



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología**

**Identificación del papel diferencial de componentes de la comunidad bacteriana en el ciclo del P: microbialitos y bacterioplancton del lago cráter Alchichica como modelo de estudio**

T E S I S

que para optar por el grado de  
Doctora en Ciencias del Mar y Limnología

present a

Patricia Margarita Valdespino Castillo

Tutora principal:

Dra. Luisa I. Falcón Alvarez.  
Insituto de Ecología, UNAM

Miembros del Comité tutor:

Dr. Javier Alcocer Durand	(FES Iztacala, UNAM)
Dr. Antonio Eusebio Lazcano Araujo	(Facultad de Ciencias, UNAM)
Dr. Miroslav Macek	(FES Iztacala, UNAM)
Dra. Rosa Ma. Prol Ledesma	(Instituto de Geofísica, UNAM)

México, D. F., Febrero 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Hoy entiendo que la vida  
y la ciencia  
son juegos que quieres jugar con tus amigos,  
he sido muy afortunada  
y me ha tocado jugar con ustedes.

## Resumen

Los microbios juegan un papel clave en los ciclos biogeoquímicos del planeta ya que la mayor parte de las herramientas metabólicas para transformar los principales elementos de la vida están albergadas en los genomas procariontes. Sin embargo, la identidad de los microorganismos que transforman, por ejemplo, las diferentes formas del fósforo en el ambiente, es muy poco conocida. En este trabajo se utilizan consorcios de gran diversidad estructural y metabólica (microbialitos y bacterioplancton) como modelo de estudio. Se examina en su acervo genético la presencia, diversidad y distribución de distintos genes/enzimas bacterianas cuya función es transformar el fósforo orgánico disuelto (POD) en un sistema acuático con una huella iónica particular, donde la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  es baja y la relación Mg:Ca es alta. Para estudiar su dinámica temporal se comparan la comunidad potencial (portadora de los genes) vs. la comunidad funcional (que expresa esos genes) durante los dos periodos contrastantes del ciclo hidrológico: la circulación invernal y la estratificación del lago Alchichica, Puebla. Los resultados indican un vasto potencial para remineralizar el POD a través de las fosfatasa alcalinas *phoX*, *phoD*; y de la fitasa alcalina *BPP*. Los marcadores estudiados se afiliaron filogenéticamente con enzimas procariontes de grupos bacterianos, principalmente heterótrofos, que son abundantes en la estructura procarionte de los sistemas acuáticos: Proteobacteria (Alfa, Beta y Gamma), además de Bacteoidetes. Los marcadores estudiados mostraron una dinámica rápida, y diferencial, en el tiempo. Se observó por tanto un recambio de los filotipos de *phoX*, *phoD* y *BPP* en un tiempo tan corto como el ciclo intra-anual. El estudio de las metalofosfatasa bacterianas representa una puerta de entrada a la comprensión del ciclaje del fósforo en su interacción con la disponibilidad de otros metales (cofactores de este tipo de enzimas).

Cita. Valdespino, P.M. 2015. **Identificación del papel diferencial de componentes de la comunidad bacteriana en el ciclo del P: microbialitos y bacterioplancton del lago cráter Alchichica como modelo de estudio.** Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

## Contenido

<b>Introducción</b>	6
<i>El ciclo del fósforo</i>	6
<i>Formas del P y sus transformaciones en la columna de agua</i>	8
<i>Conocimiento del papel de los microorganismos en las transformaciones del ciclo biogeoquímico del P</i>	10
<b>Modelos de estudio</b>	13
Microbialitos	13
Bacterioplancton	13
<b>Antecedentes</b>	16
<b>Planteamiento del trabajo</b>	18
<b>Objetivos</b>	18
Generales	18
Particulares	18
<b>Área de estudio</b>	19
<b>Métodos</b>	20
<i>Esquema general de muestreo</i>	20
<i>Colecta de microbialitos y bacterioplancton</i>	21
<i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	21
<i>Selección de marcadores genéticos</i>	23
<i>Amplificación por PCR de genes funcionales en ADN total</i>	24
<i>Determinación de la expresión génica</i>	26
<i>Análisis de secuencias</i>	26
<i>Caracterización ambiental (parámetros fisicoquímicos y biogeoquímicos)</i>	26
<i>Análisis elemental (C, N y P) de los microbialitos</i>	26
<b>Resultados</b>	27
<b>1. Trabajo de revisión</b>	27
<i>Transformación del fósforo por procariontes en los sistemas acuáticos</i>	27
<i>Estrategias de los procariontes para transformar el fósforo. Aproximación en diferentes escalas espaciales</i>	31
<i>Las enzimas del ambiente</i>	35
<i>Enzimas extracelulares para la remineralización del fósforo orgánico disuelto</i>	36
<b>2. Caracterización del ambiente</b>	40
<i>Caracterización ambiental y condición del fósforo en el lago Alchichica</i>	40
<i>Composición elemental de los microbialitos (C:N:P)</i>	42

<i>Balace de fósforo en el sistema Alchichica</i>	43
<b>3. Marcadores genéticos</b>	<b>46</b>
<i>Genes y proteínas asociadas a las transformaciones de POD en ensamblajes microbianos complejos: microbialitos y bacterioplancton del lago Alchichica como modelo de estudio</i>	46
<i>Afiliación filogenética de las secuencias <i>phoX</i></i>	50
<i>Afiliación filogenética de las secuencias <i>phoD</i></i>	51
<i>Afiliación filogenética de las secuencias BPP</i>	54
<i>Unidades taxonómica operacionales (OTUs)</i>	54
<i>Diversidad y dinámica intra-sistema de <i>phoX</i>, <i>phoD</i> y BPP</i>	55
<i>Diversidad y dinámica inter-sistemas de <i>phoX</i> y BPP</i>	59
<i>Transcriptómica dirigida. Patrones de expresión de <i>phoX</i>, <i>phoD</i> y BPP en el ciclo diurno</i>	63
<b>Discusión</b>	<b>67</b>
<i>Hidrodinámica del sistema y estado trófico (zona litoral vs. columna de agua)</i>	67
<i>Condición del fósforo en el sistema</i>	69
<i>Potencial para remineralizar el POD a través de fosfatasas y fitasas alcalinas. Dinámica intra-sistema</i>	70
<i>Distribución y diversidad de fosfatasas alcalinas <i>phoX</i> en aguas naturales</i>	73
<i>Distribución y diversidad de BPP fitasas en la naturaleza</i>	73
<i>Expresión de <i>phoX</i>, <i>phoD</i> y BPP. Comunidad potencial vs. comunidad funcional</i>	74
<i>Contribución del presente estudio a las bases de datos generales</i>	78
<b>Conclusiones</b>	<b>80</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>83</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>84</b>
<b>Anexos</b>	<b>94</b>
Anexo 0. Índice de Figuras y Tablas	94
Anexo 1. Manuscrito de revisión, en preparación	98
Anexo 2. Manuscrito publicado, Valdespino-Castillo et al. 2014	

## Introducción

Las actividades antropogénicas han afectado sustancialmente los ciclos biogeoquímicos del planeta durante los últimos 200 años. El aumento de la concentración de gases con efecto invernadero, como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) en la atmósfera se ha relacionado directamente con el aumento en la temperatura global, el cual es uno de los factores que son consecuencia y a la vez impulsan el cambio ambiental que se vislumbra (o Cambio Global). Comprender las posibles consecuencias de estos fenómenos en las décadas por venir es crítico para formular las estrategias energéticas, tecnológicas, ecológicas, sociales y de seguridad que afectarán a las generaciones futuras (IPCC 2007).

Los microorganismos son los principales entes activos que participan en las diferentes transformaciones biológicas dentro de los ciclos biogeoquímicos debido a su extraordinaria flexibilidad metabólica. Dentro de los ciclos biogeoquímicos, el del nitrógeno (N) y el del fósforo (P) son de gran interés, ya que estos elementos limitan con frecuencia la producción primaria y la actividad microbiana en los ecosistemas (Stotzky y Norman 1961), afectando por tanto, en escalas geológicas, al ciclo del carbono (C), y consecuentemente, a la química de la atmósfera.

Muchas de las grandes transformaciones biogeoquímicas tuvieron origen en ambientes acuáticos durante la primera mitad de la historia evolutiva del planeta (~4, 200 - 2, 500 Ma) de tal forma que las rutas metabólicas responsables del ciclaje de los elementos se encuentran principalmente en los genomas procariontes (Falkowski *et al.* 2008). El estudio del ambiente acuático y de sus habitantes ha sido muy útil para entender las transformaciones de los elementos principales para la vida así como las interacciones entre sus ciclos biogeoquímicos (Paytan y McLaughlin 2007). Y aunque en las últimas décadas ha existido un gran avance en la caracterización de los componentes biológicos asociados tanto al ciclo del N como del C, apenas comenzamos a entender la mediación biológica en el ciclo del P (ver Chróst 1990, Dyhrman *et al.* 2007, White y Dyhrman 2013).

### ***El ciclo del fósforo***

El fósforo (P) es un elemento esencial para la vida siendo un componente estructural y funcional en todos los organismos. Forma parte de la estructura de los ácidos nucleicos y es crucial en la transmisión de energía química mediante la óxido-reducción del ATP (adenosin trifosfato). El P es

también un constituyente estructural en muchos componentes celulares como las fosfoproteínas y los fosfolípidos en las membranas celulares, también en estructuras como dientes, huesos, etc. (Karl 2000); en algunos organismos puede también estar presente como gránulos de almacenaje de polifosfato intracelular (Körnberg 1999). El fósforo juega un papel relevante y diverso en el señalamiento celular, por ejemplo, las señales fosforilación/desfosforilación constituyen un mecanismo ampliamente difundido en la transducción (Somlyo y Somlyo 2000).

A pesar de su relevancia para los sistemas vivos, la disponibilidad de P es escasa en muchos compartimientos de la biosfera y puede condicionar las tasas de producción primaria, la distribución de las especies y la estructura del ecosistema (Smith 1984).

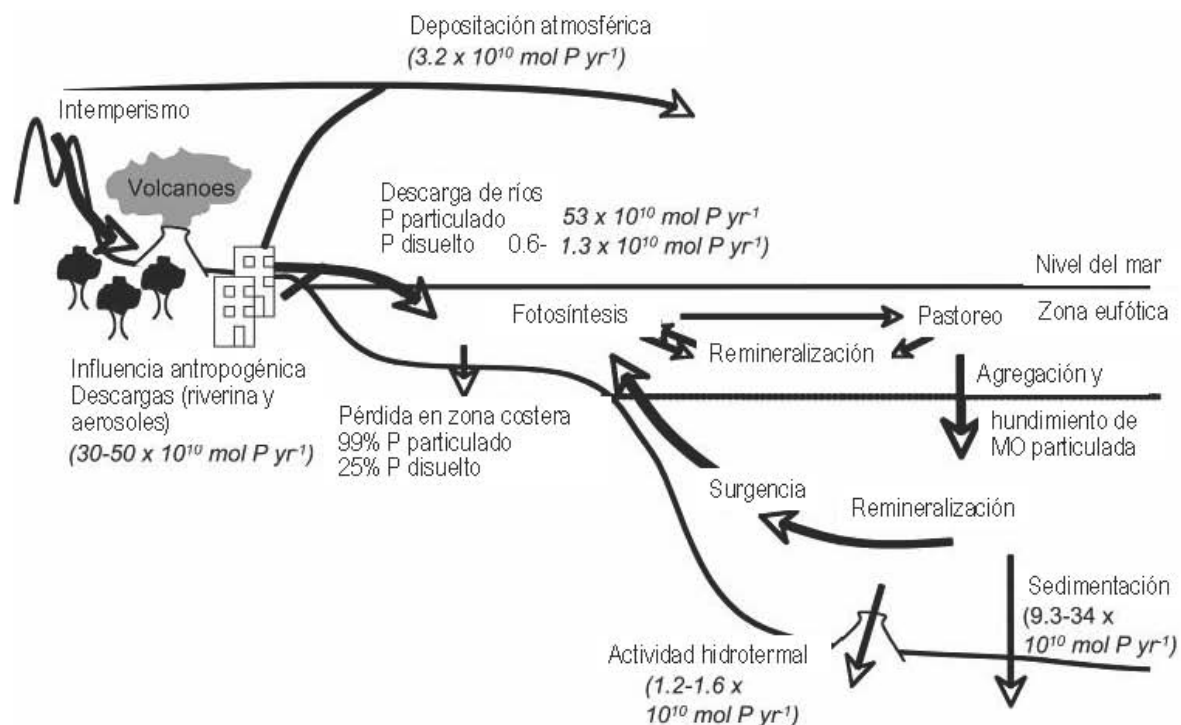


Fig. 1 Ciclo global del fósforo. Están señalados los reservorios y flujos principales tomando como modelo un sistema acuático. Fuente: Paytan y McLaughlin 2007.

El ciclo del fósforo en el planeta tiene un componente físico y geoquímico primordial; el intemperismo continental representa la fuente más significativa de P hacia los sistemas, siendo el medio acuático un vehículo muy eficaz, sin embargo la deposición atmosférica por aerosoles, cenizas volcánicas y polvo mineral son importantes también (Paytan y McLaughlin 2007) (Fig. Intro 1). Las formas en las que se encuentra al fósforo en la naturaleza son muy diversas. El P particulado que viaja por los ríos comprende formas tanto inorgánicas (PIP) como orgánicas (POP). Mucho del P



en los ríos está asociado con materia inorgánica particulada, especialmente en granos de apatita u otros minerales y adsorbido en óxidos u oxihidróxidos de hierro y manganeso; esta carga particulada se deposita rápidamente y no contribuye directamente al reservorio de P disponible para la vida acuática (Wollast 1983). Las partículas de arcilla con oxihidróxidos de hierro y aluminio tienen en su superficie una gran capacidad de adsorber fosfato a partir de soluciones de agua dulce. Por lo anterior se estima que solo entre el 10 – 30% del flujo total de P riverino es potencialmente “reactivo” o bien, disponible para su utilización por los organismos (Paytan y McLaughlin 2007).

Existe también un aporte cuantioso de P hacia los ecosistemas proveniente de la actividad humana, principalmente por la fertilización de los campos agrícolas, a través de los drenajes y de la erosión causada por los cambios en el uso de la tierra o de la industria (la industria del papel por ejemplo) (Fig. 1) . Este P es lavado hacia ríos, estuarios o hacia el agua subterránea, y causa enriquecimientos de nutrientes en los sistemas acuáticos. Muchos de estos conllevan efectos indeseables para los sistemas y sus habitantes (eutrofización) como florecimientos de algas tóxicas, hipoxia o anoxia, mortalidad de peces, pérdida de la biodiversidad, desequilibrios en las interacciones entre especies y en las redes tróficas, entre otros problemas (Filippelli 2008).

### ***Formas del P y sus transformaciones en la columna de agua***

Las formas orgánicas e inorgánicas, disueltas y particuladas del P tienen transformaciones continuas en la columna de agua (Figura 2). El P inorgánico disuelto (PID, comúnmente ortofosfato) es asimilado por el plancton e incorporado en biomasa. El plancton puede ser posteriormente ingerido por zooplancton o por organismos detritívoros. Una amplia fracción del P orgánico es excretado como P inorgánico y orgánico disueltos (Cotner y Biddanda 2002), lo mismo que a través de la lisis de las células del fitoplancton. Continuando con el ciclo, el P inorgánico es rápidamente asimilado por el plancton mientras algunos de los compuestos orgánicos pueden ser hidrolizados por enzimas sintetizadas por bacterias y fitoplancton, y subsecuentemente asimilados. En ambientes marinos se ha visto que el fitoplancton y las bacterias autotróficas incorporan el P principalmente como ortofosfato principalmente ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) para satisfacer sus necesidades metabólicas. Las bacterias heterotróficas son responsables de gran parte de la hidrólisis de P orgánico disuelto (POD) y su conversión a PID; sin embargo, el fitoplancton y las bacterias autotróficas pueden también hidrolizar compuestos orgánicos cuando la demanda por este elemento no está satisfecha por ortofosfato inorgánico (Cotner y Biddanda 2002).

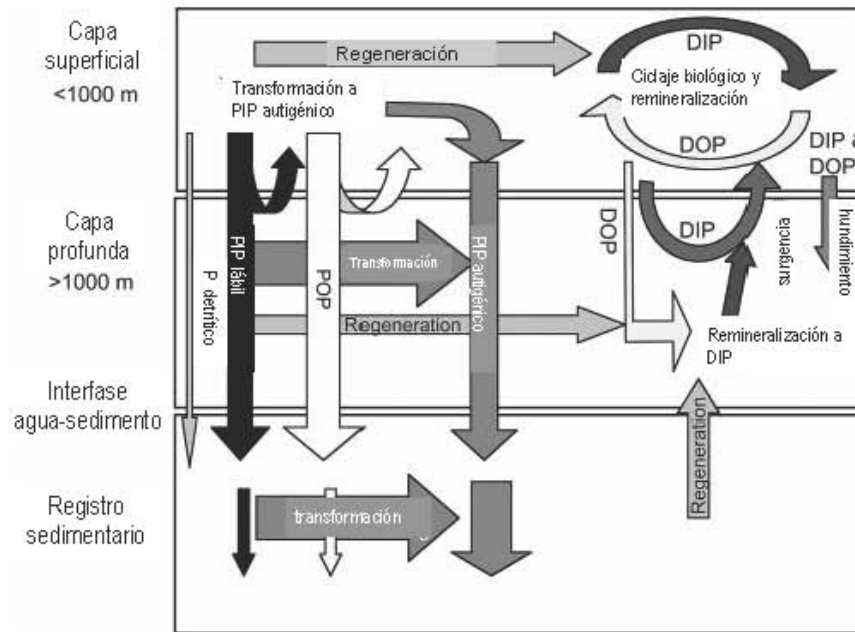


Fig. 2 Formas del fósforo en los ambientes acuáticos. Se muestran los flujos generales de las formas disueltas (orgánicas, DOP e inorgánicas, DIP) y particuladas (POP y PIP) usando como modelo un sistema acuático (columna de agua y sedimentos). Fuente: Paytan y McLaughlin 2007.

Diferentes estudios revelan una alta variabilidad espacial y temporal en las concentraciones de PID y POD en los cuerpos de agua. Estas fluctuaciones en la superficie están controladas por el efecto de factores físicos (e.g. estratificación, surgencias) y biológicos (asimilación de PID, producción de POD, recambio o regeneración) (Ruttenberg y Dyhrman 2005). El fósforo inorgánico disuelto (Pi, fosfato) es, en general, muy escaso en la capa superficial del océano donde tiene tiempos de residencia muy cortos, en la escala de horas a minutos (Benítez-Nelson 2000). La fracción orgánica disuelta de P (POD) es la fracción más abundante en la capa de mezcla de los océanos (~ los primeros 150 m) (Kolowith et al. 2001).

La caracterización molecular de las formas de POD (y en general de las fracciones de P en el ambiente acuático) han sido un factor que ha limitado la comprensión del ciclo del P por décadas (Kolowith et al. 2001). El desarrollo de técnicas de espectroscopía como  $^{31}\text{P}$ -NMR (de *Nuclear Magnetic Resonance*) ha sido muy útil para entender la composición de POD (Young e Ingall 2010). A través de estos avances conocemos e.g. que los compuestos de POD de alto peso molecular (HMW) comprenden aproximadamente una cuarta parte del POD (principalmente se trata de fosfoésteres; enlaces C-O-P) y que otra cuarta parte aproximadamente está contenida en compuestos con enlaces fosfonato (C-P). Los compuestos de bajo peso molecular (LMW) no son sujetos de este tipo de

análisis y por lo tanto sabemos poco de la fracción más extensa de POD (Dyhrman *et al.* 2007). Si bien, se han publicado una gran cantidad de trabajos tratando de establecer si es el N o el P quien limita la producción de los sistemas, por ejemplo, se ha señalado que la disponibilidad de P es un factor crucial en el control de la fijación de nitrógeno en el océano (Moutin *et al.* 2007; Paytan y McLaughlin 2007), la tendencia actual se aproxima a modelos de co-limitación dinámica tanto de formas disponibles de N como de P que limitan alternativamente la producción primaria acuática (e.g. Tyrell 1999).

### ***Conocimiento del papel de los microorganismos en las transformaciones del ciclo biogeoquímico del P***

Aún no se conoce con claridad el papel de las comunidades microbianas en el ciclaje de las diferentes formas del P y en la regulación de la producción primaria a través de la relación estequiométrica C:N:P. En la actualidad, con la explosión del conocimiento derivado de las "ómicas", o bien, de las técnicas "independientes de cultivo" utilizadas en el estudio de los microorganismos, estamos comenzando a entender quiénes son los portadores de las capacidades para transformar esta gran heterogeneidad de formas del fósforo de las que hemos hablado, así como el papel que juegan estos organismos en los sistemas biológicos, que parece ser muy relevante (ver Dyhrman *et al.* 2007).

Las moléculas de la vida están construídas principalmente por seis elementos: H, C, N, O, S y P. Los ciclos a través el compartimiento biológico de los primeros 5 elementos están conducidos por reacciones redox mediadas por microbios mientras que el del fósforo está vinculado mayormente con la química ácido-base (Falkowski *et al.* 2008). Si bien, el ciclo del P tiene un amplio componente geoquímico, su paso por los sistemas vivos tiene una dinámica muy intensa debido a que en general sus fuentes y su disponibilidad son escasas. Dyhrman y col. (2007) han propuesto un modelo general sobre las estrategias de los microorganismos para lidiar con las diferentes formas de fósforo en los ambientes acuáticos (Fig. 3).

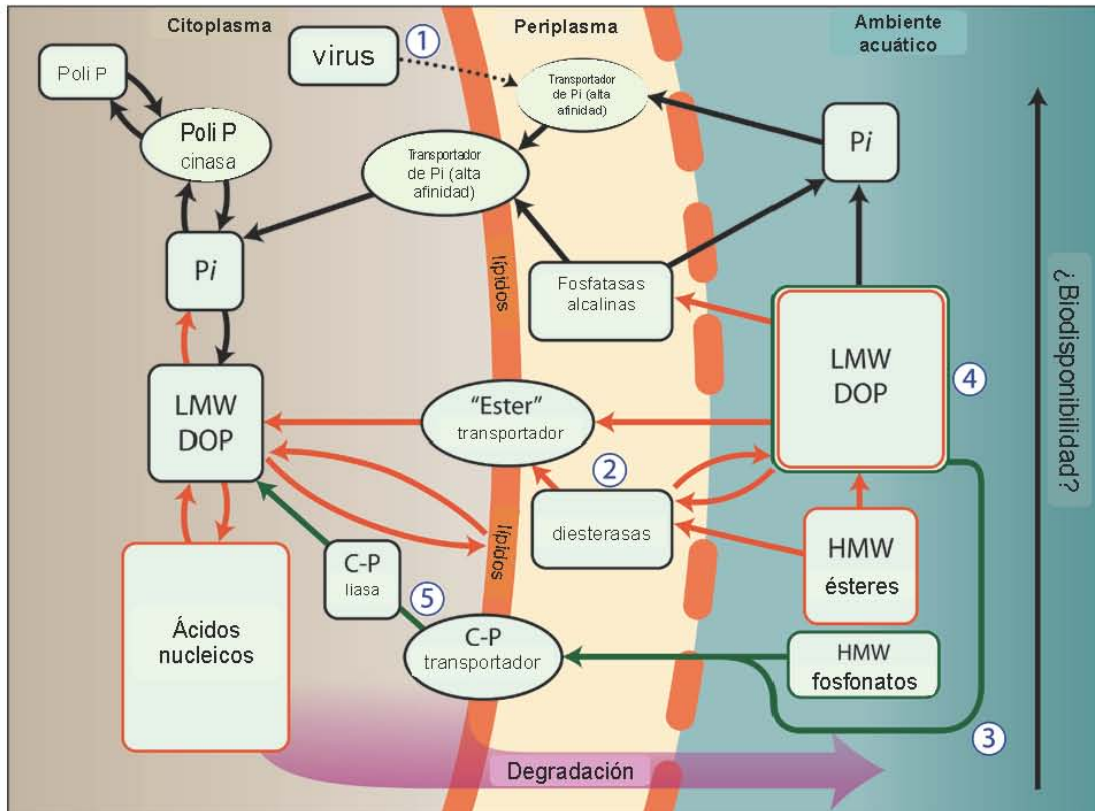


Fig. 3 Transformaciones del fósforo por los microorganismos de sistemas acuáticos. El tamaño relativo de los reservorios de P en aguas oceánicas está señalado en la parte derecha de la figura, a la izquierda se observa el interior celular de un microorganismo acuático, así como las estrategias moleculares de los microorganismos para la remineralización, adquisición y metabolismo del fósforo. Fuente: Dyhrman *et al.* 2007.

Los microorganismos se valen de estrategias constitutivas y de respuesta al estrés ambiental para lidiar con la disponibilidad variable de P, como es el caso de los transportadores de baja y alta afinidad al fosfato, cuya expresión es constitutiva para los primeros y se activa en caso de estrés por fosfato, en el caso de los segundos (Dyhrman *et al.* 2007). Por otro lado, enzimas hidrolasas extracelulares y periplásmicas interactúan con formas del POD para regenerar el fosfato, cuya expresión parece estar estrechamente relacionada con el estrés por P; algunas de estas enzimas son pH dependientes (fosfatasa ácida y alcalina) y como veremos más adelante, se trata en general de metalofosfatasa distribuidas en el plancton procarionte y eucarionte, además de en algunos organismos del zooplancton como los cladóceros (Strojsova *et al.* 2003). Si bien, se conocen con más amplitud las enzimas para utilizar los compuestos LMW del POD, se conoce muy poco sobre aquellas que se utilizan para aprovechar los compuestos HMW del POD y compuestos considerados recalcitrantes como los fosfonatos. Las bacterias poseen una amplia colección de mecanismos para

enfrentar la limitación por P que incluyen aumentar el ingreso de compuestos que contengan fósforo (a través de transportadores de alta y baja afinidad a fosfato: genes *pst* y *pit*, respectivamente) o el uso de enzimas que actúan sobre compuestos orgánicos, principalmente ésteres de P para regenerar el PID o bien herramientas para economizar el uso del P, como la sustitución de fosfolípidos por sulfolípidos (Wanner, 1993, Benning *et al.* 1995, Giovannoni *et al.* 2005). Un modelo ampliamente estudiado para entender las respuestas bacterianas ante la limitación por P ha sido *E. coli*, donde un conjunto de genes, denominado el regulón *pho* es controlado en respuesta a la limitación por P por un sistema coordinado de dos componentes PhoR-PhoB (Hsieh y Wanner, 2010; Van Bogelen *et al.* 1996). PhoR está inactivo en condiciones de disponibilidad de P, mientras que, si las condiciones de P disminuyen, PhoR percibe este cambio (directa o indirectamente a través de la interacción con los transportadores de fosfato PstSCAB a través del acoplamiento de la proteína PhoU) y se activa su actividad de histidina cinasa.

Desde hace décadas se han estudiado la actividad de enzimas para utilizar el fósforo, como las fosfatasas alcalinas (APs), para aproximarse al estatus nutricional de las comunidades acuáticas. Su actividad sugiere la hidrólisis enzimática de POD y la producción de PID a partir de un sustrato inicial no disponible (Ruttenberg y Dyhrman 2005). Los resultados de la detección de actividad de fosfatasas no habían podido ser relacionados con procariontes específicos hasta hace poco; apenas ahora empezamos a aproximarnos hacia quiénes son los miembros de la comunidad con esta capacidad (Martiny *et al.* 2006). El trabajo con microfotografías de Strojsova *et al.* (2003) además de evidenciar lo anterior, nos permiten reflexionar sobre el problema de la heterogeneidad microespacial y sobre los procesos a escala de la capa límite (Fig. 4). La identidad de los microorganismos que llevan a cabo las principales transformaciones de fósforo ha sido desconocida por largo tiempo, de igual forma, los mecanismos que modulan las respuestas de los microorganismos al cambio ambiental. Por ende, no es claro si hay organismos clave en las transformaciones del fósforo o en las interacciones entre microorganismos en la utilización del P o si la transferencia horizontal está ligada a alguno de los mecanismos de utilización del fósforo. A lo largo de este documento exploraremos estas interrogantes nuevamente.

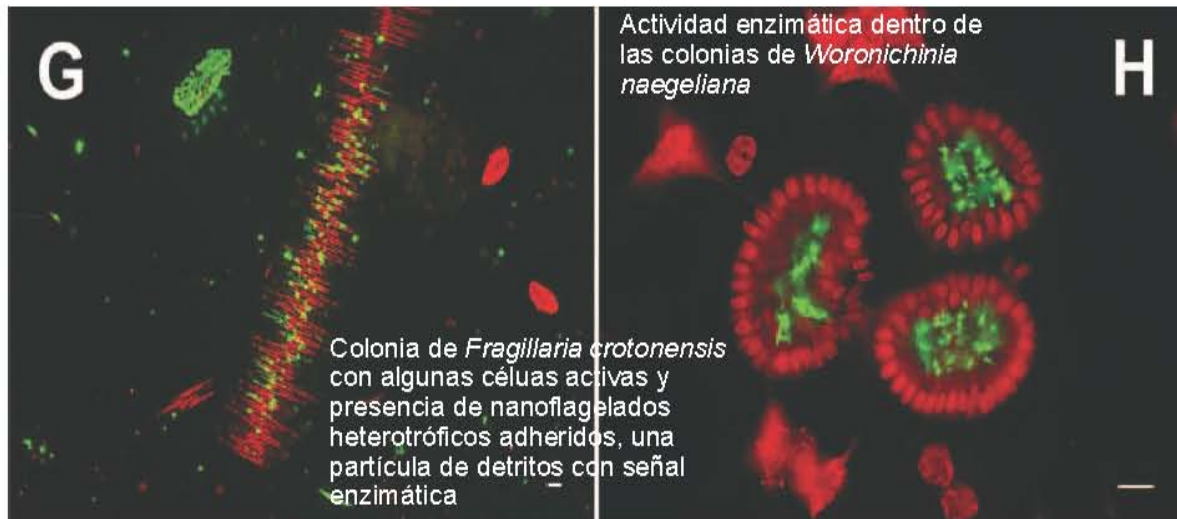


Fig. 4 Micrografías de plancton marcado a partir de ensayos enzimáticos con marcadores fluorescentes (ELF, *enzyme labelled fluorescence*) y autofluorescencia. El color verde corresponde a precipitados fluorescentes de ELFA y el rojo corresponde a autofluorescencia (clorofila a) de células del fitoplancton. G) Una colonia de *Fragillaria crotonensis* con algunas células activas (estructuras lineales) con nanoflagelados heterotróficos adheridos (los puntos verdes) y arriba a la derecha una partícula de detrito marcada con ELFA; H) precipitados de ELFA dentro de colonia de *Woronichinia naegeliana*. Fuente: Strojsova et al. 2003.

## Modelos de estudio

### *Microbialitos*

Un excelente modelo de estudio en ecología bacteriana son los microbialitos: depósitos organosedimentarios formados por las actividades metabólicas de comunidades (mayormente procariontes) del bentos. Las comunidades que forman estas estructuras se arreglan de manera vertical en capas estratificadas "visibles", en donde hay una gran diversidad filogenética y metabólica. Se ha estimado que estas comunidades se encuentran entre las más productivas del planeta (Des Marais 1997), y también entre las más diversas (ver Centeno et al. 2012). En la actualidad hay ejemplos de microbialitos en sistemas marinos y dulce-acuícolas, manteniendo similitud estructural con los registros fósiles más antiguos, los estromatolitos del periodo Archeano datados en ~3,500 millones de años (Schopf 2007).

En el presente, la presencia de microbialitos está limitada a pocos sitios tropicales marinos y quasi-marinos (Kempe y Kazmierczak 1993, Reid et al. 2000) y a ambientes extremos como lagos alcalinos, hipersalinos o manantiales termales (Paerl et al. 2001) donde se facilita la mineralización *in situ* (Kempe y Kazmierczak 1990). A pesar de que se han hecho algunos estudios sobre la diversidad de

estos consorcios microbianos aplicando técnicas moleculares, hay poca información que describa en detalle su potencial metabólico (en la transformación de elementos clave para los ecosistemas) y sobre las variables abióticas relacionadas con su distribución (ver Centeno *et al.* 2012). Y si bien, hay relativamente pocos lugares en el mundo donde se conocen microbialitos vivos, están presentes en el territorio mexicano (en Quintana Roo, en lagos cráter del altiplano central y en el Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila). Al estudiar la composición y el hábitat de estos sitios, el pH y la conductividad explicaron con mayor firmeza la variación genética entre localidades (Centeno *et al.* 2012). Fierer y Jackson (2006) coinciden en señalar al pH como un factor de influencia en la estructura de las comunidades microbianas, y apuntan que este factor puede ser más importante que la distancia geográfica.

