



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
LIMNOLOGÍA

VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE Y SU
RELACIÓN CON LA DINÁMICA LIMNOLÓGICA EN EL LAGO CRÁTER ATALASOHALINO
ATEXCAC, PUEBLA.

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIÓL. JUAN ANTONIO ARELLANO POSADAS

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Miroslav Macek, FES Iztacala

ASESOR EXTERNO:

Dr. Justo Salvador Hernández Avilés, FES Zaragoza

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Rosa Luz Tavera Sierra, Facultad de Ciencias

Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez, Instituto de Ecología

Dra. María Leticia Arena Ortiz, Facultad de Ciencias, UMDI Sisal

Dr. Alfonso Lugo Vázquez, FES Iztacala

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2017



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.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE Y SU
RELACIÓN CON LA DINÁMICA LIMNOLÓGICA EN EL LAGO CRÁTER ATALASOHALINO
ATEXCAC, PUEBLA

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Limnología)

p r e s e n t a

BIÓL. JUAN ANTONIO ARELLANO POSADAS

Director de Tesis: DR. MIROSLAV MACEK

Asesor externo: DR. JUSTO SALVADOR HERNÁNDEZ
AVILÉS

Comité tutorial: DRA. ROSA LUZ TAVERA SIERRA

DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ

DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ

DR. ALFONSO LUGO VÁZQUEZ

MÉXICO, 2017

AGRADECIMIENTOS

“Todo está en todas partes, pero el medio ambiente selecciona”
Baas Becking en 1934

Agradezco al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por la formación académica recibida a lo largo de estos dos años de trabajo.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la Facultad de estudios Superiores Iztacala por permitirme realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a través de una beca para la realización de estudios de maestría.

Al Dr. Miroslav Macek por ayudarme y regañarme siempre para bien, por el tiempo que dedico a la revisión y corrección de esta tesis, así como por su invaluable contribución a mi formación académica y científica. Agradezco al Dr. Justo Salvador por apoyarme y brindarme su tiempo y consejo para la conclusión de esta tesis, así como fomentar a que crezca de manera científica y personal.

Le agradezco a mi comité tutorial Dra. Rosa Luz Tavera, Dra. Luisa Falcón, Dra. Leticia Arena, Dr. Alfonso Lugo por el tiempo otorgado en las revisiones de esta tesis, así como sus comentarios y sugerencias que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN219313 con el proyecto: Dinámica del plancton procariota en lagos monomícticos cálidos volcánicos en la Cuenca Oriental Puebla.

Sic Parvis Magna
“La grandeza nace de pequeños comienzos”
Sir Francis Drake 1546-1596

AGRADECIMIENTO PERSONAL

Comenzare con una frase que dice así:

“Todo gran cometido debe tener un principio, pero es en la continuidad hasta el final, donde está la verdadera gloria”
Sir Francis Drake 1837

Dedico este trabajo a mi familia, mi padre Antonio y mi madre Juana que al igual que mis hermanas y sobrinos me han apoyado durante este tiempo; al motivar mis sueños y aspiraciones recordándome que es posible superar las adversidades.

A Eunice por enseñarme a no caer y siempre seguir adelante; a mejorar cada día esforzándome y comprometiéndome con todo lo que realice, pues cada día aprendemos algo nuevo; pues no solo debemos mejorar académicamente sino también de manera personal. Gracias por tu apoyo en todos los momentos vividos durante esta etapa complicada, pero pese eso nunca nos hemos rendido.

Agradezco a mis compañeros del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología: Víctor, Claudia, Liliana, Carmen, Citlalli, Pavel, Laurita, Ximena y Esmeralda; así mismo agradezco a los estudiantes del laboratorio de limnoecología de la FES Zaragoza y a todas aquellas personas que, aunque no mencione contribuyeron de manera significativa de una u otra manera con la conclusión de este trabajo.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE CUADROS	IX
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 GRUPOS DE PICOPLANCTON PROCARIONTE.	5
2. JUSTIFICACIÓN	9
3. OBJETIVOS	10
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	11
5. ÁREA DE ESTUDIO	11
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1 TRABAJO DE CAMPO	14
6.2 TRABAJO DE LABORATORIO: FILTRACIÓN Y MONTAJE	15
6.2.1 <i>Concentración de las muestras de picoplancton procarionte</i>	15
6.2.2 <i>Permeabilización de las membranas</i>	16
6.2.3 <i>Hibridación de las células</i>	17
6.3 ANÁLISIS DE NUTRIENTES	18
6.4 TRABAJO DE GABINETE	19
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
7. RESULTADOS	21
7.1 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	21
7.1.1 <i>Temperatura</i>	21
7.1.2 <i>Oxígeno disuelto</i>	22
7.1.3 <i>Zona eufótica</i>	24
7.1.4 <i>Salinidad, conductividad, pH y alcalinidad</i>	24
7.2 VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LOS NUTRIMENTOS	25
7.2.1 <i>Nitrato</i>	25
7.2.2 <i>Nitrito</i>	26
7.2.3 <i>Amonio</i>	26
7.2.4 <i>Fósforo soluble reactivo</i>	27
7.2.5 <i>Fósforo total</i>	27
7.2.6 <i>Sulfato</i>	28
7.3 DINÁMICA ESPACIO TEMPORAL DEL BACTERIOPLANCTON TOTAL (BT)	29
7.3.1 <i>Abundancia</i>	29
7.3.2 <i>Biomasa</i>	30
7.4 DINÁMICA ESPACIO TEMPORAL DE LAS PICOCIANOBACTERIAS (PCY)	31
7.4.1 <i>Abundancia</i>	31
7.4.2 <i>Biomasa</i>	32
7.5 DINÁMICA Y COMPOSICIÓN ESPACIO TEMPORAL DE LOS GRUPOS PROCARIONTES	33
7.5.1 <i>Distribución temporal</i>	33
7.5.2 <i>Distribución espacial</i>	35
7.6 CORRELACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS CON LOS GRUPOS PROCARIONTES DEL LAGO ATEXCAC	38

7.6.1	<i>Relación de los grupos del plancton procarionte con los parámetros físico-químicos en el lago Atexcac durante las fases hidrodinámicas</i>	38
7.7	ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA CANÓNICO	41
7.8	PROBLEMAS DE HIBRIDACIÓN DE LAS SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS	44
8.	DISCUSIÓN	46
8.1	PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS	46
8.2	PARÁMETROS BIOLÓGICOS	48
8.2.1	<i>Bacterioplancton Total (BT)</i>	48
8.2.2	<i>Dominio Bacteria (BAC)</i>	49
8.2.3	<i>Dominio Archaea (ARCH)</i>	50
8.2.4	<i>Filo Thaumarchaeota (THAU)</i>	51
8.2.5	<i>Picocyanobacterias (PCy)</i>	51
8.2.6	<i>Clase Alphaproteobacteria (ALF)</i>	53
8.2.7	<i>Género Paracoccus (PAR)</i>	53
8.2.8	<i>Subclado: LD12: SAR11 IIIb (LD12)</i>	54
8.2.9	<i>Clase Betaproteobacteria (BET)</i>	55
8.2.10	<i>Clase Gammaproteobacteria (GAM)</i>	56
8.2.11	<i>Clase Deltaproteobacteria (BSR)</i>	57
8.2.12	<i>Filo Actinobacteria (ACT)</i>	59
8.2.13	<i>Filo Planctomycetes (PLA)</i>	59
8.2.14	<i>Filo Bacteroidetes (BACT)</i>	60
9.	CONCLUSIONES	61
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIG. 1 LOCALIZACIÓN DEL LAGO CRÁTER ATEXCAC, ESTADO DE PUEBLA (IMAGEN TOMADA DE PRONTUARIO DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA MUNICIPAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS GUADALUPE VICTORIA, PUEBLA, 2009). _____ 12
- FIG. 2 A) IMAGEN AÉREA DEL LAGO ATEXCAC (GOOGLE EARTH, NASA DIGITAL GLOBE; INEGI, 2016) B) MAPA BATIMÉTRICO DEL LAGO ATEXCAC, PUEBLA (TOMADO DE ARREDONDO-FIGUEROA ET AL., 1983). _____ 14
- FIG. 3 A) VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LA TEMPERATURA DEL AGUA DURANTE EL AÑO 2014, PARA LAS DISTINTAS FASES HIDRODINÁMICAS B) ISOPLETAS DE OXÍGENO DISUELTO DEL LAGO ATEXCAC EN EL AÑO 2014. EN AMBOS GRÁFICOS SE DELIMITA LA TERMOCLINA SUPERIOR, PLANAR E INFERIOR. _____ 23
- FIG. 4 UBICACIÓN DE LA ZONA EUFÓTICA Y SU DESPLAZAMIENTO DURANTE EL AÑO 2014. _____ 24
- FIG. 5 VARIACIÓN TEMPORAL DEL CARBONATO, BICARBONATO Y EL PH EN LOS MESES CONSIDERADOS PARA LA EVALUACIÓN DEL PICOPLANCTON PARA DISTINTAS FASES HIDRODINÁMICAS EN EL LAGO DE ATEXCAC. _____ 25
- FIG. 6 VARIACIÓN ESPACIAL POR ESTRATOS DE LA CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE LOS NUTRIMENTOS (NITRATO, NITRITO, AMONIO, FÓSFORO SOLUBLE REACTIVO: FSR Y FÓSFORO TOTAL: FT) DURANTE LA ESTRATIFICACIÓN. PARA EL SULFATO SE MUESTRAN AMBAS FASES HIDRODINÁMICAS POR ESTRATO DURANTE EL AÑO 2014 EN EL LAGO DE ATEXCAC. _____ 29
- FIG. 7 A) ABUNDANCIA DEL BT B) BIOMASA DEL BT DURANTE LAS ETAPAS HIDRODINÁMICAS EN EL AÑO 2014 PARA EL LAGO DE ATEXCAC. _____ 31
- FIG. 8 A) ABUNDANCIA DE LAS PCY B) BIOMASA DE LAS PCY DURANTE LAS ETAPAS HIDRODINÁMICAS EN EL AÑO 2014 PARA EL LAGO DE ATEXCAC. _____ 33
- FIG. 9 COMPOSICIÓN TEMPORAL DE LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS GRUPOS PROCARIONTES EN EL LAGO ATEXCAC DURANTE LAS FASES HIDRODINÁMICAS. _____ 34
- FIG. 10 COMPOSICIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DE LA ABUNDANCIA RELATIVA (% DE HIBRIDACIÓN) DE LOS GRUPOS PROCARIONTES EN EL LAGO ATEXCAC DURANTE LA ESTRATIFICACIÓN PARA EL AÑO 2014. SE INDICAN POR ABREVIATURAS LOS DOMINIOS BACTERIA: BAC, ARCHAEA: ARCH, THAUMARCHAEOTA: THAU, ASÍ COMO PARA LOS GRUPOS ESPECÍFICO, ALPHAPROTEOBACTERIA: ALF, PARACOCCLUS: PAR, SUBCLADO SAR11-IIIb: LD12, BETAPROTEOBACTERIA: BET, GAMMAPROTEOBACTERIA: GAM, DELTAPROTEOBACTERIA: BSR, ACTINOBACTERIA: ACT, PLANCTOMYCETES: PLA Y BACTEROIDETES: BACT. _____ 37
- FIG. 11 ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA CANÓNICA SIN TENDENCIA (ACCST. EJES 1 Y 2 EXPLICAN EL 33 % Y EL 33. 4 % DE LA VARIANZA ACUMULADA. SE INDICAN POR ABREVIATURAS LOS DOMINIOS BACTERIA: BAC Y ARCHAEA: ARCH, ASÍ COMO PARA LOS GRUPOS ESPECÍFICO, PARACOCCLUS: PAR, SUBCLADO SAR11-IIIb: LD12, BETAPROTEOBACTERIA: BET, GAMMAPROTEOBACTERIA: GAM, DELTAPROTEOBACTERIA: BSR, ACTINOBACTERIA: ACT, PLANCTOMYCETES: PLA Y BACTEROIDETES:

BACT, ASÍ MISMO SE INDICAN LAS ABREVIATURAS UTILIZADAS PARA LAS VARIABLES LIMNOLÓGICAS
POTENCIAL DE HIDRÓGENO: PH, FÓSFORO SOLUBLE REACTIVO: FSR, FÓSFORO TOTAL: FT Y OXÍGENO
DISUELTO: OXÍGENO _____ 43

FIG. 12 A) VISTA NORESTE DESDE LA CIMA DEL CRÁTER QUE CONTIENE AL LAGO ATEXCAC DURANTE EL
FLORECIMIENTO DE NODULARIA. B) AGLOMERACIÓN DE LA CIANOBACTERIA A ORILLAS DEL LAGO
ATEXCAC. _____ 47

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS MARCADAS CON PEROXIDASA DE RÁBANO (HRP), EMPLEADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE DOMINIOS Y GRUPOS TAXONÓMICOS DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE, UTILIZANDO LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE A TRAVÉS DE LA DEPOSICIÓN DEL REPORTERO CATALIZADOR (CARD-FISH) PROPUESTO POR SALCHER ET AL. (2011).	17
CUADRO 2 TÉCNICAS EMPLEADAS PARA EL ANÁLISIS DE NUTRIENTES	18
CUADRO 3 CONCENTRACIONES PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA PARA LA FASE DE MEZCLA Y ESTRATIFICACIÓN EN EL LAGO ATEXCAC.	25
CUADRO 4 CONCENTRACIONES PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE NUTRIMENTOS Y SULFATO DURANTE LAS FASES HIDRODINÁMICAS DEL LAGO ATEXCAC.	28
CUADRO 5 CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LOS DOMINIOS Y GRUPOS GENERALES DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE Y LOS PARÁMETROS LIMNOLÓGICOS DEL LAGO ATEXCAC, DURANTE LA FASE DE ESTRATIFICACIÓN. CON N=23, CORRELACIONES ESTIMADAS ($P < 0.05$) CON UN NIVEL DE CONFIANZA AL 95%, NS= NO SIGNIFICANCIA ($P > 0.05$). SE HAN ABREVIADO TANTO DOMINIOS Y TAXONES DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE (DOMINIOS BACTERIA: BAC Y ARCHAEA: ARCH. FILO THAUMARCHAEOTA: THAU. PARÁMETROS LIMNOLÓGICOS COMO FÓSFORO SOLUBLE REACTIVO: FSR, FÓSFORO TOTAL: FT.	39
CUADRO 6 CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE LOS GRUPOS PARTICULARES DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE Y LOS PARÁMETROS LIMNOLÓGICOS DEL LAGO ATEXCAC, DURANTE LA FASE DE ESTRATIFICACIÓN. CON N=23, CORRELACIONES ESTIMADAS ($P < 0.05$) CON UN NIVEL DE CONFIANZA AL 95%, NS= NO SIGNIFICANCIA ($P > 0.05$). SE HAN ABREVIADO TANTO TAXONES PERTENECIENTES A LA CLASE ALPHAPROTEOBACTERIA COMO EL GÉNERO PARACOCUS: PAR Y EL LINAJE SAR11 IIIb: LD12. LA CLASE BETAPROTEOBACTERIA: BET Y GAMMAPROTEOBACTERIA: GAM. DELTAPROTEOBACTERIAS: DELT(BSR) Y LOS FILUM ACTINOBACTERIA: ACT, PLANCTOMYCETES: PLA, BACTEROIDETES: BACT. PARÁMETROS LIMNOLÓGICOS COMO FÓSFORO SOLUBLE REACTIVO: FSR, FÓSFORO TOTAL: FT.	40
CUADRO 7 COEFICIENTES DE CORRELACIONES MÚLTIPLES DEL ACCST DE LA FIGURA 11, LAS VARIABLES LIMNOLÓGICAS CON EL MAYOR COEFICIENTE DE CORRELACIÓN SE ENCUENTRAN INDICADAS EN NEGRITAS.	42
CUADRO 8 VALORES PROPIOS, COEFICIENTE DE CORRELACIÓN, VARIANZA ACUMULADA DE LOS EJES CANÓNICOS 1- 3 QUE CORRESPONDEN A LA FIGURA 11.	42
CUADRO 9 COBERTURA, SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS SONDAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS CON CARD-FISH EN EL LAGO DE ATEXCAC. CUADRO CONSTRUIDO CON BASE A PROBEBASE DE ACUERDO CON GREUTER ET AL. (2016) Y THE SILVA RIBOSOMAL RNA GENE DATABASE PROJECT: IMPROVED DATA PROCESSING AND WEB-BASED TOOLS DE QUAST ET AL. (2013).	45

RESUMEN

Se determinó la abundancia relativa y la distribución espacio-temporal del Dominio *Bacteria*, *Archaea* y de ciertos grupos específicos con la técnica de CARD-FISH (por sus siglas en inglés: hibridación *in situ* fluorescente a través de la deposición del reportero catalizador) durante el proceso de mezcla y de estratificación en la columna de agua del lago Atexcac para el año 2014. La abundancia de *Bacteria* y *Archaea* en Atexcac, registraron variabilidad espacial y temporal relacionado con el régimen hidrodinámico del sistema; en la estratificación térmica se asociaron con la variación en la concentración de nutrientes y oxígeno disuelto. Las mayores abundancias de *Bacteria* en Atexcac se registraron en la termoclina, mientras que el epilimnion registró las menores abundancias y un descenso gradual hacia el hipolimnion. El dominio *Archaea* presentó abundancias menores a lo obtenido por el dominio *Bacteria*, siguiendo un patrón inverso. Las abundancias relativas de los grupos específicos bacterianos registraron variación en las fases hidrodinámicas del lago, atribuible principalmente a la distribución en la concentración de nutrientes. La abundancia de la clase *Alphaproteobacteria* se restringió a la estratificación temprana, de ésta el subclado LD12 presentó mayores abundancias hacia el hipolimnion durante todo el periodo de estudio, mientras el género *Paracoccus* registró las mayores abundancias en el epilimnion durante la estratificación temprana y bien establecida, con un comportamiento inverso durante la estratificación tardía. *Betaproteobacteria* fue la más abundante hacia el hipolimnion y epilimnion, con mínimas abundancias en el metalimnion. *Gammaproteobacteria* y los filo *Planctomycetes* y *Bacteroidetes* presentaron una distribución mayor hacia el fondo del sistema. Por otro lado, *Deltaproteobacteria* y el filo *Actinobacteria* registraron un comportamiento similar con máximas abundancias en el epilimnion y un descenso hacia el hipolimnion.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la comunidad microbiana y la importancia de estos microorganismos como los principales impulsores de los ciclos biogeoquímicos en ambientes acuáticos, fue registrado por primera vez en la década de 1940 permitiendo reconocer tempranamente el papel de la comunidad microbiana en la regeneración y movilización de nutrientes en las redes tróficas de los ambientes acuáticos, poniendo de manifiesto que los microorganismos conducen la mayoría de las transformaciones de los elementos en los ecosistemas acuáticos (Lindeman, 1942; Schattenhofer *et al.*, 2009).

El entendimiento de las interacciones entre estos organismos y su medio responde a un gran número de variables espacio-temporal y este representa uno de los principales retos a los que se enfrenta la ecología microbiana hoy en día (Mullins *et al.*, 1995; Schauer *et al.*, 2003); pues aun cuando ya se conoce la forma en que algunas de estas impactan en la calidad del agua y como participan en los ciclos biogeoquímicos de los sistemas acuáticos gran parte de lo que estas efectúan sigue siendo poco conocido, es aquí donde las investigaciones en ecología microbiana basadas en el uso de herramientas moleculares han logrado establecer algunas de las características y diferencias de estos microorganismos, permitiendo aproximarse a los factores que intervienen en el origen y su desarrollo (Escalante *et al.*, 2008).

