



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

Análisis descriptivo de la diversidad microbiana asociada a la precipitación de carbonatos “Emblanquecimiento” para dos lagos cráter de la Cuenca Oriental, Puebla, México.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Martínez Díaz Jesús Tadeo

TUTORA PRINCIPAL:

**Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez
(Instituto de Ecología, UNAM)**

COMITÉ TUTOR:

**Dr. Javier Alcocer Durand
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM)**

**Dr. Gustavo Alberto Montejano Zurita
(Facultad de Ciencias, UNAM)**

**Dr. Luis A. Oseguera Pérez
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM)**

**Dra. Itzel Becerra Absalón
(Facultad de ciencias, UNAM)**

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., MAYO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Análisis descriptivo de la diversidad microbiana asociada a la precipitación de carbonatos “Emblanquecimiento” para dos lagos cráter de la Cuenca Oriental, Puebla, México.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Martínez Díaz Jesús Tadeo

TUTORA PRINCIPAL:

Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez
(Instituto de Ecología, UNAM)

COMITÉ TUTOR:

Dr. Javier Alcocer Durand
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM)

Dr. Gustavo Alberto Montejano Zurita
(Facultad de Ciencias, UNAM)

Dr. Luis A. Oseguera Pérez
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM)

Dra. Itzel Becerra Absalón
(Facultad de ciencias, UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., MAYO, 2018



Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, por la formación académica y profesional brindada.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por la beca otorgada 568513, la cual permitió el desarrollo y culminación del presente trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, CONACyT, por el proyecto SEP-CONACyT 254962, mismo que financió esta investigación.

A Osiris Gaona Pineda, técnico académico del Instituto de Ecología por su apoyo, con la parte técnica y logística para la realización de este proyecto.

A mi directora de tesis, la Dra. Luisa I. Falcón Álvarez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por todo el apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo.

A los miembros de mi comité: Dr. Javier Alcocer Durand, Dr. Gustavo Alberto Montejano Zurita, Dr. Luis A. Oseguera Pérez y Dra. Itzel Becerra Absalón, por sus aportaciones a este proyecto.

Al Dr. Justo Salvador Hernández Avilés y al equipo de Limnoecología microbiana de la FES Zaragoza por el apoyo en el trabajo de campo, y las muestras proporcionadas para la realización de este trabajo.

Agradecimientos personales

A mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar nuestras diferencias de opiniones.

A mi compañera de vida Mayela por tu amor, alegría, constante apoyo y estímulo a lo largo de toda esta maravillosa aventura profesional que hemos compartido juntos y que no cambiaría por nada en este mundo.

A Daniel Cerqueda García por apoyarme siempre que surgían dudas en el desarrollo de este trabajo y por todos esos comentarios que me hicieron replantearme mis metas en la vida.

A todos mis compañeros del laboratorio de ecología microbiana, ya que sin ustedes el trabajo de laboratorio no sería lo mismo



CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
Evento de emblanquecimiento	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
JUSTIFICACIÓN	24
OBJETIVO	24
ÁREA DE ESTUDIO	24
Lago Atexcac	25
Lago Preciosa	25
METODOLOGÍA	27
Muestreo en campo	27
Extracción de DNA	28
Amplificación	28
Secuenciación	29
RESULTADOS	30
Diversidad microbiana	30



Composición microbiana	32
Fila microbianos en el lago Preciosa	32
Fila microbianos del lago Atexcac	32
Filum Proteobacteria	34
Filum Actinobacteria	34
Filum Bacteroidetes	35
Filum Planctomycetes	37
Filum Verrucomicrobia	37
Filum Firmicutes	38
Filum Chlorobi	38
Filum Cyanobacteria y productores primarios eucariontes determinados por señal del cloroplasto.	40
Géneros representativos	42
CONCLUSIONES	53
PERSPECTIVAS	54
BIBLIOGRAFÍA	55



Índice de figuras

<i>Figura 1. Esquema de los distintos procesos relacionados con el ciclo de carbono y la precipitación de carbonatos en lagos. 1.- Fotosíntesis. 2.-Precipitación de carbonatos. 3.- Metanogénesis. 4.-Oxidación del metano.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2. A) Evento de emblanquecimiento lago Preciosa (agosto 2014) B) evento de emblanquecimiento lago Atexcac (septiembre 2014).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 3. Imágenes satelitales y vista de los lagos Atexcac (A y B) y Preciosa (C y D).....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 4. Curvas de acumulación de OTUs observados para los lagos A) Preciosa y B) Atexcac tanto antes (línea roja) como durante (línea azul).</i>	<i>31</i>
<i>Figura 5. Fila dominantes en los Lagos Atexcac y La Preciosa.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 6. Gráfica de la composición a nivel de clase de los Fila más Representativos en los lagos Atexcac y Preciosa.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 7. Gráfica de la composición de los Fila menos representativos durante la mezcla y evento blanco en los lagos Preciosa y Atexcac.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 8. Gráfica de composición relativa de Cyanobacteria y Cloroplasto para el lago Atexcac y Preciosa durante la mezcla y evento blanco.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 9. Porcentaje relativo de abundancia de los órdenes de Cyanobacteria.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 10. Gráfica de géneros dominantes presentes en la mezcla y durante el evento blanco en el lago Atexcac.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 11. Gráfica de géneros dominantes presentes en la mezcla y durante el evento blanco en el lago Preciosa.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 12. Diagrama de géneros de los lagos Preciosa y Atexcac durante la Mezcla.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 13. Diagrama de géneros de los lagos Preciosa y Atexcac durante el evento de emblanquecimiento.....</i>	<i>45</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Clasificación del plancton tomado y modificado de Callieri (2007).....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 2. Ejemplos de rutas asociadas a la precipitación de carbonatos y su ambiente. Tomado y modificado de Hammes y Verstraete (2002).</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los iniciadores (primers) usados en la reacción de PCR.</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 4. Índices de diversidad tanto antes como durante el evento de emblanquecimiento para los lagos Atexcac y Preciosa.</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 5. Características físicas y químicas del lago Atexcac y Preciosa.....</i>	<i>52</i>



Resumen

La precipitación del carbonato de calcio es un proceso clave en el ciclo del carbono tanto a escala global como lacustre. Uno de los casos más espectaculares de precipitación de CaCO_3 son los denominados "eventos de emblanquecimiento". Estos son precipitaciones a gran escala de CaCO_3 de grano fino el cual genera un cambio en la coloración del espejo de agua de algunos lagos. En los lagos, se postula que la precipitación de CaCO_3 se debe a la actividad fotosintética de las algas, ya que el aumento del pH induce la precipitación de calcita.

En México a pesar de contar con reportes de este tipo de eventos a lo largo de los años, el interés prestado por la comunidad científica del país hasta el momento es escasa. Lo anterior se debe a que el emblanquecimiento no presenta una periodicidad como ocurre en sistemas templados lo cual dificulta su estudio, aunado a que la mayoría de los cuerpos de agua que se encuentran en buen estado dentro del país se localizan en localidades alejadas o de difícil acceso.

En el presente trabajo se exploró la diversidad microbiana de muestras superficiales de agua asociada a eventos de precipitación de carbonatos para dos lagos cráter (Atexcac y La Preciosa), empleando técnicas de secuenciación masiva del 16S ARNr. El 90 % de la diversidad microbiana encontrada en los sistemas de estudio se encontró distribuida en 8 filo dominantes: Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Firmicutes y Chloroflexi. Los cuales presentaron una variación en cuanto a su abundancia relativa tanto antes como durante el evento de emblanquecimiento, así como entre sistemas; sin embargo, durante el evento de emblanquecimiento se pudo observar un incremento de la clase *Synechococcophycideae* perteneciente al Filum Cyanobacteria para ambos sistemas de estudios corroborando así lo presentado por otros autores que nos indican que las cianobacterias juegan un papel importante dentro del evento de emblanquecimiento.

Este estudio representa uno de los primeros en aportar conocimiento sobre la diversidad microbiana en columna de agua durante el evento de emblanquecimiento dando pie a un mejor entendimiento de los procesos y microorganismos involucrados durante este tipo de evento.



Abstract

Precipitation of calcium carbonate (CaCO_3) is a key process both at the global and the lacustrine scale in the Carbon cycle. One of the most spectacular cases of CaCO_3 precipitation are the so-called "whitening events". These are large-scale precipitations of fine-grained CaCO_3 that generate a change in the coloration in the surface water of lakes (from blue to milky state). In lakes, it is postulated that the precipitation of CaCO_3 is due to the photosynthetic activity of algae, since the increase in pH induces the precipitation of calcite. In Mexico, despite having reports of this type of events over the years, the interest lent by the scientific community of the country is minimal. This is related to the fact that whitening events are not periodic, as it occurs in temperate systems, which makes it difficult to study. In addition, most water bodies that are in good environmental condition in the country are located in places which are difficult to access. In the present work, the microbial diversity of surface water samples from two crater lakes (Atexcac and Preciosa) associated with CaCO_3 precipitation events was explored, using massive sequencing techniques of the 16S rRNA. The majority of the microbial diversity found in the study systems was distributed in 8 dominant Phyla: Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Firmicutes and Chlorobium. These Phyla showed variations in their relative abundance before and during the whitening event, as well as between systems. However, during the whitening event, an increase in the Class Synechococcophycidae belonging to the Phylum Cyanobacterium could be observed in both systems of study, corroborating what was mentioned by other authors showing that cyanobacteria (of the genus *Synechococcus*) play an important role in this kind of events.

This study represents one of the first to provide knowledge about the microbial diversity in the water column during whitening events, giving the opportunity to a better understanding of the processes and microorganisms involved.



Introducción

La vida en los ecosistemas evoluciona constantemente dando origen a una gran biodiversidad. Se estima que la biodiversidad microbiana asciende a unos 30 millones de especies y que la mayor parte de ella se encuentra en los mares y océanos (Mora *et al.*, 2011). Si bien se desconoce el tamaño real de la misma, estudios recientes han revelado que solo se encuentran clasificadas hasta la fecha aproximadamente 11,000 especies de Bacterias y Arqueas, y cada año se describen al menos 600 nuevas (Yarza *et al.*, 2014). Estos números proporcionan no solo una referencia del potencial ampliamente inexplorado de nuestro Planeta y de las comunidades microbianas que lo habitan, sino también del potencial de las mismas en lo que a nuevos genes y actividades se refiere (Kyrpides *et al.*, 2014). Dichas actividades son ampliamente desconocidas a pesar de que su potencial para futuros desarrollos económicos se reconoce ampliamente (Jemli *et al.*, 2014; Timmis *et al.*, 2014; Velasco-Bucheli, *et al.*, 2015).

Los ambientes acuáticos concentran gran parte de la biodiversidad del planeta lo que es comprensible si consideramos que la vida surgió en estos ambientes hace aproximadamente 3,500 millones de años (Jiménez *et al.*, 2007). Sin embargo, la poca accesibilidad para muestrear y monitorear estos sistemas, debido a su extrema heterogeneidad espacial y temporal, dificultan el reto de comprender los procesos evolutivos que originan y mantienen su diversidad biológica y se complica más si tomamos en cuenta la gran cantidad de microorganismos presentes en ellos (Prosser *et al.*, 2007). Nuestro entendimiento del papel que tienen los microorganismos en los procesos ecológicos y biogeoquímicos ha aumentado en los últimos cien años a una tasa excepcional, la primera persona en observar la presencia de estos pequeños organismos en sistemas acuáticos fue Von Leeuwenhoek en el siglo XVII, pero lamentablemente el progreso en microbiología fue lento. No fue hasta finales del siglo XX que la comunidad científica aceptó que las bacterias y otros microorganismos eran



un componente importante de los ecosistemas, pero hasta cierto punto incuantificable (Cotner y Biddanda, 2002).

Las bacterias representan el grupo más diverso de organismos y cumplen un rol esencial en procesos ecológicos fundamentales relacionados con el sostenimiento de la vida. Dada su gran abundancia y versatilidad metabólica y fisiológica, estos microorganismos son capaces de habitar una gran variedad de ambientes, desde aquellos que ofrecen condiciones ideales para el crecimiento hasta ambientes extremos cuyas características impiden el desarrollo de cualquier otra forma de vida (Prosser *et al.*, 2007). Desde que se originaron los primeros microorganismos, la actividad biológica de estos ha modelado las características del medio ambiente a través del consumo de nutrientes, intercambio gaseoso y modificación química de diferentes sustratos. Un claro ejemplo del impacto de la actividad de los microorganismos fue el cambio de una atmósfera reductora a una oxidante, gracias a la actividad metabólica de las cianobacterias (Couradeau *et al.*, 2012).

Como una manera de facilitar el estudio de los microorganismos que habitan la columna de agua, y debido a la introducción de varios tipos de redes y filtros que difieren en el tamaño de poro para separar las distintas fracciones, se introdujeron distintos términos a lo largo del tiempo y que en la actualidad son comúnmente usados (Tabla 1). De acuerdo con esta clasificación, las bacterias (o picoplancton) corresponden a la fracción entre 0.2 y 2 μm , el término picoplancton fue introducido por primera vez por Sieburth *et al.* (1978) e incluye tanto células procariotas como células eucariotas. Esta fracción del plancton se encuentra representada por integrantes de los tres dominios del árbol filogenético propuesto por Woese *et al.* (1990) para la división de todos los organismos: Bacteria, Arquea y Eukarya y tiene una importancia esencial en el flujo de carbono de los océanos y cuerpos de agua dulce.

En la mayoría de sistemas acuáticos epicontinentales el picoplancton fotosintético contribuye entre el 16 y el 70% de la producción de carbono total (Steitz y Velimirov 1999, Callieri 2008, Greisberger *et al.*, 2007). En particular, en cuerpos de agua ultraoligotróficos entre un 50 y 70% del flujo de carbono anual es atribuido a organismos que pasan a través de filtros con tamaños de poro de 1 a 2 μm (Caron *et al.*, 1985) y que representan un componente fundamental en el flujo de energía a través



del bucle microbiano (“microbial loop”) conectando los ciclos de carbono y nutrientes con el esquema de red trófica convencional en los sistemas acuáticos.

Tabla 1. Clasificación del plancton tomado y modificado de Callieri (2007).

Término	Tamaño (µm)	Referencia
Microplancton	20-200	Dussart 1965; Sieburth <i>et al.</i> , 1978
	50-500	Margalef 1955
	60-500	Hutchinson 1967
Nanoplancton	2-20	Dussart 1965; Sieburth <i>et al.</i> , 1978
	5-50	Margalef 1955
	5-60	Hutchinson 1967
	<64	Vollenweider <i>et al.</i> , 1974
Ultraplancton	<5	Margalef 1955
	0.5-5	Hutchinson 1967
Picoplancton	0.2-2	Sieburth <i>et al.</i> , 1978

El picoplancton representa un componente clave en las tramas tróficas acuáticas y su biomasa es un recurso significativo de alimento para muchos organismos (Azam *et al.*, 1983, Cole 1999). En las últimas décadas, su importancia en las cadenas tróficas acuáticas ha sido bien documentada (Pomeroy 1974, Azam *et al.*, 1983, Stockner y Antia 1986, Weisse 1993, Vörös *et al.*, 1998, Callieri y Stockner 2002, Drakare *et al.*, 2003) y en la actualidad es ampliamente reconocida su contribución dentro del flujo de carbono en muchos sistemas acuáticos, particularmente en sistemas oligotróficos (Agawin *et al.*, 2000, Bell y Kalff 2001, Richardson y Jackson 2007, Barber 2007).



Azam y colaboradores (1983) fueron los primeros en conceptualizar el rol del picoplancton en las cadenas tróficas microbianas en los océanos y más recientemente Richardson y Jackson (2007) cambiaron la visión sobre la importancia del picoplancton en las cadenas tróficas marinas, al establecer que estos microorganismos transfieren mucho más carbono sintetizado a través de la red trófica acuática que lo que se asumía previamente, demostrando que el picoplancton puede ser también una fuente importante de carbono orgánico para la producción del zooplancton y materia orgánica. El control de los predadores (“top-down”) sobre el picoplancton es principalmente ejercido por la actividad de nanoflagelados heterotróficos y mixotróficos y pequeños ciliados (Callieri 2008), mientras que el control de los recursos (“bottom-up”) sobre la abundancia del picoplancton parece estar ejercido particularmente por la disponibilidad de nutrientes y por demás variables ambientales, como por ejemplo pH, salinidad, temperatura, luz, calidad y cantidad de materia orgánica disuelta (Stockner y Porter 1988, Sanders *et al.*, 1992, Burns y Schallenberg 1998, Gasol *et al.*, 2002). Entre los factores ecológicos que regulan la estructura del picoplancton autotrófico se han señalado: el estado trófico de los lagos, la morfometría, el régimen térmico, el tiempo de residencia, los nutrientes, la luz y las interacciones bióticas (Callieri 2008).

Métodos de estudio de la abundancia y diversidad del picoplancton

Entre los años 70 y 80, gracias a la incorporación de nuevas técnicas tales como la microscopia de epifluorescencia (Daley y Hobbie 1975), la microscopía electrónica (Johnson y Sieburth 1982, Takahashi y Hori 1984) y la citometría de flujo (Olson *et al.*, 1985, Chisholm *et al.*, 1988) se lograron importantes avances en la ecología, fisiología y taxonomía del picoplancton.