Las principales diferencias que separan a los microbialitos de Alchichica con los de otras localidades son: **a.** Tanto los microbialitos de Quintana Roo como los de Coahuila están presentes en sistemas kársticos oligotróficos (agua con altas concentraciones de calcio y de carbonatos). En cambio, la concentración de calcio en el lago Alchichica es muy baja. La composición mineralógica de hidromagnesita-magnesita de los microbialitos de Alchichica es muy particular, se ha registrado solamente en pocos sitios en el mundo (ver Kazmierczak *et al.* 2011). **b.** La conductividad y el pH que circunda los dos tipos de microbialitos en Alchichica es la más alta en relación a los otros sitios, la diversidad de la comunidad microbiana, en cambio, es relativamente la más baja entre estos sistemas. Esto tiene coherencia con otros valores bajos de riqueza de especies reportados en lagos alcalino-sódicos (Galat *et al.* 1981, Leland y Berkas 1998). **c.** La concentración de nitrato fue un factor relevante en la separación (estadística) de los microbialitos estudiados, en Alchichica se situaron entre los más bajos. Es interesante notar que la proporción relativa de cianobacterias en Alchichica fue la más alta entre sitios. Lo anterior podría estar ligado a la posible limitación por N en el sistema Alchichica ya que las cianobacterias son importantes fijadoras de nitrógeno. Un aspecto destacado del estudio de Centeno *et al.* (2012) es la relativa constancia de la composición microbiana de los principales grupos bacterianos en los distintos microbialitos estudiados. Si bien, los géneros/especies pueden ser diferentes, la participación relativa de los grupos (sus metabolismos quizás) en la diversidad de los consorcios fue muy similar.

El estudio de los microbialitos, su organización interna, sus interacciones, su potencial metabólico y su supervivencia ofrecen un vasto archivo de información con posibles respuestas a preguntas planteadas desde la Ecología microbiana, la Evolución química y la Astrobiología.



Fig. 5 Morfología de los dos microbialitos: tipo esponjoso (arriba) y tipo columnar (abajo) presentes en el lago de Alchichica. En la parte izquierda se presenta la morfología externa de los microbialitos expuestos mientras a la derecha se observa una sección de los microbialitos sumergidos (a una profundidad aproximada de 0.3 m). Fuente: Valdespino-Castillo et al. 2014.

### *Bacterioplancton*

El bacterioplancton o mejor dicho, y de forma más integral, el plancton procarionte, ha sido relacionado con los flujos más importantes de materia y energía en los sistemas acuáticos. Por ejemplo, el estado trófico de los sistemas acuáticos y las comunidades microbianas (*bacterioplancton*) ha mostrado interesantes relaciones (ver Biddanda et al. 2001, Cotner y Biddanda 2002), estas pueden ser una herramienta útil para comprender y prever las respuestas de las comunidades acuáticas en el horizonte de cambio global.

Los procariontes son capaces de dominar los procesos metabólicos en los ecosistemas donde son abundantes relativamente a otros componentes (como los sistemas oligotróficos). Por ejemplo, los procariontes heterótrofos son el componente más significativo de la respiración comunitaria total en los sistemas oligotróficos, mientras que su contribución relativa es menor en sistemas eutróficos (Biddanda et al. 1994, 2001; del Giorgio et al. 1997). Parte de la explicación de la importancia de los procariontes heterótrofos en los flujos de oxígeno y de carbono tiene que ver con su proporcional alta biomasa relativa en los sistemas oligotróficos y su afinidad por las formas disueltas de C.

La presencia, la dominancia y la distribución, y por tanto el potencial metabólico, de los microorganismos en los sistemas acuáticos obedece a "equilibrios dinámicos" muy complejos, ligados al cambio ambiental (e.g. cambios en el estatus nutrimental, en la fisicoquímica o en la hidrodinámica de los sistemas). Las condiciones de cambio (gradual o abrupto) han sido



relacionados, por ejemplo, con la presencia de organismos con estilos de vida distintos que están relacionados con dos diferentes estrategias adaptativas: los “oportunitrofos” que poseen capacidades para explotar recursos que son variables espacial y temporalmente (e.g. *Vibrio* y *Roseobacter* son buenos competidores en condiciones de cambio ambiental); y los oligótrofos “pasivos”, muy eficientes en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (e.g. *Pelagibacter* y *Prochlorococcus* son los organismos numéricamente más abundantes en el océano; Polz *et al.* 2006). Los requerimientos y las capacidades específicas de los microorganismos presentes, por tanto, son uno de los factores clave del funcionamiento de los ecosistemas. Algunos ejemplos de respuestas abruptas al cambio ambiental, que afectan los flujos de materia y energía en los sistemas, son los florecimientos masivos (*blooms*) o la dominancia alternada de ciertos grupos de fitoplancton sobre otros. El conocimiento de las estrategias que utilizan los microorganismos para responder al cambio ambiental, tales como la presencia y expresión de genes para la remineralización de macro y micronutrientes y otros mecanismos, como el *quorum sensing* (Gram *et al.* 2002), la quimiotaxis (Miller *et al.* 2004) o la asociación de procariontes con células animales o algas (e.g. Buchan *et al.* 2005) pueden contribuir al entendimiento de los sistemas biológicos. En la actualidad, con la explosión del conocimiento derivado de las “ómicas” y la eficiencia para procesar la información, estamos adentrándonos en una era de amplio conocimiento de los microbios y de las variables que condicionan su presencia y distribución, sus interacciones y sus respuestas a los cambios ambientales.

## Antecedentes del trabajo

La presencia de microbialitos (de dos morfologías: columnar y esponjoso) distribuidos aleatoriamente en la zona litoral del lago-cráter Alchichica fue descrita inicialmente por Tavera y Komárek (1996). Los microbialitos esponjosos se encuentran en toda la zona litoral del lago, mientras que el tipo columnar, en la zona S y SW. Su crecimiento máximo se observa entre 0 y 5 m de profundidad. El estudio de Falcón *et al.* (2002) señaló que ambos tipos de estromatolitos están fijando N<sub>2</sub> atmosférico activamente, con tasas máximas durante el día, asociadas a la actividad fotosintética de cianobacterias con heterocistos. Recientemente, Beltrán *et al.* (2012) identificó una veintena de filotipos de *nifH* como los responsables de la actividad de fijación de N en los microbialitos de Alchichica. El trabajo de Centeno *et al.* (2012) ha señalado que ambos tipos de microbialitos tienen una composición única y diferente además de altamente diversa.

Macek y colaboradores (2009) describieron el picoplancton en la columna de agua del lago de Alchichica en un periodo de cinco años, encontraron que la dinámica del picoplancton total sigue un patrón regular ligado al ciclo hidrodinámico del sistema. La mayor concentración del picoplancton total ocurre durante el periodo de circulación y estratificación temprana (enero a marzo), mientras que los números más pequeños ocurren durante la estratificación tardía (octubre a noviembre). El trabajo de Hernández-Avilés (2010) identifica mediante técnicas de microscopía (FISH y CARD-FISH) la zonación de componentes del bacterioplancton asociadas a procesos biogeoquímicos (Figura 6).

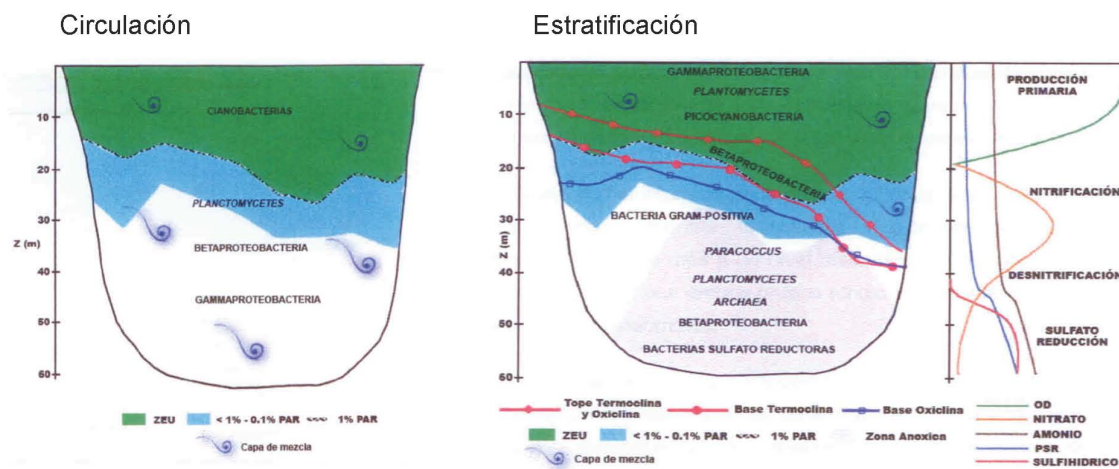


Fig. 6 Utilizando hibridación *in-situ* se describe la presencia y actividad de la comunidad bacteriana en la columna de agua del lago Alchichica durante los periodos de circulación y estratificación. También se señala en el periodo de estratificación el potencial metabólico asociado a los procariontes según el gradiente redox (Fuente: Hernández-Avilés 2010).

De acuerdo con la concentración de nutrientes y de clorofila *a*, el estado trófico de Alchichica se ha descrito como oligo a mesotrófico, esto también fue indicado al estudiar el picoplancton total (ver Macek *et al.* 2009). La dinámica del N y P en la columna de agua corresponde con el ciclo anual estratificación-mezcla. Durante la estratificación hay un agotamiento gradual de los nutrientes en el epilimnion y un enriquecimiento hacia el hipolimnion, en el periodo de circulación la concentración de dichos nutrientes se vuelve homogénea en la columna de agua y es un poco mayor a aquella del epilimnion en estratificación.

Tras experimentos de enriquecimientos con N y P en el lago Alchichica, Ramos-Higuera *et al.* (2007) proponen que durante la circulación los nutrientes N y P no limitan la producción primaria en columna de agua, mientras que el elemento que limita la producción fitoplanctónica durante la estratificación podría ser el N; sin embargo los mayores crecimientos de productores primarios se

registraron durante los enriquecimientos combinados de N y P sugiriendo colimitación. Los trabajos antes mencionados, abren la pauta para abordar preguntas como las aquí planteadas usando a las comunidades bacterianas del lago-cráter Alchichica como modelo de estudio.

## Planteamiento del trabajo

Dada la importancia de conocer el papel de las comunidades bacterianas en las transformaciones y en el ciclaje del P, se plantean preguntas como:

1. ¿Existe paralelismo funcional en comunidades bacterianas filogenéticamente diferentes, en cuanto a la expresión y actividad de genes asociados al ciclo del P?
2. ¿Existen especies clave y ubicuas dentro de diferentes comunidades bacterianas que lleven a cabo las transformaciones y el ciclaje del P?
3. ¿Estarán sujetas de igual forma las comunidades de bacterioplancton y de microbialitos a la hidrodinámica del sistema?

## Objetivos

**General.** Identificar el papel funcional, asociado a los procesos de transformación y ciclaje del P, de la comunidad bacteriana en microbialitos y bacterioplancton del lago-cráter Alchichica.

### **Particulares**

- Identificación de genes asociados a las transformación y ciclaje del P en la comunidad bacteriana de un lago monomítico, incluyendo microbialitos y columna de agua.
- Montaje de metodologías moleculares para identificar mediante PCR-clonación a los diferentes componentes bacterianos asociados al ciclo del P.
- Identificación de tasas y dinámica de expresión diferencial de la comunidad bacteriana (cADN), en diferentes condiciones hidrodinámicas y circadianas.
- Establecer las relaciones filogenéticas de los diferentes genes asociados al ciclo del P.

- Comparar los resultados de inferencia filogenética y los patrones de expresión, identificando especies/grupos clave en el funcionamiento biogeoquímico de las comunidades.

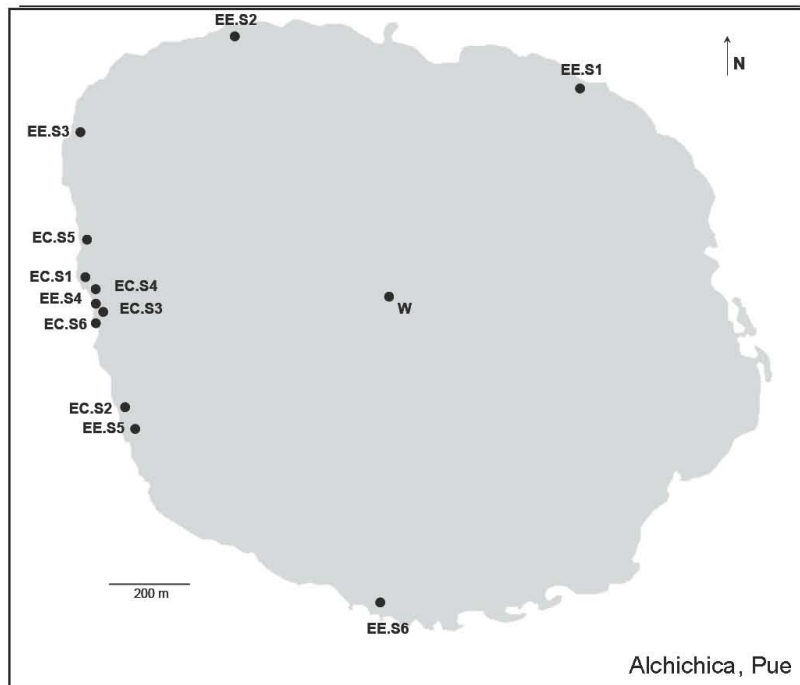
## Área de estudio

Alchichica es un lago cráter (19°24' N y 97°24') en el llano lacustre de Puebla en el Eje Neovolcánico Transversal, a 2340 m.s.n.m. Es circular (diámetro 1.8 km) con pendientes abruptas. Su profundidad promedio es 40.9 m, y la máxima es de 62 m. Es un sistema oligosalino (8.5 g L<sup>-1</sup>), alcalino (pH 8.7 a 9.2), dominado por iones sodio-magnesio y cloro-bicarbonato (Vilaclara *et al.* 1993). El clima es semiárido (la precipitación anual es <500 mm y la tasa de evaporación anual es <1690 mm), la temperatura media ambiental es de 12.9 °C (Adame *et al.* 2008), mientras que la de la columna de agua varía entre 14.5 y 20 °C.

Alchichica no tiene afluentes superficiales, está alimentado con agua subterránea (Filonov *et al.* 2006). Ha sido clasificado como un lago monomítico cálido (Alcocer *et al.* 2000) cuya mezcla ocurre en el invierno (entre diciembre y abril); durante la estratificación el hipolimnion se encuentra anóxico (Alcocer *et al.* 2000).

Se han indicado condiciones de oligo a mesotróficas en el sistema de acuerdo con la concentración de clorofila *a*, *proxis* de biomasa fitoplanctónica (Adame *et al.* 2008) y concentraciones de nutrientes <4 μMol en una amplia (15 – 35 m) zona eufótica (Ramírez-Olvera *et al.* 2009). Durante el verano ocurren afloramientos masivos de cianobacterias como *Nodularia cf. spumigena*. (Falcón *et al.* 2002, Macek *et al.* 2009)

En el lago de Alchichica no ha sido claro establecer los mecanismos que limitan y sostienen la producción primaria tanto en la columna de agua como en la zona litoral del lago, ni cómo el compartimiento bacteriano participa en la transferencia de nutrientes en las redes tróficas. Diferentes fuentes de evidencia coinciden y sugieren en una posible co-limitación de la producción fitoplanctónica por N, P y Si en una escala temporal (intra-anual) (ver Ramírez-Olvera *et al.* 2009, Ardiles *et al.* 2012).



<b>M columnar y Mesponjoso:</b>	<b>Columna de agua:</b>	
6 pts de muestreo	1 punto de muestreo	<b>ADN</b>
X 3 réplicas	X 3 profundidades X 3 réplicas	
X 4 tiempos (c/ 6 h)	X 4 tiempos (c/ 6 h)	<b>ARN</b>

Fig. 7 Esquema de muestreo en el lago Alchichica, Puebla, que muestra los sitios de colecta para los microbialitos columnar (EC) y esponjoso (EE), además del sitio de muestreo de la columna de agua (W) donde se colectó agua a 5 m, 25 m y 61 m durante la circulación (febrero 2011) y la estratificación (agosto 2011). En la parte inferior se muestra el diseño de colecta para el análisis de ADN y ARN totales.

## Métodos

### *Esquema general de muestreo*

A continuación se explican los diferentes métodos y estrategias utilizadas para abordar las preguntas y las hipótesis relacionadas con el presente proyecto. El orden propuesto es secuencial y operacional.

## *Colecta de microbialitos y bacterioplancton*

### *Muestras para extracción de ADN*

Se colectaron muestras de diferentes componentes de la comunidad microbiana del lago-cráter Alchichica durante los periodos de mezcla (enero de 2011) y estratificación (agosto de 2011).

De los dos tipos morfológicos de microbialitos presentes en Alchichica (esponjoso y columnar *sensu* Tavera y Komarek (1996)), se colectaron núcleos de aproximadamente 5 cm de diámetro por 5 cm de profundidad de las capas superficiales de estas estructuras. El muestreo se realizó por triplicado para seis microbialitos (de cada tipo morfológico) distribuidos a lo largo del lago (Estaciones EE S1-S6 y EC S1-S6 (Fig. 7)).

Para estudiar el bacterioplancton se colectó agua de 3 profundidades en la columna de agua: 5m, 20 m y 61 m, en una estación central del lago (Fig. 7) por triplicado. El agua fue filtrada a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ , Durapore, Millipore, posteriormente a un pre-filtrado por 10  $\mu\text{m}$ .

### *Muestras para extracción de ARN*

Además de los fragmentos de microbialitos colectados para analizar el ADN, en los mismos sitios, se colectaron muestras de estromatolitos y columnar y de agua en 4 momentos de un ciclo diurno, cada 6 horas: amanecer, medio día, atardecer y media noche (06:00, 12:00, 18:00 y 24:00 h, respectivamente), para monitoreo de su expresión génica a lo largo del día.

Microbialitos. Se colectó aproximadamente 20 g de cada tipo de microbialito (EE y EC) que fue preservado en sus condiciones originales (agua, temperatura, luz) en un periodo de 24 h. Cada 6 h se seccionó una submuestra que fue congelada en nitrógeno líquido (-140 °C) y preservada posteriormente a -80°C.

Columna de agua. De igual forma se colectó y preservó agua de 3 profundidades: 5, 20 y 61 m. Cada 6 h se filtró un volumen de 1.5 litros a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ , Durapore, Millipore posterior a un pre-filtrado por 10  $\mu\text{m}$ . Estas submuestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y preservadas posteriormente a -80°C.

### *Extracción de ácidos nucleicos*

Se realizaron extracciones de ADN metagenómico de microbialitos (EE n=6, EC n=6) y columna de agua (n=3, correspondientes a tres profundidades) según el protocolo de Zhou *et al.* (1996), con limpiezas posteriores de fenol: cloroformo: isoamil alcohol y purificación con columnas de sílice (ver

Centeno *et al.* 2012). Aproximadamente 5 g de cada microbialito fueron pulverizados en varios ciclos con nitrógeno líquido en una solución buffer (100 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 8) y 0.06 del volumen obtenido de CTAB. Esta mezcla fue incubada con lisozima (30 mg ml<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich, USA) por 30 min a 37 °C y posteriormente con proteinasa K (10 mg ml<sup>-1</sup>, Sigma Aldrich, USA) y 0.1 del volumen de duodecil sulfato de sodio (SDS) a 55 °C, durante toda la noche.

Las muestras fueron centrifugadas a 8000 g por 20 min. La fase soluble fue recuperada y extraída en dos ciclos con fenol: cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1) y en un ciclo posterior con cloroformo: isoamil alcohol (24:1). El ADN fue precipitado durante toda la noche añadiendo 2 volúmenes de 2-propanol, 0.1 volumen de acetato de sodio (3 M) y 2 µL of GlycoBlue (Ambion Inc., USA). El ADN precipitado fue recuperado por centrifugación (8000 g por 15 min), lavado en dos ciclos con etanol 80% y resuspendido en agua de grado molecular. Las muestras fueron purificadas con columnas Mini Spin columns (DNeasy Blood & Tissue kit; QIAGEN, Alameda, CA) según las recomendaciones del fabricante, precipitadas nuevamente y almacenadas a -20°C hasta su análisis. Las muestras de seis sitios de colecta fueron combinadas para hacer una mezcla compuesta para cada tipo morfológico de microbialito.

#### Extracción de ARN y síntesis de cADN

Posteriormente a la extracción de ácidos nucleicos con solventes orgánicos, según se describió anteriormente, la fracción que contiene los ácidos nucleicos fue resuspendida en 30 µl de agua grado molecular (Sigma Aldrich). Para extraer el ARN se utilizó el kit RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) y se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Seis gramos de los microbialitos por sitio fueron molidos en varios ciclos con nitrógeno líquido con 2.5 ml de la Bead Solution (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA). La fracción obtenida fue colocada en tubos Falcon de 15 ml contenidos en el kit. Posteriormente el ARN fue purificado a través del protocolo de limpieza del RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) que incluye un paso para eliminar el ADN con ADNase I (Qiagen). En este paso, las muestras de los diferentes sitios fueron combinadas para obtener muestras compuestas para cada tipo de microbialito, para cada tiempo de colecta a lo largo del ciclo circadiano. Inmediatamente después a esta purificación, el cADN fue sintetizado utilizando el sistema Reverse Transcription System (Promega, WI, USA). El ARN fue posteriormente incubado a 70°C por 10 min y después incubado en hielo. Alícuotas de 4 µl del ARN total fueron colocadas en tubos de reacción con una concentración final de 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 volumen de solución buffer (Reverse Transcription; Promega), 1.0 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 0.5 U de inhibidor Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor

(Promega), 15 U de AMV Transcriptasa Reversa (Promega) and 0.5 µg de los oligos específicos para cada marcador (Invitrogen).

Las reacciones de 20 µl fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente, a 42°C por 15 min y finalmente a 95°C por 5 min para inactivar la transcriptasa reversa. El cADN obtenido fue almacenado a -20°C hasta su análisis.

#### Selección de marcadores genéticos

A partir de reconocer la diversidad de formas del fósforo en los ambientes acuáticos y sus transformaciones (mayormente por procariontes) se realizó una búsqueda de oligos o primers, diseñados y probados (publicados) para buscar la mayor diversidad procarionte posible, asociada a las enzimas extracelulares fosfatasas alcalinas, fitasay polifosfato cinasa. La búsqueda de los oligos se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligos degenerados utilizados en este estudio: fosfatasas alcalinas (*phoX* y *phoD*), fitasa (*BPP*) y polifosfato cinasa (*ppk1*)

Mecanismo general	Función	Gen	oligos	Amplificación (nucleót.)	Sistema estudiado Referencia
Respuestas ante PI stress	fosfata alcalina	<i>phoX</i>		~600	agua de mar
Transformación de POD (ésteres de fosfato)		<i>phoX1</i> F R <i>phoX2</i> F R <i>phoX3</i> F R	5'GARGARAAYTYAACGGCTA 5'GCCAKSACRWAVAGATCC 5'GARGAGAACWTCACGGYTA 5'GATCTCGATGATRTGCCRAAG 5'GGGNACTTAYYTMACBTGYGAA 5'GDCKATCCATBGKBTGTC		Sebastian y Ammerman 2009
	fosfoesterasa	<i>phoD/ALP*</i>		~330	suelo
		ALPS-F730 ALPS-R1101	5'CAGTGGGACGACCAGAGGT 5'GAGGCCGATCGGCATGTCG		Sakurai <i>et al.</i> 2008
Transformación del fitato	fitasa	<i>BPP</i>		~200	intestino de carpa
		F-BPP R-BPP	5'GACGCAGCCGAYGAYCCNGCNITNTGG 5'CAGGSCGANRTCIACRTRTT		Huang <i>et al.</i> 2009
Respuestas ante estrés/abundancia de P	síntesis de polifosfato	<i>ppk1</i>		~1200	reactor de lodos activados
		NLDE-F TGNV-R	5'CGTATGAATTTCTTGGTATTATTGTAATACTngaygarttyt 5'GTCGAGCAGTTTTTGCATGawartncngt		McMahon <i>et al.</i> 2002 y 2007

\* las secuencias parciales amplificadas por estos oligos fueron erróneamente anotadas como *phoA* (NCBI), corresponden a secuencias tipo *phoD*.



*Amplificación por PCR de genes funcionales en ADN total*

En ADN metagenómico se amplificaron secuencias parciales de genes involucrados en las transformaciones de fósforo para las regiones *phoX*, *phoD*, *BPP* y *ppk1*. Las condiciones de PCR para cada uno de los marcadores está resumida en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los marcadores seleccionados con oligos degenerados en muestras ambientales (ADN metagenómico)

Marcador	Concentración de cada oligo	Concentración de MgCl <sub>2</sub>	Fragmento (pb)	Condiciones de PCR	Referencia
<i>phoX</i>	0.4 mM	1.4 mM	Aprox 600	Desnaturalización (95°C por 5 min) 35 ciclos (94 °C por 30 s, 52° C por 30 s y 72 °C por 1 min) Extensión final (72 °C por 10 min)	Sebastian y Ammerman 2009
<i>phoD</i>	2 mM	2 mM	321 a 330	Desnaturalización (94°C por 3 min) 35 ciclos (94 °C por 1 min, 57° C por 1 min y 72 °C por 2 min) Extensión final (72 °C por 7 min)	Sakurai et al. 2008
<i>BPP</i>	1 mM	2mM	160 a 200	Desnaturalización (95°C por 4 min) 8 ciclos (95 °C por 30 s; 57° C por 30 s (disminuyendo 1 °C en cada ciclo) y 72 °C por 30 s) 27 ciclos (95 °C por 30 s, 48 °C por 30 s y 72 °C por 5 min)	Huang et al. 2009
<i>ppk1</i>	400 nM	3.5 mM	Aprox 1300	Desnaturalización (94°C por 12 min) 10 ciclos (94 °C por 1 min, 53° C por 45 s (disminuyendo 0.5 °C por ciclo) y 72 °C por 2 min) 25 ciclos (94 °C por 30 s, 45 °C por 45 s y 72 °C por 2 min) Extensión final (72 °C por 20 min)	McMahon et al. 2002 y 2007
<i>phnA</i>	2.5 pmol	2.5 mM	144	Desnaturalización (94°C por 2 min) 30 ciclos (94 °C por 30 s, 58° C por 30 s y 72 °C por 2 min) Extensión final (72 °C por 20 min)	Gilbert et al. 2009

Nota. Oligos degenerados

Se buscaron las condiciones óptimas para la amplificación con PCR a partir del ADN ambiental total de cada comunidad. Los productos de PCR para cada gen identificado fueron separados con librerías de clonas, usando vectores de clonación (TA Original cloning kit, Invitrogen) y células competentes (*E. coli TOP10*, Invitrogen). Cada clona fue separada y caracterizada mediante secuenciación (usando oligos M13) para posteriormente evaluar los patrones de diversidad de cada marcador e identificar unidades taxonómicas operativas (OTUs). Se cotejó la identidad de cada producto amplificado mediante diferentes análisis filogenéticos (a continuación).

*Análisis bioinformático*

Las secuencias parciales obtenidas permitieron hacer inferencias filogenéticas y funcionales que al ir

acoplados a su patrón de expresión, ofrecieron información sobre los grupos activos en diferentes procesos del ciclo de P. Estos análisis incluyeron inferencias filogenéticas por distancia y por máxima verosimilitud.

La identidad de cada fragmento se corroboró con la base de datos del NCBI, usando el algoritmo BLASTn y se alinearon las secuencias obtenidas en base a su secuencia predicha de aminoácidos. Debido al uso de la técnica de transformación-clonación también es importante eliminar los posibles fragmentos del vector de clonación, unidos frecuentemente a las secuencias amplificadas. Resulta muy útil compilar las secuencias a analizar tanto en nucleótidos como en su secuencia prevista de aminoácidos (archivos .fasta). Buscar y descargar secuencias de referencia (casi siempre resultado de secuenciación de cepas “tipo”) es una tarea que debe realizarse a la par que se busca la identidad de las secuencias problema en BLASTn.

Una vez que se cuenta con el archivo de las secuencias problema en aminoácidos, así como secuencias de referencia, se procede a alinear las secuencias en el marco de lectura correcto, para lo cual le pueden utilizar diferentes herramientas en línea como Expasy Six frame Translator, las cuales ayudarán a reconocer el marco de lectura correcto así como saltos en el marco de lectura. Los alineamientos en aminoácidos serán muy útiles para visualizar regiones conservadas, regiones de alta variabilidad, inserciones, deleciones, dominios funcionales y “binding sites”, pseudogenes, etc.

En este proyecto se utilizaron diferentes plataformas para alinear las secuencias problemas como Sequencer 4.1.4 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA), CLUSTAL W o MUSCLE, estos últimos dos son utilizados en paquetes multifuncionales como Seaview o MEGA.

Algunas plataformas de análisis de aminoácidos como HMMER, Protein Data Base (PDB) o EMBL fueron herramientas fundamentales para entender la estructura y función de los fragmentos analizados (éstas están ligadas a bases de datos de proteínas como Uniprot o Conserved Domains, de NCBI).

En su camino evolutivo, los genes han sufrido modificaciones, la tasa de cambio y la posición de esos cambios dependen de la historia evolutiva particular de esos fragmentos (ADN), por ello es necesario seleccionar el modelo de evolución que refleje los cambios de un particular tipo de secuencias (e.g. la tasa de sustitución de los nucleótidos). Una forma práctica de buscarlo es a través de la herramienta Model selection de MEGA 5.

A partir de los alineamientos cuidadosos en aminoácidos, es posible generar alineamientos en nucleótidos con coherencia y significado. Con este tipo de alineamientos, se realizaron análisis de secuencias con algoritmos de neighbor joining, máxima verosimilitud o bayesianos, que generan topologías en forma de árboles señalando la afiliación entre las secuencias. El análisis más utilizado

en este proyecto fue el de máxima verosimilitud, a través de la plataforma en línea PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010).

A través de la plataforma en línea MOTHUR v.1.33.3 (Schloss *et al.* 2009) se realizaron los análisis para agrupar las secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y la exploración de los cortes (cutoffs) en diferentes porcentajes de similitud (95% para *phoX* y *BPP*, 75% para *phoD*). También permitió observar traslapes de OTUs en los diferentes conjuntos de secuencias ambientales, así como estimar el índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ), el índice no paramétrico de riqueza Chao y el porcentaje de cobertura de los resultados.

#### *Caracterización ambiental (parámetros fisicoquímicos y biogeoquímicos)*

Acoplado al muestreo biológico se colectaron datos de la fisicoquímica del sistema con el apoyo en el campo de los integrantes del Proyecto de Investigación en Limnología Tropical, FES-Iztacala, UNAM.

También se colectaron muestras en triplicado para nutrientes disueltos, N y P totales y para el análisis elemental de C, N y P en los microbialitos. Estos análisis fueron realizados con apoyo del Laboratorio de Biogeoquímica acuática, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. En contenedores de polipropileno pre-lavados con agua desionizada se colectó para su análisis de nutrientes un volumen de agua de 30 ml prefiltrado en membranas de nitrocelulosa (0.44 y 0.22  $\mu\text{m}$ ) al que fueron agregadas 3 gotas de cloroformo y fueron mantenidas en congelación hasta su análisis en los días subsiguientes. La determinación de la concentración de SRP, Amonio, Nitrato y Nitrito fue determinada para las muestras de la columna de agua y el agua circundante a los microbialitos, fue realizada en un analizador de flujo continuo (Skalar San Plus, Skalar) con los métodos estándar adaptados por Grashoff *et al.* (1983) siguiendo los circuitos de Kirkwood (1994).

Para el análisis de  $N_{\text{total}}$  y  $P_{\text{total}}$  de las muestras de agua, se colectaron 10 ml sin filtrar y fueron mantenidas en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) hasta su análisis. Estas muestras fueron analizadas según el método de Valderrama (1981).

#### *Análisis elemental (C, N y P) de los microbialitos*

Para el análisis elemental de los microbialitos se extrajeron secciones de la parte superficial "viva" de los microbialitos, de aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$  que fueron mantenidas en congelación y oscuridad hasta su análisis posterior. Después, fueron secadas a  $12^{\circ}\text{C}$  en vacío en el Savant SpeedVac drier (Waltham, MA, USA). Una vez secas, fueron molidas en un mortero de ágata. Aproximadamente 20 mg de esta mezcla ( $n=6$  para cada tipo de microbialito) fue utilizada para

estimar su composición elemental de C y N (en un Analizador elemental PerkinElmer 2400) y de P por una oxidación con persulfato a alta temperatura (Valderrama 1981). Para estimar la composición elemental del componente orgánico de los microbialitos, fueron removidos los carbonatos, incubando aproximadamente 150 mg de la mezcla seca y molida de cada microbialito con ácido clorhídrico 1.5 N en cápsulas de porcelana. Estas fueron colocadas en parrillas a 40°C dentro de campanas de extracción. Una vez que todo el líquido se evaporó, las muestras fueron resuspendidas en agua desionizada y centrifugadas 20 min a 4000 g a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado para analizar formas disueltas y particuladas de N y P y los pellets fueron secados a 50°C y mantenidos en un desecador hasta su análisis.