Las herramientas de biología molecular utilizadas en la ecología microbiana, se centran en la combinación de las técnicas de cultivo, moleculares y de metagenómica, para poder abordar el estudio de la diversidad metabólica y fisiológica de las muestras de ambientes naturales y han dado un acceso sin precedentes al conocimiento de la diversidad genética y la composición de la comunidad de bacterias de diversos ambientes acuáticos (Amman *et al.*, 1995; Torsvik *et al.*, 1998), al mismo tiempo mediante estas herramientas se ha logrado identificar parte de los procesos que generan y mantienen a los organismos procariontes que son numéricamente dominantes y como se distribuyen en tiempo

y espacio en medios naturales (Whittaker *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2011a).

Morfológicamente el picoplancton procarionte es simple: cocos, bacilos y filamentos en algunos grupos con tamaños de entre 0.2-3 μm , y pueden pertenecer a los Dominios *Archaea* y *Bacteria* (Woese *et al.*, 1990). La proporción de procariontes que habita en los ambientes acuáticos cerca del 90% son del dominio *Bacteria* y *Archaea* puede oscilar alrededor del 1-10% (Aravalli *et al.*, 1998; Massana y Logares, 2013). La abundancia y la actividad de la composición del plancton procarionte han sido poco investigado en los ambientes lacustres asociado con la heterogeneidad del ambiente en comparación con los estudios realizados en el océano (Stocker, 2012).

Para la determinación taxonómica de los grupos procariontes, así como de sus funciones metabólicas y relaciones espacio-temporal dentro de la comunidad acuática microbiana en su ambiente natural, se han empleado exitosamente las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés de fluorescent *in situ* hybridization) y su complemento denominado deposición del receptor catalizador (CARD por sus siglas en inglés de *Catalyzed Reporter Deposition*) (Amman *et al.*, 2001; Salcher *et al.*, 2011).

Debido a la escasa diferencia que se presenta entre los grupos procariontes, los métodos moleculares FISH y CARD-FISH permiten una adecuada identificación, de los microorganismos de ambientes acuáticos mediante la combinación de la precisión de la biología molecular con la información visual del microscopio de epifluorescencia (Moter y Gobel, 2000). Se tiene registro de que estas técnicas se han empleado exitosamente tanto con muestras cultivadas como naturales; donde ambas técnicas moleculares son más eficaces contra los métodos tradicionales basados en el aislamiento de microorganismos en medios de cultivo, que muchas veces necesitan de periodos largos de incubación, así como el empleo de medios complejos y enriquecidos, en donde en ocasiones no reflejan la población o

condición exacta de las comunidades bacterianas presentes en el sistema (Amann *et al.*, 2001; Josephson *et al.*, 2009).

Sin embargo, dado que las bacterias en sus ambientes acuáticos naturales tienen una actividad metabólica celular baja, un lento crecimiento y un bajo contenido de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) (Hoshino *et al.*, 2008; Morita, 1997) la intensidad de la señal de la hibridación del plancton procarionte es frecuentemente baja y se encuentra por debajo de los límites de detección, o se pierde con la fluorescencia de fondo esto es frecuente en el uso de la técnica de FISH ; es por ello, que se ha optado por el uso de sondas marcadas con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés de *HorseRadish Peroxidase*) en combinación con CARD y un marcador fluorescente de tiramida (Pernthaler *et al.*, 2002).

Algunos estudios realizados por medio de la técnica de FISH en lagos vecinos a Atexcac son un punto de comparación para este estudio, pues permite tener una idea general sobre la composición del picoplancton procarionte ya que estos sistemas acuáticos comparten características similares a este lago, dichos estudios son los trabajos realizados por Hernández-Avilés *et al.* (2010) y Bautista-Reyes y Macek (2012); donde el propósito del primer estudio fue describir la dinámica del ensamblaje planctónico de los procariontes unicelulares, mientras que en el segundo estudio fue identificar y cuantificar a los procariontes en el interior de células de ciliados.

1.1 Grupos de picoplancton procarionte.

La composición de los dominios y taxones frecuentemente difiere marcadamente entre los distintos ambientes acuáticos (Yannarell y Triplett, 2005; Newton *et al.*, 2011b; De-Wever *et al.*, 2005) donde hay evidencia sobre algunos grupos de microorganismos que tienen distribuciones geográficamente restringidas debido a limitaciones en dispersión (Papke *et al.*, 2003, Hughes *et al.*, 2006) y aislamiento geográfico (Papke y Ward 2004), además que existen también datos sobre endemismos microbianos (Whittaker *et al.*, 2003) y patrones espacio-temporal de diversidad microbiana no azarosos (Horner-Devine *et al.*, 2004) como puede ser el caso de los lagos de la cuenca oriental donde se ubica el lago de Atexcac.

De manera general la importancia de las *Archaea* se debe a su papel dentro de los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, amonio, azufre (Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Dubey *et al.*, 2015). El dominio *Archaea* se identificó por medio de la sonda ARCH915; la cual generalmente se une también inespecíficamente a algunas bacterias (Pernthaler *et al.*, 2002) y Picocianobacterias (Pcy) (Teira *et al.*, 2004; Callieri *et al.*, 2009; Callieri *et al.*, 2014). Este dominio se divide en tres grandes filas: *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* y *Thaumarchaeota*.

El filo *Thaumarchaeota* se considera dentro de los microorganismos más abundantes pertenecientes a las *Archaea* en los suelos, océanos y ambientes epicontinentales. Inicialmente fue clasificado como *Crenarchaeota* mesófilas, sin embargo, por medio de genómica comparada se ha revelado recientemente que forman un filo independiente. El filo *Thaumarchaeota* detectado por la sonda CREN537 tiene como objetivo la detección del grupo MG1.1a con preferencia hacia ambientes salinos (La Cono *et al.*, 2012; Callieri *et al.*, 2014; Coci *et al.*, 2015). Este filo propuesto por Brochier-Armanet *et al.* (2008), incluye a organismos amoníaco-oxidantes y desempeñan un papel importante en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Callieri *et al.*, 2015).

El Dominio *Bacteria* incluye a las bacterias heterotróficas las cuales son consideradas como los microorganismos más abundantes en suelos y agua, donde su aportación en biomasa es muy importante en los sistemas acuáticos, además de ser excelentes organismos asimiladores de materia orgánica disuelta (MOD), los filas que más se han reportado para los sistemas acuáticos son *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes* y *Cyanobacteria*, (Ducklow, 2000; Mulholland *et al.*, 2002).

Del filo *Cyanobacteria*, las Picocianobacterias (Pcy) quedan incluidas funcionalmente en el picoplancton procarionte autotrófico (PPA) y son consideradas dentro de esta clasificación por tamaño por sus dimensiones entre 0.2 y 3 μm de diámetro (Stockner *et al.*, 2000) las cuales tienden a estar en mayor proporción en lagos oligotróficos y mesotróficos (Callieri *et al.*, 2012).

El filo *Proteobacteria* es uno de los principales y más numeroso dentro del dominio *Bacteria*; este filo ha sido establecido a través de secuencias de ARNr y en él se incluyen la mayoría de las bacterias quimioorganoheterótrofas Gram-negativas (Gupta, 2000) siendo principalmente anaerobias facultativas. Las clases distintivas del filo *Proteobacteria* son designadas por letras griegas. Particularmente en los sistemas acuáticos epicontinentales, las clases *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* son la de mayor relevancia ecológica (Newton *et al.*, 2011b).

La clase *Alphaproteobacteria* es uno de los mayores componentes bacterianos de las comunidades microbianas, es abundante en ambientes salinos y registra comúnmente una correlación positiva entre la abundancia relativa y un bajo contenido de salinidad en un sistema acuático (Kirchman *et al.*, 2005); esta clase tiene la habilidad para competir por los sustratos orgánicos e inorgánicos y es abundante en ambientes cuya condición es oligotrófica, siendo capaces de crecer a bajas concentraciones de nutrientes, donde se ve favorecida al tener un alto metabolismo (Cottrell *et al.*, 2000; Hagström *et al.*, 2002; Eiler *et al.*, 2003; Salcher *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006).

Dentro de esta clase el género *Paracoccus* incluye microorganismos Gram-negativos aeróbicos que presentan una morfología cocoide, todas las especies que comprenden a este género exhiben una similitud genética que va del 93.5 al 99.8 %; este género está asociado con la desnitrificación y crecen favorablemente en ambientes naturales y de cultivo en temperaturas que van desde los 15 a 37 °C con un pH de 6.5 a 8.5 (Ludwig *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 2006).

El subclado LD12 también forma parte de la clase *Alphaproteobacteria* y pertenece al orden de las *Pelagibacterales*, que fue posteriormente nombrado como LD12 (Zwart *et al.*, 2002), este fue descubierto en 1996 en un lago del Ártico (Bahr *et al.*, 1996). Actualmente se le conoce a este grupo como el subclado LD12: SAR11 IIIb de agua dulce (Herlemann *et al.*, 2014) y es un grupo hermano monofilético del linaje dominante de las ultramicrobacterias de vida libre en aguas marinas SAR11, con el que comparte un 86.6% de similitud (Zwart *et al.*, 2002; Herlemann *et al.*, 2014), se cree que LD12 forma una mayor proporción de la comunidad bacteriana en condiciones de baja productividad, caracterizadas por una elevada transparencia del agua y baja biomasa de fitoplancton, lo que corresponde con condiciones oligotróficas (Herlemann *et al.*, 2014).

El parecido genético que tienen ambos grupos monofiléticos se debe a que se cree que el grupo LD12 probablemente se originó a partir de raros eventos de transición de las bacterias SAR11 marino a ambientes dulces (Logares *et al.*, 2010), pues sorprendentemente, estas transiciones han aparecido pocas veces y esto contribuyó a la aparición de linajes SAR11 genéticamente distintas. La razón para la transición de este grupo de ambiente salino a agua dulce actualmente no se conoce, pero se ha sugerido que la comunidad del bacterioplancton puede variar dramáticamente en escalas de tiempo muy cortas por medio de varios cambios adaptativos (Heinrich, 2015). La información sobre LD12 es actualmente limitada; sin embargo, en fechas recientes este grupo fue investigado usando la sonda LD12-121 con muestras obtenidas de ambientes oligohalino (2.7 g L⁻¹) a un mesohalino (13.3 g L⁻¹) en donde se obtuvo una detección positiva de este grupo (Herlemann *et*

al., 2014). La presencia de bacterias metabólicamente activas de SAR11-IIIb en aguas oligohalinas-mesohalinas demuestra la capacidad de este grupo para adaptarse fácilmente a nuevas condiciones ambientales (Piwosz *et al.*, 2013).

La clase *Betaproteobacteria* presenta una elevada heterogeneidad espacial y temporal en los ambientes lacustres, así como una tendencia a disminuir su abundancia con la salinidad del agua (Glöckner *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006), además de que esta clase tiende a predominar en ambientes de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002; Glöckner *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006).

Gammaproteobacteria es una de las clases más amplias de *Proteobacteria*, incluye una gran variedad de tipos fisiológicos, son anaerobias facultativas Gram-negativas, se encuentran principalmente en hábitats acuáticos, aunque algunas son aerobias y unas cuantas especies pueden utilizar los nitratos como aceptores terminales de electrones a través del proceso denominado respiración anaerobia. A *Gammaproteobacteria* pertenecen también las bacterias púrpuras del azufre (Tortora *et al.*, 2010). Las *Gammaproteobacteria* y las *Alphaproteobacteria*, son abundantes en el océano, dado que su abundancia relativa se incrementa con la salinidad (Wu *et al.*, 2006; Biers *et al.*, 2009), no siendo particularmente abundantes particularmente en lagos de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002).

A la clase *Deltaproteobacteria* pertenecen las bacterias reductoras (BSR) del azufre y del sulfato (Fröstl y Overmann, 2000), estas bacterias junto con las desnitrificantes han sido importantes organismos a través de la historia de la tierra, además de que son parte importante de los tapetes microbianos, donde se cree que estos microorganismos pueden ser responsables de hasta un 80% de la oxidación de carbono de los sedimentos marinos (Eckert *et al.*, 2002).

El filo *Actinobacteria* es de los más diversos en el sentido taxonómico, mantiene una distribución cosmopolita en los diferentes ambientes acuáticos, frecuentemente tiende a dominar en los ambientes de agua dulce con diferentes

características químicas y biológicas y tiende a decrecer en su abundancia relativa conforme aumenta la profundidad y disminuye la cantidad de oxígeno del sistema acuático (Ventura *et al.*, 2007; Newton *et al.*, 2007; 2011b), los integrantes de este filo presentan tamaños pequeños por lo que son llamadas “ultramicrobacterias” (Warnecke *et al.*, 2005; Newton *et al.*, 2007a; Heinrich *et al.*, 2013; Salcher *et al.*, 2011a).

El filo *Planctomycetes* se conoce como un grupo de bacterias acuáticas encontradas en aguas dulce, salobre y marina. Los *Planctomycetes* son el grupo más cercano a la base del árbol filogenético del dominio *Bacteria* (Brochier y Philippe, 2002). Algunas de sus especies son aeróbicas, quimioorganoheterótrofas y otras son quimio-litoautotróficas anaerobias. Este filo lleva a cabo la oxidación anaerobia del amonio (anammox) en sistemas marinos y dulceacuícolas (Jetten *et al.*, 2003).

El filo *Bacteroidetes* es uno de los grupos más amplios e importantes, son bacterias Gram-negativas degradadores de biopolímeros (Lemarchand *et al.*, 2006); comúnmente de aguas dulces y saladas y se les considera que son uno de los componentes numéricamente más abundantes en ambientes marinos (Eilers *et al.*, 2001, Matthew y Kirchman, 2000), así como en algunos lagos polisalinos o hipersalinos (Demergasso *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe un marcado interés por conocer la dinámica y composición espacio-temporal de las comunidades microbianas procariontes en ambientes lacustres, particularmente en las zonas tropicales (Abe *et al.*, 2003; De-Wever *et al.*, 2005); especialmente en lagos con profundidades mayores a 25 m (Hernández-Avilés *et al.*, 2010; Bautista-Reyes y Macek, 2012). En estos lagos, se plantea la idea de que el cambio vertical en la composición de la comunidad bacteriana está aparentemente relacionado con la estratificación térmica y química, en esta última se incluyen la del oxígeno disuelto y la de los nutrientes (De-Weaver *et al.*, 2005).

El estudio de grupos procariontes resulta complicado por el pequeño tamaño que poseen y por su morfología que suele ser muy similar entre ellos. Así, para identificarlos adecuadamente se requieren técnicas modernas de microbiología y biología molecular como CARD-FISH, que permite determinar taxonómicamente los principales grupos del picoplancton procarionte en muestras de agua procedentes directamente de los sistemas acuáticos, así como evaluar su dinámica temporal y espacial e inferir el papel que desempeñan en los mismos.

3. OBJETIVOS

General

- Determinar la composición, distribución vertical y variación espacio-temporal del picoplancton procarionte y establecer su relación con la dinámica limnológica en el lago monomíctico cálido, Atexcac durante sus fases hidrodinámicas.

Específicos

- Determinar la distribución espacial y temporal, así como la abundancia relativa de los Dominios *Bacteria* y *Archaea* y de grupos específicos (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* (incluyendo varias bacterias sulfato reductoras), *Actinobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, *Planctomycetes*, *Thaumarchaeota*) y del linaje *Alphaproteobacteria* LD12 y el género *Paracoccus*, durante la fase de mezcla y de estratificación (temprana, bien establecida y tardía).
- Cuantificar la densidad y biomasa del bacterioplancton total y de las Picocianobacterias (Pcy) del lago Atexcac en las etapas hidrodinámicas.
- Evaluar la variación espacio-temporal de los parámetros físico-químicos del lago Atexcac en el período de estudio.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuáles son los taxa dominantes del picoplancton procarionte durante la mezcla y las diferentes etapas hidrodinámicas de la estratificación en el lago Atexcac?

2. ¿La dinámica espacio-temporal de los grupos procariontes con qué parámetros limnológicos se asocian en la columna de agua del lago Atexcac?

5. ÁREA DE ESTUDIO

El Lago Atexcac se ubica en los paralelos $19^{\circ} 19' 50.68''$, $19^{\circ} 20' 12.30''$ N y los meridianos $97^{\circ} 26' 45.99''$, $97^{\circ} 27' 15.37''$ O, en la parte este de la cuenca endorreica Oriental en los límites del eje neovolcánico; a 2510 m s.n.m., dentro de los llanos de San Andrés cerca del poblado de San Luis Atexcac, municipio de Guadalupe Victoria, en el estado de Puebla (Fig. 1).

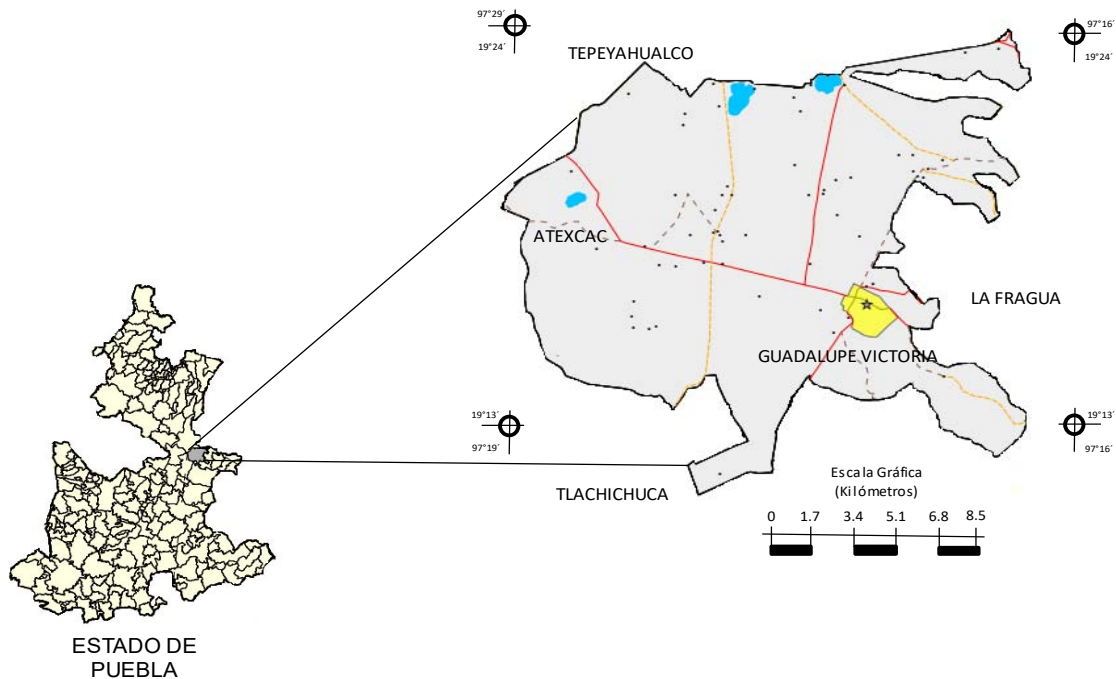


Fig. 1 Localización del lago Cráter Atexcac, Estado de Puebla (Imagen tomada de Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Guadalupe Victoria, Puebla, 2009).

La zona donde se localiza presenta un clima templado subhúmedo con una variante de sequía de medio verano, con poca oscilación anual de las temperaturas medias mensuales (5 a 7 °C) donde el mes más caliente se presenta antes del solsticio de verano Cw (w") (i') g, de acuerdo con el sistema de clasificación de Köppen modificado por García (2004); presenta una temperatura ambiental mínima de 16°C y una máxima de 22°C donde la precipitación anual es de 400-500 mm y la evaporación es de 600 mm. Se ubica sobre un relieve de llanura con lomerío y un suelo de tipo Phaeozem (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Guadalupe Victoria, Puebla, 2009).

