



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Aislamiento y caracterización de la diversidad de bacterias sulfato reductoras durante el Evento de Emblanquecimiento “Whiting Event” en el lago cráter Atexcac, Puebla

Tesis

Que para obtener el título de

Biólogo

Presentan:

Lorena Escobar Limón

Jesus Torres Huesca

Área: Limnología (Limnoecología microbiana)

M. en C. Jorge Antonio Valdivia Anistro
Director de Tesis

Dr. Justo Salvador Hernández Avilés
Asesor de Tesis

México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México; en especial, a la Carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por la formación académica y profesional brindada.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN219313 con el proyecto: Dinámica del plancton procariota en lagos monomícticos cálidos volcánicos en la Cuenca Oriental Puebla. Agradecemos el apoyo económico recibido de la DGAPA-UNAM, para la adquisición de materiales, reactivos y trabajo de campo en la realización de la presente tesis.

A nuestro director de tesis, M. en C. Jorge Antonio Valdivia Anistro, por el apoyo, la orientación y el tiempo que nos brindó durante la realización de este trabajo.

Agradecemos a nuestro asesor de tesis, Dr. Justo Salvador Hernández Avilés, por ofrecernos atención, apoyo y amistad, así como hacernos partícipes de su equipo de trabajo y compartirnos su conocimiento e interés por la Limnología.

A nuestros sinodales: Biól. Angélica Elaine González Schaff, Dra. Bertha Peña Mendoza y Dr. Antonio Valencia Hernández por sus comentarios, observaciones y tiempo dedicado durante la revisión de nuestra tesis.

Dedicatorias

A mis padres, Marco Antonio y Patricia, por la confianza y el apoyo brindados en cada una de mis decisiones, por el esfuerzo y el amor con los que mantienen unida a nuestra familia. Este trabajo también es de ustedes, que me dieron las herramientas y los valores para alcanzar cada meta. A mis hermanas, Andrea y María Fernanda, por sus enseñanzas y porque siempre que las necesito están presentes de una u otra forma. Gracias por escucharme y aconsejarme y, lo más importante, por molestar como solo una hermana mayor puede hacerlo. A ustedes, los quiero muchísimo y sé que en cada etapa de mi vida estarán presentes.

A Jesús, gracias mi amor por brindarme siempre tu apoyo, tu amistad y cariño. Quiero agradecer tus enseñanzas, por escucharme y por tu tiempo. Realizar esta tesis a tu lado fue una experiencia muy bonita y satisfactoria, que refleja el esfuerzo y la entrega de ambos. Gracias por tu compañía de tantos años, te amo mucho.

A todos mis compañeros del laboratorio de limnoecología, que a pesar de que no compartimos el mismo tiempo por la diferencia de generaciones, les doy las gracias por las experiencias divertidas y de trabajo, tanto en campo como en el laboratorio, hicieron de mi estancia una experiencia agradable y crearon bonitos recuerdos.

A mis amigos, Andrea, David, Itzamaray, Karolina, Aarón, Giovanna, César y Wendoline, que estuvieron conmigo desde el primer semestre, gracias por todos los momentos que pasamos juntos, por su amistad, cariño y apoyo.

Al Doctor Justo Salvador, gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por sus enseñanzas en el ámbito de la Limnología y por brindarme su amistad.

Al Maestro Jorge Antonio, por guiarme durante este proyecto, por sus enseñanzas y su apoyo.

Lorena Escobar Limón.

Dedicatorias

Esta investigación, la dedico primeramente a mi familia, a mis papas Jesús y Martha, por ser unos padres ejemplares y haberme dado las primeras enseñanzas en mi vida, brindarme una educación en diferentes ámbitos, mostrarme como ser una persona responsable y de bien, y demostrarme que cuento con ellos. Si hoy estoy cumpliendo mis objetivos, es porque ustedes sentaron las bases para ello.

A mi hermana Bety y a mi cuñado Jesús por haberme apoyado en todo momento, puedo decir que, el que este hoy en día cerrando un ciclo importante en mi vida, ha sido en gran manera gracias a su incondicional respaldo, ayuda y consejos. Así mismo por enseñarme a ser una persona generosa en todo momento, hasta cuando se torna difícil el serlo, creo que ustedes son un ejemplo a seguir, como familia, profesionales y amigos.

A mi hermana Carmen, por su singular apoyo, ya que cuando tenía la posibilidad de hacerlo, siempre me lo brindo. A mi cuñado Hans, por ofrecer su mano cuando lo necesitaba, y aun cuando no, el siempre estar atento y dispuesto a hacerlo, también al ser compañeros de profesión por sus anécdotas, experiencias, pláticas y consejos. A mi hermana más pequeña Catalina, por ser el costal de box, que siempre estuvo ahí para relajarme, y por mostrar apoyo cuando tenía la posibilidad.

A la mujer que se ha vuelto parte de mi familia los últimos 5 años, (prácticamente desde que inicie la licenciatura) con la que he compartido unos años fantásticos, ya que con su ayuda me he convertido en una mejor persona y me has dado enseñanzas muy valiosas. La vida ha querido que cierre este ciclo a tu lado y por supuesto que es todo un placer, gran parte de esta investigación es por ti, tu arduo trabajo está en estas páginas, y me da gusto ser partícipe de esto, ya que esta investigación es una creación de los dos. Por eso doy gracias a la vida, por permitirme conocerte y por volverte una parte importante de mi vida. Gracias Lorena.

A la familia Escobar Limón, por compartir los últimos años conmigo, y hacerme sentir como en una segunda familia. A la familia Rosales Vega, por su comprensión y apoyo durante mi carrera, me han dejado un gran aprendizaje sobre la generosidad y amabilidad.

A mis amigos de toda la vida, Daniel, José Luis, Francisco, Rodolfo, Christopher, que aunque nuestros caminos sean ampliamente distanciados, sé que puedo contar con ustedes en todo momento. A compañeros y amigos biólogos, Andrea, Wendy, House, Karo, Itza, Giovanna y a gran parte de mi equipo Kannabis, Aaron, Adrián, Ovando, Aquino, Gen, Gio, por hacer divertida y amena mi carrera. Al equipo de laboratorio de Limnoecología microbiana (que son muchos y no acabaría si los pongo a todos) por enseñarme, dejarme enseñarles, permitirme ser parte de su camino a ser profesionales, y hacer unos semestres finales divertidos y gratos.

Al Doctor Salvador, no solo por ser un asesor responsable, confiable, enseñarme todo lo que estuvo en sus manos y darme las bases para continuar en mi ámbito profesional, sino también por brindarme su amistad incondicional, sus consejos y anécdotas de la vida, fue un privilegio el trabajar en su laboratorio. A mi director de Tesis Jorge, por sus enseñanzas, asesoría, y consejos en esta investigación.

Jesus Torres Huesca.

“Sorprendernos por algo es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento”

Louis Pasteur

“Es todo muy pequeño –microorganismos o partículas elementales- o demasiado grande- galaxias o estrellas-, mundos completamente invisibles para nosotros, y que la ciencia explica su naturaleza y crea nuevos mundos que no percibimos con nuestros sentidos”

Marcelo Gleiser

“A una escala muy pequeña, las cosas dejan de comportarse como cualquier cosa de la que tengamos experiencia directa”

Richard Feynman

Contenido

Introducción	1
Antecedentes	4
Zona de estudio.....	6
Planteamiento del problema	8
Justificación	8
Hipótesis.....	9
Objetivos	9
Material y método.....	10
Muestreo.....	10
Valoración de parámetros in situ	11
Nutrimentos	11
Procesamiento de muestras para los análisis microbiológicos.....	12
Clasificación por morfología colonial y cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	13
Aislamiento de los morfotipos coloniales	14
Purificación y obtención de cultivos axénicos.....	14
Cuantificación de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) por Sistema de Detección Enzimática	14
Caracterización fenotípica.....	15
Análisis estadístico	15
Resultados	15
Muestreo.....	15
Parámetros físico-químicos.....	16
Temperatura y oxígeno disuelto	16
pH y alcalinidad	19
Dureza total, dureza permanente, dureza temporal y dureza de calcio	21
Conductividad eléctrica y Total de Sólidos Disueltos (TSD)	24
Sulfatos.....	25
Análisis microbiológico.....	28
Descripción y clasificación por morfología colonial	28
Cuantificación y aislamiento	33
Cuantificación de bacterias	33
Sistema de Detección para Bacterias Sulfato Reductoras (BSR).....	38
Caracterización fenotípica.....	40

Correlaciones físico-químico-biológicas (Prueba de Spearman).....	42
Discusión	45
Parámetros físico-químicos.....	45
Temperatura y oxígeno disuelto	45
pH y alcalinidad	46
Dureza total, dureza permanente, dureza temporal y dureza de calcio	48
Conductividad eléctrica y Total de Sólidos Disueltos (TSD)	50
Sulfatos.....	51
Análisis microbiológico.....	53
Descripción y clasificación por morfología colonial	53
Cuantificación y aislamiento	55
Cuantificación de bacterias	55
Sistema de Detección para Bacterias Sulfato Reductoras (BSR).....	57
Caracterización fenotípica.....	58
Correlaciones físico-químico-biológicas (Prueba de Spearman).....	60
Conclusiones	62
Perspectivas	63
Referencias.....	65
Anexos.....	73
Anexo 1: Aspecto físico del lago cráter Atexcac a través de los meses de muestreo.....	73
Anexo 2: Medio de Cultivo “Bacterias Sulfato Reductoras”	76
Anexo 3: Descripción y clasificación de morfotipo colonial.....	77
Anexo 4: Caracterización fenotípica de Bacterias Sulfato Reductoras para el lago cráter Atexcac, Puebla.....	78

Índice de figuras

Fig. 1 . Proceso de oxidación y reducción del azufre (tomado y modificado de Freyre, 2006).....	1
Fig. 2. Ciclo del azufre (tomado de Muyzer y Stams, 2008).	2
Fig. 3. Árbol filogenético de microorganismos con metabolismo del azufre (tomado de Sievert et al., 2007).....	3
Fig. 4. Ubicación del lago cráter Atexcac en el estado de Puebla, México (Google Earth, 2015).....	7
Fig. 5. Ubicación de Atexcac, al Noroeste se pueden apreciar otros lagos cráter de la Cuenca Oriental de Puebla. Alchichica, Preciosa (Las Minas) y Quechulac (tomado de Google Earth, 2015).....	7
Fig. 6. Zona de estudio, lago volcánico Atexcac, Puebla. Ubicado en las coordenadas geográficas 19°20'N y 97°27'W, con una altitud de 2340 m. Área superficial (0.29 km ²) y un volumen (6.15*10 ⁶ m ³), con una profundidad máxima de 39 m (tomado de Google Earth, 2015).	8
Fig. 7. (A) Forma de muestreo con botella Van Dorn, (B) determinación de oxígeno disuelto con ayuda de un oxímetro Hach y botella Winkler obscura.	10
Fig. 8. Ejemplo de un perfil vertical de temperatura y oxígeno disuelto para determinar las profundidades de muestreo de las Bacterias Sulfato Reductoras.	11
Fig. 9. Desarrollo de la técnica de sulfatos por el método turbidimétrico.....	12
Fig. 10. Preparación de placas de cultivo. (A) diluciones seriadas, (B) medio de cultivo, (C) placas servidas en una campana de extracción estéril.	13
Fig. 11. (A) Clasificación de morfotipos coloniales, (B) conteo de UFC's.	13
Fig. 12. Purificación por el método de estría abierta.	14
Fig. 13. Sistema de detección de Bacterias Sulfato Reductoras.....	15
Fig. 14. Perfiles verticales espacio-temporales de temperatura y oxígeno disuelto (mayo-agosto), las líneas punteadas indican el inicio y final de la termoclina (rojo) y oxiclina (azul).	17
Fig. 15 Perfiles verticales espacio-temporales de temperatura y oxígeno disuelto (agosto-septiembre), las líneas punteadas indican el inicio y final de la termoclina (rojo) y oxiclina (azul).	18
Fig. 16. Comportamiento de la alcalinidad promedio y el pH promedio en los diferentes estratos y meses de muestreo.	20
Fig. 17. Comportamiento espacio-temporal de los diferentes tipos de dureza (total, permanente, temporal y de calcio). Se presentan concentraciones promedio con sus respectivas desviaciones.	22
Fig. 18. Concentraciones promedio y desviaciones respectivas de la dureza de calcio a través de los estratos de la columna de agua y los meses de muestreo.	23
Fig. 19. Comportamiento de los sulfatos a través de los estratos de la columna de agua y del tiempo de muestreo.	26

Fig. 20. Relación entre los sulfatos y la alcalinidad durante los diferentes meses de estudio.....	27
Fig. 21. Diversidad de morfotipos obtenidos: (A) moroftipo H, (B) morfotipo I, (C) morfotipo AC, (D) morfotipo AJ, (E) morfotipo E, (F) morfotipo L, (G) morfotipo K, (H) morfotipo A, (I) morfotipo W. Cabe destacar que los morfotipos H, AJ y AC son importantes en el Evento de Emblanquecimiento.....	30
Fig. 22. Cuantificación promedio de UFC's en los diferentes estratos muestreados.	35
Fig. 23. Cuantificación promedio de UFC's en los distintos estratos muestreados.	36
Fig. 24. Cuantificación detallada de Unidades Formadoras de Colonias durante los meses de agosto y septiembre (Evento de Emblanquecimiento).	37
Fig. 25. Sistema de detección de Bacterias Sulfato Reductoras perteneciente al Evento de Emblanquecimiento.....	38
Fig. 26. Cuantificación de células mediante el sistema de detección, en los meses de agosto y septiembre (Evento de Emblanquecimiento) tomados en diferentes profundidades de la columna de agua.	39
Fig. 27. Diagramas de agrupamiento de las pruebas metabólicas a lo largo de los meses de muestreo.	41

Índice de tablas

Tabla 1. Variabilidad de la conductividad eléctrica y el Total de Sólidos Disueltos durante los meses de muestreo.....	24
Tabla 2. Clasificación total por morfología colonial.	29
Tabla 3. Tipos de morfotipos presentes en los distintos meses de muestreo según la disponibilidad de oxígeno (medio de cultivo óxico).	31
Tabla 4. Tipos de morfotipos presentes en los distintos meses de muestreo según la disponibilidad de oxígeno (medio de cultivo anóxico).	32
Tabla 5. Morfotipos frecuentes bajo condiciones de crecimiento óxicas.....	34
Tabla 6. Correlaciones significativas entre parámetros físico-químicos y morfotipos. Los datos en rojo indican el P-value.	43
Tabla 7. Correlaciones significativas entre diferentes morfotipos. Los datos en rojo indican el P-value.	44

Introducción

El azufre (S) es uno de los elementos principales de la Tierra y tiene un rango de valencias que va de -2 (sulfuro y azufre orgánico reducido) a +6 [sulfato] (Atlas y Bartha, 2002), siendo el sulfato la forma oxidada más estable. Las formas inorgánicas reducidas de azufre con estados de oxidación de -2 a 0 son comunes en ambientes anóxicos (Sievert *et al.*, 2007).

El ciclo del azufre es mediado por microorganismos, los cuales ocupan los compuestos del azufre para llevar a cabo su metabolismo. Estos componentes pueden ser usados como aceptores o donadores de electrones en procesos conocidos como: reducción del sulfato/azufre (por bacterias sulfato reductoras quimiorganotróficas) y oxidación del azufre [por bacterias sulfurosas quimiolitotróficas] (Sievert *et al.*, 2007; Muyzer y Stams, 2008). El primer proceso es estrictamente anaeróbico y el segundo puede ocurrir tanto aeróbica como anaeróbicamente; de modo que, en la forma aeróbica da una oxidación biológica con ayuda del oxígeno o nitrato que actúan como aceptores de electrones, mientras en la forma anaeróbica la oxidación es responsabilidad de microorganismos fotótrofos (fotoreducen el CO₂ mientras oxidan los componentes del azufre, denominado fotosíntesis anoxigénica) [Figura 1] (Freyre, 2006; Sievert *et al.*, 2007).

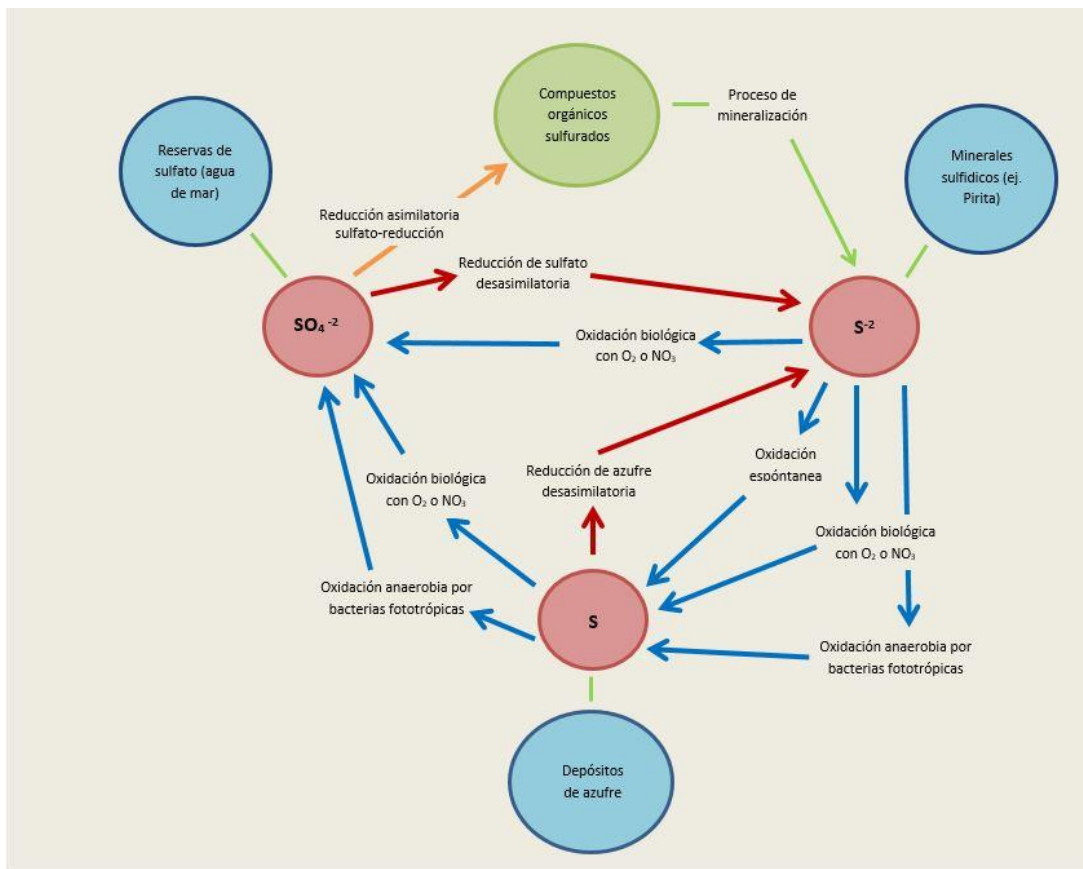


Fig. 1. Proceso de oxidación y reducción del azufre (tomado y modificado de Freyre, 2006).

El azufre constituye alrededor del 1% del peso seco de los organismos, siendo el sulfato la forma que es utilizada como nutriente y que es reducido a sulfhídrido; además de ser un componente importante en algunas proteínas (aminoácidos, cisteína y metionina), en coenzimas (coenzima A, biotina y tiamina) y en la formación de grupos azufre-hierro en metaloproteínas (Atlas y Bartha, 2002; Sievert *et al.*, 2007; Muyzer y Stams, 2008).

Los microorganismos pueden usar el azufre inorgánico, como por ejemplo el sulfato, para formar compuestos orgánicos en procesos dependientes de energía, conocido como *Asimilación*. Además diversos microorganismos de ambos Dominios procariontes (Bacteria y Arquea) usan el azufre en reacciones energéticas, llamadas metabolismo desasimilatorio del azufre (Sievert *et al.*, 2007).

El ciclo del azufre depende de las actividades metabólicas y filogenéticas de los microorganismos. Uno de los resultados son los lazos del ciclo con otros, como el carbono, nitrógeno, fósforo y hierro [Figura 2] (Sievert *et al.*, 2007).

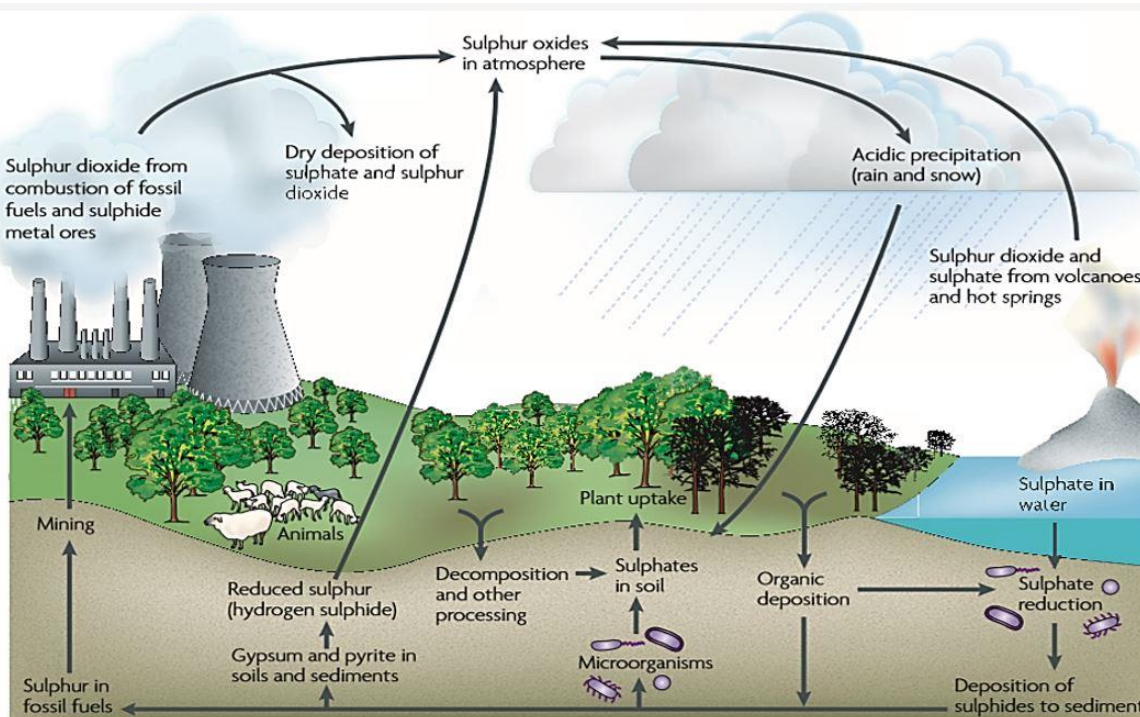


Fig. 2. Ciclo del azufre (tomado de Muyzer y Stams, 2008).

Filogenéticamente, los microorganismos que participan en los procesos de metabolización y recirculación del azufre se encuentran distribuidos entre grandes linajes [Figura 3] (Sievert *et al.*, 2007). De esta manera, una gran parte de los géneros de sulfato reductoras son encontrados dentro de δ -Proteobacteria y linajes como Nitrospiraceae, Thermodesulfobacteriaceae y Thermodesulfobiceae, principalmente (Muyzer y Stams, 2008).



Fig. 3. Árbol filogenético de microorganismos con metabolismo del azufre (tomado de Sievert et al., 2007).

Cuando las bacterias anaerobias estrictas llevan a cabo la reducción desasimilatoria de sulfatos, se dice que son reductoras de sulfato o sulfurógenas (Atlas y Bartha, 2002).

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) han sido organismos importantes durante la historia evolutiva de la Tierra (la cual se formó hace 4600 millones de años aproximadamente). Así mismo la evidencia isotópica indica que el proceso de reducción de sulfato evolucionó antes que la fotosíntesis oxigénica por cianobacterias que apareció hace 3700 millones de años. Por otra parte, inicialmente se consideraba que las BSR eran heterótrofos anaerobios estrictos; sin embargo, han sido descritas algunas BSR que tienen la capacidad de tolerar y realizar sus procesos metabólicos en presencia de oxígeno (Baumgartner et al., 2006; Braissant et al., 2007).

Las BSR son un grupo heterogéneo de microorganismos que comprenden a bacterias y arqueas que habitan primordialmente ecosistemas anaerobios y que por consiguiente utilizan el sulfato como aceptor final de electrones (Hansen, 1994) para la transformación de componentes orgánicos, generando sulfhidrilo como compuesto final de su metabolismo (Muyzer y Stams, 2008). La reducción de sulfato se puede dar en un

amplio margen de pH, presión, temperatura y salinidad (Atlas y Bartha, 2002). A pesar de que el sulfato es la principal fuente de energía para su crecimiento, la mayoría de las BSR no son exclusivamente quimiolitótrofos. Así también, las BSR carecen de sistemas enzimáticos para la fijación del dióxido de carbono (CO₂), ya que utilizan diversas fuentes de carbono orgánico. La reducción del sulfato es inhibida por la presencia de iones oxígeno, nitrato o materiales férricos. La tasa de reducción del sulfato a menudo está limitada por el carbono. Estos microorganismos pueden metabolizar una variedad de compuestos que van del hidrógeno por la vía de fermentación orgánica, hasta varios tipos de compuestos aromáticos. Todos los reductores de sulfato activan el sulfato a 5'-fosfosulfato de adenosina [APS] (Atlas y Bartha, 2002).

El hecho de que las BSR hayan sido clasificadas como anaerobias estrictas es porque inicialmente fueron descritas en las capas más profundas de los tapetes microbianos y del fondo del lecho de sistemas acuáticos; sin embargo, algunos estudios han demostrado que también son tolerantes al oxígeno, esto ha afectado un poco la percepción de su efecto sobre la litificación y precipitación de carbonato (Eschemann *et al.*, 1999; Baumgartner *et al.*, 2006). Esto último conlleva a un proceso o fenómeno estudiado en las últimas décadas denominado "Whiting Event" del que se tiene la teoría que las bacterias sulfato reductoras tienen un campo de acción (Thompson *et al.*, 1997; Thompson, 2009). Destacando la importancia que tienen estas en los ciclos biogeoquímicos, concretamente el de carbono y el azufre (Sass *et al.*, 1998).

El "Whiting event" (Evento de Emblanquecimiento) se produce en lagos tropicales y subtropicales con condiciones alcalinas por la precipitación inorgánica de carbonatos (Thompson *et al.*, 1997; Sondi y Juračić, 2010). En grandes lagos como Ontario, Erie y Michigan (Estados Unidos y Canadá), la precipitación ocurre a finales del verano y principios del otoño (julio-septiembre) (Hodell *et al.*, 1998). Durante este Evento, el CO₂ se encuentra limitado y no puede ser utilizado por los microorganismos fotoautótrofos como fuente de carbono, por lo que aprovechan los bicarbonatos que están en mayor abundancia y son utilizados para llevar a cabo la fotosíntesis (Sondi y Juračić, 2010; Couradeau *et al.*, 2012).

