia de  $109,000 \pm 84,800$  Cél  $\text{ml}^{-1}$ . En septiembre la densidad bacteriana se mantuvo casi constante en el epilimnion y metalimnion, sin embargo, no hubo presencia de este grupo en la zona del hipolimnion (Fig. 28). No se encontraron diferencias significativas entre estratos para las densidades del género *Candidatus pelagibacter* LD12 de acuerdo al análisis de varianza ( $F_{(8, 15)} = 1.89, p > 0.05$ ).

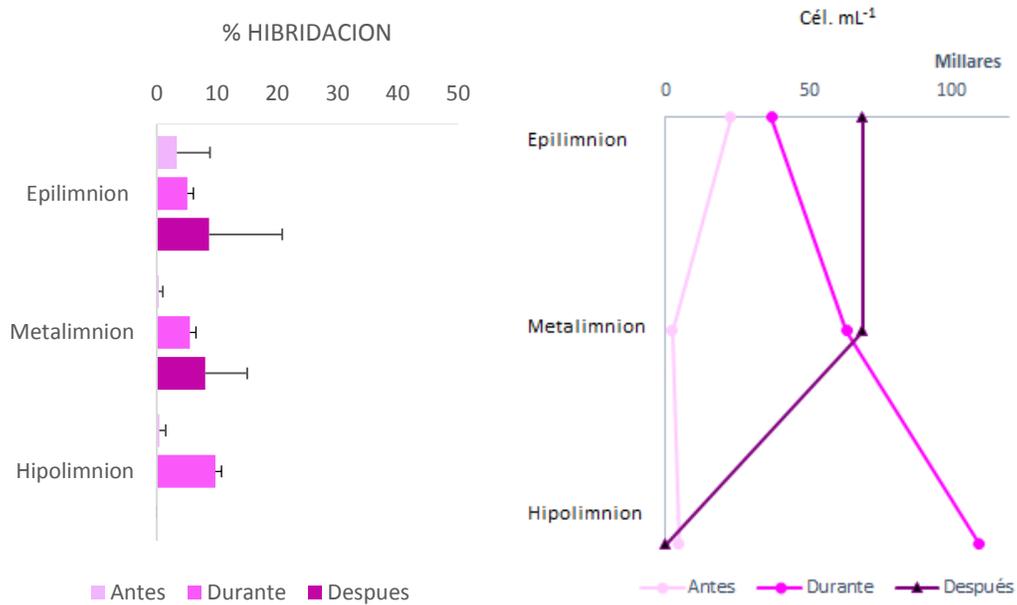


Fig. 28.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda LD12-121.

**Género: *Paracoccus***

Dentro de la clase *Alfaproteobacteria* se evaluó la abundancia del género *Paracoccus*. Los tres meses de estudio tuvieron la misma tendencia a aumentar hacia el hipolimnion. Donde septiembre fue el mes con la mayor abundancia en el hipolimnion, con una densidad de  $143,000 \pm 118,000$  Cél.  $\text{ml}^{-1}$  (Fig. 29). De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis no se encontraron diferencias significativas entre las medianas de las densidades del género *Paracoccus* ( $K = 13.7794, p > 0.05$ ).

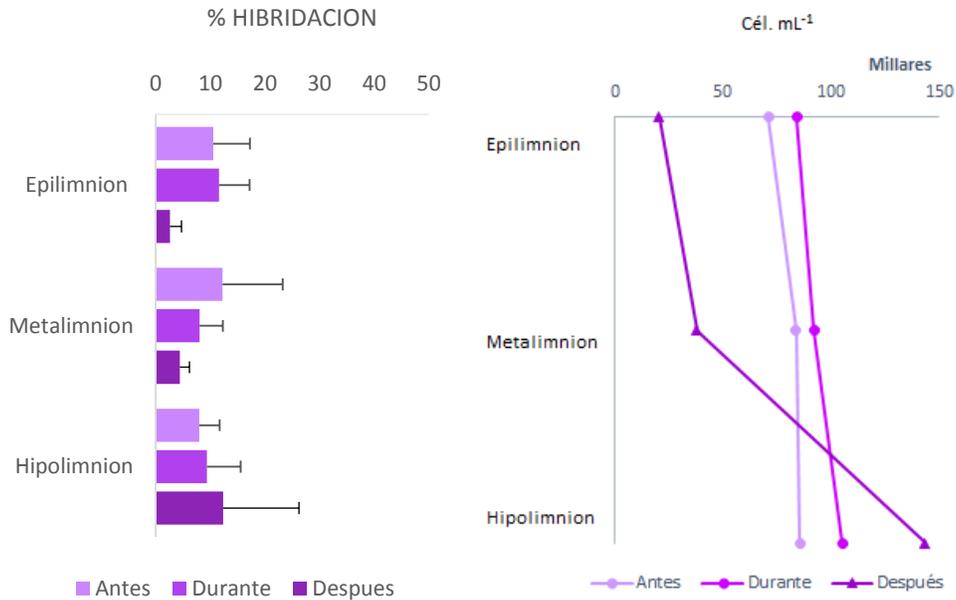


Fig. 29.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda PAR1457.

#### Clase: *Betaproteobacteria*

La distribución de *Betaproteobacteria* presentó diferentes comportamientos durante los meses de estudio. En julio tuvo una tendencia a aumentar hacia el hipolimnion, donde se registró la mayor abundancia de células con una concentración promedio de  $211,000 \pm 147,000$  Cél. mL<sup>-1</sup>. Durante el evento de emblanquecimiento, los porcentajes y densidades disminuyeron drásticamente en los dos primeros estratos del sistema y tuvieron una tendencia a aumentar considerablemente hacia la zona del hipolimnion en donde se registró la mayor densidad de células. En septiembre la mayor densidad de células se ubicó en el hipolimnion con una concentración de  $133,000 \pm 109,000$  Cél. mL<sup>-1</sup> (Fig. 30).

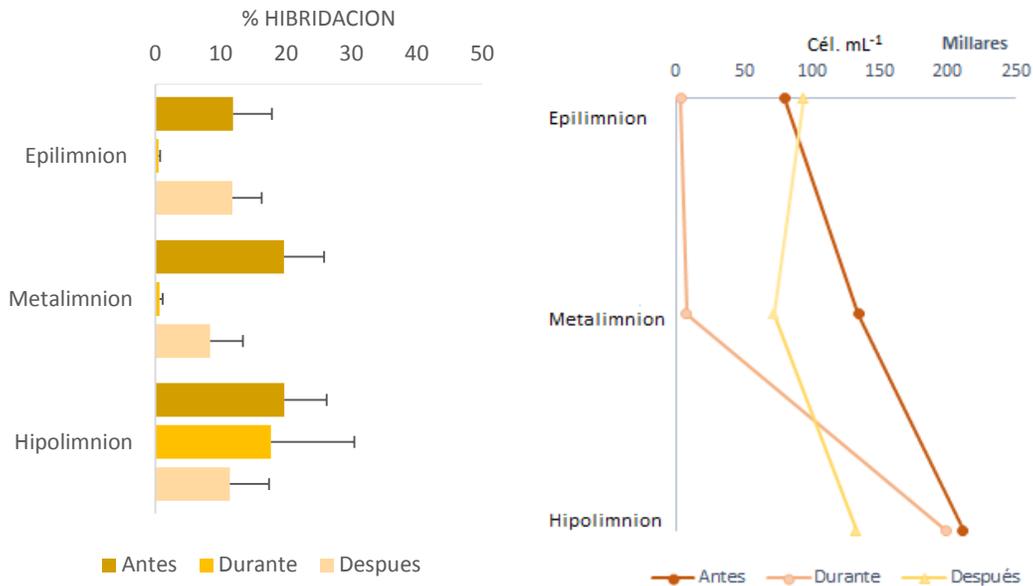


Fig. 30.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda BET42a.

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas ( $K=16.46$ ,  $p<0.05$ ) entre las medianas de log de *Betaproteobacteria*. Antes y después del fenómeno de emblanquecimiento, las zonas correspondientes al epilimnion y metalimnion presentaron diferencias con respecto al muestreo durante el fenómeno. El hipolimnion presentó diferencias antes y durante el fenómeno de emblanquecimiento (Fig. 31).

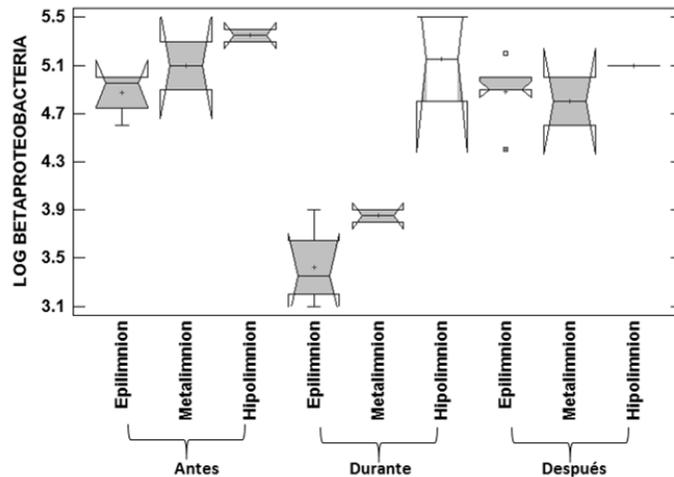


Fig. 31.- Diagrama de caja y bigote con muesca de log BET42a durante el periodo de estudio.

### Clase: *Gammaproteobacteria*

El comportamiento de *Gammaproteobacteria* durante el mes de julio presentó una tendencia a aumentar su densidad hacia el hipolimnion, con una densidad de  $64,900 \pm 45,200$  Cél. mL<sup>-1</sup>. Durante el mes de agosto presentó una tendencia a disminuir hacia el fondo del sistema, sin embargo, las densidades permanecieron casi constantes en los tres estratos de la columna de agua. En septiembre la tendencia que presentó fue a aumentar hacia el hipolimnion con una abundancia de  $118,000 \pm 96,900$  Cél. mL<sup>-1</sup>(Fig. 32). No se encontraron diferencias significativas para las densidades de *Gammaproteobacteria* de acuerdo al análisis de varianza ( $F_{(8, 15)} = 0.92, p > 0.05$ ).