Los pellets del componente orgánico en su totalidad (de aprox. 15 mg) fueron utilizados para su análisis elemental de C y N, así como su análisis por el método de Valderrama de  $N_{total}$  y  $P_{total}$ .

## Resultados

### 1. Trabajo de revisión

#### *Transformación del fósforo por microbios en los sistemas acuáticos*

El desarrollo de técnicas de Química analítica (principalmente para determinar las formas de P en el ambiente), así como de disciplinas como la Físicoquímica, la Microbiología, la Ecología y la Biología molecular, entre muchas otras, han permitido identificar procesos fundamentales (principalmente en procariontes) involucrados en el ciclaje del P en diferentes escalas espacio-temporales, como los siguientes:

#### a. Estrategias de respuesta ante concentraciones bajas o variables de P en el ambiente

Se han identificado diversos mecanismos que utilizan los microbios para poder vivir en ambientes con baja disponibilidad de P. Anteriormente (ver Fig. 3) se describió cómo los microbios cuentan con diferentes estrategias para adquirir, transformar y lidiar con el cambio de P en el ambiente. Parte de las estrategias constitutivas y de respuesta están ligadas a la preferencia por sustrato de los microorganismos y a su forma de vida.

Tal como lo hace el fitoplancton, las bacterias usan preferencialmente el fósforo inorgánico (P<sub>i</sub>) para sus necesidades metabólicas. El genoma bacteriano posee para ello transportadores específicos de alta y baja afinidad (ver Dyhrman *et al.* 2007). Sin embargo, se ha observado que los procariontes pueden aprovechar otros compartimientos del P, particularmente el POD (Palenik *et al.*, 2003, Martiny *et al.* 2006, Dyhrman *et al.* 2002). La Tabla 3 conjunta la información de los genes y proteínas mejor caracterizados que han sido relacionados con las transformaciones de P en procariontes. Están organizados de acuerdo con las transformaciones de las fracciones de P en la columna de agua, al modelo de Dyhrman *et al.* (2007) se ha sumado información de diferentes marcadores genéticos (Fig. 8) que se exploran en la actualidad para enriquecer el conocimiento sobre el ciclaje de este elemento fundamental

Tabla 3. Genes y proteínas involucrados en el metabolismo del fósforo

Metabolismo del P		Proteínas/genos involucrados	Función	Descrito en	Referencias
Adquisición de fosfato inorgánico	Transportadores de alta afinidad de fosfato	operón PstSCAB-phoU sphX, pstS1, pstC1, pstA1, pstB1, pstS2, pstC2, pstA2, pstB2	Sistema de transporte de P <sub>i</sub> transportadores de fosfato tipo ABC	cianobacterias, proteobacterias, planctomycetes, acidobacterias, firmicutes, Euryarchaeota.	Suzuki <i>et al.</i> 2004 Hirani <i>et al.</i> 2001
		nucH	nucleasa extracelular	cianobacterias, bacteroidetes	Suzuki <i>et al.</i> 2004
		urtA phoQ	codifica para una proteína periplásmica histidina cinasa transmembrana		Suzuki <i>et al.</i> 2004 Whitton y Potts. 2000
	Transportadores de baja afinidad	pit	transportador de baja afinidad	Listeria spp., Bacillus sp., proteobacterias	Alcaraz <i>et al.</i> 2008
	Fosfatasa alcalinas (Falc)	phoA	remoción de grupos fosfato de compuestos orgánicos, disponibilidad de P inorgánico	cianobacterias, planctomycetes, proteobacterias, firmicutes.	Sebastian y Ammerman 2009 Luo <i>et al.</i> 2009
		phoX		firmicutes, proteobacterias, actinobacterias, cianobacterias.	Sebastian y Ammerman 2009 Luo <i>et al.</i> 2009
		phoD		proteobacterias, actinobacterias	Sakurai <i>et al.</i> 2008, Tan <i>et al.</i> 2014
		phoV		Synechococcus sp	Whitton y Potts. 2000
	Fosfatasa ácida (Fac)	ACP		eucariontes, bacterias, arqueas	Kettler <i>et al.</i> 2007
	Utilización de P orgánico	Utilización de fosfonatos	operón phn phnB, phnK, phnL phnA	proteínas que facilitan la ruptura y la adquisición de fosfonatos	Proteobacterias, firmicutes, cianobacterias, tenericutes
utilización de DOP		ugpBAECQ	adquisición de sn-glicerol-3-fosfato, actividad fosfoliesterasa	eucariontes, bacterias, arqueas	Allewalt <i>et al.</i> 2006
Respuesta ante baja disponibilidad de P	regulón Pho (31 genes)	sistema coordinado phoB/phoR	sensor/regulador de la expresión de los operones del regulón Pho	<i>E. coli</i> , y proteobacterias	Wanner 1996
		sphS (homólogo de phoR) sphR (homólogo de phoB)	afectan la expresión de múltiples genes al anclarse río arriba a sus regiones promotoras ante limitación por P	cianobacterias marinas y firmicutes	Hirani <i>et al.</i> 2001 Suzuki <i>et al.</i> 2004
		phoU	codifica para un polipéptido envuelto en la represión del regulón pho	eucariontes, bacterias, arqueas	Whitton y Potts. 2000
	Síntesis de sulfolipidos	enzimas clave para síntesis de sulfolipidos			
		sqd1 sqdX	codifica para sulfquinovose sintasa codifica para glicosiltransferasa	proteobacterias, cianobacterias	Van Mooy <i>et al.</i> 2006 Alcaraz <i>et al.</i> 2008
Respuesta ante cambios en la disponibilidad de P	Síntesis y uso de polifosfato	ppk1	síntesis de polifosfato	bacterias, hongos, plantas	McMahon <i>et al.</i> 2002, 2007

A pesar de la evidencia acumulada sobre la limitación de la producción por la baja disponibilidad de fósforo en los océanos y en aguas continentales, los estudios en aislados bacterianos y en el ambiente, son escasos (Scanlan y Wilson 1999). Bajo el modelo de respuesta de *Escherichia coli* se

conoce que ante limitación por fósforo, *E. coli* induce varios componentes del regulón Pho, un conjunto de genes (aproximadamente 31) que codifican para proteínas necesarias para la incorporación de  $P_i$  o para el uso de fuentes alternativas de P (como fosfato ésteres y fosfonatos). Un estudio con microarreglos del regulón Pho en especies de cianobacterias mostró en *Synechocystis sp.* PCC 6803 la inducción de 12 genes (y la represión de uno) en condiciones limitantes de P (Suzuki *et al.* 2004). La regulación incluye tres conjuntos de genes: *pst1* y *pst2*, que codifican transportadores de P y un tercero, que contiene a *phoA* y *nucH*, esta última una nucleasa extracelular. Se ha observado que la inactivación de alguno de los genes *sphS* o *sphR* (homólogos de los genes *phoB* y *phoR* de *E. coli*; Martiny *et al.* 2006) elimina por completo la respuesta (expresión y represión) del regulón Pho en condiciones limitantes de P (Hirani *et al.* 2001). Con métodos independientes de cultivo, Breitbart *et al.* (2009), en un metagenoma de microbialito, determinaron las proteínas citoplasmáticas involucradas en el transporte de ortofosfatos (PstA, PstB, PstC), las proteínas periplásmicas que se anclan a  $P_i$  (PstS) y la ATPasa fosfato-inducible PhoH.

Las bacterias marinas inducen fosfatasas alcalinas y por ello, el análisis de estas han sido usadas para estimar la deficiencia por P en comunidades microbianas. Recientemente, se han identificado fosfatasas alcalinas bacterianas: PhoA, PhoX y PhoD (ver Tabla 3) miembros del regulón Pho (von Kruger *et al.* 2006) sin homología entre sí. Se ha determinado que PhoX está más ampliamente distribuido que PhoA en bacterias marinas (Sebastian y Ammerman 2009) de las agrupaciones: Alfabroteobacteria, *Roseobacter*, Gammaproteobacteria y Bacteroidetes, además de cianobacterias. Sin embargo, un poco más tarde se ha reconocido que la fosfatasa alcalina PhoD es aún más abundante (Luo *et al.* 2009). Se ha identificado también la localización subcelular más frecuente de estas fosfatasas (Tabla 3), mientras que PhoD y PhoA se encuentran mayormente en el citosol (se encuentran también en el periplasma y con dominios extracelulares); PhoX parece ser mayormente extracelular (Luo *et al.* 2009).

#### b. Transformaciones y uso de los fosfonatos

Se ha considerado que las transformaciones de P en la interfase sedimento-agua son gobernadas por procesos abióticos asumiendo que los microorganismos juegan un papel indirecto, sin embargo, hallazgos recientes sugieren que las bacterias en el sedimento no solo regeneran fosfato sino contribuyen a la formación/utilización de compuestos orgánicos refractarios. Por lo tanto, estos procariontes pueden regular el flujo de P a través de la interfase sedimento-agua, contribuyendo a su salida del sistema tanto por la formación de compuestos refractarios de P orgánico (como los fosfonatos) así como de minerales como la apatita biogénica (Gachter y Meyer 1993).

Los fosfonatos se encuentran entre los compuestos más recalcitrantes de los compuestos orgánicos que contienen P (Kononova y Nesmeyanova 2002). Están caracterizados por un enlace muy estable C-P y por ello ha sido de gran interés entender los mecanismos que participan en su degradación. Se ha reconocido la capacidad para la remineralización de los fosfonatos en procariontes y en eucariontes unicelulares (e.g. *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Candida maltosa*; Kononova y Nesmeyanova 2002), sin embargo, solo se ha observado la degradación de las estructuras más primarias de los fosfonatos. La definición específica de la comunidad responsable de esta degradación no ha sido caracterizada aún (Paytan y McLaughlin 2007).

Los mecanismos que se han identificado para el uso de los fosfonatos son dos: la hidrólisis de sustratos específicos usando enzimas fosfonatasas o bien, la hidrólisis de un amplio grupo de sustancias usando la ruta C-P liasa (Kononova y Nesmeyanova 2002). Algunos genes involucrados en estas estrategias fueron identificados en metagenomas de microbialitos, estos incluyen genes para fosfonatasas (fosfonoacetaldehído hidrolasa, transportadores de 2-aminoetilfosfonato y aminotransferasa), además de los involucrados en la ruta C-P liasa (genes *phnB*, *phnK*, *phnL*; Breitbart et al. 2009. Ver Tabla 3 y Figura 8).

### c. Estrategias ¿de mediano y largo plazos?

Los organismos han desarrollado mecanismos o adaptaciones para lidiar con el cambio ambiental de P, entre ellos, la conservación intracelular del P y las respuestas ante limitación de P como la reducción en el tamaño del genoma (Giovannoni et al. 2005) o la sustitución de fosfolípidos por otro tipo de lípidos (Van Mooy et al. 2006) para disminuir el requerimiento celular de P.

En las plantas y las cianobacterias sujetas a limitación por P, los fosfolípidos pueden ser reemplazados por lípidos sin P (como sulfo o galactolípidos) para mantener la funcionalidad e integridad de la membrana mientras se libera el P para sostener otros procesos celulares que lo requieran (Dormann y Bening 2002). Han sido identificados en procariontes los genes que codifican para la sulfoquinovose sintasa (*sqd1*) y para la glicosiltransferasa (*sqdX*), las dos enzimas clave para la síntesis de sulfolípidos en *Bacillus coahuilensis*; estos genes están cercanamente relacionados con *sqd1* y *sqdX* de cianobacterias y el arreglo del operón es idéntico al de *Synechococcus sp.* PC7942 (Alcaráz et al. 2008).

Cabe mencionar que la disponibilidad de P se ha reconocido también como posible modulador de la transferencia horizontal de genes (ver Souza et al. 2008). Aunado a lo anterior, la conservación de regiones génicas en diversos grupos bacterianos asociadas con respuestas a

limitación por P (Giovannoni *et al.* 2005) y el papel relevante de la deficiencia de P en la divergencia genética entre poblaciones (Coleman y Chislom 2010) son temas de creciente investigación.

Algunas áreas particulares que presentan un grado de comprensión pobre en el mapa de las transformaciones microbianas del P son: la composición y biodisponibilidad de moléculas de fósforo orgánico disuelto (POD) de bajo peso molecular (LMW), la reactividad de los fosfoésteres (de alto peso molecular = HMW) y su transporte al interior celular, las fuentes y reciclaje de los fosfonatos disueltos así como la frecuencia y especificidad del metabolismo microbiano de estos compuestos (Dyhrman *et al.* 2007). Adicionalmente, el papel que juegan los fagos en la transferencia intra o inter-específica de genes vinculados al metabolismo del P (Sullivan *et al.* 2005).

Las estrategias antes analizadas presentan diferente escala temporal, por ejemplo, mientras que la expresión de genes ocurre en tiempos de respuesta celular a estímulos ambientales (en algunos casos se ha cuantificado en el orden de horas, Martiny *et al.* 2006, Hirani *et al.* 2001). Estrategias poblacionales como o la sustitución de fosfolípidos a sulfo o galactolípidos o la reducción del tamaño del genoma corresponden con escalas temporales más amplias. Para hacer una aproximación de las estrategias y las implicaciones de los transformaciones del P en procariontes en una escala espacial, utilizaremos un sistema acuático continental, por ejemplo el lago de Alchichica.

### **Estrategias de los procariontes para transformar el fósforo. Aproximación en diferentes escalas espaciales**

El papel de los microbios en las transformaciones del P (a *escala celular-molecular*) en los sistemas acuáticos ha sido revisado en párrafos anteriores, utilizando el modelo de Dyhrman *et al.* (2007) (ver Figs. 3). Derivado principalmente de la investigación en el océano que en resumen, considera (1) el problema de la definición de las fracciones operativas del P en los sistemas acuáticos, (2) explora las maquinarias metabólicas procariontes asociadas a las transformaciones de P y (3) las estrategias para responder al cambio ambiental de P. En la Figura R1 se ha sumado al modelo de Dyhrman *et al.* (2007), algunos de los marcadores explorados en años recientes.



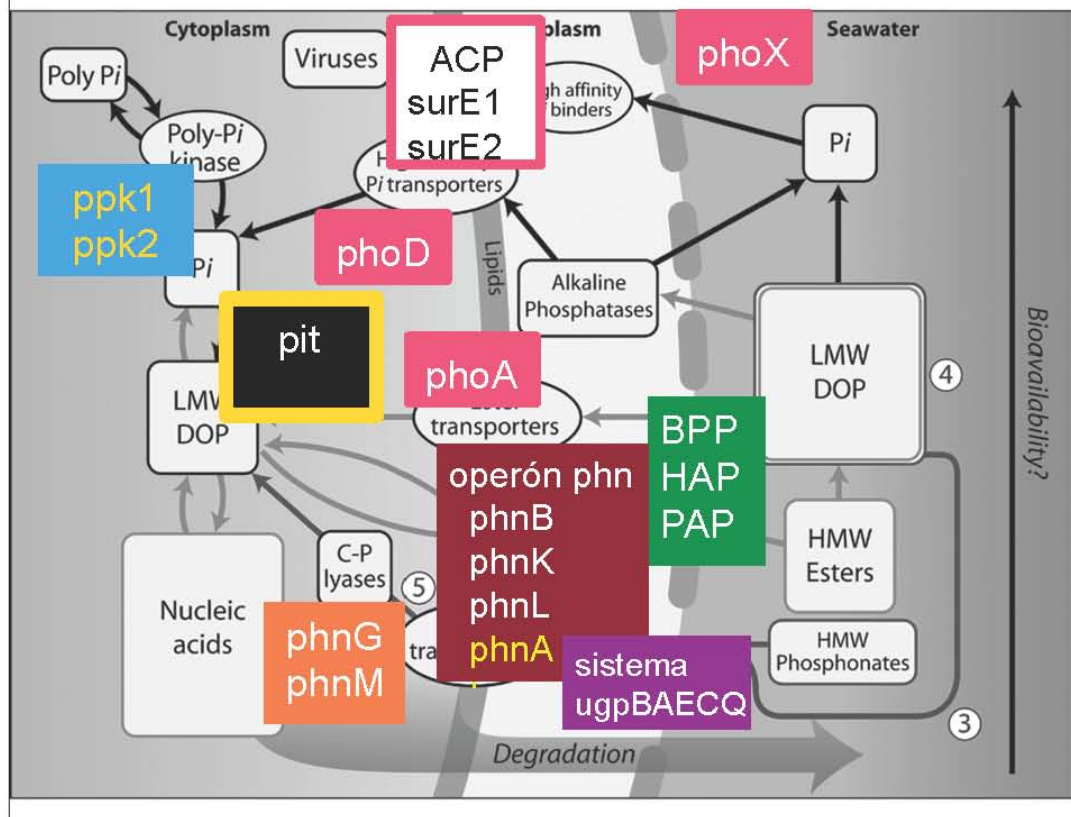


Fig. 8 Marcadores genéticos de procariontes asociados con las transformaciones de fósforo (en cajas de color sobre el modelo general propuesto por Dyhrman *et al.* 2007, en blanco y negro). Están señaladas las fosfatasa alcalinas *phoX*, *phoA* y *phoD* así como las fosfatasa ácidas ACP, *surE* (adquisición de POD), el operón *phn*, *phnG* y *phnM*, además del sistema *ugp* (transformación de fosfonatos), los transportadores de baja afinidad por el fosfato (*pit*) y las enzimas *ppk* (síntesis y degradación del polifosfato).

Las interrogantes abiertas sobre estos genes y proteínas se centran en ¿quiénes son los poseedores de estos genes?, ¿quiénes los expresan activamente?, ¿cómo se distribuyen en los diferentes niveles de organización?, ¿cuáles son los mecanismos que modulan su expresión?, etc.

*Escala de comunidades.* Tal como se ha revisado, las transformaciones del POD son intensas en la columna de agua, y se puede inferir que, en particular, en la capa de producción, donde los tiempos de residencia del fosfato son cortos. En el perfil de la columna de agua de los sistemas acuáticos se observa frecuentemente, una dinámica de deficiencia de nutrientes en la capa superficial y un incremento hacia las capas profundas (ver Fig. 10). Por ello, se podría inferir que en la capa superficial estarían presentes organismos con capacidades eficientes para lidiar con la baja disponibilidad de nutrientes o bien, que se utilizan con más probabilidad (y frecuencia) los mecanismos de respuesta al estrés nutrimental como las fosfatasa ácidas o alcalinas y se activan mecanismos como los transportadores de alta afinidad al fosfato, entre otros. Si bien, aún no se

conoce con claridad si las estrategias/organismos que llevan a cabo diferentes transformaciones están separadas(os) espacialmente, el trabajo de Luo *et al.* (2011) lo sugiere, en él describieron que en la columna de agua del océano los genes *phnG*, *phnH*, *phnI* (ejecutores líticos de fosfonatos) y *phoA* (fosfatasa alcalina) tienen una distribución muy limitada espacialmente (en la superficie los primeros y en aguas profundas, el segundo), otros marcadores presentaron una distribución más amplia en la profundidad, estos fueron los transportadores de liasa C-P (*phnK* y *phnL*), las fosfonatohidrolasas (*phnA* y *phnX*) y las fosfatasas alcalinas *phoD* y *phoX*. La afiliación, por tanto, de marcadores genéticos específicos, puede contribuir a entender este tipo de cuestiones, que contribuyen a esclarecer el papel ecológico de los grupos bacterianos. Al interior de las comunidades microbianas (e.g. procarioplankton, bacterioplankton o microbialitos) las bacterias heterótrofas parecen ser las principales responsables de gran parte de la hidrólisis de P orgánico disuelto (POD) y su conversión a P inorgánico disuelto a través de enzimas fosfatasas; sin embargo, el fitoplancton y las bacterias autótrofas pueden también hidrolizar compuestos orgánicos cuando la demanda por este elemento no está satisfecha por  $P_i$  (Cotner y Biddanda 2002). Esta capacidad, por lo tanto, se ha utilizado como modelo para explorar la competencia entre diferentes partes de la comunidad, por ejemplo entre los fotótrofos (procariontes y eucariontes; una exploración a este estudio está desarrollada en el artículo de revisión derivado del presente proyecto doctoral, ver el Anexo 1) para entender conceptos como el dominio en el plancton de algunas especies sobre otras. Aunque datos recientes resaltan el papel relevante que tienen algunos grupos de procariontes heterótrofos en el aprovechamiento de POD (e.g. proteobacterias, ver Cunha *et al.* 2010), la biodisponibilidad de las formas de P sigue siendo un tema de desarrollo potencial.

### Escala ecosistémica

Los estudios limnológicos en Alchichica han sugerido que el P no es un factor limitante de la producción en la columna de agua de Alchichica (Alcocer *et al.* 2008, Ardiles *et al.* 2012) y los datos derivados de este estudio (Tabla 1 Anexo 2 y Fig. 10) tampoco lo sugieren en la zona litoral (Tabla 5). Sin embargo, el análisis elemental de los microbialitos (cociente N:P) sí lo sugiere para este tipo de ensamble microbiano (Tabla 6).

Sin presentar una estrategia cuantitativa para aproximarnos al papel de los microbios en las transformaciones del P, el balance de masa de P a nivel ecosistémico sí revela una rápida remineralización del P en el lago Alchichica, un sistema donde las entradas de este elemento son relativamente escasas (ver Tablas Resultados 5 y 6).

El reciclaje intenso y rápido que se ha estimado (Tabla 8, Fig. 9) sugiere una intensa actividad del compartimiento vivo, particularmente de los procariontes. Lo anterior es congruente con el tipo de sistema estudiado (oligotrófico) donde predomina la fracción orgánica disuelta de nutrientes sobre la particulada (Cotner y Biddanda 2002). El POD, como hemos visto, está potencialmente sujeto a la acción bacteriana. Los ciclos de crecimiento y muerte de las bacterias, además de su capacidad para modular los reservorios intracelulares de P (particularmente de polifosfato) hacen que las bacterias juegan un papel relevante en la dinámica del P en la interfase sedimento-agua (Boström *et al.* 1988). Mientras que los microbialitos presentan un gradiente de recursos y condiciones a escala de milímetros), el gradiente de recursos y condiciones en la columna de agua está distribuido en aproximadamente 60 m de profundidad y presenta adicionalmente una condición hidrodinámica contrastante a lo largo del ciclo anual.

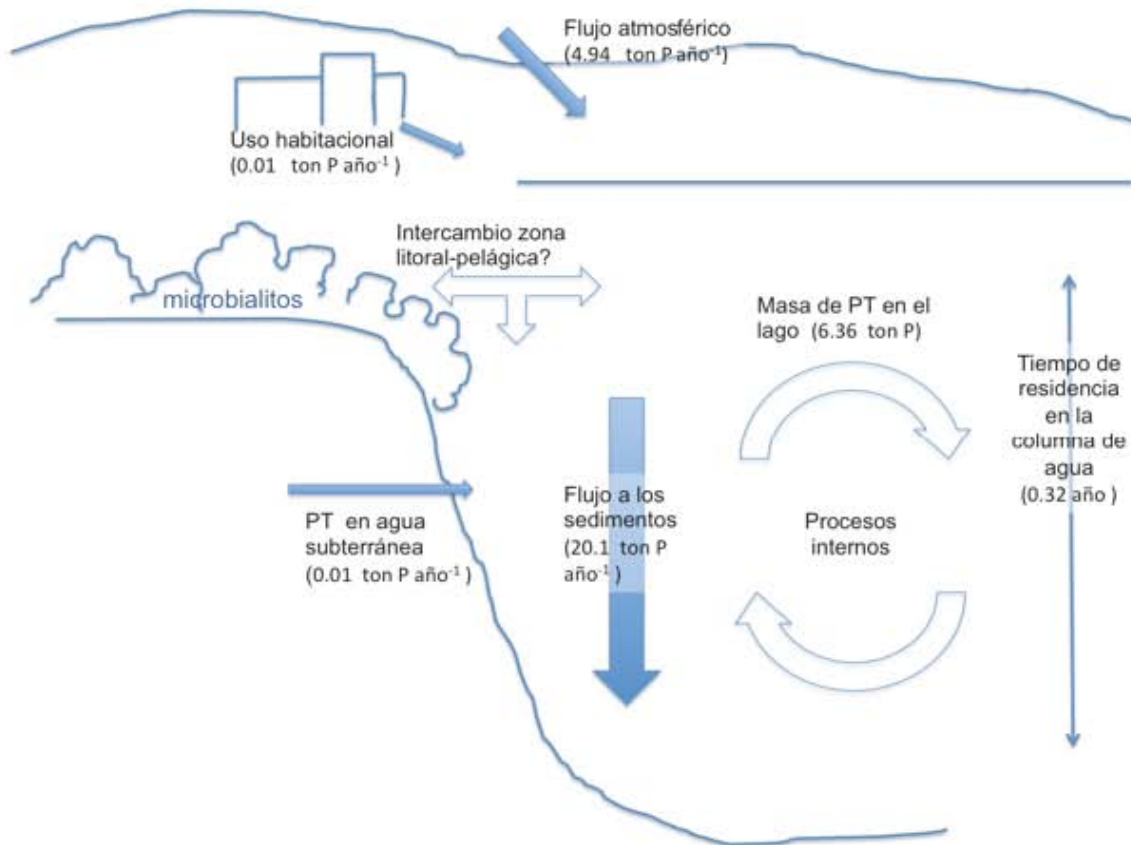


Fig. 9 Modelo conceptual del balance de fósforo en el lago Alchichica que muestra los principales flujos de fósforo en el sistema, así como la masa de fósforo total (PT) y el tiempo de residencia del P en la columna de agua. Las flechas vacías representan los flujos menos comprendidos.

### Las enzimas del ambiente

El concepto de enzimas del ambiente o ectoenzimas ha atravesado por diversos planteamientos y definiciones. En las primeras aproximaciones, Martínez y Azam (1993) estudiaron la actividad de aminopeptidasas y fosfatasas alcalinas en bacterias Gram-, detectaron que la mayoría de las fosfatasas alcalinas eran periplásmicas pero no pudieron determinar si también estaban presentes en la superficie celular. Utilizaron el término ecto-hidrolasas para referirse a estas proteínas y resaltaron su importancia en el acoplamiento bacteria-materia orgánica. También llamaron a hacer estudios ambientales y distinguir la localización subcelular de estas enzimas. A partir de entonces el término de ectoenzimas, exoenzimas, y ecoenzimas ha sido utilizado en diversos trabajos para referirse a las enzimas "en contacto con el ambiente", en la actualidad se les llama más comúnmente enzimas extracelulares (ver Cunha *et al.* 2010). Y es que el tamaño límite para el ingreso de sustancias a la célula es relativamente pequeño y está definido por la geometría de los

canales de ingreso al interior celular, p. ej. las porinas (en bacterias Gram+ es de aproximadamente 600 Da; Ghuyesen y Hackenbeck 1994) por lo cual las “sustancias” en el ambiente deben ser procesadas antes de su ingreso a las células. Por ejemplo, en el caso del fósforo se ha visto que sustancias como el sn-glicerol-3-P, glucosa-6-fosfato o manosa-6-fosfato pueden ingresar intactos a las células, así como algunos fosfoésteres y fosfonatos (Dyhrman y Haley 2006, Ilikchyan *et al.* 2009), pero una gran gama de compuestos orgánicos no puede ser metabolizada a menos que sean degradados hacia  $P_i$ .

### *Enzimas extracelulares para la remineralización del fósforo orgánico disuelto*

Las fosfatasas son un grupo reconocido de enzimas extracelulares. La actividad de las fosfatasas ha sido utilizada como un estimador del estado trófico de las comunidades en los cuerpos acuáticos o el suelo debido a que su expresión no es constitutiva, está ligada al estrés ambiental. Las fosfatasas extracelulares catalizan la liberación de P a partir de diversos compuestos orgánicos en el ambiente (Strojsova *et al.* 2003), principalmente de ésteres y anhídridos de ácido fosfórico (Feder 1973).

Se ha descrito que las fosfatasas son el grupo de fosfohidrolasas que participa más activamente en la liberación de fosfato en los ambientes acuáticos (Chróst y Siuda 2002). Cuando la disponibilidad de P inorgánico es baja (e.g. en capas superficiales de cuerpos de agua estratificados), el POD puede ser una fuente importante de este elemento. Los fosfoésteres dominan esta fracción (Bardgett *et al.* 2008) y son el sustrato que ha presentado más afinidad con las fosfatasas extracelulares (ver Cunha *et al.* 2010).

Contrariamente a las enzimas intracelulares que actúan en el citoplasma donde el pH está amortiguado, las enzimas extracelulares están directamente afectadas por el pH del ambiente, dado que los cambios en la concentración de iones hidrógeno en el ambiente modifican el estado de ionización de los aminoácidos en la estructura tridimensional de las enzimas (Tipton y Dixon 1979). Tras la caracterización de las constantes de semisaturación, temperatura y pH óptimo es este tipo de fosfatasas (Hoppe 2003) se ha observado que las desviaciones del pH óptimo disminuyen sus tasas de actividad enzimática (Chróst 1991). El término fosfatasas alcalinas engloba a un grupo de enzimas que reaccionan óptimamente en un rango de pH de 7.6 – 9.6 (ver Chróst y Siuda 2002), mientras que las fosfatasas ácidas, en pH abajo de 7, generalmente entre 4 y 6 (Jansson *et al.* 1988). La presencia y la caracterización de las fosfatasas extracelulares en los diferentes grupos microbianos ha sido una pregunta abierta desde hace décadas. La posibilidad de estudiar

metagenomas y transcriptomas de las comunidades acuáticas ha producido recientes e interesantes respuestas. Si bien, la proteína PhoA fue bien caracterizada y estudiada en cepas de *E. coli* (Overbeeke *et al.* 1983), al buscar su distribución en los microbios marinos fue sorprendente encontrar que la fosfatasa PhoX era más abundante que la esperada PhoA (Sebastian and Ammerman 2009) en el océano. Solamente unos meses más tarde, Luo *et al.* (2009) revelarían que la fosfatasa PhoD está más ampliamente distribuida que las dos anteriores.

Más allá de resolver los retos para determinar la presencia y la distribución de los genes que codifican fosfatasas extracelulares y sus mecanismos de expresión, la clasificación de las fosfatasas a nivel de proteína se encuentra en un estado de intenso cambio en los últimos años. Las fosfatasas han sido bien reconocidas y caracterizadas entre los eucariontes, se han estudiado con interés en la biomedicina humana debido a que son un mecanismo ampliamente difundido para el señalamiento celular (transducción) a través del mecanismo fosforilación/desfosforilación (e.g. Somlyo y Somlyo 2000). Y ya que el estudio de las fosfatasas alcalinas ambientales ha tenido un desarrollo posterior, las bases de datos de proteínas agrupan a todas las fosfatasas en familias de proteínas que comparten dominios funcionales. Por ejemplo, en la base de datos EMBI (European Bioinformatics Institute) el dominio Alkaline phosphatase-like (AP) alpha/beta/alpha incluye a proteínas fosfatasas alcalinas tipo PhoA, fosfonoacetato hidrolasas como PhnA, arilsulfatasas y fosfogliceratomutasas (ver AP en Tabla 4).

Se sabe que las fosfatasas extracelulares están distribuidas ampliamente en la escala filogenética. En la Tabla 4 observaremos las coincidencias de las fosfatasas extracelulares más ampliamente estudiadas (ácidas y alcalinas, base de datos EMBI) en los protistas fotosintéticos y en los grupos procariontes más representados. Dados los recientes avances en la clasificación de las fosfatasas también están incluidos los dominios de proteínas: Metalofosfoesterasas (MPE) y Alkaline phosphatase-like (AP).

La Tabla 4 muestra la distribución general de las proteínas y de los dominios proteicos en los diferentes taxa pero a la vez los números sugieren el estado del conocimiento sobre los grupos. Por ejemplo, mientras que la proteína PhnA ha sido identificada y estudiada casi exclusivamente en bacterias, sucede lo contrario con las fosfatasas ácidas púrpuras, descritas en eucariontes (particularmente en las plantas en su interacción con el suelo). Según este examen, entre los protistas, las algas verdes son el grupo que ha mostrado más fosfatasas alcalinas. En el caso de las bacterias, es interesante notar que las cianobacterias no presentan los números más altos, de hecho no se encontraron coincidencias para PhnA aún cuando algunas cianobacterias han sido descritos

como organismos que pueden aprovechar fosfonatos a través de la expresión de las proteínas PhnD y PhnJ (Gilbert *et al.* 2009). Otros grupos bacterianos (mayormente heterótrofos) muestran mayor presencia (y registro) de fosfatasa extracelulares.