En años recientes el Evento de Emblanquecimiento se ha observado en el lago Atexcac (Arellano y González, 2011; Lagunas y Martínez, 2015), por lo que sería importante el estudio de la diversidad y distribución de bacterias sulfato reductoras a lo largo de la columna de agua durante dicho fenómeno, como probables participantes en este proceso.

Antecedentes

Un lago cráter o *maar* surge de la explosión del cráter debido al contacto del magma con el agua del manto freático (Armienta *et al.*, 2008). En México existe una cantidad importante de estos lagos, como los que se encuentran en las cercanías del valle de

Santiago, el lago cráter de Tacámbaro (Guanajuato), las calderas del Valle de México y los lagos cráter de la Cuenca Oriental de Puebla (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983).

Los lagos cráter han sido estudiados ampliamente en otros países (Brock y Brock, 1971; Baross *et al.*, 1982; Wendt y Koschorrek, 2002; Gaidos *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2008; Gaidos *et al.*, 2009; Zenskaya *et al.*, 2010). Sin embargo, en México los primeros estudios realizados sólo describen su geología y origen; por ejemplo, en los Axalapazcos de Puebla (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983). Actualmente, la investigación de estos lagos se ha enfocado a la descripción de las comunidades microbianas, como en el Lago Isabela, Nayarit (Alcocer *et al.*, 1998); o del fitoplancton en el lago la Alberca de Tacámbaro, Michoacán (Hernández-Morales *et al.*, 2011). En cuanto a los lagos cráter de la Cuenca Oriental en Puebla, sólo se han realizado trabajos relacionados con el fitoplancton del lago de Alchichica (Oliva *et al.*, 2001; Alcocer, 2008), y algunos estudios sobre ciliados en los lagos de Alchichica y Atexcac (Macek *et al.*, 1994; Mayén-Estrada, 2014).

En cuanto a las bacterias sulfato reductoras (BSR), se han realizado algunas investigaciones que describen su diversidad y abundancia. Debido a que el lago cráter Alchichica presenta una alta concentración de sulfatos, las BSR son abundantes en la oxiclina e hipolimnion anóxico, pertenecientes a la clase γ -Proteobacteria del orden *Desulfovibrionales* (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). En otros estados del país, estas bacterias han sido descritas en esteras microbianas, lodos y geysers en el sistema hidrotermal Los Azufres (Michoacán), donde se identificaron especies de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfurella*, *Thermodesulfobium* y *Thermodesulfobacterium* (Brito *et al.*, 2014).

Investigaciones previas mencionan que la diversidad de BSR está participando en procesos de litificación en tapetes microbianos, donde se combinan los procesos metabólicos de estas bacterias con cianobacterias y otros heterótrofos aeróbicos; promoviendo la precipitación y disolución de carbonato de calcio (Baumgatner *et al.*, 2006). Las BSR facilitan el incremento de la cantidad (o disponibilidad) de iones carbonato en solución, ya que al consumir sulfato y producir sulfuro aumenta el pH y por tanto la alcalinidad. Esto podría justificar la tolerancia al oxígeno que ha sido observada en bacterias del género *Desulfovibrio*, principalmente (Baumgatner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007).

De esta manera las BSR pueden ser consideradas como el "motor ambiental" que sustenta la precipitación de carbonatos y que proporcionan la formación de sitios de nucleación heterogénea, como ocurriría en los tapetes microbianos (Braissant *et al.*, 2007).

El uso de medios de cultivo que permiten el crecimiento y aislamiento de los microorganismos, es una técnica antigua que presenta grandes limitantes, debido a que no más del 1% de las bacterias logran desarrollarse (Muyzer y Stams, 2008). A pesar de

esto, es una técnica eficiente que permite comprobar la existencia de los microorganismos a través de su combinación con métodos moleculares y, en conjunción con un análisis comparativo de secuencias 16S rRNA se puede obtener la filogenia de dichos organismos. De modo tal, que este análisis comparativo de secuencias ha logrado agrupar a las bacterias sulfato reductoras (conocidas) en siete linajes filogenéticos, cinco dentro del Dominio Bacteria y dos dentro del Dominio Arquea. En Bacteria, la mayoría de las BSR pertenecen a los 23 géneros de β -Proteobacteria, mientras el resto de sulfato reductoras se encuentra dividido entre los linajes de Gram positiva, dentro de Clostridia (géneros *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* y *Desulfosporomusa*); Gram negativas como Nitrospirae (género *Thermodesulfovibrio*), de Thermodesulfobacteria (género *Thermodesulfobacterium*); y de Thermodesulfobiaceae (género *Thermodesulfobium*). Mientras que en Arquea, las BSR pertenecen al linaje Euryarchaeota (género *Archaeoglobus*) y al linaje Crenarchaeota (géneros de *Thermocodium* y *Calditerrivirga*) (Muyzer y Stams, 2008).

Zona de estudio

El lago Atexcac pertenece a la Cuenca Oriental de Puebla, y es uno de los seis lagos cráter tipo maar, conocidos como los Axalapazcos [Figura 4], ocupando la quinta posición en área superficial (0.29 km²) y volumen (6.15*10⁶ m³), con una profundidad máxima de 39m [Figura 5], se localiza en el extremo Oriente del Altiplano Mexicano limitando al Este con el Cofre de Perote y el Pico de Orizaba y al Norte con la caldera Los Humeros y las Derrumbadas. Se ubica en las coordenadas geográficas 19°20'N y 97°27'W. Su altitud es de 2340 m. En el poblado de San Luis Atexcac, Municipio Guadalupe Victoria, en el estado de Puebla. Su forma es irregular aproximándose a una elipse con una longitud máxima de 780 metros suroeste-noroeste [Figura 6] (Arredondo-Figueroa, 2002; Macek *et al.*, 2007).

La interacción entre la latitud y altitud condiciona un tipo de clima templado subhúmedo con lluvias en verano (Köppen modificado por García, 2004). Su precipitación promedio anual es inferior a 500 mm. En su mayor parte, la vegetación nativa ha sido sustituida por cultivos agrícolas principalmente en las paredes elevadas. De la vegetación original se conservan algunos pinos, mientras que en el cráter predomina la yuca (*Yucca sp* y *Nolina sp*), además de matorral desértico con magueyes (*Agave lechuguilla*, *Agave spp*), y nopales [*Opuntia spp*] (Macek *et al.*, 2007).

El lago Atexcac tiene un nivel trófico poco productivo u oligotrófico y, al igual que el lago cráter Alchichica (perteneciente a la Cuenca Oriental), se comporta como monomítico cálido esto es, presenta una etapa de circulación asociada al invierno hemisférico (enero a marzo), permaneciendo estratificado el resto del año con una temperatura alrededor de los 15 °C (Macek *et al.*, 2007; Alcocer *et al.*, 2008).

Es un lago atalasoalino (con sales de origen no marino), alcalino, con una predominancia de cloruro y carbonatos sobre bicarbonatos y sulfato, así como de sodio y

magnesio sobre potasio y calcio. La temperatura del agua es templada y oscila de 14.6 a 22 °C a lo largo del año, el oxígeno disuelto fluctúa de la anoxia (0.0 mgL⁻¹) en el hipolimnion a cantidades muy elevadas (10 mgL⁻¹) en el epilimnion. El hipolimnion generalmente presenta anoxia a partir de mayo-junio (Macek *et al.*, 2007).

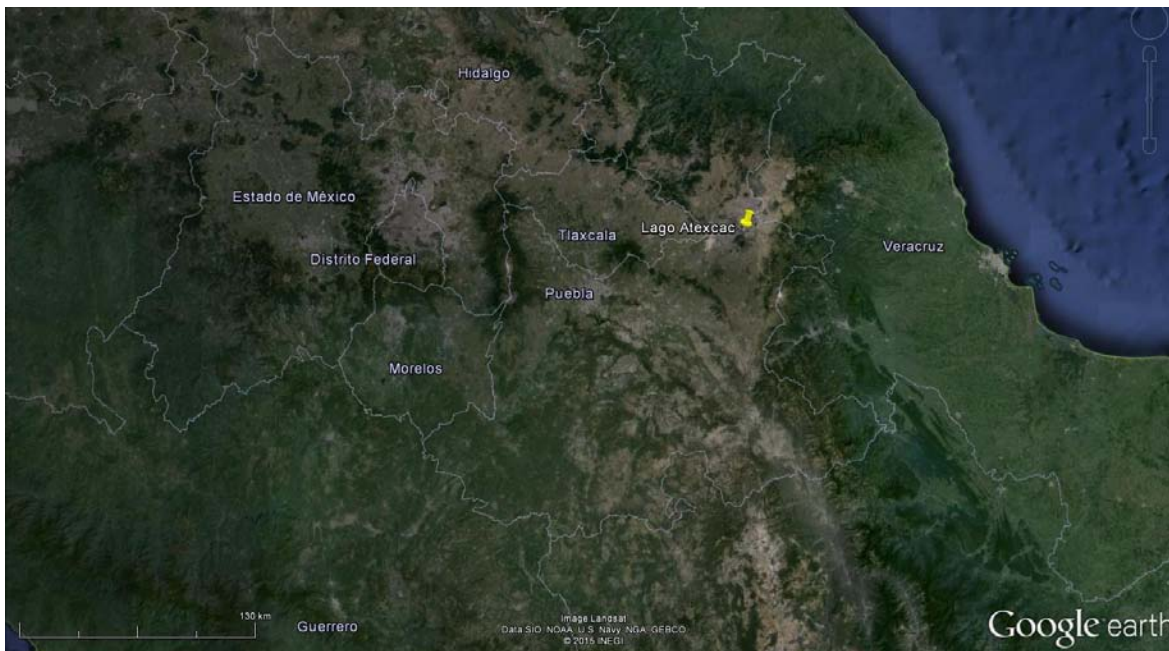
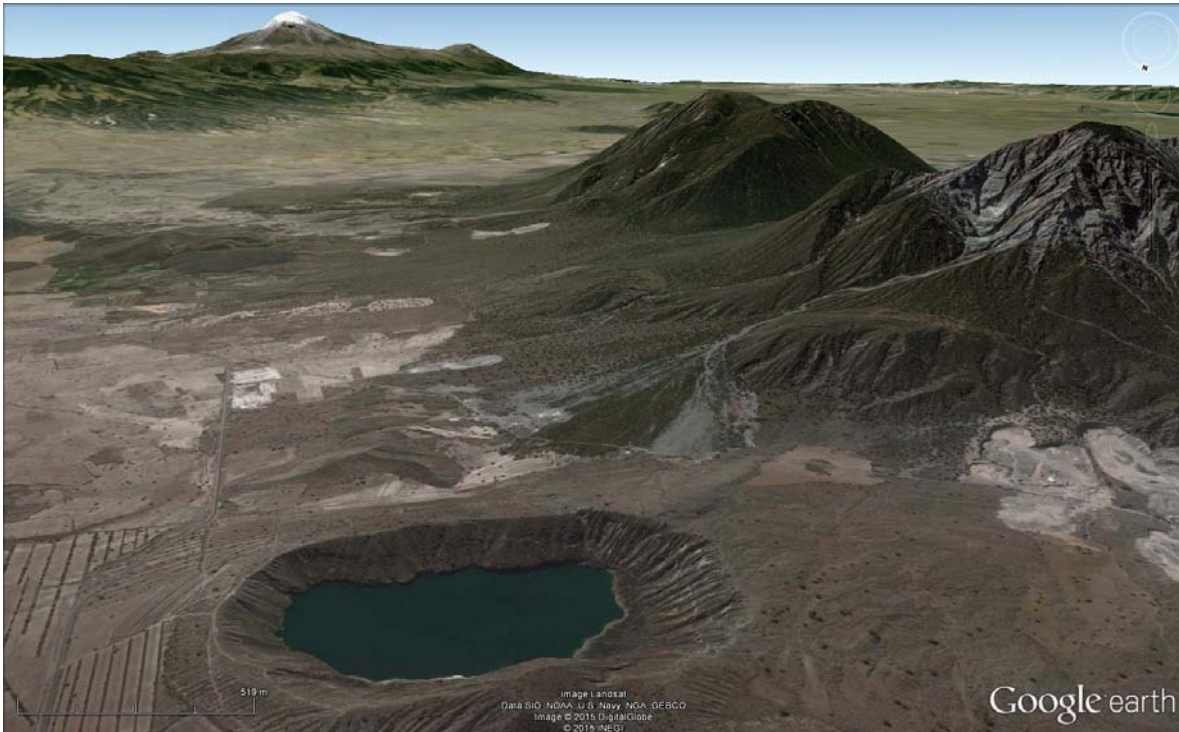


Fig. 4. Ubicación del lago cráter Atexcac en el estado de Puebla, México (Google Earth, 2015).



Fig. 5. Ubicación de Atexcac, al Noroeste se pueden apreciar otros lagos cráter de la Cuenca Oriental de Puebla. Alchichica, Preciosa (Las Minas) y Quechulac (tomado de Google Earth, 2015).



*Fig. 6. Zona de estudio, lago volcánico Atexcac, Puebla. Ubicado en las coordenadas geográficas 19°20'N y 97°27'W, con una altitud de 2340 m. Área superficial (0.29 km²) y un volumen (6.15*10⁶ m³), con una profundidad máxima de 39 m (tomado de Google Earth, 2015).*

Planteamiento del problema

El ciclo del azufre es de los más importantes en sistemas naturales, el cual tiende a ser muy activo en lagos volcánicos, este presenta una estrecha relación con otros ciclos como el de carbono y nitrógeno. En México se encuentran una serie de lagos cráter que presentan una importante concentración de compuestos de azufre, estos lagos no han sido muy estudiados en relación a su composición microbiana, particularmente las que intervienen en el ciclo del azufre.

El Evento de Emblanquecimiento (Whiting Event) es un proceso que se presenta en sistemas acuáticos continentales, en el cual microorganismos por medio de su metabolismo liberan carbonato de calcio al medio, provocando una precipitación de este; las bacterias sulfato reductoras (BSR) son comúnmente asociadas con mineralización de carbono orgánico, poniendo condiciones específicas para la precipitación de carbonato. Por tanto, se plantea saber si existe una diversidad de bacterias sulfato reductoras asociadas con el Evento de Emblanquecimiento en el lago cráter, Atexcac.

Justificación

El Evento de Emblanquecimiento es un proceso ligado al ciclo del carbono del lago Atexcac, por lo que guarda una estrecha relación con la alcalinidad, la dureza y el pH presente. La dinámica química del lago depende de la actividad biológica (particularmente

por las picocianobacterias), que en condiciones limitadas de CO₂ generan la nucleación de bicarbonatos propiciando la precipitación de carbonatos (descalcificación epilimnética). Por otra parte, las bacterias sulfato reductoras (BSR) tienen un papel funcional importante, ya que los lagos cráter son ecosistemas que presentan elevadas concentraciones de sulfatos; por lo que, durante ocho meses el lago Atexcac se encuentra estratificado con condiciones de anoxia hacia el hipolimnion y con potenciales reducidos, condiciones que estos microorganismos generan a través de la reducción de las formas químicas del azufre.

Trabajos anteriores, han mencionado que tanto las picocianobacterias como las BSR participan activamente en el Evento de Emblanquecimiento; sin embargo, no se conoce con precisión el papel que desempeñan estas últimas en este proceso y las posibles interacciones que existan entre estos microorganismos. Dicho Evento, se encuentra vinculado a la formación de estromatolitos; que son comunidades microbianas que funcionan de forma homologa a las primeras comunidades en la Tierra primitiva. De igual forma, la presencia y periodicidad de este fenómeno en el lago se puede relacionar con el cambio climático global.

Por lo anterior, la descripción de las bacterias sulfato reductoras a lo largo de la columna de agua permitió el conocimiento de la diversidad durante el Evento de Emblanquecimiento.

Hipótesis

Si los sulfatos son la forma química más abundante en los lagos cráter, entonces se espera hallar una presencia importante de bacterias sulfato reductoras durante la estratificación térmica del lago Atexcac, asociadas con el desarrollo del Evento de Emblanquecimiento.

Objetivos

- General

Analizar la diversidad de las bacterias sulfato reductoras durante la etapa de desarrollo del Evento de Emblanquecimiento en el lago Atexcac.

- Particulares
 1. Evaluar la variación de parámetros físico-químicos como temperatura, oxígeno, pH, alcalinidad, durezas, conductividad eléctrica, total de sólidos disueltos y sulfatos durante el período de estudio.
 2. Aislar y clasificar con base en la morfología colonial las bacterias sulfato reductoras obtenidas de las diferentes profundidades (epilimnion, metalimnion, hipolimnion y fondo).
 3. Cuantificar y aislar los morfotipos para la obtención de cultivos axénicos.
 4. Realizar la caracterización fenotípica de los aislados obtenidos modificando la fuente de energía y carbono del medio de cultivo base.

Material y método

Muestreo

Se realizaron muestreos mensuales a partir del mes de mayo hasta el mes de septiembre de 2014 con el fin de encontrar el Evento de Emblanquecimiento (septiembre) en el lago cráter Atexcac, el cuál correspondió con la etapa de transición a la estratificación tardía (agosto y septiembre). El desarrollo de este Evento se determinó por medio de las variaciones mensuales del pH, alcalinidad y durezas, describiendo un color blanquecino típico en el agua superficial y por la presencia de partículas suspendidas de carbonatos que se distinguen a simple vista [Anexo 1].

Durante el trabajo de campo, se realizó la colecta de las muestras a bordo de una lancha para arribar al sitio de mayor profundidad del sistema de acuerdo a su batimetría, delimitado por una boya. En dicho punto, las muestras se colectaron con ayuda de una botella Van Dorn con capacidad de 2.3 litros. Las profundidades de muestreo se definieron en base al perfil de temperatura-oxígeno disuelto, el cual delimitó las zonas de epilimnion, metalimnion e hipolimnion. Para dicha delimitación se usó un oxímetro con sensor de oxígeno disuelto luminiscente (LDO por sus siglas en inglés) con precisión de (± 0.05 mg/L) y de temperatura (± 0.1 °C) con un sistema de agitación integrado (marca Hach, modelo HQ40D), en muestras de agua que fueron depositadas en botellas Winkler oscuras, cuidadosamente tomadas para evitar burbujeo [Figura 7].

Los muestreos a diferentes profundidades, en relación a la disponibilidad de oxígeno, permitió la colecta de las bacterias aerobias presentes en el epilimnion y metalimnion; bacterias aerotolerantes en la zona superficial del hipolimnion (microaerobias) y, finalmente, las bacterias anaerobias se colectaron en lo más cercano al fondo. Dichas muestras fueron almacenadas en botellas DBO oscuras evitando la formación de burbujas; las cuales, se etiquetaron y almacenaron a una temperatura cercana a los 4 °C [Figura 8].

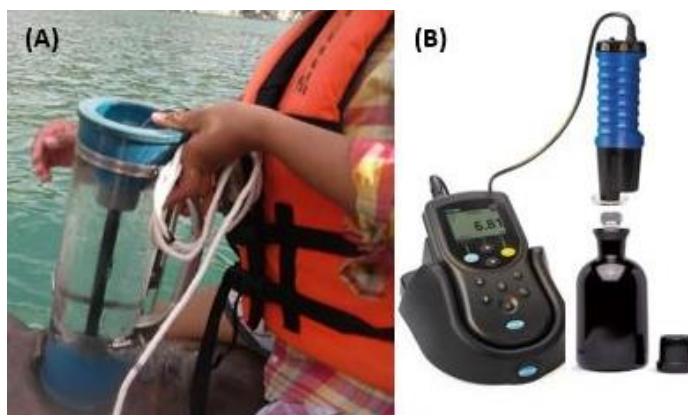


Fig. 7. (A) Forma de muestreo con botella Van Dorn, (B) determinación de oxígeno disuelto con ayuda de un oxímetro Hach y botella Winkler oscura.

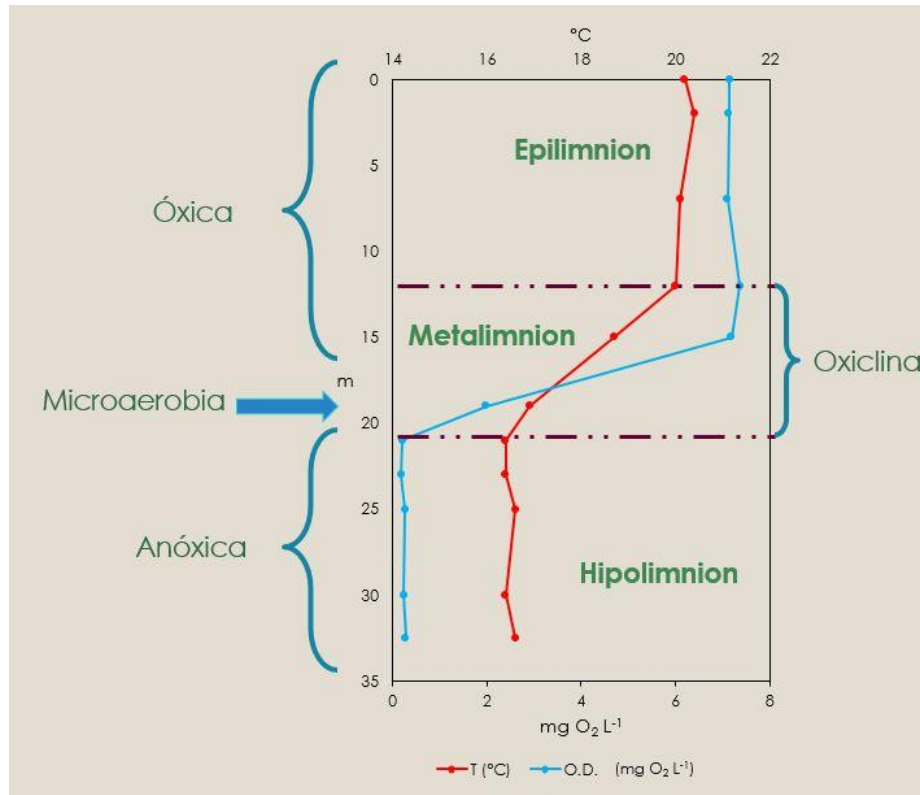


Fig. 8. Ejemplo de un perfil vertical de temperatura y oxígeno disuelto para determinar las profundidades de muestreo de las Bacterias Sulfato Reductoras.

Valoración de parámetros in situ

Se realizó la cuantificación de la dureza total y de la dureza de calcio por el método complejométrico, por su parte se logró cuantificar la dureza temporal y permanente, de acuerdo con los cálculos propuestos por Boyd (1990). Así también, se determinó la alcalinidad a la fenolftaleína y al anaranjado de metilo por el método de indicadores (Gómez *et al.*, 2014). Con ayuda de un potenciómetro de campo tipo pluma con una precisión ± 0.1 de pH (marca PHMETER) se determinó el pH. La conductividad eléctrica y los sólidos disueltos totales, se estimaron por medio de un Multiparámetro con una precisión de ± 0.01 mS cm^{-1} y ± 0.01 g L^{-1} , respectivamente (marca Corning, modelo Checkmate 90).

Nutrientos

Las muestras colectadas fueron trasladadas al laboratorio en botellas blancas con capacidad de un litro a una temperatura cercana a 4 °C; las cuales, se utilizaron para la determinación de la concentración de sulfatos por el método turbidimétrico, con ayuda de un espectrofotómetro (marca UNICO, modelo V2150) [Figura 9] (Gómez *et al.*, 2014).



Fig. 9. Desarrollo de la técnica de sulfatos por el método turbidimétrico..

Procesamiento de muestras para los análisis microbiológicos

En laboratorio, bajo condiciones estériles, se realizaron diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000) a cada una de las muestras obtenidas durante el trabajo de campo (óxicas, microaerobias, anóxicas). Dichas diluciones se hicieron con solución salina al 1%. Posteriormente, se preparó un medio de cultivo específico para el crecimiento de “Bacterias Sulfato Reductoras” [Anexo 2] (Vorquímica, 1981; Guyoneaud *et al.*, 1996; Mogensen *et al.*, 2005). Las muestras fueron sembradas en medio de cultivo sólido (placas Petri), las cuales fueron divididas bajo dos condiciones de crecimiento, óxicas y anóxicas [Figura 10].

Para el crecimiento microbiano bajo condiciones óxicas, el tiempo de incubación se determinó hasta que se observó el desarrollo de las colonias, a temperatura de 33 °C en una incubadora (marca Felisa, modelo FE133AD).

En cuanto al crecimiento microbiano bajo condiciones anóxicas, el medio de cultivo fue suplementado con hidrosulfito de sodio 0.02 μM , el cual actúo como agente reductor (Guyoneaud *et al.*, 1996; Mogensen *et al.*, 2005). Las cajas Petri de estas muestras fueron introducidas en una jarra de anaerobiosis (sellada para impedir la entrada de oxígeno), generando un ambiente libre de oxígeno, mediante la adición de sobres de reacción [$\text{H}_2 + \text{CO}_2$] (marca Becton Dickinson, BBL Gas Pack, Anaerobic System). Las cajas Petri se colocaron en una incubadora a 33°C.

Cada una de las diluciones seriadas, obtenidas de las muestras, fueron sembradas por triplicado.

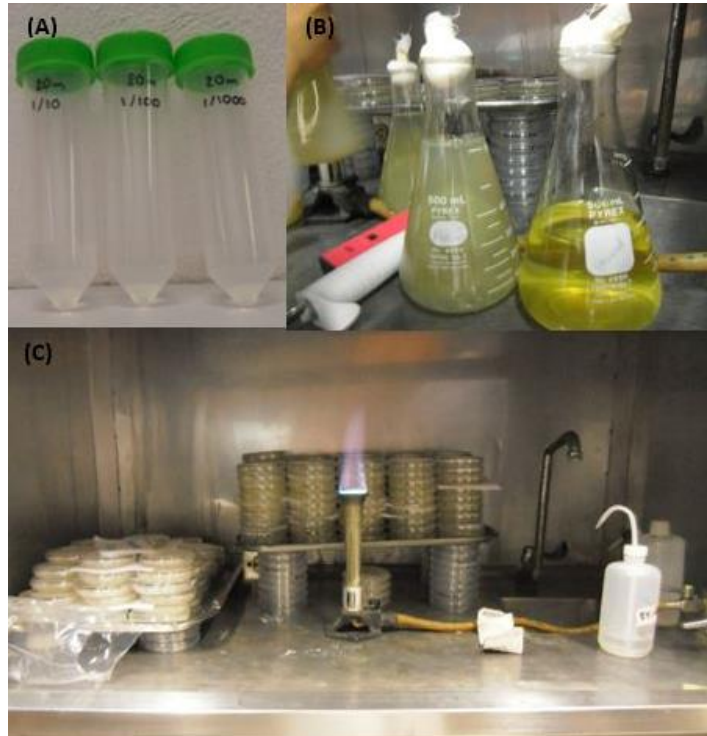


Fig. 10. Preparación de placas de cultivo. (A) diluciones seriadas, (B) medio de cultivo, (C) placas servidas en una campana de extracción estéril.

Clasificación por morfología colonial y cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la descripción y clasificación de las colonias desarrolladas por su morfología, considerando los siguientes criterios: la forma, la elevación, el margen y el color [Figura 11 (A)] [Anexo 3] (Saucedo *et al.*, 2005).