No obstante, el estudio de la diversidad del picoplancton recién fue posible a partir de la incorporación y aplicación de técnicas de biología molecular basadas en el análisis de diferentes aspectos del gen que codifica para el ARN ribosomal (ARNr) (Pace *et al.* 1986). La utilización de estas técnicas moleculares en la ecología microbiana ha revolucionado el conocimiento de los ecosistemas acuáticos y ha influenciado de



manera significativa el entendimiento de la diversidad, distribución y ecología microbiana en ambientes naturales. Por primera vez fue posible determinar la composición del picoplancton sin la necesidad de observarlo bajo microscopio o cultivarlo, gracias a que fue obtenida la secuencia de un gen presente en todos los organismos vivos que codifica para la subunidad menor del ARNr. Además, ha sido posible establecer a partir de secuencias específicas dentro de este gen las características de determinados grupos de organismos, así como también la posibilidad de sintetizar sondas moleculares (primers) que reconocen e identifican estas regiones de ADN de los microorganismos que se quieren identificar.

El análisis comparativo de genes filogenéticamente informativos (como es el caso del ARNr) ha permitido reconocer nuevos linajes filogenéticos, ampliar el mapa de distribución biogeográfica de los microorganismos y, fundamentalmente, ha puesto en evidencia que la utilización de las técnicas tradicionales de cultivo microbiológico para el estudio de la diversidad microbiana deja fuera del análisis a la mayoría de los microorganismos que habitan en los ambientes naturales (Staley y Konopka 1985). El análisis filogenético, las secuencias de los genes 16S ARNr (para bacterias y picocianobacterias) y el 18S ARNr (para picoeucariotas) han resultado una herramienta muy útil en la evaluación de relaciones filogenéticas (Amann *et al.*, 1995, Murray *et al.*, 1996, Callieri 2008).

El entendimiento de la taxonomía, distribución, estructura y ecología del picoplancton está siendo enriquecido continuamente a la introducción de nuevos equipos dirigidos al estudio de las propiedades celulares de estos microorganismos, lo cual nos permite tender un mejor entendimiento del comportamiento de las comunidades microbianas en sistemas acuáticos. En particular el análisis de una comunidad busca entender cuál es la estructura de los ensambles biológicos, cuál es su función y cómo cambian espacial y temporalmente. Según Konopka, (2009), el análisis de las comunidades microbianas involucra varios elementos relacionados con la determinación de:



- ✚ **Diversidad taxonómica:** referida a inventarios de diversidad (diversidad taxonómica dentro de un hábitat definido espacialmente) en una muestra discreta, entendiendo diversidad como la riqueza de taxones o número de especies y la abundancia relativa de los diferentes taxones en la comunidad.

- ✚ **Determinación de características funcionales:** involucra conocer la actividad de los microorganismos en procesos biogeoquímicos específicos.

- ✚ **Interacciones microbianas:** busca determinar la dinámica del ecosistema y la ecología evolutiva de cada individuo. Las interacciones se pueden originar por competencia por recursos, por asociaciones simbióticas, alelopatía, producción de moléculas señal, transferencia horizontal de genes y co-evolución, entre otros.

- ✚ **Redundancia funcional:** que proporciona la capacidad de responder rápidamente a cambios ambientales.

- ✚ **Estabilidad, resistencia y resiliencia:** determinan la respuesta del ecosistema a perturbaciones.

- ✚ **Potencial genómico:** Hace referencia al metagenoma de la comunidad

Por tanto, los estudios actuales de comunidades microbianas pretenden identificar tanto los microorganismos cultivables, basados en aislamientos y/o el análisis de las propiedades metabólicas de los organismos que componen una muestra, como los no cultivables, basados en el análisis del metagenoma por medio de técnicas moleculares; en ambos casos también se realizan comparaciones filogenéticas que permiten establecer relaciones de parentesco y afiliaciones taxonómicas.

Las bacterias han sido reconocidas como los componentes integrales de todos los ecosistemas, ya que estas se encargan de ciclar y transformar la materia orgánica y nutrientes (Falkowsky et al., 2008). Los ecosistemas acuáticos epicontinentales se encuentran sujetos a distintas presiones por parte del hombre como son: incremento en la carga de nutrientes, sobre-extracción de los mantos acuíferos y la contaminación que



proviene de insumos antropogénicos tales como la escorrentía agrícola. Un aumento en la carga de nutrientes puede conducir o acelerar el proceso de eutrofización (Schindler, 2006) alterando la dinámica y composición de las comunidades de una manera que el ecosistema pierde su capacidad de resiliencia.

A principios del siglo XXI, uno de los mayores problemas con los que se enfrenta el planeta, es el incremento exponencial de las concentraciones de gases de efecto invernadero en específico de CO₂, el cual ha generado un aumento de la temperatura media del planeta. Esta problemática ha generado que un gran porcentaje de los estudios realizados por la comunidad científica en todo el mundo se centre en el ciclo del carbono, planteándose un sinnúmero de soluciones que incluyen el ahorro de energía, desarrollo de biocombustibles y la captura y secuestro de carbono (CSC). Irónicamente, uno de los problemas globales más significativos podría resolverse a través de la comprensión de uno de los organismos más pequeños de la Tierra: las Cyanobacterias (Ridgwell & Zeebe 2005), las cuales tienen un rol importante dentro del ciclo del carbono específicamente en la formación de carbonato de calcio. Lo anterior es resultado de su actividad metabólica, siendo uno de los principales organismos que regulan los niveles de CO₂ en la atmósfera a través de la fotosíntesis (Bundeleva *et al.*, 2012), y que puede resultar en la precipitación masiva de carbonatos generando lo que se conoce como eventos de emblanquecimiento.

Evento de emblanquecimiento

El mayor reservorio de carbono en la Tierra existe como HCO₃ disuelto en los océanos y cuerpos de agua continentales. El 42% de yacimientos de carbono total en la Tierra están representados por los carbonatos en forma de piedra caliza y dolomita (Ehrlich, 1996). En la superficie de la Tierra, una porción significativa del carbonato insoluble es de origen biogénico, involucrando bacterias, hongos, algas y metazoos (Gadd, 2010). Como ejemplo de la participación de microorganismos encontramos la precipitación masiva de carbonatos representada en los estromatolitos (Grotzinger y Knoll, 1999) y los eventos de emblanquecimiento (Thompson *et al.*, 1997) aunque no es una actividad exclusiva de sistemas acuáticos (Hammes y Verstraete 2002) (Tabla 2).



El emblanquecimiento, también llamado evento blanco, es causado cuando el carbonato de grano fino precipita en la columna de agua de los lagos y océanos (Thompson *et al.*, 1997) generando un cambio en la coloración del espejo de agua a un color verde-neón. Durante mucho tiempo los científicos han estado debatiendo las causas de este fenómeno sin poder llegar a una conclusión (Drew 1913). Existe evidencia que sustenta que los emblanquecimientos son causados por la precipitación microbiana de carbonato (MCP por sus siglas en inglés) ya sea por mecanismos de precipitación inorgánicos, o por la resuspensión de sedimentos de carbonato (Wright y Oren 2005). La evidencia reciente sugiere que estos eventos son causados por organismos del picoplancton, específicamente por cianobacterias del género *Synechococcus* (Thompson *et al.*, 1997 Dittrich *et al.*, 2003). Al ser las cianobacterias organismos cosmopolitas y considerando su importancia en la mayoría de los sistemas acuáticos, la biomineralización de CaCO_3 inducida por estos puede ser mucho más frecuente de lo reportado (Obst *et al.*, 2009).

En la naturaleza, se sabe que gran variedad de microorganismos son capaces de inducir la precipitación de carbonatos alterando la química de la solución (principalmente el pH) a través de una amplia gama de actividades metabólicas (Fig.1) o como subproducto de esta (Castanier *et al.*, 1999, Riding, 2000, Dejong *et al.*, 2010, Maignien *et al.*, 2011; De Muynck *et al.*, 2013), incluyendo:

1. Fotosíntesis (Dupraz *et al.*, 2004),
2. Ureolisis (Fujita *et al.*, 2000),
3. Desnitrificación (Van Paassen *et al.*, 2010),
4. Amonificación (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2003),
5. Sulfato reducción (Braissant *et al.*, 2007) y la
6. Oxidación del metano (Reeburgh, 2007)



Tabla 2. Ejemplos de rutas asociadas a la precipitación de carbonatos y su ambiente.

Tomado y modificado de Hammes y Verstraete (2002).

Ambiente	Especies	Rutas
<p>Lago meromítico</p> <p>Medio BG11</p>	<p><i>Synechococcus GL24</i> (Douglas & Beveridge, 1998)</p> <p><i>Nannochloris atomus</i> (Yates & Robbins, 1999)</p>	<p>Fotosíntesis</p>
<p>Lagunas anóxicas hipersalinas</p> <p>Lagos naturales hipersalinos ricos en sulfato</p>	<p>SRB aislado LVform6 (Whartman <i>et al.</i>, 2000)</p> <p>SRB inespecíficas (Wright, 1999)</p>	<p>Sulfato reducción</p>
<p>Degradación de urea medio sintético</p> <p>Amonificación y nitrato reducción medio sintético</p> <p>Degradación de urea medio sintético</p>	<p><i>Bacillus pasteurii</i> (Stocks-Fischer <i>et al.</i>, 1994)</p> <p><i>Bacillus cereous</i> (Castanier, 1999)</p> <p><i>Variovorax spp</i> y <i>Pseudomonas</i> (Fujita <i>et al.</i>, 2000)</p>	<p>Ciclo de nitrógeno</p>
<p>Mezcla de sal marina sintética</p>	<p><i>Vibrio spp.</i> (Rivadeneira <i>et al.</i>, 1994)</p> <p><i>Flavobacterium spp.</i> (Ferrer <i>et al.</i>, 1998)</p> <p><i>Actinobacter spp.</i></p>	<p>Rutas no específicas</p>



(Ferrer *et al.*, 1998)

Además, se sabe que las paredes celulares y las sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés) sirven como sitios de nucleación y precipitación de carbonatos (Kamennaya *et al.*, 2012; Obst *et al.*, 2009).

Las cianobacterias presentan dos diferentes formas de capturar CO₂, una a través de la fotosíntesis y el ciclo Calvin-Benson-Bassham donde el CO₂ es capturado y transformado en compuestos orgánicos, y la otra a través de la mineralización de carbonatos. El CO₂ se sintetiza para formar materia orgánica a través de la fotosíntesis, y el bicarbonato se convierte en CO₂ y OH⁻, el llamado mecanismo de concentración de CO₂. El OH⁻ se libera entonces en la solución, aumentando el pH. La precipitación de carbonatos ocurre mediante un proceso de intercambio de HCO₃⁻ / OH⁻ a través de la membrana celular, dando como resultado un aumento del pH en el microambiente alrededor de las células. El Na⁺ y HCO₃⁻ se transportan a las células a través de un symporter (proteína asociada a la membrana dedicada al transporte de diferentes tipos de moléculas); el CO₂ entra en la pared celular a través de este symporter o por difusión (Espie y Kandasamy, 1992).

En un proceso similar a los microorganismos fotosintéticos, las bacterias ureolíticas afectan la concentración del carbono inorgánico disuelto y el pH de un ambiente a través de la hidrólisis de la urea. Por ejemplo, *Sporosarcina pasteurii* (Wei *et al.*, 2015) hidroliza urea para producir amoníaco y ácido carbónico (De Muynck *et al.*, 2013). La hidrólisis posterior de amoníaco aumenta el pH produciendo OH⁻, y la disociación del ácido carbónico genera bicarbonatos (Knoll, 2003). En este proceso, la alcalinidad se incrementa a través de la hidrólisis de la urea, por lo tanto, la reacción favorece la precipitación de carbonato de calcio en presencia de calcio en solución.

En la desnitrificación (bajo condiciones anaeróbicas), el nitrato es utilizado por los microorganismos para oxidar los compuestos orgánicos para la energía y el crecimiento celular (Martin *et al.*, 2013). Un número de bacterias capaces de reducir el nitrato, las llamadas desnitrificadoras, incluyen *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Denitro Bacillus*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Micrococcus* y *Achromobacter* (Karatas, 2008). Las bacterias desnitrificantes son típicamente anaerobios facultativos, lo que les



proporciona flexibilidad en su estrategia de crecimiento (Karatas, 2008). Se puede esperar que la desnitrificación domine donde el nitrato y el carbono orgánico están presentes y el O_2 es limitado (Dejong *et al.*, 2010). El proceso de desnitrificación aumenta el pH en el medio circundante al consumir H^+ , y produce CO_2 , lo que favorece la precipitación de carbonatos. Hasta ahora, sólo unos pocos estudios han investigado la relación entre la desnitrificación y la formación de carbonato de calcio, y los cristales observados alrededor de las células durante el proceso (Erşan *et al.*, 2015).

La Amonificación de los aminoácidos a través del metabolismo microbiano produce CO_3^{2-} y NH_3 . El subsecuente hidrolisis del NH_3 genera OH^- alrededor de la célula y conlleva a una supersaturación local con respecto al carbonato de calcio y consecuentemente precipita calcita o vaterita (González-Muñoz *et al.*, 2010). Algunas especies que son representantes de las mixobacterias como *Myxococcus xanthus* actúan como un sitio de nucleación.

Las bacterias sulfatos reductoras (BSR) reducen sulfato a sulfuro mientras oxidan el carbono orgánico a bicarbonato, durante el cual el pH y el porcentaje de saturación se incrementa, por otra parte, las BSR pueden incrementar la concentración local de Ca^{2+} a través de la degradación del EPS de los tapetes microbianos. Con el incremento en la concentración de HCO_3^- y la liberación de Ca^{2+} se favorece la precipitación de $CaCO_3$.

En la oxidación anaerobia del metano este es oxidado a bicarbonato y el sulfato es reducido a HS^- . En la presencia de Ca^{2+} se precipita carbonato de calcio y se genera sulfuro de hidrogeno.

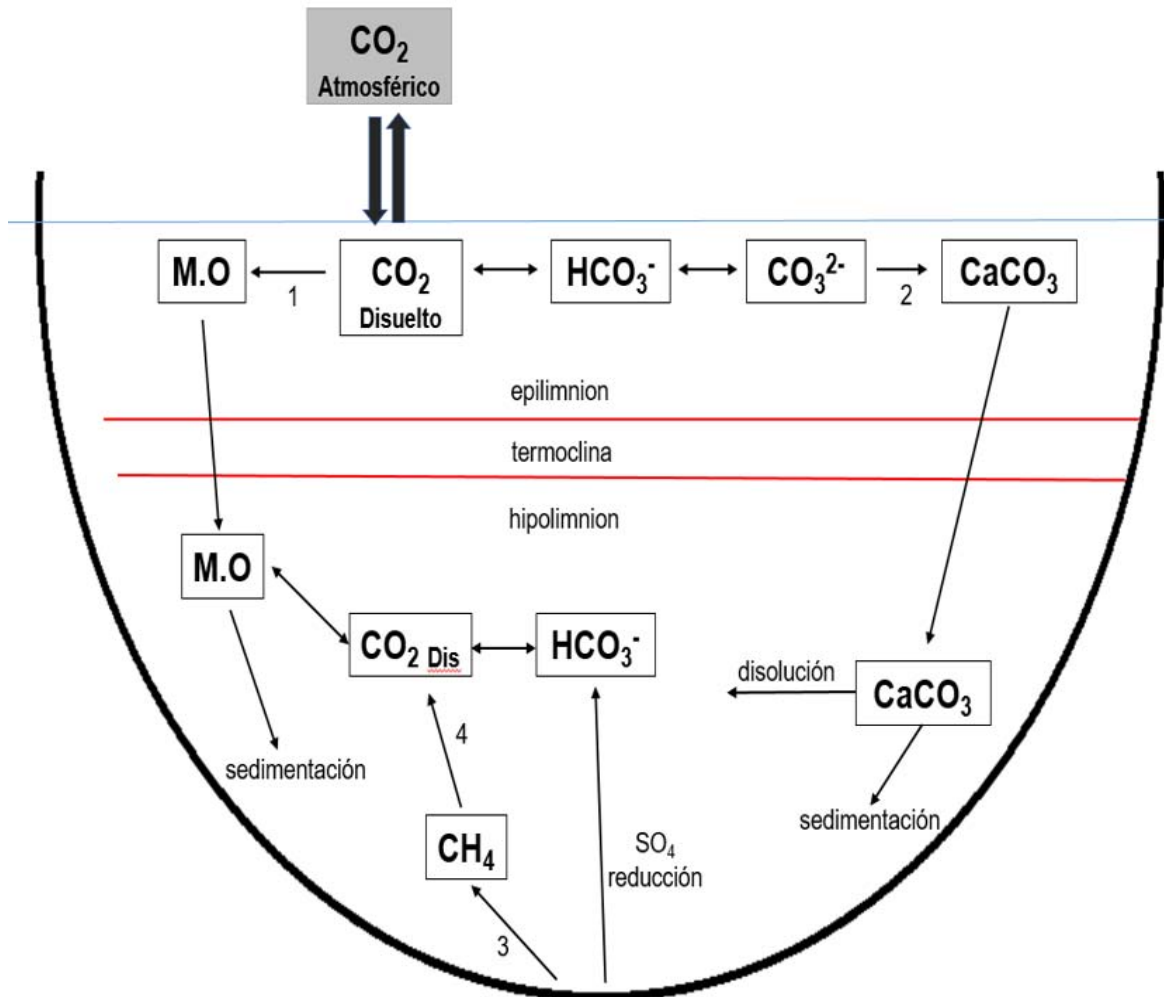


Figura 1. Esquema de los distintos procesos relacionados con el ciclo de carbono y la precipitación de carbonatos en lagos. 1.- Fotosíntesis. 2.-Precipitación de carbonatos. 3.- Metanogénesis. 4.-Oxidación del metano.