Tabla 4. Presencia en los principales grupos de arqueas y bacterias, además de protistas fotosintéticos, del dominio Metalofosfoesterasas (MPE), las familias de proteínas fosfatasa alcalinas tipo PhoD, PhoX; el dominio fosfatasa alcalinas (AP) y las familias de proteínas fosfonoacetato hidrolasa PhnA, fosfatasa ácida SurE y fosfatasa ácida púrpura hierro/zinc (PAP). Fuente: Base de datos EMBI, octubre de 2012.

	fosfatasa alcalinas					fosfatasa ácida	
	MPE	PhoD	PhoX	AP	PhnA	SurE	PAP
Archaea	433	7	15	743		127	
Euryarchaeota *	285	7	15	575		98	
Crenarchaeota	116			133		26	
Eukaryota	10243	376	13	5872	3	355	882
Chlorophyta (algas verdes)	196	12	6	61		10	27
Bacillariophyta (diatomeas)	54	10	5	12			5
Phaeophyceae (algas café)	29	5		13			4
Cryptophyta (criptomonas)	3			3			
Dinophyceae (dinoflagelados)	2						
Bacteria	21664	1346	1912	29557	2156	2905	14
Cyanobacteria	501	52	94	248		116	
Proteobacteria	10978	660	858	15820	1359	2129	12
Firmicutes	5696	42	27	6077	690	156	
Actinobacteria	1966	407	248	1612	49	43	
Bacteroidetes	1488	74	16	3192	26	226	
Spirochaetes	151	10	5	178		32	
Planctomycetes	72	32	5	1064	5	17	2
Chloroflexi	56	4	6	78		20	
bacterias no cultivadas	29	32	641	20		2	

\*Están subrayados en amarillo los grupos fotosintéticos y las arqueas Euryarchaeota están marcadas parcialmente ya que se ha detectado que *Halobacterium* (Clase Halobacteria, en Euryarchaeota) es capaz de realizar fotosíntesis

En general, predominan las observaciones de que la actividad del bacterioplancton es mayor sobre la del fitoplancton en el consumo de fosfomonoésteres orgánicos en sistemas dulceacuícolas (Cotner y Wetzel 1992) y de aminoácidos en sistemas marinos (Wheeler y Kirchman 1986). Sin embargo, la información no es concluyente al interior de la comunidad fotosintética de los cuerpos acuáticos (procariontes y protistas fotosintéticos).

No ha sido fácil establecer las relaciones de competencia en estas comunidades quizás por su alta diversidad o el constante cambio en la estructura planctónica. La importancia relativa de la actividad fosfatasa no ha podido ser ligada a la predominancia de uno u otro grupo (microbiano o protista) sino a las especies presentes; ya que diferentes componentes de la comunidad probablemente experimentan diferentes niveles de estrés bajo las mismas condiciones ambientales de P (Sebastian

y Ammerman 2009). Esclarecer el papel que tienen las arqueas en los ambientes acuáticos representa un reto para diversas disciplinas, estamos en los albores del conocimiento de este grupo. Auguet *et al.* (2010) analizaron los patrones ecológicos globales de las arqueas descritas hasta ahora y al relacionarlas con los diferentes hábitats subrayaron la relevancia de sus capacidades metabólicas en algunos hábitats: e.g. la metanogénesis en sedimentos marinos y en la degradación de materia orgánica (MO) en sistemas hipersalinos (ver Gasol *et al.* 2004), la nitrificación en el plancton marino y en suelos (Francis *et al.* 2007) y fueron reconocidas como productores primarios claves en ventilas hidrotermales (Segeer *et al.* 1993). Existe poca información sobre las arqueas planctónicas, cuya proporción en los sistemas acuáticos es pequeña aunque estable en la columna de agua (1 – 10%; Massana *et al.* 1997); el origen termofílico de éstas sigue siendo un tema de intenso debate (DeLong 1998, Brochier-Armanet *et al.* 2008).

La pregunta sobre si la competencia entre el bacterioplancton y el fitoplancton determinan la estructura comunitaria o la dominancia de alguna especie sobre otra tiene al menos tres décadas de desarrollo; muchos aspectos ecológicos de las comunidades acuáticas han sido esclarecidos en este contexto. Así, se ha demostrado que el crecimiento de las especies no es función solamente de la tasa de adquisición del nutriente limitante; es muy relevante la eficiencia con la que ese nutriente es utilizado (ver en Currie y Kalff 1984); al respecto se han identificado estrategias *oportunistas* (ver Simek *et al.* 2005) y *especialistas* (ver Thingstad *et al.* 2005). En este sentido el tamaño juega un papel importante. En células esféricas (e.g. cianobacterias), mientras la célula se hace pequeña en diámetro se incrementa la proporción superficie:volumen, por tanto habría menor demanda interna por nutrientes contra una mayor capacidad relativa para adquirirlos (Reynolds 1997). Los factores asociados a este resultado podrían implicar un menor costo energético asociado a la simplicidad en la composición de la biomasa (Neidhardt *et al.* 1990) o su afinidad por los nutrientes inorgánicos (Button 1986) que a su vez está relacionado con su talla pequeña.

Aunque se acepta en general que las bacterias heterótrofas superan al fitoplancton en la competencia por P, particularmente en ambientes oligotróficos (Simek *et al.* 2006), la evidencia no es concluyente en el caso de la competencia por P entre los fotótrofos en los sistemas acuáticos (Strojsova *et al.* 2003). A continuación muestro las principales conclusiones de los estudios que se han ocupado de este tema: 1) Algunos grupos fitoplanctónicos que han mostrado respuestas intensas en la actividad de fosfatasa extracelulares, muestran baja o nula respuesta en otros sistemas (e.g. mientras Chlorophyta y Dinophyta fueron recurrentemente productoras de



fosfatasa; diatomeas y cianobacterias fueron productoras ocasionalmente (Cao *et al.* 2005). Otro tema a explorar es el cambios en la estructura del bacterioplancton ante el cambio ambiental y sus relaciones (especie-especie) con los protistas (ver Simek *et al.* 2006). 2) En algunos casos se ha observado gran variación intrapoblacional en la expresión de fosfatasa en especies que dominan el fitoplancton (biomasa) es decir, algunas células muestran la actividad enzimática mientras que otras no lo hacen, y 3) Si bien, en sistemas con baja disponibilidad de P parece que se comprueba que la baja disponibilidad de P induce la producción de fosfatasa (ver Cao *et al.* 2005, Strojsova *et al.* 2003); también se ha observado actividad fosfatasa en sistemas eutróficos lo cual vuelve a cuestionar el papel de la actividad fosfatasa como indicador del estado trófico (deficiencia de P) de los sistemas acuáticos. 4) Diversos autores sugieren que la expresión de estas enzimas se trata mas bien de un mecanismo adicional de adquisición de P y/o es activado durante cierto periodo del ciclo celular (Rengefors *et al.* 2001, Strojsova *et al.* 2003). Creo que otra forma de verlo es que, aunque la competencia por el P en la columna de agua puede ser muy intensa, la capacidad de producción de fosfatasa no define el éxito de un grupo sobre otro.

## **2. Caracterización del ambiente**

### *Caracterización ambiental y condición del fósforo en el lago Alchichica*

En Alchichica, las condiciones del sistema litoral son marcadamente distintas que las de la columna de agua; es posible suponerlo a simple vista ya que un extenso cinturón de microbialitos rodea a las aguas cristalinas y profundas. Para entender estas diferencias se realizó una caracterización ambiental (físicoquímica y de nutrientes) además de una revisión de algunos de los conceptos de la hidrodinámica asociada a estas dos zonas.

A continuación están resumidos algunos de los parámetros físicoquímicos generales de las zonas litoral y epilimnion (Z=5 m, estación en el centro del lago) de Alchichica tanto en el periodo de estratificación como de mezcla. Estos datos fueron obtenidos en 2011, en el trabajo de campo asociado a este proyecto (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones fisicoquímicas del la zona litoral y del epilimnion del lago Alchichica en los periodos: Estratificación y Circulación. Los valores de la zona litoral representan el promedio de 12 estaciones distribuidas en la periferia del lago.

Periodo Zona litoral	Estratificación		Circulación	
	Epilimnion	Zona litoral	Epilimnion	Zona
Temperatura (°C)	18.5	19.76	14.7	16.15
OD (mg L <sup>-1</sup> )	7.4	6.4 (5.9-7.4)	6.8	8.9 (6.4-10.09)
pH	8.8	8.28	8.83	7.6
PT (µM)	0.42	0.97	1.49	2.86
NT (µM)	1.31	7.94	5.13	3.86
NT:PT	3.11	8.15	3.44	1.35
SRP (µM)	0.25	0.38	0.20	0.68
NID (µM)	5.67	3.4	1.09	1.78

OD= oxígeno disuelto, PT= fósforo total, NT= nitrógeno total, SRP=fósforo reactivo disuelto, NID= nitrogeno inorgánico disuelto

Mientras que la temperatura baja drásticamente en el epilimnion con la circulación, la zona litoral permanece en promedio más estable. En el caso del oxígeno disuelto, los intervalos representan la heterogeneidad de la zona litoral (12 estaciones). La concentración de nutrientes, con excepción de NID y NT son mayores en la zona litoral que en el epilimnion. La estacionalidad del P en estos compartimientos es notable, e.g. el PT es 90% mayor en la zona litoral que en el epilimnion durante la mezcla y 131% mayor durante la estratificación. La concentración de las formas disueltas de N (NID) son en general bajas, particularmente durante la circulación.

La columna de agua mostró condiciones contrastantes entre el epi, meta e hipolimnion, particularmente del periodo estratificado donde puede observarse un marcado gradiente donde el oxígeno se va agotando hacia la zona profunda en contraste con los nutrientes, los cuales se incrementan (por acumulación) cerca del fondo (Fig. 10).

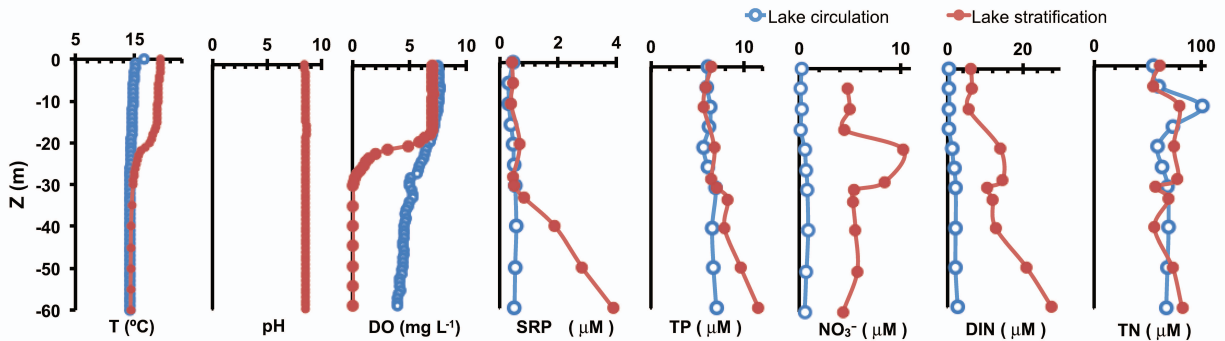


Fig. 10 Condiciones fisicoquímicas generales y de nutrientes en la columna de agua del lago sódico Alchichica durante el periodo de circulación (azul) y de estratificación (rojo). Fuente: Valdespino Castillo et al. 2014.

#### Composición elemental de los microbialitos

La proporción de C, N y P en los microbialitos fue heterogénea (tal como lo es la superficie de los microbialitos) in embargo, los resultados de la composición porcentual y las proporciones estequiométricas C:N:P fueron consistentes para cada uno de los microbialitos, n=6, CV).

De estos análisis se deriva que la capa "viva", o bien, los primeros centímetros de la superficie de los microbialitos tiene una composición aproximada de 10% de materia orgánica inmersa en una matriz mineral de carbonatos (Tabla 6). Las proporciones estequiométricas entre los elementos estudiados sugieren limitación tanto por N, como por P en estos consorcios (ver Tabla 6).

Tabla 6. Composición elemental de los microbialitos del lago Alchichica

Ensamble microbiano	P*	N	C	N:P	C:N	C:P	% MO
	(mg/g)						
Microbialitos	0.54	25.86	198	48	8	357	12.2
Esponjoso (n=6)	0.55	29.16	199	53	7	367	8.7
Columnar (n=6)	0.54	22.55	197	42	9	346	16.2

Previo al análisis elemental de C y N, las muestras fueron tratadas con HCl 1.5 N para remover la matriz mineral (de carbonatos) \* La muestra sin carbonatos fue analizada con el método de Valderrama.

### *Balance de fósforo en el sistema*

Para estimar un balance de fósforo a nivel ecosistémico es imprescindible contar con un balance hidrológico del sistema. Este tarea tiene dificultades asociadas al origen y a la morfología del lago Alchichica. Afortunadamente, la tesis de Maestría de García (2010) ha desarrollado este tema valiéndose de fuentes de información directas e indirectas.

En este trabajo se utilizó este balance hídrico "estático" para aproximarse al balance de fósforo en las condiciones presentes del lago Alchichica.

Así, el balance general del P, en el sistema Alchichica estaría definido por la ecuación siguiente, que resta las salidas a la entradas para observar si hay un diferencial de P en un tiempo dado:

$$\Delta P / \Delta t = \sum (E - S)$$

Donde  $\Delta P / \Delta t$  equivale al cambio de masa de P en el tiempo y  $\sum (E - S)$  es la sumatoria de las entradas (E) menos las salidas (S).

El estatus trófico de Alchichica se ha conservado relativamente en las últimas décadas, e.g. no se observa claramente que la masa de P en el lago se incremente en el tiempo, la concentración de las fracciones de fósforo: soluble reactivo (SRP) y total (PT) han cambiado relativamente poco en las últimas décadas (ver Oliva *et al.* 2001, 2009; Alcocer *et al.* 2007, Ardiles 2011). Por lo cual, para la construcción del balance del P en el sistema se planteó que  $\Delta P / \Delta t = 0$  (el P se encuentra en estado

estacionario) y por lo tanto se ha supuesto que:

$$\text{Entradas P} = \text{Salidas P}$$

Considerando lo anterior, se señalan a continuación los flujos potenciales de entrada y salida de P (Tabla 7):

Tabla 7. Principales flujos asociados al ciclo del P en el lago Alchichica en una base anual

#### Entradas P

Flujo PT en el agua subterránea (volumen agua x concentración de P)

Flujo de agua subterránea <sup>a</sup>	663935.58 m <sup>3</sup> año <sup>-1</sup>
Concentración de PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> en el agua subterránea <sup>b</sup>	0.53 uM PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> L <sup>-1</sup>
Deposición atmosférica <sup>c</sup>	4943 kg P año <sup>-1</sup>
Escorrentía de P por precipitación en el área del cráter	concentración desconocida
Desarrollo poblacional <sup>d</sup>	0.5 kg P persona <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup>
Drenajes	conc. y vol. desconocidos
Fuentes desconocidas	conc. y vol. desconocidos

#### Salidas P

Extracción de agua del lago	desconocida
Sedimentación <sup>e</sup>	9.2 g P m <sup>-2</sup> año <sup>-1</sup>
Remoción/inmovilización de P en OH-apatita <sup>b</sup>	índice de saturación de OH-apatita -2.97

<sup>a</sup> García 2010; <sup>b</sup> Kazmierczak *et al.* 2011; <sup>c</sup> Calculada usando las tasas totales de deposición atmosférica de Oseguera *et al.* 2010; <sup>d</sup> Smit *et al.* 2009; <sup>e</sup> Calculada usando los valores de exportación de Si de diatomeas de Ardiles *et al.* 2012. Si:P (16:1)

Según se puede observar en la Tabla 7, hay diferentes componentes que no se han definido o sobre los cuales no poseo información. Ante lo anterior, se planteó sacar de la ecuación algunos términos bajo los siguientes supuestos: 1) El flujo de *drenajes* (propios del sitio o de otras urbanizaciones) y

otras fuentes no se ha reportado. Quizás estas entradas quedan parcialmente compensadas por el índice de desarrollo poblacional donde consideré aproximadamente 20 viviendas con influencia en el lago. 2) Tanto el *flujo interno neto* (captura/liberación de P en los sedimentos) como la *extracción de agua* no han sido estimados o reportados. 3) Dado que la OH-apatita se encuentra insaturada en la columna de agua de Alchichica (índice de saturación -2.97), se descartó la *precipitación de P en OH-apatita*. 4) El acuífero en la región Alchichica es de tipo granular (Carrasco-Núñez et al. 2007), con un alto poder de infiltración ya que al caer la lluvia se infiltra tan rápido que no da paso a la *escorrentía superficial* (Gasca 1981). Partiendo de lo anterior, el balance quedó descrito en los siguientes términos:

$$\text{Flujo de P en agua subterránea} + \text{Deposición atmosférica} \\ + \text{Desarrollo habitacional} = \text{Sedimentación}$$

Tabla 8. Balance de P en el lago Alchichica en escala anual

Entradas P	
Flujo PT en el agua subterránea (vol agua x concentración de PT) <sup>a</sup>	0.01 ton P año <sup>-1</sup>
Deposición atmosférica <sup>b</sup>	4.94 ton P año <sup>-1</sup>
Desarrollo poblacional <sup>c</sup>	0.01 ton P año <sup>-1</sup>
Salidas P	
Sedimentación <sup>d</sup>	20.1 ton P año <sup>-1</sup>
Entradas P – Salidas P	-15.14 ton P año <sup>-1</sup>

<sup>a</sup>Calculada a partir de la proporción fosfato:PT en agua subterránea en Hernández-Terrones et al. 2011 (fosfato:PT ~20%);

<sup>b</sup>Oseguera et al. 2010; <sup>c</sup>Smit et al. 2009; <sup>d</sup>Ardiles et al. 2012

De acuerdo con el diferencial anterior, las entradas de P equivaldrían aproximadamente a una tercera parte de la biomasa que se exporta a los sedimentos (Tabla 8). Para tratar de entender este diferencial, se comparó la masa total de P en el lago (volumen del lago x la concentración -promedio anual- de PT en la columna de agua; Valdespino datos no publicados) con el flujo de sedimentación (Tabla 9).

Tabla 9. Balance de la masa total de P en el lago Alchichica y el flujo hacia los sedimentos

Masa total de P (PT) en el lago <sup>e</sup>	6.36 ton P <sup>e</sup>
Flujo de sedimentación de P <sup>d</sup>	20.1 ton P año <sup>-1</sup>
Diferencial	-13.74 ton P
Masa P : Flujo P	0.32 año

<sup>e</sup> Calculada con la concentración promedio de PT en la columna de agua (Valdespino datos no publicados) x volumen del lago, d Ardiles *et al.* 2012

### 3. Marcadores genéticos

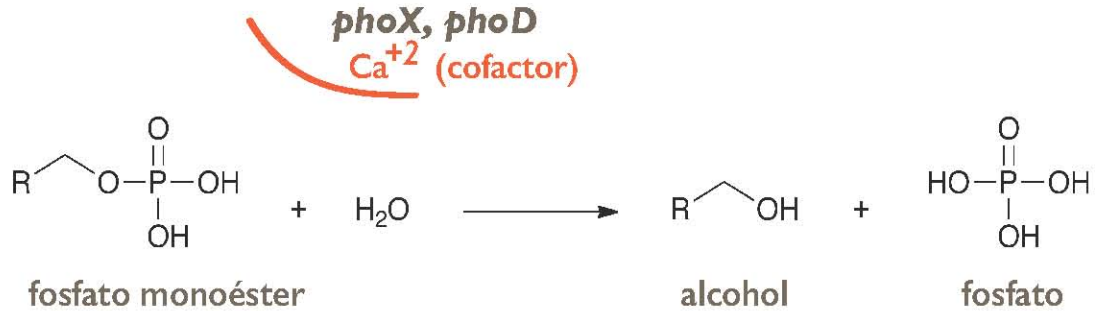
#### *Genes y proteínas asociadas a las transformaciones de POD en ensamblajes microbianos complejos: microbialitos y bacterioplancton del lago Alchichica como modelo de estudio*

Para aproximarse a las transformaciones del fósforo orgánico disuelto (POD) que es, en general, la fracción más abundante del P en los sistemas acuáticos, se estudiaron tres marcadores (con actividad de hidrolasa) y que corresponden a enzimas extracelulares: *phoD*, *phoX* y 3-fitasa BPP. En la Figura 10 se resumen algunas de las características generales (de estructura y función) de las fosfatasas alcalinas *phoX* y *phoD* que pueden ser de utilidad a lo largo del texto. Enseguida se muestran los esquemas (árboles resueltos con análisis de máxima verosimilitud) que muestran la diversidad de las secuencias obtenidas en Alchichica y la secuencias genómicas y ambientales que mostraron la afiliación más cercana con las secuencias de estudio (Figs. Resultados 5 y 6).

Marcadores: fosfatasas alcalinas

Reacción:

### fosfatasas alcalinas



	<i>phoX</i>	<i>phoD</i>
Actividad enzimática:	Hidrólisis de mono y di fosfoésteres	
Sustrato:	Fósforo orgánico disuelto, ésteres de mono y difosfato	
Tamaño de la proteína:	633 aa	583 aa
Localización:	Extracelular, periplasma, citoplasma	
Familia de proteínas:	Pfam: DUF839, TAT signal; InterPro IPR008557, Pfam: PF05787	<i>phoD</i> - tipo <i>Bacillus subtilis</i> Superfamilia MPP (metalofosfatasas) InterPro:IPR029052, Pfam:PF09423, TAT signal
pH óptimo:	7 - 10.5	5 - 10.2
inducción:	baja disponibilidad de fosfato	
Lligandos y grupos prostéticos:	calcio	
	Además del Ca <sup>+2</sup> , iones como el Al <sup>+3</sup> , Mg <sup>+2</sup> , Zn <sup>+2</sup> activan o estimulan su actividad	Además del Ca <sup>+2</sup> , iones como el Co <sup>+2</sup> , Cu <sup>+2</sup> , Al <sup>+3</sup> , Mg <sup>+2</sup> , Zn <sup>+2</sup> , activan o estimulan su actividad

Fig. 11 Información sobre la reacción y las características de las fosfatasas alcalinas bacterianas *phoX* y *phoD* (Fuentes: Conserved Domains, NCBI; Protein Data Bank, BRENDA Database, Pfam, InterPro).



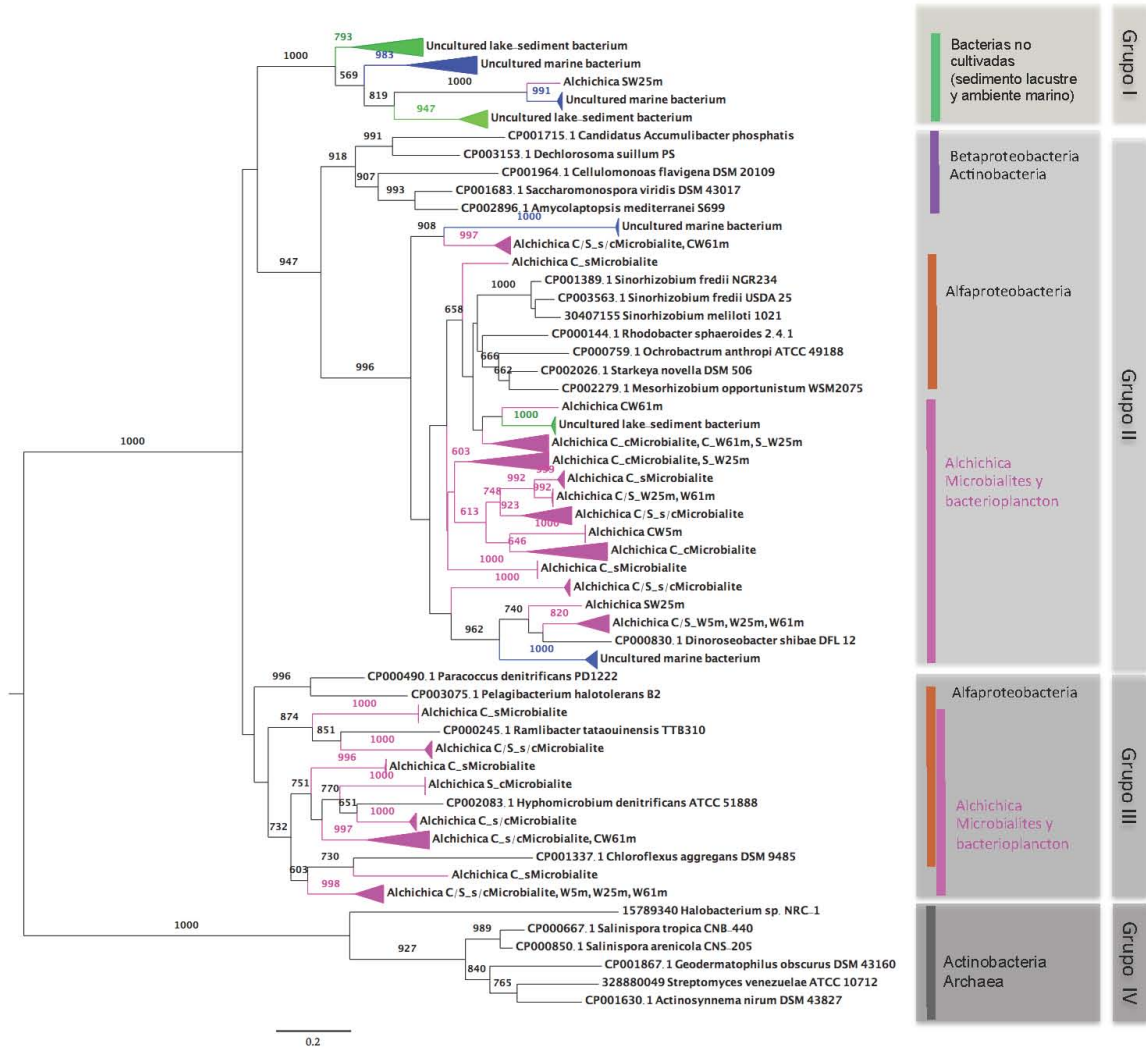


Fig. 12 Topología de máxima verosimilitud de las secuencias parciales *phoX* (aprox. 600 pb). Las secuencias de Alchichica (en magenta) de microbialitos y bacterioplancton muestran afinidad con fosfatasa alcalina *phoX* de genomas de bacterias aisladas (negro), principalmente proteobacterias, y de estudios ambientales: marinas (azul), del lago Taihu, China (verde). Están señalados los valores de bootstrap > 600/1000.

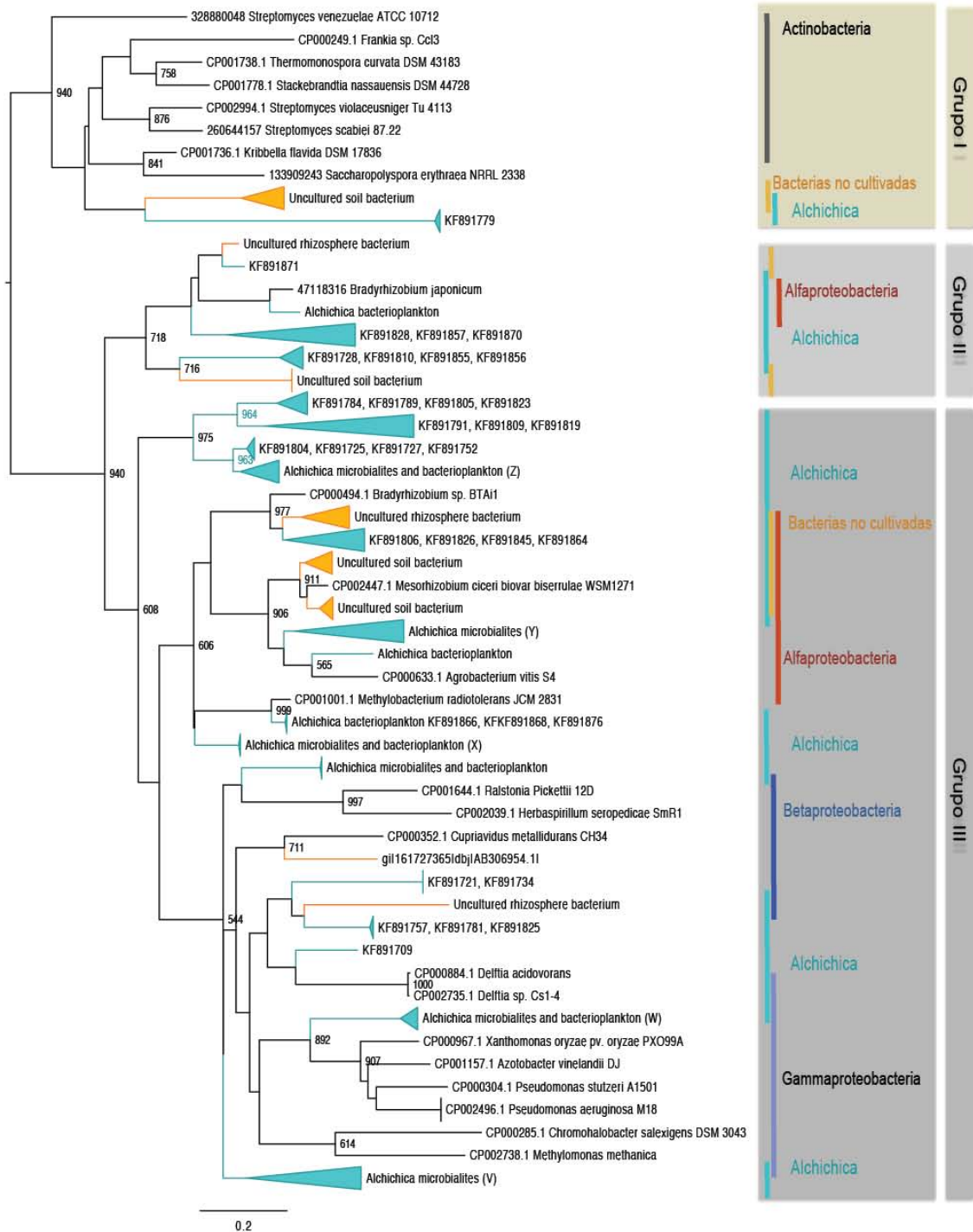


Fig. 13 Topología de máxima verosimilitud de las secuencias parciales *phoD* (aprox. 350 pb). Las secuencias de Alchichica (en turquesa) de microbialitos y bacterioplancton muestran afinidad con fosfatasa alcalina tipo *phoD* de genomas de proteobacterias aisladas (negro) del y de rizósfera (ocre). Están señalados los valores de bootstrap > 600/1000.

#### Afiliación filogenética de las secuencias *phoX*

Los fragmentos obtenidos de aproximadamente 650 pb fueron similares a fosfatasa alcalinas *phoX* de genomas bacterianos, principalmente de proteobacterias y a secuencias parciales de estudios ambientales en ambientes acuáticos (marinos: Mar de los Sargazos y Bahía Chesapeake (Sebastian y Ammerman 2009), y lacustres: lago Taihu, China; Dai. *et al.* 2014 y Dai, direct submission, NCBI).

Un total de 218 secuencias parciales *phoX* fueron obtenidas a partir de los ensamblajes microbianos de Alchichica. En la Fig. 12 se observa el agrupamiento de las secuencias (en una topología resultada de máxima verosimilitud con bootstrap de 1000). Las secuencias *phoX* están distribuidas en cinco conjuntos generales, el Grupo I (arriba) está conformado por secuencias ambientales y una secuencia del metalimnion de Alchichica (25 m). Este conjunto parece el menos explorado ya que no incluyó secuencias de bacterias aisladas. El segundo conjunto hacia abajo (Grupo II) incluyó secuencias genómicas de proteobacterias y actinobacterias pero ninguna de estudios ambientales. El Grupo III agrupa a la mayoría de las secuencias derivadas de este estudio (tanto de microbialitos como de bacterioplancton) con secuencias de fosfatasa de las alfa-proteobacterias: *Sinorhizobium freddi* (CP001389), *Sinorhizobium meliloti* 1021 (gi.30407155), *Rhodobacter sphaeroides* (CP000144), *Ochrobactrum anthropi* (CP000759), *Starkeya novella* (CP002026), *Mesorhizobium opportunistum* (CP002279) and *Dinoroseobacter shibae* DFL (CP0008830.1). Una descripción detallada de las secuencias agrupadas en el árbol se puede consultar en el Anexo 2, así como de las secuencias tipo *phoD*.