De acuerdo con la regionalización fitogeográfica de Rzedowski (1981) la región presenta elementos de las provincias florísticas conocidas como serranías meridionales y altiplanicie. La vegetación nativa de matorral ha sido sustituida por la agricultura; sin embargo, todavía se conservan relictos de la vegetación original debido al difícil acceso de sus elevadas paredes, destacando entre ellas izotal de

yuca, *Yucca* sp. y *Nolina* sp.; con matorral desértico de *Agave lechuguilla* o magueyes (*Agave* spp.) y nopales (*Opuntia* spp.) (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Guadalupe Victoria, Puebla, 2009). La flora acuática está representada por 5 especies entre las que destacan *Phragmites australis* y *Cyperus leavigatus* (Ramírez-García y Novelo, 1984). En cuanto a la fauna ictica, este lago, al parecer, carece de ella (Álvarez, 1950).

Atexcac es un lago de origen tipo maar excavado en depósitos piroclásticos (Fig. 2a) de aproximadamente 330 millones de años. Este lago fue formado como producto de las explosiones freatomagmáticas que se dan por las diferencias térmicas de la interacción del magma con el agua del manto freático (Carrasco-Núñez *et al.*, 2006). Este lago es parte de un campo monogenético disperso y aislado con conos de ceniza basáltica y cúpulas riolíticas (Carrasco-Núñez *et al.*, 2006) además de tener una geología basada en roca ígnea extrusiva (Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos Guadalupe Victoria, Puebla, 2009). El cráter que lo contiene presenta elevaciones que varían de 60 m en su parte baja hasta 130 m en su parte más alta sobre el nivel del valle. Las paredes internas son muy inclinadas, formando un sistema circular de acantilados o escarpes que dificultan el descenso hasta el espejo del agua (Fig. 2a) (Reyes, 1979).

El lago tiene un área superficial de 0.29 km², con un diámetro de 1150 m tiene una forma casi elíptica irregular cuya longitud es de 780 m con orientación suroeste-noreste. De acuerdo con Arredondo-Figueroa *et al.* (1983) presentaba una profundidad media de 25.7 m y una profundidad máxima de 39 m (Fig 2b); mientras que en una revisión realizada por Macek *et al.* (2007) el nivel de agua se registraría en 34 m.

Está clasificado como un cuerpo de agua atalasoalino (aguas con sal de origen no marino), con una salinidad de 6 gL⁻¹, siendo el Na⁺ y Cl⁻ los iones dominantes, el pH se encuentra entre 8.1 y 8.3 (Armienta *et al.*, 2008). Su

temperatura oscila entre los 16 a 22°C sigue un patrón de variación térmica con un periodo de mezcla durante el invierno hemisférico de diciembre a marzo y un periodo de estratificación los meses restantes del año por lo que se clasifica como monomíctico cálido (Lewis, 1983); la concentración de oxígeno disuelto se encuentra entre 0 y 7 mg L⁻¹, es un sistema oligo-mesotrófico (Arellano-Posadas y González-Flores, 2011; Lagunas y Martínez, 2015).

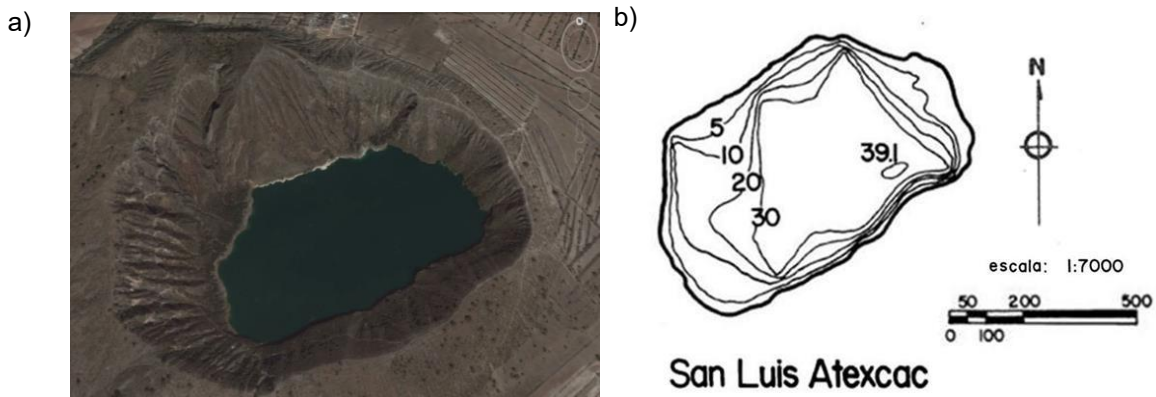


Fig. 2 a) Imagen Aérea del lago Atexcac (Google Earth, NASA Digital globe; INEGI, 2016) b) Mapa batimétrico del lago Atexcac, Puebla (Tomado de Arredondo-Figueroa et al., 1983).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Trabajo de campo

De acuerdo con la batimetría del lago se ubicó el sitio de muestreo donde se encuentra la profundidad máxima del sistema. El muestreo biológico y químico se llevó a cabo de febrero a noviembre de 2014 considerando dentro de estas muestras la zona eufótica y afótica.

En el sitio de muestreo se registró la fecha y hora de muestreo (hora de inicio y término), elementos meteorológicos (temperatura ambiental y porcentaje de nubosidad), asimismo en campo se evaluó la variación de la temperatura y del oxígeno disuelto a lo largo de la columna de agua mediante un medidor portátil marca Hach HQ30d acoplado a una sonda específica calibrado con la salinidad específica del lago, esto se realizó utilizando el sensor dentro de botellas DBO evitando la formación de burbujas de aire. Una vez que se obtuvieron los perfiles

verticales se establecieron las diferentes profundidades de muestreo. Para el periodo de mezcla se tomaron 5 profundidades de muestreo distribuidas a lo largo de la columna de agua, para el período de estratificación se tomaron de igual manera muestras de los diferentes estratos epilimnion, metalimnion (termoclina y oxíclina), hipolimnion y cerca del fondo. Asimismo, se midió la visibilidad al disco de Secchi para posteriormente estimar la profundidad de la zona eufótica a partir de multiplicar esta por una constante de 3.5 (Cole *et al.*,2015).

Todas las muestras fueron obtenidas con la ayuda de una botella van Dorn (marca Wildco, Michigan, USA) de 2.5 L de capacidad y posteriormente se almacenaron en botellas de polietileno de 1 L para los parámetros químicos, mientras para el muestreo biológico fueron almacenadas en botellas de 150 mL, fijadas con formaldehído a una concentración final al 2% (Porter y Feig, 1980).

La conductividad eléctrica y SDT mg L⁻¹ fueron registrados con un equipo Checkmate modelo 90 (marca Corning, New York, USA) con una precisión de $\pm 0.01\mu\text{S}$, mientras que la alcalinidad fue analizada por la técnica volumétrica con indicadores (APHA, 2005).

6.2 Trabajo de laboratorio: Filtración y Montaje

Para la determinación de los grupos del picoplancton procarionte se utilizó la técnica de CARD-FISH que consta de los siguientes pasos: fijación, permeabilización de las membranas celulares, hibridación, amplificación de la señal y cuantificación con microscopia de epifluorescencia, de acuerdo con el protocolo propuesto por Salcher *et al.* (2011a).

6.2.1 Concentración de las muestras de picoplancton procarionte

Las muestras de picoplancton procarionte unicelular fueron filtradas y concentradas mediante una torre de filtración de vidrio con una membrana de soporte y una membrana de policarbonato blanca (Picoplancton procarionte y Picocianobacterias) y negra (Bacterioplancton total) diámetro 47 mm de 0.2 μm de diámetro de poro)

ajustándose a un sistema de vacío manual utilizando entre 10 y 30 mL de la muestra biológica previamente fijada con formaldehído al 2%.

Las membranas de policarbonato con muestras concentradas se colocaron en una caja de Petri y se llevaron a resguardo a -20°C , estas se pueden almacenar por varios meses o se puede iniciar de inmediato el protocolo para CARD-FISH.

Con la finalidad de salvaguardar la integridad de las células contenidas en las membranas a lo largo del proceso de CARD-FISH, Se sumergieron las membranas de policarbonato dentro de agarosa al 0.1% con una temperatura de 40°C cerciorándose que el lado de la membrana que soporta a las bacterias se encuentre hacia arribase utilizó agarosa; posterior a esto se retiraron las membranas y fueron colocados sobre cajas Petri para ser secados en un horno de incubación, durante 30 minutos a 35°C , una vez secos los filtros se agregó etanol (80%) sobre los bordes de la membrana para poder desprender las membranas y deshidratar las células; las membranas fueron posteriormente colocadas sobre papel absorbente a temperatura ambiente.

6.2.2 Permeabilización de las membranas

Posterior a la utilización de agarosa se procedió a la incubación de las membranas en ácido clorhídrico (0.01 M) por 10 minutos a temperatura ambiente, consecutivamente se lavaron con buffer fosfato salino (1x; pH=7.6) a temperatura ambiente. Para facilitar la integración de las sondas dentro de la célula las membranas fueron incubadas en una solución de lisozima durante 60 minutos a 37°C ; se incubaron en una solución de acromopeptidasa o proteinasa K de acuerdo a la especificidad de la sonda durante 30 minutos a 37°C , una vez terminado este tiempo las membranas fueron lavadas con agua libre de partículas y etanol; finalizando al dejárseles secar sobre papel absorbente.

6.2.3 Hibridación de las células

La hibridación de los grupos procariontes se llevó a cabo en secciones de las membranas de policarbonato; cada sección fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad, donde cada tubo contenía sondas de oligonucleótidos universal o específica (50 ng/ μ L) (Cuadro 1) marcado con HRP (Peroxidasa de rábano picante).

6.2.4 Cuantificación de las células hibridadas con microscopía de epifluorescencia

Para la cuantificación del Bacterioplancton total (BT) así como de grupos de arqueas y bacterias incluyendo Picocianobacterias (Pcy) se usó un microscopio de epifluorescencia Leica DMLB (Alemania) con un lente de inmersión 100 \times apocromático en campos seleccionados al azar con combinación de un cubo de filtros I3 (FITC, AO) con un haz de luz azul, un filtro Cy3 (cianina) y un cubo de filtros A (UV).

Cuadro 1 Sondas de oligonucleótidos marcadas con peroxidasa de rábano (HRP), empleadas para la determinación de dominios y grupos taxonómicos del picoplancton procarionte, utilizando la técnica de hibridación in situ fluorescente a través de la deposición del reportero catalizador (CARD-FISH) propuesto por Salcher et al. (2011).

Sonda	Grupo Objetivo	Secuencia de la sonda (5'-3')	Referencias
EUB I-III	Bacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	<i>Amann et al., 1990</i> <i>Daims et al., 1999</i> <i>Daims et al., 1999</i>
NON338	Control negativo	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	<i>Wallner et al., 1993</i>
ALF968	Alphaproteobacteria	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	<i>Neef, 1997</i>
PAR1457	Genero <i>Paracoccus</i>	CTA CCG TGG TCC GCT GCC	<i>Nef et al., 1996</i>
LD12-121	Linaje de las Alphaproteobacterias	CAC AAG GCA GAT TCC CAC AT	<i>Salcher et al., 2011</i>
BET42a	Betaproteobacteria	GCC TTC CCA CTT CGT TT	<i>Manz et al., 1992</i>
BET42a-C	Competidor para BET42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	<i>Manz et al., 1992</i>
GAM42a	Gammaproteobacteria	GCC TTC CCA CAT CGT TT	<i>Manz et al., 1992</i>
GAM42a-C	Competidor para GAM42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	<i>Manz et al., 1992</i>
SRB385	Bacterias sulfato reductoras	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	<i>Amann et al., 1990</i>
PLA 886	Planctomycetes	GCCTTGCGACCATACTCCC	<i>Neef et al., 1998</i>
CF319a	Bacteroidetes	TGG TCC GTG TCT CAG TAG	<i>Manz et al., 1996</i>
HGC 69a	Actinobacteria	TA TAGTACCACCGCCGT	<i>Roller et al., 1994</i>
ARCH915	Archaea	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	<i>Stahl y Amann, 1991</i>
CREN537	Thaumarchaeota	TGA CCA CTT GAG GTG CTG	<i>Teira et al., 2004</i>

El bacterioplancton total (BT) concentrado en membranas negras de policarbonato y los grupos específicos concentrados en membranas de policarbonato blancas se cuantificaron mediante la tinción de la muestra con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) y fueron montadas en aceite de inmersión y con el uso de luz ultravioleta (UV) para el BT y con un haz de luz azul para los grupos específicos; se contabilizaron entre 600 y 800 células para obtener un error de conteo inferior al $\pm 5\%$ de acuerdo con Hobbie *et al.* (1977) y Porter y Feig (1980).

Las Picocianobacterias (Pcy) concentradas en membranas de policarbonato blancas fueron montadas en aceite de inmersión, para su análisis no se usó ningún fluorocromo ya que las Pcy poseen ficoeritrina y ficocianina que reaccionan por autofluorescencia cuando se les excita bajo un haz de luz verde de un filtro de tipo CY3; de este grupo se contabilizaron de 600 a 800 células a través de imágenes tomadas al azar.

6.3 Análisis de nutrientes

El análisis de las muestras de agua para nutrientes almacenadas en botellas de polietileno con capacidad de un litro se llevó a cabo a través del empleo de métodos colorimétricos (APHA, 2005); donde la alcalinidad se evaluó mediante el método de indicadores (Cuadro. 2).

Cuadro 2 Técnicas empleadas para el análisis de nutrientes

Nutriente	Método
Nitrato	Columna de reducción de cadmio-cobre de nitrato a nitrito. Analizándose como nitrito
Nitrito	Ácido Sulfanílico
Amonio	Azul de indofenol
Fosforo Soluble Reactivo	Fosfomolibdato

Fosforo Total	Digestión de la muestra con persulfato y Fosfomolibdato
Sulfato	Turbidimétrico

6.4 Trabajo de gabinete

Para calcular el porcentaje de células hibridadas por grupo específico y por dominio se utilizó el número total de células procariontes teñidas con DAPI contra el de células marcadas con Alexa 488, las cuales fueron excitadas con un haz de luz azul dentro del mismo campo que previamente había sido visualizado con el DAPI.

El cálculo de la densidad bacteriana se realiza aplicando un factor de corrección debido al fijador, así también una constante obtenida a través del área de filtración por el área de campo contabilizado multiplicado por el promedio de células contabilizadas en conteos directos entre el volumen de la muestra usada.

$$Densidad = \frac{Corfij * (Cte) * (promedio de celulas)}{Vol de la muestra}$$

Se tomaron fotografías en el microscopio de epifluorescencia, montado con una cámara digital (Canon PowerShot S-45) y el programa Zoom Browser Ex; de cada preparación por profundidad se tomaron entre 10-15 imágenes para posteriormente evaluar con estas las dimensiones morfométricas y calcular contenido de carbono y biomasa del Bacterioplancton Total y de las Picocianobacterias.

El contenido de carbono se calculó con las relaciones alométricas que guarda con el volumen celular con la ecuación alométrica de Loferer-Krößbacher para el BT (Posch *et al.*, 2001), mientras que para el Pcy se empleó una constante (CC=Vx200: donde V=Volumen celular $\mu\text{m}^3 \text{cél}^{-1}$) (Weisse y Stadler, 2006).

Para poder llegar a calcular este contenido de carbono se usó el análisis de las imágenes a partir de fotografías mediante el programa ImageJ versión 1.33 (USA); con el cual se obtuvieron las dimensiones morfométricas, posteriormente estas fueron transferidas a una hoja de cálculo de Microsoft Excel con macros con los cuales se obtuvo el volumen celular y el contenido de carbono los cuales una vez que fueron multiplicados por la abundancia de los grupos del picoplancton se estimó el biovolumen y la biomasa respectivamente. Para analizar la variación espacio-temporal de la abundancia y biomasa del picoplancton autotrófico y del bacterioplancton total, se realizaron gráficas de barras para su análisis, mientras que para la temperatura y oxígeno disuelto las gráficas se realizaron con el programa Golden Software Surfer 12 (2014).

6.5 Análisis estadístico

Para las abundancias del bacterioplancton total y de las Picocianobacterias, así como de la biomasa por mes y por estrato se llevó a cabo un gráfico de barras para mostrar la variación de estos parámetros. Para establecer las relaciones funcionales entre los parámetros limnológicos y biológicos del plancton procarionte se realizaron correlaciones paramétricas de Pearson empleando el Programa Statgraphics Centurion XV versión 15.2.06 (2007). Las abundancias relativas de los grupos y las variables ambientales fueron examinadas a través de un análisis multivariado usando el programa CANOCO 4.5 (2002) mediante un análisis de correspondencia canónica sin tendencia (ACCST) (Ter Braak, 1986), donde previamente se validaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, para determinar si se aplicaba la estadística paramétrica o la no paramétrica, considerando el uso de transformaciones de los datos con el propósito de estandarizar.

El uso del ACCST permite establecer el grado de asociación con los grupos, así como también ayuda a identificar las variables que posiblemente influyan en la aparición o ausencia de estos grupos haciendo posible establecer la posibilidad de que exista una relación con las múltiples variables ambientales del sistema acuático.

7. RESULTADOS

7.1 Parámetros físico-químicos

7.1.1 Temperatura

El lago Atexcac registró un periodo de mezcla del mes de enero a principios de marzo y en el mes de noviembre de 2014 con temperaturas que oscilaron entre 16.5°C a 17.5°C. Y uno de estratificación los meses restantes de finales de marzo a principios de noviembre con temperaturas que fluctuaron entre 16°C en el fondo a 21.5°C hacia la superficie. Lo que correspondió con el comportamiento de monomixis cálida.

Etapas hidrodinámicas de la estratificación:

➤ Estratificación temprana se registró de finales de marzo a principios de junio, con temperaturas que oscilaron de 21.5 a 16°C. El epilimnion se delimito hasta los 2 m al comienzo de esta etapa alcanzando un máximo de 11 m hacia el final de esta misma, mientras que el metalimnion se ubicó al inicio de esta etapa a partir de los 4 m y alcanzó hasta los 18 m hacia el final de esta etapa variando en su grosor entre 6-8 m por mes ; por otro lado, el hipolimnion al inicio de esta etapa se ubicó a partir de los 10 m y al final se ubicó desde los 17 m hasta el fondo del sistema teniendo una variación en su grosor de aproximadamente 14-17 m entre mes de muestreo (Fig. 3a).

➤ Estratificación bien establecida, registró una temperatura que osciló entre 20 y 16.5°C. El epilimnion se registró hasta los 12 m al inicio y a los 10 m al final de esta misma, la termoclina se registró desde los 12 m y hasta los 20 m con una oscilación de 8 m por mes en su grosor y el hipolimnion se ubicó de entre los 18 y 21 m hasta el fondo con una variabilidad de aproximadamente 13-16 m por mes (Fig. 3a).

➤ Estratificación Tardía, registro una temperatura que osciló entre 19 y 16.5°C. El epilimnion se ubicó al inicio de esta etapa hasta los 9 m y hasta los 16 m hacia el final de esta misma; la termoclina inicio en 9 m al principio de esta etapa y comenzó a los 16 m al final de esta con una variación en su grosor de aproximadamente 10-11 m por mes; denotando que el grosor del epilimnion se hace mucho más grande, mientras que el grosor del metalimnion e hipolimnion van disminuyendo, así mismo se observó que estos estratos fueron mostrando una profundización gradual durante todas las etapas de la estratificación (Fig. 3a).