Una vez definidos los diferentes morfotipos coloniales, fueron cuantificados para estimar las UFC's, considerando el criterio de muestras cuantificables (intervalo de >30 colonias a <300 colonias por placa) [Figura 11 (B)]. De dicha estimación resulta la aproximación de la abundancia relativa de estos morfotipos en cada uno de los sitios de muestreo.

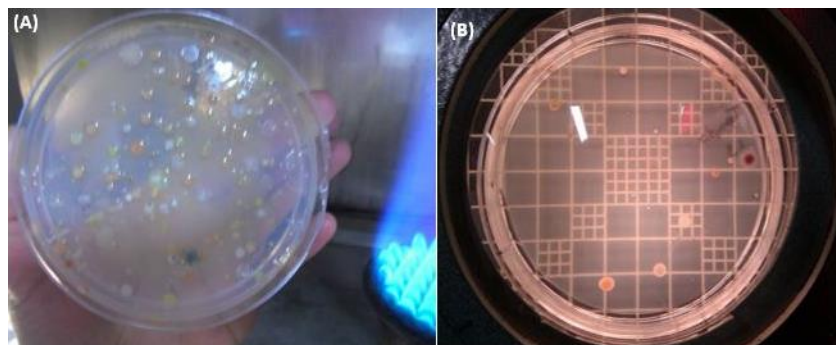


Fig. 11. (A) Clasificación de morfotipos coloniales, (B) conteo de UFC's.

Aislamiento de los morfotipos coloniales

De acuerdo con la clasificación de morfotipos coloniales se seleccionó el 10% para su aislamiento por el método de estrías en placas Petri (Saucedo *et al.*, 2005). Este proceso se aplicó a la dilución seriada cuantificable, y con la presencia de la mayor diversidad de morfotipos coloniales. Así también, se seleccionaron y aislaron los morfotipos raros o atípicos presentes en los cultivos de las demás diluciones. Los aislados se incubaron a 33 °C, bajo condiciones adecuadas de disponibilidad de oxígeno (óxicos o anóxicos).

Purificación y obtención de cultivos axénicos

La purificación de los aislados se hizo por el método de *estría abierta* asegurando la ausencia de otros microorganismos contaminantes, obteniendo cultivos axénicos de cada uno de los aislados. Estos cultivos puros fueron almacenados en medio de cultivo líquido suplementado con glicerol (30%) a 4°C [Figura 12].

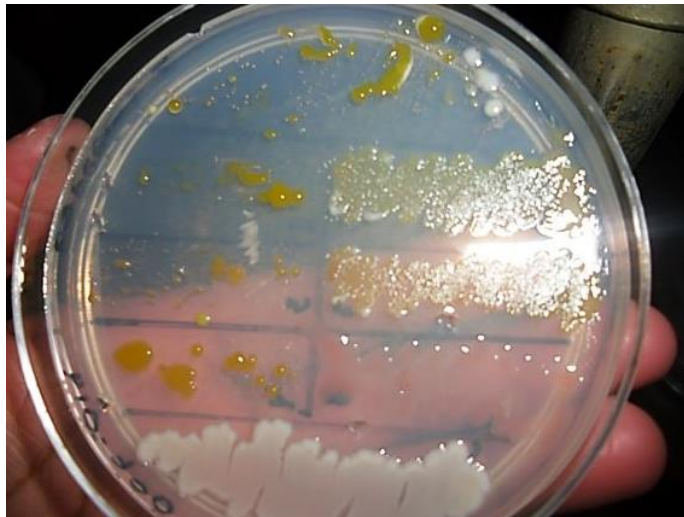


Fig. 12. Purificación por el método de estría abierta.

Cuantificación de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) por Sistema de Detección Enzimática

Para confirmar la presencia de las BSR a lo largo de la columna de agua del lago, se utilizó un kit de detección por inmunoensayo enzimático (BRS QuickChek™; MODERNWATER) [Figura 13]. La prueba emplea anticuerpos para detectar la enzima adenosina-5'-fosfosulfonato (APS) reductasa presente en todas BSR. La prueba de detección se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

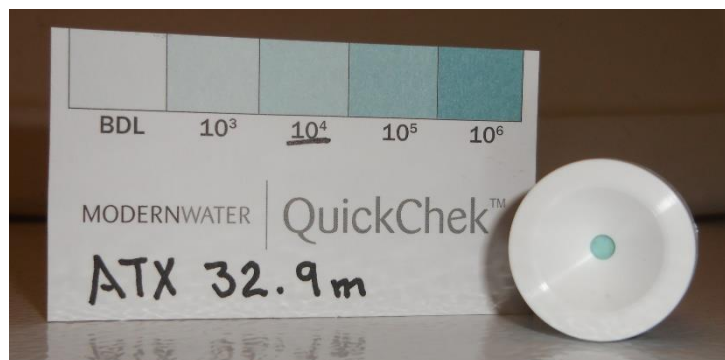


Fig. 13. Sistema de detección de Bacterias Sulfato Reductoras.

Caracterización fenotípica

Para el análisis fenotípico se realizaron pruebas bioquímicas utilizando el medio de cultivo base para su aislamiento, remplazando la fuente de carbono (glicerol, acetato, ácido fumárico, ácido málico, etanol, metanol, alanina) y la fuente de energía (sulfito, tiosulfato, nitrato, azufre). Se realizaron tres repeticiones por morfotipo y, los datos fueron organizados en una matriz binaria (ausencia-presencia) para su posterior análisis [Anexo 4] (Sass *et al.*, 1998).

Análisis estadístico

Se realizaron tablas de frecuencia (nulo-muy frecuente) empleando las reglas propuestas en Marques Dos Santos (2004), para determinar que morfotipos presentaban mayores abundancias según los promedios de (UFC's) y para conocer en que prueba metabólica los morfotipos desarrollaron mayores biomazas, de igual manera, para las pruebas metabólicas se realizó una matriz binaria (ausencia-presencia).

Se llevó a cabo un análisis multivariado de agrupación ("clustering"), con el fin de conocer los morfotipos más frecuentes relacionados, de acuerdo a la manifestación de biomasa, respuesta a la caracterización fenotípica.

Por último, se realizaron correlaciones de tipo no paramétrico (Spearman), entre los parámetros físico-químicos y los morfotipos, así como entre los morfotipos, para establecer asociaciones pareadas entre las diferentes variables (Marques, 2004).

El análisis multivariado de agrupación y las correlaciones no paramétricas se efectuaron mediante el uso del programa STATGRAPHICS Centurion XV.

Resultados

Muestreo

Durante cinco meses de muestreo se colectaron 17 muestras a diferentes profundidades del lago Atexcac para analizar la diversidad de las Bacterias Sulfato Reductoras durante el

desarrollo del Evento de Emblanquecimiento; así como 48 muestras en botellas blancas para el análisis físico-químico del agua del sitio.

Parámetros físico-químicos

Temperatura y oxígeno disuelto

Durante los meses de muestreo se presentaron tres de las cuatro etapas hidrodinámicas que tiene el sistema; en el mes de mayo se presentó el final de la “estratificación temprana”, la cual se caracteriza por dar comienzo a la formación de una termoclina en los primeros metros de profundidad (el epilimnion alcanza unos cuantos metros y el hipolimnion es muy extenso). Durante los meses de junio a agosto, se observó el desarrollo de la “estratificación bien establecida”, donde la termoclina presenta una estructura bien definida de los tres estratos de la columna de agua (epilimnion, metalimnion e hipolimnion), siendo que el epilimnion e hipolimnion presentan una extensión parecida en metros, por último en el mes de septiembre se presentó la transición a la “estratificación tardía”, aquí el epilimnion es de mayor tamaño (en metros), la termoclina se profundiza, y por tanto el hipolimnion se vuelve pequeño [Figura 14 y 15].

Las temperaturas promedio más altas se observaron durante la estratificación bien establecida (junio a agosto); siendo el 20 de junio, donde se alcanzó la mayor temperatura superficial (21.2 °C) y, el 01 de agosto, se presentó la mayor temperatura en el hipolimnion y en el fondo, con valores cercanos a los 16.5 °C. La temperatura mínima promedio se presentaron el 23 de mayo (17.23 °C) [Figura 14].

Durante el Evento de Emblanquecimiento, se presentaron la segunda temperatura promedio más baja de los meses analizados (17.33 °C); siendo el epilimnion donde se observó el valor más bajo (19.52 °C) [Figura 15].

En cuanto al oxígeno disuelto (OD), la menor cantidad se registró en el fondo el 22 de agosto (0.21 mg O₂ L⁻¹); mientras que la máxima cantidad fue de 7.41 mg O₂ L⁻¹ en el epilimnion (23 de mayo). El 26 de septiembre, mes en el que se presentó el Evento de Emblanquecimiento, el valor máximo de OD fue de 7.50 mg O₂ L⁻¹, en la zona del metalimnion (14 m, aprox.); lo cual, coincide con el "top" (inicio) de la oxiclina y, el valor mínimo fue de 0.33 mg O₂ L⁻¹ en el fondo (32.9 m), mostrando un aumento en la concentración de OD promedio en todos los estratos, comparado con el muestreo previo del 22 de agosto (7.11 mg O₂ L⁻¹ en el epilimnion, 3.17 mg O₂ L⁻¹ en el metalimnion y 0.26 mg O₂ L⁻¹ en el hipolimnion) [Figuras 14 y 15].

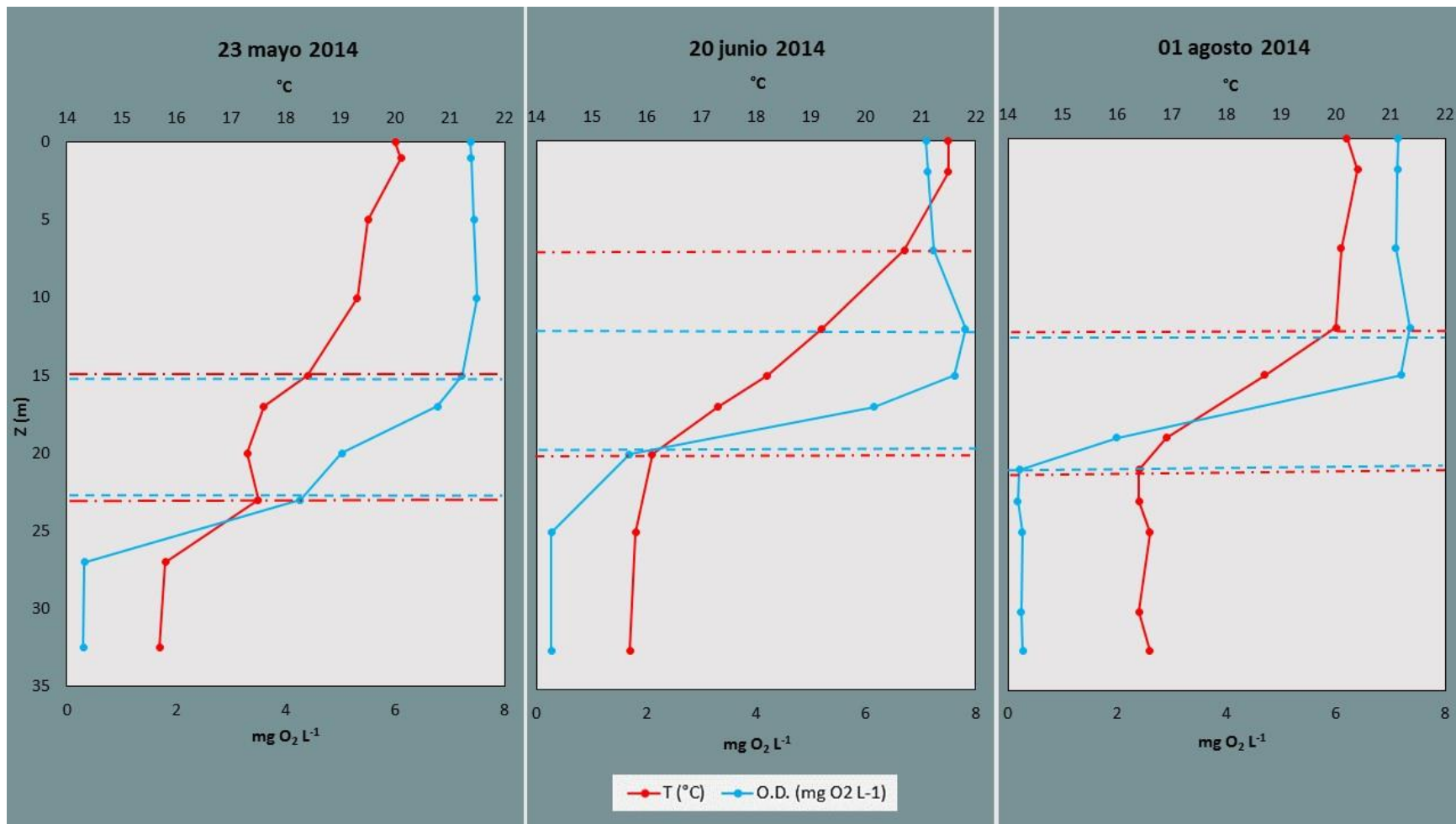


Fig. 14. Perfiles verticales espacio-temporales de temperatura y oxígeno disuelto (mayo-agosto), las líneas punteadas indican el inicio y final de la termoclina (rojo) y oxiclina (azul).

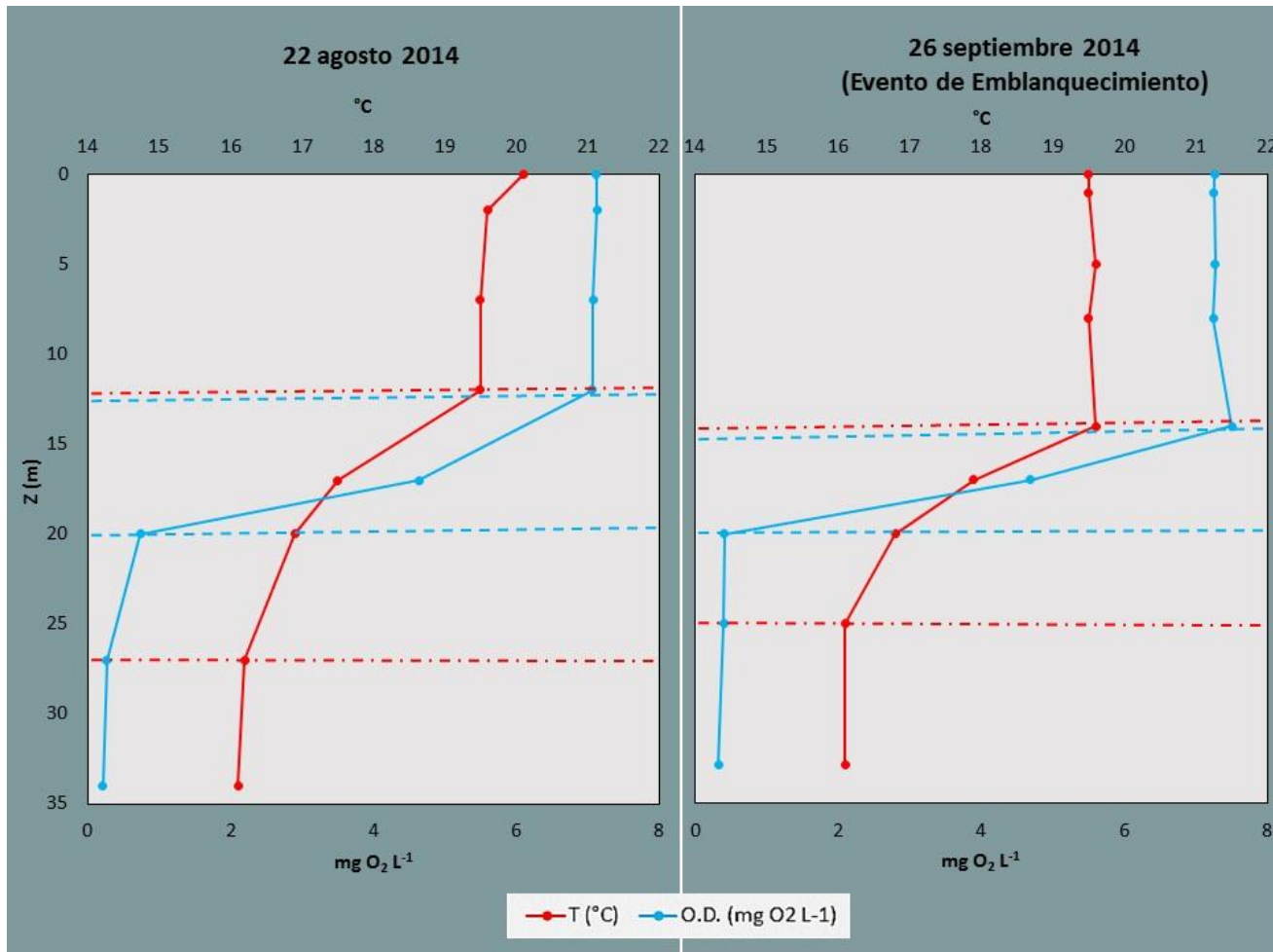


Fig. 15 Perfiles verticales espacio-temporales de temperatura y oxígeno disuelto (agosto-septiembre), las líneas punteadas indican el inicio y final de la termoclina (rojo) y oxiclina (azul).

pH y alcalinidad

Durante los meses de muestreo el pH osciló entre 8.6 y 9.3; destacando el aumento de pH que se dio previo al Evento de Emblanquecimiento, durante el mes de agosto. Este aumento de pH tiene una influencia directa en la concentración de carbonatos y bicarbonatos (sistema buffer); dado que el 01 de agosto, se tenía una mayor concentración promedio de bicarbonatos que de carbonatos (895 mg L^{-1} y 477.5 mg L^{-1} , respectivamente). Mientras que a finales del mismo mes (22 de agosto) se observó otro incremento de pH, sólo que las concentraciones de ambos compuestos tuvieron un comportamiento inverso (366.2 mg L^{-1} de bicarbonatos y 772.5 mg L^{-1} de carbonatos). Por otra parte, la mayor concentración de carbonatos se da el 23 de mayo (844 mg L^{-1}), a pesar de que en este mes se dan los valores más bajos de pH (8.64).

Durante el Evento de Emblanquecimiento el pH comenzó a descender, pasando de 9.3 en el hipolimnion y en el fondo (22 de agosto), a un valor máximo de 9.17 en el epilimnion y un mínimo de 9.0 en el fondo de la columna. Estos valores descendientes de pH muestran la estrecha relación con la concentración de carbonatos, los cuales también presentan concentraciones máximas en el epilimnion (760 mg L^{-1}) y mínimos en el fondo (660 mg L^{-1}) [Figura 16].

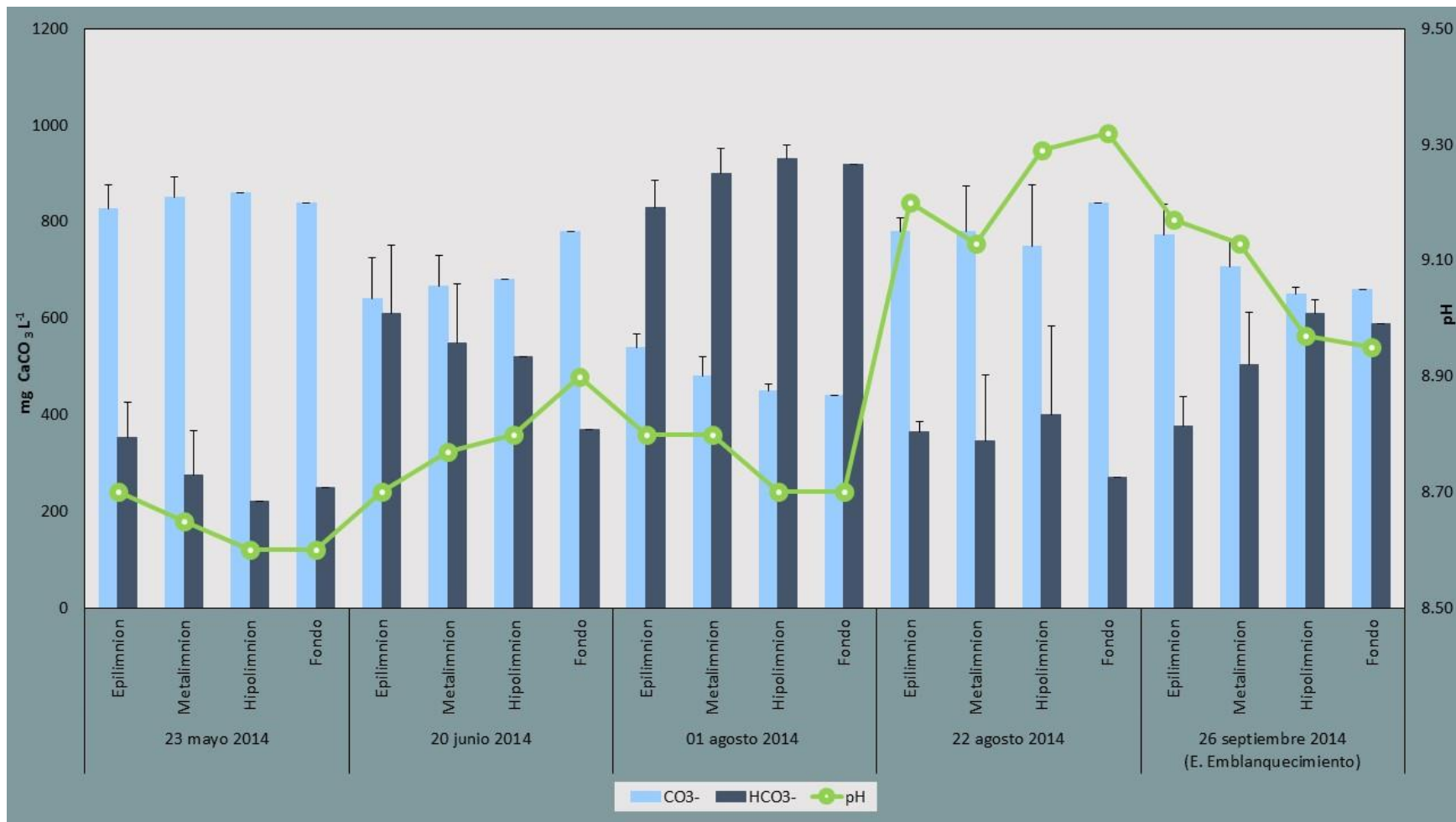


Fig. 16. Comportamiento de la alcalinidad promedio y el pH promedio en los diferentes estratos y meses de muestreo.

Dureza total, dureza permanente, dureza temporal y dureza de calcio

La dureza total fue un parámetro que no registró diferencias considerables a lo largo del tiempo de muestreo; sin embargo, las concentraciones promedio de los estratos durante el Evento de Emblanquecimiento fueron más bajas (2664.2 mg CaCO₃ L⁻¹), que las concentraciones de los demás meses de muestreo (entre 2800 y 3000 mg CaCO₃ L⁻¹).

La dureza permanente y la de calcio presentaron un comportamiento similar a la dureza total, durante el Evento de Emblanquecimiento. La dureza permanente mantuvo un promedio de 1446.7 mg CaCO₃ L⁻¹, mientras que la dureza de calcio presentó concentraciones de 61.72 mg CaCO₃ L⁻¹, siendo las mínimas registradas a lo largo del tiempo de estudio (Figuras 17 y 18).

La dureza temporal promedio del Evento de Emblanquecimiento fue de 1217.5 mg CaCO₃ L⁻¹, siendo la segunda concentración más alta presentada en los meses muestreados (menor a los 1372.5 mg CaCO₃ L⁻¹ del 01 de agosto).

Por último, se destaca que la dureza permanente mantuvo concentraciones elevadas en comparación a la dureza temporal. Teniendo la particularidad de que las concentraciones durante el Evento de Emblanquecimiento fueron más homogéneas, en especial hacia el fondo [Figura 17].

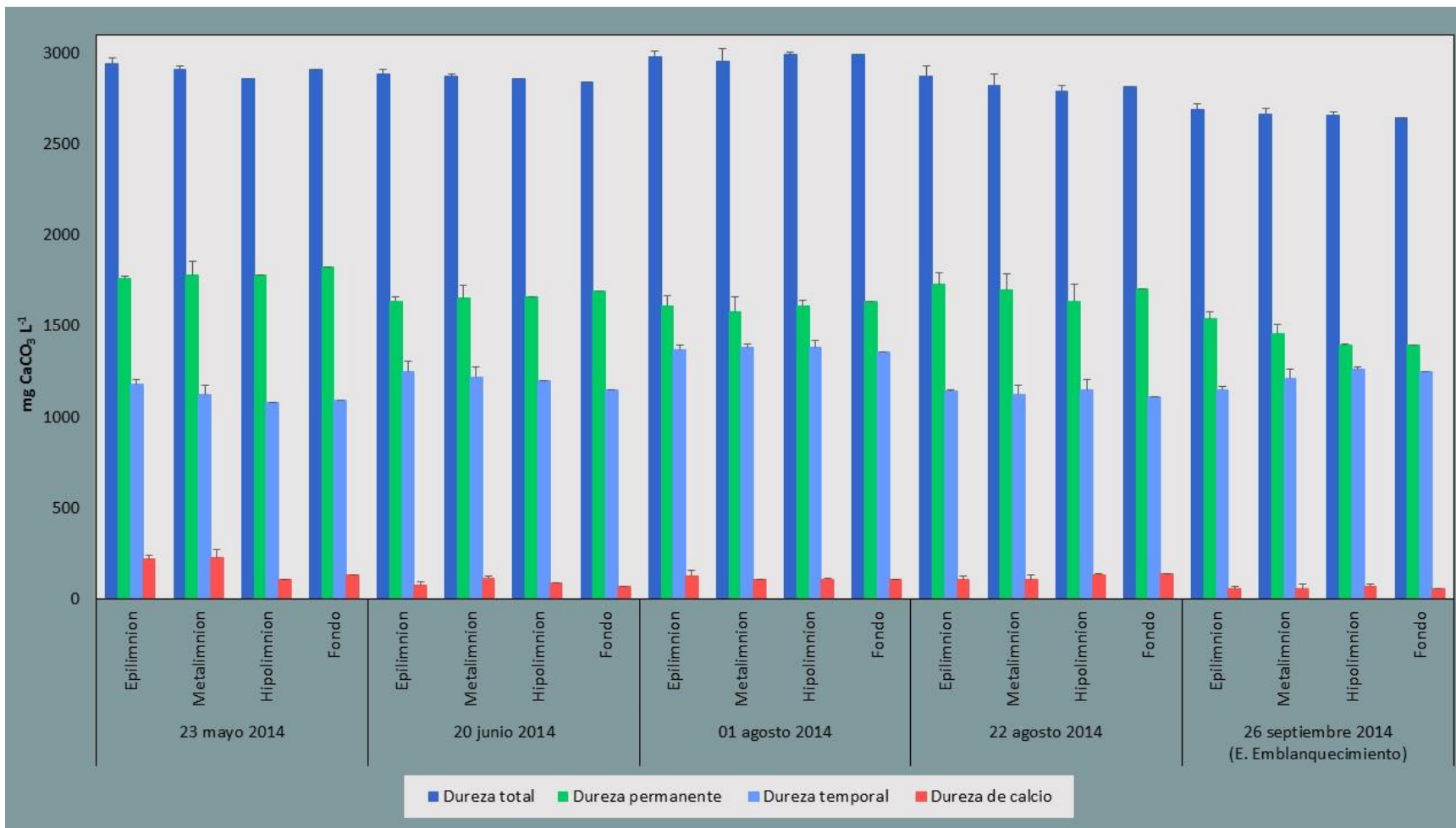


Fig. 17. Comportamiento espacio-temporal de los diferentes tipos de dureza (total, permanente, temporal y de calcio). Se presentan concentraciones promedio con sus respectivas desviaciones.