El MCP es un proceso frecuente y que tiene un papel importante en la cementación de sistemas naturales, como cuevas, suelos, sedimentos y mantos acuíferos (Riding, 2000; Chou *et al.*, 2011). Inspirado en su capacidad natural para coprecipitar iones metálicos y producir CO_2 , se propone que el MCP sea una tecnología prometedora en remediación de metales, reforzamiento del suelo y restauración en la construcción (Dejong *et al.*, 2006, Sen, 2008, Bang *et al.*, 2010, Achal *et al.*, 2012).

En los sistemas marinos y epicontinentales, los microorganismos fotosintéticos son los responsables de desencadenar la precipitación de calcita (Arp *et al.*, 2001; Dittrich y Obst, 2004; Plée *et al.*, 2010), mientras que, en una amplia variedad de



ambientes, esta precipitación ocurre más como resultado de la actividad de distintos consorcios microbianos los cuales abarcan miembros tanto autotróficos como heterotróficos (Power *et al.*, 2011).

Como se puede observar el evento de emblanquecimiento es un fenómeno muy común y ampliamente estudiado a lo largo del mundo, presentándose en distintas localidades y sistemas, por ejemplo, el lago Ontario entre EUA y Canadá, Green Lake y lago Michigan en EUA donde se puede observar un cambio progresivo en la coloración del espejo de agua, descrito como verde neón a lo largo de dos meses (Dittrich y Obst, 2004). Recientemente este fenómeno se reportó para dos lagos tropicales ubicados en la cuenca oriental de Puebla México, en el lago Atexcac y en el lago Preciosa (Lagunas y Martínez, 2015) (Fig. 2).

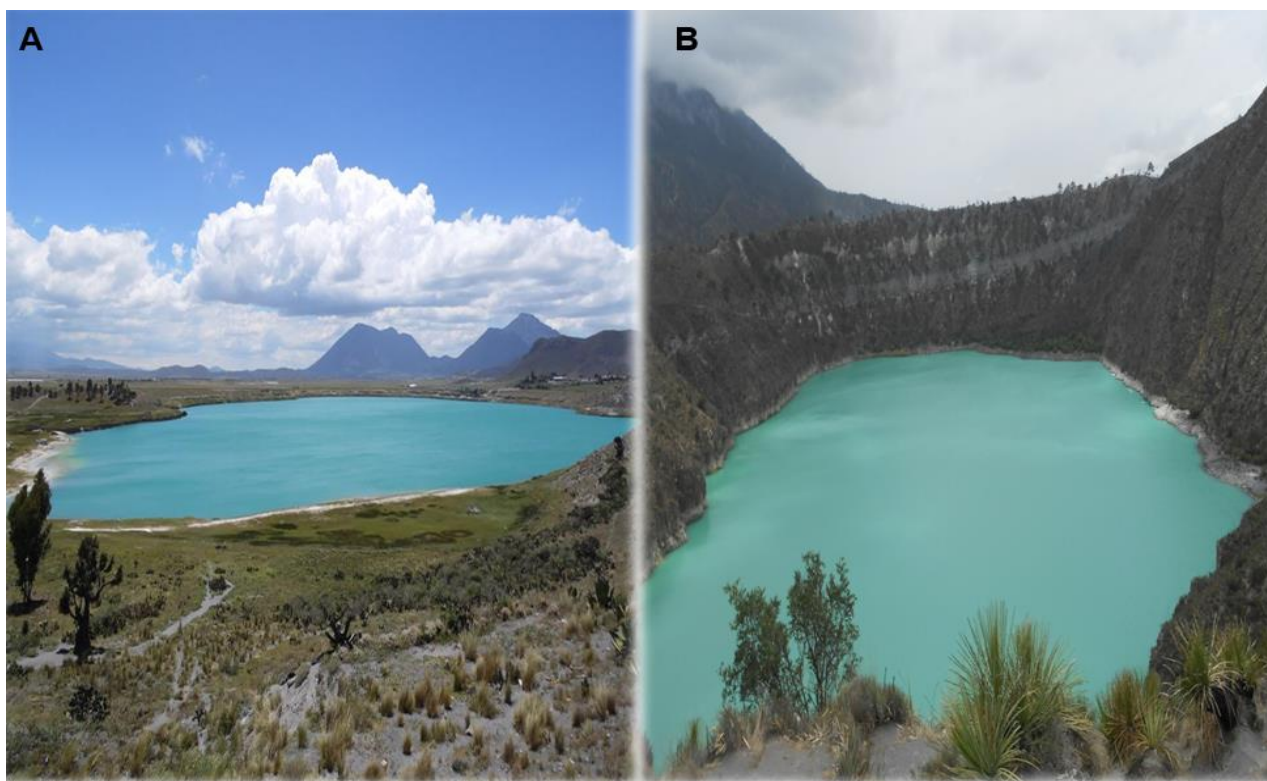


Figura 2. A) Evento de emblanquecimiento lago Preciosa (agosto 2014) B) evento de emblanquecimiento lago Atexcac (septiembre 2014).



Planteamiento del problema

Hace algunos años México poseía aproximadamente el 1% de superficie de recursos acuáticos de la reserva mundial (Alcocer *et al.* 1997), sin embargo, hoy en día con el incremento de la población, la deforestación, la sobre extracción de agua subterránea y la contaminación es muy probable que este porcentaje se encuentra muy por debajo del reportado. Aunado a esto, los procesos naturales, geológicos y climáticos también han favorecido la desecación de los lagos del país, lo cual implica un grave problema, ya que estos ecosistemas presentan una alta diversidad biológica y paradójicamente, son poco conocidos en términos de la composición específica de sus comunidades y de interacciones entre las diferentes poblaciones. Este desconocimiento se hace evidente si consideramos a los organismos planctónicos de tamaño pequeño (bacterias, fitoplancton y algunos protozoos) ya que, las técnicas empleadas para el estudio de estos organismos generalmente son poco adecuadas, además de la dificultad que implica el tratar de reproducir en el laboratorio ciertas variables ambientales.

Los microorganismos fotosintéticos, particularmente las Cyanobacterias, son reconocidos como los responsables de las precipitaciones masivas de carbonatos. Se estima que las cianobacterias han contribuido a la producción de rocas carbonatadas durante casi el 70% de la historia de la Tierra (Altermann *et al.*, 2006), realizando un papel clave en la fijación de CO₂ en sistemas acuáticos epicontinentales; sin embargo, en México a pesar de contar con reportes de eventos de precipitación de carbonatos a lo largo de los años, el interés prestado por la comunidad científica del país hasta el momento es mínima. Lo anterior se debe a que el emblanquecimiento no presenta una periodicidad como ocurre en sistemas templados lo cual dificulta su estudio, aunado a que la mayoría de los cuerpos de agua que se encuentran en buen estado dentro del país se localizan en localidades aledañas o de difícil acceso.



Preguntas de investigación

Dada la importancia de conocer el papel de las comunidades bacterianas en el evento de emblanquecimiento se propusieron las siguientes preguntas:

- ❖ ¿Cuál es la composición de las comunidades microbianas en las muestras de agua superficiales (0-5 m) en los sitios de estudio?
- ❖ ¿Existen cambios significativos en la diversidad y composición de estos microorganismos durante el evento de emblanquecimiento?

Hipótesis

Si el evento de emblanquecimiento tiene su origen a partir de un incremento en la densidad de organismos del picoplancton autotrófico (Cyanobacteria), como lo reportado para sistemas templados, se espera encontrar un aumento en la proporción relativa de este filo microbiano durante el evento en ambos sistemas de estudio; sin embargo se ha demostrado que la porción heterótrofa también juega un papel importante dentro de los ciclos biogeoquímicos en sistemas acuáticos, por lo cual no se descarta la posible presencia de ciertos grupos heterótrofos que tengan una relación directa con la formación de minerales de carbonato.

Al ser lagos ubicados en la misma zona de estudio y tener un mismo origen se espera encontrar algunas unidades taxonómicas operativas (OTUs) en común entre ambos sistemas.



Justificación

El evento de emblanquecimiento es un fenómeno muy estudiado en regiones templadas, siendo los organismos del picoplancton los responsables de este, sin embargo, los estudios realizados para sistemas tropicales son muy pocos y lo son aún más cuando hablamos de la composición y estructura de las comunidades presentes en la columna de agua durante estos eventos, aunado a esto la región presenta altos índices de erosión (acelerada por incendios controlados) y abatimiento de los mantos freáticos por la perforación de pozos de riego, lo cual implica un grave problema que de no ser solucionado nos puede llevar al abatimiento de estos cuerpos de agua.

Objetivo

Describir la composición de los Fila más abundantes en los lagos Atexcac y Preciosa, antes y durante el evento de emblanquecimiento.

Área de estudio

Entre los ecosistemas acuáticos mexicanos se encuentran una serie de lagos de origen volcánico conocidos con el nombre de Axalapascos (ollas de arena con agua). Estos sistemas son lagos de tipo *maar* ubicados en la Cuenca Oriental la cual comprende parte de los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Arredondo-Figueroa 1995). Dentro de este grupo destacan los lagos Preciosa y Atexcac, los cuales han sido centro de diversos estudios a lo largo de los años (Vilaclara *et al.*, 1993). Ambos lagos se ubican aproximadamente a 2,340 m s.n.m., presentan un régimen térmico de monomíxis cálida, el cual se caracteriza por presentar un período de mezcla y uno de estratificación dentro de un ciclo anual, con una temperatura del agua que oscila entre los 15 y 22°C a lo largo del año. La interacción entre la latitud y altitud condiciona un clima templado subhúmedo con lluvias en verano. Presentan una precipitación anual inferior a 500 mm y una evaporación anual de 600 mm, lo que genera un déficit de agua (Adame *et al.*, 2008).



Lago Atexcac

El lago Atexcac se encuentra situado en las coordenadas geográficas 19°19'58.60" y 19°20'9.34" de latitud norte y 97°27'17.34" y 97°26'47.49" longitud oeste (Google Earth 2016) (Fig. 4), en los llanos de San Juan, al norte de las montañas Las Derrumbadas y en el extremo suroeste de la sierra de Techachalco. Es un lago tropical atalasohalino (aguas saladas de origen no marino), el cual presenta una variación en su dinámica trófica la cual va de meso-eutrófico a oligotrófico (poco productivo). Dependiendo de la época del año. Tiene una salinidad de $6 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ siendo el sodio y el cloro los iones dominantes, un pH de 8 ± 1 dependiendo de la época del año y en relación a los distintos florecimientos que presenta el sistema (Macek *et al.*, 2007, Armienta *et al.*, 2008, Lagunas y Martínez 2015), característica similar a lo reportado para el lago Alchichica, con florecimientos invernales de diatomeas durante la mezcla y el florecimiento de una cianobacteria filamentosa *Nodularia* durante los meses de abril y mayo (Alcocer *et al.* 2008, Oliva *et al.*, 2009, Hernández-Avilés *et al.*, 2001).

Lago Preciosa

La Preciosa, también conocida como las Minas, se encuentra en las coordenadas 19° 22' N y 97° 23' W. Su forma es aproximadamente triangular (Fig. 3) debido a una triple explosión freática ocurrida en puntos muy próximos y casi simultáneos (Armienta *et al.*, 2008). Tiene una longitud máxima de 1.34 km, un ancho máximo de 920 m y una profundidad de 45 m (Arredondo *et al.*, 1983). Tiene un pH que oscila entre 8.4 ± 0.6 y una salinidad y conductividad de $1 \pm 0.5 \text{ g L}^{-1}$ y $2,150 \mu\text{S cm}^{-1}$ respectivamente con dominancia de sodio y magnesio sobre potasio y calcio, así como de cloruros y bicarbonatos sobre sulfatos y carbonatos (Vilaclara *et al.*, 1993).

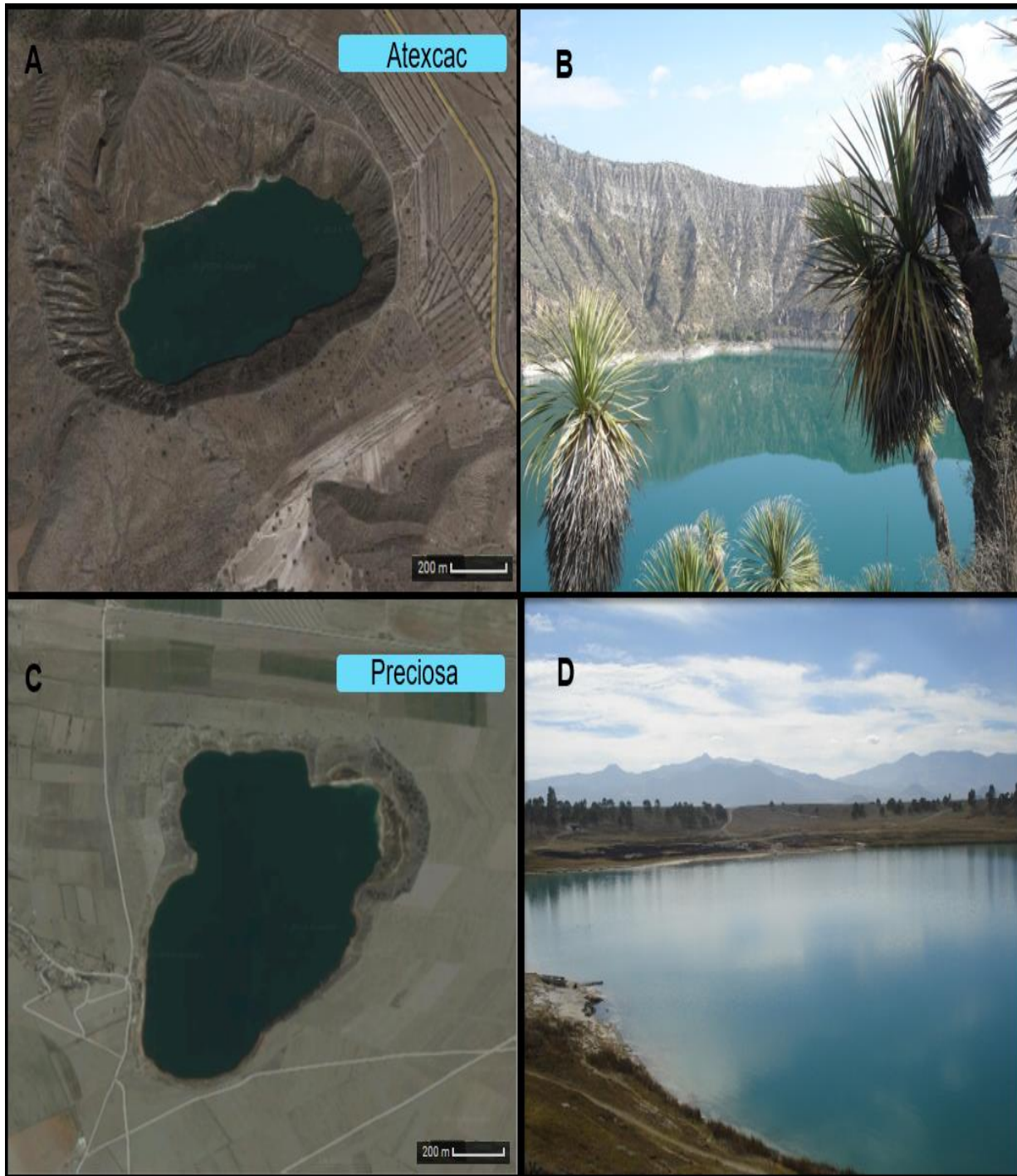


Figura 3. Imágenes satelitales y vista de los lagos Atexcac (A y B) y Preciosa (C y D).



Metodología

Muestreo en campo

Se realizaron muestreos mensuales a lo largo del 2014 con el apoyo del laboratorio de limnoecología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, esto con la finalidad de encontrar el evento de emblanquecimiento en ambos sistemas.

El presente estudio fue realizado tanto antes del evento de emblanquecimiento, el cual corresponde al mes de febrero de 2014 (mezcla) para ambos sistemas, así como en el emblanquecimiento durante el período de estratificación; en agosto (Preciosa) y septiembre (Atexcac).

Muestras DNA

De acuerdo con la batimetría de los lagos se ubicaron los puntos de mayor profundidad y se establecieron estos como los sitios de muestreo. Una vez determinado el punto de muestreo y partiendo del supuesto que el evento de emblanquecimiento es un fenómeno superficial ocasionado por la actividad microbiana por parte de los organismos autotróficos, se tomó una muestra de 500 mL de 1 y 5 m generando así una muestra compuesta de 1 L para cada sistema, las cuales se pasaron por un filtro con una membrana de 100 μm de poro y por uno de 64 μm para evitar la saturación del filtro eliminando a los organismos de mayor tamaño. Una vez que se realizó el filtrado previo se concentró la muestra de DNA en filtros estériles con una membrana de 0.22 μm marca Sterivex con ayuda de una jeringa. Los filtros se almacenaron en nitrógeno líquido y una vez en laboratorio se almacenaron en un congelador de -20°C hasta el momento de su extracción.



Extracción de DNA

La identificación de la composición microbiana se realizó mediante la extracción de DNA total de las muestras filtradas incubadas en buffer de extracción (100mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 100 mM EDTA) y CTAB al 10%. Posteriormente se adicionó lisozima (30mg/mL, sigma Aldrich) durante 15 minutos a 37°C y proteinasa K (30mg/mL, sigma Aldrich) durante 15 minutos a 55°C. Se obtuvo un sobrenadante por centrifugación y se extrajo una vez con fenol/cloroformo/isoamil alcohol (24:25:1) y una con cloroformo/isoamil alcohol (24:1). Finalmente se dejó precipitar el DNA con isopropanol al 100% y acetato de sodio 3M al 10% durante 20 minutos a -20°C.