7.1.2 Oxígeno disuelto

Durante el periodo de mezcla la concentración de oxígeno disuelto a lo largo de la columna de agua osciló entre 4.5 mg L⁻¹ y 7.5 mg L⁻¹ (Fig. 3b). Para la estratificación temprana el oxígeno disuelto osciló entre 0.5 a 7.5 mg L⁻¹ de la superficie al fondo. Durante la estratificación bien establecida, se registraron concentraciones entre 0.5 y 7 mg L⁻¹ (Fig. 3b). Durante la estratificación tardía el oxígeno presentó una oscilación entre 1 a 7.5 mg L⁻¹ de la superficie al fondo. (Fig. 3b).

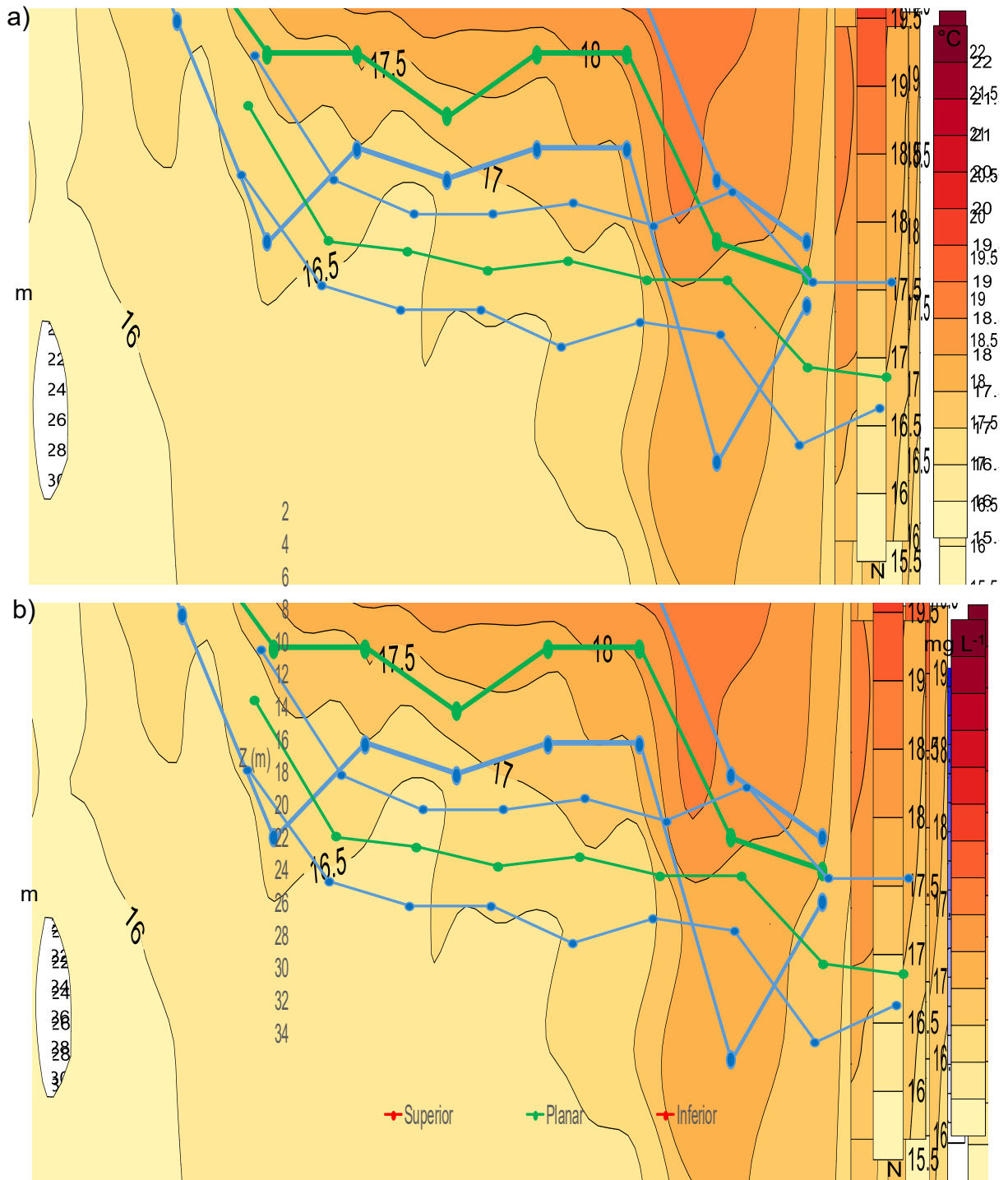


Fig. 3 a) Variación espacio-temporal de la temperatura del agua durante el año 2014, para las distintas fases hidrodinámicas b) Isojetas de oxígeno disuelto del lago Atexcac en el año 2014. En ambos gráficos se delimita la termoclina superior, planar e inferior.

7.1.3 Zona eufótica

Durante la época de mezcla (febrero) el grosor de la zona eufótica alcanzó un máximo de 21 m de profundidad, mientras que durante la estratificación temprana fluctuó entre los 8 y 10 m, para la estratificación bien establecida esta osciló entre 8-12 m y para la estratificación tardía esta se encuentra entre los 8 y 16m aumentando en grosor con el inminente inicio de la mezcla.

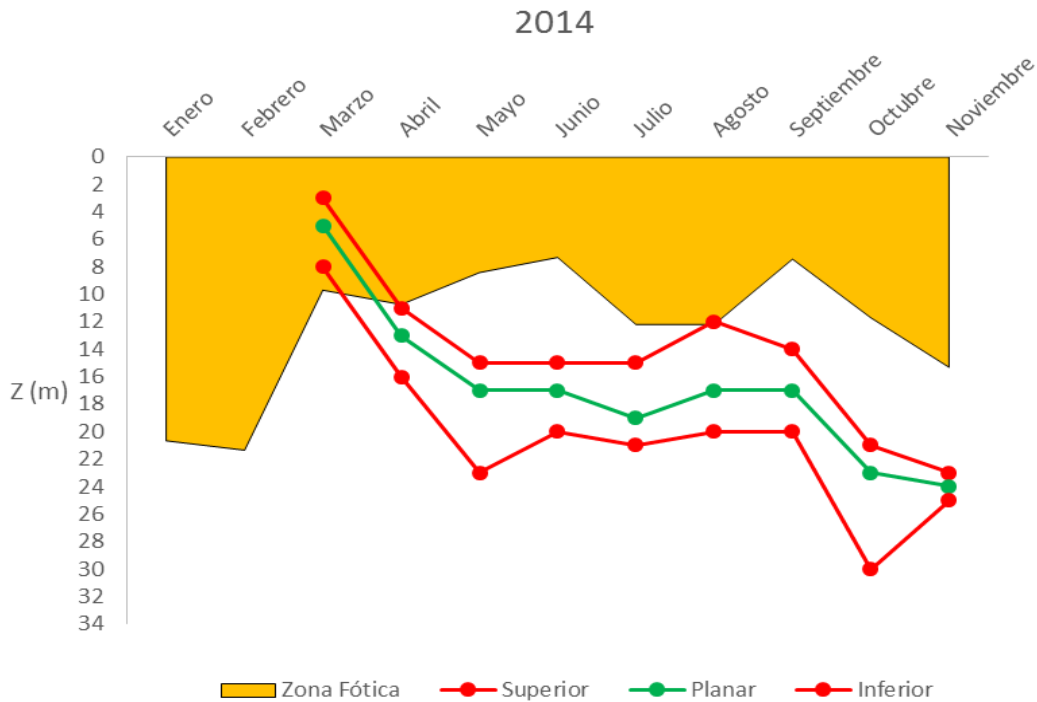


Fig. 4 Ubicación de la zona eufótica y su desplazamiento durante el año 2014.

7.1.4 Salinidad, conductividad, pH y alcalinidad

La salinidad y la conductividad eléctrica fueron parámetros conservativos en el lago Atexcac al presentar una baja variabilidad a través del tiempo. El pH fluctuó de 8.7 a 9.2, lo que le confiere un pH alcalino, predominando el carbonato sobre el bicarbonato, mientras que los valores de conductividad correspondieron con la condición hiposalina del lago (Cuadro 3).

Cuadro 3 Concentraciones promedio y desviación estándar de parámetros físico-químicos del agua para la fase de mezcla y estratificación en el lago Atexcac.

pH	Salinidad g L ⁻¹	Alcalinidad meq L ⁻¹	Conductividad mS cm ⁻¹
8.9 ± 0.2	6.0 ± 0.84	Carbonato 22 ± 4 Bicarbonato 10 ± 3	12 ± 0.20

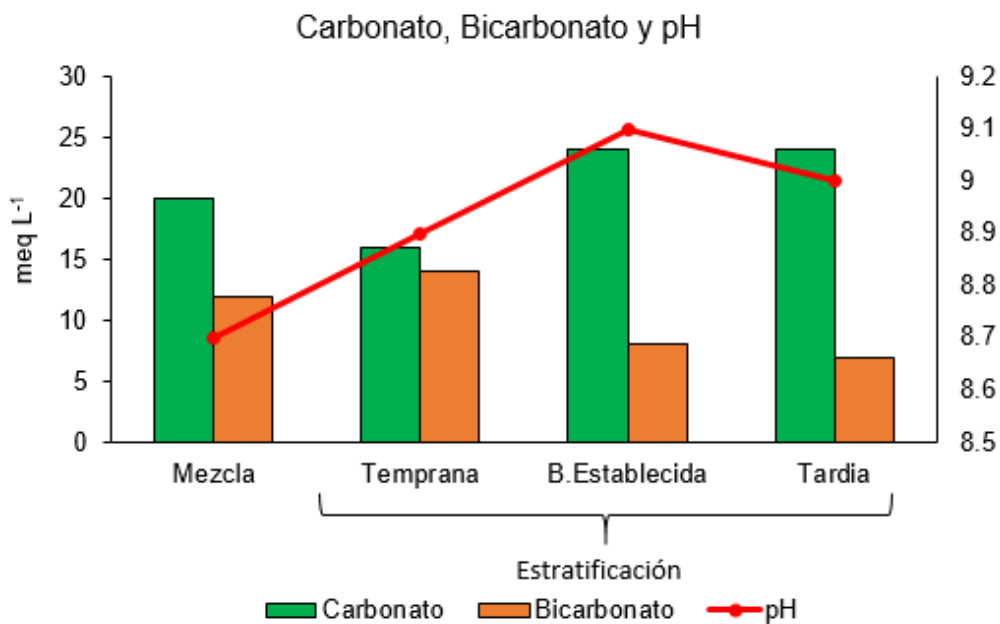


Fig. 5 Variación temporal del carbonato, bicarbonato y el pH en los meses considerados para la evaluación del picoplancton para distintas fases hidrodinámicas en el lago de Atexcac.

7.2 Variación espacio-temporal de los nutrientes

7.2.1 Nitrato

Para el periodo de mezcla las concentraciones de nitrato (NO₃⁻) oscilaron entre 0.21 a 0.15 μmol L⁻¹ (Cuadro 4 y Fig. 5). Para el periodo de estratificación temprana se observaron concentraciones de 0.30 ± 0.40 μmol L⁻¹ teniendo en el epilimnion una concentración de 0.096 μmol, en el metalimnion de 0.137 μmol L⁻¹ y en el hipolimnion de 0.61 μmol L⁻¹, mientras que en la bien establecida y tardía estos

oscilaron entre $0.01 \pm 0.004 \mu\text{mol L}^{-1}$, donde el epilimnion en ambas etapas oscilo entre 0.007 y $0.009 \mu\text{mol L}^{-1}$ para el metalimnion fluctuó entre 0.0091 - $0.006 \mu\text{mol L}^{-1}$ y el hipolimnion se encontró entre 0.003 - $0.00066 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Cuadro 4 y Fig. 5).

7.2.2 Nitrito

La concentración del nitrito (NO_2^-) registró una fluctuación entre 0.003 a $0.02 \mu\text{mol L}^{-1}$; donde en el periodo de mezcla se observaron concentraciones entre 0.002 a $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$, mientras que en la estratificación temprana se registró un leve incremento de esta forma oxidada del nitrógeno de 0.01 a $0.02 \mu\text{mol L}^{-1}$, teniendo que el epilimnion registró $0.012 \mu\text{mol L}^{-1}$, el metalimnion $0.015 \mu\text{mol L}^{-1}$ y el hipolimnion $0.003 \mu\text{mol L}^{-1}$. Por otro lado, durante la estratificación bien establecida se encontraron valores de 0.02 a $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$ registrando en el epilimnion $0.021 \mu\text{mol L}^{-1}$ y el metalimnion e hipolimnion presentaron valores de hasta $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$, observando que la concentración de dicho nutriente se incrementa conforme avanza la estratificación. Sin embargo, estos valores decaen en la estratificación tardía donde las concentraciones promedio fueron de hasta $0.003 \mu\text{mol L}^{-1}$ y donde se registra únicamente en el epilimnion una concentración de $0.005 \mu\text{mol L}^{-1}$, lo que puede estar relacionado con el subsecuente inicio de la mezcla (Cuadro 4 y Fig. 6).

7.2.3 Amonio

Las concentraciones promedio de amonio (NH_4^+) del lago Atexcac para el periodo de mezcla oscilaban entre 1.16 a $0.77 \mu\text{mol L}^{-1}$. En la estratificación temprana la concentración de amonio se incrementó hasta $1.87 \pm 1.33 \mu\text{mol L}^{-1}$, donde el epilimnion obtuvo concentraciones de $2.16 \mu\text{mol L}^{-1}$, en el metalimnion de $2.49 \mu\text{mol L}^{-1}$ y en el hipolimnion de $1.15 \mu\text{mol L}^{-1}$ teniendo durante esta fase hidrodinámica por estratos la mayor cantidad de amonio; posteriormente se registró un descenso hacia la estratificación bien establecida $0.22 \pm 0.13 \mu\text{mol L}^{-1}$, donde los estratos registraron: epilimnion $0.109 \mu\text{mol L}^{-1}$, metalimnion $0.209 \mu\text{mol L}^{-1}$ y el hipolimnion con $0.493 \mu\text{mol L}^{-1}$; teniendo un posterior aumento hacia la estratificación tardía $1.59 \pm 1.07 \mu\text{mol L}^{-1}$, donde el epilimnion registró $1.02 \mu\text{mol L}^{-1}$, el metalimnion $2.65 \mu\text{mol L}^{-1}$ y el hipolimnion $1.59 \mu\text{mol L}^{-1}$.

L⁻¹ y el hipolimnion 3.35 $\mu\text{mol L}^{-1}$, siendo durante la estratificación temprana donde se presentó la máxima concentración de amonio por mes, mientras que por estrato se presenta el máximo en la estratificación tardía y se ubica dicho máximo en el hipolimnion (Cuadro 3 y Fig. 6).

7.2.4 Fósforo soluble reactivo

Las concentraciones promedio del fósforo soluble reactivo para el periodo de mezcla fueron de 0.01 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mientras que para la estratificación temprana y tardía estos tienen un aumento de entre 0.06 a 0.07 $\mu\text{mol L}^{-1}$ donde destaca que el epilimnion e hipolimnion tienen los máximos valores para la estratificación temprana, mientras que en la tardía estos máximos se ven reflejados únicamente en el epilimnion y metalimnion; por otro lado, en la estratificación bien establecida se presentaron concentraciones de 0.02 a 0.01 $\mu\text{mol L}^{-1}$ destacando que los máximos durante este periodo se encuentran en el metalimnion e hipolimnion (Cuadro 4 y Fig. 6).

7.2.5 Fósforo total

El fósforo total para la fase de la mezcla registró concentraciones entre 0.56 ± 0.19 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mientras que en la estratificación temprana y bien establecida es de entre 0.41 ± 0.10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ donde el epilimnion para ambos oscila entre 0.11 y 0.46 $\mu\text{mol L}^{-1}$; el metalimnion de ambos periodos registra 0.030-0.396 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y el hipolimnion 0.97-0.29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Cuadro 4 y Fig. 5); sin embargo, es durante la estratificación tardía que estos valores descienden de entre 0.11 ± 0.08 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y donde el estrato con mayor cantidad de este nutriente es el metalimnion con 0.13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Cuadro 4 y Fig. 6).

7.2.6 Sulfato

La concentración del ión sulfato para la fase de mezcla presentan una oscilación de $1439 \pm 589 \mu\text{mol L}^{-1}$ siendo este el valor máximo para todas las fases hidrodinámicas. La estratificación temprana presenta un descenso que oscila de $973 \pm 88 \mu\text{mol L}^{-1}$; el epilimnion presenta $1041 \mu\text{mol L}^{-1}$, el metalimnion $947 \mu\text{mol L}^{-1}$ y el hipolimnion desciende hasta los $924 \mu\text{mol L}^{-1}$, para posteriormente tener un descenso hacia la estratificación bien establecida $834 \pm 116 \mu\text{mol L}^{-1}$ teniendo el máximo de sulfato en el epilimnion con $914 \mu\text{mol L}^{-1}$ y un descenso gradual hacia el hipolimnion durante esta fase; sin embargo, se registró un aumento hacia la estratificación tardía $1109 \pm 86 \mu\text{mol L}^{-1}$, presentando el mismo comportamiento de la fase anterior donde se observa un aumento en el epilimnion y descenso hacia el hipolimnion (Cuadro 4 y Fig. 6).

Cuadro 4 Concentraciones promedio y desviación estándar de nutrimentos y sulfato durante las fases hidrodinámicas del lago Atexcac.