El Grupo VI constituye un conjunto más heterogéneo, en el que se agrupan secciones genómicas de APs de las alfa-proteobacterias: *Paracoccus denitrificans* PDI222 (CP000490.1), y de la familia Hyphomicrobiaceae: *Pelagibacterium halotolerans* B2 (CP003075.1) and *Hyphomicrobium denitrificans*. También de la beta-proteobacteria *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 (CP000245) y un representante de *Chloroflexi*, *Chloroflexus aggregans* (CP001337). Este grupo también comprende secuencias de Alchichica, casi en su totalidad de microbialitos. El Grupo 5 (abajo) está conformado exclusivamente por secciones genómicas con clara diferencia de las anteriores, que pertenecen a las actinobacterias *Salinispora arenicola* CNS-205 (CP000850.1), *S. tropica* CNB-440 (CP000667.1), *Geodermatophilus obscurus* DSM 43160 (CP001867.1), *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 (gi.328880049), *Actinosynnema mirum* DSM 43827 (CP001630.1) y a la arquea *Halobacterium sp.* NRC-1 (gi.15789340).

La anotación de las secuencias *PhoX* predichas de aminoácidos correspondieron con la familia de proteínas COG3211: *PhoX* (Predicted phosphatase. General function prediction only; pfam05787:

DUF839); la mayoría fueron reconocidas como proteínas bacterianas de función desconocida (dominio DUF839), que contiene dominios previstos de beta propelas. A través de la plataforma de análisis HMMER se detectaron en las secuencias de Alchichica los residuos E273 and E873, a partir de la secuencia PDB 3ZWU\_A del Protein Data Bank.

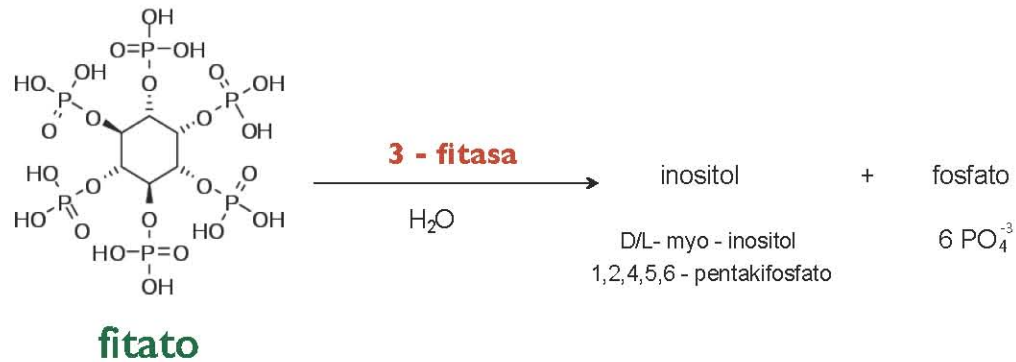
#### Afiliación filogenética de las secuencias tipo *phoD*

Se obtuvieron en este estudio un total de 180 secuencias parciales similares a las de alcalinas fosfatasas tipo *phoD*, también similares a secuencias parciales obtenidas en suelos (Sakurai *et al.* 2008). En el grupo superior (Grupo I, Fig. 13) las secuencias de microbialitos (del periodo de circulación) están agrupadas con secuencias ambientales y con secciones de APs de las actinobacterias: *Streptomyces venezuelae* (gi.328880049), *S. violaceusniger* Tu 4113 (CP002994.1), *S. scabei* 87.22(gi.260644157), *Frankia* sp. Ccl3 (CP000249.1), *Thermomonospora curvata* DSM 43183 (CP001738.1) and *Kribella flavida* DSM 17836 (CP001736.1). En el Grupo II, nuevamente secuencias de Alchichica (mayormente de bacterioplancton) se agrupan con secuencias ambientales y una secuencia de AP de la alfa-proteobacteria *Bradyrhizobium japonicum* (BA00040). El Grupo III incluye la mayoría de las secuencias obtenidas en este estudio, secuencias parciales obtenidas de suelo y APs de proteobacterias, incluyendo las APs de las alfa-proteobacterias *Bradyrhizobium* sp. Btail (CP000494.1), *Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae* WSM1271 (CP002447), *Agrobacterium vitis* S4 (CP000633.1), *Methylobacterium radiotolerans* (CP001001.1); de las beta-proteobacterias *Ralstonia pickettii* 12D (CP001644.1), *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (CP002039.1) and *Cupriavidus metallidurans* CH34 (CP000352.1) y de las gamma-proteobacterias *Delftia acidovorans* (CP000884.1), *Delftia* sp. Cs1-4 (CP002735.1), *Xantomonas oryzae* pv *oryzae* PXO99A (CP000967.1), *Azotobacter vinelandii* DJ (CP001157.1), *Pseudomonas stutzeri* A1501 (CP000304.1) y *P. aeruginosa* M18 (CP002496.1), *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043 (CP000285.1) y *Methylomonas methanica* (CP002738.1). Resulta interesante mencionar que algunas de las secuencias ambientales obtenidas por Sakurai *et al.* (2008) que están presentes en el árbol de la Fig. 13 están anotadas erróneamente como fosfatasas alcalinas *phoA* (genes que no son homólogos). Como parte del análisis se revisó este problema, y se corroboró que pertenecen a APs tipo *phoD*, lo cual se discutirá más adelante (también ver Anexo 2.).

Las secuencias previstas de aminoácidos correspondieron con el sitio de unión a calcio de la AP PhoD de *Bacillus subtilis* (residuos N215 y N216; 2YEQ; Protein Data Bank) los cuales fueron detectados en el 96% de las secuencias obtenidas del bacterioplancton y los microbialitos del lago Alchichica.

Marcador: fitasa *BPP*

Reacción:



### *BPP* (3-fitasa)

Actividad enzimática:	hidrólisis de fosfoésteres
Sustrato:	fitato, ácido fítico (mio-inositol hexakis dihidrogenofosfato)
Tamaño de la proteína:	383 aa
Localización:	Extracelular, periplasma, citoplasma
Familia de proteínas:	Beta propeller phytase InterPro (IPR003431), 3-phytase GO:0016158, Phytase Superfamily pfam02333
pH óptimo:	intervalo amplio entre 3 y 11
Inducción:	fitato (se ha observado cierta inespecificidad)
Ligandos y grupos prostéticos:	Su activación requiere calcio, pero también se ha relacionado con iones como el Co <sup>+2</sup> , Fe <sup>+2</sup> , Hg <sup>+2</sup> , Mn <sup>+2</sup> o Zn <sup>+2</sup> . El Mg <sup>+2</sup> estimula su actividad
Complejos:	El ácido fítico forma complejos con proteínas, almidones e iones metálicos como Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> y Co <sup>2+</sup>

Fig. 14 Información sobre la reacción y las características de las fitasas alcalinas *BPP* bacterianas (Fuentes: Conserved Domains, NCBI; Protein Data Bank, BRENDA Database, Pfam, InterPro).

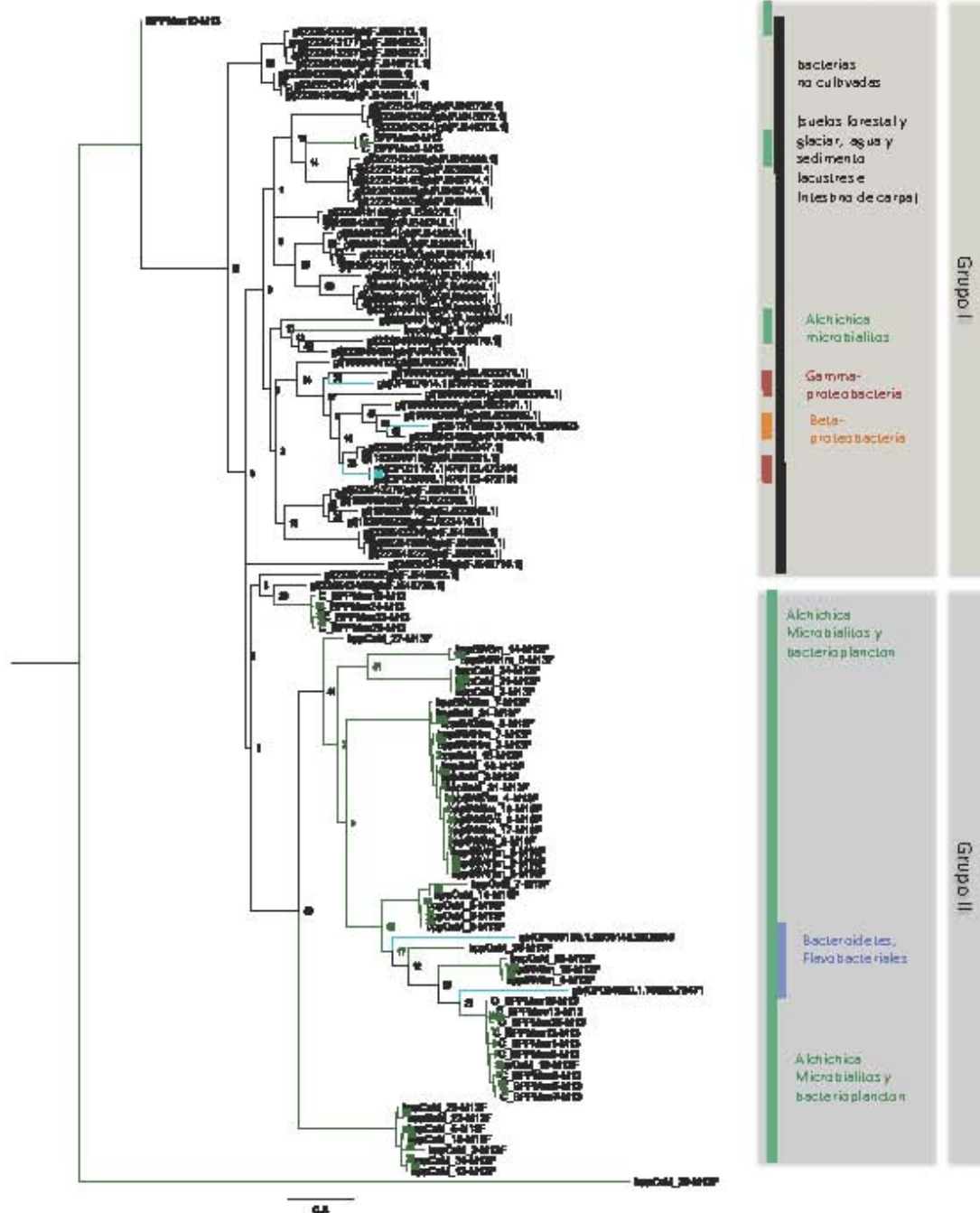


Fig. 15 Topología de máxima verosimilitud de las secuencias parciales BPP (3-nt; aprox. 200 pb). Las secuencias de Alchichica (en verde) de microbialitos y bacterioplankton muestran afinidad con fosfatasa alcalinas tipo BPP de genomas de bacterias aisladas (negro) de los grupos Bacteroidetes y Gammaproteobacteria y de estudios ambientales (suelo, sedimento, sistemas acuático continental e intestino de carpa (en negro)).

#### Afiliación filogenética de las secuencias BPP

Las secuencias parciales de fitasas BPP de Alchichica se afiliaron con secuencias fitasas BPP de estudios ambientales y con secuencias anotadas como 3-fitasa de los grupos Bacteroidetes, Beta, Gammaproteobacteria y Planctomycetes. Las características generales de esta fitasa están resumidas en la Figura 14.

El análisis con máxima verosimilitud generó una topología o árbol que agrupa todas las secuencias (Fig. 15). Las secuencias de Alchichica se separaron claramente de los grupos ambientales estudiados y presentaron más similitud con una BPP de bacterioplancton de un sistema acuático continental (NCBI: FJ539266) y fitasas de genomas de *Bacteroidetes* Flavobacteriales: *Owenweeksia hongkongensis* DSM 17368 (CP003156.1) y *Riemerella anatipestifer* RA-CH-2 (CP004020.1) Para observar la topología con más resolución (secuencias más similares), se excluyeron las secuencias más distantes (CP003364.1, CP003190.1 y CP000680.1) de *Planctomycetes* y *Gammaproteobacteria* de la Fig. 15.

En esta configuración (en una escala más cercana), el árbol comprende secuencias parciales de diferentes ambientes (Grupo 1) y secuencias genómicas de la gamaproteobacteria *Pseudomonas syringae* CC1557 (CP007014) y la betaproteobacteria *Rubrivirax gelatinosus* IL144 (gi/381376528). El segundo conjunto de arriba hacia abajo (Grupo 2) agrupó a la mayoría de las secuencias de Alchichica con las secuencias antes mencionadas de *Bacteroidetes*. A diferencia de los anteriores, el Grupo 3 agrupó secuencias ambientales de Alchichica y de los otros estudios ambientales con fitasas de *Gammaproteobacteria*. Si bien, las secuencias parciales recuperadas no comprenden el péptido señal y por ello no hemos podido señalar el residuo conservado de lisina (Huang et al. 2009), las secuencias parciales sí corresponden el dominio proteico 3-fitasa BPP (Pfam PF02333, InterPro IPR003431).

#### Unidades taxonómicas operacionales (OTUs)

Para aproximarse a analizar la diversidad de cada uno de los marcadores se definieron las unidades taxonómicas operacionales (OTUs = en inglés *Operational Taxonomical Units*) (ver Métodos) o filotipos. Para este análisis es fundamental determinar el corte de similitud/divergencia (*cutoff*). Este se ha definido *in-silico* para el marcador *phoD* (75%, Tan et al. 2013) pero aún no para los marcadores *phoX* y *BPP* para los cuales se utilizó un corte de similitud al 95%, como ha sido sugerido para trabajar con genes funcionales (Iwai et al. 2011).

Diversidad y dinámica intra-sistema de *phoX*, *phoD* y BPP

Los análisis con filotipos de *phoX* bajo un corte de 96% de similitud señalaron que hay filotipos compartidos entre ensamblajes microbianos (microbialitos y bacterioplancton), así como entre estratificación y circulación (Fig. 16). Los grupos que más filotipos compartieron son los microbialitos y de hecho, aunque los grupos se separan con una robustez menor del 50%, se observó que hay una separación más amplia entre ensamblajes (microbialitos y bacterioplancton; Fig. 17) que entre periodos.

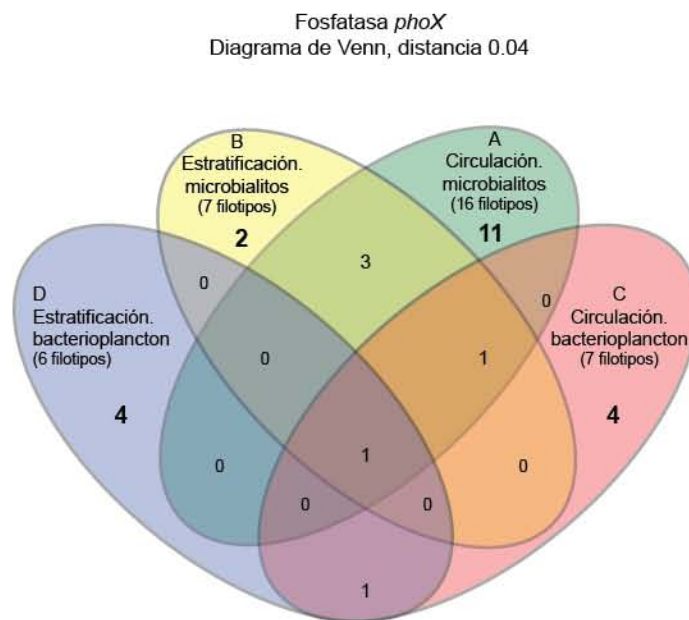


Fig. 16 Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales *phoX* de Alchichica, microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación (96% de similitud).



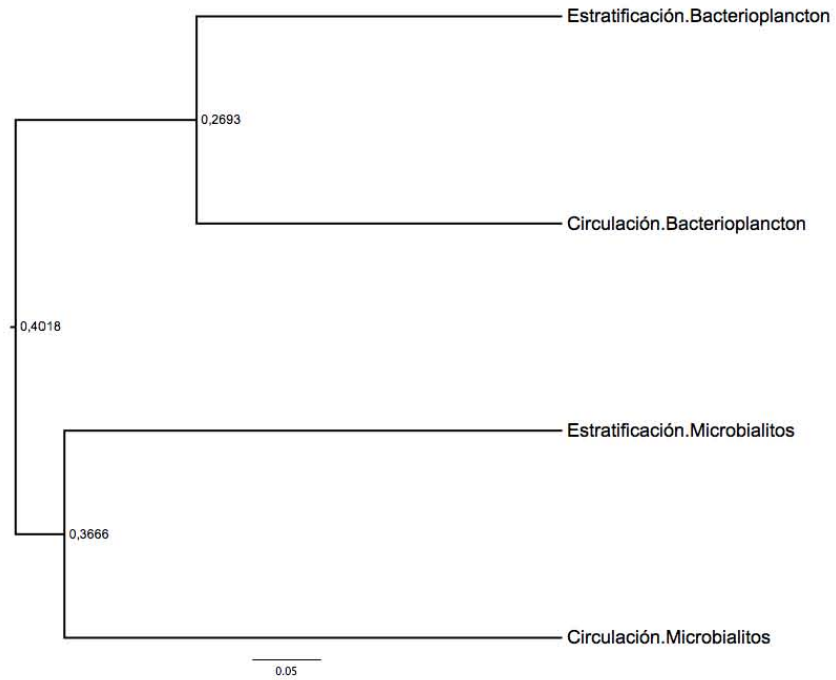


Fig. 17 Divergencia de las secuencias parciales *phoX* de microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación del lago Alchichica (secuencias únicas y a 95% de similitud).

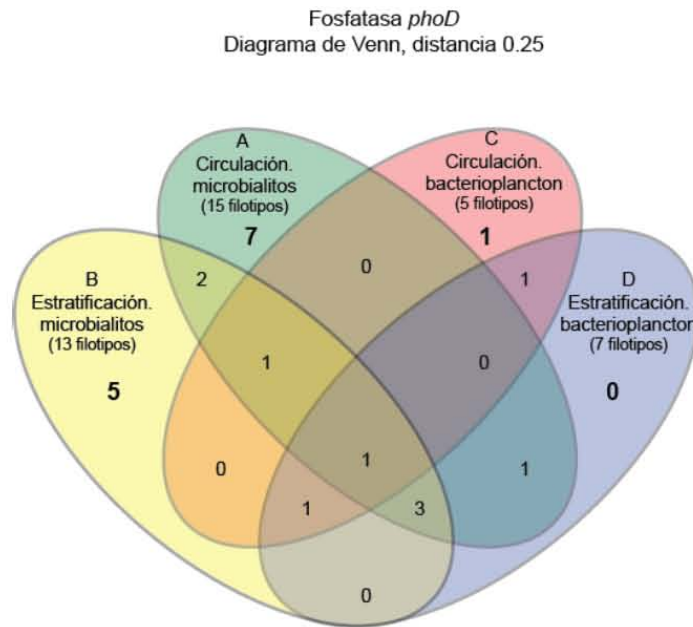


Fig. 18 Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales *phoD* de Alchichica, microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación (75% de similitud).

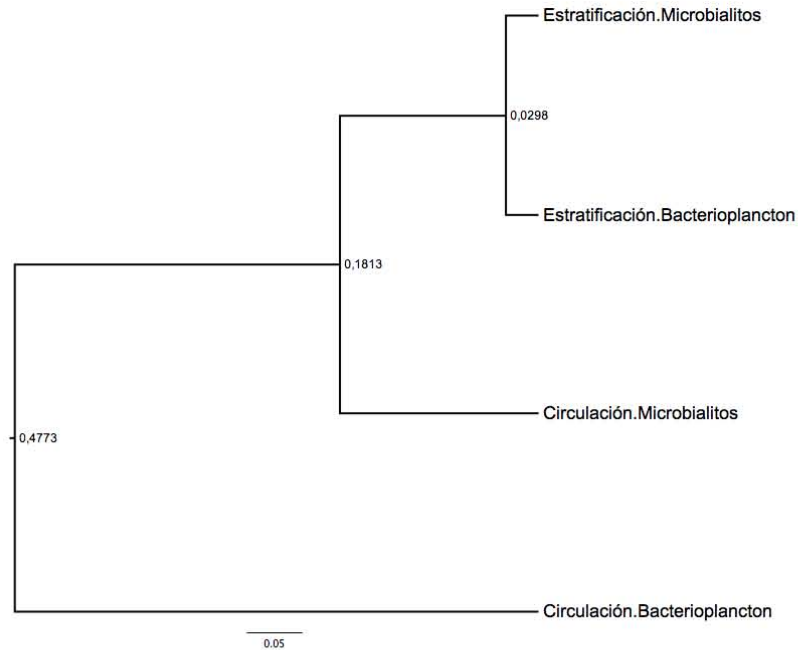


Fig. 19 Divergencia de las secuencias parciales *phoD* de microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación del lago Alchichica (secuencias únicas y a 75% de similitud).

De forma similar a la dinámica de *phoX*, los microbialitos y el bacterioplancton compartieron filotipos *phoD* (Fig. 18), siendo los microbialitos de ambos periodos, los grupos que más filotipos compartieron (7 filotipos). De forma distinta a *phoX*, la divergencia entre grupos separa al grupo de *Circulación.Bacterioplancton* de los otros grupos, siendo el grupo que más filotipos únicos presentó. Cabe mencionar que la separación entre grupos presentó una robustez menor del 50% como en el caso de *phoX* (Fig. 19).

*BPP* Fitasa  
Diagrama de Venn, distancia 0.11

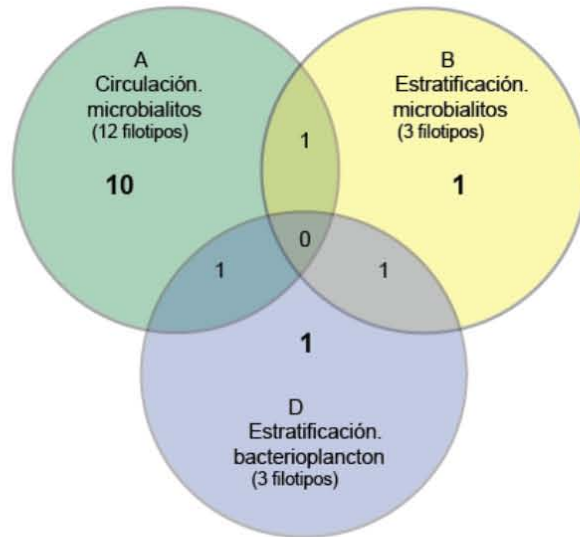


Fig. 20 Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales *BPP* (3-fitasa) de Alchichica, microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación (95% de similitud).

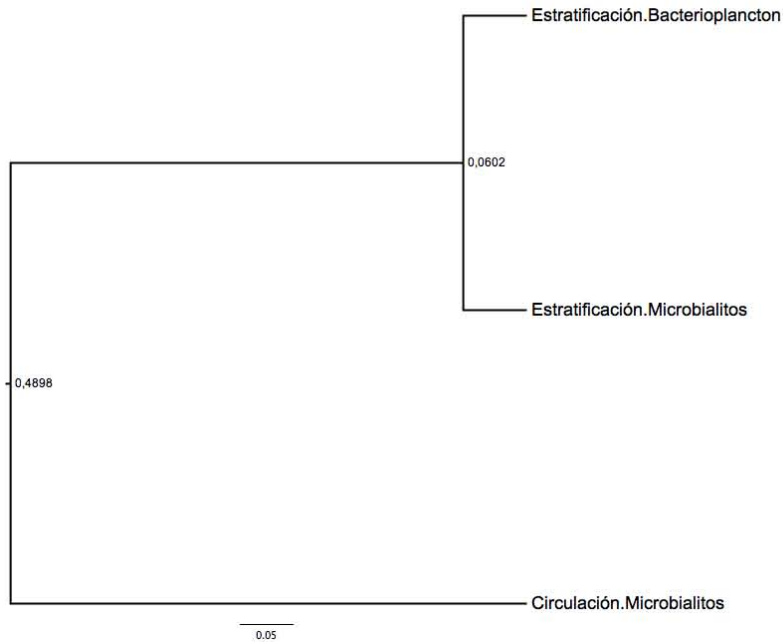


Fig. 21 Divergencia de las secuencias parciales *BPP* (3-fitasa) de microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación del lago Alchichica (secuencias únicas, 95% y 89% de similitud).

A diferencia de las fosfatasa alcalinas, no se encontraron secuencias de BPP en uno de los grupos estudiados (Circulación.Bacterioplancton). La distribución de los filotipos presentó más heterogeneidad que las APs entre grupos (Fig. 20).

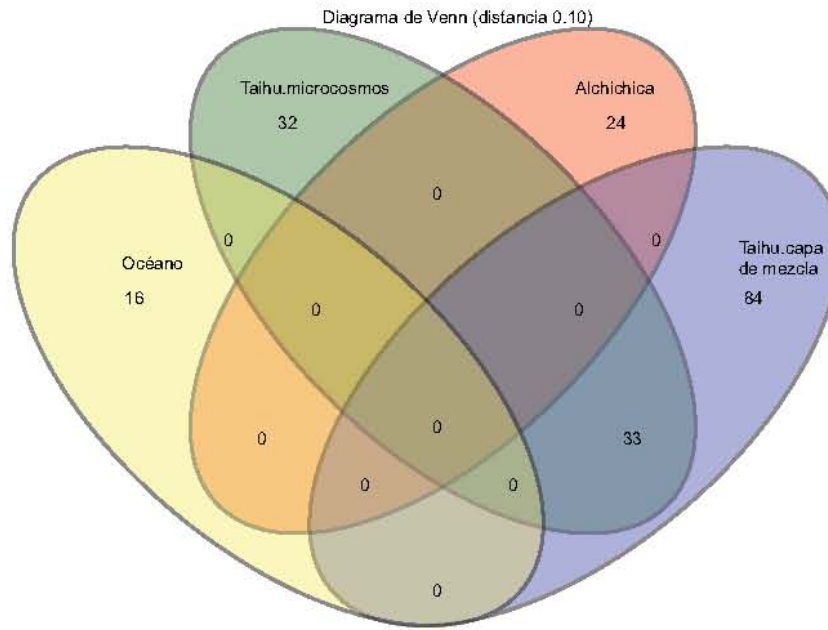
La separación de los grupos fue muy similar al utilizar tanto las secuencias únicas como al 95%, 89% de similitud, en la cual el grupo Circulación.Bacterioplancton se separa casi con el 50% de robustez de los dos tipos de ensamblajes del periodo de circulación (Fig. 21). También es este grupo el que presenta cuatro veces el número de filotipos de los otros grupos.

En números globales, en las secuencias obtenidas de los ensamblajes de Alchichica (Tabla 10), el marcador que más filotipos mostró fue *phoX* (27), seguido por *phoD* (23) y BPP (18). El número de secuencias únicas para cada marcador constituyó 62.5% del total de las secuencias de *phoX*, 52.2% del total de *phoD* y 72.4% del total de BPP. Los filotipos compartidos entre microbialitos y bacterioplancton fueron seis de *phoX*, diez de *phoD* y tres de BPP (lo que equivale al 22%, 43% y 16% del total de filotipos, respectivamente; Figs. Resultados 9, 11 y 13).

Según los resultados de los indicadores de diversidad, la diversidad de filotipos de los tres marcadores estudiados fue mayor para los microbialitos que para el bacterioplancton con excepción del marcador *phoX* en el periodo de estratificación, cuyos índices superan a los de los microbialitos.

#### Diversidad y dinámica inter-sistemas de *phoX* y BPP

Bajo el mismo esquema metodológico (PCR-amplificación *sensu* Sebastian y Ammerman 2009) se han explorado la APs *phoX* en muestras ambientales (Sebastian y Ammerman 2009, Dai *et al.* 2014, Dai direct submission, GenBank). Cabe mencionar que para su análisis conjunto, partimos de un alineamiento de aproximadamente 180 aminoácidos, más corto que el usado al interior de las secuencias de Alchichica. La Fig. 22 resume la interacción de los filotipos (90% de similitud) recuperados en cada caso, la afiliación de las secuencias de estos sistemas y de Alchichica se observó en la Fig. 12. Se observó que con un corte de 95% y hasta 90% de similitud, los conjuntos ambientales no compartieron filotipos (solo en el caso de los grupos del lago Taihu, los cuales comprenden agua mezclada, sedimento y un experimento de microcosmos en el lago Taihu, China). La topología de divergencia separa de forma correspondiente a los grupos con una robustez del 50%.



Mg:Ca Alchichica > Mar de los Sargazos > Lago Taihu

Fig 22. Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales *phoX* de estudios ambientales (NCBI, enero de 2013).

En la parte inferior se señala el gradiente de la proporción Mg:Ca entre ambientes (90% de similitud).

Nota: las secuencias ambientales fueron producidas bajo la misma metodología que el presente estudio, las marinas fueron reportadas por Sebastian y Ammerman 2009, las de la capa mezclada del lago Taihu por Dai *et al.* 2013 y las del experimento de mesocosmos a través de un envío directo a GenBank (Dai, NCBI direct submission).

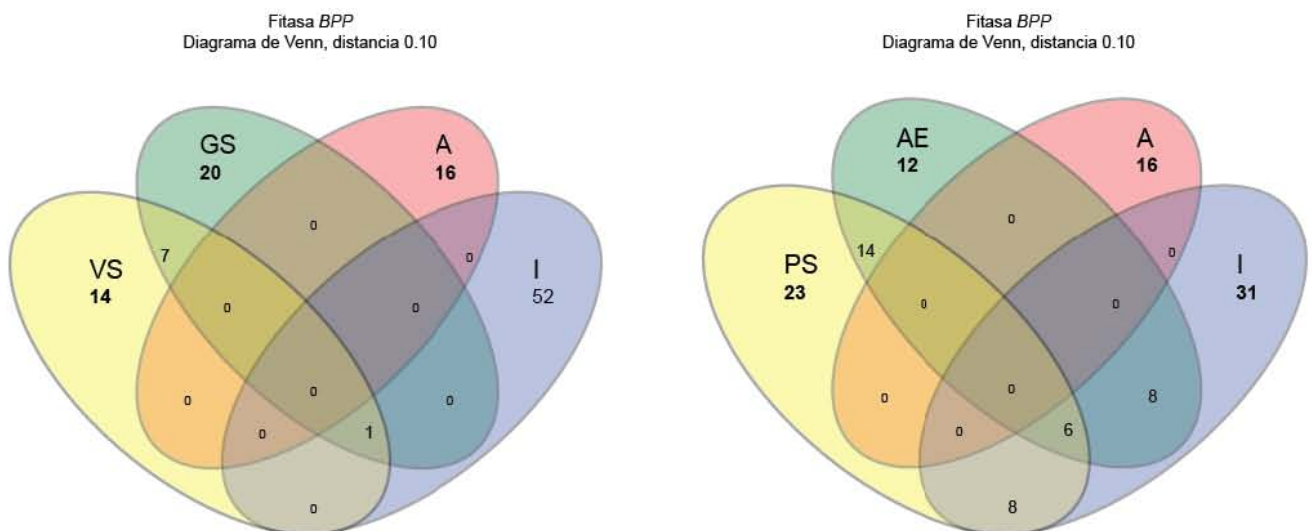


Fig. 23 Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales BPP (3-fitasa) de estudios ambientales (NCBI, enero de 2013): suelo forestal (FS), suelo vegetal o agrícola (VS), suelo glaciar (GS), sedimentos de un sistema acuático continental (PS), ambiente acuático continental (AE), intestino de carpa (I) y lago Alchichica (A), (90% de similitud).

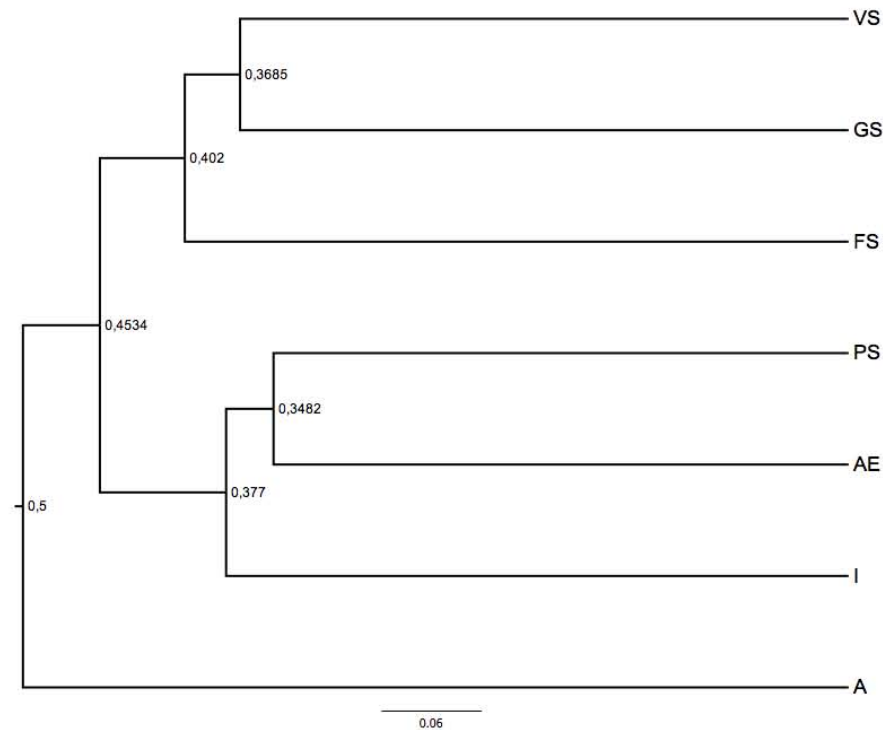


Fig. 24 Divergencia de las secuencias parciales BPP (3-fitasa) de estudios ambientales (NCBI, octubre 2014). Secuencias de suelo forestal (FS), suelo vegetal o agrícola (VS), suelo glaciar (GS), sedimentos de un sistema acuático continental (PS), ambiente acuático continental (AE), intestino de carpa (I) y del lago Alchichica (A). (90% de similitud).