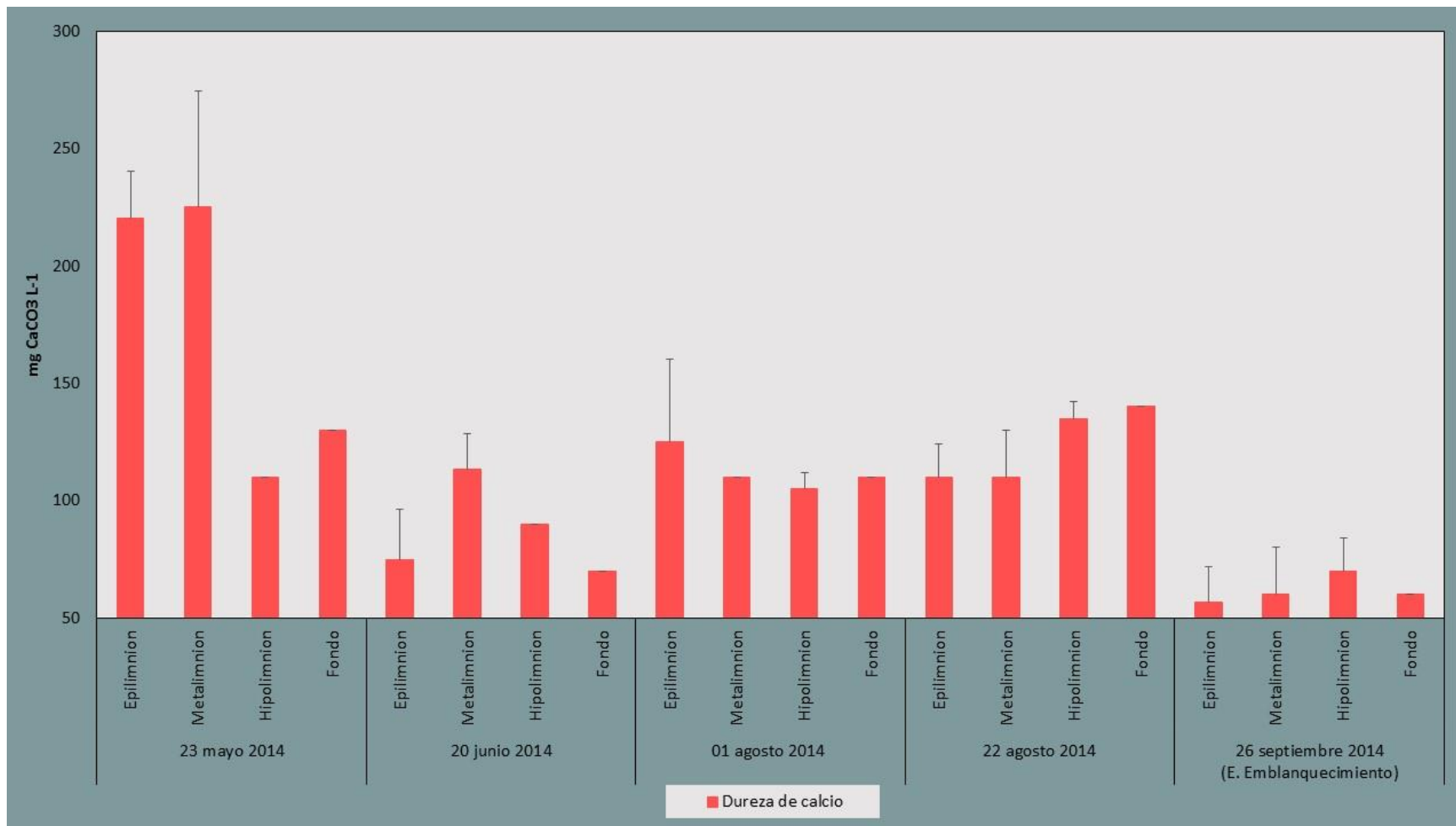


Fig. 18. Concentraciones promedio y desviaciones respectivas de la dureza de calcio a través de los estratos de la columna de agua y los meses de muestreo.

Conductividad eléctrica y Total de Sólidos Disueltos (TSD)

La conductividad eléctrica y el TSD no registraron diferencias significativas a lo largo del estudio, siendo parámetros que presentaron los máximos valores durante el 23 de mayo con 12.24 mS cm^{-1} y 6.09 g L^{-1} , respectivamente. Los valores menores fueron cuantificados durante el Evento de Emblanquecimiento (26 de septiembre) con 11.80 mS cm^{-1} y 5.89 g L^{-1} , respectivamente. Particularmente, durante todos los meses de muestreo se observaron los valores más altos en la zona del epilimnion disminuyendo hacia el fondo [Tabla 1].

Tabla 1. Variabilidad de la conductividad eléctrica y el Total de Sólidos Disueltos durante los meses de muestreo.

Fecha	Estrato	Conductividad (mS cm^{-1})	TSD (g L^{-1})
23 mayo 2014	Epilimnion	12.43	6.21
	Metalimnion	12.38	6.13
	Hipolimnion	12.40	6.18
	Fondo	11.77	5.84
20 junio 2014	Epilimnion	12.04	6.04
	Metalimnion	11.96	6.01
	Hipolimnion	11.05	6.02
	Fondo	11.94	5.99
01 agosto 2014	Epilimnion	12.22	6.14
	Metalimnion	12.14	6.08
	Hipolimnion	12.11	6.08
	Fondo	11.92	5.98
22 agosto 2014	Epilimnion	11.75	6.00
	Metalimnion	12.05	6.03
	Hipolimnion	11.81	5.94
	Fondo	12.00	6.02
26 septiembre 2014	Epilimnion	11.94	5.96
	Metalimnion	11.75	5.87
	Hipolimnion	11.70	5.84
	Fondo	11.79	5.85

Sulfatos

A lo largo del estudio las concentraciones promedio de sulfatos fueron variables [Figura 19], presentándose las concentraciones más altas el 23 de mayo (109.84 mg L^{-1}), así como, el 01 y el 22 de agosto (103.54 mg L^{-1} y 103.88 mg L^{-1} , respectivamente). Mientras las concentraciones mínimas fueron cuantificadas el 20 de junio (75.06 mg L^{-1}).

Durante el Evento de Emblanquecimiento (26 de septiembre) la concentración de sulfatos fue mayor en la superficie con 87.27 mg L^{-1} , descendiendo hacia el fondo con 67.28 mg L^{-1} .

Se encontró una relación de los sulfatos con la alcalinidad, ya que las concentraciones máximas de sulfatos coincidieron con las concentraciones altas de carbonatos (23 de mayo y 22 de agosto) y bicarbonatos (01 de agosto) [Figura 20].

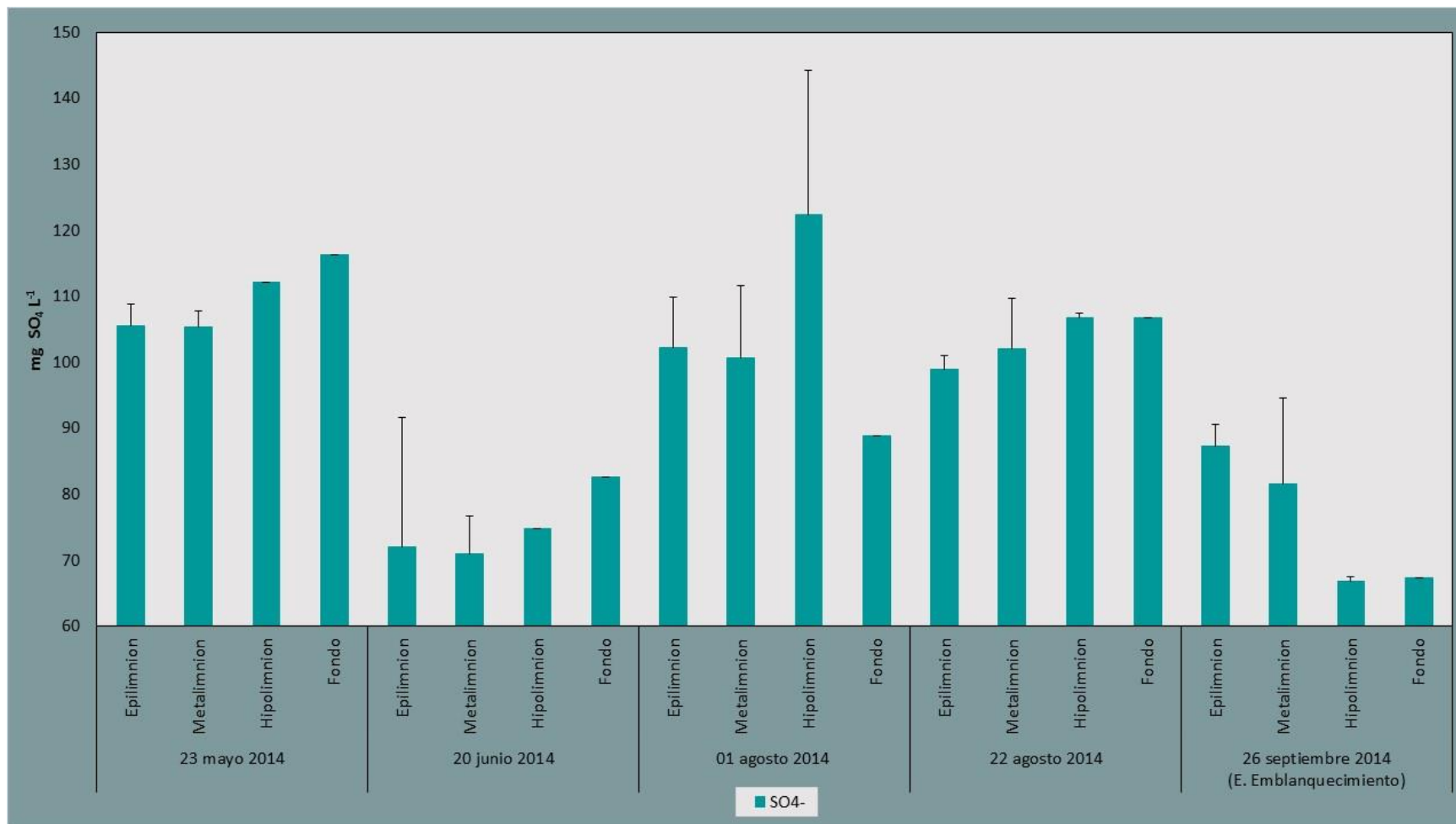


Fig. 19. Comportamiento de los sulfatos a través de los estratos de la columna de agua y del tiempo de muestreo.

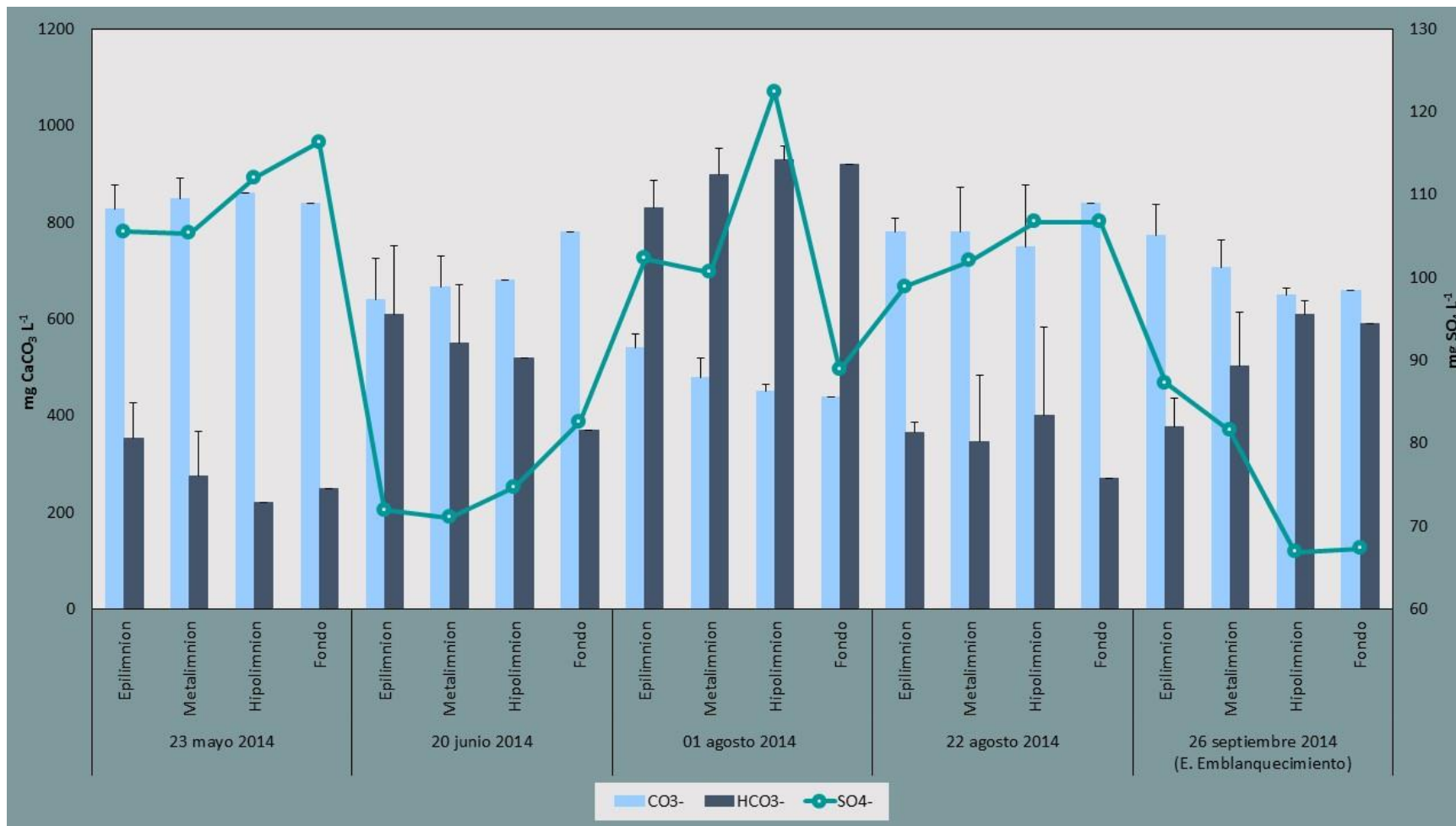


Fig. 20. Relación entre los sulfatos y la alcalinidad durante los diferentes meses de estudio.

Análisis microbiológico

Descripción y clasificación por morfología colonial

De acuerdo a los criterios establecidos por Saucedo y colaboradores (2005), las colonias fueron clasificadas de acuerdo a su forma, elevación, margen y color (Anexo 3); con lo cual, se describieron 40 morfotipos [Tabla 2] [Figura 21], de los cuales 15 morfotipos se describieron durante el Evento de Emblanquecimiento.

La presencia de los morfotipos representativos estuvo relacionada a la disponibilidad de oxígeno a lo largo de la columna de agua.

En el cultivo microbiano bajo condiciones de crecimiento óxicas, durante el mes de agosto se registró la mayor diversidad de morfotipos y la más alta abundancia de unidades formadoras de colonias (UFC's), en los tres niveles de disponibilidad de oxígeno, de manera que el nivel anaerobio presentó mayor abundancia ($329 \text{ UFC's mL}^{-1}$) y mayor diversidad (siete diferentes morfotipos). Por el contrario, en los meses de mayo y junio se observa el menor número en diversidad y abundancia de morfotipos.

Durante el Evento de Emblanquecimiento, la diversidad de morfotipos disminuyó en comparación al mes anterior (agosto), presentándose un máximo de cinco morfotipos en el nivel aerobio. En cuanto a la abundancia, la máxima fue de 55 UFC's mL^{-1} en el nivel anaerobio [Tabla 3].

En contra parte, el cultivo microbiano bajo condiciones anóxicas presentó una menor cantidad de morfologías coloniales en los diferentes niveles de oxígeno y los meses de muestreo. Cabe destacar los resultados obtenidos durante el mes de mayo y el mes de septiembre (Evento de Emblanquecimiento). En mayo, se describió en los tres niveles de oxígeno un solo morfotipo (denominado como "A"); mientras que en septiembre, no se observó crecimiento en las placas cultivadas [Tabla 4].

Tabla 2. Clasificación total por morfología colonial.

#	Morfotipo	Forma	Elevación	Margen	Color
1	A	circular	umbonada	ondulado	blanco con centro amarillo
2	B	circular	elevada	entero	rosa
3	C	circular	plana	entero	translucido
4	D	circular	plana	entero	blanco
5	E	circular	elevada	entero	amarillo
6	F	circular	elevada	entero	blanco
7	G	circular	convexa	entero	rosa mexicano
8	H	circular	plana	ondulado	translucido con centro blanco
9	I	circular	convexa	entero	amarillo
10	J	circular	elevada	ondulado	amarillo
11	K	circular	elevada	entero	anaranjado
12	L	circular	convexa	entero	blanco
13	M	circular	plana	ondulado	blanco
14	N	circular	convexa	filamentoso	rosa
15	Ñ	circular	plana	ondulado	hueso
16	O	circular	convexa	entero	anaranjado rojizo
17	P	circular	elevada	ondulado	anaranjado
18	Q	circular	plana	ondulado	translucido
19	R	filamentosa	plana	ondulado	blanco
20	S	circular	elevada	ondulado	blanco
21	T	irregular	plana	entero	rojo translucido
22	U	irregular	elevada	entero	amarillo
23	V	puntiforme	plana	entero	rosa
24	W	irregular	plana	ondulado	blanco
25	X	irregular	pulvinada	ondulado	blanco
26	Y	irregular	umbonada	ondulado	amarillo
27	Z	circular	umbilicada	entero	blanco translucido
28	AA	circular	plana	ondulado	durazno
29	AB	circular	convexa	entero	hueso translucido
30	AC	circular	convexa	entero	anaranjado-durazno
31	AD	circular	umbilicada	entero	amarillo
32	AE	circular	plana	entero	amarillo
33	AF	circular	umbilicada	entero	blanco
34	AG	circular	elevada	entero	café con centro negro
35	AH	circular	elevada	entero	rosa con centro negro
36	AI	circular	elevada	ondulado	hueso translucido
37	AJ	puntiforme	elevada	entero	blanco
38	AK	rizoide	plana	filamentoso	blanco
39	AL	irregular	plana	ondulado	amarillo
40	AM	irregular	elevada	ondulado	beige

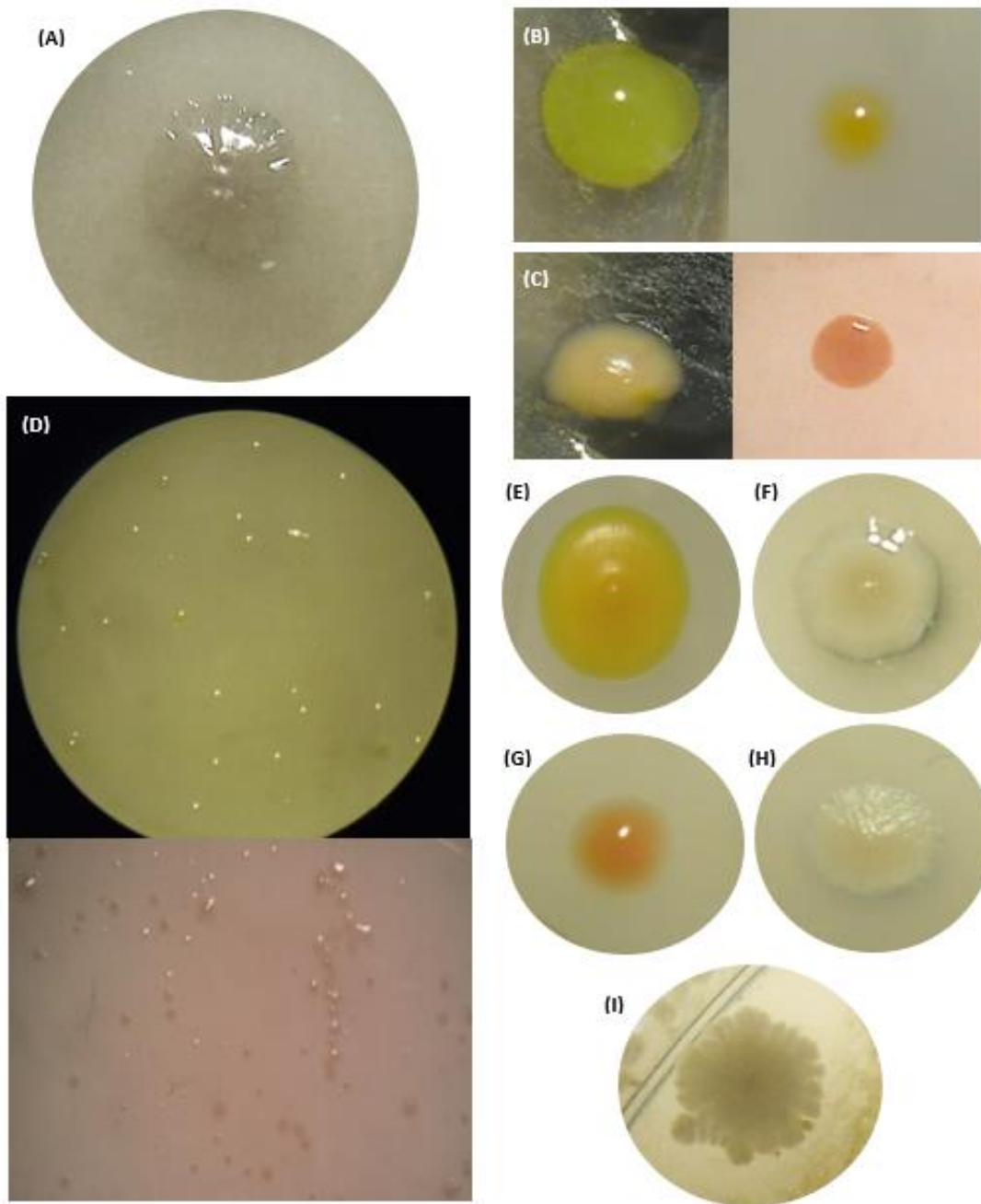


Fig. 21. Diversidad de morfotipos obtenidos: (A) morfotipo H, (B) morfotipo I, (C) morfotipo AC, (D) morfotipo AJ, (E) morfotipo E, (F) morfotipo L, (G) morfotipo K, (H) morfotipo A, (I) morfotipo W. Cabe destacar que los morfotipos H, AJ y AC son importantes en el Evento de Emblanquecimiento

Tabla 3. Tipos de morfotipos presentes en los distintos meses de muestreo según la disponibilidad de oxígeno (medio de cultivo óxico).

Cultivo bajo condiciones óxicas										
Presencia de O ₂	23 mayo		20 junio		01 agosto		22 agosto		26 septiembre	
	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹
Aerobio	A	36	A	38	B	69	A	27	C	10
	B	16	B	10	L	39	E	10	H	11
	G	6			AJ	5	L	39	R	3
							AI	21	AC	4
							AJ	100	AJ	19
Total		58		48		113		197		47
Aerotolerante	A	19	A	21	B	43	A	12	H	21
			H	10	L	64	E	7	AC	13
					AJ	25	L	13	AJ	17
							AI	18		
							AJ	82		
Total		19		31		132		132		51
Anaerobio	A	14	A	49	B	86	C	63	H	18
			H	8	L	18	E	31	AC	14
			Q	4	Q	9	H	10	AJ	13
					AJ	46	Q	8	AM	10
							AE	32		
							AI	4		
Total		14		61		159		329		55

Tabla 4. Tipos de morfotipos presentes en los distintos meses de muestreo según la disponibilidad de oxígeno (medio de cultivo anóxico).

Cultivo bajo condiciones anóxicas								
Presencia de O ₂	23 mayo		20 junio		01 agosto		22 agosto	
	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹	Morfotipo	UFC's mL ⁻¹
Aerobio	A	22	A	39	C	8		
			Y	22	AK	6		
			AE	6				
Total		22		67		14		
Aerotolerante	A	6	A	27	C	10		
			Y	7	AK	12		
Total		6		34		22		
Anaerobio	A	2	A	67	B	18	AK	6
					C	4		
Total		2		67		22		6

Cuantificación y aislamiento

Cuantificación de bacterias

De los cultivos bajo condiciones óxicas se aislaron los 40 morfotipos totales, de los cuales 13 fueron los morfotipos con mayor frecuencia, de acuerdo a la estimación promedio de *Unidades Formadoras de Colonias* (UFC's) en los diferentes meses de muestreo. De estos 13 morfotipos, siete se presentaron a lo largo de los diferentes meses de muestreo y estratos de la columna de agua [Tabla 5].

El morfotipo A se presentó durante los meses de mayo, junio y agosto en los tres estratos de muestreo (metalimnion, hipolimnion y fondo). El mes de junio registró la mayor abundancia de UFC's, teniendo un máximo de 49 UFC's mL⁻¹ en el fondo y un mínimo de 21 UFC's mL⁻¹ en el hipolimnion. En el mes de agosto se cuantificó la menor abundancia de UFC's, con 27 UFC's mL⁻¹ en el metalimnion y cero al fondo [Figura 22 (A)].

El morfotipo B se observó en los meses de mayo, junio y agosto; siendo este último (01 de agosto), el mes en el que se presentaron las abundancias más altas cuantificadas, en la zona del fondo un máximo de 86 UFC's mL⁻¹, y un mínimo 43 UFC's mL⁻¹ en la zona del hipolimnion [Figura 22 (B)].

En los meses de agosto y septiembre, se describió al morfotipo C; el cual durante el 22 de agosto se encontró en el fondo con un valor de 63 UFC's mL⁻¹, y el 26 de septiembre (Evento de Emblanquecimiento) se presentó en el epilimnion con 15 UFC's mL⁻¹ [Figura 22 (C) y 24 (A y B)].

En los meses de junio, agosto y septiembre se describió al morfotipo H; siendo el 26 de septiembre donde se registró la mayor abundancia en el epilimnion e hipolimnion con 13 UFC's mL⁻¹; mientras que el metalimnion tuvo 7 UFC's mL⁻¹ [Figura 22 (D) y 24 (B)].