Las muestras fueron centrifugadas y el pellet se lavó con etanol al 70% dejando secar a temperatura ambiente. Con la finalidad de obtener un DNA de mayor calidad, se utilizó el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Valencia, CA), que brinda una purificación fácil y rápida con ayuda de columnas de sílice.

Amplificación

Las muestras de DNA fueron amplificadas mediante PCR usando la región hipervariable V4 con primers universales para bacteria y arquea 515F/806R (tabla 3) siguiendo el procedimiento reportado por Caporaso *et al.*, (2012). La reacción de PCR (25µl) constituida por 2-6 ng de DNA, 2.5µl de Takara ExTaq PCR buffer 10x, 2µl Takara dNTP (2.5mM), 0.7µl de albúmina de suero bovino (BSA, 20 mg ml⁻¹), 1 µl de oligonucleótidos (10 µM), 0.125 µl de Takara Ex Taq DNA Polimerasa (5 U µl⁻¹; TaKaRa, Shiga, Japan) y agua libre de nucleasas.

Las muestras fueron amplificadas por triplicado usando el protocolo de PCR que incluye un proceso de desnaturalización a 95° C (3 min), seguido de 35 ciclos de 95° C (30 seg), 52° C (40 seg) y 72° C (90 seg) seguida de una extensión final de 72° C, 12 minutos.



Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los iniciadores (primers) usados en la reacción de PCR.

Iniciador	Secuencia (5´ - 3´)
<i>515 forward</i>	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
<i>806 reverse</i>	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Secuenciación

El tipo de secuenciación forma parte de la plataforma illumina Miseq y se llevó a cabo en el Yale Center for Genome Analysis, CT, EUA. (≈ 20 ng por muestra). Se obtuvieron lecturas de extremo (pair-ended) de ~ 250 pb. Las secuencias se traslaparon y se unieron utilizando el programa FLASH (Magoč & Salzberg, 2011). Las quimeras fueron eliminadas mediante USEARCH (Edgar, 2013), y se eliminaron los singletons. La demultiplexación se realizó con QIIME versión 1.7.0 ($r = 1$, $p = 0,75$, $q = 3$, $n = 0$, $-min_count 0,005\%$). Las secuencias que no pasaron el filtro de calidad se descartaron. Las secuencias que pasaron los filtros de calidad fueron organizadas en OTUs (Operational Taxonomic Units) a una identidad nucleotídica igual o mayor del 97%. Las secuencias se clasificaron en diferentes grupos taxonómicos bacterianos mediante la base de datos GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov/>) (Cole et al., 2007).



Resultados

De acuerdo a la clasificación de Lewis,(1983) estos sistemas presentan un régimen hidrodinámico de monomixis cálida, el cual se caracteriza por presentar dos períodos; uno de mezcla que abarca los meses de diciembre a marzo (invierno hemisférico) con una temperatura que va desde los 16 °C en la superficie a 15° C hacia el fondo, y otro de estratificación el cual abarca los meses restantes en donde la temperatura depende del período de estratificación (que puede ser clasificado en estratificación temprana, bien establecida o tardía) con una temperatura promedio de $18 \pm 18.5^{\circ}\text{C}$ con una máxima de 21.8°C en la superficie y una mínima de 15.4°C hacia el fondo según lo reportado en estudios anteriores (Lagunas y Martínez, 2015; Moran-Ventura, 2016).

Estos sistemas presentan también una estratificación química relacionada con la estratificación térmica en donde las concentraciones de oxígeno disuelto fluctúan entre 7 y 0 mg L⁻¹. Tales condiciones generan gradientes redox a lo largo de la columna de agua el cual tiene una influencia directa en la diversidad y composición microbiana.

Diversidad microbiana

La diversidad microbiana encontrada en los lagos Atexcac y Preciosa es muy variada tanto antes como durante el evento de emblanquecimiento para cada sistema. Las curvas de acumulación (Fig. 4) muestran que el sistema que presenta una mayor riqueza de microorganismos es el lago Atexcac aumentando el número de especies observadas durante el evento de emblanquecimiento, mientras que el lago Preciosa a pesar de tener un menor número de especies presenta un patrón inverso siendo la mayor diversidad antes del evento y que se corrobora con los índices presentados en la Tabla 4.

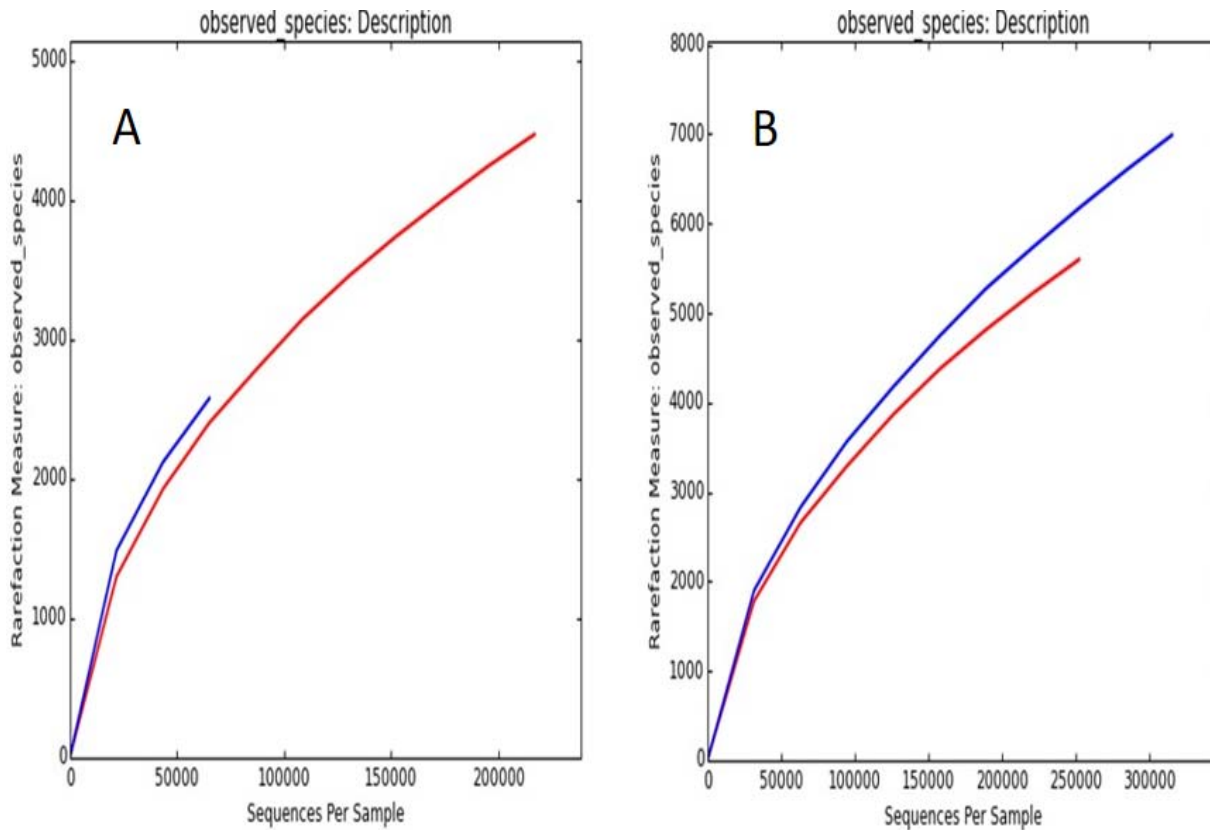


Figura 4. Curvas de acumulación de OTUs observados para los lagos A) Preciosa y B) Atexcac tanto antes (línea roja) como durante (línea azul).

Tabla 4. Índices de diversidad tanto antes como durante el evento de emblanquecimiento para los lagos Atexcac y Preciosa.

Lago	Etapas	PD	chao1	OTUS
Atexcac	Mezcla	156	6228	2828
	Evento blanco	163	6496	2956
Preciosa	Mezcla	138	5030	2485
	Evento blanco	155	4507	2650



Composición microbiana

Fila microbianos en el lago Preciosa

El 90 % de la diversidad de microorganismos encontrados en el lago Preciosa se puede explicar a través de la suma de los ocho Fila más dominantes Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Verrumicrobia, Planctomicetes, Chlorobi y Firmicutes. Durante el evento de emblanquecimiento se observa un incremento en el porcentaje relativo de los 8 Fila dominantes, a excepción de los Fila Actinobacteria, Firmicutes y Chlorobi los cuales reducen su porcentaje durante este evento (Fig. 5) siendo los más representativos Proteobacteria y Bacteroidetes. Durante el periodo de mezcla los 3 Fila más representativos fueron Actinobacteria, Proteobacteria y Bacteroidetes.

Fila microbianos del lago Atexcac

Al igual que en el lago Preciosa la composición de la comunidad microbiana de los Fila más representativos de Atexcac está constituida en un 94% por Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Verrumicrobia, Planctomicetes, Chlorobi y Firmicutes. Durante el evento de emblanquecimiento se observa un incremento de los Fila Bacteroidetes y Actinobacteria siendo estos los más abundantes además de la reducción de cloroplasto (detectado por la señal de algas verdes o diatomeas). Durante la mezcla los Fila que presentaron un mayor porcentaje fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y cloroplasto.

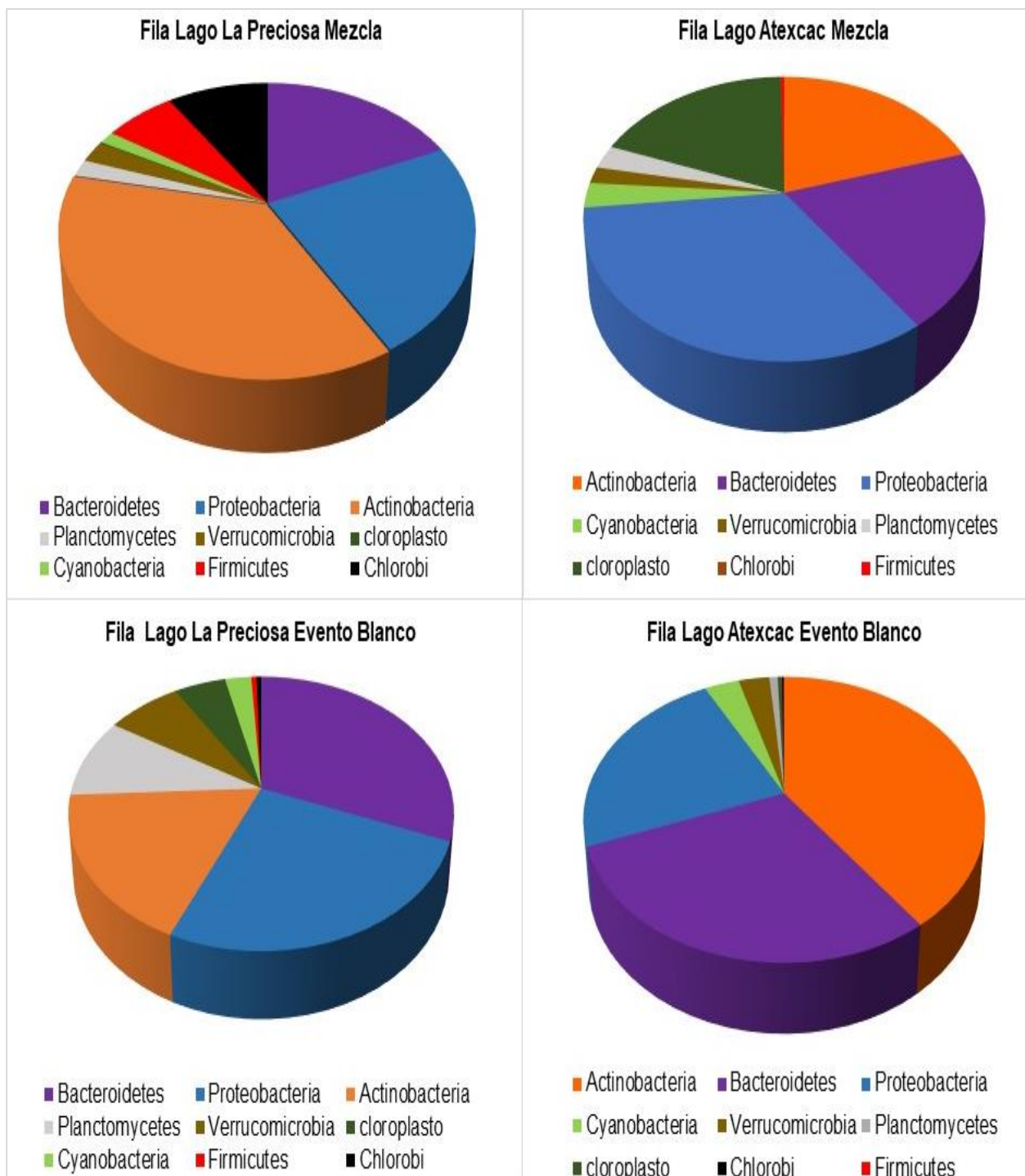


Figura 5. Fila dominantes en los Lagos Atexcac y La Preciosa.



Filum Proteobacteria

El Filum Proteobacteria es un grupo de bacterias Gram negativas de gran importancia ya que son muy diversas y abundantes en todos los ecosistemas. Son relevantes en la agricultura, la industria y son médicamente relevantes convirtiéndose en uno de los Fila más estudiados.

Ambos lagos presentan una variación en cuanto a la composición y abundancia de las distintas clases que conforman al Filum, misma que se relaciona directamente con el tipo de sistema y sus características limnológicas, así como el momento de muestreo, encontrando un total de 5 clases entre los dos lagos: Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria y Epsilonbacteria (Fig. 6). La clase Gammaproteobacteria se presenta exclusivamente en el lago Preciosa tanto en la mezcla como en el evento blanco y es la más dominante para ambos meses de muestreo. En el caso del lago Atexcac se presenta la clase Epsilonbacteria que al igual que Gammaproteobacteria es la más abundante para ambos eventos; para ambos sitios de estudio la clase Deltaproteobacteria fue la que presentó una menor dominancia.

Filum Actinobacteria

El Filum Actinobacteria es un Filum común y abundante en lagos, de hecho, es el Filum más dominante numéricamente en lagos donde contribuyen con aproximadamente un 50% del total de bacterias presentes en estos sistemas, en las capas superficiales (epilimnion), ya que su abundancia disminuye conforme disminuye la concentración de oxígeno en la columna de agua (Newton *et al.*, 2011).

Entre los dos sistemas de estudio observamos la presencia de tres clases: Actinobacteria, Nitriliruptoria y Acidimicrobiia. Para Preciosa la clase con mayor proporción fue Actinobacteria reportando su mayor porcentaje durante el perdió de mezcla disminuyendo durante el evento de emblanquecimiento al igual que Acidimicrobiia. Atexcac presento un patrón inverso al observado en Preciosa donde las 3 clases incrementan su proporción durante el evento, siendo las más abundantes Actinobacteria y Nitriliruptoria, la cual presento un porcentaje tan bajo durante la mezcla en el lago Preciosa que podría pasar desapercibida (Fig. 6).



Filum Bacteroidetes

El Filum Bacteroidetes, antes conocido como el Filum de Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB), exhibe una enorme diversidad fenotípica y metabólica. Los miembros de este Filum se encuentran en distintos tipos de ambiente desde suelo, ambientes acuáticos, o como simbioses de plantas, de animales o seres humanos. Este Filum fue uno de los más abundantes en los sitios de estudio y está constituido por las clases: Rhodothermi, Saprospirae, Sphingobacteriia, Flavobacteriia y Cytophagia (Fig. 6). La proporción de estas clases fue muy diferente entre los dos sistemas. En el lago Preciosa se puede apreciar de mejor manera las diferencias en las proporciones de estas cinco clases, siendo Sphingobacteriia la más dominante en los dos muestreos aumentando durante el evento de emblanquecimiento junto con Saprospirae y Cytophagia. En el lago Atexcac se pudo observar un mayor porcentaje constituido por las clases Rhodothermi y Flavobacteriia las cuales aumentan su porcentaje durante junto con las otras dos clases durante el evento.