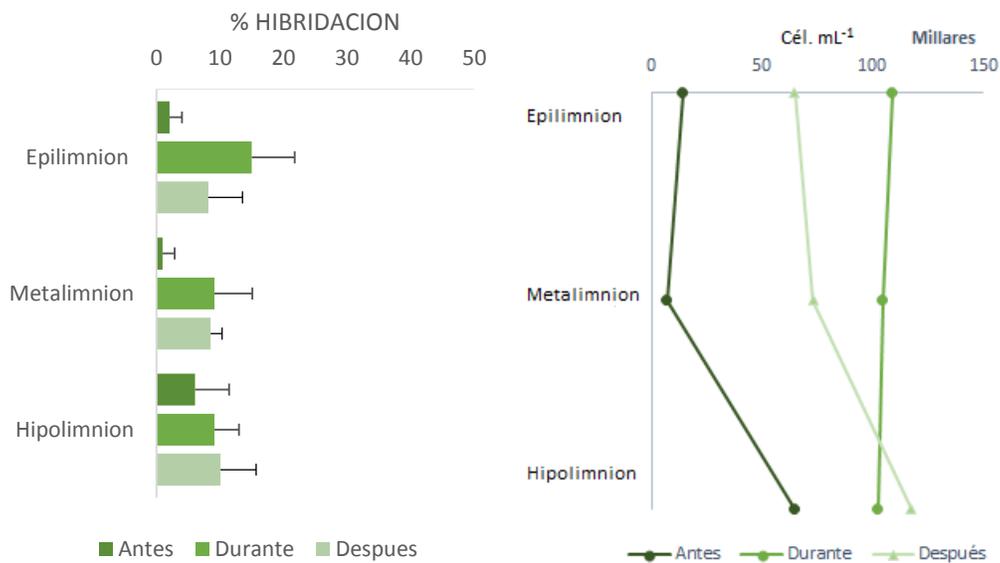


Fig. 32.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda GAM42a.

### Clase: *Deltaproteobacteria*

La sonda SRB385 es utilizada para la detección de bacterias sulfato-reductoras (BSR), el cual es un taxa bacteriano que se encuentra dentro de la clase *Deltaproteobacteria* (Amann *et al.*, 1990). Los porcentajes de hibridación tuvieron una tendencia a aumentar hacia la zona del hipolimnion, con porcentajes que fluctuaban entre 0.1 a 0.4 %. En el mes de septiembre, los porcentajes y las densidades aumentaron, con porcentajes que se encontraban entre 4.7 y 7.5 % con una tendencia a ir aumentando hacia el hipolimnion, donde la máxima abundancia fue de  $87,200 \pm 71,800$  Cél. mL<sup>-1</sup> ubicada en este estrato (Fig.33).

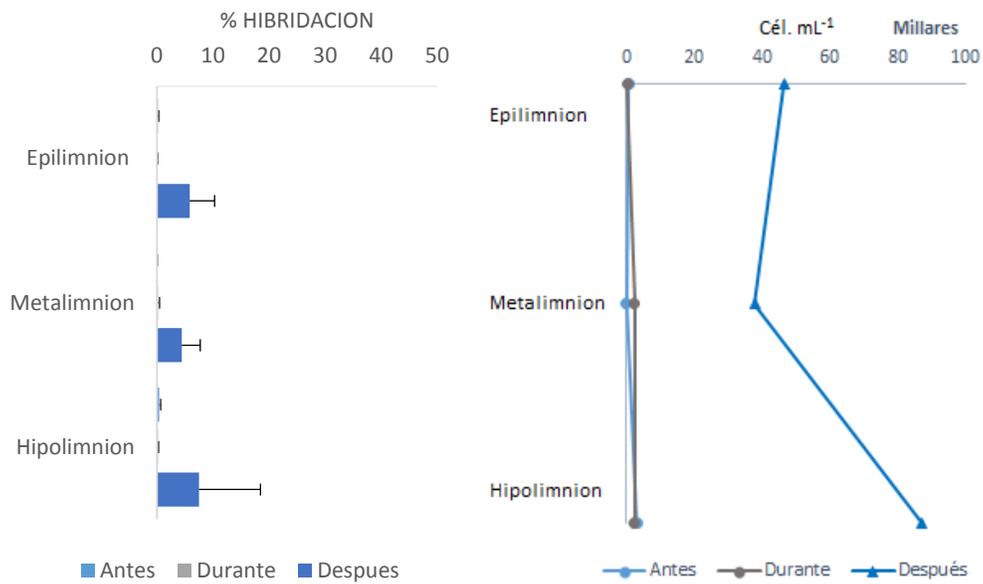


Fig. 33.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda SRB385.

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Walis, se presentaron diferencias significativas entre las medianas de log BSR ( $K= 17.81$ ,  $p<0.05$ ). Estas diferencias se encontraron durante los tres muestreos; las zonas del epilimnion, metalimnion e hipolimnion fueron diferentes entre sí (Fig. 34).

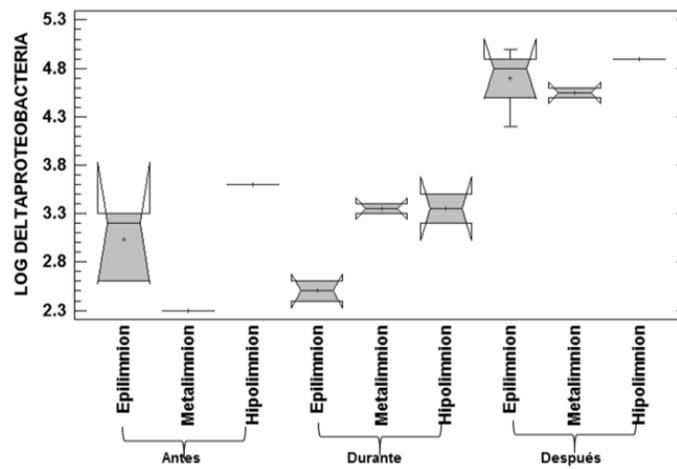


Fig. 34.- Diagrama de caja y bigote con muesca de log SRB385 durante el periodo de estudio.

### Filo: *Actinobacteria*

Durante el mes de julio, el filo *Actinobacteria* presentó hibridación únicamente en el epilimnion. En cuanto a los siguientes dos meses, presentó una tendencia a aumentar su abundancia hacia el fondo del sistema. El mes de septiembre registró mayor abundancia celular ubicada en el hipolimnion con un promedio de  $244,00 \pm 201,000$  Cél. mL<sup>-1</sup> (Fig. 35). De acuerdo al análisis de varianzas, no se presentaron diferencias significativas ( $F_{(5,3)} = 1.17$ ,  $p > 0.05$ ) entre los muestreos.

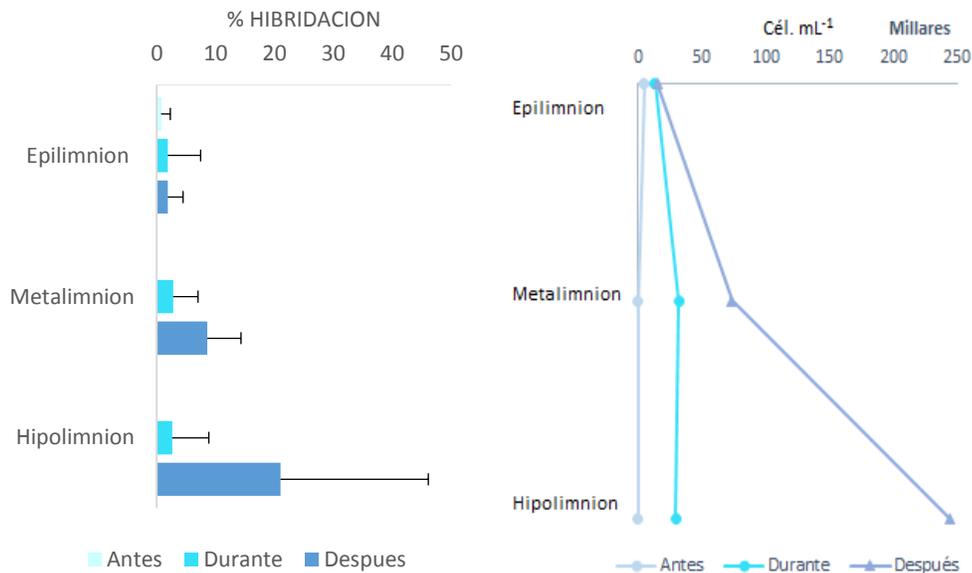


Fig. 35.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda HGC69a.

### Filo: *Bacteroidetes*

Durante el mes de julio la densidad de bacteroidetes tuvo una tendencia a disminuir hacia el metalimnion e incrementó las concentraciones hacia el hipolimnion. En agosto y septiembre la tendencia fue a aumentar hacia el fondo del sistema, en donde la mayor abundancia, registrada en el hipolimnion fue de  $118,000 \pm 97,200$  Cél. mL<sup>-1</sup> en el mes de septiembre (Fig. 36). De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, no se encontraron diferencias significativas ( $K = 15.41$ ,  $p > 0.05$ ) en las densidades de *Bacteroidetes*.

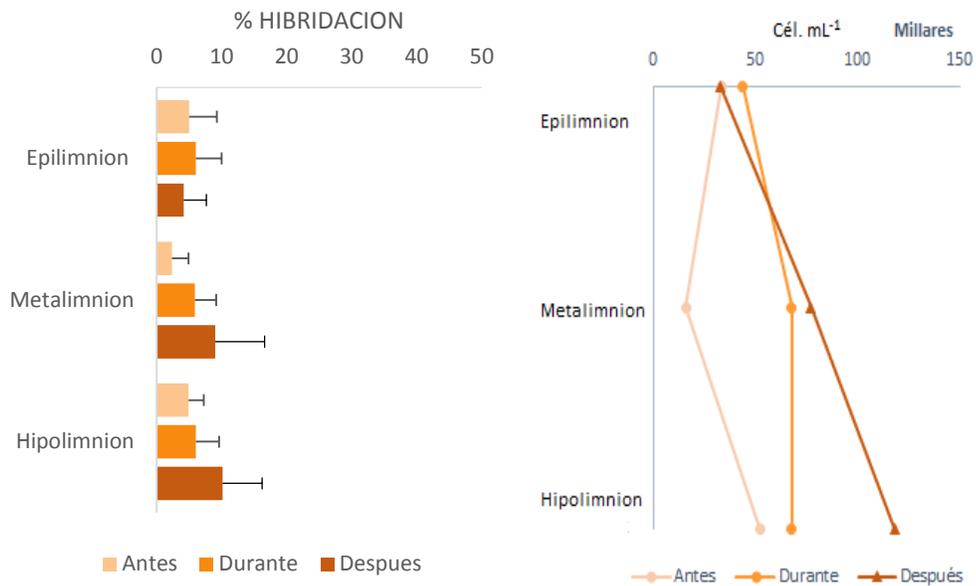


Fig. 36.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda CF319.