El morfotipo L se observó en los dos muestreos de agosto. El realizado el 01 de agosto, tuvo la abundancia más alta en el hipolimnion con 64 UFC's mL⁻¹; mientras que el 22 de agosto mostró 39 UFC's mL⁻¹ en la zona del metalimnion [Figura 23 (A)].

El morfotipo Q se describió en los meses de junio y agosto; siendo el fondo donde se cuantificaron abundancias poco variables entre los mismos [Figura 23 (B)].

El morfotipo AJ, se describió durante los meses de agosto y septiembre. El 01 de agosto, la abundancia fue aumentando hacia el fondo registrando un valor de 46 UFC's mL⁻¹. El 22 de agosto destacó por tener los valores más altos de abundancia con 181 UFC's mL⁻¹ en el fondo. Por otro lado, el Evento de Emblanquecimiento (septiembre, 26), registró en la zona del epilimnion una mayor abundancia con 21 UFC's mL⁻¹, mientras la menor se presentó en el fondo (13 UFC's mL⁻¹). Hay que resaltar que AJ fue el único morfotipo que presentó las abundancias más altas durante un mismo mes [Figuras 23 (C) y 24 (A y B)].

Los seis morfotipos restantes de medio de cultivo en condiciones óxicas, aunque muy frecuentes no se presenciaron en más de un mes, entre estos se encuentran el morfotipo G para el 23 de mayo, los morfotipos E, AE, AI para el 22 de agosto y para el mes del Evento de Emblanquecimiento (septiembre, 26) se encontró AC y AM.

De los 40 morfotipos totales en medio de cultivo anóxico, aquellos que se cuantificaron como muy frecuentes fueron, el morfotipo A con un máximo de 22 UFC's mL⁻¹ en la zona del metalimnion (mayo, 23). El 20 de junio, se presentaron los morfotipos Y (22 UFC's mL⁻¹) y AE (6 UFC's mL⁻¹) en el metalimnion, y el morfotipo A (67 UFC's mL⁻¹) hacia el fondo. En el 01 de agosto, en la zona del metalimnion e hipolimnion se encontraron los morfotipos C (10 UFC's mL⁻¹) y AK (12 UFC's mL⁻¹); mientras en el fondo se encontró el morfotipo B (18 UFC's mL⁻¹). Para el 22 de agosto, sólo se manifestó el morfotipo AK con 6 UFC's mL⁻¹. Sin embargo, el aislamiento no pudo ser realizado para posteriores análisis debido a que los morfotipos no lograron desarrollarse.

Tabla 5. Morfotipos frecuentes bajo condiciones de crecimiento óxicas.

Morfotipos frecuentes	Presentes durante los cinco meses de muestreo
A	✓
B	✓
C	✓
E	
G	
H	✓
L	✓
Q	✓
AC	
AE	
AI	
AJ	✓
AM	

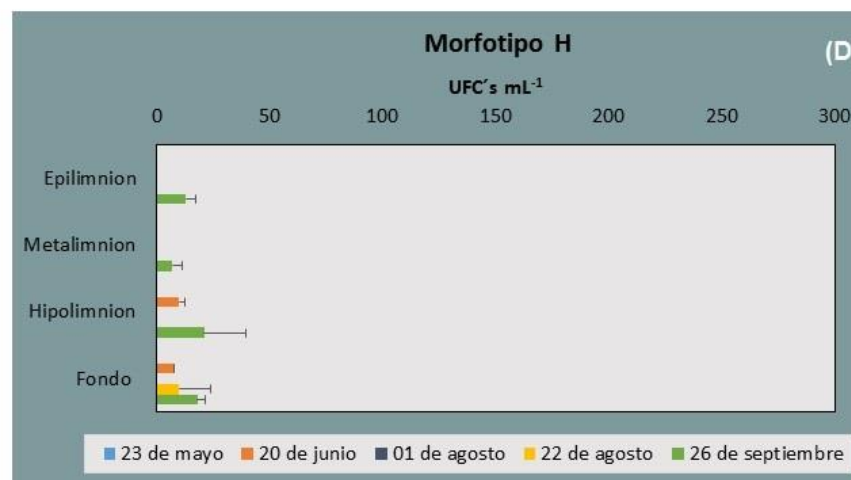
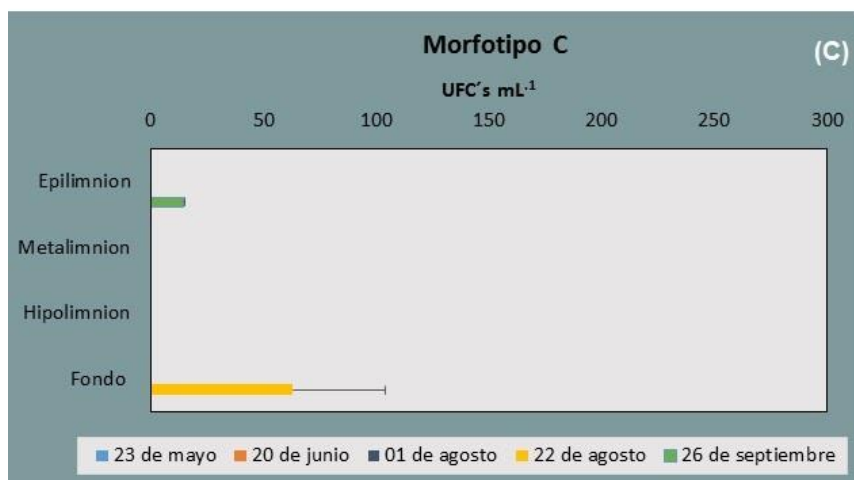
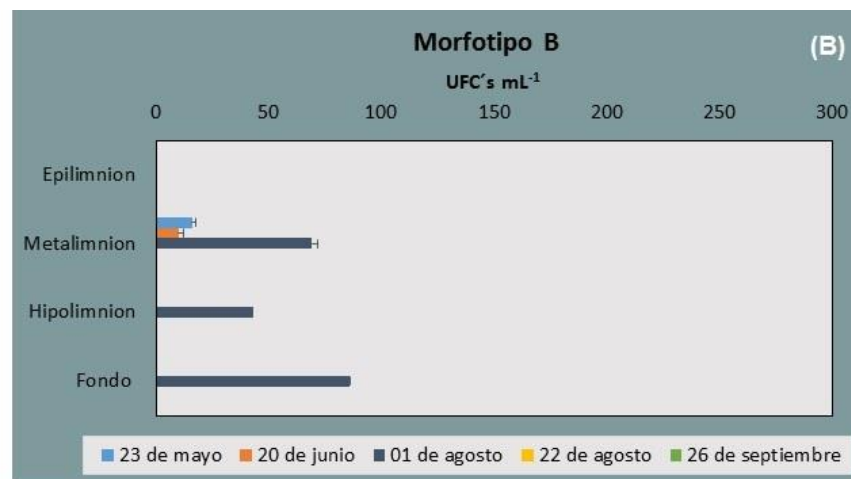
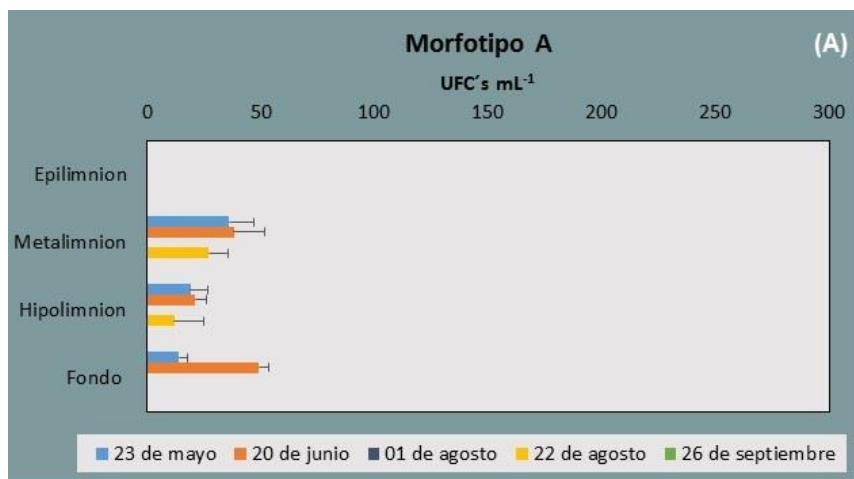


Fig. 22. Cuantificación promedio de UFC's en los diferentes estratos muestreados.

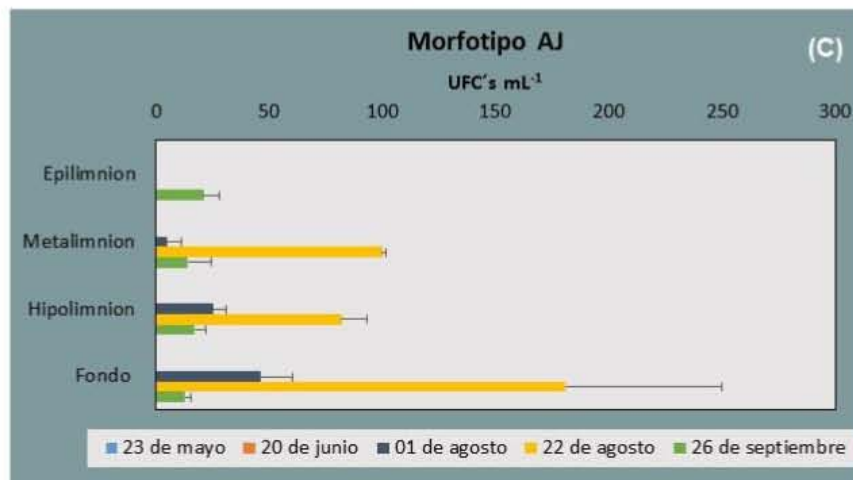


Fig. 23. Cuantificación promedio de UFC's en los distintos estratos muestreados.



Fig. 24. Cuantificación detallada de Unidades Formadoras de Colonias durante los meses de agosto y septiembre (Evento de Emblanquecimiento).

Sistema de Detección para Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

Durante el mes de agosto se presentó una mayor cantidad de células ($10,000 \text{ células mL}^{-1}$) en el fondo del sistema (34 metros); mientras que a los 17 metros y 27 metros de profundidad se estimaron $1,000 \text{ cél mL}^{-1}$ [Figura 26 (A)]

Durante el Evento de Emblanquecimiento (septiembre), en el epilimnion (5 metros) y en la superficie de la termoclina (17 metros) se cuantificaron $1,000 \text{ células mL}^{-1}$, aproximadamente. Es importante mencionar que a los 20 metros de profundidad (termoclina) se observó un importante aumento en el número de células que continuo hacia el fondo (32.9 metros), ($10,000 \text{ cél mL}^{-1}$) [Figuras 25 y 26 (B)].

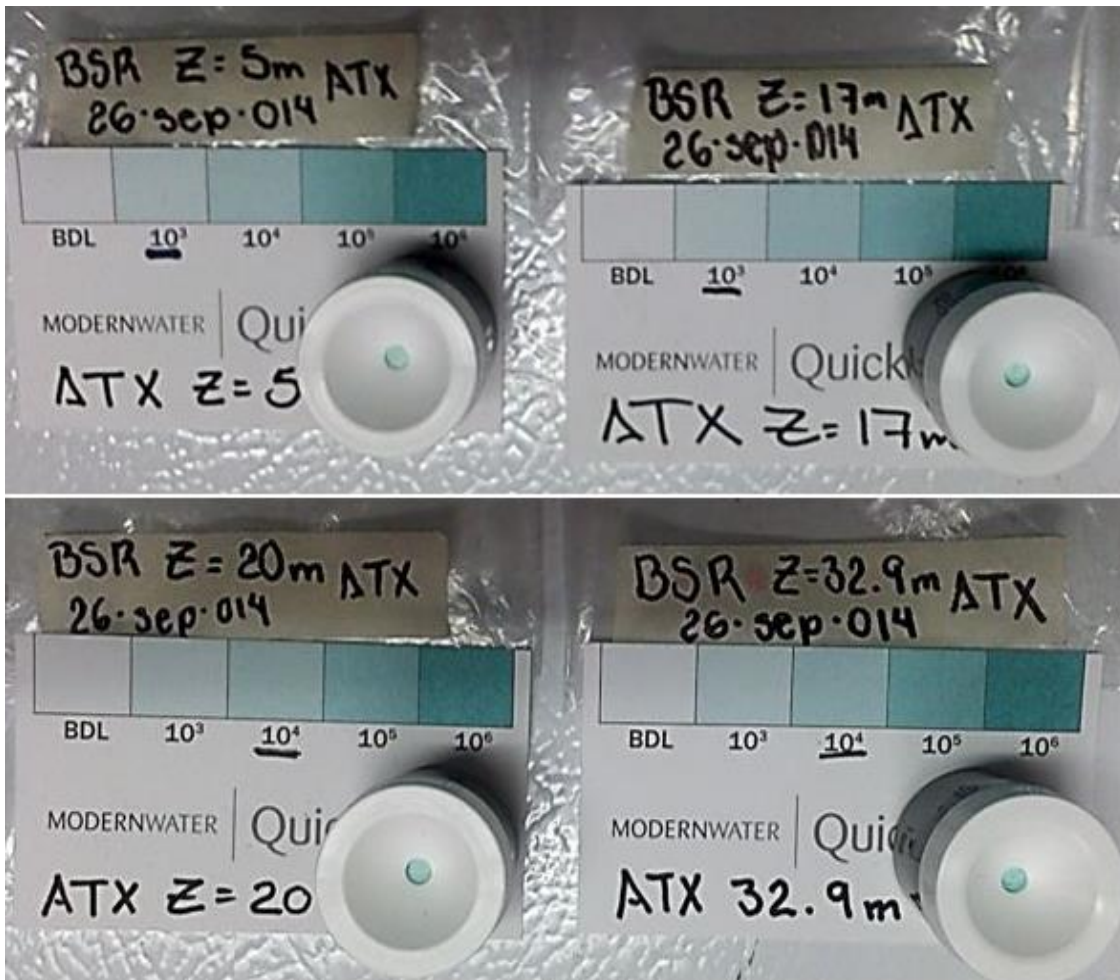


Fig. 25. Sistema de detección de Bacterias Sulfato Reductoras perteneciente al Evento de Emblanquecimiento.

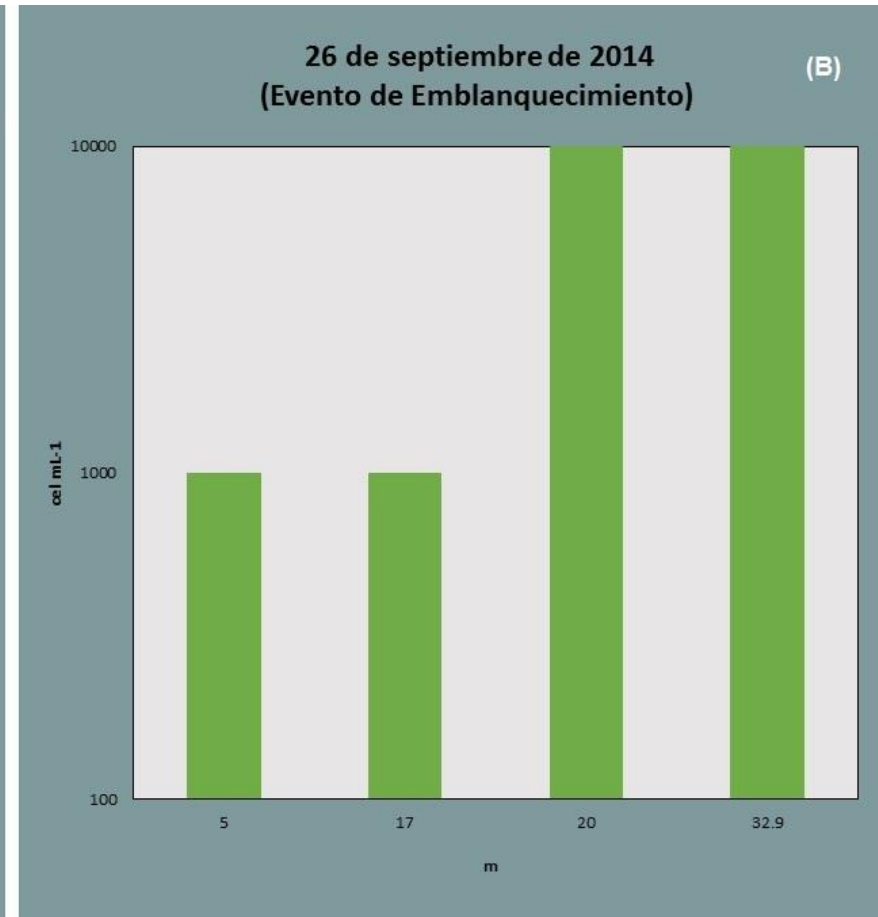
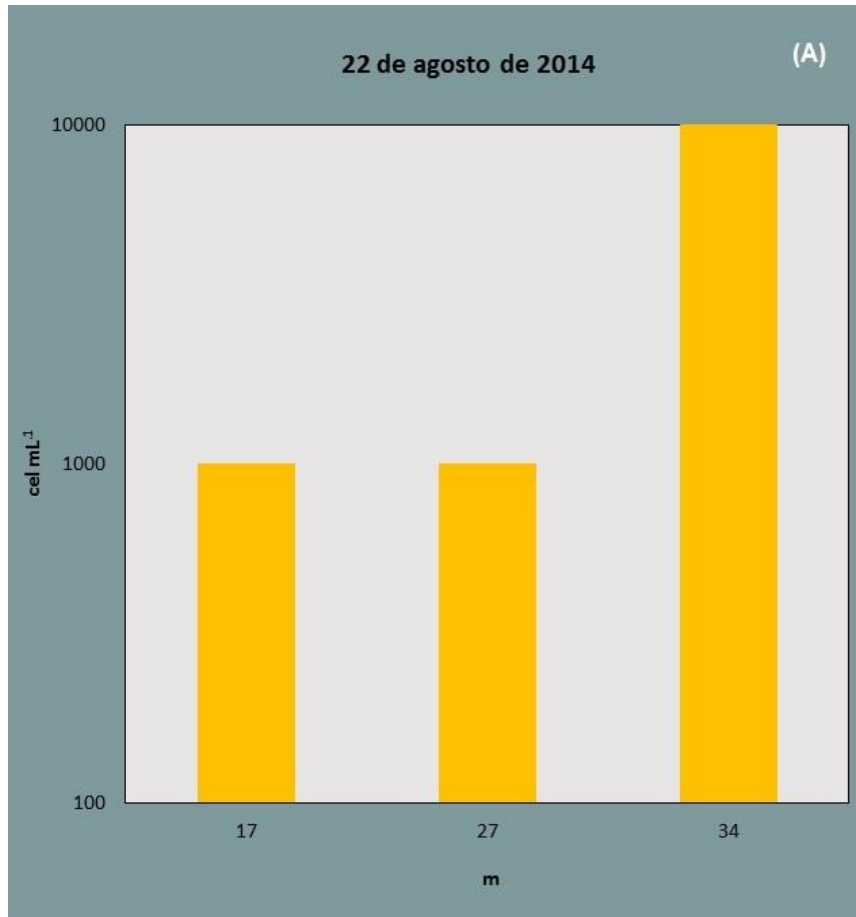


Fig. 26. Cuantificación de células mediante el sistema de detección, en los meses de agosto y septiembre (Evento de Emblanquecimiento) tomados en diferentes profundidades de la columna de agua.

Caracterización fenotípica

Con el fin de determinar fenotípicamente los 13 morfotipos más representativos se realizaron pruebas metabólicas, para poder describir a las bacterias sulfato reductoras según sus propiedades metabólicas, estas pruebas consistían en remplazar la fuente de energía (sulfato de magnesio) y la fuente de carbono (lactato) del medio de cultivo base (Anexo 2). Como fuentes de energía, fueron utilizados sulfito de sodio, tiosulfato de sodio, azufre elemental y nitrato de calcio; mientras las fuentes de carbono, fueron acetato de calcio, ácido fumárico, ácido málico, etanol, metanol, alanina y glicerol. El desarrollo de dichos morfotipos, en las diferentes condiciones de crecimiento, se observó en su mayoría entre los 3 a 5 días. Con dichos resultados se construyó una matriz binaria de ausencia-presencia, para conocer la respuesta metabólica según el desarrollo de biomasa y, así poder encontrar similitudes con géneros y especies pertenecientes a las BSR [Anexo 4].

De los 11 sustratos utilizados, siete fueron los que mostraron mayor efecto en la producción de la biomasa bacteriana; dentro de estos se encuentran etanol, glicerol, alanina y ácido málico (fuente de carbono) y tiosulfato de sodio, azufre elemental y nitrato de calcio (fuente de energía), durante los cinco meses de muestreo. El único sustrato que no presentó crecimiento fue el metanol. Por otro lado, los morfotipos que se desarrollaron en una mayor variedad de sustratos fueron AJ, Q, A, L y B; mientras que, el morfotipo que no se desarrolló en ningún tipo de sustrato fue AM [Anexo 4].

A través de un análisis de agrupamiento (“clustering”), se describieron las relaciones metabólicas entre los 13 morfotipos más frecuentes según su capacidad de crecimiento en los sustratos analizados. El 23 de mayo, presentó sólo dos morfotipos (A y G), por tanto, se muestra una alta afinidad entre ellos, al compartir cuatro sustratos metabólicos. El 20 de junio, presentó la formación de dos clúster, el primero, conformado por los morfotipos H, Q y A, los morfotipos H y Q mostraron una mayor afinidad metabólica al compartir tres sustratos; mientras que, el morfotipo B presentó una mayor lejanía [Figura 27 (A)].

El 01 de agosto se formaron tres clúster, donde los morfotipos B y L presentaron la mayor afinidad metabólica, seguidos por el morfotipo AJ, en tanto, el morfotipo Q fue el que presentó la relación más lejana [Figura 27 (B)].

El 22 de agosto, presentó la formación de cuatro clúster, en el primero, la relación más cercana fue entre los morfotipos H y AE, debido a que comparten un solo sustrato, el segundo clúster, es conformado por los morfotipos A y L; por último los morfotipos AJ y E, mostraron la mayor lejanía [Figura 27 (C)].

El 26 de septiembre (Evento de Emblanquecimiento), se formaron tres grupos, siendo más afines las parejas de morfotipos C y AM, así como H y AJ; el morfotipo AC presentó mayor diferencia [Figura 27 (D)].

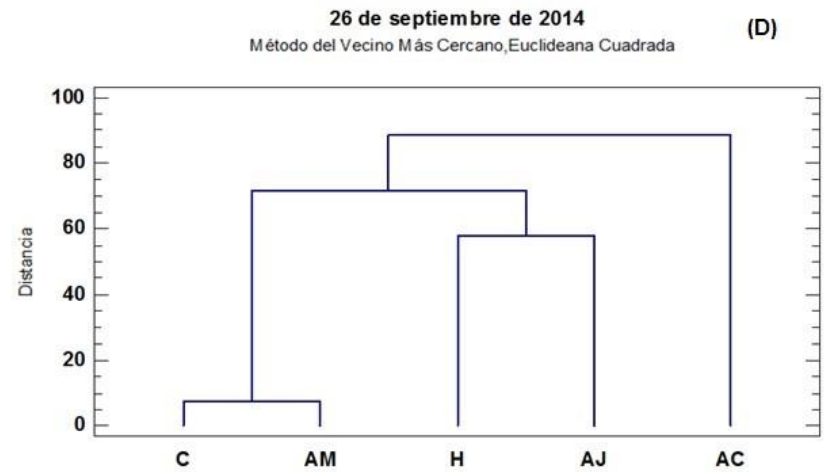
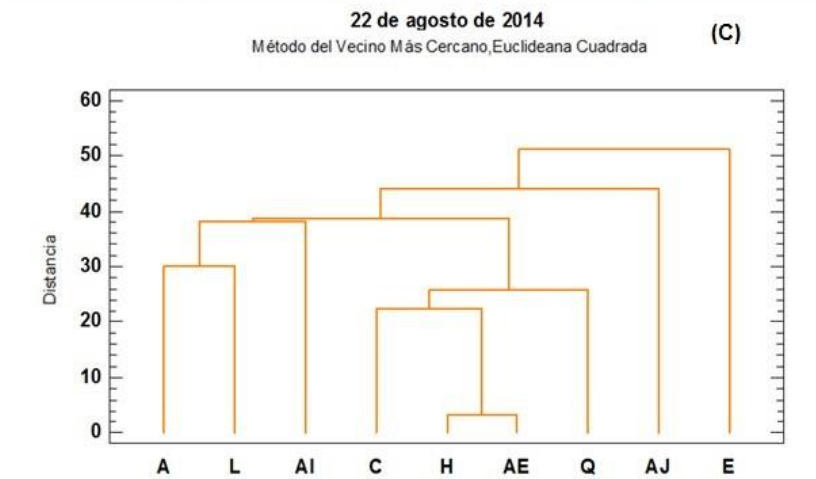
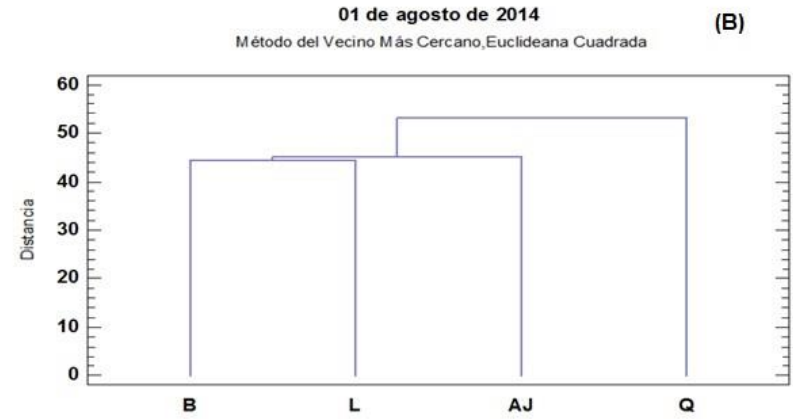
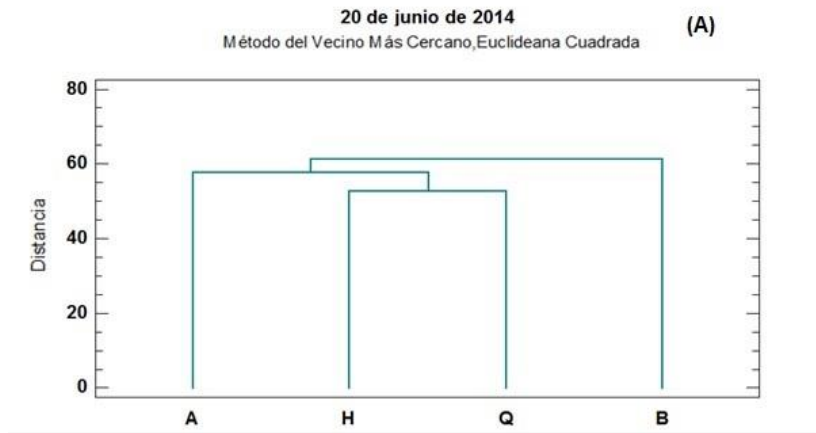


Fig. 27. Diagramas de agrupamiento de las pruebas metabólicas a lo largo de los meses de muestreo.