Nota: las secuencias ambientales fueron producidas bajo la misma metodología que el presente estudio (ver Huang *et al.* 2009).

A un corte de similitud de 95 y 90% se observa que en general son pocos los filotipos de BPP compartidos entre grupos ambientales (Fig. 23) donde los que más comparten son los de agua y sedimento de un sistema acuático continental (Huang *et al.* 2009). Entre los sistemas estudiados, el sistema Alchichica es el único que no compartió filotipos con el resto de los sistemas.

La afiliación entre los filotipos de BPP de los estudios ambientales mostró que los grupos se separaban con una robustez cercana al 40% en general, siendo el grupo de Alchichica el que se separó con más robustez (casi del 50%) en cortes al 95 y al 90% de similitud (Fig. 24). La topología a partir de secuencias únicas (no mostrada) sí proporcionó una separación mayor, donde casi todos los grupos se separan con una robustez aproximada del 50%.

Tabla 10. Fosfatasa alcalinas bacterianas *phoX*, *phoD* y fitasa *BPP* de los ensamblajes microbianos analizados en el presente estudio, así como de diferentes estudios ambientales (GenBank). Se señalan las características de los conjuntos de secuencias parciales de cada marcador, así como indicadores de su diversidad

Sistema Ensamble bacteriano Periodo	<i>phoD</i>				<i>phoX</i>				<i>BPP</i>							
	No. seqs. obtenidas	OTUs <sup>1</sup>	Chao	Shannon (H')	Cobertura (%)	No. seqs. obtenidas	OTUs <sup>2</sup>	Chao	Shannon (H')	Cobertura (%)	No. seqs. obtenidas	OTUs <sup>2</sup>	Chao	Shannon (H')	Cobertura (%)	
<b>Lago Alchichica<sup>a</sup></b>																
<b>microbialitos</b>																
Circulación		15	20.0	2.22	0.92		16	30.0	2.28	88	35	15	33.0	2.35	74	
Estratificación		13	20.5	1.68	0.92		7	7.0	1.67	100	7	3	4.0	0.80	71	
<b>bacterioplancton</b>																
Circulación		5	8.0	1.56	0.33		7	7.3	1.15	97	-	-	-	-	-	
Estratificación		7	7.3	1.44	0.93		6	16.0	1.04	72	16	3	3.0	0.74	100	
<b>Total</b>		<b>180</b>	<b>23**</b>	<b>68</b>	<b>2.16</b>	<b>0.94</b>	<b>192</b>	<b>27**</b>	<b>53.0</b>	<b>2.36</b>	<b>93</b>	<b>58</b>	<b>18**</b>	<b>25.0</b>	<b>2.40</b>	<b>86</b>
<b>Mar de los Sargazos y Bahía Chesapeake<sup>b</sup></b>																
bacterioplancton	-	-	-	-	-	-	57	20	28.2	2.68	85	-	-	-	-	
<b>Lago Taihu</b>																
capa mezclada <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	625	146	243.0	4.21	90	-	-	-	-	
microcosmos <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	1183	85	195.0	2.92	93	-	-	-	-	
<b>China<sup>e</sup></b>																
Suelo agrícola (VS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	127.0	3.08	9	
Suelo forestal (FS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	820.0	3.69	<1	
Suelo glaciario (GS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	117.8	3.37	28	
Sistema acuático continental (AE)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	41	431.0	3.70	5	
Sedimento de aguas continentales (PS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53	716.0	3.96	4	
Intestino de carpa ( )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	329.2	4.01	58	

<sup>1</sup> *phoD* OTUs corte=0.25 *sensu* Tan *et al.*, 2013; <sup>2</sup> *phoX* OTUs corte=0.05 *sensu* Iwai *et al.*, 2011; \*\*OTUs no compartidos entre ensamblajes bacterianos o periodos

<sup>a</sup> Este estudio. Lago Alchichichica ensamblajes: Microbialitos= morfotipos esponjoso y columnar; Bacterioplancton=profundidades 5 m, 25 m y 61 m

<sup>b</sup> Sebastian & Ammerman, 2009. Mar de los Sargazos y Bahía Chesapeake: capa mezclada (profundidad=40 m)

<sup>c</sup> Dai *et al.*, 2014. Lago Taihu ensamblajes: agua mezclada de un gradiente espacial

<sup>d</sup> Dai, no publicado, envío directo a GenBank. Lago Taihu ensamblaje: experimento de microcosmos

Solo en el caso de los marcadores *phoX* y *BPP* fue posible realizar una comparación entre diferentes estudios ambientales debido a que éstos fueron realizados bajo la misma metodología que el presente estudio y las bases de secuencias parciales están reportadas en el GenBank. Los estimadores de diversidad Chao y Shannon ( $H'$ ), en general mostraron resultados útiles para comparar dichos sistemas.

## Transcriptómica dirigida

Patrones de expresión de *phoX*, *phoD* y BPP en el ciclo diurno

Cabe recordar que el trabajo de expresión corresponde exclusivamente al microbialito esponjoso. Las secuencias de los transcritos en general fueron escasas en medio de un gran número de transcritos recuperados cuya afiliación frecuente era de fragmentos de 16S y 23S de cianobacterias y de otros grupos bacterianos. Con un escrutinio cuidadoso se seleccionaron aquellas secuencias con significado a través de diferentes herramientas bioinformáticas para cada marcador. Los resultados del trabajo de expresión de los marcadores estudiados están comprendidos en la Tabla 11, así como su tamaño, su patrón de expresión en el ciclo diurno, la afiliación más cercana de cada una de las secuencias así como las plataformas de búsqueda y las bases de datos para determinar su identidad.

Tabla 11. Afiliación filogenética más cercana de los transcritos de los marcadores *PhoD*, *PhoX* y 3-fitasa BPP del componente bacteriano de los microbialitos esponjosos del lago Alchichica

Marcador	Expresión			Afiliación filogenética más cercana	E-value	Bases de datos	
Nombre/No. acceso	Temporada						
<b>PhoX</b>							
phoXcDNA_S6h_29	06:00	E	24	GenBank CP000390.1 <i>Chelativorans</i> sp. BNC1, TAT pathway signal, DUF 839	9.00E-03	BLASTn	NCBI
phoXcDNA_S6h_32	06:00	E	44	GenBank JQ029668.1 Uncultured bacterium clone 3F-28-27 PhoX (phoX) gene, water Xukou Bay	3.90E-01	BLASTn	NCBI
phoXcDNA_S12h_20	012:00	E	24	<i>Jannaschia</i> sp. GenBank CP000264.1:1885825-1887702, DUF 839	4.8	BLASTn	NCBI
phoXcDNA_S12h_22	012:00	E	58	GenBank KF891576.1 Uncultured bacterium clone alkaline phosphatase (phoX) Alchichica, KC141372 m	0.39	BLASTn	NCBI
phoXcDNA_S12h_23	012:00	E	25	GenBank KC141471.1 Uncultured bacterium clone SC-3-37 alkaline phosphatase (phoX)lake Taihu, micr	0.39	BLASTn	NCBI
<b>PhoD</b>							
alpsSsMcDNA6h_2	06:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	6.00E-09	PDB	HMMER
alpsSsMcDNA6h_003	06:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	5.20E-08	PDB	HMMER
C_alpsSsMcDNA6h_7	06:00	E	369	LOGIM8_PSEST, Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D (Precursor), <i>Pseudomonas stutzeri</i> RCH2	1.40E-76	PDB	HMMER
alpsSsMcDNA6h_10	06:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	1.80E-09	PDB	HMMER
alpsSsMcDNA6h_14	06:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	3.00E-12	PDB	HMMER
alpsSsMcDNA6h_16	06:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	4.60E-10	PDB	HMMER
C_alpsSsMcDNA6h_19	06:00	E	363	J31S3_9BRAD, Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D (Precursor), <i>Bradyrhizobium</i> sp. YR681	4.2E-72	PDB	HMMER
alpsSsMcDNA12h_5	012:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	6.90E-12	PDB	HMMER
alpsSsMcDNA12h_6	012:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	1.1E-08	PDB	HMMER
alpsSsMcDNA12h_007	012:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	1.70E-11	PDB	HMMER
alpsSsMcDNA12h_11	012:00	E	369	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	1.10E-08	PDB	HMMER
alpsSsMcDNAOh_12	024:00	E	357	2yeq_A, Alkaline phosphatase D, <i>Bacillus subtilis</i>	3.60E-09	PDB	HMMER
<b>BPP (3-fitasa)</b>							
bppSsMcDNA18h_1	018:00	E	93	142000032 hypothetical protein GOS_3222580, partial [marine metagenome]. GenBank ECU73193.1	1.80E-03	env NR	HMMER
bppSsMcDNA18h_3	018:00	E	93	142000032 hypothetical protein GOS_3222580, partial [marine metagenome]. GenBank ECU73193.1	1.80E-03	env NR	HMMER
bppSsMcDNA18h_4	018:00	E	93	142000032 hypothetical protein GOS_3222580, partial [marine metagenome]. GenBan: ECU73193.1	1.60E-03	env NR	HMMER
bppSsMcDNAOh_2	018:00	E	114	hypothetical protein [ <i>Scytonema hotmanni</i> ], NCBI Reference Sequence: WP_017743188.1	7.00E-05	NR	HMMER
		E		Uniprot B9VHQ3_9BACT Beta-propeller phytase (Fragment) uncultured bacterium	7.70E-02	Pfamseq	HMMER
bppSsMcDNAOh_3	024:00	E	118	hypothetical protein [ <i>Scytonema hotmanni</i> ], NCBI Reference Sequence: WP_017743188.1	6.30E-05	NR	HMMER
		E		Pfam B9VHQ3_9BACTBeta-propeller phytase (Fragment) uncultured bacterium	6.70E-02	Pfam	HMMER
bppSsMcDNAOh_6	024:00	E	63	138898707 hypothetical protein GOS_4294045, partial [marine metagenome] GenBank ECC33673.1	1.20E-01	env NR	HMMER
bppSsMcDNAOh_15	024:00	E	604	135259640 hypothetical protein GOS_9425901	4.50E-02	env NR	HMMER
bppSsMcDNAOh_16	024:00	E	57	E7Q086_STRDY Exported protein <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> ATCC 27957	4.30E-02	env NR	HMMER
bppSsMcDNAOh_17	024:00	E	114	unnamed protein product, partial [marine sediment metagenome] marine sediment GenBank GAF67605.	1.50E-02	env NR	HMMER
bppSsMcDNAOh_18	024:00	E	54	141444315, hypothetical protein GOS_3465902, partial [marine metagenome]. GenBank ECR87230.1	2.20E-03	env NR	HMMER

\* La afiliación filogenética más cercana corresponde a la búsqueda realizada en pHMMER considerando las bases de datos 1) PDB y 2) Environmental seqs. Como templatado se utilizó la secuencia predicha de amino ácidos.



Los transcritos de PhoX fueron los menos representados entre los marcadores elegidos, un total de cinco secuencias mostraron afiliación con secuencias parciales de la fosfatasa alcalina *phoX* de estudios ambientales (secuencias de microbialitos y de la columna de agua de Alchichica; y secuencias tanto de agua mezclada como del experimento de microcosmos en el Lago Taihu). En contraste con las secuencias *phoX* detectadas en el ADN total, los transcritos obtenidos mostraron una longitud bastante menor al fragmento amplificado con el juego de oligos degenerados (Sebastian y Ammerman 2009), en promedio fue de 26 pb. En la mayoría de los casos, el Blastn relacionó estas secuencias con fragmentos de dominio DUF839, tal como lo hiciera con la mayoría de las secuencias de *phoX* en ADN, así como fragmentos de secuencias parciales de *phoX* de estudios ambientales, proteínas con la señal TAT (Twin-arginine translocation pathway) y con secuencias anotadas como hipotéticas o proteínas putativas.

Los transcritos relacionadas con PhoX (DUF389, Pfam) dado su pequeño tamaño, no fueron alineados con el resto de las secuencias parciales *phoX* obtenidas en los ensamblajes de Alchichica. En cambio, las secuencias relacionadas con *phoD* presentaron un tamaño adecuado para ello, posibilitando la visualización de los transcritos con las secuencias genómicas de Alchichica en un árbol (topología de máxima verosimilitud, Fig. 25).

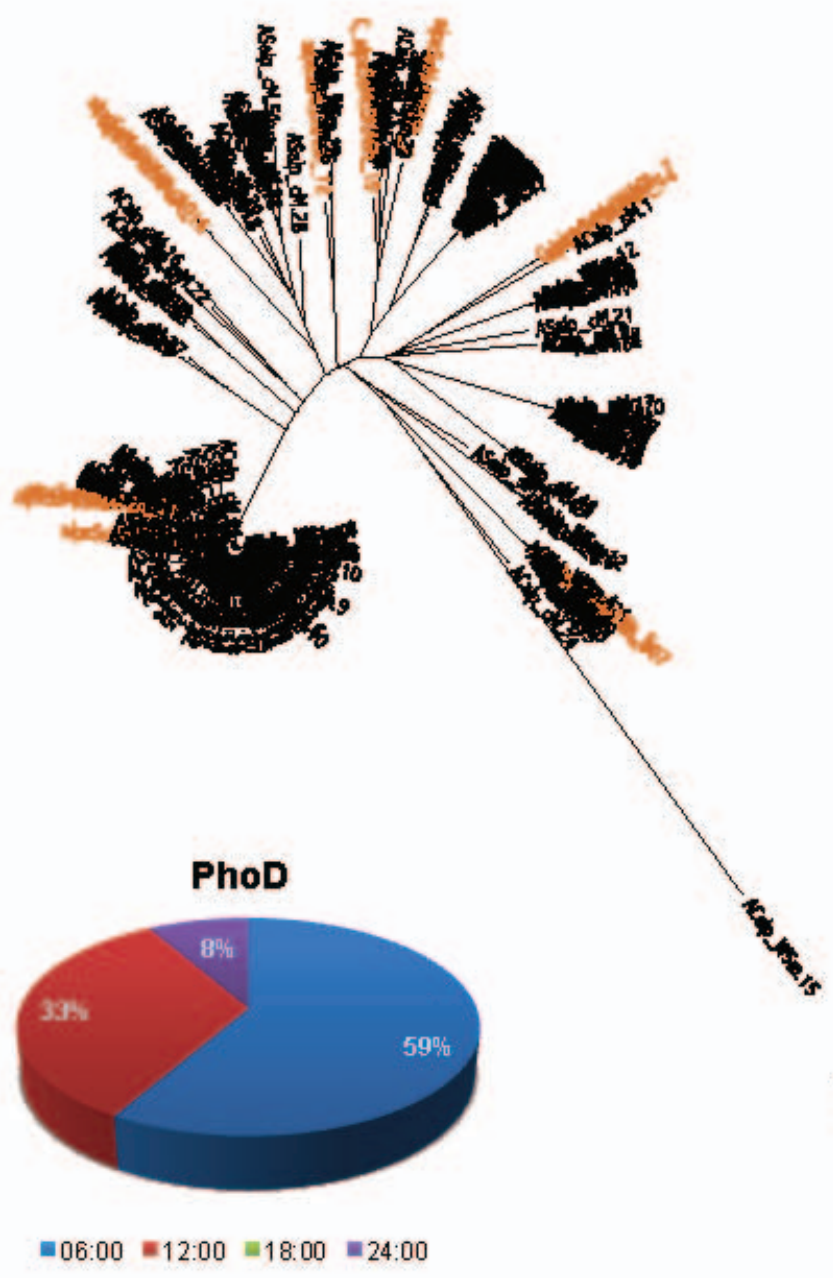


Fig 25 Comunidad potencial vs. comunidad funcional. Secuencias parciales PhoD de Aldrichica en ADN metagenómico (negro) y transcritos en ARN total (anaranjados). Topología BioNeighbor Joining de 200 secuencias de aprox 350 pb. Distribución porcentual de la expresión del marcador PhoD en el ciclo diurno (abajo).

La fosfatasa alcalina PhoD mostró expresión diferencial en el ciclo diurno, más representada hacia el amanecer (06:00 h) y el mediodía (12:00 h), a la medianoche (24 h) se recuperó un solo transcrito. En cambio ninguno fue recuperado al atardecer (18:00 h).

Los transcritos de la fitasa BPP presentaron un tamaño más pequeño que las secuencias genómicas de tal forma que no fue posible generar un alineamiento o un árbol como en el caso de los transcritos de PhoD.

El patrón de expresión en el ciclo diurno fue diferente entre los marcadores elegidos (Fig. 26), casi totalmente matutino en el caso de las APs PhoX y PhoD (con excepción de uno solo de los transcritos de PhoD recuperado a la medianoche).

La expresión de la fitasa BPP, en cambio fue vespertina-nocturna en su totalidad, la mayoría de estos transcritos correspondieron a la medianoche.

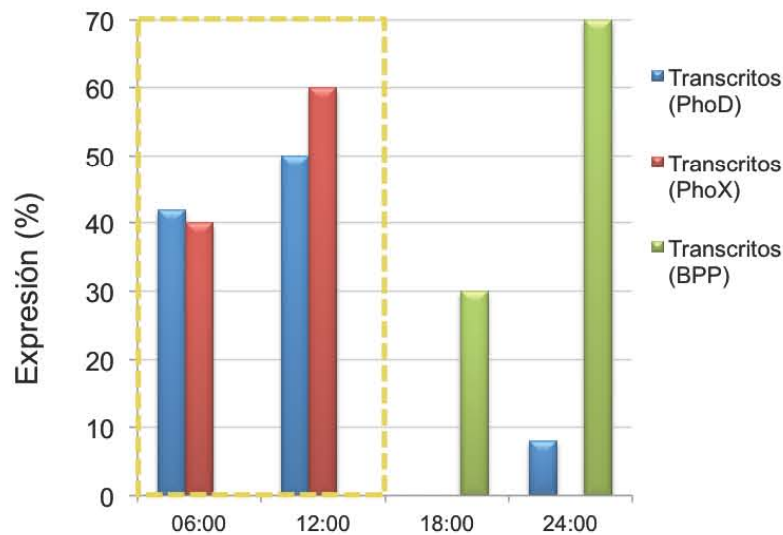


Fig. 26 Patrón de expresión en el ciclo diurno (distribución porcentual) de los marcadores PhoD, PhoX y 3-fitasa BPP.

## Discusión

### *Hidrodinámica del sistema y estado trófico*

La columna de agua presenta una estratificación que puede dividirse en tres etapas en el periodo anual en las que se observa un desplazamiento gradual de la termoclina (*sensu* Hernández-Avilés 2010): estratificación *temprana* (de abril a junio, cuando la termoclina se encuentra entre 9 – 23 m), *bien establecida* (de julio a septiembre, con una termoclina bien definida entre 14 y 30 m) y *tardía* (de octubre a diciembre, cuando la termoclina comienza a debilitarse y a profundizarse hasta desaparecer entre los 20 y 39 m). La mezcla invernal homogeneiza la totalidad de la columna de agua entre la segunda mitad de enero y marzo (ver Alcocer *et al.* 2000).

El patrón de circulación superficial y el de la onda interna (ver Filonov *et al.* 2006) hacen de la capa superficial un sistema muy dinámico. La influencia del viento no es homogénea en el ciclo anual, es más intensa en el invierno seco que en el verano húmedo.

Por su parte, las estructuras masivas de los microbialitos (bastante heterogéneas entre sí), se extienden en el perímetro del lago; la zona expuesta (o no sumergida) de estas estructuras es testimonio del abatimiento del espejo de agua, ya que este proceso gradual ha conformado una zona litoral donde están presentes múltiples zonas someras de baja energía (la temperatura, la evaporación y el tiempo de residencia del agua en estas zonas es potencialmente mayor que en la zona pelágica). En el perímetro norte del lago ocurren más frecuentemente estas zonas donde el sedimento es muy fino (en estas condiciones encontramos a los microbialitos de tipo esponjoso). En la zona sur-SO el oleaje es más intenso, el sedimento más grueso en general y encontramos los dos tipos de microbialitos (esponjoso y columnar) descritos en la literatura. Estos dos tipos de microbialitos difieren en morfología, composición microbiana (Tavera y Komarek 1996, Centeno *et al.* 2012), mineralogía, textura, edad (Kazmierczak *et al.* 2011). Por lo anterior, en cierta forma, podríamos relacionar la heterogeneidad de la zona litoral con el régimen de viento dominante (desde el N).

Se ha explorado ampliamente la hidrología, la fisicoquímica y la estructura comunitaria de la columna de agua del lago Alchichica en torno a entender el estado trófico del sistema, el cual ha sido caracterizado como oligo a oligo-mesotrófico (ver Alcocer *et al.* 2007), por ejemplo, a pesar de que los nutrientes totales son escasos (ver Ardiles *et al.* 2012), la concentración de clorofila-*a* y el

picoplancton total (alrededor de  $2$  a  $2.7 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) son un poco más altos a los reportados para lagos oligotróficos (Macek *et al.* 2009). En la escala anual ha presentado dos momentos de intensa producción primaria (un florecimiento de diatomeas asociado a la circulación invernal y otro de cianobacterias al inicio de la estratificación (ver Macek *et al.* 2009, Ardiles *et al.* 2012) cuya intensidad parece obedecer patrones temporales más amplios (bianuales en el caso del florecimiento de diatomeas, Alcocer no publicado). También se ha supuesto que el sistema puede ser un exportador neto de carbono a los sedimentos (Ardiles *et al.* 2012, Alcocer *et al.* 2014) y está en proceso la exploración de su balance metabólico neto.

La zona litoral de Alchichica presenta características de ser un sistema de alta producción y diversidad. Alcocer y colaboradores (1998) estudiaron esta zona y encontraron que es el hábitat de al menos 44 macroinvertebrados bénticos; en la caracterización fisicoquímica del sedimento (arena y grava) y de la fina capa lodosa que lo cubre, estimaron que el porcentaje de materia orgánica (MO) varía entre 2.8 y 8.4 %. La variable cobertura de algas bénticas y macrófitas sumergidas en ocasiones alcanzan cobertura de 25 y 100%, respectivamente. La comunidad microbiana asociada a estos microbialitos está fijando activamente N (Beltrán *et al.* 2012) y aunque no son conocidas sus tasas de fijación de C, los microbialitos son conocidos por ser sistemas muy productivos (ver Centeno *et al.* 2012).

Macek *et al.* (2009) encontraron que la dinámica del picoplancton total (PPT) sigue un patrón regular ligado al ciclo hidrodinámico del sistema. La mayor concentración ocurre durante el periodo de circulación y estratificación temprana (enero a marzo), mientras que durante la estratificación tardía se observaron las concentraciones más bajas. Los patrones temporales y espaciales del PPT han sido relacionados con la disponibilidad de nutrientes (Hernández-Avilés *et al.* 2010).

Resulta muy complejo establecer la interacción entre la zona litoral con la pelágica, particularmente en lo que se refiere a flujos de materia e interacciones tróficas (Filonov *et al.* 2006). El estudio de Escobar Briones *et al.* (1998) señala que hay diferencias significativas entre las firmas de isótopos estables de las comunidades pelágicas y litorales del lago Alchichica. Si bien, lo anterior sugiere la compartimentalización de los recursos entre las dos zonas, el hallazgo de especies de diatomeas (de la zona litoral) en las trampas de sedimentación situadas en el centro del lago (Ardiles *et al.* 2012) es evidencia de su posible interacción. La acción del viento sobre la superficie del lago y los efectos de la onda interna pueden jugar un papel clave en este proceso.

Para la construcción del balance de P en el sistema Alchichica compilé información de diferentes características y fuentes, la diversidad de los datos, así como su relativa importancia en las diferentes partes del ciclo del P me permiten reconocer la importancia de las condiciones físicas y

químicas de los lagos como condicionantes de los ciclos biogeoquímicos de los elementos principales para la vida.

Diversos estudios señalan que el N puede ser el nutriente que limite con mayor probabilidad la producción en Alchichica (Ramos-Higuera *et al.* 2008), adicionalmente se ha señalado que en ciertos momentos, la disponibilidad de silicio (Si) puede ser determinante para el desarrollo de diatomeas (Ardiles *et al.* 2012). Sin embargo, también se ha estimado y propuesto que a lo largo del ciclo anual hay una limitación sucesiva por nutrientes (nitrógeno, fósforo y silicio; ver Ramírez-Olvera *et al.* 2009 y Ardiles *et al.* 2012). Las relaciones estequiométricas C:N:P sugieren que el N y el P son limitantes de la producción en los microbialitos, sin embargo, pocos estudios comienzan a explorar aún estas cuestiones en consorcios como los microbialitos o tapetes microbianos (Fernández-Valiente *et al.* 2001).

### *Condición del fósforo en el sistema*

El cociente *Masa de P: Flujo de P* hacia los sedimentos indica el tiempo de residencia del P, el cual es relativamente corto en el sistema Alchichica. Se puede entender esta proporción de la siguiente forma: cada partícula de P vuelve a incorporarse a biomasa de diatomeas en cuatro meses, o bien, cada año se exporta a los sedimentos 3 veces la masa total de P del lago. Por lo tanto, en la escala anual, la producción autóctona sería mayor que la alóctona. Esta proporción puede ser distinta entre los periodos circulación/estratificación; probablemente durante la mezcla invernal (ambiente seco y polvoso) la producción alimentada por fuentes alóctonas sea relativamente más abundante (rápida producción y sedimentación) al resto del año. Ya que las fuentes alóctonas equivalen a una cuarta parte del P que se exporta a los sedimentos, el resto proviene de nutrientes “regenerados” o reciclados en el lago. Por un lado esto puede significar que el reciclaje del fósforo al interior del sistema es el principal mecanismo que sustenta este nutriente a la comunidad biológica del lago a lo largo del ciclo anual.

El balance de P realizado indica que en el sistema Alchichica hay una intensa regeneración y reuso del fósforo. A continuación se señalan los mecanismos que considero más importantes para que esto ocurra: 1. La *mezcla invernal*, que homogeneiza los nutrientes en la columna de agua, incorporando a la zona eufótica nutrientes que se encontraban en el hipolimnion. 2. La *liberación de*

*P* desde el hipolimnion y/o los sedimentos que ocasiona que la concentración del *P* aumente en el hipolimnion con el avance de la estratificación. 3. El *intercambio vertical* de agua del meso e hipolimnion hacia la capa mezclada por efecto de los movimientos de la termoclina, promovidos por la influencia del viento. Filonov y col. (2006) señalaron que el viento regional ejerce una fuerte influencia en la estructura vertical del lago provocando un hundimiento de la termoclina de aproximadamente 3 m en la zona sur y levantamiento de las isoterms en la zona norte; la termoclina se restablece durante la noche. Considero que este proceso puede ser fundamental para el reciclaje de los nutrientes exportados desde la zona eufótica. Por lo tanto recalco que la alteración potencial de este régimen de viento en un escenario de cambio climático podrían tener un efecto directo en el reciclaje de los nutrientes en el sistema.

Por otro lado, un rubro que podría ser muy relevante es la *exportación* potencial de *P* (disuelto y particulado) desde algunas partes de *la zona litoral*, donde hay zonas pobladas por macrófitas, diatomeas epibénticas y microbialitos. De hecho, Ardiles (2011) explora esta idea al encontrar diatomeas que habitan la zona litoral en las trampas de sedimentación colocadas en el centro del lago. La influencia del viento en el sistema hace que la exportación de *P* y otros nutrientes desde la zona litoral sea muy probable. El trabajo de Filonov *et al.* (2006) hace evidente que el epilimnion de Alchichica es un sistema muy dinámico, ya que la influencia del viento crea dos celdas de circulación superficial que potencialmente transportan materia (nutrientes) desde la zona litoral.

#### *Potencial para remineralizar el POD a través de fosfatasas y fitasas alcalinas. Dinámica intra-sistema*

Si bien, hay un paralelismo funcional entre los ensamblajes microbialitos y bacterioplancton, los resultados indican que el potencial para transformar el POD con las estrategias estudiadas es mayor en los microbialitos y que en general, la columna de agua estratificada, en su conjunto (epi, meta e hipolimnion) comparte más filotipos de *phoX*, *phoD* y *BPP* con los microbialitos, que la columna de agua durante la circulación del lago. La estructura de los ensamblajes no definió la presencia pero sí la abundancia de *phoX*, *phoD* y *BPP*.

En general, las comunidades microbianas estudiadas mostraron un vasto potencial para remineralizar el POD, los resultados sugieren que las fosfatasas y fitasa estudiadas están albergadas en los genomas de grupos bacterianos abundantes en los sistemas acuáticos y en ensamblajes como microbialitos o tapetes microbianos. La afiliación detallada de las secuencias obtenidas en este

estudio fue descrita en la sección de Resultados. Las fosfatasas alcalinas mostraron una afiliación más cercana con fosfatasas del grupo *Proteobacteria*, bacterias gram negativas aerobia o facultativas, cuyos grupos poseen metabolismos diversos: quimioautótrofos, oligótrofos, y diazótrofos como Alfabroteobacteria; heterótrofos organótrofos como Beta y Gammaproteobacteria y quimioautótrofos, litótrofos como Gammaproteobacteria. Las fitasas de los ensamblados de Alchichica presentaron también afiliación cercana con fitasas de bacterias Bacteroidetes y de Gammaproteobacteria, bacterias gram negativas.

La aproximación a la diversidad de estos marcadores a través de determinar filotipos es una estrategia de gran utilidad para empezar a delinear procesos o bien, potencial metabólico a nivel de ensamblados, comunidades y ecosistemas; en contraparte, deben ser asumidos supuestos muy generales. También hay cierta incertidumbre asociada a las técnicas moleculares utilizadas para obtener las secuencias. En este sentido, sólo podemos afirmar que los métodos fueron aplicados con el máximo rigor y homogeneidad posibles; de tal forma que consideramos este esfuerzo como una propuesta confiable para comenzar a responder las preguntas planteadas.

Al considerar las diferencias y similitudes entre las secuencias de los microbialitos y del bacterioplancton de los periodos circulación y estratificación (cuatro grupos), los resultados indican que en general, las secuencias de microbialitos no son muy diferentes entre circulación y estratificación, tampoco muy diferentes con las del bacterioplancton de estratificación. El bacterioplancton del periodo de circulación es el grupo "más divergente" en cuanto a la divergencia de las fosfatasas *phoD* (Fig. 19) y por otro lado, el es único grupo donde no se obtuvieron secuencias de la fitasa *BPP* (Fig. 21).

En general, los microbialitos fueron portadores de un mayor potencial para transformar el POD a través de las fosfatasas y fitasas examinadas, lo cual fue más contrastante en el caso de las fitasas *BPP* (ver Tabla 10).

Las comunidades portadoras de estos genes mostraron cambios (reemplazo de filotipos) en un tiempo tan reducido como el ciclo intra-anual circulación-estratificación (ver Figs. Resultados 9, 11 y 13 y la Tabla 10). Sobresalen las diferencias de los grupos *phoD*-Circulación.Bacterioplancton (Fig. 19) y *BPP*-Circulación.Microbialitos (Fig. 21), lo que sugiere una dinámica de reemplazo más rápida o más importante entre estos grupos y marcadores. La AP *phoX* parece no mostrar demasiada diferencia entre ensamblados o periodos, en contraste con la dinámica de *phoD* y *BPP*, que parece estar más



ligada al cambio ambiental.

Las fosfatasa alcalinas *phoX* y *phoD* y la fitasa BPP de los diferentes ensamblajes analizados mostraron solapamiento de filotipos entre ensamblajes y entre periodos, los diagramas de Venn (Figs. Resultados 9, 11 y 13) lo muestran, sugiriendo una conexión estructural (entre microbialitos y bacterioplancton) y funcional (entre la zona litoral y la zona pelágica) en el sistema Alchichica. Los filotipos que casi no cambian, constituyen por tanto una reserva genética para utilizar el POD.