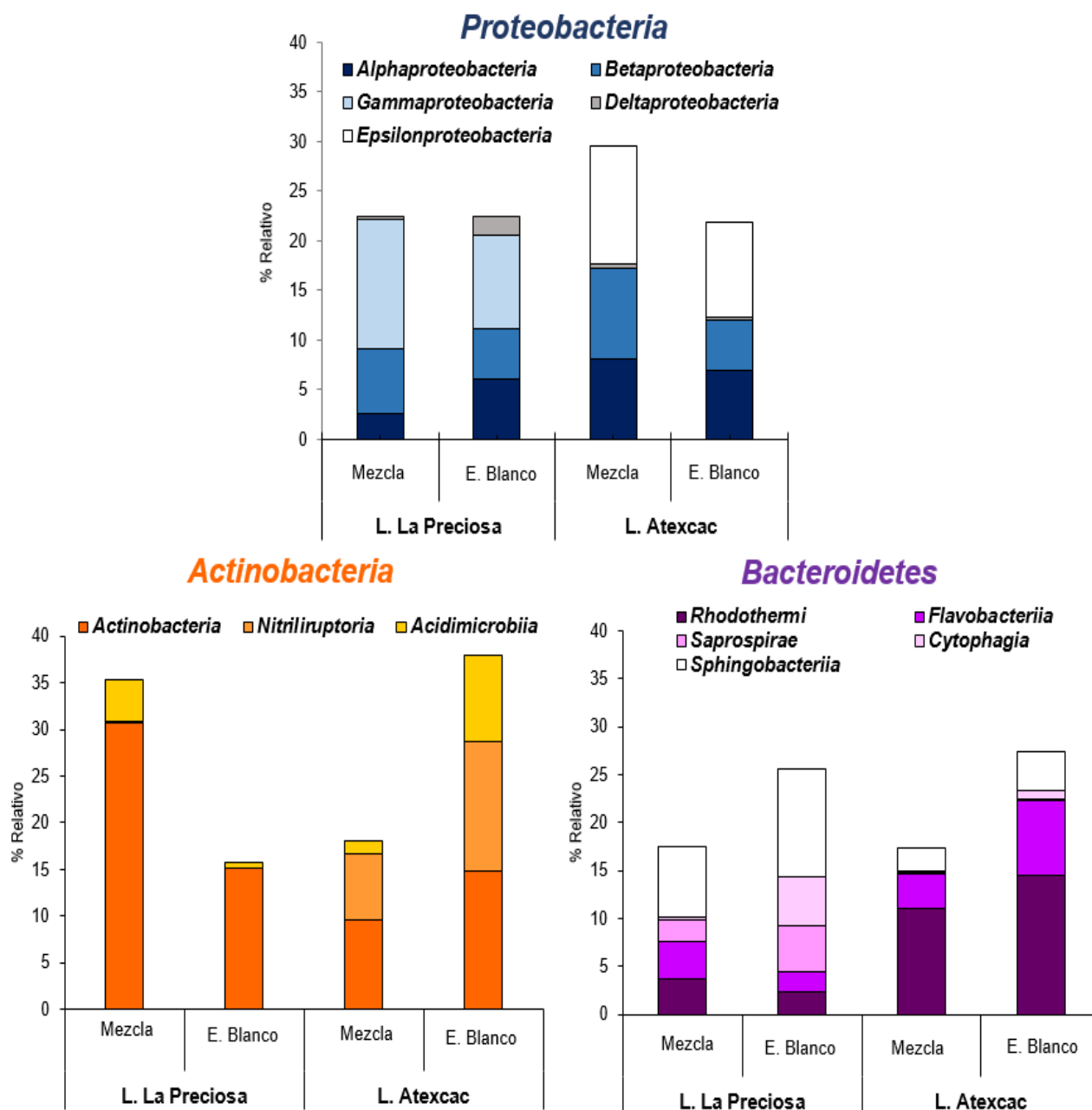


Figura 6. Gráfica de la composición a nivel de clase de los Fila más Representativos en los lagos Atexcac y Preciosa.



Filum Planctomycetes

El Filum Planctomycetes el cual es uno de los Fila menos representativos de los sistemas (con una proporción relativa menor al 10%) (Fig. 7), fue conformado por la presencia de dos clases: Phycisphaerae y Planctomycetia. Ambas clases estuvieron presentes en ambos sistemas con diferencias en su proporción siendo las más dominantes Phycisphaerae durante el evento blanco en el lago La Preciosa y Planctomycetia en le mezcla. En Atexcac Phycisphaerae fue las más dominante tanto en el periodo de mezcla como durante el evento, sin embargo, contrario a lo observado en Preciosa el porcentaje de estas dos clases disminuye durante el evento de emblanquecimiento.

Filum Verrucomicrobia

El Filum *Verrucomicrobia* fue constituido por las clases Pedosphaerae, Opiritae, Verrucomicrobiae y Spartobacteria. Encontrándose las tres primeras en ambos sistemas de estudio y la última solo en el lago Atexcac. Durante el evento de emblanquecimiento en Preciosa se observó un incremento en el porcentaje relativo de las tres clases presentes en el sistema, siendo la más abundante Pedosphaerae. (Fig. 7). En el caso de Preciosa la clase con mayor porcentaje fue Opiritae tanto en la mezcla como en el evento seguida de la clase Spartobacteria la cual presento un ligero aumento. La clase Verrucomicrobiae solo se presentó durante el evento de emblanquecimiento.



Filum Firmicutes

El Filum Firmicutes se constituyó por las clases de Erysipelotrichi, Bacilli y Clostridia. Estas clases presentaron su mayor abundancia en el lago Preciosa en comparación con Atexcac, específicamente Erysipelotrichi la cual presentó su mayor abundancia durante la mezcla; durante el evento blanco se observó un aumento de *Bacilli* y un marcado decremento en la proporción de Erysipelotrichi. En el caso de Atexcac se presentaron todas las clases, pero en proporciones por debajo del 1% encontrando la mayor abundancia de Bacilli y Clostridia durante el período de mezcla (Fig. 7).

Filum Chlorobi

Este Filum solo registró la clase OPB56 con una mayor abundancia en el lago Preciosa durante el período de mezcla, mientras que para Atexcac se observó un ligero aumento en su proporción durante el evento blanco, que no supera el 0.5% (Fig. 7).

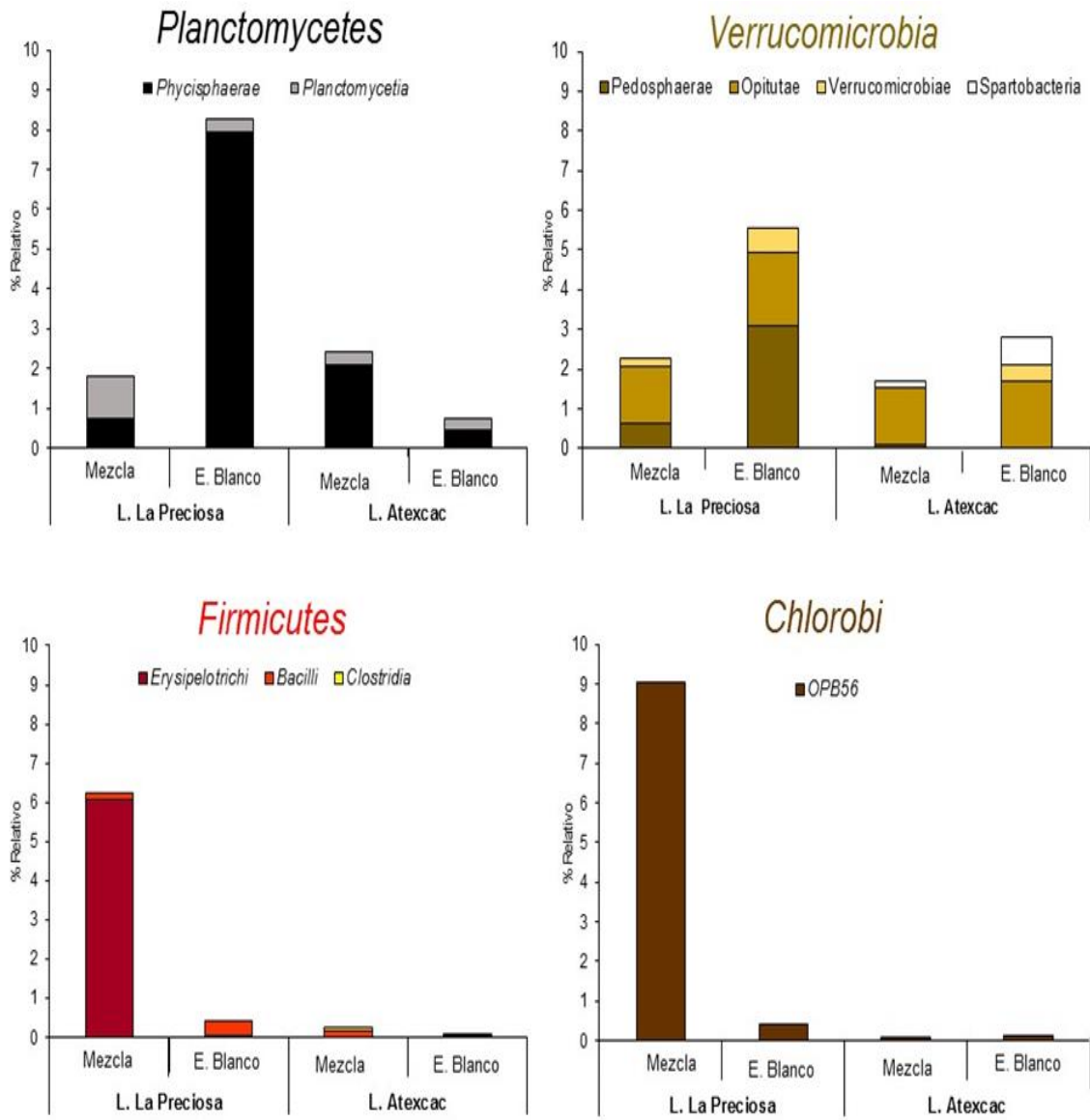


Figura 7. Gráfica de la composición de los Fila menos representativos durante la mezcla y evento blanco en los lagos Preciosa y Atexcac.



Filum Cyanobacteria y productores primarios eucariontes determinados por señal del cloroplasto.

A pesar de no ser uno de los Fila más representativos en los sistemas de estudio El Filum Cyanobacteria estuvo constituido únicamente por la clase Synechococcophycidae (Fig. 8), presentándose tanto en el período de mezcla como en el evento y aumentando su proporción en ambos lagos durante mismo. Con la finalidad de no generar una sobreestimación de este Fila, se separó la señal de cloroplasto de esta misma. Los cloroplastos presentes en este estudio probablemente se relacionen con la presencia de algún florecimiento de algas verdes dentro de los sistemas. En ambos casos, estos productores primarios eucariontes aumentaron su abundancia el evento blanco.

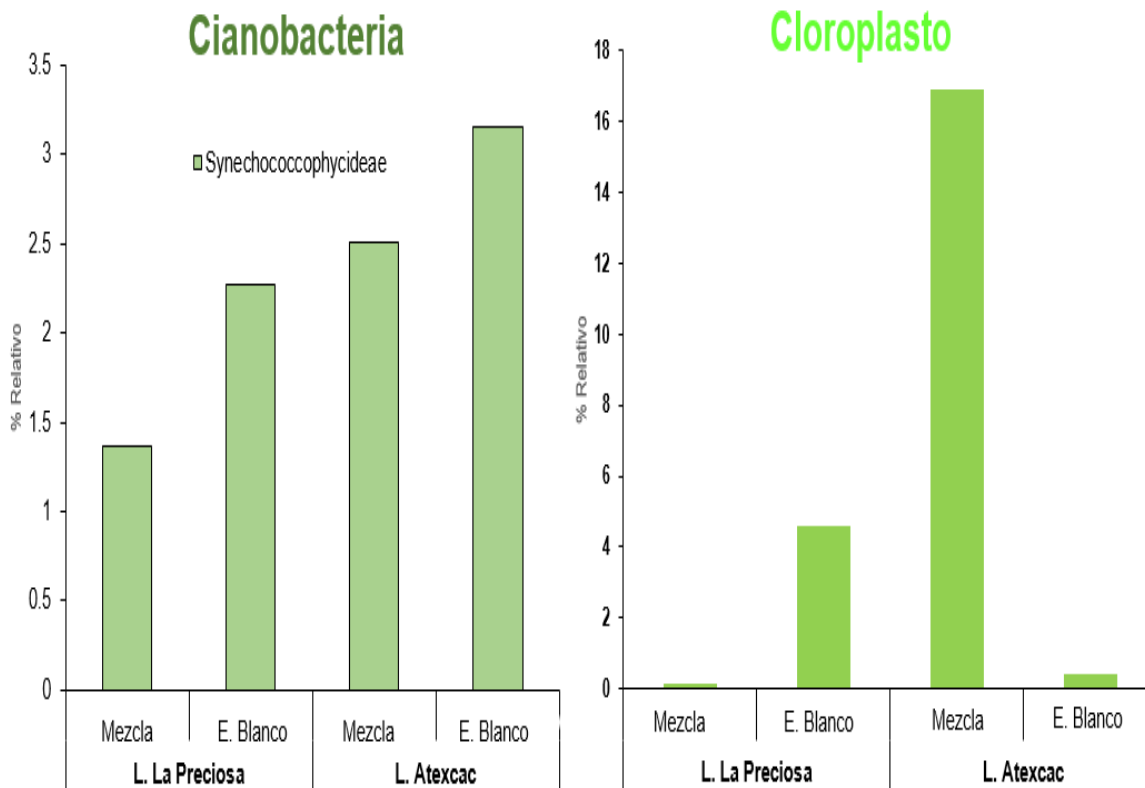


Figura 8. Gráfica de composición relativa de Cyanobacteria y Cloroplasto para el Lago Atexcac y Preciosa durante la mezcla y evento blanco.



Abundancia relativa de los órdenes de Cyanobacteria.

En este estudio relacionado con la diversidad microbiana superficial en los lagos Atexcac y Preciosa tanto antes como durante el evento de emblanquecimiento se identificó la presencia de dos órdenes de Cyanobacterias dentro de la clase Synechococcophycidae los cuales fueron Synechococcales y Pseudanabaenales (Fig. 9). Ambos ordenes presentes en los dos sistemas de estudio mostraron un incremento durante el evento de emblanquecimiento a excepción del orden Pseudanabaenales el cual disminuyo su porcentaje en el lago Atexcac durante el evento. El orden Synechococcales fue el más abundante tanto antes como durante el evento en los dos sistemas de estudio, mientras que el orden Pseudanabaenales a pesar de presentar un incremento durante el evento en el lago Preciosa, disminuye su proporción durante este en Atexcac.

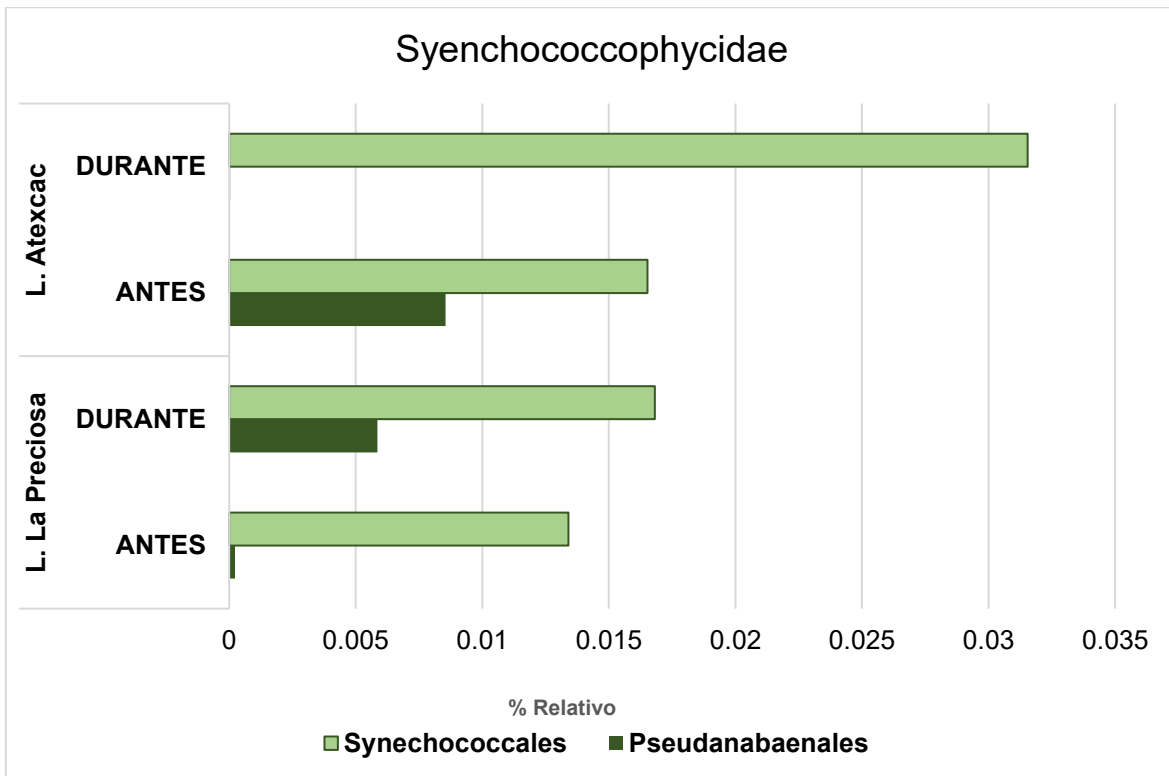


Figura 9. Porcentaje relativo de abundancia de los órdenes de Cyanobacteria



Géneros representativos

Los géneros que presentaron una mayor abundancia durante la mezcla en el lago Atexcac fueron *Acholeplasma*, *KSA1*, *Pseudoalteromonas* y *Alteromonas* mientras que durante el evento blanco la mayoría de los géneros presentes en el sistema aumentaron su proporción, siendo los más dominantes *Synechococcus*, *C. Aquiluna*, *HTCC*, *Opitutus*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas* y *C. Xiphinematobacter*; de todos los géneros en el sistema solo uno se presentó exclusivamente durante el evento blanco y fue *Verrucomicrobium* (Fig. 10).