Correlaciones físico-químico-biológicas (Prueba de Spearman)

La prueba de Spearman (no paramétrica) se realizó para encontrar asociaciones de los morfotipos con el medio fisicoquímico o interacciones entre morfotipos, estas relaciones o asociaciones se dan directamente entre dos variables y son de dos tipos, positivos (es decir que las dos variables se asocian directamente de manera estrecha) y negativas (es decir que las dos variables se asocian de forma inversa).

De esta manera, se determinó que los sulfatos presentan una correlación negativa sobre el morfotipo H y el morfotipo Y; siendo H el morfotipo más importante durante el mes de Emblanquecimiento ya que fue de los morfotipos representativos aislados y caracterizados [Tabla 6].

Los parámetros que presentan una correlación con un mayor número de morfotipos son el pH y la dureza de calcio, el pH presenta una correlación negativa con los morfotipos B y D, mientras que con los morfotipos AI y AJ (de cierta relevancia durante el Evento de Emblanquecimiento) presentó una relación positiva. La dureza de calcio presentó relación positiva con el morfotipo E y negativa con H, O, AC e Y [Tabla 6].

En relación con carbonatos y bicarbonatos, el único morfotipo relacionado fue AC, el cual presentó una relación negativa con los carbonatos y positiva para bicarbonatos [Tabla 6].

Se encontraron correlaciones entre algunos morfotipos, A presentó relaciones negativas con un gran número de morfotipos, destacando AC, AE y AI que fueron activas durante el Evento de Emblanquecimiento [Tabla 7].

Los morfotipos AI y AJ presentes durante el Evento, presentaron una correlación positiva con el morfotipo E. Por otro lado, H presentó relaciones negativas con E, AC e Y; mientras el morfotipo AC presentó relación negativa con A y H, y positiva con K y O [Tabla 7].

Tabla 6. Correlaciones significativas entre parámetros físico-químicos y morfotipos. Los datos en rojo indican el P-value.

Morfotipo	B	D	E	F	H	K	R	O	Y	AC	AI	AJ
Parámetros físico-químicos												
Sulfatos					-0.5544				-0.5384			
					0.0318				0.037			
pH	-0.604	-0.5071					0.6668				0.608	0.6626
	0.0193	0.0495					0.0098				0.0185	0.0103
Conductividad				0.6894								
				0.0076								
TSD	0.5133			0.659					-0.5222			
	0.0468			0.0107					0.0431			
Dureza de calcio			0.5061		-0.5454			-0.5484	-0.5958	-0.8136		
			0.05		0.0347			0.0337	0.021	0.0016		
Dureza total	0.8483				-0.6	-0.6669	-0.619		-0.6088			
	0.001				0.0201	0.0098	0.0165		0.0184			
CO₃⁻										-0.5105		
										0.048		
HCO₃⁻										0.5444		
										0.035		

Tabla 7. Correlaciones significativas entre diferentes morfotipos. Los datos en rojo indican el P-value.

Morfotipo	F	J	K	L	O	Q	R	T	U	Y	AC	AE	AH	AI	AJ
A					-0.5105		-0.5091			-0.535	-0.5986	-0.5167			-0.5426
					0.048		0.0486			0.0383	0.0204	0.0454			0.0356
C	0.571		0.5777						0.5108				0.5108		
	0.027		0.0253						0.0479				0.0479		
D								0.5761							
								0.0257							
E														0.7173	0.7183
														0.0055	0.0054
G		1													
		0													
H			0.7777	-0.5088						-0.124	-0.2397				
			0.0026	0.0488						0.0091	0.0251				
K				-0.5106						0.7845	0.5804				
				0.048						0.0024	0.0246				
O											0.6716				
											0.0093				
U												0.5519	1		
												0.0326	0		
W	0.6547					0.5239		0.6831	0.6831						
	0.0112					0.0424		0.0082	0.0082						

Discusión

Parámetros físico-químicos

Temperatura y oxígeno disuelto

Los perfiles de temperatura muestran tres etapas de estratificación durante los meses de muestreo, característico de lagos tropicales como es el caso del lago Atexcac los cuales presentan una etapa de mezcla durante el invierno hemisférico, y el resto del año se encuentran estratificados, que corresponde con un comportamiento hidrodinámico de monomixis cálida de acuerdo con Hutchinson y Löffler (1953) y Lewis (1983). En el sistema se delimitaron tres etapas de estratificación (temprana, bien establecida y tardía) de acuerdo con la amplitud, variación de la temperatura y ubicación de la termoclina en los perfiles verticales [Figuras 14 y 15].

Las temperaturas promedio más altas se presentaron durante la estratificación bien establecida (junio a agosto), registrando la temperatura más alta el 01 de agosto, ya que en el hipolimnion y en el fondo se presentaron valores cercanos a los 16.5 °C, esto concuerda con lo reportado por Lagunas y Martínez (2015) para el lago Atexcac en el año 2012, donde las temperaturas más altas se encontraron durante la estratificación bien establecida (siendo agosto y septiembre para ese año), con la característica de que las temperaturas del hipolimnion y fondo oscilaron entre los 18°C .

El Evento de Emblanquecimiento se presentó durante la etapa de transición entre la estratificación bien establecida y tardía (septiembre, 2014), esto no concuerda con lo reportado en 2010, cuando fue registrado en la estratificación bien establecida (junio), (Arellano y González, 2011) y en 2013, donde se reportó en la estratificación temprana, durante el mes de mayo (Lagunas y Martínez, 2015). Esto indica que el Evento de Emblanquecimiento no ocurre en una época específica del año, como en el caso del lago Malo Jezero, donde se presenta a finales de mayo y principios de junio de forma regular (Sondi y Juračić, 2010).

La temperatura promedio durante el Evento de Emblanquecimiento fue de las más bajas registradas durante los meses muestreados, ya que la superficial fue de 19.5°C y hacia el fondo de 16.1°C. Esto contrasta con los Eventos de Emblanquecimiento registrados en Ontario, Canadá, durante los veranos de 1993 y 1995, donde una variable importante para que se dé la precipitación biológica de carbonatos son las temperaturas elevadas en la columna de agua, ya que durante esos dos veranos se dieron las temperaturas más altas, que superaban los 22° C en el nivel superficial; lo cual no sucedió en el año de 1994, donde la temperatura osciló alrededor de los 19° C y no se presentó el fenómeno (Hodell *et al.*, 1998). Los datos de la presente investigación son similares con el Evento de Emblanquecimiento de Atexcac en el 2013, ya que tampoco se dio durante la

etapa más cálida de la columna de agua (la cual se presenta en los meses de agosto y septiembre con temperaturas superficiales de 21 °C y 22 °C), más bien, se encontró durante el mes de mayo con una temperatura superficial aproximada de 20 °C y hacia el fondo de 16 °C (Lagunas y Martínez, 2015). Por lo que se podría concluir que las altas temperaturas en el lago Atexcac, no son la variable más importante que determina el Evento de Emblanquecimiento.

El oxígeno disuelto es un parámetro ligado con la temperatura; el cual presentó un patrón homogéneo a lo largo de los meses muestreados, con concentraciones de saturación en la superficie y hacia el fondo anóxicas [Figuras 14 y 15]. La mayor concentración de oxígeno fue registrada el mes de mayo, principalmente en el epilimnion y el metalimnion (7.41mg O₂ L⁻¹ y 5.81 mg O₂ L⁻¹, respectivamente); lo cual, podría ser el resultado de la actividad de organismos autótrofos, que aprovechan los nutrientes aún disponibles durante la estratificación temprana; aunado a esto, durante este mes, se encontró el florecimiento de una cianobacteria filamentosa, *Nodularia spumigena* [Anexo 1], (Komárek y Komárková-Legnerová, 2002; Macek *et al.*, 2007; Arellano y González, 2011; Lagunas y Martínez, 2015). Aunque dicha alga presentó el florecimiento más intenso en los meses de marzo y abril, la actividad metabólica podría generar un incremento en la concentración de oxígeno disuelto sobre todo superficialmente. De acuerdo con las concentraciones de oxígeno, los datos concuerdan con lo reportado para el año 2013, donde también para el mes de mayo se registró la máxima concentración de oxígeno disuelto (8.06 mg O₂ L⁻¹), aunque durante este mes se presentó el Evento de Emblanquecimiento en el lago (Lagunas y Martínez, 2015).

El mes de consolidación del Evento de Emblanquecimiento (septiembre, 2014), presentó una concentración de oxígeno ligeramente superior a la observada durante el mes de agosto. Esto puede ser debido a una elevada tasa fotosintética del picoplancton autotrófico [PPA] (Couradeau *et al.*, 2012) [que puede fotosintetizar por debajo del 1% del PAR] (Kosamu y Obst, 2009; Callieri, 2010) y otros organismos del fitoplancton, como *Merismopedia trolleri*, que pueden participar durante el Evento de Emblanquecimiento. Estos resultados son un patrón recurrente durante el Evento de mayo del 2013, donde la concentración de oxígeno aumentó en relación a meses anteriores a pesar de que se presentó en una etapa hidrodinámica distinta (Lagunas y Martínez, 2015).

pH y alcalinidad

El pH es un parámetro que define a Atexcac como un lago alcalino (Macek *et al.*, 2007). Durante el desarrollo del presente estudio, se registraron valores entre 8.7 y 8.9 en la estratificación temprana y a principios de la bien establecida (inicio del mes de agosto) [Figura 16]. Esta dinámica fue similar a lo observado en las mismas etapas hidrodinámicas

del 2013 (exceptuando mayo que fue donde se presentó el Evento de Emblanquecimiento) (Lagunas y Martínez, 2015). Mientras que en 2008, Can (2011) reporta un pH de 9.3, valor parecido al encontrado en el mes de septiembre de 2014.

De acuerdo con el sistema buffer, los valores de pH implican una dominancia de bicarbonatos sobre carbonatos (Gómez *et al.*, 2014), esto no se registró en todos los meses muestreados, ya que se presentó cierta sucesión en las dominancias de las formas de carbono, predominando los carbonatos en mayo y junio y los bicarbonatos en agosto (Figura 16). Para el 2008, 2009, 2010 y 2012 al 2013 en Atexcac, se reportan dominancias de bicarbonatos sobre carbonatos (Arellano y González, 2011; Can, 2011; Mancilla, 2012; Lagunas y Martínez, 2015). De acuerdo con Armienta y colaboradores (2008), se sabe que en los lagos *Maars* los bicarbonatos son dominantes; sin embargo el lago Atexcac presentó concentraciones homogéneas de carbonatos y bicarbonatos (534 mg L^{-1}), valores similares a lo reportado en el presente estudio en epilimnion y metalimnion del mes de junio. Mientras que Macek (2007), menciona que los carbonatos son los que se encuentran en mayores concentraciones en el mismo lago. De esta manera se asume que, dependiendo de las condiciones específicas al momento del muestreo existe una variación temporal y espacial en la concentración de carbonatos y bicarbonatos, probablemente asociado con las variaciones de pH, que favorece a algunas de las formas de carbono específicas dependiendo del punto de transición o transformación entre los bicarbonatos y los carbonatos, por lo que cualquier cambio en la formas químicas relacionadas con procesos biológicos específicos dan como resultado esta alternancia de las formas aniónicas en el sistema buffer.

Para el 22 de agosto se incrementó el pH en 0.4 unidades [Figura 16], este aumento de pH en los sistemas ha sido registrado poco antes del Evento de Emblanquecimiento (Thompson *et al.*, 1997; Arellano y González, 2011; Lagunas y Martínez, 2015), se cree que es provocado por el metabolismo del PPA, particularmente *Synechococcus spp.*, el cual es un género abundante en lagos oligotróficos (Padisak *et al.*, 1997) y también es reportado para el lago Atexcac (Callieri *et al.*, 2013). Al darse un florecimiento de este grupo bacteriano, el ambiente que rodea a la célula tiene un pH más alto debido a la actividad fotosintética, promoviendo la precipitación de carbonato de calcio inter o intracelularmente (Thompson *et al.*, 1997; Hodell *et al.*, 1998; Kosamu y Obst, 2009; Couradeau *et al.*, 2012). No solo el PPA promueve esta precipitación de carbonato, hoy en día se sabe que otras cianobacterias, algunos heterótrofos aeróbicos y particularmente bacterias sulfato reductoras, generan reacciones químicas que también lo propician (Baumgatner *et al.*, 2006), indicando que la precipitación de carbonato de calcio es fuertemente controlada por la concentración y la actividad de células bacterianas (Bundelewa *et al.*, 2012). Por ejemplo, las BSR facilitan la disponibilidad de iones carbonato

en solución, al consumir sulfato y producir sulfuro se da un aumento del pH y por tanto de la alcalinidad (Braissant *et al.*, 2007).

De esta manera se puede decir que el Evento de Emblanquecimiento comenzó desde el 22 de agosto y que su máxima expresión se presentó en el mes de septiembre. Este último mostró ciertas particularidades, ya que el pH del epilimnion fue de 9.2, debido a la actividad fotosintética, lo que provocó una concentración de carbonatos casi del doble en comparación a la concentración de bicarbonatos, y descendió hacia el hipolimnion y el fondo hasta llegar a 9.0, donde la concentración entre carbonatos y bicarbonatos presentaron valores más homogéneos [Figura 16]. Este patrón se debe a que superficialmente se presenta una capa densa de carbonato de calcio por actividad microbiana, lo que genera que los organismos fotosintéticos se acumulen lo más cercano a la superficie para continuar con su metabolismo (Thompson *et al.*, 1997; Hodell *et al.*, 1998).

Por otro lado, cabe destacar que no necesariamente un aumento en el pH puede desencadenar el Evento de Emblanquecimiento en el lago Atexcac, ya que de agosto a octubre del 2012 el pH se encontró entre 9.2 y 9.4, y no se reportó dicho Evento (Lagunas y Martínez, 2015).

Dureza total, dureza permanente, dureza temporal y dureza de calcio

La dureza total en ambientes naturales se presenta principalmente por cationes divalentes como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} , que interactúan con los carbonatos y bicarbonatos, principalmente (Boyd, 1990). Las concentraciones registradas en el presente estudio se encontraron entre los 2800 y los 3000 $mg\ CaCO_3\ L^{-1}$; exceptuando al Evento de Emblanquecimiento [Figura 17]. Armienta y colaboradores (2008), presentaron un cuadro con los 4 cationes más importantes en los lagos volcánicos ($Na^+ > Mg^{2+} > K^+ > Ca^{2+}$), que al sumarlos dan un total de 2476 $mg\ L^{-1}$, esta concentración es cercana a los 2668 $mg\ L^{-1}$ presentes durante el Evento de Emblanquecimiento, teniendo en cuenta que existen otros cationes que podrían ser de cierta relevancia como el manganeso y hierro por algunos tipos de minerales dominantes como dióxidos presentes en Atexcac.

Si se toma en cuenta la composición edáfica y el tipo de rocas predominantes en la cuenca, los cationes más abundantes en el cuerpo de agua son el sodio de origen no marino [atalasohalino] (Macek *et al.*, 2007), seguido del magnesio, por una sobresaturación de minerales de magnesio y silicato de magnesio (dolomita y magnesita) propios de una interacción del agua con rocas ígneas comunes de un lago volcánico (formado entre el Pleistoceno tardío y el Holoceno). Posteriormente, los aniones más importantes son los cloruros, seguidos de los bicarbonatos y carbonatos, y por último los sulfatos (Armienta *et al.*, 2008). Esto propicia que la dureza del lago Atexcac, no

precisamente sea dada por Mg^{2+} y Ca^{2+} , teniendo en cuenta que el Ca^{2+} es el menos abundante en el lago, siendo el Na^+ y el Mg^{2+} los que juegan un rol importante en las denominadas aguas muy duras de acuerdo con la clasificación de Boyd (1990) del lago Atexcac.

Por otra parte, la dureza total es más del doble de la concentración de la alcalinidad total, a lo largo del tiempo [Figura 17], esto indica que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} se asocian con sulfatos, cloruros, silicatos o nitratos y no solamente con carbonatos y bicarbonatos presentes en el lago (Boyd, 1990).

La dureza permanente o no carbonatada se define como la dureza que no puede ser eliminada por evaporación (Boyd, 1990), y es dada principalmente por cloruros y sulfatos. En el lago Atexcac los cloruros representan más del 40% de las formas disueltas, (Armienta *et al.*, 2008; Can, 2011; Mancilla, 2012), si a esto se le suma la cantidad de sulfatos se forma una idea del por qué en los meses muestreados la dureza permanente es mayor a la dureza temporal, la cual es dada por formas carbonatadas principalmente. Para el Evento de Emblanquecimiento, la dureza temporal y permanente mostraron una tendencia a concentraciones similares, por lo menos en el fondo se registraron las concentraciones más cercanas una de otra ($1250 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ y 1390 mg L^{-1} , respectivamente), esto puede deberse a la actividad microbiana propia del fenómeno, dado por picocianobacterias y algunas especies de *Desulfovibrio*, estas últimas, al comenzar a metabolizar liberan carbonatos al medio, ya que toman los sulfatos del ambiente y por medio de reacciones químicas específicas pueden liberar carbonato de calcio o magnesio (Wright, 1999; Baumgatner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007). Por su parte, en microbialitos del lago Alchichica se ha determinado que están formados principalmente por hidromagnesita (Couradeau *et al.*, 2011), siendo que el magnesio es un catión muy dominante en las aguas del lago Atexcac, lo que hace suponer que este ión podría tomar un rol importante en la litificación biogénica.

El calcio es el catión menos dominante en Atexcac, con concentraciones mínimas de $56 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ y máximas de $172 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, durante los meses muestreados [Figura 18]. Sin embargo, en los lagos *Maar* se sabe que existe una sobresaturación de calcio y magnesio, dado por minerales como calcita, dolomita o aragonita, que son propios de la litología de la Cuenca Oriental de Puebla, la cual incluye rocas sedimentarias, seguidas de arcillas calcáreas y pedernal del Jurásico superior y Cretácico (Armienta *et al.*, 2008).

Las concentraciones de 27 mg L^{-1} de calcio publicadas en Armienta y colaboradores (2008), siendo que de igual manera, se ocupó el método complejométrico para su medición, presentan valores un poco alejados a las cuantificadas durante los meses de

muestreo, ya que durante el presente estudio la concentración mínima se dio durante el Evento de Emblanquecimiento en la zona superficial con $56 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Este valor mínimo podría ser provocado por actividad microbiana, particularmente de picocianobacterias, que ocupan las formas bicarbonatadas para su metabolismo y a su vez generan una elevada precipitación de carbonato de calcio, producido en el epilimnion y metalimnion hacia el fondo. Esto se aprecia fácilmente ya que en el hipolimnion se registró una mayor concentración de calcio ($80 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$); de acuerdo con la composición química del calcio, este precipita fácilmente a pH mayores o iguales a 8.3 [principalmente la calcita] (Armienta *et al.*, 2008).

Las bacterias sulfato reductoras pueden tomar el calcio del sistema y por su metabolismo exudan (exopolímeros [EPS]), carbonato de calcio y magnesio, al igual que las picocianobacterias. El cual actúa en la formación de minerales como calcita, dolomita o aragonita (Wright, 1999; Bosak y Newman, 2003). Como es el caso de Evento de Emblanquecimiento en el lago Malo Jezero, donde se registró una precipitación de aragonita, principalmente (Sondi y Juračić, 2010).

A pesar de esto, Bundeleva (2012) menciona que el descenso del calcio en un medio de cultivo líquido, es poco probable que esté vinculado con la absorción de Ca^{+2} por la superficie bacteriana de bacterias fototróficas anoxigenicas, ya que una biomasa total de 10 g L^{-1} solo produce una disminución aproximada de 0.2 a 0.3 mM de calcio, significativamente menor a la disminución total del calcio en los medios de cultivo (en ocasiones de 4 a 5mM); dando como pauta, que la mayor pérdida de calcio se produzca por precipitación química de carbonato de calcio (dado por el aumento del pH), algo similar sucedería con el magnesio, de esta manera también se puede asociar con la precipitación de dolomita (Braissant *et al.*, 2007).

Conductividad eléctrica y Total de Sólidos Disueltos (TSD)

La conductividad eléctrica es un parámetro que se emplea particularmente para calcular el TSD, que en los lagos refleja la salinidad, la cual presentó un comportamiento conservativo en el transcurso del tiempo de estudio, dado que no tuvo cambios significativos en su concentración [Tabla 1]. La salinidad presente en el lago Atexcac es típica de lagos endorreicos, donde la concentración iónica se acentúa por el déficit de afluentes y lluvias (Torres y García, 1995; Lagunas y Martínez, 2015). Se ha determinado que Atexcac presenta una salinidad de tipo clorhídrica ($\text{Cl}/\text{SO}_4 > 2$), siendo el cloruro de sodio el soluto más importante (Can, 2011). De ahí el hecho de que Atexcac sea considerado un lago atalasoalino (Macek *et al.*, 2007).

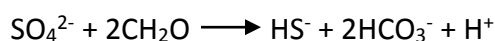
El Evento de Emblanquecimiento presentó un ligero descenso en la concentración de la salinidad, que va de 6 g L^{-1} durante el 22 de agosto a valores de 5.8 g L^{-1} durante el 26

de septiembre, esto se podría explicar, teniendo en cuenta que la salinidad presenta pocas variaciones en un ciclo anual, estas variaciones suelen asociarse con alteraciones de iones menos conservativos como lo son el calcio y los carbonatos (Torres y García, 1995). Durante el Evento de Emblanquecimiento se registró la menor concentración de calcio ($64.23 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$) [Figura 18] y un aumento importante en la concentración de carbonatos ($760 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$), probablemente relacionado con la actividad microbiana del lago [Figura 16]. Estos patrones podrían generar este ligero descenso de salinidad.

Sulfatos

Durante el tiempo de estudio, las concentraciones de sulfatos en el lago Atexcac muestran fluctuaciones temporales; sin embargo, se mantienen en promedio en los meses de mayo y agosto por arriba de los 100 mg L^{-1} , esto contrasta con lo reportado por Armienta y colaboradores (2008), ya que maneja concentraciones máximas para Atexcac por arriba de los 200 mg L^{-1} , siendo por lo menos el doble de lo encontrado en el periodo estudiado.

Para el mes de junio y de septiembre (Evento de Emblanquecimiento), la concentración de sulfatos descendió gradualmente hasta los 75 mg L^{-1} [Figura 19]. Este descenso puede ser causado por la actividad microbiana, principalmente por las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), como ha sido propuesto por Caumette (1986). A su vez las BSR facilitan la disponibilidad de iones carbonato en solución, esto se da como resultado del consumo de sulfato y la producción de sulfuro, lo que aumenta el pH y por tanto la alcalinidad (Braissant *et al.*, 2007), mediante la reducción de iones de sulfato y el consumo de ácidos orgánicos, produciendo grandes cantidades de sustancias exopoliméricas (EPS), (Bosak y Newman, 2006), el mecanismo por el que se propicia esta precipitación es descrita a menudo por las siguientes ecuaciones:



propuestas por Bosak y Newman (2003) y Baumgatner y colaboradores (2006), donde, por una molécula de sulfato y dos moléculas de carbono orgánico consumidas, potencialmente una molécula de carbonato de calcio puede precipitar (Baumgatner *et al.*, 2006). Todos estos procesos influyen en la morfología y la mineralogía de los minerales de carbonato, donde se dan interacciones de EPS con el calcio particularmente, y que se cree son los principales procesos mediante los cuales la matriz extracelular controla la precipitación de los minerales de carbonato (Braissant *et al.*, 2007).

Este aumento de pH es clave para el Evento de Emblanquecimiento, ya que propicia el metabolismo de las picocianobacterias para la asimilación de las formas bicarbonatadas (Thompson *et al.*, 1997; Hodell *et al.*, 1998; Kosamu y Obst, 2009;

Couradeau *et al.*, 2012), y ayuda a que las BSR promuevan la precipitación de carbonatos (Bosak y Newman, 2003; Dupraz y Visscher, 2005; Baumgatner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007), participando activamente durante el Evento de Emblanquecimiento (Thompson, 2009).

En el Evento de Emblanquecimiento la mayor actividad metabólica de BSR se presentó en el hipolimnion y el fondo (anóxico), donde las concentraciones de sulfatos disminuyeron poco más de 20 mg L⁻¹ en comparación del epilimnion [Figura 19]. Este patrón es contrario a lo presentado el mes previo, donde la menor concentración se cuantificó en la superficie y fue aumentando hacia el fondo del lago. Esto puede deberse a que existen diversos grupos tolerantes al oxígeno, entre los que destacan algunas especies del género *Desulfovibrio* (Cipionka, 2000; Baumgatner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007).

En el estudio se encontró una relación entre la concentración de los sulfatos con la alcalinidad del lago, ya que cuando se presentaron concentraciones máximas ya sea de bicarbonatos (01 de agosto) o carbonatos (23 de mayo y 22 de agosto), también se registraron concentraciones máximas de sulfatos por arriba de los 100 mg L⁻¹ [Figura 20]. La alcalinidad de las aguas es un parámetro que explica la concentración de las bases presentes en el agua, y que son expresadas en miligramos por litro de carbonato de calcio (Gómez *et al.*, 2014). En este caso, el lago Atexcac se caracteriza por tener una dominancia de cloro, carbonatos y bicarbonatos (Macek *et al.*, 2007); sin embargo, al ser un lago volcánico, los sulfatos presentan concentraciones también importantes, por lo que tal vez el método de indicadores empleado para medir alcalinidad, pudo llegar a cuantificar concentraciones de sulfatos probablemente de calcio.

Los sulfatos son los aniones menos abundantes en Atexcac, esto contrasta con el hecho de que es un lago volcánico (*Maar*), donde se esperaría que las formas de azufre sean las dominantes como en el caso del lago Chichón, la diferencia puede deberse a que el primero no es un sistema activo mientras que el segundo sí lo es (Armienta *et al.*, 2008). Aunado a esto, el lago Atexcac presenta litificación que favorece una mayor concentración de las formas aniónicas de carbono, dada por la formación de la Cuenca Oriental de Puebla (Jurásico-Cretácico), por lo que la dominancia aniónica sigue el siguiente orden cloro > bicarbonatos > carbonatos > sulfatos (Armienta *et al.*, 2008). Lo anterior contrasta con lo reportado por Can (2011) y Mancilla (2012) que muestran para los años de 2008 a 2011 una relación en Atexcac de cloro > bicarbonatos > sulfatos > carbonatos en la zona superficial, lo que no fue registrado en el presente estudio durante todo el ciclo anual [Figura 19]. A pesar de esto, los sulfatos (por su concentración en el lago), siguen siendo un parámetro importante para la dinámica química del sistema, así como, para la actividad microbiana, particularmente para las bacterias sulfato reductoras (Sievert *et al.*, 2007; Muyzer y Stams, 2008).