	MEZCLA $\mu\text{mol L}^{-1}$	ESTRATIFICACIÓN $\mu\text{mol L}^{-1}$		
		Temprana	Bien establecida	Tardía
Nitrato	0.21 ± 0.15	0.30 ± 0.40	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.004
Nitrito	0.002 ± 0.01	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.003 ± 0.003
Amonio	1.16 ± 0.77	1.87 ± 1.33	0.22 ± 0.13	1.59 ± 1.07
FSR	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.06	0.02 ± 0.01	0.07 ± 0.01
FT	0.56 ± 0.19	0.41 ± 0.40	0.41 ± 0.10	0.11 ± 0.08
Sulfato	1439 ± 598	973 ± 88	834 ± 116	1109 ± 86

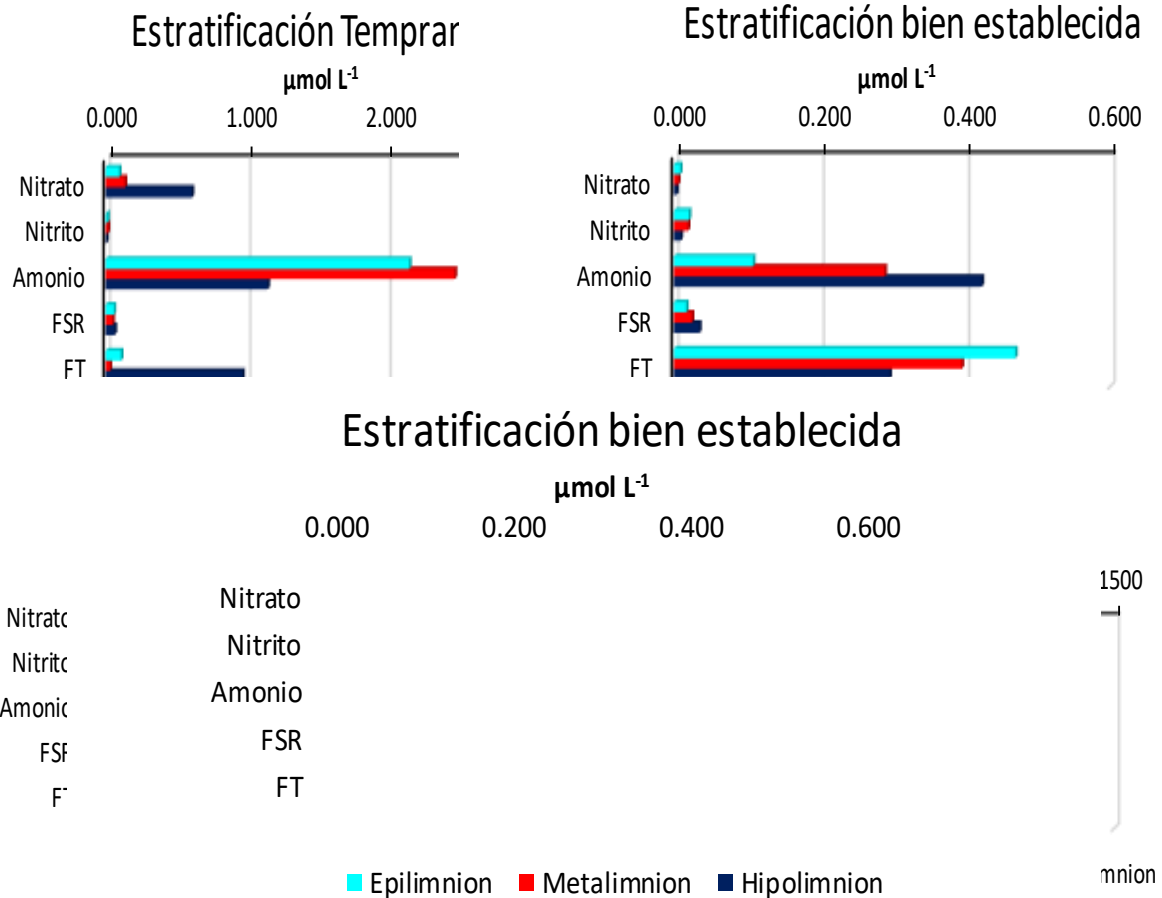


Fig. 6 Variación espacial por estratos de la concentración promedio de los nutrientes (nitrato, nitrito, amonio, fósforo soluble reactivo: FSR y fósforo total: FT) durante la estratificación. Para el sulfato se muestran ambas fases hidrodinámicas por estrato durante el año 2014 en el lago de Atexcac.

7.3 Dinámica Espacio temporal del Bacterioplancton Total (BT)

7.3.1 Abundancia

El bacterioplancton total (BT) registró una abundancia promedio de 1.72×10^6 cél. mL^{-1} durante el periodo de mezcla (Fig. 6a). En la estratificación temprana se observó en la zona del epilimnion una abundancia promedio de 1.49×10^6 cél. mL^{-1} , del metalimnion de 1.98×10^6 cél. mL^{-1} y del hipolimnion de 1.61×10^6 cél. mL^{-1} (Fig. 6b), mientras que para el epilimnion de la estratificación bien establecida este aumento a 2.22×10^6 cél. mL^{-1} , el metalimnion a 2.44×10^6 cél. mL^{-1} , y el hipolimnion a 2.15×10^6 cél. mL^{-1} (Fig. 7a).

Durante la estratificación tardía la abundancia descendió en todos los estratos registrando densidades en el epilimnion de 2.12×10^6 cél. mL⁻¹, mientras que en el metalimnion estas densidades descendieron con respecto a los estratos anteriores teniendo en este hasta 1.61×10^6 cél. mL⁻¹, haciendo evidente un considerable descenso de dicha abundancia durante este periodo. Por último, el hipolimnion registró una abundancia de 1.98×10^6 cél. mL⁻¹ (Fig. 6a); haciendo evidente que en este último mes y última etapa hidrodinámica fue el que presentó un mayor descenso en el metalimnion con respecto al resto de los meses y fases hidrodinámicas (Fig. 6a).

7.3.2 Biomasa

La biomasa del bacterioplancton total (BT) registró una concentración promedio de $42.9 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ durante el periodo de mezcla (Fig. 7b) En la estratificación temprana se registró una concentración promedio de $23.42 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ (Fig. 7b), donde el epilimnion obtuvo $20.77 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$, el metalimnion $30.78 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ y el hipolimnion de $21.16 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$; siendo evidente que el estrato con mayor cantidad de biomasa es el del metalimnion con un gradual descenso hacia el hipolimnion (Fig. 7b). Mientras que durante la estratificación bien establecida se encontró una biomasa promedio de $43.03 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ (Fig. 7b), donde el epilimnion registro $29.70 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$, el metalimnion $64.22 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ y el hipolimnion $48.49 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$, donde el estrato con mayor biomasa es el del metalimnion, mientras que el epilimnion registro un considerable descenso de la biomasa con respecto a la fase hidrodinámica anterior, mientras que el hipolimnion registra un aumento significativo en relación con el de la fase anterior (Fig. 7b).

Durante la fase de estratificación tardía la concentración promedio de biomasa fue de $39.43 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ (Fig. 7b), en donde el epilimnion tiene $37.82 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$, mostrando que este estrato tiene aumentos al principio y final de la estratificación y una disminución al medio de estas, mientras que el metalimnion registra $58.80 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ siendo así que en este estrato se observa un comportamiento inverso a lo descrito del estrato anterior, pues este tiende a

incrementarse durante la bien establecida y a disminuir cuando este se acerca al periodo de mezcla; por otro lado, el hipolimnion registró 28.09 $\mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$, haciendo evidente que este estrato en cuanto a la biomasa tiene un comportamiento típico de campana donde se tiene un máximo hacia la estratificación bien establecida y registra valores de biomasa bajos en los extremos es decir al inicio y al final de la estratificación.

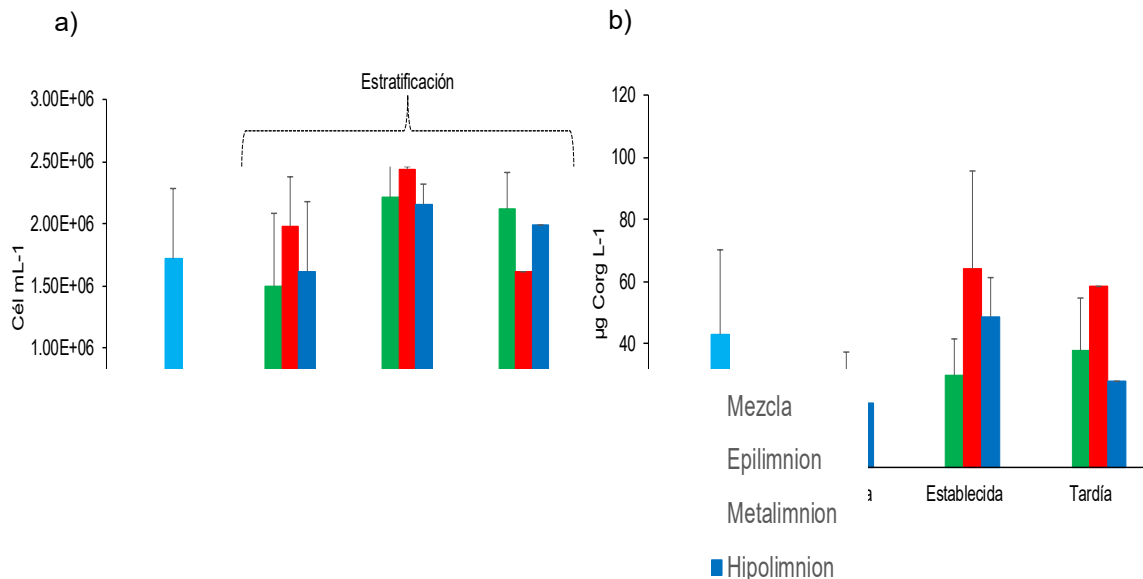


Fig. 7 a) Dinámica espacio-temporal de la abundancia del BT b) Dinámica espacio-temporal de la biomasa del BT durante las etapas hidrodinámicas en el año 2014 para el lago de Atexcac.

7.4 Dinámica Espacio temporal de las Picocianobacterias (Pcy)

7.4.1 Abundancia

Las Picocianobacterias (Pcy) registraron una abundancia promedio de 1.55×10^5 cél. mL⁻¹ durante el periodo de mezcla (febrero) (Fig. 8a), mientras que en la estratificación temprana se observó en la zona del epilimnion una abundancia promedio de 2.05×10^5 cél. mL⁻¹, del metalimnion de 3.0×10^5 cél. mL⁻¹ y del hipolimnion de 1.38×10^5 cél. mL⁻¹ (Fig. 8a); para el epilimnion de la estratificación bien establecida éste aumentó a 1.34×10^5 cél. mL⁻¹, el metalimnion a 2.49×10^5 cél. mL⁻¹, y el hipolimnion a 8.52×10^4 cél. mL⁻¹ (Fig. 8a).

En la estratificación tardía la abundancia descendió en los estratos registrando densidades en el epilimnion de 2.49×10^5 cél. mL⁻¹; en el metalimnion estas densidades descendieron con respecto a los estratos anteriores registrando hasta 5.65×10^4 cél. mL⁻¹, teniendo un considerable descenso de abundancia durante este periodo. Por último, el hipolimnion tuvo una abundancia de 1.39×10^5 cél. mL⁻¹ (Fig. 8a); evidenciando que en este último mes y última fase hidrodinámica fue el que presentó un mayor descenso en el metalimnion con respecto al resto de los meses y fases hidrodinámicas.

7.4.2 Biomasa

La biomasa de las Picocianobacterias (Pcy) registró una concentración promedio de $19.36 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ durante el periodo de mezcla (Fig. 8b). En la estratificación temprana se encontró una concentración promedio de $16.25 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ (Fig. 8b), el epilimnion obtuvo $12.41 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$, el metalimnion $25.47 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ y el hipolimnion de $13.93 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$.

El estrato con mayor cantidad de biomasa es el del metalimnion con un descenso hacia el hipolimnion (Fig. 8b); mientras que en la estratificación bien establecida se encontró una biomasa promedio de $14.55 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ (Fig. 8b), teniendo que el epilimnion registró $10.05 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$, el metalimnion $25.29 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ y el hipolimnion $12.83 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$; el estrato con mayor biomasa es el del metalimnion, mientras que el epilimnion e hipolimnion tienen un descenso significativo en relación con el de la fase anterior (Fig. 8b). Por último durante la fase de estratificación tardía la concentración promedio de biomasa fue de $15.95 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ (Fig. 8b), el epilimnion tiene $18.33 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$, mostrando que este estrato tiene un aumento al principio y final de la estratificación, así como una disminución al medio de estas, mientras que el metalimnion registra $7.77 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ donde este estrato presenta un comportamiento inverso a lo descrito del estrato anterior, pues este tiende a incrementarse durante la bien establecida y disminuye cuando se acerca al periodo de mezcla. El hipolimnion registró $12.22 \mu\text{g C}_{\text{org}} \text{L}^{-1}$ donde se hace evidente que este estrato tiene un comportamiento típico de campana donde se

tiene un máximo hacia la estratificación bien establecida y registra valores de biomasa bajos en los extremos es decir al inicio y al final de la estratificación (Fig. 8b).

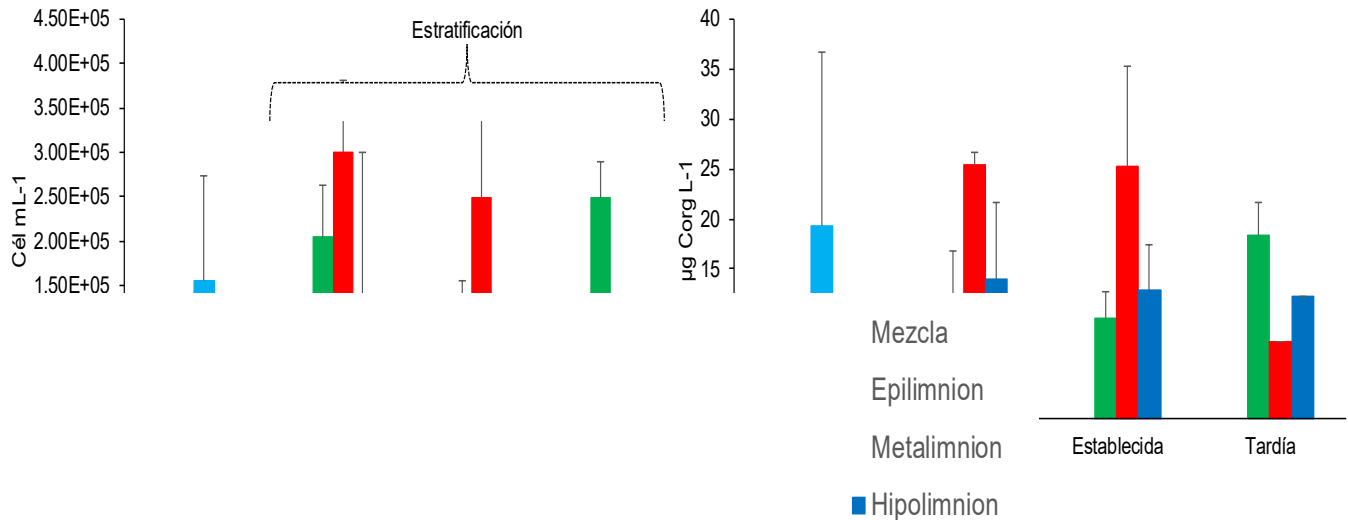


Fig. 8 a) Dinámica espacio-temporal de la abundancia de las Pcy b) Dinámica espacio-temporal de la biomasa de las Pcy durante las etapas hidrodinámicas en el año 2014 para el lago de Atexcac.

7.5 Dinámica y composición espacio temporal de los grupos procariontes

7.5.1 Distribución temporal

El dominio *Bacteria* (BAC) se encontró por arriba del 50% de abundancia relativa durante todas las fases, presentando los máximos de hibridación en la mezcla y en la estratificación tardía, siendo la fase de estratificación bien establecida durante la cual dicho porcentaje se encontró en el límite del 50% de abundancia relativa. El dominio *Archaea* (ARCH) se caracterizó por estar presente solo en la estratificación donde se ve un aumento en la abundancia relativa hacia la estratificación tardía; por otro lado, el filo *Thaumarchaeota* (THAU) solo estuvo registrado en la estratificación bien establecida (Fig. 10).

La fase de mezcla se ve caracterizada por el bajo número de grupos procariontes presentes registrándose solo 5 de los 9 grupos específicos destacando que los valores de abundancia relativa para estos grupos son muy similares estando todos por arriba del 5% de abundancia relativa sin sobrepasar el 10% (Fig. 9).

Para la estratificación temprana se presentan los 9 grupos de procariontes, siendo durante esta etapa las *Betaproteobacteria* (BET) el grupo que sobresale con un 6% de abundancia relativa, mientras que los demás grupos se encuentran por debajo de este valor. Por otro lado, durante la estratificación bien establecida los grupos dominantes son las BET, el género *Paracoccus* (PAR) y los *Planctomycetes* (PLA); mientras que para la estratificación tardía los porcentajes de abundancia relativa son casi homogéneos sin embargo los grupos dominantes de manera decreciente durante esta fase hidrodinámica son los PLA, BET, *Gammaproteobacteria* (GAM), PAR y LD12 encontrando sus porcentajes de abundancia relativa desde un 7-12%, teniendo al resto de los grupos con porcentajes por debajo del 7%; siendo así que de manera temporal los grupos con mayor dominancia durante toda la estratificación son PAR, BET, GAM Y PLA (Fig. 9).

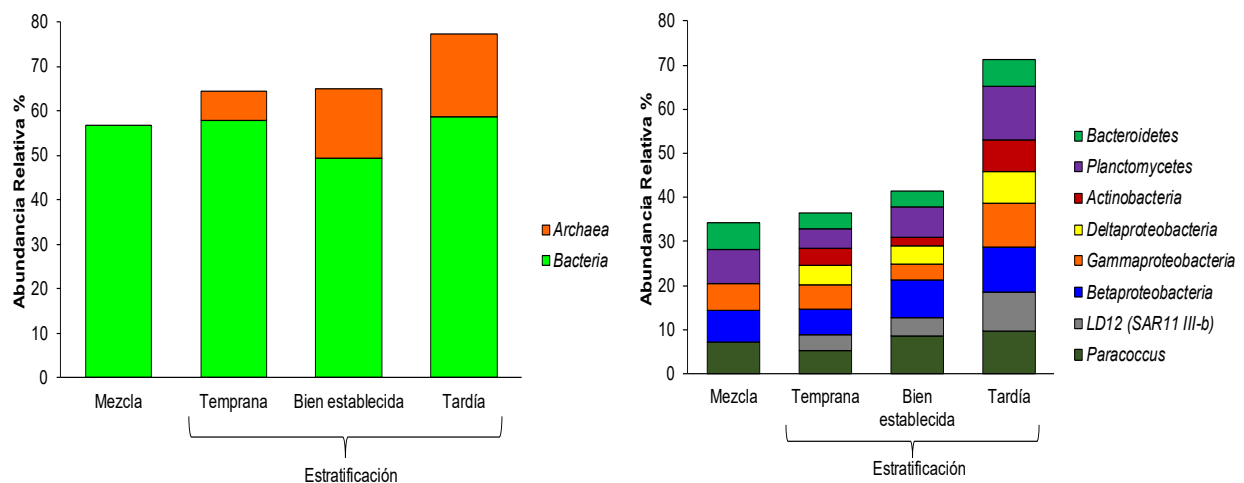


Fig. 9 Composición temporal de la abundancia relativa de los grupos procariontes en el lago Atexcac durante las fases hidrodinámicas.

7.5.2 Distribución espacial

En el lago Atexcac, durante el periodo de mezcla el número de grupos bacterianos específicos fue menor con respecto al período de estratificación (Fig. 10). Siendo durante la etapa de mezcla que predominaron en su abundancia relativa de manera decreciente el grupo PLA, seguido por BET, PAR, *Bacteroidetes* (BACT) y GAM en menor proporción, siendo de esta manera que estos grupos nos da alrededor del 35% de abundancia relativa durante este periodo (Fig. 9).

Durante la estratificación temprana en el epilimnion los grupos con mayor abundancia relativa son PAR, GAM y BET los cuales son mayores o iguales al 10% pero menores al 15% de abundancia relativa. En el metalimnion los grupos dominantes de manera decreciente son GAM, BET, PLA y PAR donde destaca el hecho de que ninguno de estos supera al 12% y se encuentran por arriba del 6% de abundancia relativa, siendo que el resto de los grupos como BSR, LD12, *Actinobacteria* (ACT) y ALF se encuentran dentro del rango de 5-6% de abundancia relativa (Fig. 10); mientras que en el hipolimnion los grupos dominantes fueron BET, GAM y PAR que se encuentran dentro de un rango de 12-8% de abundancia relativa, y donde los grupos BSR, PLA, ACT, BACT, LD12 están un intervalo de 5-6% de abundancia relativa.

Para la estratificación bien establecida los grupos con mayor abundancia relativa en el epilimnion son PAR, BET, BSR y PLA siendo PAR el máximo para el epilimnion con un 20% de abundancia relativa y que a comparación del mes anterior este es mayor; el resto de los grupos dominantes se encuentran por debajo de este en un rango de 16-13% de abundancia relativa, los grupos restantes como GAM, BACT y ACT se encuentran en un rango de 5-8%, destacando solo el hecho de que el grupo ALF se encuentra ausente a partir de este momento hasta el final de la estratificación en todos los estratos (Fig. 10); por otro lado el metalimnion se encuentra representado en mayor proporción por PAR (17%), BET, LD12 y PLA estos últimos tres en un rango de 16-10% y en menor proporción BSR, GAM, BACT y ACT estos en un rango de 7-4% de abundancia relativa; por último en el

hipolimnion se registra que los grupos dominantes son BET y PAR con 18% de abundancia relativa y con un descenso consecutivo de los grupos ACT (16%), PLA (13%), LD12 (11%), GAM (8%), BSR (5%) y ACT(5%) (Fig. 10).