**Filo: *Planctomycetes***

**Familia: *Planctomycetaceae***

Durante julio y agosto la distribución de *Planctomycetaceae* presentó una tendencia a aumentar hacia el hipolimnion. Septiembre tuvo una tendencia a aumentar hacia la zona del metalimnion, donde se ubicó la mayor abundancia de células con una concentración promedio de  $87,400 \pm 84,900$  Cél. mL<sup>-1</sup> (Fig. 37). De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis, no se encontraron diferencias significativas ( $K= 13.7755$ ,  $p>0.05$ ) entre las medianas de las densidades de *Planctomycetaceae*.

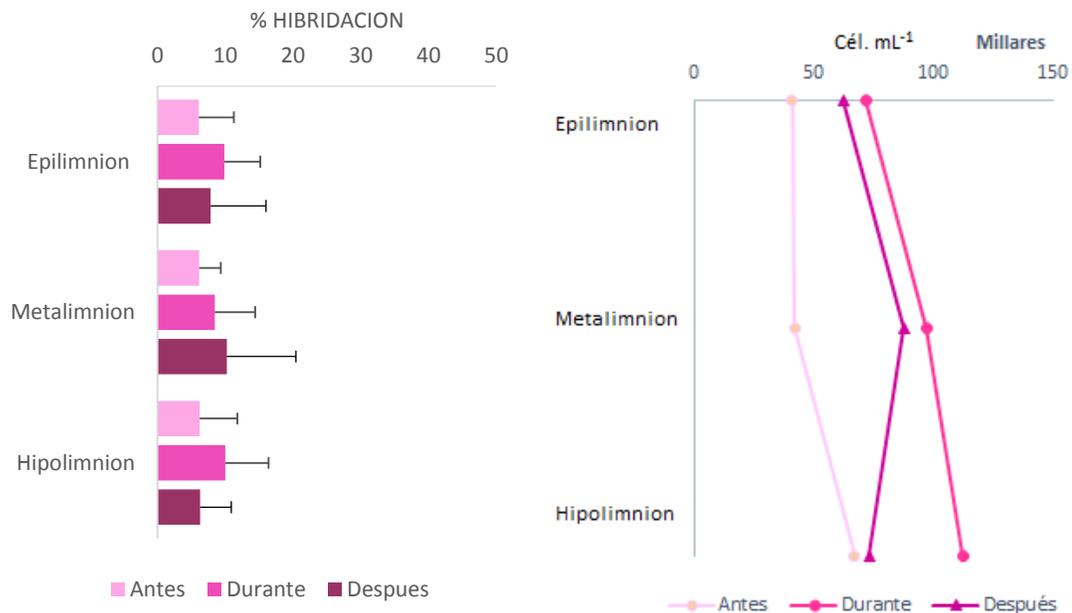


Fig. 37.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda PLA886.

### Dominio *Archaea*

Los porcentajes de hibridación para el dominio *Archaea* en el mes de julio presentaron un comportamiento creciente hacia el metalimnion, en donde se registró la mayor abundancia de células  $45,300 \pm 41,100$  Cél. mL<sup>-1</sup>.

Durante el fenómeno de emblanquecimiento, el comportamiento de *Archaea* tuvo una tendencia a ser creciente hacia la zona del hipolimnion con una concentración de  $104,000 \pm 105,000$  Cél. mL<sup>-1</sup>.

El mes de septiembre mostró una tendencia a aumentar hacia la zona del hipolimnion, con una abundancia de  $49,000 \pm 40,300$  Cél. mL<sup>-1</sup> (Fig. 38). Para las abundancias del dominio *Archaea* no se encontraron diferencias significativas ( $F_{(8, 7)} = 1.71$   $p > 0.05$ ) de acuerdo al análisis de varianza.

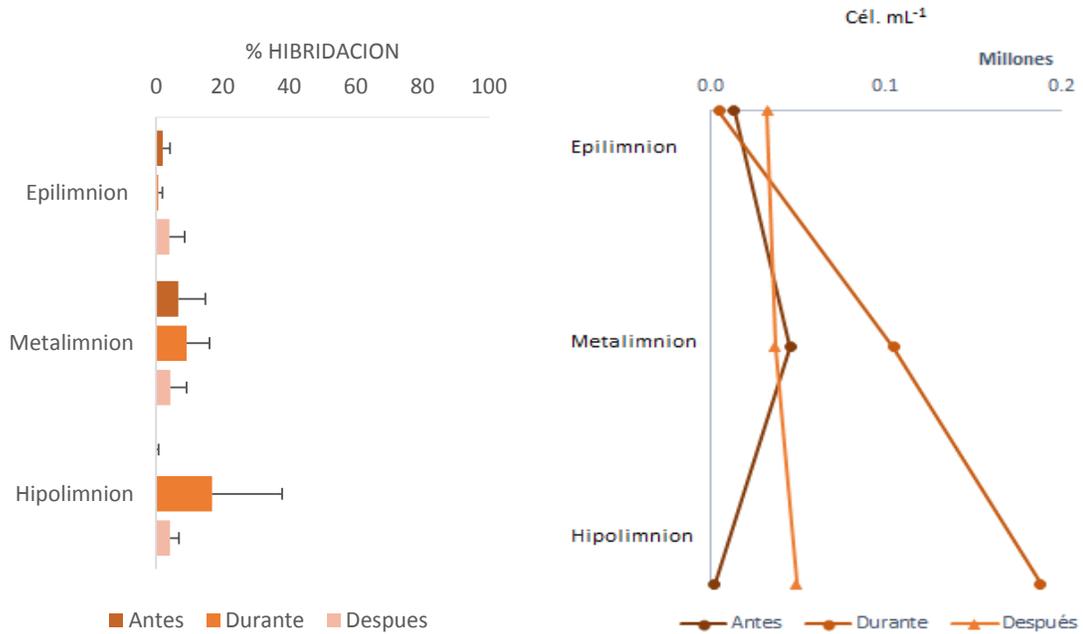


Fig. 38.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda ARC915.

**Filo: *Thaumarchaeota***

Para las abundancias del filo *Thaumarchaeota*, julio registró abundancia bacteriana únicamente en el hipolimnion, con una densidad de  $28,300 \pm 19,700$  Cél. mL<sup>-1</sup>. En el mes de agosto hubo presencia de células en el epilimnion e hipolimnion, siendo este último estrato la zona donde se registró la mayor abundancia, con una concentración de  $40,900 \pm 31,700$  Cél. mL<sup>-1</sup>. Para el mes de septiembre este grupo de arqueas estuvo presente en toda la columna de agua con una tendencia a aumentar hacia el hipolimnion, en donde se registró una abundancia promedio de  $21,300 \pm 17,600$  Cél. mL<sup>-1</sup> (Fig. 39). De acuerdo al análisis de varianza, no se presentaron diferencias significativas durante los meses de estudio ( $F_{(8, 15)} = 0.93$   $p > 0.05$ ).

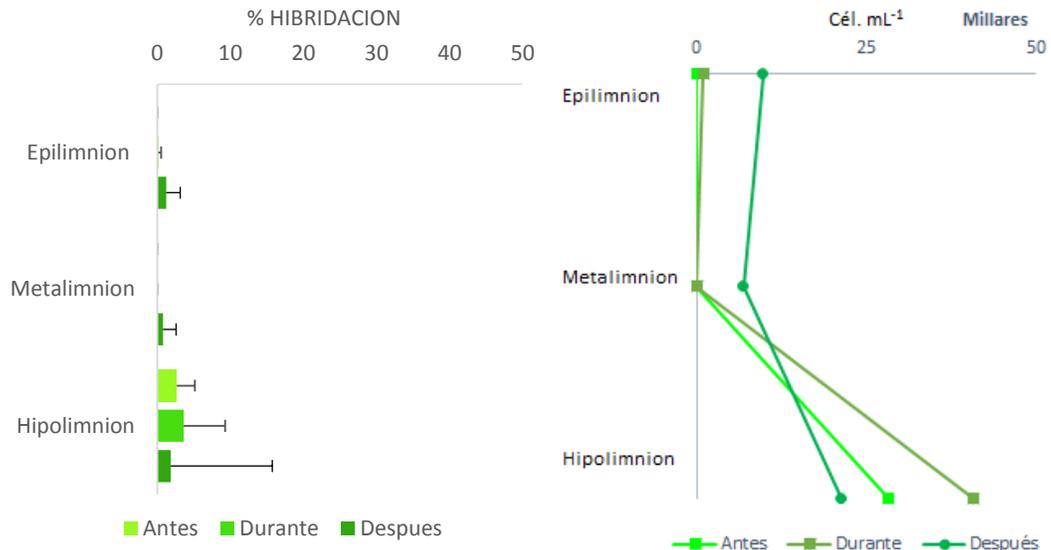


Fig. 39.- Porcentaje de hibridación y densidad de células hibridadas con la sonda CREN537.

### Correlación de variables

Una vez realizadas las pruebas de Kruskal-Wallis y Tukey para cada uno de los parámetros, nutrientes y grupos bacterianos, se realizó un análisis de variables múltiples en donde se determinó la correlación entre las variables físicas y químicas con las biológicas.

Para el dominio *Eubacteria* únicamente presentó una relación directa con respecto a las concentraciones de nitritos ( $r_s=0.52$ ,  $p<0.05$ ) (Tabla 4).

En cuanto a la densidad de PPA tuvo una relación positiva con respecto a la temperatura ( $r_s=0.58$ ,  $p<0.05$ ) y a la concentración de sulfatos ( $r_s=0.40$ ,  $p<0.05$ ) (Tabla 4).