Análisis microbiológico

Descripción y clasificación por morfología colonial

Los estudios sobre Bacterias Sulfato Reductoras se han centrado principalmente en sedimentos marinos, ventilas hidrotermales, tapetes o costras microbianas [entre ellas los microbialitos] (Caumette, 1986; Amann *et al.*, 1992; Minz *et al.*, 1999; Bosak y Newman, 2003; Muyzer y Stams, 2008; Barton y Fauque, 2009; Sorokin *et al.*, 2012). Hasta el momento existen pocos trabajos que describan a este grupo bacteriano en lagos; los cuales, se centran en el análisis de los sedimentos más profundos y en la zona litoral (Sass *et al.*, 1998; Teske *et al.*, 1998). Por tanto es prácticamente nula la investigación de las BSR en la columna de agua; sin embargo, han llegado a ser analizadas con otros grupos bacterianos (picoplancton heterotrófico) como lo evaluado en el lago Alchichica (Hernández-Avilés *et al.*, 2010), y algunos datos de la comunidad sulfato reductora en el lago oligotrófico Gek-Gel (Azerbaijan) (Karnachuk *et al.*, 2006).

En los cinco meses de muestreo se describió un total de 40 morfotipos distintos de BSR [Tabla 2], que superan al número de aislados encontrados en sedimentos profundos y zona litoral del lago oligotrófico Stechlin en Alemania [23 morfotipos en dos muestreos] (Sass *et al.*, 1998). Es probable que la abundancia de BSR en Atexcac sea mayor por el esfuerzo de muestreo, ya que estos morfotipos se presentaron a lo largo de los 5 muestreos y se presentó un recambio en la composición de morfotipos entre los meses muestreados [Tabla 3 y 4], dado que la mayor diversidad se dio el 22 de agosto con 9 morfotipos distintos encontrados en toda la columna de agua, ya que los demás meses muestreados presentaron 4 o 5 morfotipos. Aunado a esto ya que Atexcac es un lago volcánico, contiene una abundante concentración de sulfatos [SO_4^{2-}] (Armienta *et al.*, 2008), y al ser monomíctico cálido, el hipolimnion presenta condiciones de anoxia gran parte del año provocando que las condiciones sean favorables para el crecimiento de BSR (Muyzer y Stams, 2008; Barton y Fauque, 2009).

El proceso de aislamiento de las BSR se realizó en dos medios de cultivo bajo condiciones distintas (óxicas y anóxicas); de las cuales, el cultivo óxico presentó la mayor diversidad de morfotipos y una alta abundancia de UFC's [Tabla 3]. Bajo estas condiciones, el crecimiento bacteriano requirió de 7 días, menor a lo requerido en los cultivos anóxicos (4 semanas aprox.). Esta variación puede deberse a que el cultivo anóxico, presenta condiciones más restringidas (Guyoneaud *et al.*, 1996), que podrían ser estresantes para algunas bacterias por las condiciones reducidas que propician que el metabolismo sea más lento, y el crecimiento bacteriano sea menos evidente. El cultivo anóxico presentó la mayor abundancia de UFC's en el estrato anaerobio a lo largo de los 5 muestreos [Tabla 4]. Debido a la limitación del crecimiento bacteriano bajo condiciones anóxicas en el

laboratorio, los resultados obtenidos no fueron considerados ya que no fue posible aislar los morfotipos; además se obtuvo un nulo crecimiento en las muestras del Evento de Emblanquecimiento.

Debido a que el cultivo óxico presentó la mayor diversidad y abundancia de BSR, los resultados fueron organizados en zonas de acuerdo con la disponibilidad de oxígeno (aerobio, microaerobio y anaerobio). En general, la zona anaerobia presentó la mayor abundancia de morfotipos a través del tiempo de muestreo (excepto mayo, donde la mayor abundancia se dio en la zona aerobia), siendo los meses de junio a agosto los que presentaron la mayor cantidad de morfotipos [Tabla 3]. La abundancia de BSR puede ser mayor debido a los procesos de transformación química del azufre que ocurren en el lago Atexcac, ya que utilizan el sulfato como aceptor terminal de electrones durante la degradación de compuestos orgánicos, lo que resulta en la producción de sulfuro, compuesto asociado a la reducción desasimilatoria del sulfato (Freyre, 2006; Muyzer y Stams, 2008) [Figura 1]. Este proceso desasimilatorio está acoplado a la oxidación de ácidos grasos, como el lactato y el piruvato, que generan ATP (Freyre, 2006). Dicho proceso es realizado por bacterias de los órdenes Desulfovibrionales y Desulfobacterales, principalmente (Caumette, 1986; Muyzer y Stams, 2008; Barton y Fauque, 2009; Sorokin *et al.*, 2011^a; Sorokin *et al.*, 2011^b; Sorokin *et al.*, 2012; Sorokin *et al.*, 2014). Sin embargo, las bacterias cultivadas en este trabajo podrían no considerarse anaerobias estrictas, ya que crecieron en condiciones ambientales óxicas.

La afirmación de que las BSR son estrictamente anaerobias, comenzó a cambiar con la demostración de la reducción de sulfato en ambientes óxicos. Muchas investigaciones se han realizado desde entonces para obtener algunas ideas sobre la respuesta de estas bacterias al oxígeno (Eschemann *et al.*, 1999; Cypionka, 2000; Sigalevich y Cohen 2000; Mogensen *et al.*, 2005; Baumgatner *et al.*, 2006; Karnachuk *et al.* 2006; Braissant *et al.*, 2007). Algunas bacterias reductoras de sulfato se encuentran irreversiblemente inactivadas en presencia de bajas concentraciones de oxígeno, mientras otras sobreviven a la aireación; a pesar de que la reducción de sulfato es suprimida por el oxígeno (Muyzer y Stams, 2008). Lo anterior es importante, debido a que los cultivos realizados en la presente investigación mostraron crecimiento bacteriano en condiciones microaerobias (aerotolerantes) y aerobias.

Los grupos de las BSR son filogenética y metabólicamente versátiles, algunas especies consideradas primeramente como anaerobios estrictos fueron capaces de realizar una respiración microaeróbica acoplada a la conservación de energía (Barton y Fauque, 2009). Por lo que el número de colonias aisladas microaeróbicamente son importantes y, en general, la abundancia de morfotipos fue mayor en la zona aerobia que en la microaerobia [Tabla 3]. Estos resultados son de gran relevancia, ya que confirman

que las BSR podrían adaptarse a condiciones oxigénicas. En los últimos 30 años, se ha hecho evidente la respiración aerobia en las BSR, particularmente en diversas especies de *Desulfovibrio* (Dannenberg *et al.*, 1992; Santegoeds *et al.*, 1998; Minz *et al.*, 1999; Cypionka, 2000; Fournier *et al.*, 2004;), donde se demuestra que el oxígeno no es tóxico y puede ser utilizado en su metabolismo (NADH oxidasa, Rubredoxina oxidoreductasa, reducción del oxígeno periplásmico). El proceso de respiración aeróbica está acoplado con la translocación de protones y la conservación de ATP (Cypionka, 2000; Fournier *et al.*, 2004), donde también se correlacionó con una reducción de lactato y producción de H₂ y sulfuro (Dolla *et al.*, 2006).

Cuantificación y aislamiento

Cuantificación de bacterias

La cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC's), permitió hacer una comparación de la abundancia de morfotipos a través del tiempo. El mes de mayo fue el segundo mes que presentó una menor abundancia, ya que el promedio de los 3 estratos fue de 33 UFC's mL⁻¹, para junio la abundancia aumento a 47 UFC's mL⁻¹, para el 01 de agosto la tendencia de aumento siguió ya que se registraron 135 UFC's mL⁻¹ y para el 22 de agosto (un mes antes de la máxima expresión del Evento de Emblanquecimiento) se dio el máximo en la abundancia de UFC's con 181 UFC's mL⁻¹ en promedio, por último, para septiembre este valor decreció, ya que solo se cuantificaron 21 UFC's mL⁻¹ siendo la menor abundancia presentada en este estudio [Tabla 3]. De esta manera se aprecia una tendencia de aumento en la abundancia de BSR hasta que se presentó el Evento de Emblanquecimiento.

Al ser el mes de agosto la etapa anterior al Evento de Emblanquecimiento, fue posible realizar una comparación de abundancia y diversidad de morfotipos considerados como frecuentes. Como ya se comentó el 22 de agosto presentó la mayor diversidad de morfotipos descritos en los diferentes estratos muestreados (metalimnion, hipolimnion y fondo) [9 morfotipos; Tabla 3]. Así también, fue el mes que registró la mayor abundancia, con de 181 UFC's mL⁻¹. Por el contrario, el 26 de septiembre (mes del Evento de Emblanquecimiento), tuvo una menor diversidad (5 morfotipos) y abundancia (21 UFC's mL⁻¹).

Ambos meses tuvieron en común tres morfotipos, C, H y AJ; de los cuales el morfotipo AJ, durante el mes de agosto, presentó una abundancia muy alta en todos los estratos (100 UFC's mL⁻¹ en el metalimnion, 82 UFC's mL⁻¹ en el hipolimnion y 181 UFC's mL⁻¹ en el fondo). En cambio, en el mes de septiembre, durante el Evento de Emblanquecimiento, se registraron 21 UFC's mL⁻¹ en el epilimnion, 14 UFC's mL⁻¹ en el metalimnion, 17 UFC's mL⁻¹ en el hipolimnion y 13 UFC's mL⁻¹ en el fondo [Tabla 3].

El 22 de agosto se presentó un tipo de florecimiento o incremento de la abundancia de BSR, que se observó en el número de colonias que se desarrollaron; 150 UFC's mL⁻¹ en promedio para toda la columna de agua, en el muestreo del 01 de agosto. En cambio, para el muestreo del 22 del mismo mes se cuantificaron 329 UFC's mL⁻¹; siendo el morfotipo AJ, el que presentó mayor dominancia en los tres estratos en ambos muestreos [Tabla 3; Figuras 23 y 24]. Estos resultados podrían ser muy relevantes, dado que la reducción de sulfatos genera un aumento en el pH, afectando el índice de saturación y la precipitación de carbonato (Bosak y Newman, 2003; Braissant *et al.*, 2007), una de las formas en que se presenta esta precipitación de carbonatos, es cuando las BSR utilizan ácidos orgánicos de bajo peso molecular (por ejemplo lactato o acetato) como donadores de electrones para el crecimiento (Freyre, 2006; Muyzer y Stams, 2008), y por otra parte la disponibilidad de iones de calcio libres puede aumentar debido a la eliminación de los ácidos carboxílicos unidos al calcio (Braissant *et al.*, 2007). Por tanto, estos procesos propician una formación y posterior precipitación de carbonato (Baumgatner *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007), particularmente de carbonato de calcio por medio de una reducción desasimilatoria de sulfato (Hammes y Verstraete, 2002).

Por otra parte, entre los meses de febrero y julio se registró un florecimiento de *Nodularia spumigena* [Anexo 1], la cual al descomponerse pone a disponibilidad una cantidad importante de materia orgánica; que puede ser metabolizada por las BSR a través de la reducción desasimilatoria de sulfato (Hammes y Verstraete, 2002). Con lo que, más del 50% del carbono orgánico en sedimentos marinos puede ser mineralizado por medio de este proceso metabólico (Santegoeds *et al.*, 1998; Muyzer y Stams, 2008; Barton y Fauque, 2009).

En el mes de septiembre, cuando se llevó a cabo la máxima expresión del Evento de Emblanquecimiento, el morfotipo AJ se mantuvo en el sistema aunque con una menor abundancia (pasando de 121 UFC's mL⁻¹ promedio en agosto a 16 UFC's mL⁻¹ en septiembre) [Tabla 3]. Mientras que el morfotipo H aumentó en abundancia, siendo dominante a lo largo de la columna de agua (el 22 de agosto solo se presentó en el fondo). Así también, se describió el morfotipo AC presente en toda la columna de agua, y el morfotipo AM que sólo se observó en el fondo del lago [Tabla 3, Figura 24]. Por otro lado, se observó una reducción considerable en la abundancia microbiana (UFC's), en comparación a lo cuantificado en el muestreo del 22 de agosto (de 329 a 55 UFC's mL⁻¹). Es importante mencionar, que es en septiembre cuando se presentó la precipitación de carbonatos en el lago y una reducción de la concentración de sulfatos en la columna de agua; por lo que, estos procesos pueden estar relacionados con el florecimiento de las BSR, que tuvo su mayor expresión en septiembre. Esta precipitación de carbonato de calcio en la que podrían estar participando las BSR, está relacionada con la formación de

estructuras órgano sedimentarias como son los microbialitos (Bosak y Newman, 2003; Dupraz y Visscher, 2005), que pueden ser encontrados en el litoral del lago Atexcac.

Sistema de Detección para Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

De las muestras obtenidas durante el Evento de Emblanquecimiento, se realizó un análisis más preciso sobre la abundancia de las BSR. Para lo cual, se utilizó un kit de detección específico para este grupo bacteriano, que utiliza anticuerpos para detectar la enzima adenosina-5'-fosfosulfonato reductasa (APS); la cual, está presente en la membrana de todas las BSR y activa en el proceso de formación de ATP (Gibson, 1990; Atlas y Bartha, 2002). Para el muestreo del 22 de agosto, las concentraciones de BSR, fueron de 1×10^3 cél mL^{-1} en la zona aerobia y microaerobia, y de 1×10^4 cél mL^{-1} en la zona anaeróbica; mientras que, para septiembre hubo un aumento en la zona microaerobia de 1×10^4 cél mL^{-1} manteniéndose hacia la anoxia [Figura 25 y 26]. Este patrón de variación en abundancia comúnmente observado en suelos, donde se presenta una mayor abundancia conforme el gradiente de oxígeno disminuye y, en ocasiones, la zona microaerobia llega a presentar algunos picos máximos de las BSR (Schneider *et al.*, 2013).

Los resultados sobre la abundancia de BSR con el kit de detección son comparables con lo reportado en los sedimentos de la laguna Prévost, en la cual después de un florecimiento del alga *Ulva lactuca*, se reportó una abundancia de BSR en condiciones anóxicas de 5×10^4 cél mL^{-1} y 2×10^5 cél mL^{-1} (Caumette, 1986). En comparación con los porcentajes de hibridación por FISH de BSR en el lago Alchichica, donde se encontró una abundancia relativa de 2.5×10^4 cél mL^{-1} en el epilimnion, 3.8×10^4 cél mL^{-1} en el metalimnion y 1.24×10^5 cél mL^{-1} en el hipolimnion (Hernandez-Avilés *et al.*, 2010). Estos resultados, presentan el mismo patrón de incremento de la abundancia de BSR conforme disminuye la disponibilidad de oxígeno. Así también, en el lago oligotrófico tropical Gek-Gel se observó un patrón similar de abundancia, en el que la zona aerobia tuvo una abundancia de 1.9×10^5 cél mL^{-1} y hacia el fondo anaerobio de 5.33×10^6 cél mL^{-1} (Karnachuk *et al.* 2006). Estos resultados confirman que las BSR tienen una distribución mayor en zonas anaerobias de la columna de agua donde se sabe están mejor adaptadas.

A pesar del patrón observado en el aumento de la abundancia de las BSR hacia el fondo del lago Atexcac, el número de células cuantificado con el kit de detección son menores en comparación con lo reportado en la columna de agua de los lagos Alchichica y Gek-Gel.

Sin embargo, los lagos tipo *maar* de la Cuenca Oriental de Puebla se caracterizan por ser oligotróficos con una baja abundancia celular; por lo que, los resultados obtenidos con el kit de detección pueden estar en función de las propiedades ecológicas del lago, cuantificándose bajas abundancias de BSR. De igual forma, debido a que el kit cuantifica la

enzima APS propia de las BSR, los volúmenes de células pequeñas podrían dar una menor producción de la enzima, indicando bajas concentraciones de abundancia. Así mismo, el peso molecular de la enzima APS es variable de acuerdo con la especie bacteriana (por ejemplo, *Desulfobulbus propionucus* contiene 175 kDa y *Desulfovibrio gigas* 400 kDa). De manera que, especies de un mismo género de bacterias sulfato reductoras, como es *Desulfovibrio*, pueden producir de forma diferencial la enzima APS (Hansen, 1994), por lo que el kit podría generar una subestimación en la cuantificación de las mismas.

Un punto importante a resaltar es la confirmación obtenida con el kit de detección sobre la presencia de las BSR en las zonas aerobias de la columna de agua del lago Atexcac. Trabajos anteriores, han reportado la presencia de especies del género *Desulfovibrio* en zonas aeróbicas de otros cuerpos acuáticos (Cypionka, 2000; Karnachuk *et al.*, 2006). Así también, los resultados reportados en el lago Alchichica donde se describen dichas bacterias en el epilimnion de la columna de agua (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). Hasta el momento, no se sabe cuál es la función ecológica que realizan las BSR en dichas zonas aerobias del lago Atexcac; sin embargo existen reportes sobre la actividad metabólica de estas bacterias bajo condiciones de oxigenación (Dannenberg *et al.*, 1992; Sass *et al.*, 1998; Cypionka, 2000; Karnachuk *et al.*, 2006).

Caracterización fenotípica

Las pruebas metabólicas son análisis básicos para la descripción de las propiedades metabólicas de los grupos bacterianos y es utilizado en la descripción de las Bacterias Sulfato Reductoras [BSR] (Sass *et al.*, 1997; 1998).

Los requerimientos nutricionales para la mayoría de las cepas de BSR son un aceptor de electrones inorgánico, el cual puede ser el ion sulfato u otros componentes oxidados del azufre; otras BSR pueden usar azufre elemental como aceptor terminal de electrones o bien, tener la capacidad de reducir nitrato o nitrito (Gibson, 1990; Cypionka, 2000). En cuanto a la fuente de carbono, la reducción de un aceptor de electrones puede ser realizada en ácidos grasos, alcoholes, H₂/CO₂, azúcares y ciertos hidrocarburos; así como, aminoácidos, péptidos, almidón y glicerol (Gibson, 1990; Hansen, 1994; Matheron y Caumette, 2015). Con la información anterior se eligieron los sustratos que sustituirían a los nutrientes del medio de cultivo base; utilizando como aceptores de electrones al sulfito de sodio, tiosulfato de sodio, azufre elemental y nitrato de calcio. En cuanto a la fuente de carbono, se seleccionaron al acetato de calcio, ácido fumárico, ácido málico, alanina, etanol, metanol y glicerol [Anexo 4].

Debido a la descripción de las BSR en las zonas aerobias de los cuerpos acuáticos (Dannenberg *et al.*, 1992; Eschemann *et al.*, 1999; Santegoeds *et al.*, 1998; Sass *et al.*, 1998; Minz *et al.*, 1999; Sigalevich y Cohen, 2000; Fournier *et al.*, 2004; Mogensen *et al.*, 2005; Karnachuk *et al.*, 2006; Hernández- Avilés *et al.*, 2010), se conoce su capacidad de

metabolizar sustratos similares a los usados en condiciones anaerobias, estos son H₂, formiato, lactato, piruvato, etanol, acetato, propionato, butirato y componentes inorgánicos del azufre (sulfuro, sulfito, azufre elemental y tiosulfato). Los componentes inorgánicos del azufre, pueden ser completamente oxidados a sulfato mediante el oxígeno molecular, debido a que las BSR son los únicos microorganismos que catalizan completamente las reacciones desasimilatorias del ciclo del azufre (Cypionka, 2000).

Dado que el medio de cultivo base utilizado para el aislamiento de las BSR, contenía lactato como fuente principal de carbono; es probable el aislamiento de bacterias pertenecientes a los géneros *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*; los cuales, se caracterizan por utilizar al lactato como fuente de carbono y energía (Gibson, 1990).

Sin embargo, la alta flexibilidad metabólica de las BSR (oxidan >125 componentes) (Hansen, 1994), podría explicar por qué 13 morfotipos descritos como más frecuentes, crecen con una amplia gama de sustratos [Anexo 3]. De acuerdo con las pruebas bioquímicas realizadas en el presente estudio, se podría haber aislado bacterias pertenecientes a los siguientes géneros: *Desulfovibrio*, debido a que sus fuentes de carbono preferentes son los ácidos orgánicos como lactato, piruvato y malato, y alcoholes como etanol, propanol y butanol; utilizando como aceptores de electrones al sulfato, sulfito, tiosulfato, azufre elemental y fumarato. Las fuentes de carbono, así como, los aceptores de electrones utilizados por *Desulfovibrio* son similares a las utilizadas por el género *Desulfotomaculum*, exceptuando al fumarato (Gibson, 1990; Cypionka, 2000; Aüllo *et al.*, 2013). Por otro lado, el género *Desulfobulbus*, es capaz de oxidar componentes del azufre utilizando nitrato y/o nitrito como aceptores de electrones, en ausencia de oxígeno molecular, característica compartida con *Desulfovibrio* (Gibson, 1990; Dannenberg *et al.*, 1992; Cypionka, 2000; Karnachuck *et al.*, 2006). Por último el género *Desulfobacter*, utiliza acetato como fuente de carbono, así como lactato y etanol (Caumette, 1986; Gibson, 1990; Dannenberg *et al.*, 1992).

De forma más detallada se ha caracterizado a los morfotipos frecuentes del lago Atexcac, logrando describir propiedades similares con ciertos géneros y especies. El morfotipo designado AJ, presenta características similares a la especie *Desulfovibrio desulfuricans*, debido a que utiliza tiosulfato, azufre elemental y fumarato, además de nitrato (en presencia de O₂), como aceptores de electrones; mientras que etanol, lactato y tiosulfato (en presencia de O₂), funcionan como donadores de electrones (Postgate y Campbell, 1966; Gibson, 1990; Dannenberg *et al.*, 1992; Hansen, 1994; Sass *et al.* 1998; Teske *et al.*, 1998; Cypionka, 2000). Por otra parte, los morfotipos designados como A, C, G, L, Q, AI y AE tienen propiedades similares con el género *Desulfovibrio*, debido al crecimiento manifestado con los sustratos etanol, nitrato, fumarato y tiosulfato, como principales, (Sass *et al.*, 1998) [Anexo 4].

Por presentar crecimiento en sustratos como etanol, alanina, tiosulfato y lactato, el morfotipo H comparte propiedades similares a las descritas del género *Desulfotomaculum* (Sass *et al.*, 1998) [Anexo 3].

Los morfotipos designados como B, E y AC pueden pertenecer al género *Desulfobulbus*, debido a que utilizan etanol, acetato y lactato como donadores de electrones, mientras que el tiosulfato es utilizado como aceptor de electrones (Sass *et al.*, 1998); sin embargo, estos morfotipos también podrían pertenecer al género *Desulfobacter*, por utilizar acetato como donador de electrones (Caumette, 1986). Ambos géneros pertenecen al Orden Desulfobacterales, por tanto es posible que compartan ciertas características metabólicas (Caumette *et al.*, 2015) [Anexo 3].

En complemento con los análisis de agrupamiento (“clustering”) [Figuras 27], es posible observar que los géneros anteriormente descritos se pueden encontrar durante los cinco meses de muestreo; además, los morfotipos similares a *Desulfovibrio* tienen una mayor afinidad con los morfotipos descritos como *Desulfotomaculum*, en comparación a aquellos designados como *Desulfobulbus* y *Desulfobacter*. Esto podría deberse a que el género *Desulfovibrio* comparte una mayor variedad de aceptores de electrones (sulfato, sulfito, tiosulfato, azufre elemental) y fuentes de carbono (ácidos orgánicos y alcoholes) con el género *Desulfotomaculum* que con los dos géneros restantes (Gibson, 1990; Cypionka, 2000; Aüllo *et al.*, 2013).

Correlaciones físico-químico-biológicas (Prueba de Spearman)

Se realizaron correlaciones para encontrar las interacciones que pudieran presentar los diversos morfotipos con el medio (parámetros físico-químicos) y entre mismos morfotipos (biológicos); con el fin, de entender la interacción ecología entre los morfotipos y, poder identificar los parámetros que fueron importantes para ellos durante el Evento de Emblanquecimiento.

Los morfotipos Y y H, fueron los únicos morfotipos que presentaron una correlación negativa con los sulfatos [Tabla 6], recordando que las BSR atrapan el sulfato del medio para su metabolismo transformándolo en S^0 o H_2S (Lens y Kuenen, 2001; Freyre, 2006), ya que una mayor concentración de BSR, provoca una mayor reducción de sulfato como lo ocurrido en tapetes cianobacterianos en el lago Solar (Teske *et al.*, 1998). El morfotipo H, se presenta durante el Evento de Emblanquecimiento, por lo que se sugiere que el metabolismo de éste contribuye con el descenso del sulfato en el lago durante este periodo.

Los morfotipos AJ y AI, de igual manera fueron característicos e importantes durante el Evento de Emblanquecimiento, correlacionando positivo con el pH [Tabla 6], lo que hace suponer que estos pueden contribuir activamente con el aumento de pH en el mes de agosto. Donde AJ presentó valores de UFC's superiores a los demás morfotipos

descritos, lo cual podría considerarse como un florecimiento, responsable de la precipitación de carbonato en el mes de septiembre. Mientras que los morfotipos B y D, no fueron favorecidos con este cambio de pH ya que presentaron correlaciones negativas, desapareciendo a partir del 22 de agosto.

Los morfotipos H y AC presentaron una correlación negativa con la dureza de calcio, recordando que durante el mes de septiembre se da un descenso brusco del calcio en toda la columna de agua; el cual podría estar siendo reducido por el metabolismo de estos morfotipos o bien por la precipitación de calcita o aragonita provocada por exopolímeros bacterianos (Sondi y Juračić, 2010; Bundeleva *et al.*, 2012). El morfotipo H presentó una correlación negativa con la dureza total, siendo que esta al igual que la de calcio, registró un descenso de concentración en toda la columna de agua. Es importante mencionar que la concentración de la dureza total, es dada en gran medida por Mg^{2+} en el lago, por lo que se podría asumir una relación con la formación y posterior precipitación de dolomita (Bundeleva *et al.*, 2012), como ocurre en los sedimentos de los lagos distales Corong (Wright, 1999) y en los microbialitos del lago Alchichica (Couradeau *et al.*, 2011).

El morfotipo AC, presentó relaciones significativas con los carbonatos y bicarbonatos, siendo negativa y positiva respectivamente, este morfotipo apareció únicamente en el Evento de Emblanquecimiento, por lo que se esperaría que este participe activamente en la precipitación de carbonato en la columna de agua (Wright, 1999; Braissant *et al.*, 2007)

Se puede concluir que los morfotipos H, AC, AI y AJ, tuvieron relaciones significativas con parámetros referentes al ciclo del carbono, y que su papel fue maximizado durante el Evento de Emblanquecimiento del lago. Estos resultados, podrían explicar su participación activa en la formación de carbonatos, ya sea de calcio o de magnesio, en la columna de agua, que es un proceso importante en la mineralización de diversos ambientes acuáticos y marinos (Bertrand *et al.*, 2015).

La ecología microbiana no sólo explica las interacciones de los microorganismos con el medio, sino también interacciones bióticas, ya sea del mismo o diferente nivel trófico (intra o interespecífica) (Moënné *et al.*, 2015). Dichas correlaciones podrían ofrecer patrones entre los morfotipos bacterianos sulfato reductores (interespecíficos).