En la estratificación tardía el epilimnion se ve representado en mayor proporción por los grupos PLA, BET, GAM y PAR, siendo el grupo con una mayor abundancia relativa PLA al tener 19%; donde la abundancia relativa de estos últimos tres está en un rango de 17-15%. En el metalimnion el grupo PLA continúa siendo el máximo con un 21% de abundancia relativa, cabe mencionar que hay un ligero aumento con respecto al del estrato anterior, seguido de los grupos GAM y PAR los cuales se encuentran en un rango de 19-17% de abundancia relativa; seguidos por los grupos BET (14%), BACT (13%), BSR (12%) y ACT (11%). En el hipolimnion se registra el máximo de abundancia relativa del grupo PLA para toda la estratificación con un 24%; seguido por los grupos BET, PAR, GAM y LD12 en un rango de 21-18% de abundancia relativa y donde BACT, BSR, ACT se encuentran por debajo 16% (Fig. 10).

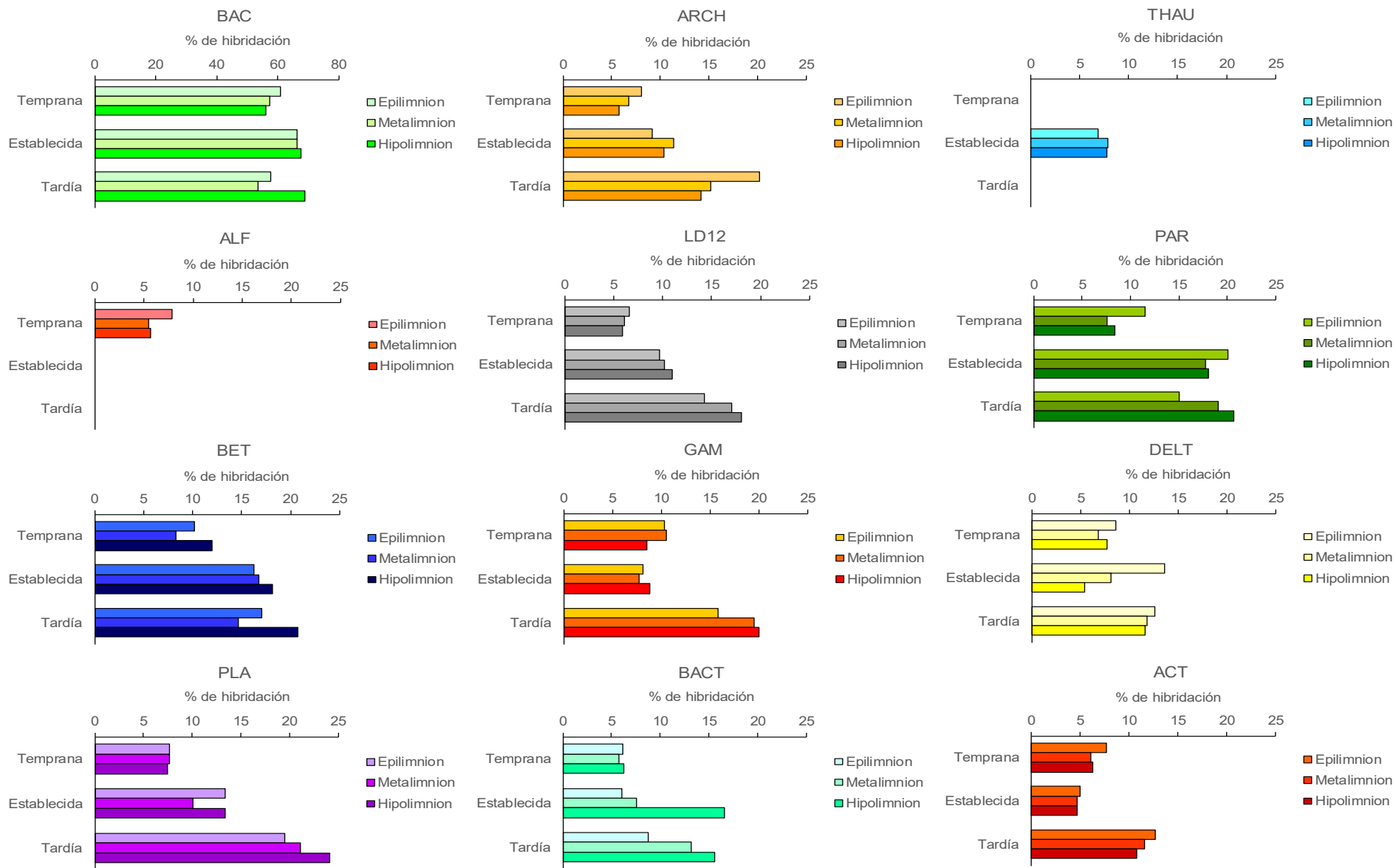


Fig. 10 Composición espacial y temporal de la abundancia relativa (% de hibridación) de los grupos procariontes en el lago Atexcac durante la estratificación para el año 2014. Se indican por abreviaturas los Dominios Bacteria: BAC, Archaea: ARCH, Thaumarchaeota: THAU, así como para los grupos específico, Alphaproteobacteria: ALF, Paracoccus: PAR, subclado SAR11-IIIb: LD12, Betaproteobacteria: BET, Gammaproteobacteria: GAM, Deltaproteobacteria: BSR, Actinobacteria: ACT, Planctomycetes: PLA y Bacteroidetes: BACT.

7.6 Correlación de los parámetros fisicoquímicos con los grupos procariontes del lago Atexcac

7.6.1 Relación de los grupos del plancton procarionte con los parámetros físico-químicos en el lago Atexcac durante las fases hidrodinámicas

Para los parámetros biológicos del picoplancton procarionte para la fase de mezcla se encontraron correlaciones positivas (r^2 entre 0.97 y 0.82, $p < 0.05$) en general entre la temperatura (T) Pcy, BACT; mientras que el oxígeno disuelto (OD) con Pcy y BACT, el pH con BET, y el nitrito (NO_2^-) con Pcy y BACT. Mientras que se halló una correlación negativa (r^2 de -0.85, $p < 0.05$) de la conductividad con GAM.

De forma general para la estratificación, la temperatura solo mantiene una relación positiva con el grupo BSR, y una negativa con BACT siendo no significativa para el resto de los grupos bacterianos, por otro lado, el oxígeno mantiene una relación positiva con los taxones Pcy y BSR (r^2 entre 0.50 a 0.57, $p < 0.05$), hallando solo para los *Bacteroidetes* una relación negativa (Cuadro 5 y 6).

Tanto el pH como la conductividad registran una relación tanto positiva como negativa con la mayoría de los grupos procarionte. Por otro lado, tanto el nitrato como el amonio registran una relación negativa siendo importante destacar que únicamente ALF son positivas con el nitrato y amonio, mientras que THAU tiene una relación positiva con el nitrito como se muestra en los cuadros 5 y 6.

Se observa que las relaciones entre fósforo soluble reactivo, fosforo total y sulfato mantienen una relación negativa en su mayoría con los grupos procariontes. Notando que únicamente existe relación positiva entre GAM y fosforo soluble. Cabe decir que el carbonato y bicarbonato presentaron correlaciones positivas y negativas con el bacterioplancton procarionte, siendo estos y el pH los que obtienen los valores de correlación más altos (Cuadro 5).

Cuadro 5 Correlación de Pearson entre los dominios y grupos generales del picoplancton procarionte y los parámetros limnológicos del lago Atexcac, durante la fase de estratificación. Con n=23, correlaciones estimadas ($p < 0.05$) con un nivel de confianza al 95%, Ns= no significancia ($p > 0.05$). Se han abreviado tanto dominios y taxones del picoplancton procarionte (Dominios Bacteria: BAC y Archaea: ARCH. Filo Thaumarchaeota: THAU. Parámetros limnológicos como fósforo soluble reactivo: FSR, fósforo total: FT.

	BAC	ARCH	THAU	Pcy
Temperatura	ns	ns	ns	ns
Conductividad	-0.6459	ns	-0.78	ns
pH	0.5612	0.4608	0.6066	ns
Oxígeno	ns	ns	ns	0.5759
Nitrato	-0.5314	-0.4983	ns	ns
Nitrito	ns	ns	0.4763	ns
Amonio	ns	ns	-0.7029	ns
FSR	-0.5497	ns	-0.8189	ns
FT	ns	ns	ns	-0.4514
Carbonato	0.5055	0.6292	0.4893	ns
Bicarbonato	ns	ns	-0.617	ns
Sulfato	-0.4548	ns	-0.6716	ns

n=23 $p < 0.05$ ns= no significativo $p > 0.05$.

Cuadro 6 Correlación de Pearson entre los grupos particulares del picoplancton procarionte y los parámetros limnológicos del lago Atexcac, durante la fase de estratificación. Con n=23, correlaciones estimadas ($p < 0.05$) con un nivel de confianza al 95%, Ns= no significancia ($p > 0.05$). Se han abreviado tanto Taxones pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria como el género Paracoccus: PAR y el linaje SAR11 IIIb: LD12. La clase Betaproteobacteria: BET y Gammaproteobacteria: GAM. Deltaproteobacterias: DELT(BSR) y los filum Actinobacteria: ACT, Planctomycetes: PLA, Bacteroidetes: BACT. Parámetros limnológicos como fósforo soluble reactivo: FSR, fósforo total: FT.

	PAR	LD12	BET	GAM	DELT	ACT	PLA	BACT
Temperatura	ns	ns	ns	ns	0.5975	ns	ns	-0.4435
Conductividad	-0.6314	ns	-0.5956	ns	ns	ns	ns	-0.5274
pH	0.8484	0.5953	0.735	ns	0.6416	ns	0.5184	ns
Oxígeno	ns	ns	ns	ns	0.5009	ns	ns	-0.4748
Nitrato	-0.5459	-0.5889	-0.5076	-0.4549	-0.4304	ns	-0.5285	-0.4245
Nitrito	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Amonio	-0.4705	ns	-0.444	ns	ns	ns	ns	ns
FSR	-0.4736	ns	ns	0.4502	ns	ns	ns	ns
FT	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Carbonato	0.7826	0.7236	0.8404	ns	0.6442	ns	0.6891	ns
Bicarbonato	-0.6851	-0.6734	-0.7434	-0.4277	-0.6841	-0.4553	-0.6715	ns
Sulfato	ns	ns	ns	ns	ns	0.6104	ns	ns

n=23 $p < 0.05$ ns= no significativo $p > 0.05$.

7.7 Análisis de correspondencia canónico

Los resultados obtenidos a través del análisis de correspondencia canónica sin tendencias (ACCST) mostraron que ambos ejes ejercen influencia en el bacterioplancton procarionte donde estos tienen una correlación de 0.91 y 0.96 para los ejes canónicos 1 y 2 (Fig. 11 y cuadro 8). En cuanto a la relación especies-variables ambientales, se observó que el primer eje explicó el 33% y el segundo explicó el 33.4% de dicha variabilidad acumulada, lo que indica que el total de la variabilidad se explica con los dos primeros ejes (66.4%) del ACCST, siendo el eje 2 el que responde la mayor cantidad de variabilidad del sistema.

Las variables ambientales con las mayores correlaciones ponderadas dentro de la matriz multivariada para el eje uno fueron la conductividad con (0.67), el oxígeno con (0.53), amonio (0.46), carbonato (-0.56), bicarbonato (0.43), sulfato (0.39) y fósforo total (-0.37), mientras que las variables relacionadas con el eje dos son: nitrito (-0.48), amonio (0.51), sulfato (0.39), fósforo soluble (0.73) y fósforo total (-0.42) (Fig. 11 y cuadro 7).

En el biplot de la Figura (11) se observa la relación de las variables ambientales con la diversidad de bacterias en la estratificación. Aplicando el test de permutaciones de *Monte Carlo*, se confirmó que el segundo eje canónico representó la influencia de ambos factores, donde las variables ambientales con más peso para este segundo eje son: Amonio y Fósforo Soluble Reactivo, mientras que para el primer eje son: Conductividad, oxígeno disuelto y carbonato (Cuadro 8).

Cuadro 7 Coeficientes de correlaciones múltiples del ACCST de la figura 11, las variables limnológicas con el mayor coeficiente de correlación se encuentran indicadas en negritas.

Parámetros ambientales	Ejes		
	1	2	3
<i>pH</i>	-0.44	-0.27	-0.21
<i>Temperatura</i>	0.20	-0.22	0.21
<i>Conductividad</i>	0.67	0.25	0.06
<i>Oxígeno disuelto</i>	0.53	-0.15	0.02
<i>Nitrato</i>	0.13	-0.22	0.36
<i>Nitrito</i>	-0.02	-0.48	0.15
<i>Amonio</i>	0.46	0.51	-0.05
<i>Carbonato</i>	-0.56	0.06	-0.13
<i>Bicarbonato</i>	0.43	-0.10	0.06
<i>Sulfato</i>	0.39	0.39	0.08
<i>Fosforo soluble</i>	0.19	0.73	0.13
<i>Fosforo total</i>	-0.37	-0.42	0.22

Cuadro 8 Valores propios, coeficiente de correlación, varianza acumulada de los ejes canónicos 1- 3 que corresponden a la figura 11.

<i>Ejes de ordenación</i>	1	2	3	<i>Inercia total</i>
<i>Eigenvalor</i>	0.007	0.004	0.001	
<i>Correlación especies-Variabes ambientales:</i>	0.912	0.962	0.774	
<i>Porcentaje acumulado de la variabilidad de especies</i>	34.5	55.6	60.8	
<i>Porcentaje acumulado de la relación especies-variables ambientales</i>	33	66.4	75.9	0.02

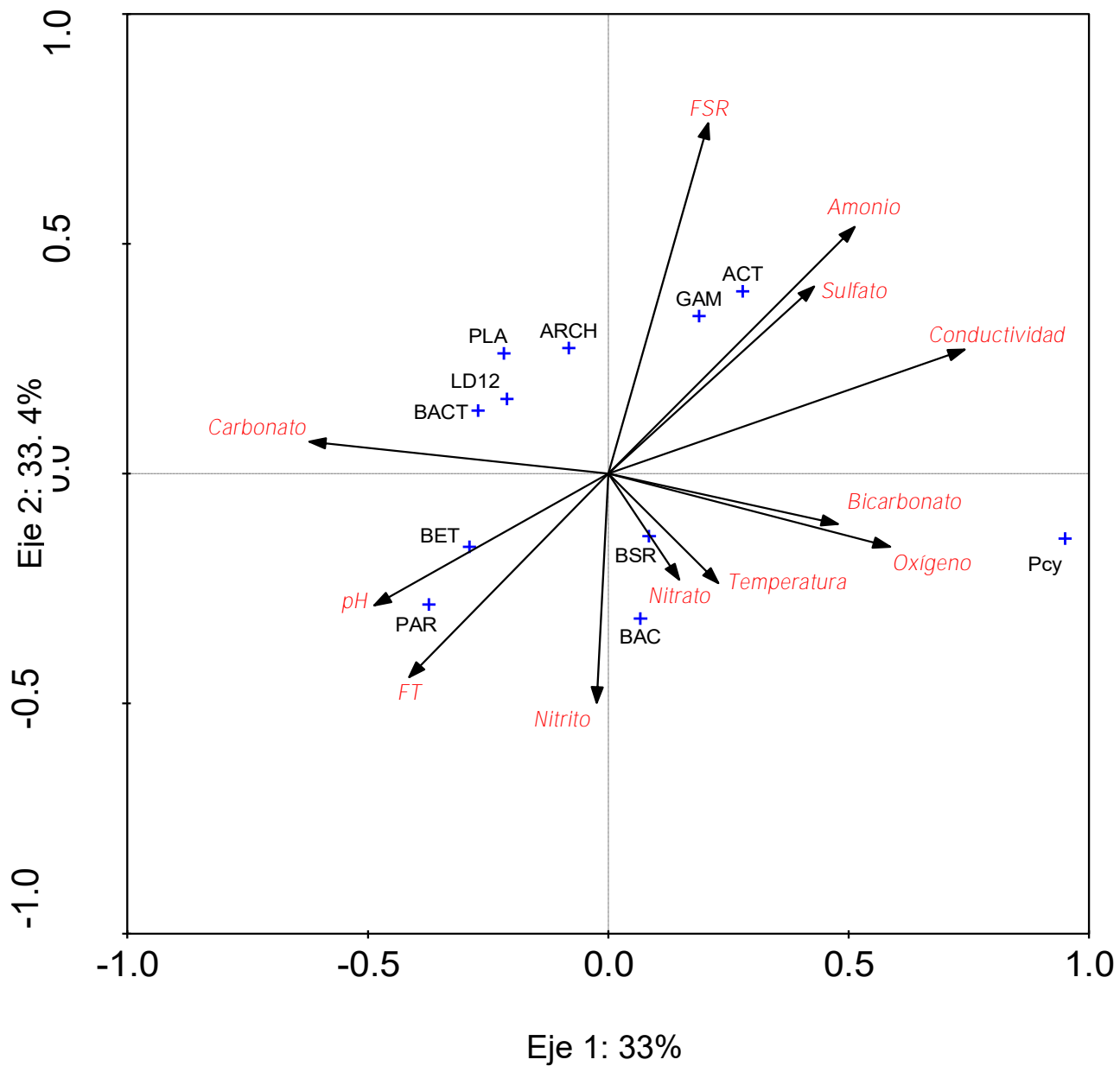


Fig. 11 Análisis de correspondencia canónica sin tendencia (ACCST. Ejes 1 y 2 explican el 33 % y el 33.4 % de la varianza acumulada. Se indican por abreviaturas los Dominios Bacteria: BAC y Archaea: ARCH, así como para los grupos específico, Paracoccus: PAR, subclado SAR11-IIIb: LD12, Betaproteobacteria: BET, Gammaproteobacteria: GAM, Deltaproteobacteria: BSR, Actinobacteria: ACT, Planctomycetes: PLA y Bacteroidetes: BACT, Así mismo se indican las abreviaturas utilizadas para las variables limnológicas potencial de hidrógeno: pH, fósforo soluble reactivo: FSR, fósforo total: FT y oxígeno disuelto: oxígeno

7.8 Problemas de hibridación de las sondas de oligonucleótidos

El hecho de que la mayoría de las sondas no puedan alcanzar el 100% de hibridación o cobertura aun con la técnica de CARD-FISH no solo se puede deber al bajo contenido de ARN que el grupo objetivo pueda tener, dado que además existen factores como la sensibilidad de la sonda, la cual está referida en términos de porcentaje a la posibilidad de éxito que pueda tener esta sonda para penetrar en la zona de hibridación, siendo esto variable en función de la estructura celular, así como de las características particulares del grupo objetivo (Wagner et al.,2003).

Al igual que con la sensibilidad, la cobertura de la sonda también es expresada en porcentaje y esta se refiere al alcance o nivel que cubre del grupo objetivo, el cual no es alcanzado al 100% por ninguna sonda existente actualmente. Por otro lado, también están los llamados falsos negativos referidos así por ser organismos que teóricamente deben de ser hibridados y marcados con la sonda pero que por alguna razón no son incluidos durante el proceso; también están los llamados falsos positivos que a diferencia de los falsos negativos estos pueden ser organismos que son marcados e hibridados pero que no son pertenecientes al grupo objetivo, estos últimos son los menos deseables y comunes pues ya están incluidos dentro de cada sonda de oligonucleótidos, la única manera de descartarlos es conociendo el porcentaje exacto de estos dentro de cada nivel de cobertura (Cuadro 9) (Greuter *et al.*, 2016; Quast *et al.*, 2013).