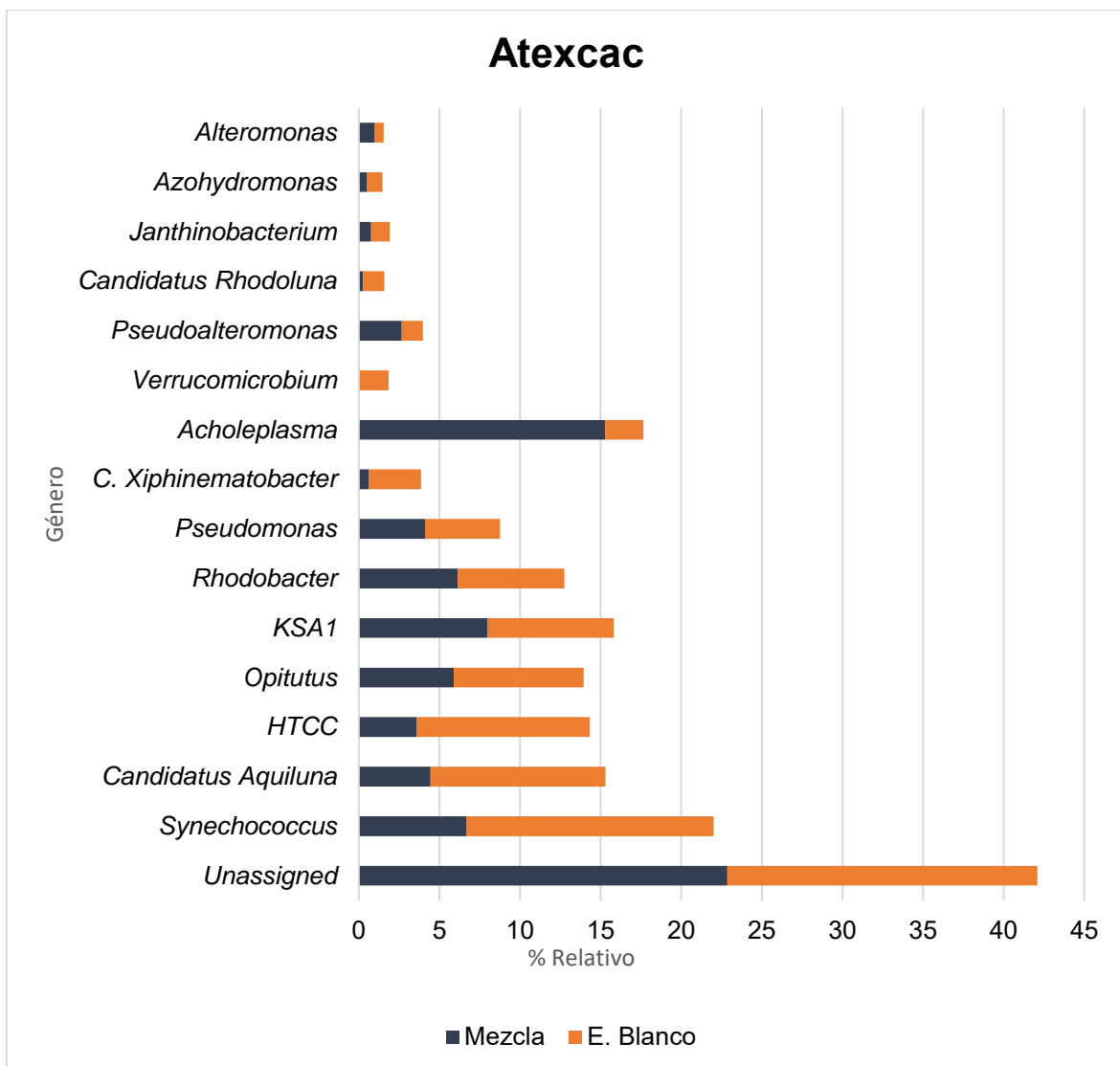


Figura 10. Gráfica de géneros dominantes presentes en la mezcla y durante el evento blanco en el lago Atexcac.



En el caso del lago Preciosa los organismos más abundantes durante mezcla fueron *Pseudomonas*, *Fluviicola*, y *Opitutus* mientras que durante el evento blanco se observa un patrón similar al descrito para Atexcac donde los géneros presentes tienden a aumentar su proporción (a excepción de los antes mencionados que solo son dominantes durante el período de mezcla) y que son: *Rhodobacter*, *Synechococcus*, *HTCC*, *Azohydromonas* y *Pseudoalteromonas*. Cabe mencionar que existen ciertos géneros que solo se presentaron durante el evento blanco para este sistema como *Roseococcus*, *Sphingomonas* y *Prosthecobacter* (Fig. 11), mientras que *Rhodobacter* fue el género con mayor porcentaje durante el evento de emblanquecimiento.

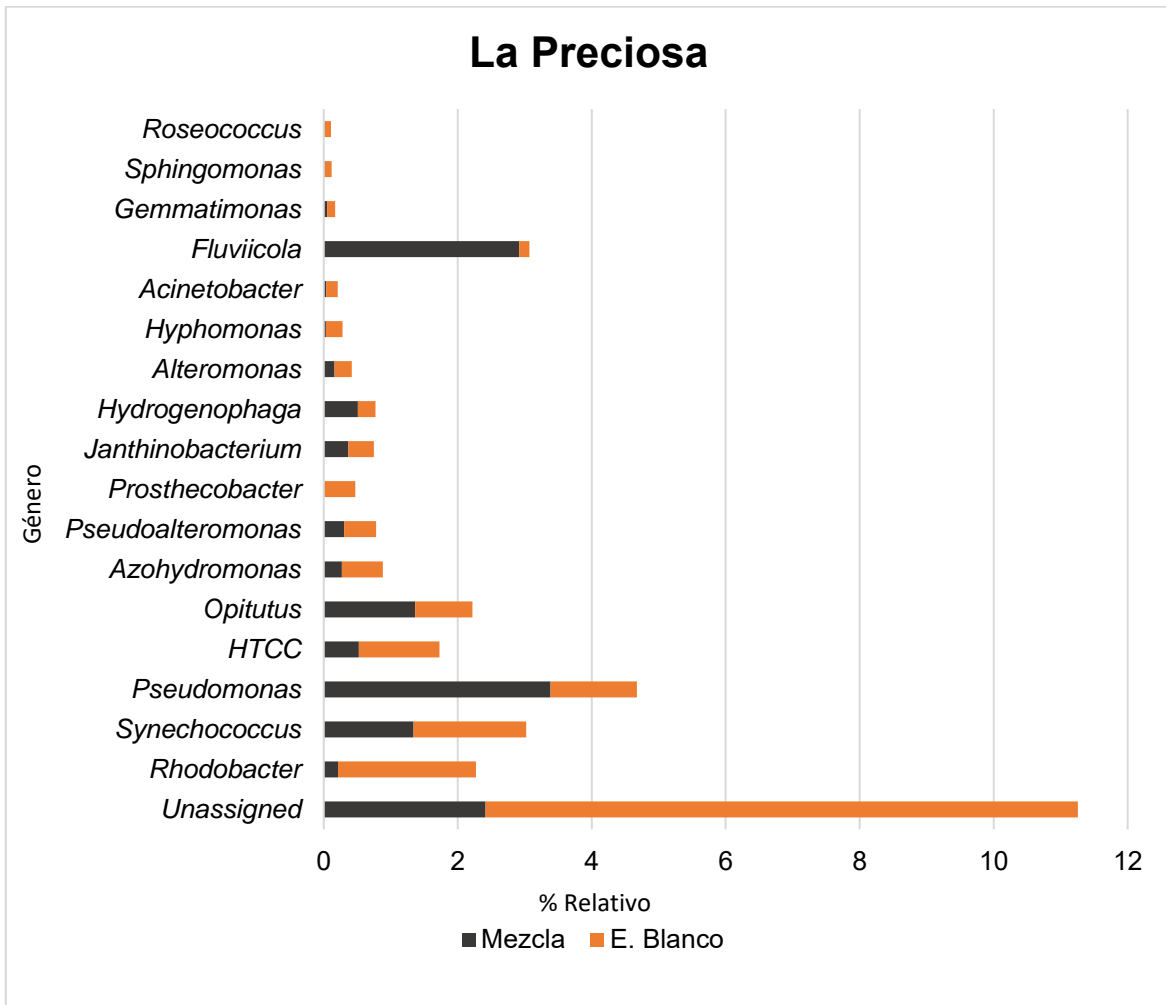


Figura 11. Gráfica de géneros dominantes presentes en la mezcla y durante el evento blanco en el lago Preciosa.



Tanto el período de mezcla como durante el evento de emblanquecimiento se reportó la presencia constante de nueve géneros en ambos sistemas de estudio (Fig. 12 y 13). Durante la mezcla se reportó un total de 14 géneros para ambos lagos, observándose la presencia de géneros cuya presencia fue exclusiva de cada sistema (Fig. 12). En el evento de emblanquecimiento el número de géneros representativos aumento en ambos lagos, en Atexcac se encontró un total de 15 géneros debido a la aparición de *Verrucomicrobium*, mientras que en Preciosa se reportó un total de 17 géneros debido a la aparición de 3 géneros: *Prosthecobacter*, *Sphingomonas* y *Roseococcus* (Fig. 13).

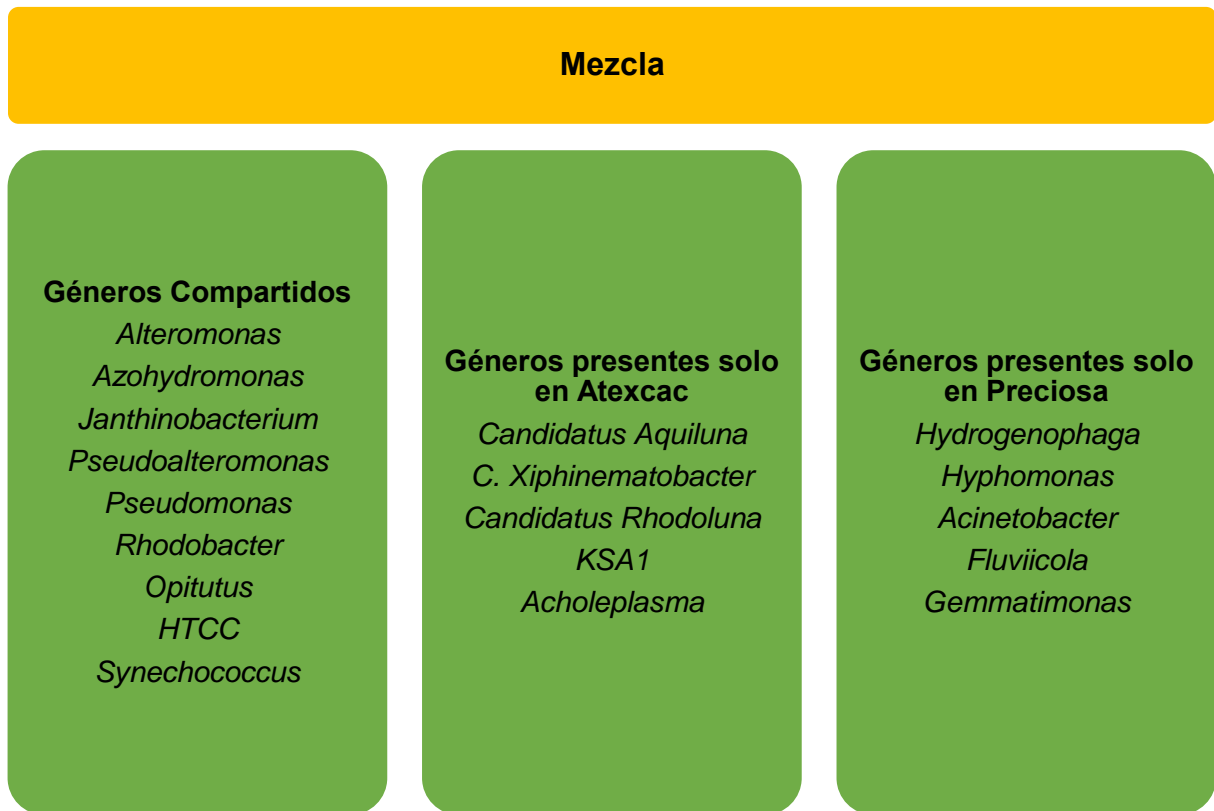


Figura 12. Diagrama de géneros de los lagos Preciosa y Atexcac durante la Mezcla.

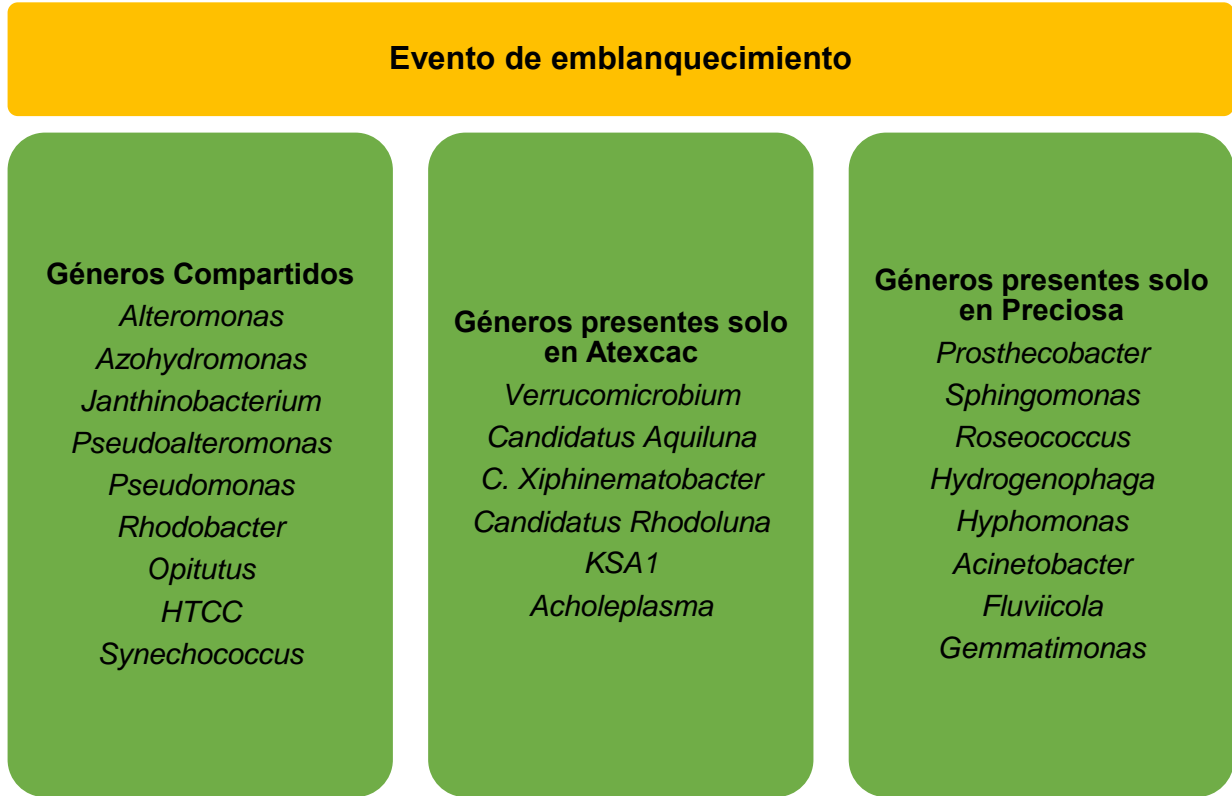


Figura 13. Diagrama de géneros de los lagos Preciosa y Atexcac durante el evento de emblanquecimiento

Discusión

Hidrodinámica y su relación con la composición microbiana

Los sistemas de estudio presentan un régimen de monomixis cálida (Lewis, 1983), caracterizado por un período de mezcla (diciembre-marzo) y uno de estratificación (marzo-noviembre). Este tipo de dinámica es común en lagos tropicales y se caracteriza por no exhibir una disminución de la temperatura por debajo de los 4°C durante el invierno hemisférico (Wetzel, 2001). De acuerdo con estos datos los muestreos de los sitios de estudio (Atexcac y Preciosa) se realizaron durante el período de mezcla y estratificación del año 2014. Cada una de estas etapas hidrodinámicas que constituyen a los sistemas se caracteriza por presentar condiciones físicas (temperatura, movimiento de las masas de agua, luz, precipitación pluvial) y químicas (nutrientes) cuya diferencia determina la



composición, abundancia y sucesión de distintas especies microbianas (Talling y Lemonalle, 1998; Reynolds, 2006); de acuerdo con esta información es muy probable que la variación en cuanto a la abundancia y composición de los distintos Fila reportados en ambos sitios de estudio tenga una relación directa con el comportamiento hidrodinámico como resultado de la variación de nutrientes provocado por la presencia de distintos grupos algales, por lo tanto la composición microbiana depende directamente de la época de muestreo; sin embargo, es importante considerar la naturaleza propia de los organismos: las interacciones bióticas entre estos, la respuesta a fluctuaciones (tolerancia), y los requerimientos fisiológicos (Wetzel, 2001; Wehr y Sheath, 2003).

Como resultado de la variación de los parámetros físicos y químicos a lo largo del año se reportan distintos florecimientos algales (Oliva *et al.*, 2001; Hernández-Morales *et al.*, 2011; Macek *et al.*, 2009). La Preciosa presenta un florecimiento invernal de diatomeas, el cual está influenciado por la disponibilidad de nutrientes durante la circulación. Sin embargo, no exhibe el típico florecimiento primaveral de Cyanobacterias, que se ha observado en otros sistemas al iniciar la estratificación (Oliva *et al.*, 2001; Chale *et al.*, 2004 en Ndebele-Murisa *et al.*, 2010; Hernández-Morales *et al.*, 2011), sino una considerable abundancia de clorofitas; rasgo característico en lagos templados durante esta etapa (Lewis, 1978; Oliver y Ganf, 2000; citados en Vázquez *et al.*, 2005). La dominancia de algas verdes continua durante todo el período de estratificación (aunque en menor abundancia) y no se limita a la temporada de verano, donde su abundancia es común, tanto en lagos templados (Wehr y Sheath, 2003), como en tropicales (Oliva *et al.*, 2001; Hernández-Morales *et al.*, 2011).

En el caso de Atexcac este presentó un comportamiento similar al observado en el lago Alchichica con un florecimiento invernal de diatomeas en invierno seguido de un florecimiento de *Nodularia spumigena* al comienzo de la estratificación (Adame *et al.*, 2008; Alcocer *et al.*, 2014). Con el decaimiento del florecimiento de *Nodularia* la disponibilidad de nutrientes en la superficie del lago es mínima, es



entonces cuando aparece el picoplancton, el cual por su reducido tamaño presenta una mayor proporción superficie-volumen que les permite maximizar la absorción de nutrientes aprovechándolos de manera eficiente (Macek *et al.*,2009).