La clase *Alfaproteobacteria* no presentó relación con respecto a otros grupos bacterianos ni con algún nutriente. Únicamente presentó una relación directa con respecto a la concentración de oxígeno disuelto ( $r_s=0.57$ ,  $p<0.05$ ), pH ( $r_s=0.50$ ,  $p<0.05$ ), carbonatos ( $r_s=0.55$ ,  $p<0.05$ ) y una correlación negativa con la concentración de bicarbonatos ( $r_s=-0.42$ ,  $p<0.05$ ). El linaje de LD12-121 únicamente presentó relaciones negativas con respecto a la dureza de calcio ( $r_s=-0.44$ ,  $p<0.05$ ) y con respecto a la concentración de nitritos ( $r_s=-0.43$ ,  $p<0.05$ ). Por otro lado, el género *Paracoccus* tuvo una relación positiva con las concentraciones de nitratos ( $r_s=0.58$ ,  $p<0.05$ ) y amonio ( $r_s=0.50$ ,  $p<0.05$ ) (Tabla 4).

La clase *Betaproteobacteria* presentó una relación positiva con respecto a la profundidad ( $r_s=0.45$ ,  $p<0.05$ ), a la concentración de bicarbonatos ( $r_s=0.49$ ,  $p<0.05$ ) y silicatos ( $r_s=0.47$ ,  $p<0.05$ ). Por otra parte, la relación inversa que presentó correspondió con la temperatura

( $r_s = -0.44$ ,  $p < 0.05$ ), pH ( $r_s = -0.52$ ,  $p < 0.05$ ) y a la concentración de nitratos ( $r_s = -0.72$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

En cuanto a la clase de *Gammaproteobacteria*, no tuvo ninguna relación con los parámetros físicos y químicos, nutrientes o grupo bacteriano ya que el programa estadístico indicó no haber alguna correlación significativa.

Dentro de la clase *Deltaproteobacteria*, la subdivisión de las bacterias reductoras del azufre tuvo una relación inversa con respecto a la conductividad eléctrica ( $r_s = -0.54$ ,  $p < 0.05$ ) y a las concentraciones de nitritos ( $r_s = -0.53$ ,  $p < 0.05$ ), fosfatos ( $r_s = -0.44$ ,  $p < 0.05$ ) y sulfatos ( $r_s = -0.56$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

El filo *Actinobacteria* únicamente presentó una relación positiva con respecto a la concentración de carbonatos ( $r_s = 0.47$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

El análisis de correlación para el filo *Bacteroidetes* presentó una relación positiva con respecto a la concentración de amonio ( $r_s = 0.41$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, tuvo una relación inversa en cuanto a la concentración de oxígeno disuelto ( $r_s = -0.41$ ,  $p < 0.05$ ), conductividad eléctrica ( $r_s = -0.41$ ,  $p < 0.05$ ) y la dureza de calcio ( $r_s = -0.44$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

La familia *Plantomycetaceae* tuvo una relación inversa con las concentraciones de oxígeno disuelto ( $r_s = -0.45$ ,  $p < 0.05$ ) y dureza total ( $r_s = -0.47$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

En cuanto al dominio *Archaea* únicamente presentó una relación directa con la profundidad ( $r_s = 0.44$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

El filo *Thaumarchaeota* presentó una relación inversa con respecto a la dureza total ( $r_s = -0.54$ ,  $p < 0.05$ ) y dureza de calcio ( $r_s = -0.43$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

El PPH presentó una correlación negativa con respecto al pH ( $r_s = -0.45$ ,  $p < 0.05$ ), a la temperatura ( $r_s = -0.63$ ,  $p < 0.05$ ) y con el oxígeno disuelto ( $r_s = -0.60$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, tuvo una correlación positiva con respecto a la concentración de silicatos ( $r_s = 0.42$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla 4).

Tabla 4.- Resumen de correlaciones entre grupos bacterianos y las variables físicas y químicas, así como con los nutrientes evaluados en este estudio. Las siglas N.S. indican una correlación no significativa ( $p>0.05$ ). Los grupos están denotados por el nombre de la sonda utilizada para realizar la hibridación de CARD-FISH como se describió anteriormente. El color azul indica una correlación positiva y el color rojo indica una correlación negativa.

	EUB I_III	APP	ALF968	LD12-121	PAR1457	BET42a	SRB385	HGC69a	CF319	PLA886	ARC915	CREN537	HPP
Profundidad	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.45	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.44	N.S.	N.S.
Temperatura	N.S.	0.58	N.S.	N.S.	N.S.	-0.44	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.63
O.D.	N.S.	N.S.	0.57	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.41	-0.45	N.S.	N.S.	-0.60
pH	N.S.	N.S.	0.50	N.S.	N.S.	-0.52	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Conductividad	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.54	N.S.	-0.41	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Salinidad	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
CO <sub>2</sub>	N.S.	N.S.	0.55	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.47	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
HCO <sub>3</sub>	N.S.	N.S.	-0.42	N.S.	N.S.	0.49	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Dureza total	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.47	N.S.	-0.54	N.S.
Dureza de calcio	N.S.	N.S.	N.S.	-0.44	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.44	N.S.	N.S.	-0.43	N.S.
Nitratos	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.58	-0.72	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Nitritos	0.52	N.S.	N.S.	-0.43	N.S.	N.S.	-0.53	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Amonio	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.50	N.S.	N.S.	N.S.	0.41	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
FSR	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.44	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Sulfatos	N.S.	0.40	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-0.56	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Silicatos	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.47	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.42

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El lago La Preciosa presentó una dinámica de monomixis cálida, con un periodo de mezcla en invierno (de finales de diciembre a finales de marzo) y un periodo de estratificación durante los meses restantes del año, lo que coincide con lo reportado por Marcos & Reyes (2012). Esta dinámica es común en lagos tropicales y se caracteriza por no haber una disminución de la temperatura por debajo de los 4°C durante el invierno hemisférico (Wetzel, 2001).

Muchos lagos presentan estratificación vertical en sus masas de agua, al menos por algunos periodos de tiempo. Las diferencias de densidad en los cuerpos de agua facilitan la evolución de cambios químicos con consecuencias para los organismos del lago. La temperatura y sustancias disueltas contribuyen a las diferencias de densidad del agua y las condiciones atmosféricas contribuyen a la temperatura de la superficie del agua. Como resultado de esto se puede establecer una estratificación térmica durante la temporada cálida si un lago es suficientemente profundo (Boehrer *et al.*, 2008). De acuerdo con los perfiles de temperatura que se realizaron durante el estudio, el lago La Preciosa se encontraba en la fase de estratificación bien establecida.

Autores como Thompson *et al.* (1997) y Sondi & Juračić (2010) relacionan la temperatura como un factor que puede explicar el fenómeno de emblanquecimiento, particularmente en zonas cálidas, tropicales y subtropicales (Cloud, 1962; Sondi, 2010). Sin embargo, en este estudio, la temperatura no fue el factor determinante para el desarrollo del fenómeno de emblanquecimiento, ya que no hubo un incremento considerable de este parámetro durante los meses de muestreo.

Se postula que la precipitación de carbonatos puede ser inducida por la actividad fotosintética de algas (Dittrich, 2004) o por la concentración de picoplancton fototrófico (Hodell, 1998).

La calcificación inducida por la fotosíntesis es considerada como la forma más común de precipitación de carbonatos por la acción microbiana y está asociado con la presencia de algas o cianobacterias principalmente en ambientes acuáticos como sistemas marinos y/o sistemas de agua dulce (Erlich 1998; Hammes & Verstraete, 2002).

El fitoplancton juega un papel en la precipitación actuando como catalizador superficial en el proceso de nucleación o realizando supersaturación de calcita en el microambiente que rodea a la célula (Hodell, 1998). Las algas pueden iniciar la precipitación de carbonato de calcio solo si están vivas y se mantienen en la luz, entonces el mecanismo de precipitación está ligado a la actividad metabólica primaria a través de la fotosíntesis (Küchler-Krischun, 1990, Dittrich & Obst, 2004). Yates (1996) sugirió un modelo de la precipitación de carbonato de calcio inducido por una microalga unicelular (Dittrich & Obst, 2004) en el cual, los bicarbonatos y carbonatos proveen una fuente de carbono inorgánico para la precipitación. Este proceso se lleva a cabo cuando la concentración de CO<sub>2</sub> en el sistema es limitante (Thompson *et al.*, 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que los picos de concentraciones de calcita en aguas oligotróficas se pueden explicar por la actividad de picoplancton autotrófico unicelular (Thompson *et al.*, 1997, Dittrich *et al.*, 2004; Dittrich & Obst, 2004). El picoplancton autotrófico (PPA) es un componente ubicuo de los ecosistemas pelágicos (Dittrich, 2004) que incluye organismos procarióticos y eucarióticos capaces de la adsorción y nucleación heterogénea y podría ser responsable de promover la formación de calcita observada en lagos (Riding, 2000, Dittrich, 2004). Aunque cabe destacar que, en este sistema, el PPA estuvo dominado por picocianobacterias (Pcy) y solo en casos excepcionales se llegaron a observar células eucariontes de este tamaño.

Además de la importancia del PPA en la formación de diferentes formas de carbonatos, también contribuye de manera importante en la producción primaria global en los sistemas acuáticos (Callieri & Stockner, 2002) y son responsables del 50 al 70% de la fijación anual de carbono (Callieri, 2007). Las formas de organización de PPA que presentó La Preciosa, fueron células individuales, lo cual es característico de sistemas oligo-mesotróficos (Callieri & Stockner, 2002). Sin embargo, tuvo un comportamiento distinto durante los tres meses de muestreo. Antes del fenómeno de emblanquecimiento, la mayor abundancia de PPA se registró en la zona del metalimnion; que es similar a lo registrado en el Lago Alchichica, donde el PPA tiende a ser más abundante en el metalimnion durante la estratificación bien establecida. Esto se puede deber a que es un lago que presenta la misma dinámica térmica que La Preciosa (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). A pesar de que las concentraciones de fósforo soluble reactivo (FSR) en el metalimnion fueron las más bajas durante este mes de estudio (Fig. 7), se sabe que las células de PPA se ven menos afectadas por la limitación de fósforo y poseen habilidades competitivas en niveles bajos de luz (Callieri & Stockner, 2002).