Resulta interesante que al estar relacionados los indicadores de diversidad con las secuencias únicas, los resultados, tomando en cuenta los tres marcadores, subrayan la mayor diversidad de estos marcadores en los microbialitos en el periodo de circulación. El caso de la fitasa BPP es emblemático ya que los filotipos presentes superan a los de los otros grupos por cuatro veces (Fig. 20, Tabla 10)

Con estos análisis no es posible concluir si hay un efecto de los estilos de vida (vida libre en la columna de agua vs. vida en consorcio) sin embargo, al observar que el grupo que con mayor frecuencia se separa de los otros es el de bacterioplancton del periodo de circulación, se sugiere que la columna de agua estratificada, donde conviven especies aerobias y anaerobias, parece tener un mejor similitud con la vida en consorcio en los microbialitos. La columna de agua en circulación, al estar oxigenada, presenta por tanto, una comunidad bacteriana con otra estructura y dinámica.

La presencia de estos marcadores en algunos de los grupos bacterianos más abundantes en los ambientes naturales (e.g. *Proteobacteria* o *Bacteroidetes* es consistente con: 1) con la distribución cosmopolita de estos grupos, 2) con un vasto potencial genético para responder al cambio ambiental y 3) con el alto potencial de remineralización de los sistemas acuáticos, sistemas conocidos por su capacidad para catalizar (acelerar) procesos ambientales (p. ejemplo captura de carbono).

Cuando la distribución de las fosfatasas o fitasas está restringida a pocos organismos o a organismos que solo están presentes bajo ciertas condiciones (e.g. en la columna de agua durante la circulación), son precisamente estos organismos los que pueden jugar un papel clave en ciertos momentos o condiciones (a decir por las secuencias únicas de cada periodo).

### *Distribución y diversidad de fosfatasas alcalinas *phoX* en aguas naturales*

El análisis por filotipos de *phoX* (corte= 95% de similitud) señala una gran similitud a nivel de secuencia entre *phoX* de Alchichica y de otros sistemas acuáticos de características contrastantes (p. ej. su estado trófico o la concentración de los iones  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ , cofactores de estas metaloproteínas, ver Fig. 22). Sin embargo, a este nivel de similitud e incluso extendiéndolo hasta 0.10, no hay solapamiento de filotipos entre sistemas (Fig. 22) salvo de los dos estudios llevados a cabo en el lago Taihu.

Nuestros resultados muestran que las APs *phoX* de un sistema con una relativa baja concentración de  $Ca^{+2}$  fueron similares (a nivel de secuencia) de las obtenidas en un sistema con mayor concentración de este elemento a pesar de que la distribución y la variabilidad intrínseca en las comunidades microbianas es distinta. Estas relaciones constituyen una línea base en cuanto a la diversidad de estos marcadores en sistemas acuáticos. En la Tabla 3, Anexo 2, se muestran las características particulares de cada uno de estos sistemas.

### *Distribución y diversidad de fitasas BPP en la naturaleza*

Los conjuntos ambientales de secuencias *BPP* mostraron una diversidad similar, en general, según el estimador no paramétrico de riqueza *Chao* y el índice de Shannon; entre los conjuntos comparados Alchichica aparece como el de menor diversidad (ver Tabla 10). Cabe resaltar que los filotipos del conjunto Alchichica no mostraron solapamiento con los de los otros estudios, de hecho, los conjuntos estudiados comparten un número muy pequeño de filotipos (ver Fig. 23). Es claro que hay tres conjuntos que claramente presentan filotipos compartidos: intestino (I), columna de agua (AE) y sedimento (PS). Es interesante este ejemplo, y nos hace suponer que los tres conjuntos proceden de muestras del mismo cuerpo de agua (aunque en el artículo que lo refiere no lo clarifica). Este solapamiento es interesante, mientras que los grupos agua y sedimento comparten > 50% de los filotipos, solo del 11 al 15% de estos filotipos se encuentran también en el intestino de la carpa.

Por otro lado, se observa que si bien los muestreos en ambientes distintos fueron útiles para revelar la distribución de estas fitasas *BPP* en los ambientes naturales, los resultados reflejan un muestreo relativamente pobre. En estos términos, el conjunto Alchichica aparece como el conjunto mejor muestreado (Tabla 10). Esto está sugerido por los bajos valores de cobertura (Tabla 10) y los

cocientes secuencias únicas:OTUs, comparados con el resto de los conjuntos de secuencias (Fig. 25). El análisis del número de las secuencias únicas entre conjuntos de secuencias de estudios ambientales es útil para entender la diversidad intrínseca de los marcadores, así como el estado de avance en el estudio de cada marcador, así, la unicidad de las secuencias en relación con el número de OTUs (secuencias agrupadas por similitud) varió entre conjuntos (ver Fig. 25). Entre los conjuntos de secuencias ambientales analizados, *phoX* posee los cocientes más altos, señalando al mismo tiempo la diversidad intrínseca de las secuencias parciales y, por otro lado, muestreos más extensivos que, por ejemplo, la mayoría de los conjuntos BPP.

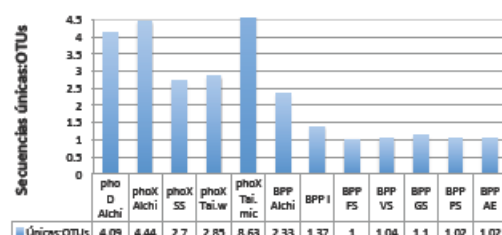


Fig. 25 Proporción entre secuencias únicas: OTUs en los conjuntos de secuencias de Alchichica y de diferentes estudios ambientales.

#### *Expresión de phoX, phoD y BPP. Comunidad potencial vs. comunidad funcional*

Explorar la expresión de *phoX*, *phoD* y *BPP* con una estrategia primer-dirigida permitió comparar la comunidad potencial (la que posee los genes) de la comunidad funcional (que activamente expresó los genes), sin embargo es importante considerar que el esfuerzo en tiempo y recursos de esta metodología, en ocasiones parece no estar balanceado con los resultados obtenidos. Los transcritos recuperados fueron escasos y a menudo mostraron características distintas del amplicón a partir de ADN, lo cual dificultaba su análisis. Con frecuencia, más de la mitad de los transcritos seleccionados en las librerías de clonas correspondían a fragmentos de origen heterogéneo (fragmentos de 16S y 23S ribosomales de cianobacterias se encuentran entre los fragmentos más frecuentes).

El reto de capturar transcritos de genes con funciones tan particulares como las que exploramos no era una tarea sencilla desde la planeación original, de tal forma que hallar algunas secuencias en el "mar de transcripción" celular/comunitario hace pensar que la adquisición y transformaciones de fósforo en estas comunidades son mecanismos activos e importantes.

Uno de los aspectos a resaltar a partir de este acercamiento es que las secuencias recuperadas se pueden procesar con mucho detalle (a diferencia de un acercamiento de Proteómica, enfocado en la exploración masiva de transcritos).

Un escrutinio cuidadoso (y distinto según las características de cada marcador, en particular de su corta longitud) llevó a la recuperación de algunas secuencias útiles para comenzar a entender la expresión de los marcadores estudiados. La Tabla 11 resume el número de secuencias y las características de los transcritos obtenidos en un muestreo circadiano (amanecer, medio día, atardecer, media noche).

Los transcritos recuperados de la fosfatasa alcalina *phoD* (ARN) fueron seleccionados por su identidad (BLASTn, HMMER) y su tamaño fue adecuado para formar parte de un alineamiento que comprendía las secuencias de Alchichica (ADN) y secuencias genómicas de referencia. La Figura 25 muestra una topología derivada de un análisis de Neighbor joining de las secuencias *phoD* amplificadas a partir de ADN total (comunidad potencial) y las secuencias amplificadas a partir de cADN (comunidad funcional). Entre el total de los transcritos *PhoD* (12 OTUs) recuperados (de aprox. 350 pb de longitud) se recuperó un transcrito del filotipo *PhoD* más abundante en ADN.

Los transcritos de *phoX* mostraron un tamaño mucho menor al esperado, de aprox. 20 veces menor, esto requirió un escrutinio cauto y exhaustivo. Si bien fue posible alinear los transcritos con las secuencias ambientales y de genomas, su corto tamaño no nos permitió incorporarlas en un análisis topológico, como sí fue posible con las secuencias de la fosfatasa *phoD*.

Entre las fosfatasas alcalinas procariontes estudiadas, es *phoX* el marcador que ha tenido un respaldo experimental más sólido en cuanto a su función fisiológica. Los trabajos de Sebastian y Ammerman (2009, 2011), muestran que la expresión de esta fosfatasa está relacionada con el estrés por PID. En tal caso, la escasa expresión de *phoX* es consistente con un ambiente en el que el fósforo no es muy abundante pero que sin embargo, exhibe una concentración superior a los límites teóricos de limitación por dicho nutriente. La baja señal de la expresión de *phoX*, por el contrario, si bien cuestiona la sugerencia de limitación por fósforo revelada por el análisis elemental de los microbialitos, podría indicar por un lado, condiciones diferentes de vivir en vida libre vs. vivir en

consorcio. Por otro lado, podemos suponer que la comunidad potencial explorada es poco sensible a este estrés. Y por lo tanto, que podríamos no ver la señal de la comunidad más sensible a la baja concentración de PID, si esta está presente en grupos bacterianos que no podemos observar bajo el sesgo de los oligos. Estos resultados refuerzan la idea de una comunidad preparada para enfrentar una deficiencia de PID, esta comunidad podría reaccionar y e invertir en fosfatasas alcalinas para utilizar POD.

Es también probable que otras respuestas "constitutivas" u otros mecanismos (además de la expresión de la fosfatasa alcalina *phoX* sean activados en el consorcio microbiano estudiado, y que tal vez, en el consorcio, la utilización de diferentes formas de fósforo orgánico sea relevante, tal como lo veremos a continuación con el patrón de expresión de las BPP fitasas.

Los transcritos obtenidos de APs pertenecen al periodo de estratificación, cuando las concentraciones de SRP en la columna de agua son menores que en la circulación (ver Tabla 1, Anexo 2). Por otro lado, la dinámica de expresión de estos marcadores sugiere que entre el amanecer y el medio día es cuando ocurre la mayor actividad (Fig. 26). La afiliación más cercana de los transcritos *phoX* correspondió con secuencias de estudios ambientales y de Alfaproteobacteria como *Chelativorans*, género del orden Rhizobiales (fijan nitrógeno y de vida estrictamente aerobia) y del género *Jannaschia*, Rhodobacteraceae, familia que contiene organismos quimio-organótrofos y fotoheterótrofos). También los transcritos mostraron afiliación cercana con el vía de señalamiento TAT), por lo tanto podría tratarse de proteínas que se transportan hacia la membrana celular.

La afiliación más cercana de algunos transcritos de PhoD de Alchichica fue la de la cadena A del dominio Fosfatasa tipo PhoD (2yeq\_A; Protein Data Bank, Pfam PF09423) mientras que dos de los transcritos se afiliaron con la fosfodiesterasa D de la Gammaproteobacteria del género *Pseudomonas*, familia Pseudomonadaceae (aerobias y poseedoras de una gran diversidad metabólica) y de la Alfaproteobacteria del género *Bradyrhizobium* (bacterias frecuentemente fijadoras de nitrógeno) (Tabla 11). Ambos géneros se relacionan con la desnitrificación y la fijación del nitrógeno, respectivamente, por lo tanto, puede tratarse de géneros relevantes para mantener el ciclaje de la materia orgánica (N y P) en los ensamblajes microbianos.

La presencia de transcritos de Alfa proteobacterias sugiere también que algunos miembros de este grupo, presenta mayor actividad y/o mayor sensibilidad/respuesta a bajas concentraciones del nutriente que otras proteobacterias.

En general, los transcritos BPP fueron más cortos que los fragmentos recuperados de ADN por lo que no fueron incluidos en el alineamiento general (el tamaño modal fue de 93 pb). La afiliación más cercana de dos transcritos BPP fue una proteína hipotética de la cianobacteria diazótrofa *Scytonema*, formadora de heterocistos del orden Nostocales. En otro caso, de una proteína exportada del género *Streptococcus*, Firmicutes del orden Lactobacillales (anaerobias facultativas y fermentadoras de carbohidratos).

Sin embargo, los transcritos de BPP mostraron una estructura particular. En varios de ellos, las secuencias que correspondían con fragmentos de BPP (BLASTn) se interrumpían en el centro por fragmentos de alrededor de 52 pb cuya identidad era similar a fragmentos de genes de origen heterogéneo (por ejemplo *nifH*, *nifB*), por ejemplo las secuencias 18h\_3, oh\_2.

En general, fueron similares a proteínas de la familia fitasa o proteína 3-fitasa (PhyC) de Gammaproteobacterias, a la superfamilia de proteínas cl17685, pfam02333:Phytase; COG4247:Phy 3-phytase; aunque también a algunas secuencias de Firmicutes como *Dehalobacter*, así como proteínas integrales de membrana y proteínas exportadas de Bacteroidetes y Firmicutes).

La afiliación de los transcritos BPP y *phoX* como proteínas no fue fácil de analizar debido al tamaño corto del fragmento, los ajustes en la plataforma HMMER incluyeron las bases de metagenomas y de datos ambientales (env NR) para tal propósito, dando como resultado afiliaciones cercanas con dominios del Global Ocean Sampling (GOS) de metagenomas de columna de agua y sedimentos (Tabla 11).

Si bien, los transcritos de la fosfatasa alcalina *PhoD* presentaban un tamaño e identidad suficientes para ser alineadas con las secuencias obtenidas a partir de ADN, en los otros casos (*PhoX*, fitasa BPP y *Ppk1*) los transcritos fueron más cortos y heterogéneos que las secuencias en ADN, en general, podemos aproximarnos a distintas explicaciones al respecto. Por ejemplo, 1) que la velocidad de degradación/transformación de la molécula de ARNm sea muy veloz dificultando la obtención de secuencias completas, 2) que los transcritos elegidos (ARNm) sufren un procesamiento post-transcripcional diferencial, 3) que los métodos utilizados (en particular la extracción de ARN) interfiera con la captura y con la calidad de los transcritos.

### Contribución del presente estudio a las bases de datos generales

A través de amplificación por PCR con oligos degenerados se obtuvieron exitosamente secuencias parciales de los marcadores *phoX*, *phoD* y *BPP* en ADN metagenómico y en ARN total de microbialitos y bacterioplancton del lago Alchichica durante los periodos de circulación y estratificación. Estas secuencias son similares a las de otros estudios ambientales y a secuencias genómicas de bacterias.

Estas secuencias "nuevas" fueron incorporadas al GenBank y a las bases de datos generales una vez que cumplieron con las condiciones de escrutinio del GenBank, por ejemplo algunas secuencias fueron excluidas por mostrar saltos en el marco de lectura (en su traducción a aminoácidos) o bien, por ser consideradas pseudogenes.

En la Tabla 12 se resumen las secuencias generadas, algunas de sus características y su número de acceso en el GenBank, si ya les ha sido asignado.

Tabla 12. Resumen de las secuencias a partir de microbialitos y bacterioplancton obtenidas en el presente estudio

Marcador	No. de secuencias	No. de pseudogenes	No. de acceso GenBank
<b>ADN</b>			
<i>phoX</i>	218	3	KF891484-KF891515, KF891517-KF891702
<i>phoD</i>	180	4	KF891703-KF8918828, KF891830-KF891882
<i>BPP</i>			por asignar
<b>ARNm</b>			
<i>PhoX</i>	5		por asignar
<i>PhoD</i>	12		por asignar
<i>BPP</i>	10		por asignar

Los conjuntos de secuencias derivadas de este trabajo contribuyen a la formación de bases de datos de estudios ambientales, en algunos casos las secuencias de Alchichica se han podido comparar con las de otros estudios llevados a cabo en ambientes acuáticos (derivadas de métodos similares), es el caso de los marcadores *phoX* y *BPP*, mientras que en otros casos, las secuencias de Alchichica constituyen los primeros estudios en ambientes acuáticos utilizando dichos marcadores (es el caso de *phoD*, sólo hay registro de secuencias de suelos). La comparación de nuestros resultados con otros conjuntos de secuencias ambientales permitió clarificar la discutida anotación de las

secuencias de Sakurai *et al.* (2008), anotadas "erróneamente" como fosfatasa alcalina *phoA*, si bien esta discusión es una contribución al problema de la anotación de las secuencias en las bases de datos generales, es otra evidencia del estado incipiente del conocimiento de estas metaloproteínas.

El registro amplio y riguroso de las condiciones ambientales en las que se hallaban las comunidades portadoras de estos genes es de gran utilidad para entender los procesos que se llevan a cabo en los ecosistemas. Insistimos por ello en la importancia de recabar la mayor información posible ya que estamos seguros que en el futuro podremos utilizarla para darle sentido al "mar de secuencias" que crece día con día.

Ya que tanto las fosfatasa alcalinas como la fitasa (BPP) son metaloproteínas (cuyo cofactor es el calcio), fue importante considerar las condiciones de este catión y de otros cofactores metálicos que utilizan las enzimas extracelulares. Este y otros metales parecen tener una relación estrecha con el ciclaje del fósforo que podría repercutir en nuestra comprensión hacia el futuro de las interacciones entre ciclos biogeoquímicos.

Comenzamos esta exploración con base a las hipótesis expresadas por Sebastian y Ammerman (2009) y Luo *et al.* (2009) en torno a la presencia de una u otra fosfatasa bacteriana en base a la disponibilidad de sus cofactores metálicos, este estudio es particularmente interesante en Alchichica, que resalta como un sistema con baja concentración de calcio y una proporción alta, entre los valores más altos reportados (ver Müller *et al.* 1972) de Mg:Ca.

El acercamiento a genes "funcionales" a través de las técnicas utilizadas requiere de un considerable esfuerzo de laboratorio, al ser comparado con las técnicas asociadas a secuenciación de siguiente generación (*next-generation sequencing*, NGS) y tanto la amplificación como la captura de transcritos es escasa. Sin embargo, el trabajo cercano con estas secuencias (en la que en ocasiones cuesta trabajo pensar en homología debido a su divergencia) permite el acercamiento a la diversidad y a la complejidad de las estrategias funcionales distribuidas en los sistemas naturales.

La comparación de las secuencias obtenidas en este estudio con las bases de datos generales, por otro lado, revela el incipiente estado de comprensión sobre la identidad de los organismos involucrados en las transformaciones del fósforo. Por ejemplo, salvo cinco secuencias de PhoX-ARNm (GenBank; Sebastian y Ammerman 2009) cuyo origen es un experimento de mesocosmos en un ambiente costero (Gilbert *et al.* 2008), los transcritos obtenidos en este estudio constituyen los primeros reportes de ARNm de estos marcadores en muestras ambientales.



Los tres marcadores elegidos representan estrategias para transformar el fósforo orgánico disuelto (POD), que si bien se ha visto que es el reservorio más importante de P en aguas marinas (Dyhrman *et al.* 2007), es probable que también lo sea en un sistema oligotrófico como el lago de Alchichica.

## Conclusiones

Las transformaciones y el reuso del fósforo son muy relevantes para el funcionamiento de los sistemas biológicos, desde la escala celular hasta la ecosistémica. Existe una amplia diversidad de formas del fósforo en los ambientes acuáticos, las diferentes estrategias para transformarlas se encuentran albergadas en los genomas de los microbios, particularmente de los procariontes. En la actualidad estamos comenzando a entender la identidad de los microorganismos con estas capacidades. El presente trabajo pretende contribuir en el entendimiento de las maquinarias metabólicas para cumplir este cometido, su diversidad, su distribución y el papel que juegan en el mundo microbiano. Para ello, se exploró la transformación de formas orgánicas disueltas del fósforo (POD), las que, en conjunto, constituyen la fracción que se considera más abundante (y menos conocida) de las formas del fósforo en los sistemas acuáticos. Se realizó un recuento de las estrategias de los microbios para transformar el fósforo y para responder a los cambios de las condiciones de fósforo ambientales. Se estudió en detalle los marcadores *phoX* y *phoD* (fosfatasa alcalinas) y la fitasa *BPP* obtenidas de microbialitos y bacterioplancton del lago sódico Alchichica, metaloproteínas bacterianas cuyo funcionamiento óptimo ocurre en pH alcalino. Consideramos que los modelos de estudio (microbialitos y bacterioplancton del lago Alchichica) son apropiados y muy útiles para indagar sobre las preguntas planteadas así como para futuros estudios sobre la diversidad funcional microbiana.

Los análisis de la presencia y diversidad de *phoX*, *phoD* y *BPP* en el ciclo intra anual (circulación-estratificación) sugieren que el sistema:

1. alberga un vasto potencial (para remineralizar el fósforo orgánico disuelto) que parece ser mayor en los microbialitos que en el bacterioplancton, dada la abundancia y la diversidad de los genes de fosfatasa y fitasa alcalinas obtenidos.

2. El bacterioplancton, a pesar de albergar un potencial menor que los microbialitos (según el número de filotipos de *phoX*, *phoD* y *BPP*) presenta una respuesta más drástica al cambio ambiental estratificación-circulación en el que se observa un remplazo rápido de los filotipos, principalmente de *phoD* y *BPP*. Lo cual podría estar relacionado con los contrastantes estilos de vida de los consorcios microbianos estudiados: libre o en consorcio.

3. Se observaron por lo tanto, cambios en la afiliación de las fosfatasas y fitasas estudiadas en un periodo tan corto como el ciclo intra-anual circulación-estratificación.

El traslape poco numeroso entre los grupos estudiados (tipo de ensamble y periodo) sugiere esta idea, de igual forma que la numerosa presencia de secuencias únicas en cada ensamble microbiano y periodo.

4. El amplio potencial para degradar el POD albergado en proteobacterias (indicado principalmente por la afiliación filogenética de las fosfatasas *phoX* y *phoD*) es congruente con la amplia distribución de este grupo en la naturaleza (p. ej. se ha visto que el número de filotipos de Alfa, Beta y Gammaproteobacteria ha sido abundante en microbialitos y tapetes microbianos de diferentes localidades; ver Centeno *et al.* 2012).

Algunas secuencias de Alfa proteobacterias diazótrofes mostraron una afiliación cercana con las fosfatasas y fitasas estudiadas, sugiriendo que estos grupos (p. ej. del orden Rhizobiales) pueden estar cercanamente implicados en las transformaciones tanto del fósforo como del nitrógeno en los ecosistemas.

5. La distribución de las fitasas *BPP* parece estar más restringida entre grupos bacterianos que la de las fosfatasas (dado el menor número de filotipos *BPP*), de tal forma que la presencia de organismos con potencial para degradar el fitato (Bacteroidetes Flavobacteriales, por ejemplo) pueden jugar un papel clave en los ensamblajes microbianos, participando en el ciclaje del fósforo y de otros elementos metálicos importantes del funcionamiento celular.

6. Con este estudio no fue posible incidir en el debate si la presencia, frecuencia y distribución de los marcadores corresponde con la disponibilidad de sus cofactores metálicos (*sensu* Sebastian y Ammerman, 2009 y Luo *et al.* 2009) ya que las dos fosfatasas estudiadas son calcio-dependientes. Sin embargo, este estudio confirmó la presencia y amplia diversidad de *phoX* y *phoD* en un sistema con baja concentración de calcio y con una proporción alta Mg:Ca.

7. Las comparaciones entre sistemas consisten una línea base para aproximarse a la diversidad de los marcadores *phoX* y *BPP* en los sistemas naturales: acuáticos para el caso de *phoX* y en un rango más amplio en el caso de *BPP*. La caracterización ambiental fue clave para hacer consideraciones más puntuales sobre la diversidad de *phoX*, en particular la exploración de la hipótesis sobre el papel de iones metálicos como el calcio y el magnesio en la presencia y distribución de las enzimas extracelulares para el aprovechamiento del POD.

8. Las comparaciones entre conjuntos de secuencias ambientales se suman a la afirmación (sensu Huang *et al.* 2009, Lim *et al.* 2009, Tan *et al.* 2013) de que tanto las fosfatasas alcalinas *phoX* y *phoD*, como la fitasa *BPP* son marcadores ampliamente distribuidos en la naturaleza. Los tres marcadores estudiados presentan una amplia divergencia en su secuencia y si bien, su distribución parece estar restringida a ciertos phyla bacterianos, se han identificado en ensamblajes microbianos y ambientes de características contrastantes.

9. El estudio de las enzimas que se encargan de las transformaciones del fósforo subraya la compleja y estrecha interacción del ciclo del calcio con el ciclo del fósforo. Sin embargo, la investigación *in silico* de las enzimas extracelulares para utilizar el POD muestra la relevancia de otros metales que funcionan como cofactores/inhibidores de la actividad enzimática de enzimas ligadas a las transformaciones del fósforo (ver Tabla 3, Anexo 2).

10. La acción de las enzimas fitasas, además de contribuir con el ciclaje del fósforo, es fundamental para restituir y dinamizar el ciclaje de elementos metálicos como el Fe, Zn, Mg o Ca, que pueden ser fundamentales para el desarrollo celular, por ejemplo a través de su participación en los sitios activos de distintas metaloproteínas. Esta es una aproximación que debe estudiarse con más detalle y con diferentes metodologías. En nuestro caso, nos permite avanzar hacia el entendimiento de las interacciones entre los ciclos biogeoquímicos.

11. El patrón de expresión en un ciclo diurno o circadiano fue diferente entre las enzimas estudiadas, diurno en general en el caso de las fosfatasas y de vespertino a nocturno en el caso de la fitasa *BPP*. La obtención de los transcritos en las muestras del periodo de estratificación sugiere que es en este periodo cuando los microorganismos están sujetos a mayor estrés por fósforo (particularmente PID).

## Perspectivas

Este estudio comprende la primera exploración de genes para transformar el POD en microbialitos, encontrando que las secuencias parciales de las fosfatasa alcalinas *phoX* y *phoD* y de la fitasa *BPP* de Alchichica fueron similares a las de otros estudios ambientales con características contrastantes (ambientes marinos, estuarios, suelos e incluso, del intestino de un pez). La composición iónica del lago Alchichica es particular y ofrece un buen punto de comparación para comenzar a sentar las bases de la diversidad de estos marcadores en los ambientes naturales.

La relación de elementos metálicos (tanto iones mayores como elementos traza) con el ciclo del fósforo se evidencia a lo largo del trabajo. En cuanto a la disponibilidad de los cofactores metálicos de estas enzimas, las condiciones de Alchichica resultan de interés para seguir explorando la hipótesis de que la presencia y distribución de estas enzimas en la naturaleza está ligada a la disponibilidad de sus cofactores metálicos (*sensu* Sebastian y Ammerman 2009, Luo *et al.* 2009). La concentración de calcio es relativamente baja comparada con la de otros sistemas, la de  $Mg^{+2}$  es alta y la concentración de  $Zn^{+2}$  es aproximadamente 100 veces la del mar (Tabla 3, Anexo 3). Esto tiene un efecto directo sobre la composición de los carbonatos y minerales que se precipitan en el sistema y por lo tanto, con la interacción del calcio con el fósforo. Por ejemplo, el lago de Alchichica es uno de los pocos sitios donde se pueden encontrar microbialitos formados de hidromagnesita e hidromagnesita-magnesita (Kazmierczak *et al.*, 2011), mientras que minerales de calcio como la calcita y la aragonita están menos presentes. La baja presencia de calcio en el sistema puede ser un componente relevante en el uso eficiente del fósforo en este sistema debido a que el fósforo tiene menos interacciones con minerales de calcio como la apatita  $Ca_5(PO_4)_3(F,Cl,OH)$ , la cual se sabe que es capaz de inmovilizar al fósforo como sucede en sistemas kársticos, donde los carbonatos de calcio son muy abundantes.

La utilización del fitato es también un proceso que involucra al mismo tiempo la liberación del fosfato y la de otros elementos metálicos, inmovilizados por el ácido fítico, tales como el zinc, hierro, calcio o magnesio, entre otros. Por lo tanto, es un proceso que puede tener impacto en el estatus nutricional a escala celular y de comunidades al tratar de entender los factores que condicionan la biodisponibilidad de diversos macro y micronutrientes en los sistemas biológicos.

Las transformaciones del fósforo orgánico constituyen por tanto, una oportunidad para buscar y entender las interacciones entre ciclos biogeoquímicos. Las preguntas y respuestas derivadas de la

exploración de este tema pueden contribuir a entender los efectos del Cambio Global en la productividad de los sistemas y las respuestas al cambio ambiental que pueden presentar los sistemas, partiendo del compartimiento microbiano.

La composición de este lago y la diversidad de enzimas para transformar el fósforo encontradas en los microbialitos intenta abrir algunas posibilidades para explorar la utilización del fósforo en los ecosistemas del pasado en términos de que un ambiente con alta alcalinidad, alto pH y baja concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  recuerda el mar sódico ancestral (Kempe y Degens, 1985).

En otro sentido, se ha detectado que algunas zonas potencialmente habitables del sistema solar poseen agua rica en Mg y  $\text{SO}_4$ , tal es el caso de Europa, luna de Júpiter, como fue indicado por la sonda Galileo (e.g. Fanale *et al.* 2001). Ambos iones son abundantes en el sistema Alchichica y por lo tanto el estudio del metabolismo y de la biogeoquímica de este sistema tienen una dimensión potencial bajo un enfoque de Astrobiología.

## Literatura citada

Adame, M.F., Alcocer, J. y E. Escobar. 2008. Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology* 53: 22-31.

Alcaráz, L.D., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., Ramírez, E. Putonti, C., Jiménez, B., Martínez, E., López, V., Arvizu, J.L., Ayala, F., Razo, F., Caballero, J., Siefert, J., Eguiarte, L., Vielle, J-P., Martínez, O., Souza, V., Herrera-Estrella, A. y L. Herrera-Estrella. 2008. The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *PNAS* 105 (15): 5803-5808.

Alcocer J., Escobar, E., Lugo, A. y L. Peralta. 1998. Littoral benthos of the saline crater lakes of the basin of Oriental, Mexico. *International Journal of Salt Lake Research* 7: 87-108.

Alcocer, J., Escobar, E. y L.A. Oseguera. 2008. Acoplamiento pelágico-bentónico: respuesta de la zona bentónica profunda a la sedimentación del florecimiento invernal de diatomeas en el lago oligotrófico Alchichica, Puebla, México. *Hidrobiológica* 18(1) suplemento: 115-122.

Alcocer, J., Lugo, A., Escobar, E., Sánchez, M.R. y G. Vilaclara. 2000. Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 27: 3168-3169.

Alcocer, J., López-Anaya, D.P. y L.A. Oseguera. 2007. Dinámica del carbono orgánico particulado en un lago tropical profundo en B. Hernández de la Torre y G. Gaxiola Castro (eds.) *Carbono en ecosistemas acuáticos de México*. INE. México.

Alcocer, J., Ruiz-Fernández, A. C., Escobar, E., Pérez-Bernal, L. H., Oseguera, L. A. y V. Ardiles-Gloria. 2014. Deposition, burial and sequestration of carbon in an oligotrophic, tropical lake. *Journal of Limnology* 73(AoP).

- Ardiles, V.S. 2011. Dinámica a largo plazo de la biomasa fitoplanctónica en un lago monomítico cálido tropical. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ardiles, V., Alcocer, J., Vilaclara, G., Oseguera, L.A. y L. Velasco. 2012. Diatom fluxes in a tropical, oligotrophic lake dominated by large-sized phytoplankton. *Hydrobiologia* 679:77–90. DOI 10.1007/s10750-011-0853-7
- Auguet, J.C., Barberan, A. y E.O. Casamayor. 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME* 4: 182–190.
- Bardgett, R.D., Freeman, C. y N.J. Ostle. 2008. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *ISME Journal* 2:805-814.
- Beltrán, Y., Centeno, C.M., García-Oliva, F., Legendre, P. y L.I. Falcón. 2012. N<sub>2</sub> fixation rates and associated diversity (nifH) of microbialite and mat-forming consortia from different aquatic environments in Mexico. *Aquatic Microbial Ecology* 67:15-24.
- Benitez-Nelson, C.R. 2000. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth-Science Reviews* 51:109–135.
- Benning, C., Huang, Z. H. y D.A. Gage. 1995. Accumulation of a Novel Glycolipid and a Betaine Lipid in Cells of *Rhodobacter sphaeroides* Grown under Phosphate Limitation. *Archives of biochemistry and biophysics* 317(1): 103-111.
- Biddanda, B., Opsahl, S. y R. Benner. 1994. Plankton respiration and carbon flux through bacterioplankton on the Louisiana shelf. *Limnology and Oceanography* 39:1259–75.
- Biddanda, B.A., Ogdahl, M.L. y J.B. Cotner. 2001. Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnology and Oceanography* 46:730–9.
- Boström, G., Persson, G. y B. Broberg. 1988. Bioavailability of different phosphorus forms in freshwater systems. *Hydrobiologia*, 170: 133–155.
- Breitbart, M., Hoare, A., Nitti, A., Siefert, J., Haynes, M., Dinsdale, E., Edwards, R., Souza, V., Rohwer, F. y D. Hollander. 2009. Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environmental Microbiology* 11(1): 16-34.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. y P. Forterre. P. 2008. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6: 245–252.
- Buchan, A., González, J. M. y M.A. Moran. 2005. Overview of the marine Roseobacter lineage. *Applied and environmental microbiology* 71(10): 5665-5677.
- Button, D. 1986. Affinity of organisms for substrate. *Limnology and Oceanography* 31:453–6.
- Cao, X., Štrojsová, A., Znachor, P., ZApomělová, E., Liu, G., Vrba, J. y Y. Zhou. 2005. Detection of extracellular phosphatases in natural spring phytoplankton of a shallow eutrophic lake (Donghu, China). *European Journal of Phycology* 40(3):251-258.
- Carrasco-Núñez, G., Michael, H. y C. Romero. 2007. Evolution and hydrological condition of a maar volcano (Atexcac crater, Easter Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 159:179 – 1997.
- Centeno, C.M., Legendre, P., Beltrán, Y., Alcántara-Hernández, R.J., Lidström, U.E., Ashby, M.N. y L. Falcón. 2012. Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology* :1-12.