Se ha demostrado que picos en la concentración de calcita durante eventos de emblanquecimiento en sistemas oligotróficos se pueden explicar a partir de la actividad Cyanobacterias, en específico de ciertos grupos del picoplancton (Thompson *et al.*,1997; Dittrich y Obst, 2004, Dittrich *et al.*,2004), los cuales son un componente ubicuo de los sistemas acuáticos epicontinentales (Dittrich, 2004), sin embargo y con base en los resultados obtenidos podemos observar que el Filum Cyanobacteria es uno de los menos representativos (Fig. 5) con un porcentaje menor del 3,5 % (Fig.8). A pesar de que este Filum fue uno de los que presento una menor proporción, a nivel de género observamos que durante el evento de emblanquecimiento *Synechococcus* mostró una mayor abundancia relativa durante el evento de emblanquecimiento aumentando su proporción casi un 50% en Atexcac en comparación con los otros géneros presentes durante el evento. Reportes previos indican a aparición del evento del emblanquecimiento, justo después del decaimiento del florecimiento de *Nodularia* (Lagunas y Martinez, 2015).

Principales grupos taxonómicos y su relación con la precipitación de carbonatos.

Durante el periodo de estudio la comunidad microbiana de los sistemas de estudio estuvo dominada por el dominio Bacteria, encontrando un total de 9 Fila (incluidos los cloroplastos), siendo los más dominantes los Fila Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria presentando variación en cuanto composición y abundancia entre la mezcla y el evento blanco.

El Filum Proteobacteria es un grupo de bacterias Gram- negativas que se encuentran distribuidas en una amplia gama de hábitats. Este Filum contiene 6 clases; las alfa-, beta-, delta-, gamma-, epsilon- y zetaproteobacteria. De estas clases las más abundantes en sistemas epicontinentales y marinos son: alfa, beta



y gamma. La clase Alfabroteobacteria, de la cual se cree que las mitocondrias se originaron (Andersson et al., 1998), son ecológicamente importantes y son conocidas por la fijación de nitrógeno en asociación con plantas leguminosas (Kersters et al., 2006). Las Alfabroteobacteria son ubicuas de sistemas acuáticos oligotróficos donde su pequeño tamaño junto con su eficiente pero lenta absorción de nutrientes las hace una de las clases con mayor abundancia (Morris et al., 2002; Logares et al., 2009; Salcher et al., 2011). Al igual que las Alfabroteobacteria, las Gammaproteobacterias y Betaproteobacterias son otras de las clases con mayor presencia en sistemas acuáticos (Biers et al., 2009). Estas clases pertenecientes al Filum Proteobacteria parecen tener un estilo de vida oportunista, exhibiendo tasas de crecimiento rápido en respuesta a los pulsos de nutrientes (Šimek et al., 2008), siendo una de las más dominantes en cuerpos de agua, este tipo de comportamiento explicaría por qué la mayor concentración de organismos pertenecientes a este Filum se registraron durante el periodo de mezcla en ambos sistemas, periodo en el que existe una homogenización y remineralización de nutrientes a lo largo de toda la columna de agua, favoreciendo la absorción de nutrientes y el desarrollo de distintos florecimientos microbianos.

De todas las clases de Proteobacteria la que presento una menor proporción fue Deltaproteobacteria coincidiendo con lo reportado por Šimek y colaboradores (2008), a pesar de no ser tan abundantes dentro de sus miembros encontramos a los que se alimentan de bacterias Gram negativas (Bdellivibrionales), así como bacterias anaerobias reductoras de azufre. Entre las distintas clases que conforman Proteobacteria podemos encontrar miembros fototróficos que utilizan proteorodopsinas ya sea en Alfa (*Rhodobacter*), Beta- (*Rhodoferrax*), y Gammaproteobacteria (*Chromatiales*) (Kersters et al., 2006). La proteorodopsina es una proteína fotoactiva que usa una forma determinada de la vitamina A como un cromóforo para la recepción de la luz permitiéndole a la bacteria vivir normalmente junto con partículas orgánicas de las cuales se alimenta, pero una vez acabado el alimento su mecanismo de fotorecepción le ayuda a sobrevivir en ambientes donde existen pocos recursos, como es el caso del lago Preciosa en donde *Rhodobacter*



fue el género más abundante durante el evento de emblanquecimiento, en el que probablemente tenga un papel importante.

El Filum Actinobacteria es uno de los más importantes ya que está presente en una gran variedad de hábitats que van desde suelos hasta ecosistemas marinos y epicontinentales. Anteriormente se pensaba que eran bacterias exclusivas de suelo (Goodfellow y Williams, 1983), pero con el tiempo se descubrió que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, mostrando que las cepas marinas y epicontinentales eran diferentes de las encontradas en suelo (Rappé *et al.*, 1999; Newton *et al.*, 2011). Por otra parte, a menudo son los organismos numéricamente más abundantes en los lagos, llegando a representar hasta el 63% de la biomasa atribuida al bacterioplancton (Glöckner *et al.*, 2000), comportamiento opuesto al presentado en los sistemas de estudio donde la mayor abundancia de este Filum solo se presentó en el periodo de mezcla en el lago Preciosa y durante el evento de emblanquecimiento en Atexcac. Las Actinobacteria de agua dulce se han dividido en nueve linajes que representan 32 tribus (Newton *et al.*, 2011), las cuales cuentan con un gran número de adaptaciones las cuales van desde tener un alto contenido de GC (~51 al 70%) (Ventura *et al.*, 2007), el cual se ha sugerido como un mecanismo de protección contra los rayos UV (Warnecke *et al.*, 2005) permitiéndoles sobrevivir en los primeros 5 m de la columna de agua, siendo así uno de los microorganismos más abundantes en los primeros metros de la columna de agua y que se pudo corroborar en la Fig.5. Sin embargo, un estudio de Ghai *et al.*, (2011), indicó que el clado dominante numéricamente (entre otros linajes), puede tener un contenido de GC tan bajo como 37%. El descubrimiento de que las Actinobacteria poseen proteínas de captura de luz similares a las proteorodopsinas, denominadas actinorodopsinas, sugiere que algunos miembros de Actinobacteria pueden llevar a cabo un estilo de vida fotoheterotrófico en la superficie de los sistemas acuáticos (Sharma *et al.*, 2008) similar a lo que ocurre con algunos miembros de Proteobacteria.



Los Bacteroidetes son un Filo metabólicamente diverso que contiene tanto quimiorganótrofos como fotótrofos (Gómez-Consarnau *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008). Se sabe que los organismos dentro de este grupo son capaces de degradar la materia orgánica disuelta de alto peso molecular, como la quitina y la celulosa, esto es realmente importante debido a que el aprovechamiento de carbono orgánico disuelto es el primer paso en el circuito microbiano para la mineralización de la productividad primaria de los sistemas acuáticos (Schweitzer *et al.*, 2001; Böckelmann *et al.*, 2000). Cabe destacar que la degradación bacteriana de compuestos orgánicos genera CO₂ como producto secundario. El CO₂ en el medio acuoso reacciona con los carbonatos provocando su disociación y de esta reacción se genera un incremento en la alcalinidad y consecuentemente un descenso en el pH.

Se ha reportado que durante los períodos de floración de Cyanobacterias el Filum más abundante son los Bacteroidetes donde representaron casi el 90% de la comunidad heterotrófica (Eiler y Bertilsson, 2004) característica que no se cumple en nuestros sistemas de estudio, sin embargo, la mayor abundancia de este Filum fue durante el evento de emblanquecimiento en Atexcac en donde se ha observado una mayor abundancia de Cyanobacterias del género *Synechococcus* encontrándose una posible relación entre estos dos grupos. Por lo regular miembros del Filum Bacteroidetes se encuentran asociados a partículas, siendo uno de los grupos más numerosos junto con Proteobacteria y Actinobacteria (Nold y Zwart, 1998, Lemarchand *et al.*, 2006) (Fig.5)

La mayoría de las unidades taxonómicas dentro de los nueve Filum reportados no pudieron ser asignados a nivel de género (Fig. 10 y 11), el hecho de que no se lograra una relación a nivel de género es indicativo de la gran diversidad microbiana presente en los sistemas de estudio.



La salinidad como factor determinante de la diversidad.

Ambos sistemas de estudio presentaron diferencias en cuanto a la composición, abundancia y estructura de microorganismos presentes tanto antes como durante el evento blanco, así como entre sistemas teniendo en común que durante el evento blanco la cantidad de organismos no asignados aumentó, estas diferencias pueden estar relacionadas directamente con las características fisicoquímicas de cada sistema (Tabla 5), ya que, a pesar de ser sistemas que presentan un mismo origen presentan diferencias en cuanto a ciertos parámetros, siendo la salinidad uno de los parámetros determinantes en la composición de la comunidad microbiana.

Se ha reportado que con el incremento en salinidad la diversidad metabólica y de especies disminuye drásticamente (Benllock *et al.*, 2012), generando una barrera ambiental para las comunidades microbianas. De la misma forma Lozupone y Knight (2007) estudiaron la diversidad de bacterias en ambientes salinos y no salinos, demostrando que la concentración de sales es el factor que más influye en la composición de la comunidad. Por otra parte, existen diversos trabajos en los que se afirma que distintos grupos microbianos son numéricamente más dominantes en algunos hábitats salinos, siendo los más representativos aquellos pertenecientes a los Fila Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes (Mouné *et al.*, 2003; Dong y *et al.*, 2006; Mesbah *et al.*, 2007; Hollister *et al.*, 2010). En el lago Atexcac podemos apreciar un fenómeno similar donde la mayor proporción de microorganismos se asocia al Filum Proteobacteria y Bacteroidetes durante el periodo de mezcla, además durante este mismo periodo observamos un incremento en el porcentaje relativo del Filum Firmicutes en Preciosa que podría estar directamente relacionado con el periodo de mezcla, debido a que por un periodo de tiempo hay recirculación de nutrientes en la columna de agua lo que favorece el desarrollo de distintos grupos microbianos.



Tabla 5. Características físicas y químicas del lago Atexcac y Preciosa

PARÁMETRO	PRECIOSA	ATEXCAC
Área (Km²)	0.78	0.3
Volumen (m³ x10⁶)	16.2	6.1
Profundidad máxima (m)	45	30
pH	8.6	8.4
Salinidad (g/L)	1-2	6-7
Iones	Bic - Mg	Cl - Na

Un escenario que explicaría el fenómeno de emblanquecimiento en los sitios de estudio como un proceso inorgánico se basa en la fuente de calcio que podría detonar la precipitación. El radio de evaporación-precipitación que domina en la región donde se sitúa los lagos favorece la concentración de sales mientras que la fuente de calcio en estos lagos podría ser principalmente el manto acuífero. El nivel de agua de los lagos de esta región se mantiene principalmente por influjos del manto acuífero (Alcocer et al., 2005), de acuerdo con la sedimentología del lago Atexcac (Carrasco-Núñez et al., 2007), el agua proveniente del manto acuífero podría contener una alta cantidad de calcio. Dado que el fenómeno de emblanquecimiento ocurrió en plena temporada de lluvias, un flujo importante de agua del manto acuífero es muy probable.

Realizar estudios más finos apuntando al metabolismo bacteriano y el análisis de partículas durante el fenómeno de emblanquecimiento podrían revelar nuevas claves para el entendimiento completo de este proceso, entendiendo de una mejor manera las relaciones funcionales entre los distintos grupos microbianos y las variables limnológicas, corroborando la importancia de este tipo de ambientes para el estudio de la comunidad microbiana y su relación con los ciclos biogeoquímicos.



Conclusiones

Durante los meses de muestreo la comunidad microbiana de los sistemas de estudio lago Atexcac y Preciosa, estuvo constituida en mayor proporción por los Fila Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria.

Se presentaron cambios en la composición y abundancia de los distintos Fila presentes entre los sistemas de estudio, así como entre la época en la que se llevó a cabo el muestreo, demostrando que a pesar de ser sistemas que presentan un mismo origen, la composición microbiana específica de cada lago responde directamente a los factores físico- químicos y asociados a los eventos de mezcla y estratificación.

Durante el evento de emblanquecimiento en el lago Atexcac se observó un incremento en la abundancia relativa de organismos pertenecientes al Filum Cyanobacteria en específico del género *Synechococcus* llegando a duplicar su abundancia en más de un 50% en comparación con la mezcla, esto es indicativo de que la parte autotrófica juega un papel importante dentro de la precipitación de carbonatos en Atexcac, sin embargo, en Preciosa a pesar de que se observó un incremento en la proporción de este género durante el evento, la mayor abundancia relativa pertenece a organismos del Filum *Proteobacteria*, lo cual hace pensar que la dinámica por la cual se genera este tipo de eventos tiene una relación directa con la parte heterótrofa de la comunidad microbiana o es el resultado conjunto de la interacción de distintas rutas metabólicas las cuales tienen como punto final la formación de minerales de Carbonato.

Distintas hipótesis se han planteado a lo largo del tiempo con la finalidad de responder como es que se lleva a cabo este tipo de eventos y cuáles son los factores principales que los desencadenan, sin embargo, con los datos presentados durante el desarrollo de este trabajo solo logró comprender un poco de la vasta diversidad de microorganismos presentes en los lagos de estudio, recalcando la importancia de realizar estudios más finos que ayuden a entender los procesos involucrados durante la precipitación de carbonatos, y más importante aún, que permita generar el conocimiento para la protección de estos cuerpos de agua.



Perspectivas

Aunque es evidente que el avance en técnicas moleculares permite obtener una gran cantidad de información sobre las comunidades microbianas de ambientes naturales, considero importante continuar con el desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento y de estrategias de enriquecimiento, que favorezcan la recuperación en cultivo de microorganismos de ambientes naturales para generar más información sobre su fisiología, ecología y evolución.

Estudios futuros, también podrían incluir un estudio metagenómico y la evaluación de la actividad microbiana, para determinar cuál es la función de los microorganismos en su hábitat y cómo sus actividades contribuyen en los ciclos biogeoquímicos.

Por otra parte, se podría continuar con la exploración de los mecanismos bióticos y abióticos que contribuyen con la variación de las comunidades microbianas en estos sistemas, es decir contar con la información y análisis necesarios para poder interpretar de mejor manera si este tipo de eventos (emblanquecimientos) están relacionados de manera directa con alguna variable ambiental, fisicoquímica o biológica.

Resulta fundamental cuantificar los flujos de C en los lagos de estudio a través de distintas mediciones de tasas fotosintéticas, respiratorias y de precipitación de minerales carbonatados al igual que la tasa de exportación de la materia orgánica, con la finalidad de obtener una mejor comprensión del proceso de mineralización dentro de estos sistemas acuáticos. Esto es fundamental para conocer el balance de C de estos lagos.



Bibliografía

- ❖ Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews* 2008; 6, 431-440.
- ❖ Adame M.F., Alcocer J., & Escobar E., 2008. Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology* 53:22-31.
- ❖ Agawin N.S.R., Duarte C.M., Agustí S. 2000. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography* 45: 591-600
- ❖ Alcocer J., Escolero F., & Marín L.E. 2005. Problemática del agua de la Cuenca Oriental, estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala, p. 57-77. En: B. Jiménez, & L.E. Marín (eds.), *El agua en México vista desde la academia*. Academia Mexicana de Ciencias.
- ❖ Alcocer J., Ruiz-Fernández A.C., Escobar E., Pérez-Bernal L.H., Oseguera L.A., & Ardiles-Gloria V., 2014. Deposition, burial and sequestration of carbon in an oligotrophic, tropical lake. *Journal of Limnology* 73(2):223-235.
- ❖ Alcocer, J., A. Lugo, M.R. Sánchez, M. Chávez y E. Escobar. 1997. Threats to the saline lakes of the oriental basin, Mexico, by Human activities. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*. 26:1383-1386.
- ❖ Alcocer, J., E. Escobar y L.A. Oseguera. 2008. Acoplamiento pelágico-bentónico: respuesta de la zona bentónica profunda a la sedimentación del florecimiento invernal de diatomeas en el lago oligotrófico Alchichica, Puebla, México. *Hidrobiológica* 18. 116-122.
- ❖ Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A., and Wright, D. T. (2006). Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of earth history. *Geobiology* 4, 147–166. doi:10.1111/j.1472-4669.2006.00076.x
- ❖ 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.
- ❖ Armienta, M., G. Vilaclara, S. De la Cruz-Reyna, S. Ramos, N. Cenicerros, O. Cruz, A. Aguayo y F. Arcega. 2008. Water chemistry of lakes related to active and inactive mexican Volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 178: 249-258.
 - ❖ Arredondo-Figueroa, J.L., L.E. Borrego-Enríquez, R.M. Castillo-Domínguez y M.A. Valladolid Laredo. 1983. Batimetría y morfometría de los lagos Maars de la Cuenca oriental, Puebla, México. *Biótica* 8: 3-47.
 - ❖ Azam, F., T. Fenchel, J. Field, J. Gray, L. Meyer-Reil y F. Tingstad. 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*. 10:257-263.
 - ❖ Barber R.T. 2007. Picoplankton do some heavy lifting. *Science* 315: 777-778.
 - ❖ Battin T.J., S. Luysaert, L.A. Kaplan, A.K. Aufdenkampe, A. Ritcher y L.J. Tranvik. 2009. The Boundless Carbon Cycle. *Nature Geoscience* 2:598-600.
 - ❖ Bell T., Kalff J. 2001 The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater systems of different trophic status and depth. *Limnology and Oceanography* 46: 1243-1248.
 - ❖ Benlloch S, López-López A, Casamayor E. O, Øvreås L, Goddard V, Daae F.L, Smerdon G, Massana R, Joint I, Thingstad F, Pedrós-Alió C, Rodríguez-Valera F. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environmental Microbiology* 2002; 4:349-360.
 - ❖ Biers E.J., Sun S., & Howard E.C., 2009. Prokaryotic Genomes and Diversity in Surface Ocean Waters: Interrogating the Global Ocean Sampling Metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* 75:2221-2229.
 - ❖ Bundeleva I.A., L.S. Shirokova, P. Bénézeth, O.S. Pokrovsky, E.I. Kompantseva, y S. Balor. 2012. Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemical Geology* 291:116-131.
 - ❖ Burns C.W., Schallenberg M. 1998 Impacts of nutrients and zooplankton on the microbial food web of an ultra-oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research* 20: 1501-1525.