La presencia de estos falsos positivos es variable, sin embargo, la más común es debido una alta similitud nucleotídica del grupo objetivo con otros grupos (falsos positivos), haciendo que de esta manera con la sonda no se pueda distinguir claramente entre el grupo objetivo y estos. Por lo tanto, se puede decir que algunos de estos factores pueden haber sido los causantes de no haber logrado una hibridación del todo eficaz con algunos grupos (Cuadro 9).

Cuadro 9 Cobertura, sensibilidad y especificidad de las sondas de oligonucleótidos empleados con CARD-FISH en el lago de Atexcac. Cuadro construido con base a ProbeBase de acuerdo con Greuter et al. (2016) y The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools de Quast et al. (2013).

Prueba	Grupo objetivo	Sensibilidad %	Cobertura %	Falsos negativos %	Falsos positivos %
EUB338	<i>Bacteria</i>	90.4	90	6	0
EUB338 II	<i>Planctomycetales</i>	0.8	69		
EUB338 III	<i>Verrucomicrobiales</i>	0.6	93		
ARCH915	<i>Archaea</i>	88.3	90	10	0
CREN537	<i>Thaumarchaeota</i>	23.2	49	51	0.20
ALF968	<i>Alphaproteobacteria</i> excepto <i>Rickettsiales</i>	76.6	79	21	14.29
PAR1457	género <i>Paracoccus</i>	80	51.5	48.5	0.00
LD12-121	<i>SAR11-IIIb</i>	91	84	9	1.90
BET42a	<i>Betaproteobacteria</i>	92.6	93	7	0.48
BET42a-C	Competidor para BET42a	*ND			
GAM42a	<i>Gammaproteobacteria</i>	90.8	90	10	0.40
GAM42a-C	Competidor para GAM42a	*ND			
SRB385	Mayoría de las <i>Desulfovibrionales</i> y otras bacterias <i>Deltaproteobacterias</i>	2.4	21	79	*ND
CF319a	Detecta 90 % de <i>Flavobacteria</i> , 30% <i>Sphingobacterias</i> y 92% <i>Bacteroidetes</i>	41.9	43	57	2.24
PLA886	<i>Planctomycetes</i>	82.7	74	26	0.00
HGC69a	<i>Actinobacteria</i>	82.5	93	7	0.66

*ND= No determinado

8. DISCUSIÓN

8.1 Parámetros físicos y químicos

La dinámica térmica en el lago Atexcac durante este estudio se ajustó a la descrita por Alcocer *et al.* (2000) que indican que los cuerpos de agua ubicados en el altiplano mexicano y con profundidades mayores a 20 m tienden a presentar un comportamiento de monomixis cálida, caracterizado por tener un periodo de mezcla invernal (diciembre-marzo) y la etapa de estratificación (marzo-noviembre) y que a su vez es congruente con la categoría propuesta por Lewis (1983) para lagos profundos tropicales.

Para el período de estudio en el Lago Atexcac con una profundidad máxima de 34 m, la monomixis cálida fue ratificada por medio de los perfiles verticales de temperatura y de oxígeno disuelto (OD) (Fig. 3 a y b), que a su vez confirman que éste es un comportamiento cíclico anual que previamente había sido reportado por Macek *et al.* (1994, 2000, 2007), Arellano-Posadas y González-Flores (2011) y Lagunas y Martínez (2015).

Las concentraciones de oxígeno disuelto durante la mezcla tendieron a ser homogéneas, con niveles de saturación a sobresaturación durante los meses de febrero y marzo; mientras que durante la estratificación el lago desarrolló un perfil clinógrado, donde el epilimnion permaneció saturado (Fig. 3b) debido probablemente al florecimiento de alta intensidad y duración de la Cianobacteria filamentosa *Nodularia cf. spumigena* (Komárek y Komárková-Legnerová, 2002). Dicho florecimiento duró aproximadamente 7 meses (febrero-agosto) para el año de estudio. Este florecimiento es similar al que ocurre en el lago hiposalino monomíctico cálido Alchichica (Oliva *et al.*, 2009); siendo incluso similar en duración al registrado para el año 1999, a partir de este evento y estudios subsecuentes se sabe que estos florecimientos largos e intensos pueden diferir entre años de estudio (Oliva *et al.*, 2009) y que muy probablemente esta variabilidad interanual puede suceder también en el lago de Atexcac (Fig. 12 a y b).



Fig. 12 a) Vista Noreste desde la cima del cráter que contiene al lago Atexcac durante el florecimiento de *Nodularia*. b) Aglomeración de la Cianobacteria a orillas del lago Atexcac.

La concentración de oxígeno disuelto disminuyó gradualmente por debajo de la termoclina con el desarrollo de la estratificación; así en la zona más profunda del hipolimnion se registraron las concentraciones más bajas (0.5 mg L^{-1}). Sin embargo, el hipolimnion no llegó a ser anóxico, como también había sido reportado por Macek *et al.* (1994, 2000), Arellano-Posadas y González-Flores (2011) (Fig. 3b) y que contrasta con lo encontrado en el lago profundo Alchichica donde el hipolimnion es anóxico durante la estratificación bien establecida (Alcocer *et al.*, 2000).

El lago de Atexcac por su pH de 8.9 ± 0.2 (Cuadro 3) se le puede definir como alcalino y por su composición iónica que establece una salinidad de origen no marino como atalasohalino y sódico por la dominancia de esta catión favorecido al estar ubicado en la zona tropical dentro de una cuenca endorreica con un índice de precipitación anual que es rebasado por el de evaporación que determinan una predominancia de los aniones carbonato, cloruro y del catión anteriormente citado (Jones *et al.*, 1998; Grant, 2006; Macek *et al.*, 2007).

La dominancia de los aniones carbonatos y cloruro en el lago Atexcac ha sido documentado por Armienta *et al.* (2008), lo que coincide con la predominancia de carbonatos sobre bicarbonatos registradas en el presente estudio. Sin embargo, de acuerdo con el sistema de amortiguamiento de carbono asociado con el pH, en función de los valores de pH se esperarían la dominancia de bicarbonato sobre el

carbonato en condiciones de equilibrio químico (Wetzel *et al.*, 2001). Esta dominancia de carbonato sobre bicarbonato no es extraña en el lago Atexcac puesto que ya había sido reportada por Macek *et al.* (2007), lo que puede ser el resultado de una variabilidad interanual de estos parámetros, asociada con la dinámica de nucleación de carbonatos favorecida por las picocianobacterias (Zhu y Ditrich, 2016)

8.2 Parámetros biológicos

La dinámica de la abundancia relativa y la composición del picoplancton procarionte por dominios y grupos taxonómicos en el lago Atexcac se encontró directamente relacionado con el comportamiento térmico del lago. Dado que la abundancia relativa de los mismos se encontró en mayor o menor medida en dependencia de la etapa hidrodinámica, pues se ha demostrado que el cambio estacional en la concentración de nutrientes puede afectar la composición del bacterioplancton (Hawes, 1990; Donner *et al.*, 1996; Yannarell *et al.*, 2003), la cual se asocia a su vez con la variación por estratos de los mismos.

8.2.1 Bacterioplancton Total (BT)

El bacterioplancton total (BT) del lago Atexcac, se caracterizó por tener una abundancia absoluta mayor durante la época de mezcla (Macek *et al.*, 1994), mientras que durante la estratificación temprana y bien establecida esta abundancia se ubicó en gran proporción en el metalimnion (Fig. 7a), lo que pudo estar también en respuesta a la concentración de nutrientes disponibles y a su distribución dentro de la columna de agua (Hibbing *et al.*, 2010, Hernández-Avilés *et al.*, 2012).

Sin embargo, la biomasa del BT no siguió el mismo patrón que la abundancia absoluta, lo cual pudo estar más en respuesta del volumen celular que de la cantidad de microorganismos que se encuentren en el momento. Se sabe que las condiciones oligotróficas pueden inducir de forma temporal o permanente adaptaciones bacterianas que afectan el aumento o decremento del volumen celular de las bacterias y por ende el contenido de carbono (Schut *et al.*, 1997). Así a pesar de tener una abundancia alta, si el volumen celular es pequeño entonces el

contenido de carbono por célula será bajo como ha sido reportado en los lagos tropicales (Hernández-Avilés et al., 2012), lo que implicará que la biomasa sea baja.

8.2.2 Dominio *Bacteria* (BAC)

El dominio bacteria (BAC) caracterizado por las sondas EUB I, II y III registró alta variabilidad de las abundancias relativas de los diferentes grupos que lo constituyen, pues está depende de las diferentes condiciones físicas y químicas de la columna de agua (Gasol *et al.*, 2002; Rubbin y Leff, 2007).

La abundancia relativa durante la mezcla, estratificación temprana y bien establecida disminuyó hacia el fondo del sistema (Fig. 9) coincidiendo con las menores concentraciones de nitrato (Cuadro 4 y Fig. 6); a través de esto se puede inferir que algunos de los grupos pertenecientes a este dominio tienen una baja abundancia cuando este nutriente se encuentra en grandes concentraciones (Cuadro 5 y Fig. 6 y 10) (Hawes, 1990; Donner *et al.*, 1996; Yannarell *et al.*, 2003). Durante la estratificación tardía en el hipolimnion se registró el máximo de abundancia relativa para todo el sistema (59%), donde se registraron las mayores concentraciones de bicarbonato para todo el periodo de estudio (Fig.5); siendo esto relacionado de manera positiva con este dominio (Cuadro 5), lo cual puede estar respondiendo a que algunos grupos dentro de este dominio se asocien con este ion.

El máximo de este dominio encontrado en la estratificación tardía coincide con el máximo registrado en el Lago Alchichica empleando FISH (Hernández-Avilés *et al.* 2010). Sin embargo, la abundancia relativa de este dominio en el lago Atexcac fue superior a la registrada para el lago de Alchichica por estos mismos autores y por Bautista-Reyes y Macek (2012) empleando CARD-FISH; los factores determinantes en las diferencias encontradas entre estos lagos pueden deberse además de la precisión de las técnicas utilizadas, a las condiciones ambientales particulares, como son la salinidad, la concentración de nutrientes y la capacidad de estos microorganismos para competir efectivamente en ambientes con diferentes estados tróficos: oligotrófico (Alchichica) y oligo-mesotrófico (Atexcac). Así también

de estrategias adaptativas particulares en cada lago que pueden resultar en cambios significativos dentro de la composición taxonómica de los sistemas acuáticos como respuesta al entorno cambiante en el que se encuentran (Drakare, 2002; Boucher *et al.*, 2006; Rubbin y Leff, 2007; Bertoni *et al.*, 2008; Hibbing *et al.*, 2010).

8.2.3 Dominio *Archaea* (ARCH)

El Dominio *Archaea* para el lago Atexcac presentó un porcentaje de abundancia relativa alto (6-20%) (Fig. 10), en comparación con el presentado para el lago de Alchichica (0.14-6%) realizado por medio de FISH, donde el patrón de abundancia fue similar al de Hernández-Avilés *et al.* (2010); este grupo tuvo una tendencia a un incremento considerable hacia el metalimnion e hipolimnion solo durante la estratificación bien establecida, lo que puede estar relacionado principalmente con las condiciones de baja concentración de oxígeno disuelto durante el periodo de estratificación bien establecida, lo que se corroboró con el análisis canónico donde se registró que este dominio se relaciona de manera negativa con el oxígeno disuelto, siendo además este gas una de las variables con mayor correlación en el ACCST del eje 1 (Fig. 11, Cuadro 7); lo que corresponde para este dominio con lo previamente reportado en el lago Maggiore y en otros lagos profundos estratificados, pues las abundancias relativas de *Archaea* aumentan con la profundidad y la disminución del oxígeno disuelto (Callieri *et al.*, 2009; Casamayor y Borrego, 2009; Bertoni *et al.*, 2010; Auguet *et al.*, 2012; Vissers *et al.*, 2013).

En la estratificación tardía, la mayor abundancia relativa se registró en el epilimnion y metalimnion, lo que concuerda con lo reportado para el lago Maggiore por Callieri *et al.* (2009), sugiriendo que este dominio contribuye de forma diferente en la actividad microbiana en los dos estratos; estos autores mencionan que este comportamiento es similar al encontrado en el océano pues es aquí donde diversos procesos aeróbicos pueden estarse llevando a cabo y se sabe que este grupo no está restringido a las áreas anaeróbicas como se creía anteriormente (Fig. 10). Asimismo, este dominio presentó una correlación positiva de Pearson con el pH y

el carbonato (Cuadro 5), parámetros químicos de alta relevancia en la dinámica general de los diferentes grupos del picoplancton procarionte.

8.2.4 Filo *Thaumarchaeota* (THAU)

El filo *Thaumarchaeota* en el lago de Atexcac se registró únicamente durante la estratificación bien establecida en todos los estratos de la columna de agua con variación vertical mínima (Fig. 10). A través de las correlaciones de Pearson se ubicó que este filo mantiene una correlación positiva con el nitrito, carbonato y pH (Cuadro 5), mientras que mostró una correlación negativa con el amonio (Fig. 6); de acuerdo con Pester *et al.* (2011) este grupo mantiene una preferencia por bajas concentraciones de esta forma reducida del nitrógeno, pues su intervalo óptimo de crecimiento es en concentraciones menores a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ y a pH mayor de 8.5 además de bajas concentraciones de oxígeno disuelto (Erguder *et al.*, 2009; Pester *et al.*, 2011); esto concuerda con lo observado en el lago de Atexcac (Cuadro 3), donde la presencia de este filo coincidió con la concentración más baja de amonio para las fases hidrodinámicas (Cuadro 5). La presencia de este grupo durante la estratificación bien establecida, correspondió para el mes de septiembre donde se presentó el fenómeno conocido como “evento de emblanquecimiento”, y durante el cual el carbonato y pH fueron los más altos durante todo el período de estudio, su presencia se puede asociar con su participación en el emblanquecimiento del lago, o bien que durante este episodio se encuentran condiciones óptimas para su desarrollo.

8.2.5 *Picocyanobacterias* (PCy)

La abundancia registrada para Pcy fue de 3.0×10^5 cél. mL^{-1} en la zona del metalimnion durante la estratificación temprana y de 2.0×10^5 cél. mL^{-1} para el epilimnion e hipolimnion en el lago Atexcac (Fig. 8 a y b), lo que coincide con lo reportado para ambientes oligotróficos, particularmente hacia el metalimnion (Kilham, 1981) como en el estudio llevado a cabo en el 2011 para el lago de Atexcac por Arellano-Posadas y González Flores (2011). Esta distribución de las Pcy en

Atexcac coincide también con lo reportado para el lago Alchichica (Peřtová *et al.*, 2008), donde se sabe que las Pcy responden rápidamente a cambios en la disponibilidad de nutrientes (Callieri *et al.*, 2012) (Fig. 6), así como a variaciones físicas, como las de la temperatura y la penetración de luz, siendo este último un factor muy importante para la distribución de las Pcy en el lago de Atexcac, donde regularmente se sitúan por debajo de la zona eufótica; este grupo tiene alta preferencia por situarse entre el 1 y 0.1% de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) (Callieri, 2010).

En la estratificación temprana y bien establecida las máximas abundancias y biomásas se registraron en el metalimnion, lo que coincide con lo reportado para otros lagos estratificados (Camacho *et al.*, 2003) y para este mismo lago en el 2011; (Arellano-Posadas y González-Flores, 2011) (Fig. 8 a y b). Craig (1987) y Malinsky-Rushansky *et al.* (1997) sugieren que las Pcy tienen una alta eficiencia fotosintética a bajas condiciones de radiación lumínica, además de que su tamaño pequeño no les permite crear compuestos que las protejan contra la radiación solar alta (Callieri *et al.*, 2012) (Fig. 4 y 8), encontrándose bien aclimatadas en el metalimnion, dado que en esta profundidad, prevalece la luz verde del espectro (Camacho y Vicente, 1998) y se conoce que las Pcy son capaces de aprovechar este tipo de luz, dándoles ventaja competitiva sobre otros grupos de fitoplancton (Drakare, 2002; Stomp *et al.*, 2007).

Durante la estratificación bien establecida se presentó un abrupto decaimiento de la abundancia y biomasa de las Pcy (Fig. 6 y 8 a,b), lo que puede estar relacionado con la limitación de los nutrimentos durante esta fase hidrodinámica tal como lo sugiere Weisse *et al.* (1990). Por medio de las correlaciones de Pearson se encontró una relación positiva con el oxígeno disuelto, al ser estas productores primarios capaces de ser activas a intensidades de luz bajas. De manera importante, las Pcy se encuentran dentro del mismo cuadrante en el análisis de correspondencia canónica donde se ubican los vectores para parámetros como bicarbonato, oxígeno, temperatura y nitratos. Todos estos están

asociados con la actividad fotosintética y las tasas metabólicas de las Pcy, así como con la nucleación de carbonato asociada con la utilización por este grupo de bicarbonato para la fotosíntesis cuando el bióxido de carbono es limitante (Zhu *et al.*, 2016).

8.2.6 Clase *Alphaproteobacteria* (ALF)

La detección de la clase *Alphaproteobacteria* por medio de la sonda ALF968 para el lago Atexcac solo registró baja abundancia relativa en la estratificación temprana y nula en el resto del periodo de estudio, lo que puede indicar una baja eficiencia de esta sonda, que puede estar en relación con el pequeño tamaño de las células de este grupo y el bajo contenido de ARNr, lo que no permitiría que la sonda tuviera suficiente material para hibridar al grupo objetivo. Esto se ve reflejado en el hecho de que al usar sondas específicas con grupos pertenecientes a esta clase como el género *Paracoccus* y el subclado LD12 se encontró una mayor abundancia relativa de estos.

8.2.7 Género *Paracoccus* (PAR)

El género *Paracoccus* es un microorganismo que crece favorablemente en temperaturas que van de 25 a 37 °C con un pH de 6.5 a 8.5 (Ludwig *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 2006); donde para el lago Atexcac la temperatura fluctuó entre 15.5°C a 22°C con un pH entre 8.5 a 9.1, siendo la primera poco favorable para este grupo en contraposición al pH que sería adecuado. Así, el pH tuvo una correlación positiva con la abundancia de este género (Cuadro 5). Con lo que se explica la mayor abundancia relativa de este grupo durante la estratificación bien establecida y tardía, donde los valores de pH y carbonato fueron los mayores para todo el periodo de estudio (Fig. 5).

En cuanto a la distribución espacial de la abundancia relativa de este género en el lago Atexcac, éste se registró hacia el epilimnion durante la estratificación bien establecida, lo que coincide con lo registrado en el lago Alchichica (Hernández-Avilés *et al.*, 2010), y hacia el hipolimnion en la estratificación tardía, dado que este

grupo tiene la posibilidad de encontrarse en condiciones aerobias o anaerobias y que su versatilidad metabólica puede responder a que este microorganismo participa en procesos de desnitrificación (Baker *et al.*, 1998). El patrón espacial general que registró *Paracoccus* en el lago de Atexcac se asemeja al que siguen las concentraciones de nitrato y nitrito durante las mismas etapas de la estratificación (Fig. 6)

8.2.8 Subclado: LD12: SAR11 IIIb (LD12)

El subclado LD12 forma una mayor proporción de la comunidad bacteriana en condiciones de baja productividad, caracterizadas por una elevada transparencia del agua y baja biomasa de fitoplancton, lo que corresponde con condiciones oligo-mesotróficas similares a las del lago de Atexcac. Se cree que el grupo LD12 probablemente se originó a partir de raros eventos de transición de las bacterias SAR11 marino a ambientes dulces (Logares *et al.*, 2010), pues sorprendentemente, estas transiciones han aparecido pocas veces y esto contribuyó a la aparición de linajes SAR11 genéticamente distintas. La razón para la transición de este grupo de ambiente salino a agua dulce actualmente no se conoce, pero se ha sugerido que la comunidad del bacterioplancton puede variar dramáticamente en escalas de tiempo muy cortas por medio de varios cambios adaptativos (Heinrich, 2015).