- Chróst, R. J. (1990). Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In *Aquatic microbial ecology* (pp. 47-78). Springer New York.
- Chróst, R.J. 1991. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes, In: Chróst RJ eds. *Microbial enzymes in aquatic environments* Springer-Verlag. New York.
- Chróst, R.J. y W. Siuda. 2002. Ecology of Microbial Enzymes in Lake Ecosystems, In: Burns RC and Dick RP eds. *Microbial Enzymes in the Environment Activity, Ecology, and Applications* New York: Marcel Dekker, Inc. 35-72.
- Coleman, M.L. y S.W. Chisholm. 2010. Ecosystem-specific selection pressures revealed through comparative population genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:18634–18639.
- Cotner, J.B. y R.G. Wetzel. 1992. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnology and Oceanography* 37:232–43.
- Cotner, J.B. y B.A. Biddanda. 2002. Small players, large role: Microbial influence on Biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems* 5: 105-121.
- Cunha, A., Almeida, A., Coelho, F.J.R.C., Gomes, N.C.M., Oliveira, V. y A.L. Santos. 2010. Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems en A. Méndez-Vilas (ed.). *Current Research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. World Scientific Publishing.
- Currie, D.J. y J. Kalf. 1984. A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnol Oceanogr* 29:298–310.
- Dai, J., Chen, D., Gao, G., Tang, X., Wu, S., Wu, X. y J. Zhou. 2014 Recovery of novel alkaline phosphatase-encoding genes (phoX) from eutrophic Lake Taihu. *Canadian Journal of Microbiology* 60 (3): 167–171.
- Dai, J.Y. (unpublished, GenBank direct submission) Effect of microcystis bloom decomposition on genetic diversity of bacterial phoX in a microcosm experiment.
- DeLong, E.F. 1998. Everything in moderation: Archaeas 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics and Development* 8:649–654.
- Des Marais, D.J. 1997. Long-term evolution of the biogeochemical carbon cycle. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 35(1): 429-448.
- del Giorgio, P.A., Cole, J.J. y A. Cimleris. 1997. Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature* 385:148–51.
- Dormann, P. y C. Benning. 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plants Sci* 7:112-118.
- Dyhrman, S.T., Webb, E., Anderson, D.M., Moffett, J. y J. Waterbury. 2002. Cell specific detection of phosphorus stress in *Trichodesmium* from the Western North Atlantic. *Limnology and Oceanography* 47(1):823–1,836.
- Dyhrman, S.T. y S.T. Haley. 2006. Phosphorus scavenging in the unicellular marine diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Applied and environmental microbiology* 72(2): 1452-1458.
- Dyhrman, S.T., Ammerman, J.W. y B.A.S. Van Mooy. 2007. Microbes and the marine phosphorus cycle. *Oceanography* 20:110–116.
- Escobar Briones, E., Alcocer, J., Cienfuegos, E. y P. Morales. 1998. Carbon stable isotopes ratios of pelagic and

- littoral communities in Alchichica crater-lake, Mexico. *International Journal of Salt Lake Research* 7: 345-355.
- Falcón, L.I., Escobar-Briones, E. y D. Romero. 2002. Nitrogen fixation patterns displayed by cyanobacterial consortia in Alchichica crater-lake, Mexico. *Hydrobiologia* 467: 71-78.
- Falkowski, P.G., Fenchel, T. y E.F. Delong. 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320(5879):1034-1039.
- Fanale, F. P., Li, Y.-H., De Carlo, E., Farley, C., Sharma, S. K., Horton, K. y J.C. Granahan. 2001. An experimental estimate of Europa's "ocean" composition-independent of Galileo orbital remote sensing. *Journal of Geophysical Research* 106: 14595-14600.
- Feder, J. 1973. The phosphatases. en E. J.Griffith, A. Benton, J. M. Spencer y D. T. Mitchell (eds.) *Environmental phosphorus handbook*. J. Wiley & Sons. New York. 475-508.
- Fernández-Valiente, E., Quesada, A., Howard-Williams, C. E I. Hawes. 2001. N<sub>2</sub>-fixation in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Microbial Ecology* 42(3): 338-349.
- Fierer, N. y R.B. Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 626-631.
- Filippelli, G.M. 2008. The global phosphorus cycle: past, present, and future. *Elements* 4(2), 89-95.
- Filonov, A., Tereshchenko, I. y J. Alcocer. 2006. Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophysic Research Letters* 33: 1-4. doi:10.1029/2006GL025901.
- Francis, C.A., Beman, J.M. y M.M.M. Kuypers. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME Journal* 1: 19-27.
- Gachter, R. y J.S. Meyer. 1993. The role of microorganisms in mobilization and fixation of phosphorus in sediments. *Hydrobiologia* 253: 103-121.
- Galat, D.L., Lider, D.L. Vigg, S. y S.R. Robertson. 1981. Limnology of a large, deep, North American terminal lake, Pyramid Lake, Nevada, U. S. A. *Hydrobiologia* 82: 281-317.
- García Martínez, J. 2010. Efectos climáticos sobre el agua subterránea y el lago Alchichica Puebla, México. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias de la Tierra. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gasca, D.A. 1981. Algunas notas de la génesis de los lagos cráter de la Cuenca Oriental. INAH, Colección científica, 98. México.
- Gasol, J.M., Casamayor, E.O., Join, I., Garde, K., Gustavson, K., Benloch S et al. 2004. Control of heterotrophic prokaryotic abundance and growth rate in hypersaline planktonic environments. *Aquatic Microbiology Ecology* 34: 193-206.
- Ghuysen, J. y R. Hackenbeck. 1994. *Bacterial cell wall*. Elsevier Science Ltd.
- Giovannoni, S.J., H.J. Tripp, S. Givan, M. Podar, K.L. Vergin, D. Baptista, L. Bibbs, J. Eads, T.H. Richardson, M. Noordewier, M.S. Rappé, J.M. Short, J.C. Carrington y E.J. Mathur. 2005. Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. *Science* 309:1242-1245.
- Gram, L., Grossart, H. P., Schlingloff, A. y T. Kjørboe. 2002. Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 4111-4116.



- Hernández-Avilés, J.S. 2010. Dinámica del ensamblaje planctónico de procariontes unicelulares en un lago atalasoalino monomíctico cálido con hipolimnion anóxico. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. México.
- Hernández-Avilés, J.S., Macek, M., Alcocer, J., López-Trejo, B. 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(9): 1301-1314.
- Hernández-Terrones, L., Rebolledo-Vieyra, M., Merino-Ibarra, M., Soto, M., Le-Cossec, A. y E. Monroy-Ríos. 2011. Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): Baseline nutrient content and flux to coastal ecosystems. *Water, Air, & Soil Pollution* 218(1-4): 517-528.
- Hirani, T.A., Suzuki, I., Murata, N., Hayashi, H. y J.J. Eaton-Rye. 2001. Characterization of a two-component signal transduction system involved in the induction of alkaline phosphatase under phosphate-limiting conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Molecular Biology* 45:133-144.
- Hoppe, H.G. 2003. Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia* 493:187-200.
- Hsieh, Y.J. y B.L. Wanner. 2010. Global regulation by the seven-component P<sub>i</sub> signaling system. *Current opinion in microbiology* 13(2): 198-203.
- Gilbert, J. A., Field, D., Huang, Y., Edwards, R., Li, W., Gilna, P. e I. Join. 2008. Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PloS one* 3(8): e3042.
- Gilbert, J. A., Thomas, S., Cooley, N. A., Kulakova, A., Field, D., Booth, T., McGrath, J. W., Quinn, J. P. e I. Joint. 2009. Potential for phosphonoacetate utilization by marine bacteria in temperate coastal waters. *Environmental Microbiology* 11(1): 111-125.
- Grasshoff, K., Kremling, K. y M. Ehrhardt. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. Y O. Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systems Biology* 59(3): 307-321.
- Huang, H., Shi, P., Wang, Y., Luo, H., Shao, N., Wang, G., ... y B. Yao. 2009. Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. *Applied and environmental microbiology* 75(6): 1508-1516.
- Ilikchyan, I.N., McKay, R.M.L., Zehr, J.P., Dyhrman, S.T. y G.S. Bullerjahn. 2009. Detection and expression of the phosphonate transporter gene *phnD* in marine and freshwater picocyanobacteria. *Environmental microbiology* 11(5): 1314-1324.
- IPCC. 2007. *Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. [Core Writing Team, Pachauri, R.K. and A. Reisinger (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.
- Iwai, S., Chai, B., Jesus, E.D.C., Penton, C.R., Lee, T.K., Cole, J.R. y J.M. Tiedje. 2011. Gene-targeted metagenomics (GT Metagenomics) to explore the extensive diversity of genes of interest in microbial communities. *Handbook of molecular microbial ecology I: metagenomics and complementary approaches*. (De Bruijn FJ, ed), pp. 235-243. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Jansson, M., Olsson, H. y K. Petterson. 1988. Phosphatases; origin, characteristic and function in lakes. *Hydrobiologia* 170: 157 - 175.

- Karl, D.M. 2000. Aquatic ecology: phosphorus, the staff of life. *Nature* 406: 31–33.
- Kazmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D. y R. Tavera. 2011. Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies* DOI 10.1007/s10347-010-0255-8
- Kempe, S. y E.T. Degens. 1985. An early soda ocean?. *Chemical Geology* 53(1): 95-108.
- Kempe, S. y J. Kazmierczak. 1990. Chemistry and Stromatolites of the Sea-Linked Satonda Crater Lake, Indonesia - a Recent Model for the Precambrian Sea. *Chemical Geology* 81: 299–310.
- Kempe, S. y J. Kazmierczak. 1993. Satonda Crater Lake, Indonesia: Hydrogeochemistry and biocarbonates. *Facies* 28: 1–32.
- Kirkwood, D.S. 1994. Sanplus segmented flow analyzer and its applications. *Seawater analysis*. Skalar.
- Kolowith, L.C., Ingall, E.D. y R. Benner. 2001. Composition and cycling of marine organic phosphorus. *Limnology and Oceanography* 46:309–320.
- Kononova, S.V. y M.A. Nesmeyanova. 2002. Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry* 67: 220.
- Körnberg, A. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. In *Inorganic polyphosphates* (pp. 1-18). Springer Berlin Heidelberg.
- Leland, H.V. y W.R. Berkas. 1998. Temporal variation in plankton assemblages and physicochemistry of Devils Lake, North Dakota. *Hydrobiologia* 377: 57-71.
- Lim, B. L., Yeung, P., Cheng, C. Y J.E. Hill. 2007. Distribution and diversity of phytate-mineralizing bacteria. *The ISME journal* 1(4): 321-330.
- Luo, H., Benner, R., Longa, R.A. y J. Huc. 2009. Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 21219-21223. doi: 10.1073/pnas.0907586106.
- Luo, H.W., Zhang, H.M., Long, R.A. y R. Benner. 2011. Depth distributions of alkaline phosphatase and phosphonate utilization genes in the North Pacific Subtropical Gyre. *Aquatic Microbial Ecology* 62: 61-69.
- Macek, M., Alcocer, J., Lugo-Vázquez, A., Martínez-Pérez, M.E., Peralta Soriano, L. y G. Vilaclara Fatjó. 2009. Long term picoplankton dynamics in a warm-monomictic, tropical high altitude lake. *Journal of Limnology* 68(2): 183-192.
- Mancilla-Villa, O.R., Ortega-Escobar, H.M., Ramírez-Ayala, C., Uscanga-Mortera, E., Ramos-Bello, R. y A.L. Reyes-Ortigoza. 2012. Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28(1): 39-48.
- Millero, F.J. 1996. *Chemical Oceanography*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Martiny, J.B.H., Bohannan B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Adams Krumins, J., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Ovreas, L., Reysenbach, A-L., Smith, V.H. y J.T. Staley. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4: 102-112.
- Martínez, J. y F. Azam. 1993. Periplasmic aminopeptidase and alkaline phosphatase activities in a marine bacterium: implications for substrate processing in the sea. *Marine Ecology Progress series* 92: 89-97.

- Martiny, A.C., Coleman, M.L. y S.W. Chisholm. 2006. Phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* ecotypes: evidence for genome-wide adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 12552-12557.
- Massana, R., Murray, A.E., Preston, C.M. y E.F. DeLong. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Applied Environmental Microbiology* 63:50-6.
- Miller, T. R., Hnilicka, K., Dziedzic, A., Desplats, P. y R. Belas. 2004. Chemotaxis of *Silicibacter* sp. strain TM1040 toward dinoflagellate products. *Applied and environmental microbiology* 70(8) 4692-4701.
- Müller, G., Irion, G. Y U. Förstner. 1972. Formation and diagenesis of inorganic Ca- Mg carbonates in the lacustrine environment. *Naturwissenschaften* 59(4): 158-164.
- Moutin, T., Karl, D.M., Duhamel, S., Rimmelin, P., Raimbault, P., Van Mooy, B.A.S. y H. Claustre. 2007. Phosphate availability and the ultimate control of nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. *Biogeosciences Discuss* 4: 2407-2440.
- Paytan A. y K. McLaughlin. 2007. The oceanic phosphorus cycling. *Chemical Reviews* 107(2): 563-576.
- Ruttenberg, K.C. y S.T. Dyhrman. 2005. Temporal and spatial variability of dissolved organic and inorganic phosphorus, and metrics of phosphorus bioavailability in an upwelling-dominated coastal system. *Journal of Geophysics Research* 110: C10S13, doi 10.1029/2004JC002837.
- Scanlan, D.J. y W.H. Wilson. 1999. Application of molecular techniques to addressing the role of P as key effector in marine ecosystems. *Hydrobiologia* 401: 149-175.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., et al. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 75(23): 7537-41.
- Smith, S.V. 1984. Phosphorus versus nitrogen limitation in the marine environment. *Limnology and oceanography* 29(6): 1149-1160.
- Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. y M. Schaechter. 1990. *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*. Sunderland: Sinauer.
- Oseguera, L.A., Alcocer, J. y G. Vilaclara. 2010. Relative importance of dust inputs and aquatic biological production as sources of lake sediments in an oligotrophic lake in a semi-arid area. *Earth Surface Process and Landforms* 1-8. DOI: 10.1002/esp.2062.
- Oliva, M.G. Lugo, A., Alcocer, J., Peralata, L. y L.A. Oseguera. 2009. Planktonic bloomforming *Nodularia* in the saline Lake Alchichica, Mexico. *Natural Resources and Environmental Issues: Vol. 15, Article 22*. Available at: <http://digitalcommons.usu.edu/nrei/vol15/iss1/22>
- Oliva, M.G., Lugo, A., Alcocer, J., Peralta, L. y R. Sánchez. 2001. Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia* 466: 299-306.
- Overbeeke, N., Bergmans, H., van Mansfeld, F. y B. Lugtenberg. 1983. Complete nucleotide sequence of *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology* 163(4): 513-532.
- Paerl, H.W., Steppe, T.F. y R.P. Reid. 2001. Bacterially mediated precipitation in marine stromatolites.

Environmental Microbiology 3: 123–130.

Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E.E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E.A. y J. Waterbury J. 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. Nature 424:1037–1042.

Paytan, A. y K. McLaughlin. 2007. The oceanic phosphorus cycling. Chemical Reviews 107(2): 563-576.

Polz, M.F., Hunt, D.E., Preheim S.P. y D.M. Weinreich. 2006. Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 361(1475): 2009-2021.361: 2009-2021.

Ramírez-Olvera, M.A. Alcocer, J., Merino-Ibarra, M. y A. Lugo. 2009. Nutrient limitation in a tropical saline lake: a microcosm experiment. Hydrobiologia 626: 5-13.

Ramos-Higuera, E., Alcocer, J., Ortega-Mayagoitia, E. y A. Camacho. 2008. Nitrógeno: elemento limitante en un lago oligotrófico tropical. Hidrobiológica 18(1) suplemento: 105–113.

Reid, R.P., Visscher P.T., Decho, A.W., Stolz, J.F., Bebout, B.M., Dupraz, C., Macintyre, I.G., Paerl, H.W., Pinckney, J.L. y L. Prufert- Bebout. 2000. The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. Nature 406: 989–992.

Rengefors, K., Pettersson, K., Blenckner, T. y D.M. Anderson. 2001. Species-specific alkaline phosphatase activity in freshwater spring phytoplankton: Application of a novel method. Journal of Plankton Research 23: 435–443.

Reynolds, C.S. 1997. Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. Ecology Institute, Germany.

Sakurai, M., Wasaki, J., Tomizawa, Y., Shinano, T. y M. Osaki. 2008. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. Soil Science and Plant Nutrition 54: 62-71.

Schopf, J. W., Kudryavtsev, A. B., Czaja, A. D. Y A.B. Tripathi. 2007. Evidence of Archean life: stromatolites and microfossils. Precambrian Research 158(3): 141-155.

Sebastian, M. y J.W. Ammerman. 2009. The alkaline phosphatase *phoX* is more widely distributed in marine bacteria than the classical *phoA*. ISME Journal 3(5): 563-572.

Sebastián, M. y J.W. Ammerman. 2011. Role of the phosphatase PhoX in the phosphorus metabolism of the marine bacterium *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. Environmental microbiology reports, 3(5): 535-542.

Seegerer, A.H., Burggraf, S., Fiala, G., Huber, G., Huber, R, Pley, U. y K.O. Stetter. 1993. Life in hot springs and hydrothermal vents. Origins of Life and Evolution of Biospheres 23: 77–90.

Simek, K., Horák, K., Jezbera, J., Ma ěn, M., Nedoma, J., Gasol, J.M. y M. Schauer. 2005. Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster  $\beta$ -proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. Applied Environmental Microbiology 71: 2381–2390.

Simek, K., Hornák, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Vrba, J., Straskrbová, V., Macek, M., Dolan, J.R. y M.W. Hahn. 2006. Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. Environmental Microbiology 8(9): 1613-24.

Smit, A.L., Bindraban, P., Schröder, J.J., Conjin, J.G. y H.G.v.d. Meer. 2009. Phosphorus in agriculture: global resources, trends and developments. Plant Research International (Report 282): 36 p.

- Somlyo, A.P y A.V. Somlyo. 2000. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *Journal of Physiology* 15, 522(Pt 2): 177-185. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-2-00177.x.
- Souza, V., Eguiarte, L.E., Siefert, J. y J.J. Elser. 2008. Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation? *Nature Reviews Microbiology* doi:10.1038/nrmicro1917.
- Stotzky, G. y A.G. Norman. 1961. Factors limiting microbial activities in soil. *Archiv für Mikrobiologie* 40(4): 341-369.
- Strojsova, A., Vrba, J., Nedoma, N., Komarkova, J. y P. Znachor. 2003. Seasonal study of extracellular phosphatase expression in the phytoplankton of a eutrophic reservoir. *European Journal of Phycology* 38: 295-306.
- Sullivan, M. B., Coleman, M. L., Weigle, P., Rohwer, F. Y S.W. Chisholm. 2005. Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations. *PLoS biology* 3(5): e144.
- Suzuki, S., Ferjani, A., Suzuki, I. y N. Murata. 2004. The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expresión in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 13234-13240.
- Tan, H., Barret, M., Mooij, M.J., Rice, O., Morrissey, J.P., Dobson, A., Griffiths, B. Y F. O'Gara. 2013. Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the phoD phosphorus mineraliser group in pasture soils. *Biology and Fertility of Soils* 49(6): 661-672.
- Tavera, R. y J. Komárek. 1996. Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica. Puebla State, Mexico. *Algal Std.* 83: 511-538.
- Thingstad, F., Øvreas, L., Egge, J.K., Løvda, T. y M. Heldal. 2005. Use of non-limiting substrates to increase size; a generic strategy to simultaneously optimize uptake and minimize predation in pelagic osmotrophs? *Ecology Letters* 8: 675-682.
- Tipton, K.F. y H.B.F. Dixon. 1979. Effects of pH on enzymes, In: Daniel LP eds. *Methods in Enzymology* vol. Volume 63. Academic Press, pp. 183-234.
- Tyrell, T. 1999. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. *Nature* 400(5): 525-531.
- Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry* 10: 109-122.
- Van Bogelen, R.A., Olson, E.R., Wanner, B.L. y F.C. Neidhardt. 1996 Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178: 4344-4366.
- van Mooy, B.A.S., Rocap, G., Fredricks, H.F., Evans, C.T. y A.H. Devol. 2006. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 8607-8612.
- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., González, H. y M. Gaytán. 1993. Comparative description Basic chemistry of crater-lakes in Puebla State, México. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 25: 435-440.
- Von Kruger, W.M.A., Lery, L.M.S., Soares, M.R., de Neves-Manta, F.S., Silva, C., Neves-Ferreira, A.G.D. et al.

2006. The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* 01 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics* 6: 1495-1511.

Wanner, B.L. 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of cellular biochemistry* 51(1): 47-54.

Wuenchuan, Q., Dickman, M. y W. Sumin. 2001. Multivariate analysis of heavy metal and nutrient concentrations in sediments of Taihu Lake, China. *Hydrobiologia* 450(1-3): 83-89.

Wheeler, P.A. y D.L. Kirchner. 1986. Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnology and Oceanography* 31:998-1009.

Wollast, R. 1983. Interactions in estuaries and coastal waters. En: B. Bolin y R.B. Cook (eds). *The major biogeochemical cycles and their interactions*. Wiley-Interscience. Chichester, UK.

Young, C.L. y E.D. Ingall. 2010. Marine Dissolved Organic Phosphorus Composition: Insights from Samples Recovered Using Combined Electrodialysis/Reverse Osmosis. *Aquatic Geochemistry* 16: 563-574.

Zhou, J., Bruns, M.A. y J.M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied Environmental Microbiology* 62: 316-322.

## Anexo o

### Índice de Figuras y Tablas

#### Figuras

Fig. 1 Ciclo global del fósforo. Están señalados los reservorios y flujos principales tomando como modelo un sistema acuático. Fuente: Paytan y McLaughlin 2007.

Fig. 2 Formas del fósforo en los ambientes acuáticos. Se muestran los flujos generales de las formas disueltas (orgánicas, DOP e inorgánicas, DIP) y particuladas (POP y PIP) usando como modelo un sistema acuático (columna de agua y sedimentos) Fuente: Paytan y McLaughlin 2007.

Fig. 3 Transformaciones del fósforo por los microorganismos de sistemas acuáticos. El tamaño relativo de los reservorios de P en aguas oceánicas está señalado en la parte derecha de la figura, a la izquierda se observa el interior celular de un microorganismo acuático, así como las estrategias moleculares de los microorganismos para la remineralización, adquisición y metabolismo del fósforo. Fuente: Dyhrman *et al.* 2007.

Fig. 4 Micrografías de plancton marcado a partir de ensayos enzimáticos con marcadores fluorescentes (ELF, *enzyme labelled fluorescence*) y autofluorescencia. El color verde corresponde a precipitados fluorescentes de ELFA y el rojo corresponde a autofluorescencia (clorofila a) de células del fitoplancton. G) Una colonia de *Fragillaria crotonensis* con algunas células activas (estructuras lineales) con nanoflagelados heterotróficos adheridos (los puntos verdes) y arriba a la derecha una partícula de detrito marcada con ELFA; H) precipitados de ELFA dentro de colonia de *Woronichinia naegeliana*. Fuente: Strojsova *et al.* 2003

Fig. 5 Morfología de los dos microbialitos: tipo esponjoso (arriba) y tipo columnar (abajo) presentes en el lago de Alchichica. En la parte izquierda se presenta la morfología externa de los microbialitos expuestos mientras a la derecha se observa una sección de los microbialitos sumergidos (a una profundidad aproximada de 0.3 m).

Fig. 6 Utilizando hibridación *in-situ* se describe la presencia y actividad de la comunidad bacteriana en la columna de agua del lago Alchichica durante los periodos de circulación y estratificación. También se señala en el periodo de estratificación el potencial metabólico asociado a los procariontes según el gradiente redox (Fuente: Hernández-Avilés 2010).

Fig. 7 Esquema de muestreo en el lago Alchichica, Puebla, que muestra los sitios de colecta para los microbialitos columnar (EC) y esponjoso (EE), además del sitio de muestreo de la columna de agua (W) donde se colectó agua a 5 m, 25 m y 61 m durante la circulación (febrero 2011) y la estratificación (agosto 2011). En la parte inferior se muestra el diseño de colecta para el análisis de ADN y ARN totales.

Fig. 8 Marcadores genéticos de procariontes asociados con las transformaciones de fósforo (en cajas de color sobre el modelo general propuesto por Dyhrman *et al.* 2007, en blanco y negro). Están señaladas las fosfatasas alcalinas *phoX*, *phoA* y *phoD* así como las fosfatasas ácidas ACP, *surE* (adquisición de POD), el operón *phn*, *phnG* y *phnM*, además del sistema *ugp* (transformación de fosfonatos), los transportadores de baja afinidad por el fosfato (*pit*) y las enzimas *ppk* (síntesis y

degradación del polifosfato).

Fig. 9 Modelo conceptual del balance de fósforo en el lago Alchichica que muestra los principales flujos de fósforo en el sistema, así como la masa de fósforo total (PT) y el tiempo de residencia del P en la columna de agua. Las flechas vacías representan los flujos menos comprendidos.

Fig. 10 Condiciones fisicoquímicas generales y de nutrientes en la columna de agua del lago sódico Alchichica durante el periodo de circulación (azul) y de estratificación (rojo).

Fig. 11 Información sobre la reacción y las características de las fosfatasas alcalinas bacterianas *phoX* y *phoD* (Fuentes: Conserved Domains, NCBI; Protein Data Bank, BRENDA Database, Pfam, InterPro).

Fig. 12 Topología de máxima verosimilitud de las secuencias parciales *phoX* (aprox. 600 pb). Las secuencias de Alchichica (en magenta) de microbialitos y bacterioplancton muestran afinidad con fosfatasas alcalinas *phoX* de genomas de bacterias aisladas (negro), principalmente proteobacterias, y de estudios ambientales: marinas (azul), del lago Taihu, China (verde). Están señalados los valores de bootstrap > 600/1000.

Fig. 13 Topología de máxima verosimilitud de las secuencias parciales *phoD* (aprox. 350 pb). Las secuencias de Alchichica (en turquesa) de microbialitos y bacterioplancton muestran afinidad con fosfatasas alcalinas tipo *phoD* de genomas de proteobacterias aisladas (negro) del y de rizósfera (ocre). Están señalados los valores de bootstrap > 600/1000.

Fig. 14 Información sobre la reacción y las características de las fitasas alcalinas *BPP* bacterianas (Fuentes: Conserved Domains, NCBI; Protein Data Bank, BRENDA Database, Pfam, InterPro).

Fig. 15 Topología de máxima verosimilitud de las secuencias parciales *BPP* (3-fitasa; aprox. 200 pb). Las secuencias de Alchichica (en verde) de microbialitos y bacterioplancton muestran afinidad con fosfatasas alcalinas tipo *BPP* de genomas de bacterias aisladas (negro) de los grupos Bacteroidetes y Gammaproteobacteria y de estudios ambientales (suelo, sedimento, sistemas acuático continental e intestino de carpa (en negro)).

Fig. 16 Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales *phoX* de Alchichica, microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación (96% de similitud).

Fig. 17 Divergencia de las secuencias parciales *phoX* de microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación del lago Alchichica (secuencias únicas y a 95% de similitud).

Fig. 18 Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales *phoD* de Alchichica, microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación (75% de similitud).

Fig. 19 Divergencia de las secuencias parciales *phoD* de microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación del lago Alchichica (secuencias únicas y a 75% de similitud).

Fig. 20 Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales *BPP* (3-fitasa) de Alchichica, microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación (95% de similitud).



Fig. 21 Divergencia de las secuencias parciales BPP (3-fitasa) de microbialitos y bacterioplancton en el ciclo intra-anual circulación-estratificación del lago Alchichica (secuencias únicas, 95% y 89% de similitud).

Fig 22. Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales *phoX* de estudios ambientales (NCBI, enero de 2013). En la parte inferior se señala el gradiente de la proporción Mg:Ca entre ambientes (90% de similitud).

Fig. 23 Diagrama de Venn que muestra las interacciones entre los grupos de secuencias parciales BPP (3-fitasa) de estudios ambientales (NCBI, enero de 2013): suelo forestal (FS), suelo vegetal o agrícola (VS), suelo glaciario (GS), sedimentos de un sistema acuático continental (PS), ambiente acuático continental (AE), intestino de carpa (I) y lago Alchichica (A), (90% de similitud).

Fig. 24 Divergencia de las secuencias parciales BPP (3-fitasa) de estudios ambientales (NCBI, octubre 2014). Secuencias de suelo forestal (FS), suelo vegetal o agrícola (VS), suelo glaciario (GS), sedimentos de un sistema acuático continental (PS), ambiente acuático continental (AE), intestino de carpa (I) y del lago Alchichica (A). (90% de similitud).

Fig. 25 Comunidad potencial vs. comunidad funcional. Secuencias parciales *PhoD* de Alchichica en ADN metagenómico (negro) y transcritos en ARN total (anaranjados). Topología BioNeighbor Joining de 200 secuencias de aprox. 350 pb. Distribución porcentual de la expresión del marcador *PhoD* en el ciclo diurno (abajo).

Fig. 26 Patrón de expresión en el ciclo diurno (distribución porcentual) de los marcadores *PhoD*, *PhoX* (B) y 3-fitasa BPP (C) en el ciclo diurno.

Fig. 25 Proporción entre secuencias únicas: OTUs en los conjuntos de secuencias de Alchichica y de diferentes estudios ambientales.

## Tablas

Tabla 1 Oligos degenerados utilizados en este estudio: fosfatasa alcalina (*phoX* y *phoD*), fitasa (BPP) y polifosfato cinasa (*ppk1*)

Tabla 2 Condiciones de PCR para la amplificación de los marcadores seleccionados con oligos degenerados en muestras ambientales (ADN metagenómico).

Tabla 3 Genes y proteínas involucrados en el metabolismo del fósforo

Tabla 4 Presencia en los principales grupos de arqueas y bacterias, además de protistas fotosintéticos, del dominio Metalofosfoesterasas (MPE), las familias de proteínas fosfatasa alcalina tipo *PhoD*, *PhoX*; el dominio fosfatasa alcalina (AP) y las familias de proteínas fosfonoacetato hidrolasa *PhnA*, fosfatasa ácida *SurE* y fosfatasa ácida púrpura hierro/zinc (PAP). Fuente: Base de datos EMBI, octubre de 2012.

Tabla 5 Condiciones fisicoquímicas de la zona litoral y del epilimnion del lago Alchichica en los periodos: Estratificación y Circulación. Los valores de la zona litoral representan el promedio de 12

estaciones distribuidas en la periferia del lago.

Tabla 6 Composición elemental de los microbialitos del lago Alchichica

Tabla 7 Principales flujos asociados al ciclo del P en el lago Alchichica en una base anual

Tabla 8 Balance de P en el lago Alchichica en escala anual

Tabla 9 Balance de la masa total de P en el lago Alchichica y el flujo hacia los sedimentos

Tabla 10 Fosfatasas alcalinas bacterianas *phoX*, *phoD* y fitasa *BPP* de los ensamblajes microbianos analizados en el presente estudio, así como de diferentes estudios ambientales (GenBank). Se señalan las características de los conjuntos de secuencias parciales de cada marcador, así como indicadores de su diversidad

Tabla 11 Afiliación filogenética más cercana de los transcritos de los marcadores *PhoD*, *PhoX* y 3-*fitasa BPP* del componente bacteriano de los microbialitos esponjosos del lago Alchichica

Tabla 12 Resumen de las secuencias a partir de microbialitos y bacterioplancton obtenidas en el presente estudio