En los meses restantes la máxima abundancia de PPA se registró en el epilimnion; esta tendencia se ha observado en el Lago Kinneret (Callieri & Stockner, 2002), que al igual que La Preciosa, es un lago monomítico cálido (Malinsky, 1997). En términos de biomasa, se pudo observar que durante el fenómeno de emblanquecimiento la concentración máxima de carbono orgánico se presentó en la zona del metalimnion, debido a que las células de PPA tuvieron un incremento de volumen en este estrato y que, por su tamaño y alta abundancia, provee de mayores áreas superficiales de contacto con el medio (Riding, 2000, Dittrich, 2004). De igual forma, se pudo observar que hay una disminución considerable de las formas de FSR en el metalimnion y un aumento en las concentraciones de nitrógeno, esta relación puede resultar en una colimitación de ambos nutrientes en el lago para la época de lluvias como ha sido propuesto por Hernández-Avilés *et al.* (2001), que se refuerza por el hecho de que se encontró una correlación positiva del PPA con el FSR.

Con respecto al PPH, además de ser la comunidad bacteriana más importante en transformación y mineralización de materia orgánica en sistemas acuáticos (Hernández *et al.*, 2012); es un gran componente de la biomasa microbiana (Cotner & Biddanda., 2002).

El PPH siempre mantuvo una tendencia a aumentar su abundancia hacia el fondo de la columna de agua, debido a la mayor disponibilidad de carbono orgánico disuelto, que es la principal forma de carbono utilizada por la comunidad heterotrófica (Cotner & Biddanda.,

2002). Además de utilizar sustratos orgánicos, se ha reportado que las bacterias pueden aprovechar otras fuentes de nutrientes como el FSR y el nitrógeno; particularmente en el hipolimnion donde ambos nutrientes no son limitantes y que podría estar ligado a su tamaño celular (Hernández-Avilés *et al.*, 2012). De acuerdo con el volumen celular promedio descrito en cada estrato, se observaron células más pequeñas en el epilimnion y células más grandes en el hipolimnion; esta misma tendencia se registró tanto en el lago tropical Alchichica como en el lago templado Maggiore (Hernández-Avilés *et al.*, 2012); estos lagos son clasificados como oligomesotróficos (Callieri *et al.*, 2009, Hernández-Avilés *et al.*, 2010). La actividad de esta comunidad bacteriana también se puede relacionar con la concentración registrada de sulfatos y nitratos en la columna de agua; ya que se ha reportado que los procesos de sulfato reducción y desnitrificación pueden ser posibles causas del aumento de tamaño celular (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). En este sentido, el PPH presentó una mayor abundancia y biomasa que el PPA, resultado de la mayor abundancia del PPH en un orden de magnitud, aunque su volumen fue menor, se plantea que el carbono orgánico disuelto y otras fracciones de los nutrientes disueltos, son mejor aprovechados por los organismos heterótrofos (Cotner & Biddanda, 2002).

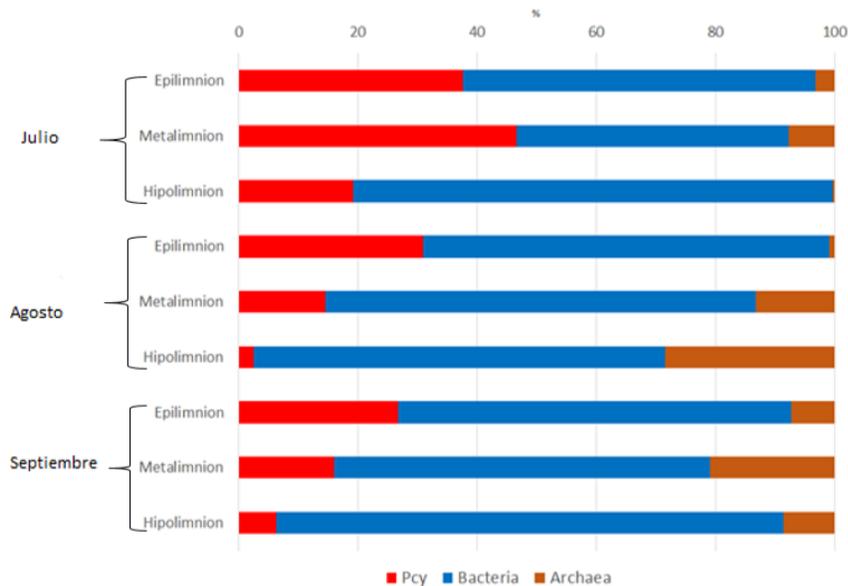
### Comunidad procarioplánctónica mediante CARD-FISH

La abundancia relativa del dominio *Bacteria* fue mayor sobre el dominio *Archaea*, este último dominio tuvo un aporte mínimo durante el periodo de estudio, con excepción del fenómeno de emblanquecimiento en donde se observó un aumento de densidad (Fig. 40).

El dominio *Bacteria* no tuvo un patrón constante a lo largo de los meses de estudio. Antes y después del fenómeno de emblanquecimiento, se registró una mayor abundancia en el hipolimnion del sistema, tendencia que es similar a lo que se ha observado en el lago Alchichica, en donde las densidades de los dos primeros estratos no presentaron diferencias significativas y hubo un incremento considerable en el fondo del lago (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). Sin embargo, durante el evento de emblanquecimiento este dominio tuvo una distribución diferente al resto de los meses, pues la concentración máxima se localizó en la zona del metalimnion (Fig. 40).

Miembros planctónicos marinos pertenecientes al dominio *Archaea* fueron reportados por primera vez en la capa mesopelágica del océano pacífico (Amano-Sato *et al.*, 2013) y su presencia se atribuía a ambientes extremos. Con el avance en las técnicas de biología molecular, se hizo claro que *Archaea* está actualmente distribuida en diversos ambientes como océanos, lagos y suelos (Karner *et al.*, 2001, Wuchter *et al.*, 2006). Se ha reportado que taxa que se encuentran dentro del dominio *Archaea* están involucrados en la degradación de biomasa orgánica en los sedimentos (Ye *et al.*, 2009). Las arqueas presentes en el lago La Preciosa tuvieron una tendencia a aumentar su abundancia hacia el fondo del sistema, ya que estos organismos, además de la materia orgánica, pueden utilizar el CO<sub>2</sub> que se libera de la descomposición de materia orgánica (Wuchter *et al.*, 2006) (Fig. 40).

Uno de los grupos filogenéticos más abundantes de arqueas pelágicas es *Thaumarchaeota* (Thaum) comúnmente presente en el plancton de los océanos y lagos (Pester *et al.*, 2011, Callieri *et al.*, 2015). Este filo tuvo un comportamiento similar al que presentó el dominio *Archaea*, sin embargo, se observó una disminución de su abundancia en comparación a la del dominio y presentó un aumento de su densidad hacia el fondo del sistema, que se atribuye a su participación en la oxidación de amoníaco a nitritos, proceso que es realizado por algunos miembros de Thaum (Callieri *et al.*, 2015). Estos organismos tienen la capacidad de fijar CO<sub>2</sub> (Callieri *et al.*, 2014), resultado de los procesos de descomposición de materia orgánica; por lo cual contribuyen significativamente en el ciclo del nitrógeno y carbono.



**Fig. 40.- Aporte porcentual relativo de la comunidad procarionte de los dominios Archaea y Bacteria, así como de picocianobacterias (Pcy) con base en las densidades determinadas mediante CARD-FISH para los dominios y con conteos directos para picocianobacterias.**

Otro de los filos estudiados fue *Proteobacteria*, dentro del cual se encuentran la mayoría de los grupos bacterianos de importancia para la agricultura, medicina y la industria. Ecológicamente, para los sistemas acuáticos, las clases *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* son las de mayor importancia (Newton *et al.*, 2011).

La clase *Alphaproteobacteria* es numéricamente dominante en varios ecosistemas marinos (Morris *et al.*, 2002, Newton *et al.*, 2011). Sin embargo, en lagos de agua dulce se distribuye en menor proporción (Newton *et al.*, 2011) como se pudo observar en el presente estudio (Fig. 41). Las abundancias de *Alphaproteobacteria* únicamente se registraron en la zona del epilimnion; sin embargo, la sonda que se utilizó para marcar a la mayoría de las *Alphaproteobacteria* (ALF968) no es muy adecuada para la detección de algunos grupos abundantes en lagos, como es el caso del género *Candidatus pelagibacter* LD12 (Salcher *et al.*, 2011) y esto podría aumentar el número de células detectadas para el filo *Alphaproteobacteria*. Por lo tanto, esto podría explicar la baja hibridación de *Alphaproteobacteria* a lo largo del sistema. A pesar de lo anterior, el género *Candidatus pelagibacter* LD12 estuvo presente en toda la columna de agua y es considerado como el miembro más abundante de la clase *Alphaproteobacteria* en sistemas de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002). Este grupo se distribuye en aguas epilimnéticas donde la temperatura es cálida y pueden poseer pigmentos que las ayudan a permanecer en el estrato con más penetración de luz (Salcher *et al.*, 2011). Es un grupo bacteriano que tiene la capacidad de adaptarse a condiciones oligotróficas (Salcher *et al.*, 2011); por lo cual, las abundancias observadas en el hipolimnion en julio y septiembre, fueron las más bajas al haber una mayor

disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, durante el fenómeno de emblanquecimiento hubo un incremento de densidad en el hipolimnion, esto se debe a que la densidad promedio de PPH fue la más alta durante el periodo de estudio y hubo un consumo de nutrientes más rápido, dejando compuestos de bajo peso molecular que podrían ser aprovechados por *Candidatus pelagibacter* LD12 y que propician la proliferación de este grupo.

El género *Paracoccus* mostró una menor abundancia en el epilimnion del lago; tal como se ha observado en el lago Alchichica (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). Sin embargo, tuvo un incremento en su abundancia hacia el fondo del sistema a lo largo de los meses. Debido a que este género está involucrado en el proceso de desnitrificación, estadísticamente se observó una correlación positiva con la concentración de nitritos del sistema, indicando que la desnitrificación es un proceso importante durante el periodo de estratificación (Hernández-Avilés *et al.*, 2010).