- ❖ Callieri C, & Stockner J.G. 1997. Pico-blues success across freshwater trophic gradient. In Proceedings of the 7th International Conference on Lakes Conservation & Management, International Lake Environmental Committee (ILEC), San Martín delos Andes, Neuquén, Argentina.
- ❖ Callieri C. & Stockner J.G. 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology* 61: 1-14.
- ❖ Callieri C. 2008. Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews* 1: 1-28.
- ❖ Callieri C., B.E. Modenutti, C.P. Queimaliños, R. Bertoni, E.G. Balseiro. 2007. Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology* 41: 511-523.
- ❖ Callieri C., E. Amicucci, R. Bertoni., L. Vörös. 1996. Fluorometric characterization of two picocyanobacteria strains from different underwater light quality. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie* 81: 13-23.
- ❖ Callieri C., Stockner J.G. (2002) Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology* 61: 1-14.
- ❖ Callieri, C y M.L. Pinolini, 1995. Picoplancton in Lake Maggiore, Italy. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. 81:13-23.
- ❖ Callieri, C. 2007. Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews*. 1:1-28.
- ❖ Caron D.A., Pick F.R. Lean D.R.S. (1985) Chroococcoid cyanobacteria in Lake Ontario: seasonal and vertical distribution during 1982. *Journal of Phycology* 21: 171-175.
- ❖ Chisholm S.W., Olson R.J., Zettler E.R., Goericke R., Waterbury J.B., Welschmeyer N.A. (1988) A novel free living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334: 340-343.
- ❖ Chu H., Fierer N., Lauber C.L., Caporaso J.G., Knight R., Grogan P. (2010) Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental Microbiology* 12: 2998-3006.



- ❖ Cole J.J. (1999) Aquatic microbiology for ecosystem scientists: new and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems* 2: 215-225.
- ❖ Cotner, J. and B. Biddanda. 2002. Small players, Large Role: Microbial Influence on Biogeochemical Processes in Pelagic Aquatic Ecosystems. *Ecosystems*. 5:105-121.
- ❖ Couradeau E, K. Benzerara, E. Gérard, D. Moreira, GE Jr Brown, P. Lopez-García, 2012. An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. *Science* 336(6080): 459-62.
- ❖ Daley R.J., Hobbie J.E. (1975) Direct counts of aquatic bacteria by a modified
- ❖ DeLong EF, C.M. Preston, T. Mincer, V. Rich, S.J. Hallam, Frigaard. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior *Science* 2006; 311, 496–503.
- ❖ Dittrich M., & Obst M., 2004. Are picoplankton responsible for calcite precipitation in lakes? *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 33:559-564.
- ❖ Dong H, Zhang G, Jiang H, Yu B, Leah RC, Courtney RL, Fields MW (2006) Microbial diversity in sediment of saline Qinghai Lake, China: linking geochemical controls to microbial ecology. *Microbiol Ecol* 51: 65-82
- ❖ Drakare, S., P. Blomqvist, A.K. Bergström, M. Jansson, 2003. Relationships between picophytoplankton and environmental variables in lakes along a gradient of water colour and nutrient content. *Freshwater Biology* 48:729-740
- ❖ Drew, G.H. 1913. On the precipitation of calcium carbonate in the sea by marine bacteria and on the action of denitrifying bacteria in tropical and temperate seas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 9:479-520.
- ❖ Dussart B.H., 1965. Les différentes catégories de plancton. *Hydrobiologia* 26 72-74.
- ❖ Eiler A., & Bertilsson S., 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology* 6:1228-1243.
- epifluorescence technique. *Limnology and Oceanography* 20: 875-882.



- ❖ Estella C., K. Benzerara, E. Gérard, D. Moreira, S. Bernard, G. Brown Jr and P. López-García. 2012. An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science*. 336:459-462.
- ❖ Gasol J.M., Comerma M., García J.C., Armegol J., Kojecká P., Simek K. (2002) A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnology and Oceanography* 47: 62-77.
- ❖ 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.
- ❖ González J.M, R. Simó, R. Massana, J. Covert, E.O. Casamayor, C. Pedrós-Alió, M.A. Moran. 2000. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate producing North Atlantic algal bloom *Applied and Environmental Microbiology*; 66(10): 4237-4246.
- ❖ Google (2016). Foto de satélite del Lago Atexcac. Consulta: febrero 2016 <http://earth.google.com>.
- ❖ Grashoff K., K. Kremling y M. Ehrhardt. 1983. *Methods of seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim. pp. 634.
- ❖ Greisberger S., Dokullil M.T., Teubner K. (2007) A comparison of phytoplankton sizefractions in Mondsee, an alpine lake in Austria: distribution, pigment composition and primary production rates. *Aquatic Ecology* 42: 379-389.
- ❖ Hammes, F. y W. Verstraete. 2002. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Environmental Science & Bio/Technology*. 1:3-7.
- ❖ Hernández-Avilés, J. S., M. Macek, J. Alcocer, B. López –Trejo y M. Merino-Ibarra. 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.



- ❖ Hollister EB, Amanda SE, Hammett AJM, Provin TL, Wilkinson HH, Gentry TJ (2010) Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *The ISME Journal* 4: 829-838.
- ❖ Hutchinson, G.E. (1967). *A Treatise on Limnology, II. Introduction to Lake Biology and the Limnoplankton*. John Wiley & Sons, NY. 1115 pp.
- ❖ Jemli S, D. Ayadi-Zouari, H.B Hlima, S. Bejar. 2014. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Crit Rev Biotechnol.* 6:1-13
- ❖ Jiménez, J. C., M. Marfil, A. M. Francesch, C. Cuevas, M. Álvarez, F. Albericio. 2007. Productos naturales de origen marino. *Investigación y Ciencia* 365: 75-83.
- ❖ Johnson P.W., Sieburth J.McN. (1982) In-situ morphology and occurrence of eukaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *Journal of Phycology* 18: 318-327.
- ❖ Kirkwood, D.S. 1994. Sanplus segmented flow analyzer and its applications. seawater analysis. Amsterdam. Skalar.
- ❖ Komárková J., 2002. Cyanobacterial picoplankton and its Colonial Formations in two Eutrophic Canyon Reservoirs (Czech Republic). *Archiv für Hydrobiologie.* 154: 605-623.
- ❖ Konopka A. 2009. What is microbial community ecology?. *The ISME Journal*; 3, 1223-1230.
- ❖ Kyrpides NC, P. Hugenholtz, J.A. Eisen, T. Woyke, M. Göker, C.T. Parker, R. Amann, B.J Beck, P.S Chain, J. Chun, R.R Colwell, A. Danchin, P. Dawyndt, T. Dedeurwaerdere, E.F. DeLong, J.C. Detter, P. De Vos, T.J. Donohue, X.Z. Dong, D.S Ehrlich, C. Fraser, R. Gibbs, J. Gilbert, P. Gilna, F.O Glöckner, J.K Jansson, J.D Keasling, R. Knight, D. Labeda, A. Lapidus, J.S. Lee, W.J. Li, V. Markowitz, E.R Moore, M. Morrison, F. Meyer, K.E Nelson, M. Ohkuma, C.A. Ouzounis, N. Pace, J. Parkhill, N. Qin, R. Rossello-Mora, J. Sikorski, D. Smith, M. Sogin, R Stevens, U. Stingl, K. Suzuki, D. Taylor, J.M., B. Tindall, M. Wagner, G. Weinstock, J. Weissenbach, O. White, J. Wang, L. Zhang, Y.G. Zhou, D. Field, W.B Whitman, G.M Garrity, H.P Klenk. 2014. Genomic



- encyclopedia of bacteria and archaea: sequencing a myriad of type strains. PLoS Biol. 12: e1001920.
- ❖ Lagunas M. y J. Martínez. 2015. Estructura de la comunidad del plancton procarionte en el lago volcánico, hiposalino y monomíctico cálido Atexcac, Puebla. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
 - ❖ LEWIS, W.M., FROST, T. and MORRIS, D. 1986. Studies of planktonic bacteria in lake Valencia, Venezuela. Arch. Hydrobio). 106, 289-305.
 - ❖ Lindeman R.L. 1942. The trophic-dynamic aspect of ecology. Ecology 23:399.
 - ❖ Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 2005; 71, 8228–8235.
 - ❖ Macek, M., J. Alcocer, A. Lugo, M.E. Martínez, L. Peralta y G. Vilaclara, 2009. Long term picoplankton Dynamics in a warm- monomictic, tropical high altitude lake. Journal of Limnology. 68(2):1-10
 - ❖ Margalef R., 1955. Los Organismos Indicadores en la Limnología. Biología de las Aguas Continentales. XII. Ministerio de Agricult. Inst. Forest. Invest. Exper., Madrid. 300 pp.
 - ❖ Margalef, M. 1983. Limnología Omega (Ed.), Barcelona, España.
 - ❖ Martin S, M.C. Márquez, C. Sánchez-Porro, E. Mellado, D.R. Arahal, A. Ventosa. 2003. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 53, 1383-1387.
 - ❖ Mayden R.L. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. En: Claridge M.F, Dawah H.A., Wilson M.R. (Eds.). Species: The Units of Biodiversity. Chapman and Hall, London. 1997, pp. 381-24.
 - ❖ Mesbah NM, Abou-El-Ela SH, Wiegel J (2007) Novel and unexpected prokaryotic diversity in water and sediments of the alkaline, hypersaline lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. Microb Ecol 54: 598-617.



- ❖ Mora C, D.P. Tittensor, S. Adl, A.G. Simpson, B. Worm. 2011. How many species are there on Earth and in the ocean? PLoS Biol. 9:e1001127.
- ❖ Mouné S, Caumette P, Matheron R, Willison JC (2003) Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the anoxic sediments underlying cyanobacterial mats of two hypersaline ponds in Mediterranean salterns. FEMS Microbiol Ecol 44: 117-130.
- ❖ O'Sullivan L, Rinna J, Humphreys G, Weightman A, Fry J. Culturable phylogenetic diversity of the phylum „Bacteroidetes“ from river epilithon and coastal water and description of novel members of the family Flavobacteriaceae: Epilithonimonas tenax gen. nov., sp. nov. and Persicivirga xylanidelens gen. nov., sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2006; 56, 169-180.
- ❖ Oliva, M., A. Lugo, J. Alcocer, L. Peralta y L. Oseguera. 2009. Planktonic bloom-forming Nodularia in the saline Lake Alchichica, México. Natural Resources and Environmental Issues. 15: 120-126.
- ❖ Olson R.J., Vaulot D., Chisholm S.W. (1985) Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. Deep Sea Research 32: 1273-1280.
- ❖ Pace N.R. 2009. Mapping the tree of life: progress and prospects. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 73: 565-576.
- ❖ Pace N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane, G.J. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. Advances in Microbial Ecology 9: 1-55. Papke R.T., Ward D.M. (2004) The importance of physical isolation to microbial diversification. FEMS Microbiology Ecology 48: 293-303.
- ❖ Pomeroy L.R. (1974) The ocean's food web, a changing paradigm. BioScience 24:499-504.
- ❖ Prosser J, B. Bohannan, T. Curtis, 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. Nature 5:384-392.
- ❖ Ramírez-García P. y A. Novelo. 1984. La vegetación acuática vascular de seis lagos cráter del estado de Puebla, México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 46:75-88.



- ❖ Richardson T.L., Jackson G.A. (2007) Small phytoplankton and carbon export from the surface ocean. *Science* 315: 838-840.
- ❖ Ridwell A, y Zeebe. 2005. The role of the global carbonate cycle in the regulation and evolution of the earth system. *Earth and Planetary Science letters*. 234:299-315.
- ❖ Sanders R.W., D.A. Caron, U.G. Berninger. 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison. *Marine Ecology Progress Series* 86: 1-14.
- ❖ Serrato, A., A. Cornejo, O. Amilpa. 2013. La biodiversidad y evolución en ambientes acuáticos analizados con herramientas moleculares *Hidrobiologica*. 23 (3): 275-286.
- ❖ Sieburth, J. McN., V. Smetacek y J. Lentz. 1978. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*. 23:1256-1263.
- ❖ Sigeo, D.C. 2005. *Freshwater Microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment*. Primera edición. John Wiley & Sons Ltd, Inglaterra. pp 524.
- ❖ Sigeo, D.C. *Freshwater Microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment*. Primera edición. John Wiley & Sons Ltd, Inglaterra. 2005, 524 p.
- ❖ Šimek K., Hornak K., Jezbera J., Nedoma J., Znachor P., Hejzlar J., & Sed'a J., 2008. Spatio-temporal patterns of bacterioplankton production and community composition related to phytoplankton composition and protistan bacterivory in a dam reservoir. *Aquatic Microbial Ecology* 51:249-262.
- ❖ Staley J.T., A. Konopka. 1985. Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Ecology and Systematics* 39: 321-346
- ❖ Steele, J. H. 1974. *The Estructure of Marine Ecosystems*. Harvard University. Press, Cambridge, Mass. pp 128.



- ❖ Steitz A., Velimirov B. (1999) Contribution of Picocyanobacteria to total primary production and community respiratory losses in a backwater system. *Journal of Plankton Research* 21: 2341-2360.
- ❖ Stockner J.G., K.G. Porter. 1988. Complex interactions in lake communities. In: *Microbial food webs in freshwater planktonic ecosystems*. Carpenter S.R. (ed.). Springer-Verlag, New York, pp. 69-84.
- ❖ Stockner J.G., N.J. Antia. 1986. Algal Picoplankton from Marine and Freshwater Ecosystems: A Multidisciplinary Perspective. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 43: 2472-2503
- ❖ Takahashi M., Hori T. (1984). Abundance of picophytoplankton in the subsurface chlorophyll maximum layer in subtropical and tropical waters. *Marine Biology* 79: 177-186.
- ❖ Thompson, J., S. Schultze, T. Beveridge, y D. Des Maris. 1997. Whiting events: biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnology and Oceanography*. 42(1): 133-141.
- ❖ Timmis K., V de Lorenzo, W. Verstraete, J.L. Garcia, J.L. Ramos, H. Santos, I. Economidis, B. Nogales, J.K. Timmis, C. Fonseca, C. Pruzzo, A. Karagouni, N. Panopoulos, B. Dixon. 2014. Pipelines for New Chemicals: a strategy to create new value chains and stimulate innovation-based economic revival in Southern European countries. *Environ. Microbiol.* 16:9-18.
- ❖ Tranvik L.J., J.A. Downing, J.B. Cotner, S.A. Loiselle, R.G. Striegel, T.J. Ballatore, P. Dillion, K. Finlay, K. Fortino, L.B. Knoll, P.L. Kortelainen, T. Kutser, S. Larsen, I. Laurion, D.M. Leech, S.L. Mccallister, D.M. Mcknight, J.M. Melack, E. Overholt, J.A. Porter, Y. Prairie, W.H. Renwick, F. Roland, B.S. Sherman, D.W. Schindler, S. Sobek, A. Tremblay, M.J. Vanni, A.M. Verschoor, E. Von Wachenfeldt, y G.A. Weyhenmeyer. 2009. Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnology and Oceanography* 54:2298-2314.
- ❖ Velasco-Bucheli R, C. Del Cerro, D. Hormigo, C. Acebal, M. Arroyo, J.L. García, I. de la Mata. 2015. Draft genome sequence of actinoplanes



- utahensis nrrl 12052, a microorganism involved in industrial production of pharmaceutical intermediates. *Genome Announc.* 3, pii: e01411-14.
- ❖ Vilaclara G., M. Chávez, A. Lugo, H. Gonzales y M. Gaytán. 1993. Comparative description of crater lakes basic chemistry in Puebla State, Mexico. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie.* 25:435–440.
 - ❖ Vollenweider, R.A., M. Munavar, P. Stadelmann, 1974. A comparative review of phytoplankton and primary production in the Laurentian Great Lakes. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 31:739-762
 - ❖ Vörös L., C. Callieri, K.V. -Balogh, R. Bertoni. 1998. Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia* 369/370: 117-125
 - ❖ 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. *Advances in Microbial Ecology* 13: 327-370.
 - ❖ Wetzel, G. 2001. *Limnology. Lake and River Ecosystems.* 3ra ed. Elsevier Science. AUS.
 - ❖ Woese C.R., O. Kandler, M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *PNAS* 87: 4576-4579.
 - ❖ Wright D.T., A. Oren. 2005. Non-photosynthetic bacteria and the formation of carbonates and evaporates through the time. *Geomicrobiology Journal.* 22:27-53.
 - ❖ Yarza P, P. Yilmaz, E. Pruesse, F.O. Glöckner, W. Ludwig, K.H. Schleifer, W.B. Whitman, J. Euzéby, R. Amann, R. Rosselló-Móra. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:635-645.