El morfotipo A presentó una relación negativa con los morfotipos Y, O, AC y AJ [Tabla 7], esto explica cómo se fueron dando las sucesiones bacterianas a través del tiempo, ya que A fue dominante durante mayo y junio; posteriormente disminuyó su abundancia en los muestreos cercanos al Evento de Emblanquecimiento. Este descenso podría haberse originado por la presencia de otros grupos bacterianos que pueden

aprovechar mejor las condiciones propias del nicho donde A había dominado, causando su desplazamiento hasta que ya no apareció en el cultivo.

Un patrón similar lo presentó el morfotipo L, el cual perdió su dominancia cuando apareció el morfotipo H; como ocurrió en mes de septiembre, donde H dominó en toda la columna de agua y el morfotipo L desapareció por completo del medio de cultivo. Este recambio de especies se puede dar ocasionalmente por interacciones interespecíficas de competencia; esta competencia es una interacción en la que ciertos grupos bacterianos ocupan el mismo recurso (nutrientes, agua, o incluso el espacio), el cual puede llegar a ser tan intenso que genera que un grupo bacteriano desplace a otro grupo. En ocasiones, las bacterias generan ciertos exopolímeros (bacteriocinas o antibióticos), los cuales pueden llegar a ser tóxicos para otras bacterias, (amensalismo) (Moëne *et al.*, 2015). También cambios en el medio (físicos o químicos) genera que ciertos grupos bacterianos pueden estar mejor adaptados que otros para realizar su metabolismo.

El morfotipo E presentó una relación positiva con los morfotipos AI y AJ [Tabla 7], esto se observó en el muestreo del 22 de agosto, donde el morfotipo E apareció en toda la columna de agua; mientras que los morfotipos AI y AJ dominaron en todos los estratos. Este tipo de relaciones en grupos bacterianos tiende a ser benéfica para alguno de los dos grupos (comensalismo), en este caso puede que el morfotipo E tenga un beneficio de los productos (EPS) de otras bacterias (AI y AJ), los cuales pueden llegar a ser esenciales para su crecimiento. Este tipo de interacciones se han encontrado entre especies de BSR, por ejemplo *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* presenta afinidades con *Desulfohalobium retbaense* y *Desulfomicrobium baculatus* (coeficiente de correlación 0.23) (Zhilina *et al.*, 1997), infiriendo que los coeficientes entre los diferentes morfotipos muestren este tipo de interacciones afines.

Conclusiones

El Evento de Emblanquecimiento en el lago Atexcac podría no estar ligado a factores ambientales como la temperatura, sino más bien, a la actividad microbiana de organismos fotosintéticos oxigénicos, organismos quimiolitotrofos y organótrofos (entre estos las BSR). Las BSR mediante el metabolismo desasimilatorio aprovechan el sulfato como aceptor de electrones, causando un descenso de este nutrimento durante el Evento de Emblanquecimiento en toda la columna de agua. De esta manera, liberan exopolímeros de carbonato de calcio o magnesio al medio, los cuales se pueden apreciar a simple vista en la columna de agua (color blanquecino característico), provocando que la alcalinidad y el pH aumenten. Este aumento de pH, pone condiciones favorables para que el carbonato de calcio o magnesio precipite, lo que genera un descenso de la concentración de la dureza total, dureza de calcio y salinidad en la columna de agua. Sin embargo, faltan análisis

mineralógicos para determinar si los carbonatos característicos durante el Evento de Emblanquecimiento es dada por microorganismos (biológico) o por precipitación química.

Por medio del cultivo en condiciones de crecimiento óxicas, se aislaron y caracterizaron morfotipos pertenecientes a Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), antes y durante del Evento de Emblanquecimiento, estos se obtuvieron de tres zonas o estratos de acuerdo con la disponibilidad de oxígeno en la columna de agua (aerobia, microaerobia y anaerobia). Para el 22 de agosto, un mes antes de la máxima expresión del Evento de Emblanquecimiento, se registró un florecimiento de las BSR cultivadas.

Los morfotipos frecuentes H, AC, AI y AJ, fueron importantes durante el Evento de Emblanquecimiento, debido a que no sólo maximizaron su abundancia en los meses de agosto y septiembre; sino que presentaron relación con parámetros referentes con el ciclo del carbono y sistema amortiguador del lago. Lo cual, podría ser explicado por el hecho de que estos morfotipos participan activamente en la liberación de exopolímeros y posterior precipitación de carbonatos en el Evento de Emblanquecimiento del lago cráter Atexcac.

El kit de detección de BSR confirmó la presencia de este grupo bacteriano en las zonas aerobias del lago Atexcac.

Las pruebas metabólicas demostraron que las BSR tienen una alta plasticidad metabólica, debido a que pueden crecer en un gran número de sustratos orgánicos e inorgánicos, como aceptores o donadores de electrones en procesos de formación de energía (ATP). Por medio de estos procesos metabólicos, se considera que son responsables de la mineralización de más del 50% del carbono orgánico en el mar; debido a que el Evento de Emblanquecimiento se da después de un florecimiento de *Nodularia Spumigena* (en su etapa de senescencia) y que los sulfatos en el lago presentan una importante concentración por ser volcánico, podría considerarse que existen las condiciones específicas para que las bacterias sulfato reductoras las aprovechen para su metabolismo.

Los resultados obtenidos a través de la caracterización fenotípica proponen la existencia de cuatro géneros pertenecientes a las Bacterias Sulfato Reductoras dentro de la columna de agua del lago cráter Atexcac: *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* y *Desulfobacter*. Los morfotipos similares a estos géneros se encontraron durante los cinco meses de muestreo en todos los estratos analizados.

Perspectivas

De acuerdo con las condiciones durante el Evento de Emblanquecimiento, se necesitan hacer análisis mineralógicos para determinar si la formación de carbonatos es de origen biológico, químico o una combinación de ambos, además de identificar si es carbonato de calcio o magnesio es lo que está precipitando.

Además de la caracterización fenotípica, el presente estudio se debe complementar con la realización de análisis de tipo molecular, para corroborar la similitud metabólica que presentaron los morfotipos con géneros y especies de Bacterias Sulfato Reductoras.

Se propone realizar análisis experimentales para conocer cómo se dan las interacciones ecológicas de BSR a lo largo de la columna de agua en el lago Atexcac.

Referencias

- Alcocer, J., Lugo, A., Del Rosario Sánchez, M., y Escobar, E. (1998). Isabela Crater-Lake: a Mexican insular saline lake. *Hydrobiologia*. 381 (1-3): 1-7.
- Alcocer, J., Escobar, E., y Oseguera, L. A. (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): 115-122.
- Amann, R. I., Stromley, J., Devereux, R., Key, R. y Stahl, D. A. (1992). Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(2): 614-623.
- Arellano P. y González F. (2011). Dinámica espacio temporal del picoplancton procarionte y su relación con la variabilidad limnológica del lago volcánico Atexcac, Puebla. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 75.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Ceniceros, N., Cruz, O., Aguayo, A. y Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 178(2): 249-258.
- Arredondo-Figueroa, J. L., Borrego-Enríquez, L. E., Castillo-Domínguez, R. M. y Valladolid-Laredo, M. A. (1983). Batimetría y morfometría de los lagos "maars" de la cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biotica*. 8(1): 37-47.
- Arredondo-Figueroa, J. L. Los Axalapascos de la Cuenca Oriental, Puebla en: De la Lanza Espino, G. y García Calderón, J. L. (2002). Lagos y presas de México. *AGT Editor*. México. 87.
- Atlas R. y Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. *Pearson Educación*. España. 422-429.
- Aüllo, T., Ranchou-Peyruse, A., Ollivier, B. y Magot, M. (2013). *Desulfotomaculum* spp. and related gram-positive sulfate-reducing bacteria in deep subsurface environments. *Frontiers in microbiology*. 4(362): 1-12.
- Baross, J. A., Dahm, C. N., Ward, A. K., Lilley, M. D. y Sedell, J. R. (1982). Initial microbiological response in lakes to the Mt St Helens eruption. *Nature*. (296): 49-52.
- Barton, L. L. y Fauque, G. D. (2009). Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Advances in applied microbiology*. 68: 41-98.
- Baumgartner, L. K., Reid, R. P., Dupraz, C., Decho, A. W., Buckley, D. H., Spear, J. R., Przekop, K.M. y Visscher, P. T. (2006). Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*. 185(3): 131-145.

- Bertrand, J., Bonin, P., Caumette, P., Gattuso, J., Grégori, G., Gutoneaud, R., Le, J., Matheron, R. y Poly, F. (2015). Biogeochemical Cycles. 511-617 en: Bertrand, J., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P. y Sime, T. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer. 533, 539, 540.
- Bosak, T. y Newman, D. K. (2003). Microbial nucleation of calcium carbonate in the Precambrian. *Geology*. 31(7): 577-580.
- Boyd, C. E. (1990). Water quality in ponds for aquaculture. *Birmingham Publishing Co*. Birmingham. Alabama. 36-48, 87-90.
- Braissant, O., Decho, A. W., Dupraz, C., Glunk, C., Przekop, K. M. y Visscher, P. T. (2007). Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology*. 5(4): 401-411.
- Brito, E. M., Villegas-Negrete, N., Sotelo-González, I. A., Caretta, C. A., Goñi-Urriza, M., Gassie, C., Hakil, F., Colin, Y., Duran, R., Gutiérrez-Corona, F., Piñón-Castillo, H. A., Cuevas-Rodríguez, G., Malm, O., Torres, J. P., Fahy, A., Reyna-López, G. E. y Guyoneaud, R. (2014). Microbial diversity in Los Azufres geothermal field (Michoacán, Mexico) and isolation of representative sulfate and sulfur reducers. *Extremophiles*. 18(2): 385-398.
- Brock, T. D. y Brock, M. L. (1971). Microbiological studies of thermal habitats of the central volcanic region, North Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 5(2): 233-258.
- Bundeleva, I. A., Shirokova, L. S., Bénézeth, P., Pokrovsky, O. S., Kompantseva, E. I. y Balor, S. (2012). Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemical Geology*. 291: 116-131.
- Callieri, C. (2010). Single cells and microcolonies of freshwater picocyanobacteria: a common ecology. *Journal of Limnology*. 69(2): 257-277.
- Callieri, C., Coci, M., Corno, G., Macek, M., Modenutti, B., Balseiro, E. y Bertoni, R. (2013). Phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria. *FEMS microbiology ecology*. 85(2): 293-301.
- Can, C. A. (2011). Calidad de las aguas para riego en la cuenca del Oriental y sierra Norte, estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Postgrado de Hidrociencias. Colegio de Postgraduados. México.
- Caumette, P. (1986). Phototrophic sulfur bacteria and sulfate-reducing bacteria causing red waters in a shallow brackish coastal lagoon. (Prevost Lagoon, France). *FEMS Microbiology Ecology*. 38(2): 113-124.
- Caumette, P., Brochier, C. y Normand, P. (2015). Taxonomy and Phylogeny of Prokaryotes. 145-190 en: Bertrand, J. Caumette, P. Lebaron, P. Matheron, R.

Normand, P. y Sime, T. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer. 183.

- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gerard, E., Kazmierczak, J., Tavera, R. y López-García, P. (2011). Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS One*. 6(12):28767-28767.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G. E. y López-García, P. (2012). An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. *Science*. 336(6080): 459-462.
- Cypionka, H. (2000). Oxygen Respiration by *Desulfovibrio* species. *Annual Reviews in Microbiology*. 54(1): 827-848.
- Dannenberg, S., Kroder, M., Dilling, W. y Cypionka, H. (1992). Oxidation of H₂, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*. 158(2): 93-99.
- Dolla, A., Fournier, M. y Dermoun, Z. (2006). Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of biotechnology*. 126(1): 87-100.
- Dupraz, C. y Visscher, P. T. (2005). Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in microbiology*. 13(9): 429-438.
- Eschemann, A., KuÈhl, M. y Cypionka, H. (1999). Aerotaxis in *Desulfovibrio*. *Environmental microbiology*. 1(6): 489-494.
- Freyre F. (2006). Caracterización de bacterias alcalofilas sulfoxidantes. Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México. 87.
- Fournier, M., Dermoun, Z., Durand, M. C. y Dolla, A. (2004). A new function of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [Fe] hydrogenase in the protection against oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 279(3): 1787-1793.
- Gaidos, E., Lanoil, B., Thorsteinsson, T., Graham, A., Skidmore, M., Han, S. K. y Popp, B. (2004). A viable microbial community in a subglacial volcanic crater lake, Iceland. *Astrobiology*. 4(3): 327-344.
- Gaidos, E., Marteinsson, V., Thorsteinsson, T., Johannesson, T., Rúnarsson, Á. R., Stefansson, A. y Miller, M. (2009). An oligarchic microbial assemblage in the anoxic bottom waters of a volcanic subglacial lake. *The ISME journal*. 3(4): 486-497.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, 5ta edición. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gibson, G. R. (1990). Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 69(6): 769-797.

- Gómez, M. J. L., Blancas, A. G., Constanzo, C. E. y Cervantes, S. A. (2014). Análisis de calidad de aguas naturales y residuales con aplicación a la microescala. FES Zaragoza. UNAM. México. 53, 62, 67-69,75.
- Guyoneaud, R., Matheron, R., Baulaigue, R., Podeur, K., Hirschler, A. y Caumette, P. (1996). Anoxygenic phototrophic bacteria in eutrophic coastal lagoons of the French Mediterranean and Atlantic coasts (Prevost Lagoon, Arcachon Bay, Certes fishponds). *Hydrobiologia*. 329(1-3): 33-43.
- Hammes, F. y Verstraete, W. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in environmental science and biotechnology*. 1(1): 3-7.
- Hansen, T. A. (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 66(1-3): 165-185.
- Hernández-Avilés, J. S., Macek, M., Alcocer, J., López-Trejo, B. y Merino-Ibarra, M. (2010). Prokaryotic picoplankton dynamics in a warm-monomictic saline lake: temporal and spatial variation in structure and composition. *Journal of plankton research*. 32(9): 1301-1314.
- Morales, R. H., Ortega, M. R., Sánchez, J. D., Alvarado, R. y Aguilera, M. S. (2013). Distribución estacional del fitoplancton en un lago cálido monomíctico en Michoacán, México. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. 13(2): 21-28.
- Hodell, D. A., Schelske, C. L., Fahnenstiel, G. L., y Robbins, L. L. (1998). Biologically induced calcite and its isotopic composition in Lake Ontario. *Limnology and Oceanography*. 43(2): 187-199.
- Hutchinson, G. E., y Löffler, H. (1956). The thermal classification of lakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 42(2): 84-86.
- Karnachuk, O. V., Pimenov, N. V., Yusupov, S. K., Frank, Y. A., Puhakka, Y. A. y Ivanov, M. V. (2006). Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan. *Microbiology*. 75(1): 82-89.
- Komárek, J. y Komárková-Legnerová, K. J. (2002). Contribution to knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central Mexico. *Preslia*. 74: 207-233.
- Kosamu, I. B. M. y Obst, M. (2009). The influence of picocyanobacterial photosynthesis on calcite precipitation. *International Journal of Environmental Science & Technology*. 6(4): 557-562.
- Lagunas S. y Martínez D. (2015). Estructura de la comunidad del plancton procarionte en el lago volcánico, hiposalino y monomíctico cálido Atexcac, Puebla.

Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.

- Lens, P. y Kuenen, J. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science & Technology*. 44(8): 57-66.
- Lewis Jr, W. M. (1983). A revised classification of lakes based on mixing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 40(10): 1779-1787.
- Macek, M., Vilaclara, G. y Lugo, A. (1994). Changes in protozoan assemblage structure and activity in a stratified tropical lake. *Marine Microbial Food Webs*. 8(1-2): 235-249.
- Macek, M., Vilaclara, G., Lugo, A. y Alcocer, J. (2007). Lago de Atexcac. 199-201 en: De la Lanza Espino, G. Las aguas interiores de México: conceptos y caso. *AGT Editor*. México. 695.
- Mancilla, O. (2012). Índices de salinidad y calidad de las aguas superficiales. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias. Postgrado de Hidrociencias. Colegio de Postgraduados. México.
- Marques Dos Santos, M. J. (2004). Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas. 2da edición. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 206-209, 482-485.
- Matheron R. y Caumette P. (2015). Structure and Functions of Microorganisms: Production and Use of Material and Energy. 25-71 en: Bertrand J., Caumette P., Lebaron P., Matheron R., Normand P. y Sime T. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer. 48.
- Mayén-Estrada, R., Reyes-Santos, M. y Aguilar-Aguilar, R. (2014). Biodiversidad de Ciliophora en México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 85: 34-43.
- Minz, D., Flax, J. L., Green, S. J., Muyzer, G., Cohen, Y., Wagner, M. y Stahl, D. A. (1999). Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(10): 4666-4671.
- Moëne Y., Mavingui P., Combes C., Normand P. y Steinberg C. (2015). Microorganism and biotic interactions. 395-444 en: Bertrand J., Caumette P., Lebaron P., Matheron R., Normand P. y Sime T. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer. 395-397, 400-404.
- Mogensen, G. L., Kjeldsen, K. U. y Ingvorsen, K. (2005). *Desulfovibrio aerotolerans* sp. nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from activated sludge. *Anaerobe*. 11(6): 339-349.
- Muyzer, G. y Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 6(6): 441-454.

- Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer, J., Peralta, L. y Del Rosario Sánchez, M. (2001). Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia*. 466(1-3): 299-306.
- Padisák, J., Krienitz, L., Koschel, R. y Nedoma, J. (1997). Deep-layer autotrophic picoplankton maximum in the oligotrophic Lake Stechlin, Germany: origin, activity, development and erosion. *European Journal of Phycology*. 32(4): 403-416.
- Postgate, J. R. y Campbell, L. L. (1966). Classification of Desulfovibrio species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. *Bacteriological reviews*. 30(4): 732-738.
- Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J. P. y Van Broock, M. R. (2008). Yeast diversity in the acidic Rio Agrio–Lake Cavihue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS microbiology ecology*. 65(3): 415-424.
- Santegoeds, C. M., Ferdelman, T. G., Muyzer, G. y de Beer, D. (1998). Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*- 64(10): 3731-3739.
- Sass, H., Cypionka, H. y Babenzien, H. D. (1997). Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiology Ecology*. 22(3): 245-255.
- Sass, H., Wieringa, E., Cypionka, H., Babenzien, H. D. y Overmann, J. (1998). High genetic and physiological diversity of sulfate-reducing bacteria isolated from an oligotrophic lake sediment. *Archives of microbiology*. 170(4): 243-251.
- Saucedo, C., González, M. y Arellano, P. Práctica no. 5. Siembras. 29-35 y Práctica No. 6. Características microscópicas de cultivos (morfología colonial). 35-39 en Arellano, P., González, M., Gutiérrez, R., Martínez, F., Romero, D. y Saucedo, C. (2005). Manual de Prácticas para el laboratorio de Microbiología general I. 6º semestre. Carrera de Química Farmacéutico Biológica. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. 111.
- Schneider, D., Arp, G., Reimer, A., Reitner, J. y Daniel, R. (2013). Phylogenetic analysis of a microbialite-forming microbial mat from a hypersaline lake of the Kiritimati Atoll, Central Pacific. *PLoS One*. 8(6):1-14 .
- Sievert, S. M., Kiene, R. P. y Schultz-Vogt, H. N. (2007). The sulfur cycle. *Oceanography*. 20(2):117-123.
- Sigalevich, P. y Cohen, Y. (2000). Oxygen-Dependent Growth of the Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfovibrio oxycinae* in Coculture with *Marinobacter* sp. Strain MB in an Aerated Sulfate-Depleted Chemostat. *Applied and environmental microbiology*. 66(11): 5019-5023.
- Sondi, I. y Juračić, M. (2010). Whiting events and the formation of aragonite in Mediterranean Karstic Marine Lakes: new evidence on its biologically induced inorganic origin. *Sedimentology*. 57(1): 85-95.

- Sorokin, D. Y., Kuenen, J. G. y Muyzer, G. (2011). The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes. *Frontiers in microbiology*. 2(44):1-16.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Detkova, E. N., Galinski, E. A. y Muyzer, G. (2011). Culturable diversity of lithotrophic haloalkaliphilic sulfate-reducing bacteria in soda lakes and the description of *Desulfonatronum thioautotrophicum* sp. nov., *Desulfonatronum thiosulfatophilum* sp. nov., *Desulfonatronovibrio thiodismutans* sp. nov., and *Desulfonatronovibrio magnus* sp. nov. *Extremophiles*. 15(3): 391-401.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Panteleeva, A. N. y Muyzer, G. (2012). *Desulfonatronobacter acidivorans* gen. nov., sp. nov. and *Desulfobulbus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 62(Pt 9): 2107-2113.
- Sorokin, D. Y., Berben, T., Melton, E. D., Overmars, L., Vavourakis, C. D. y Muyzer, G. (2014). Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*. 18(5): 791-809.
- Teske, A., Ramsing, N. B., Habicht, K., Fukui, M., Küver, J., Jørgensen, B. B. y Cohen, Y. (1998). Sulfate-reducing bacteria and their activities in cyanobacterial mats of Solar Lake (Sinai, Egypt). *Applied and Environmental Microbiology*. 64(8): 2943-2951.
- Thompson, J.B., Schultze-Lam, S., Beveridge, T. J. y Des Marais, D. J. (1997). Whiting events: biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnology and Oceanography*. 42(1): 133-141.
- Thompson, J. B. (2009). Current Perspectives and Research on Lacustrine Whiting Events and Microbialites. In *AGU Fall Meeting Abstracts*. (1):0314. Abstract #B21A-0314.
- Torres-Orozco, R. y García-Calderon, J.L. (1995). Introducción al manejo de datos limnológicos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México. 53-56 y 72-74.
- Vorquímica S.A. Agar para sulfato reductoras. 342-344. (1981) en: Medios de cultivo para microbiología. ADAS=MICRO. Barcelona. 388.
- Wendt-Potthoff, K. y Koschorreck, M. (2002). Functional groups and activities of bacteria in a highly acidic volcanic mountain stream and lake in Patagonia, Argentina. *Microbial ecology*. 43(1): 92-106.
- Wright, D. T. (1999). The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. *Sedimentary Geology*. 126(1): 147-157.

- Zemskaya, T. I., Pogodaeva, T. V., Shubenkova, O. V., Chernitsina, S. M., Dagurova, O. P., Buryukhaev, S. P., Namsaraev, B. B., Khlystov, O. M., Egorov, A. V., Krylov, A. A. y Kalmychkov, G. V. (2010). Geochemical and microbiological characteristics of sediments near the Malenky mud volcano (Lake Baikal, Russia), with evidence of Archaea intermediate between the marine anaerobic methanotrophs ANME-2 and ANME-3. *Geo-Marine Letters*. 30(3-4): 411-425.
- Zhilina, T. N., Zavarzin, G. A., Rainey, F. A., Pikuta, E. N., Osipov, G. A. y Kostrikina, N. A. (1997). Desulfonatronovibrio hydrogenovorans gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, sulfate-reducing bacterium. *International journal of systematic bacteriology*. 47(1):144-149.

Anexos

Anexo 1: Aspecto físico del lago cráter Atexcac a través de los meses de muestreo

Marzo, 2014 (floreCIMIENTO de *Nodularia spumigena*)





Muestreo del 23 de mayo de 2014



Muestreo del 20 de junio de 2014



Muestreo del 01 de agosto de 2014



Muestreo del 22 de agosto de 2014

Muestreo del 26 de septiembre de 2014 (Evento de Emblanquecimiento)



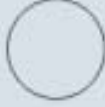









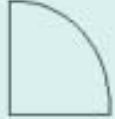







Anexo 2: Medio de Cultivo “Bacterias Sulfato Reductoras”

Cantidad por litro (L):

- Lactato de sodio (50%) ---- 5 mL.
- Cloruro de amonio ---- 1 gr.
- Fosfato monobásico de potasio ---- 0.5 gr.
- Sulfato de magnesio heptahidratado ---- 2 gr.
- Cloruro de calcio ---- 1 gr.
- Citrato férrico ---- 0.5 gr.
- Ácido ascórbico ---- 0.1 gr.
- Extracto de levadura ---- 0.2 gr.
- Solución de hidrosulfito de sodio 0.02 μ M ---- 100 mL.
- Ciclohexamida 0.05 gr.
- Agar-Bacto ---- 15 gr.

Anexo 3: Descripción y clasificación de morfotipo colonial

Forma			
Puntiforme		Irregular	
Circular		Rizoide	
Filamentosa		Como huso	
Elevación			
Plana		Pulvinada	
Elevada		Umbonada	
Convexa		Umbilicada	
Margen			
Entero		Lacerado	
Ondulado		Filamentoso	
Lobulado		Rizado	

Tomado de Saucedo *et al.*, 2005.

Anexo 4: Caracterización fenotípica de Bacterias Sulfato Reductoras para el lago cráter Atexcac, Puebla

PRESENCIA **AUSENCIA**

			donadores de electrones							aceptores de electrones			
fecha	presencia de O ₂	morfotipo	acetato de calcio	ácido fumárico	ácido málico	etanol	metanol	alanina	glicerol	sulfito de sodio	tiosulfato de sodio	nitrato de calcio	azufre elemental
23 mayo	aerobio	A											
		G											
	aerotolerante	A											
	anaerobio	A											

			donadores de electrones							aceptores de electrones			
fecha	presencia de O ₂	morfotipo	acetato de calcio	ácido fumárico	ácido málico	etanol	metanol	alanina	glicerol	sulfito de sodio	tiosulfato de sodio	nitrato de calcio	azufre elemental
20 junio	aerobio	A											
		B											
	aerotolerante	A											
		H											
		A											
	anaerobio	H											
		Q											

			donadores de electrones							aceptores de electrones			
fecha	presencia de O ₂	morfotipo	acetato de calcio	ácido fumárico	ácido málico	etanol	metanol	alanina	glicerol	sulfito de sodio	tiosulfato de sodio	nitrato de calcio	azufre elemental
01 agosto	aerobio	B											
		L											
		AJ											
	aerotolerante	B											
		L											
		AJ											
	anaerobio	B											
		L											
		Q											
AJ													

			donadores de electrones							aceptores de electrones			
fecha	presencia de O ₂	morfotipo	acetato de calcio	ácido fumárico	ácido málico	etanol	metanol	alanina	glicerol	sulfito de sodio	tiosulfato de sodio	nitrato de calcio	azufre elemental
22 agosto	aerobio	A											
		E											
		L											
		AI											
		AJ											
	aerotolerante	A											
		L											
		AI											
	anaerobio	AJ											
		C											
		E											
		H											
		Q											
		AE											
		AJ											

			donadores de electrones							aceptores de electrones			
fecha	presencia de O ₂	morfotipo	acetato de calcio	ácido fumárico	ácido málico	etanol	metanol	alanina	glicerol	sulfito de sodio	tiosulfato de sodio	nitrato de calcio	azufre elemental
26 septiembre	aerobio	C											
		H											
		AC											
		AJ											
	aerotolerante	H											
		AC											
		AJ											
	anaerobio	H											
		AC											
		AJ											
		AM											