Una de las clases más abundantes dentro de las *Proteobacterias* en sistemas de agua dulce es *Betaproteobacteria* (Zwart *et al.*, 2002); la cual, fue dominante durante los meses de muestreo (4% - 15.8%) (Fig. 41) y presentó una tendencia a aumentar su densidad hacia el hipolimnion. El cambio más evidente de la densidad de esta clase se registró durante el fenómeno de emblanquecimiento, ya que se observó que las abundancias en el epilimnion y metalimnion disminuyeron considerablemente. Este comportamiento puede ser atribuido a que existe un clado dentro de esta clase (Bet I) que es más abundante en los estratos superficiales (Salcher *et al.*, 2008) y su abundancia esta positivamente relacionada al grado de cambio en el color del agua, por la liberación de sustancias de bajo peso molecular que producen las algas (Šimek *et al.*, 2010). Sin embargo, al haber una saturación de carbonatos durante el fenómeno, el clado Bet I no puede aprovechar las sustancias provenientes de las algas, por lo que, la abundancia de este grupo disminuyó considerablemente. De acuerdo con el análisis de correlación, este género presentó una asociación positiva con la concentración de bicarbonatos, sin embargo, durante el fenómeno de emblanquecimiento los carbonatos fueron las formas de carbono dominantes y este cambio podría haber influenciado la abundancia de *Betaproteobacteria*. Los porcentajes que se presentaron durante el periodo de estudio fueron más altos que los registrados para Alchichica (Hernández-Avilés *et al.*, 2010), debido a que *Betaproteobacteria* tiende a disminuir su abundancia en sistemas salinos (Wu *et al.*, 2006). Esta clase bacteriana, al presentar la mayor abundancia en el hipolimnion, participa en los procesos de oxidación de amoníaco junto con a clase *Gammaproteobacteria* (Callieri *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que la clase *Gammaproteobacteria* generalmente es más abundante en el océano (Biers *et al.*, 2009) o lagos salinos (Wu *et al.*, 2006) que en agua dulce. Sin embargo, en este estudio estuvo presente en toda la columna de agua con una tendencia a aumentar su abundancia hacia el fondo del lago, tal como se ha registrado en el lago Alchichica (Hernández-Avilés *et al.*, 2010) (Fig. 41). Diferentes estudios han demostrado que, a diferencia de *Betaproteobacteria*, esta clase incrementa su abundancia conforme aumenta la salinidad del sistema (Wu *et al.*, 2006); sin embargo, al no haber un

aumento considerable de salinidad, *Gammaproteobacteria* presentó la mayor abundancia al fondo del sistema, ya que esta clase bacteriana tiene preferencia por concentraciones elevadas de nutrientes y pueden asimilar fácilmente fuentes de carbono orgánico (Pinhassi & Berman, 2003) que se encuentran en la parte del hipolimnion, en donde lleva a cabo la oxidación anaerobia de amonio (Jiang *et al.*, 2009).

Dentro de la clase *Deltaproteobacteria*, las bacterias sulfato reductoras (BSR) tuvieron poca presencia durante los primeros dos meses de muestreo; lo cual fue observado en los bajos porcentajes de hibridación en la zona del hipolimnion (Fig. 41). Este comportamiento cambió después del fenómeno de emblanquecimiento, pues las abundancias de este grupo bacteriano, aumentaron de manera significativa a lo largo de la columna de agua, con un incremento en el hipolimnion, en donde se ha reportado que este grupo bacteriano lleva a cabo los procesos de sulfato reducción (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). Se pudo observar que se están llevando procesos de oxidación de sustratos orgánicos en la columna de agua, ya que estas bacterias pueden desarrollar este proceso en condiciones aerobias usando O<sub>2</sub> como aceptor de electrones, tal como ha sido en el lago Alchichica (Hernández-Avilés *et al.*, 2010).

Por otra parte, se realizó el estudio de la composición del filo *Actinobacteria*, el cual está constituido por bacterias Gram positivas con una alta composición de guanina y citosina (Ventura *et al.*, 2007). Históricamente, los suelos eran considerados el ambiente primordial de residencia y actividad óptima de las actinobacterias, sin embargo, diversos estudios han revelado que miembros de este filo son comunes e importantes en una variedad de hábitats de agua dulce (Newton *et al.*, 2011). Este filo bacteriano estuvo presente a lo largo del sistema (Fig. 41), sin embargo, no fue una fracción dominante como se ha reportado en distintos trabajos (Allgaier & Grossart, 2006). La clase *Actinobacteria* presentó una baja abundancia en el epilimnion; lo cual se atribuye a que esta clase presenta una resistencia a la exposición de UV (Warnecke *et al.*, 2005), lo cual les permite situarse en zonas donde la intensidad lumínica es alta. Por otro lado, el pH funciona como modelador de este grupo bacteriano (Newton *et al.*, 2011), ya que en el epilimnion; el pH tuvo una tendencia a ser un poco más alto que en los demás estratos y existen miembros de un clado específico (ACK-M1) que prevalecen en pHs altos (Newton *et al.*, 2011). En trabajos anteriores, se ha reportado que al disminuir la cantidad de clorofila en el sistema, la densidad de este filo aumenta (Warnecke *et al.*, 2005) lo cual podría explicar el incremento de este filo hacia el fondo del lago y por su participación en la refracción de biomateriales por la descomposición y formación de humus (Ventura *et al.*, 2007). Además, este grupo bacteriano produce enzimas extracelulares y diversos metabolitos secundarios (Ventura *et al.*, 2007), los cuales pueden estar siendo aprovechados por bacterias que consumen compuestos de bajo peso molecular como el género *Candidatus pelagibacter* LD12.

El filo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) conocido formalmente como filo *Bacteroidetes* exhibe una gran diversidad fenotípica y metabólica y se encuentra distribuido en suelos, ambientes acuáticos o en simbiosis con plantas, animales y humanos (Newton *et al.*, 2011). Junto con el filo *Proteobacteria*, constituyen dos de los grupos más abundantes en sistemas acuáticos (Kirchman, 2002); sin embargo, este comportamiento no fue

observado en el sistema de estudio (Fig. 41), ya que las densidades fueron menores en comparación con las densidades de otros grupos bacterianos. Las mayores densidades se localizaron en la zona del hipolimnion, ya que este grupo está asociado al consumo y degradación de materia orgánica de alto peso molecular (Kirchman, 2002). Además, se observó una correlación negativa con las concentraciones de oxígeno disuelto (Cuadro 3), que es explicada por la anaerobiosis de la mayoría de los miembros de CFB (Amann & Fuchs, 2008).

Por último, se determinó la abundancia de la familia *Planctomycetaceae* haciendo uso de la sonda PLA886. Este grupo estuvo distribuido de manera homogénea durante el periodo de estudio con un ligero aumento en la densidad durante el fenómeno de emblanquecimiento hacia el fondo del sistema (Fig. 41). Este grupo bacteriano presentó una relación inversa con las concentraciones de oxígeno disuelto, ya que está conformado por organismos quimiolitotóxicos que llevan a cabo la oxidación anaerobia de amonio (Anammox) en sistemas marinos y de agua dulce (Jetten *et al.*, 2003). El proceso Anammox se lleva a cabo bajo condiciones mínimas de oxígeno y se ha demostrado que es un proceso importante en el ciclo de nitrógeno y en la degradación de carbohidratos altamente complejos, dejándolos accesibles a otros organismos; por lo tanto, es un proceso importante en el ciclo de carbono (Glöckner *et al.*, 2003). Es importante mencionar que la sonda utilizada para la identificación de *Planctomycetaceae* abarca el 69% de organismos pertenecientes al filo *Planctomycetes*, sin embargo, hibrida en la región 18S rRNA de varios eucariotes, incluyendo diatomeas (Musat *et al.*, 2006). Por lo cual, no se descarta la posibilidad de presentar una cantidad considerable de falsos positivos de esta sonda durante el estudio.

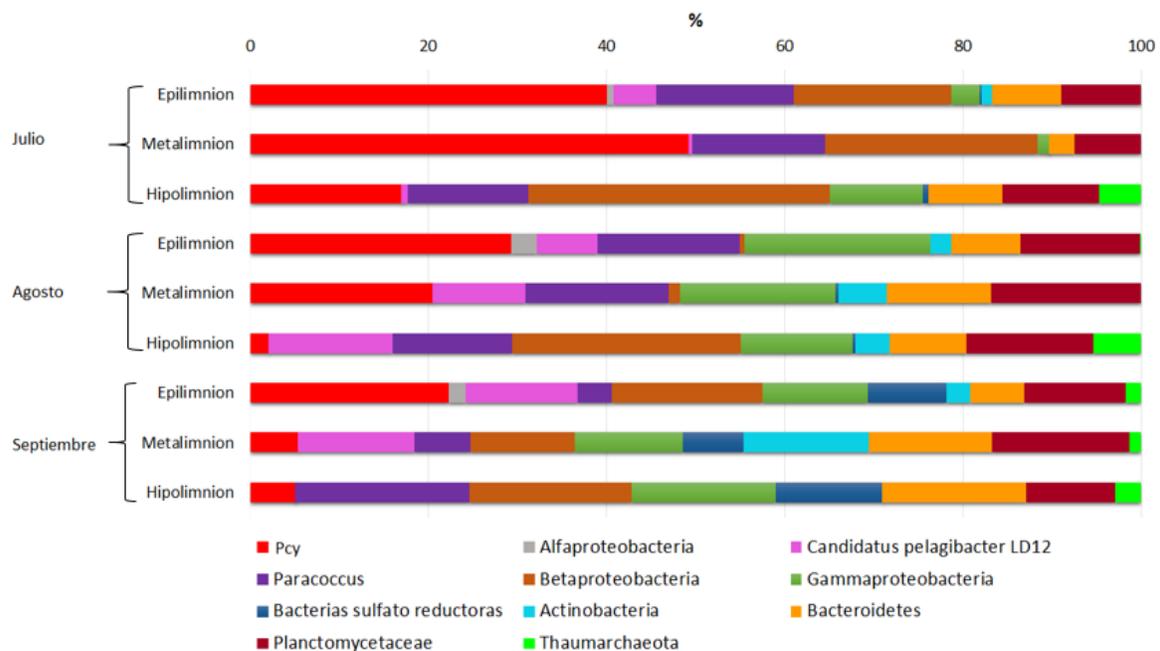


Fig. 41.- Composición y estructura del procarioplankton en función del aporte porcentual relativo de la densidad de los diferentes grupos bacterianos determinados mediante CARD-FISH y de la densidad del picocyanobacterias (Pcy) durante los muestreos realizados.

### **El papel de la comunidad procarionte en los ciclos biogeoquímicos.**

A pesar del tamaño pequeño de los procariontes, son un componente planctónico importante en ecosistemas acuáticos y participan de manera importante en los procesos biogeoquímicos. Esta importancia está relacionada con los procesos de flujo de energía y de materiales; que es maximizada en ambientes oligotróficos y disminuye conforme aumenta el estado trófico (Cotner & Biddanda.,2002).

El lago La Preciosa es un sistema con una salinidad baja ( $1.1 \text{ g L}^{-1}$ ) y una elevada alcalinidad dominada por bicarbonatos; la cual amortigua los cambios en los 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 como es el caso del sistema de estudio. La actividad biológica es la principal causa del reciclado de materiales, ya que la incorporación de materiales sucede en la temporada de lluvias y por acción de actividad antropogénica como agricultura, pesca, extracción de agua. Las actividades antropogénicas son facilitadas por ser un lago donde es fácil el acceso. Por ser un lago de origen volcánico (Armienta *et al.*, 2008) tiene una composición alta de rocas basálticas (Alcocer *et al.*, 2005, Carrasco-Nuñez *et al.*, 2007, Armienta *et al.*, 2008), por lo que existe una gran cantidad de silicatos presentes en el sistema.

### **Ciclo del carbono**

El  $\text{CO}_2$  ocupa el  $\sim 0.035\%$  del aire que constituye la atmósfera y su solubilidad es 200 veces más que la del oxígeno; por lo que, una vez que se encuentra disuelto en el agua forma ácido carbónico, bicarbonatos y carbonatos (Wetzel, 2001).

El  $\text{CO}_2$  es fijado por el fitoplancton y el PPA (picocianobacterias) produciendo polímeros orgánicos los cuales son degradados por bacterias heterótrofas hidrolíticas, principalmente actinobacterias, gammaproteobacterias (Sorokin *et al.*, 2014), bacteroidetes (Kirchman, 2002) y miembros pertenecientes a la familia *Planctomycetaceae* (Glöckner *et al.*, 2003). Como resultado de la degradación de polímeros, se forman monómeros como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y alcoholes; los cuales son aprovechados por bacterias heterótrofas secundarias (“dissipotrophic”), como los organismos del género *Candidatus pelagibacter* LD12; que es un género que está relacionado con la degradación de compuestos de bajo peso molecular. El proceso de degradación de materia orgánica da como resultado la liberación de  $\text{CO}_2$  y las concentraciones de oxígeno disminuyen.

Como parte del ciclo de carbono, los metanógenos son un grupo exclusivo de arqueas (Atlas & Bartha, 2002) anaerobios y activos potenciales Redox (entre  $-350$  y  $-450 \text{ mV}$ ) y pueden utilizar el  $\text{CO}_2$  como aceptor de electrones y a su vez, reducirlo a metano (Atlas & Bartha, 2002).

### **Ciclo del nitrógeno**

La desnitrificación es un proceso que es realizado por heterótrofos y por diversos litótrofos anaerobios facultativos (Sorokin *et al.*, 2006; Sorokin *et al.*, 2014); el cual consiste en la reducción de nitritos y nitratos a nitrógeno molecular. Este proceso es realizado por bacterias de la clase *Gammaproteobacteria* y el género *Paracoccus*; que en el presente estudio presentó una relación positiva con las concentraciones de nitritos.

Los desechos metabólicos producidos por la micro y macrofauna son una fuente constante de amoníaco en el sistema. Esta molécula es utilizada como aceptor de electrones por el filo *Thaumarchaeota* y por las clases *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* quienes la transforman en nitritos y/o nitratos en las zonas aeróbicas de la columna de agua. No obstante, el amoníaco puede ser oxidado de forma anaerobia (proceso Anammox) por organismos pertenecientes a la familia *Planctomycetaceae*, quien lo convierte en nitrógeno molecular, que puede reintegrarse al ciclo por medio de organismos fijadores de nitrógeno o perderse por volatilización.

### **Ciclo del azufre.**

Las algas y muchos microorganismos heterótrofos, asimilan el azufre en forma de sulfato. Para poder ser incorporado como radical sulfhidrilo (-SH), el sulfato debe reducirse a sulfuro mediante la reducción asimiladora de sulfato, la cual se realiza comúnmente, aunque no de manera obligada, en condiciones de anoxia por las BSR. Se sabe que las BSR que se encuentran en estos sistemas son del grupo *Desulfovibrionales*, que realizan la reducción completa del sulfato ( $\text{SO}_4^- \rightarrow \text{H}_2\text{S}$ ) y que no tienen la capacidad de reducir azufre elemental (Sorokin *et al.*, 2014). El sulfuro que se produce en la reducción puede ser oxidado a azufre elemental o sulfatos por bacterias fotótrofas o quimiótrofas oxidadoras del azufre (Sorokin *et al.*, 2014). La clase *Gammaproteobacteria* utiliza los compuestos reducidos del azufre (sulfuro, polisulfuro, tiosulfato y azufre elemental) como donador de electrones (Sorokin *et al.*, 2014). Estos procesos se llevan a cabo en la zona anóxica del sistema, sin embargo, la distribución de BSR y de las gammaproteobacterias, no se limitó únicamente a esta zona, ya que estuvieron distribuidas a lo largo de toda la columna de agua.

### **Ciclo del fósforo**

En la mayoría de los sistemas de agua dulce, el fósforo constituye el nutriente limitante; el cual, determina la productividad biológica, ya que, mientras se encuentre más disponible, se forma más biomasa (Spivakov *et al.*, 1999). El fósforo que se encuentra en el lago La Preciosa, es aprovechado por la comunidad fitoplanctónica, el PPA y las bacterias heterótrofas. El fósforo es introducido de diferentes formas al sistema; durante la temporada de lluvias, el arrastre de material orgánico y terrígenos, la incorporación de detergentes de manera antropogénica y el uso de fertilizantes añadidos a los cultivos que se encuentran en la parte alta de la cuenca, hacen que el fósforo soluble sea la forma más frecuente de fosforo disuelto (Spivakov *et al.*, 1999). El fósforo que no es utilizado por los organismos fotosintéticos y heterótrofos, puede ser aprovechado por organismos del filo *Bacteroidetes* y *Planctomycetes*; ya que estos taxa bacterianos están relacionados con la degradación de compuestos orgánicos complejos.

## **El fenómeno de emblanquecimiento y la comunidad procarionte**

La precipitación de carbonato es un fenómeno que se encuentra comúnmente en ambientes marinos, de agua dulce y suelos (Erlich 1998, Hammes & Verstraete, 2002) y se puede presentar siempre y cuando existan las condiciones ambientales adecuadas. Se han postulado dos posibles modelos para explicar el emblanquecimiento en sistemas lacustres: una precipitación inorgánica producida por cambios en la temperatura del agua y una precipitación bioinducida por la remoción de CO<sub>2</sub> por medio de la fotosíntesis (Thompson *et al.*, 1997). Se ha demostrado que, en diversos lagos, la precipitación está influenciada por el aumento de la temperatura (25°C en agua superficial) (Sondi & Juračić, 2010), sin embargo, en La Preciosa la temperatura se mantuvo constante, lo cual descarta la posibilidad de que la precipitación se realice de forma inorgánica, lo que nos lleva a la posibilidad de que la precipitación sea más bien de origen biológico.

Tanto las bacterias heterótrofas y las autótrofas han sido asociadas con la precipitación de carbonatos en ambientes de agua dulce (Riding, 2000) y su papel principal dentro de este fenómeno es crear un ambiente alcalino, a través de diversas actividades fisiológicas (Hammes & Verstraete, 2002). Estas actividades están relacionadas con las comunidades bacterianas heterótrofas encargadas de la reducción de sulfatos (Arp *et al.*, 1999), la oxidación anaerobia de metano (Arp *et al.*, 1999), la amonificación y la degradación de compuestos orgánicos vía reducción de nitratos (Arp *et al.*, 1999). Estas actividades metabólicas, incluyendo la actividad fotosintética por parte del fitoplancton y del PPA dieron como resultado un aumento en el pH durante el mes de emblanquecimiento. Este aumento en el pH causó un cambio del equilibrio de ácido carbónico hacia un incremento de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Lo cual explicaría el cambio de las alcalinidades durante el fenómeno de emblanquecimiento.

Además de las condiciones mencionadas anteriormente, la precipitación puede estar influenciada por las concentraciones de fósforo disuelto ya que la formación de las diferentes formas de carbonato, inicia cuando la concentración de fósforo es menor a 0.01 mg L<sup>-1</sup> (Küchler-Krischun & Kleiner, 1990) y esto concuerda con la concentración de fósforo registrada un mes antes del fenómeno de emblanquecimiento en La Preciosa.

Si bien la comunidad heterótrofa es la encargada de crear las condiciones ambientales adecuadas para la precipitación, la comunidad autótrofa está más relacionada con el proceso de emblanquecimiento ya que, además de que puede aprovechar las formas de bicarbonatos como fuente de carbono inorgánico para la fotosíntesis (Dittrich & Obst, 2004), el PPA es conocido por producir secreciones poliméricas extracelulares, las cuales sirven como sitios de nucleación y pueden inducir el crecimiento de cristales de calcita (Arp *et al.*, 1999, Dittrich & Obst, 2004). Estas secreciones poliméricas extracelulares poseen cargas negativas que son afines a los cationes polivalentes como el calcio Ca<sup>+</sup> y el magnesio Mg<sup>+</sup> (Obst *et al.*, 2009) lo que favorecería la incorporación de alguno de estos dos cationes para la nucleación.

Por último, la combinación de diferentes técnicas experimentales como la observación *in situ* de la nucleación de calcita en las células, métodos de microscopía de alta resolución y métodos para analizar la superficie de las células durante el emblanquecimiento (Dittrich &

Obst, 2004), podría ayudar a entender la precipitación en lagos tropicales, los cuales han sido sistemas poco estudiados. De igual forma, con la utilización de una variedad más amplia de sondas, se podrían realizar estudios más completos sobre la composición microbiana, su papel en la dinámica del lago y su participación en los ciclos biogeoquímicos en los sistemas acuáticos, los cuales, son sitios únicos y de gran importancia para entender su funcionamiento en relación a los cambios atmosféricos y el impacto que causan hacia las comunidades bióticas.

## CONCLUSIONES

Las densidades del picoplancton autotrófico (PPA) disminuyeron hacia el fondo del sistema, asociado con la disminución de la luz. La mayor abundancia del PPA se registró en el metalimnion antes del fenómeno de emblanquecimiento, donde se presenta una mayor disponibilidad de nutrientes y entre el 1% y el 0.1% de la región fotosintéticamente activa donde estas células pueden sintetizar. Por otro lado, la comunidad heterotrófica solo aumentó su densidad en la termoclina después del fenómeno de emblanquecimiento.

A diferencia del PPA, las densidades más altas de picoplancton heterotrófico se encontraron en la zona del hipolimnion, asociado con una mayor disponibilidad de materia orgánica.

Los organismos del dominio *Bacteria* dominaron la composición del procarioplankton del lago la Preciosa, mientras que el dominio *Archaea* tuvo una presencia mínima durante el periodo de estudio. En el fenómeno de emblanquecimiento se observó un comportamiento inverso entre las abundancias de PPA y el dominio *Archaea*.

El filo *Proteobacteria* fue la comunidad bacteriana dominante durante el periodo de estudio; siendo la clase dominante *Betaproteobacteria*. Sin embargo, al sumar las sondas específicas de la clase *Alphaproteobacteria* (*LD12* y *Paracoccus*) esta resultó ser la dominante.

Los taxa bacterianos que dominaron la columna de agua durante el fenómeno de emblanquecimiento fueron *Gammaproteobacteria* y *Planctomycetacea*.

El género *Paracoccus* estuvo presente a lo largo de la columna de agua presentando la mayor abundancia en el hipolimnion anóxico, lo cual está asociado con los procesos de desnitrificación en este estrato.

La comunidad procarionte tiene un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos que se llevan a cabo en el lago. En el ciclo del carbono los grupos bacterianos que están asociados son el PPA y los taxa bacterianos *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* y *LD12-121*. Las clases *Gammaproteobacteria* y *Betaproteobacteria* y el filo *Thaumarchaeota* se relacionan principalmente con el ciclo de nitrógeno, y en particular la familia *Planctomycetacea* lleva a cabo la oxidación anaerobia del amonio. En el ciclo del azufre participan las BSR y la clase *Gammaproteobacteria*. Por último, el PPA y las bacterias heterótrofas son consumidoras del fósforo.

Al no haber un incremento significativo en la temperatura superficial del agua durante el periodo de estudio, la precipitación de carbonatos es consecuencia de la actividad biológica por la nucleación de bicarbonatos, cuando el  $\text{CO}_2$  es limitante, y no de forma inorgánica como ocurre en otros sistemas acuáticos. Como consecuencia de la fotosíntesis se presentó un aumento de pH y resultado de los cambios de las formas de carbono se incrementó la alcalinidad de carbonatos, las cuales, condicionaron el desarrollo del fenómeno de emblanquecimiento en el lago.



Anexo 1.- Lago la Preciosa antes del fenómeno de emblanquecimiento (arriba) y foto del lago la Preciosa durante el fenómeno de emblanquecimiento (abajo).

## 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.
- 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.
- 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., Fuchs B.M., & Behrens S., 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. Curr. Opin. Biotechnol. 12: 231-236.
- 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.
- Amano-Sato C., Akiyama S., Uchida M., Shimada K., & Utsumi M., 2013. Archaeal distribution and abundance in water masses of the Arctic Ocean, Pacific sector. Aquat. Microb. Ecol. 69: 101-112.
- 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 F. J. L., 2002. Los axalapasos de la cuenca Oriental, Puebla. En: De la Lanza Espino, G. & García C. J. L. Lagos y presas de México. Centro de Ecología y Desarrollo, México D.F. 65-87 pp.
- 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.
- Arriaga C.L., Aguilar V., Alcocer J., Jiménez R., Muñoz E., & Vázquez E., 1998. Regiones hidrológicas prioritarias: fichas técnicas y mapa (1: 4,000,000). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad. México. 142 pp.
- Atlas R., & Bartha R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación. España. 383-398.
- Bohrer B., & Schultze M., 2008. Stratification of lakes. Rev. Geophys., 46, RG2005, DOI: 10.1029/2006RG000210.
- Callieri C., 2007. Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. Freshwater Reviews 1: 1-28.
- Callieri C., & Stockner J.G., 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. Journal of Limnology 61:1-14.
- Callieri C., Coci M., Eckert E., Salcher M., & Bertoni R., 2014. Archaea and Bacteria in deep lake hipolimnion: *in situ* dark inorganic carbon uptake. J. Limnol. 73 (1): 47-54.

- 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-oligomictic lake. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7298-7300.
- 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., 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.
- 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.
- Cloud P.E., 1962. Environment of calcium carbonate deposition west of Andros Island, Bahamas. US Geological Survey Professional Paper 350, 138 p.
- Cole J., 1999. Aquatic microbiology for Ecosystem scientist: new and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems* 2: 215-225.
- Conde-Porcura J.M., Ramos-Rodríguez E., & Morales-Baquero R., 2004. El zooplankton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas lénticos. *Ecosistemas* 13 (2): 23-29.
- Cotner J.B., & Biddanda B.A., 2002. Small Players, Large Role: Microbial Influence of Biogeochemical Processes in Pelagic Aquatic Ecosystems. *Ecosystems*. 5: 105-121.
- 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.
- 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.
- Dittrich M., & Obst M., 2004. Are picoplankton responsible for calcite precipitation in lakes? *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 33:559-564.
- Dittrich M., Kurz P., & Wehrli B., 2004. The role of autotrophic picocyanobacteria in calcite precipitation in an oligotrophic lake. *Geomicrobiology Journal* 21: 45-53.
- Ehrlich H.L., 1998. Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews* 45:45-60.
- 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.
- Falkowski P., 1994. The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research*. 39: 235-258.
- Glöckner F., Kube M., Bauer M., Teeling H., Lombardot T., Ludwig W., Gade D., Beck A., Borzym K., Heitmann K., Rabus R., Schlesner H., Amann R., & Reinhardt R., 2003. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain1. *PNAS* vol.100 no.14 8298-8303.
- 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.
- Hammes F., & Verstraete W., 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* 1: 3-7.
  - Hernández-Avilés J., Bernal-Brooks F., Velarde G., Ortiz D., Lind O., & Dávalos-Lind L., 2001. The algal growth potential and algae growth-limiting nutrients for 30 of Mexico's lakes and reservorios. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 27: 3583-3588.
  - 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.
  - 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.
  - Jetten M., Sliemers O., Kuypers M., Dalsgaard T., Niftrik L., Cirpus I., Pas-Schoonen K., Lavik G., Thamdrup B., Le Paslier D., Op den Camp H., Hulth S., Nielsen L., Abma W., Third K., Engström P., Kuenen J., Jorgensen B., Canfield D., Sinninghe J., Revsbech N., Fuerst J., Weissenbach J., Wagner M., Schmidt I., Schmid M., & Strous M., 2003. Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:107-114.
  - Jiang H., Dong H., Yu B., Lv G., Deng S., Berzins N., & Dai M., 2009. Diversity and Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Qinghai Lake, Northwestern China. *Geomicrobiology Journal* 26:199-211.
  - 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
  - Karner M.B., DeLong E.F., & Karl D.M., 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409:507-510.
  - Kirchman D.L., 2002. The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* 39:91-100.
  - Kosamu I.B.M., & Obst M., 2009. The influence of picocyanobacterial photosynthesis on calcite precipitation. *International Journal of Environmental Science & Technology* 6: 557-562.
  - Kűchler-Krischun J., & Kleiner J., 1990. Heterogeneously nucleated calcite precipitation in Lake Constance. A short time resolution study. *Aquatic Sciences* 52:176-197.
  - Lewis W.M., 1983. A revised classification of lakes based on mixing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40:1779-1787.
  - Loferer-Krűbűbacher 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.
  - Malinsky-Rushansky N.Z., Berman T., & Dubinsky Z., 1997. Seasonal photosynthetic activity of autotrophic picoplankton in lake Kinneret, Israel. *Journal of Plankton Research*. Vo. 19 no. 8 pp. 979-993.
  - 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* 142:10971106.

- 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.
- Marcos H., & Reyes M., 2012. Variabilidad anual del picoplancton procarionte en el lago monomítico cálido la Preciosa, Puebla.
- 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.
- 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.
- Musat N., Werner U., Knittel K., Kolb S., Dodenhof T., Beusekom J., Beer D., Dubilier N., & Amann R., 2006. Microbial community structure of Sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Romo Basin, Wadden Sea. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 333-348.
- 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* 75:1449.
- 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.
- 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.
- Pester M., Schleper C., & Wagner M., 2011. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current opinion in Microbiology*. 14: 300-306.
- Pinhassi J., & Berman T., 2003. Differential growth response of colony-forming  $\alpha$ - and  $\gamma$ - proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from lake Kinneret (Israel), the Eastern mediterranean sea, and the gulf of Eilat. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 1:199-211.
- Porter K., & Feig Y., 1980. The used of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 5: 948-951.
- Riding R., 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47:179-214.
- Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W., & Schleifer K.-H., 1995. In situ probing of Grampositive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 141:1267-1267.

- Salcher M., Pernthaler J., Zeder M., Psenner R., & Posch T., 2008. Spatio-temporal niche separation of planktonic Betaproteobacteria in an oligo-mesotrophic lake. *Environmental Microbiology* 10(8), 2074-2086.
- 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.
- Sarmiento H., 2012. New paradigms in tropical limnology: the importance of the microbial food web. *Hydrobiologia* 686: 1-14.
- 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.
- Siebuth J., Smetacek V., & Lenz J., 1978. Pelagic ecosystems structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23 (6): 1256-1263.
- 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.
- 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.
- Stockner J.G., & Shortreed K.S., 1991. Autotrophic picoplankton: community composition abundance and distribution across a gradient of oligotrophic. *British Columbia and Yukon Territory lakes*. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 76: 581-601.
- 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.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.
- 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.
- Vernadsky W.I., 1945. The biosphere and the noosphere. *Am Sci* 33: 1-12.

- Vilaclara G., Chávez M., Lugo A., González H., & Gaytán M. 1993. Comparative description basic chemistry of crater-lakes in Puebla State, Mexico. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 25: 435-440.
- Vizuet A., 2015. Evaluación de la composición del procarioplancton durante el fenómeno de emblanquecimiento "Whitnig Event" en el lago volcánico Atexcac, Estado de Puebla.
- 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.
- Wetzel R.G., 2001. *Limnology: Lake and river ecosystems*. Limnology, Academic Press, London:1006.
- 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.
- Wuchter C., Abbas B., Coolen M., Herfort L., Bleijswijk J., Timmers P., Strous M., Teira E., Herndl G., Middelburg J., Schouten S., Sinninghe J. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *PNAS* Vol. 103 no. 33 12317-12322.
- 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.
- 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.