La presencia de bacterias metabólicamente activas de SAR11-IIIb en aguas oligohalinas-mesohalinas demuestra la capacidad de este grupo para adaptarse fácilmente a nuevas condiciones ambientales (Piwosz *et al.*, 2013). Esta aseveración es una pauta que demuestra que LD12 puede no estar sujeto completamente a ambientes de agua dulce, así en el lago de Atexcac con una salinidad de $6.0 \pm 0.84 \text{ g L}^{-1}$ registró la presencia de este grupo durante toda la fase de estratificación (Fig. 9 y 10), observando que tuvo una distribución preferencial hacia el metalimnion e hipolimnion durante la estratificación bien establecida y tardía, lo cual puede ocurrir con relación a que estos microorganismos tiene una alta preferencia por pH altos mayores a 8.5 (Newton *et al.*, 2011a). Esto se confirma con la correlación positiva encontrada entre este grupo con el pH del lago (Cuadro 6 y

Fig. 5); donde Stepanauskas *et al.* (2003) reportan que este grupo en los lagos se encuentra regulado por el pH. Por otro lado, la presencia de LD12 en el metalimnion e hipolimnion registradas en el lago, donde se encontraron las máximas concentraciones de amonio (Fig. 6), contradice que este grupo tenga preferencias por bajas concentraciones de amonio menores a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Newton *et al.*, 2011a; Hollibaugh *et al.*, 2014).

En la estratificación temprana, LD12 presentó una mayor abundancia en el epilimnion (Fig. 10) donde las concentraciones de amonio fueron las más bajas, siguiendo un patrón decreciente hacia el hipolimnion en donde las concentraciones de amonio fueron mayores (Fig. 6). Esta variación espacial registrada en el lago de Atexcac es similar a lo reportado por Heinrich *et al.* (2013) y Salcher *et al.* (2011b), en el que LD12 presenta máximos en el epilimnion, cuando existen bajas concentraciones de nutrientes pues estos microorganismos son altamente eficientes en la toma de nutrientes en estas condiciones, lo que puede relacionarse con que el grupo LD12 exhibe tamaños pequeños y bajas tasas de crecimiento (Rappé *et al.*, 2002), basadas en el consumo de sustratos simples (monómeros) (Alonso y Pernthaler, 2006).

8.2.9 Clase *Betaproteobacteria* (BET)

La clase *Betaproteobacteria* en el lago de Atexcac fue una de las más abundantes dentro del grupo de las *Proteobacteria* y puede ser comparada en términos de abundancia relativa con la de los ambientes de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002); esta clase fue la dominante durante los meses de muestreo (8-23%; Fig. 10) coincidiendo con el patrón de dominancia de este grupo registrado para el lago Alchichica (Hernández-Avilés *et al.*, 2010).

La distribución de esta clase se observó correlacionada positivamente con el pH y el carbonato (Fig. 5). La relación con el pH también se corroboró con el análisis de correspondencia canónica (Fig. 11), donde las mayores abundancias relativas de este grupo se presentaron donde el valor de pH y la concentración de carbonato

fueron mayores durante toda la estratificación, presentando una clara tendencia a aumentar en abundancia relativa hacia el hipolimnion durante la estratificación bien establecida y tardía, pues es aquí donde esta clase junto con las *Gammaproteobacteria* llevan a cabo los procesos de oxidación de amoníaco (Callieri *et al.*, 2015), pues se sabe que *Betaproteobacteria* tiene rápido crecimiento como respuesta a los aumentos en la concentración de nutrientes orgánicos e inorgánicos, así como del pH y del amonio, por lo que se les suele considerar como organismos oportunistas y se les confiere que son la fracción del picoplancton procarionte más activa y versátil (Pérez y Sommaruga, 2006; Šimek *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2011b; Salcher *et al.*, 2011b), donde la presencia de este grupo podría indicar que estas pueden estar sujetas a los cambios en el sistema de amortiguamiento del lago, así como al fenómeno de emblanquecimiento que sucede durante la estratificación bien establecida.

8.2.10 Clase *Gammaproteobacteria* (GAM)

La clase *Gammaproteobacteria* en el lago de Atexcac presentó sus máximas abundancias relativas en la mezcla, estratificación temprana y tardía (Fig. 9), donde se registraron las mayores concentraciones de nutrientes (Cuadro 4 y Fig. 6). Se sabe que esta clase se desarrolla en condiciones de alta concentración de nutrientes (Newton *et al.*, 2011b); donde en particular, durante la mezcla y la estratificación temprana en el lago de Atexcac estas concentraciones de nutrientes fueron altas lo que favoreció florecimientos fitoplanctónicos, mayor productividad primaria y mayor abundancia del picoplancton procarionte; mientras que las bajas concentraciones de nutrientes en la estratificación bien establecida, se debieron a su consumo y agotamiento en el epilimnion o se acumularon hacia el metalimnion donde las diferencias de densidad fueron más marcadas (Fig.10).

La clase *Gammaproteobacteria* tuvo una alta preferencia por ubicarse hacia el metalimnion e hipolimnion durante la estratificación bien establecida y tardía, donde las temperaturas del agua fluctuaron entre 19 y 17 °C. De acuerdo con Lefort y Gasol (2013) esta clase tiene una alta preferencia por ambientes con temperaturas

más cálidas por arriba de los 20°C. Sin embargo, se sabe que estas crecen en un rango de los 15-37 °C (Newton *et al.*, 2011a). Este grupo solo presentó una correlación positiva con el FSR, que también se denotó con el análisis de correspondencia canónica (Cuadro 5 y Fig. 11), donde ésta fue más alta durante la estratificación tardía (Cuadro 3) observando el máximo de abundancia relativa del grupo para todo el estudio. Por otro lado, este también presentó correlación negativa con bicarbonato, pues también se observa que este grupo solo parece aumentar su abundancia relativa cuando el bicarbonato es menor durante todo el periodo de estudio (Fig. 5).

En la estratificación tardía y comienzo de la mezcla las Gammaproteobacterias podrían volver a tener una mayor abundancia debido a la redistribución de los nutrientes, pues el epilimnion aumenta en amplitud al profundizarse y disminuir en amplitud la termoclina, dando a lugar a la conclusión de la estratificación, favoreciendo nuevamente a una mayor disponibilidad de nutrientes procedentes de la oxidación de la materia orgánica de los estratos profundos hacia la superficie (Cuadro 4 y Fig. 6 y 10). Sin embargo, las altas abundancias relativas de la clase Gammaproteobacteria durante la estratificación bien establecida y tardía pueden ser producto de que algunas especies integrantes de este grupo tienen estilos de vida competitivos y crecen significativamente más rápido que el promedio del bacterioplancton de los lagos, además de que exhibe tasas altas de desarrollo cuando hay nitrógeno y fósforo (Gasol *et al.*, 2002; Šimek *et al.*, 2006; Newton y McMahon, 2011).

8.2.11 Clase *Deltaproteobacteria* (BSR)

Las *Deltaproteobacteria* en el lago de Atexcac se presentaron durante todo el periodo de estratificación con un incremento gradual desde el inicio de éste hasta el final. La distribución de esta clase en mayor proporción hacia la estratificación bien establecida y tardía puede estar en función de la relación directa encontrada con el pH y el carbonato (Fig. 5), pues se ha reportado que esta clase tiene una alta

preferencia hacia ambientes con variación del pH (Newton *et al.*, 2011a) como el registrado en Atexcac (Cuadro. 3 y Fig.5).

Por otro lado, las máximas abundancias relativas se ubicaron en el epilimnion e hipolimnion (Figs. 9 y 10), presentándose las mínimas abundancias en la estratificación temprana en el metalimnion (Fig. 10). La presencia de este grupo a lo largo de la columna de agua coincide con que este grupo no está restringido únicamente a las zonas sin oxígeno (Atlas y Bartha, 2002), dado que las mayores abundancias relativas fueron encontradas en el epilimnion donde la concentración de oxígeno estuvo por arriba de los 5 mg L⁻¹(Fig. 3b), y donde se ha reportado que pueden llevar a cabo la oxidación de varios substratos orgánicos teniendo al oxígeno como aceptor de electrones (Braissant *et al.*, 2003; Karnachuk *et al.*, 2006; Baumgartner *et al.*, 2006).

Las *Deltaproteobacteria* (BSR) del lago de Atexcac también estuvieron correlacionadas de manera positiva con la temperatura y el oxígeno (Cuadro 5), dado que su abundancia relativa decrecía conforme la temperatura y el oxígeno disuelto fueron disminuyendo conforme aumentaba la profundidad (Figs. 3a, b y 10), comportamiento contrario al esperado con la concentración de oxígeno disuelto donde se presumiría una relación inversa. Sin embargo, la distribución de este grupo dentro del epilimnion y metalimnion también coincide con lo reportado para el lago meromítico Gek-Gel por Karnachuk *et al* (2006) y lo registrado por Hernández-Avilés *et al* (2010) para el lago de Alchichica por medio de FISH. Asimismo, el patrón de la presencia de las BSR a lo largo de la columna de agua durante la estratificación es equivalente a lo reportado por Escobar y Torres (2016) para el lago Atexcac empleando un kit que detecta a este grupo por medio de una enzima específica (APS: adenosina-5'-fosfosulfonato reductasa).

8.2.12 Filo *Actinobacteria* (ACT)

En el lago de Atexcac el filo *Actinobacteria* se registró en la estratificación teniendo los máximos de abundancia relativa al final de ésta, mientras que durante la estratificación bien establecida se registraron los valores más bajos de abundancia relativa donde este grupo demostró solo tener una correlación positiva con el sulfato (Cuadro 5) (Fig. 6 y Fig. 10).

Los máximos de abundancia relativa fueron registrados hacia el epilimnion durante toda la estratificación, donde *Actinobacteria* estuvo particularmente asociada con la zona eufótica y corresponde con lo observado en otros sistemas, pues se conoce que estos organismos de tamaño pequeño (ultramicrobacterias) aprovechan la luz por medio de un pigmento (rodopsina), que es importante para la generación de la energía de estos microorganismos y les confiere una ventaja para evitar la depredación y la radiación UV (Pernthaler *et al.*, 2001; Warnecke *et al.*, 2005; Ventura *et al.*, 2007).; además de que este filo posee también un alto contenido de guanina y citosina que favorecen su metabolismo (Sharma *et al.*, 2009; Ghai *et al.*, 2013; García *et al.*, 2013; Wurzbacher *et al.*, 2012).

8.2.13 Filo *Planctomycetes* (PLA)

El filo *Planctomycetes* fue registrado por medio de la sonda PLA886. En el periodo de mezcla fue uno de los tres grupos más abundantes del picoplancton procarionte, este grupo tuvo un descenso y un posterior aumento en abundancia relativa desde el principio hasta el final de la estratificación (Fig. 9), registrando una correlación positiva con el pH y el carbonato, siendo que las abundancias relativas de este filo aumentaron conforme se incrementó el pH y las concentraciones de carbonato durante la estratificación bien establecida y tardía (Cuadro 4 y Fig. 5). A pesar de que no se encontró una correlación estadística de este grupo con el amonio cabe resaltar que dicha forma del nitrógeno es la más abundante en el lago a través del tiempo y su distribución al parecer sí está asociada con el patrón espacio-temporal que presentaron las concentraciones de esta forma reducida del nitrógeno (Figs. 6 y 10), de donde se deduce que este grupo puede estar llevando a cabo el proceso

de anammox hacia el fondo del lago, como también lo ha sugerido Hernández-Avilés *et al* (2010) para el lago Alchichica.

8.2.14 Filo *Bacteroidetes* (BACT)

Este filo en el lago de Atexcac registró una mayor abundancia relativa al final de la estratificación y durante la subsecuente mezcla. Durante el período de mezcla este filo puede estar degradando un amplio espectro de sustratos (Bernardet *et al.*, 1996; Tortora *et al.*, 2010), mientras que durante la estratificación se observa un aumento progresivo de este grupo (Fig. 9) principalmente hacia el hipolimnion (Fig. 10); asociado con la reducción del oxígeno disuelto y de las formas oxidadas del nitrógeno (Fig. 6), para los cuales se encontró una correlación negativa (Cuadro 6 y Fig. 11), y se infiere que este filo pueda estar participando en el proceso de desnitrificación como ha sido reportado por Bernardet *et al.* (1996) y Tortora *et al.* (2010). *Bacteroidetes* en los lagos se encuentran a menudo en mayores abundancias durante períodos siguientes a florecimientos de cianobacterias (Díez-Vives *et al.*, 2014) como puede ser el caso en el lago Atexcac pues este grupo tuvo sus máximas abundancias relativas después del florecimiento y decaimiento de *Nodularia*.

9. CONCLUSIONES

- La alta variabilidad de los grupos que componen al dominio *Bacteria* y *Archaea* durante la estratificación térmica a lo largo de la columna de agua, estaba relacionada con la dinámica de monomixis cálida, que define gradientes físicos y químicos
- El filo *Thaumarchaeota* perteneciente al dominio *Archaea* solo se registró durante la estratificación bien establecida durante el evento de emblanquecimiento por lo que se puede hipotetizar que este grupo participa en este proceso.
- *Thaumarchaeota* al igual que la mayoría de los grupos del dominio *Bacteria* estuvieron principalmente correlacionados con el pH y el carbonato, lo que indica que su dinámica se asocia con el sistema de amortiguamiento de carbono del lago.
- El género *Paracoccus* y el subclado *LD12* pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* registraron abundancias relativas altas. Mientras el género *Paracoccus* se presentó durante todo el periodo de estudio el grupo *LD12* solo se registró durante la estratificación.
- Los grupos dominantes durante todo el estudio fueron las *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, ambas clases respondieron a la concentración de nutrientes, principalmente a la de amonio. Así como también con el sistema de amortiguamiento de carbono asociado con el pH.
- La abundancia relativa del filo *Planctomycetes* estuvo en respuesta de las concentraciones de bicarbonato y carbonato, teniendo una mayor abundancia cuando el carbonato era mayor que el bicarbonato.

- El filo *Bacteroidetes* además de ser parte de los grupos más importantes dentro del estudio, su distribución y abundancia estuvo relacionado con la disminución del oxígeno disuelto, así como con las formas oxidadas del nitrógeno.

- La clase *Deltaproteobacteria* (BSR) presentó asociación directa con la temperatura y el oxígeno disuelto, tuvo una amplia distribución a través de la columna de agua y su presencia no se encontró restringida a las zonas de bajo concentración de oxígeno, ni de mayor disponibilidad del sulfato como era de esperarse.

- *Deltaproteobacteria* (Bacterias Sulfato Reductoras: BSR), *Actinobacteria* y *LD12* solo se registraron en la estratificación, presentando mayor abundancia durante las fases bien establecida y tardía cuando las concentraciones de bicarbonato y amonio fueron bajas y los pH altos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe DS, Matsamura-Tundisi T, Rocha O, Tundisi JG (2003) Denitrification and bacterial community structure in the cascade of six reservoirs on a tropical river in Brazil. *Hydrobiologia* 504: 67-76.
2. Adame MF, Alcocer J, Escobar E (2008) Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology* 53: 22-31.
3. Alcocer J, Lugo A, Escobar E, Sánchez MR, Vilaclara G (2000) Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Verhandlungen der Internationalen. Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 27: 3166-3169.
4. Alonso C, Pernthaler J (2006) *Roseobacter* and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology* 8: 2022-2030.
5. Álvarez J (1950) Contribución al conocimiento de los peces de la región de los Llanos, estado de Puebla (México). *Anales de la Escuela nacional de Ciencias biológicas México* 6: 81-107.
6. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 1919-1925.
7. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
8. Amann RI, Fuchs BM, Behrens S (2001) The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 231-236.

9. APHA-AWWA, WEF (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
10. Aravalli RN, She Q, Garrett RA (1998) Archaea and the new age of microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution* 13: 190-194.
11. Armienta MA, Vilaclara G, De la Cruz-Reyna S, Ramos S, Ceniceros N, Cruz O, Aguayo A, Arceaga-Cabrera F (2008) Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Vulcanology and Geothermal Research* 178: 249-258.
12. Arredondo-Figueroa JL, Borrego-Enríquez LE, Castillo-Domínguez RM, Valladolid-Laredo MA (1983) Batimetría y morfometría de los lagos "Maars" de la cuenca Oriental, Puebla, México. *Biótica* 8: 3-47.
13. Arrellano-Posadas JA y González-Flores E (2011) Dinámica espacio-temporal del picoplancton procarionte y su relación con la variabilidad limnológica del lago volcánico Atexcac, Puebla. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
14. Atlas RM, Bartha R (2002) "Ecología fisiológica de los microorganismos: adaptaciones a las condiciones ambientales" en *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación. España. pp. 345-360.
15. Auguet JC, Triado-Margarit X, Nomokonova N, Camarero L, Casamayor EO (2012) Vertical segregation and phylogenetic characterization of ammonia-oxidizing Archaea in a deep oligotrophic lake. *ISME Journal* 6(9): 1786-1797.
16. Bahr M, Hobbie J, Sogin M (1996) Bacterial diversity in an arctic lake: a freshwater SAR 11cluster. *Aquatic Microbial Ecology* 11: 271-277.
17. Baker SC, Ferguson SJ, Ludwig B, Page MD, Richter OMH, Van Spanning RJM (1998) Molecular Genetics of the Genus *Paracoccus*: Metabolically Versatile Bacteria with Bioenergetic Flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(4): 1046-1078.

18. Baumgartner LK, Reid RP, Dupraz C, Decho AW, Buckley DH, Spear JR, Przekop KM, Visscher PT (2006) Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology* 185: 131-145.
19. Bautista-Reyes F y Macek M (2012) Ciliate food vacuole content and bacterial community composition in the warm-monomictic crater Lake Alchichica, México. *FEMS Microbiology Ecology* 79: 85-97.
20. Bernardet JFP, Segers M, Vancanneyt, Berthe F, Kerster K, Vandamme P (1996) Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga quatalis* Stohtl and Taitl 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 128-148.
21. Bertoni R, Callieri C, Balseiro E, Modenutti B (2008) Susceptibility of bacterioplankton to nutrient enrichment of oligotrophic and ultraoligotrophic lake waters. *Journal of Limnology* 67: 120-127.
22. Biers EJ, Sun SL, Howard EC (2009) Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: interrogating the global ocean sampling metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2221-2229.
23. Boucher D, Jardillier L, Debroas D (2006) Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* 55: 79-97.
24. Braissant O, Cailleau G, Dupraz C, Verrecchia EP (2003) Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: the role of xopolysaccharides and amino acids. *Journal of Sediment Research* 73, 485–490.
25. Brochier C, Philippe H (2002) Phylogeny- a non hyperthermophilic ancestor for bacteria. *Nature* 417: 244

26. Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6: 245-252.
27. Callieri C, Corno G, Caravati E, Rasconi S, Contesini M, Bertoni R (2009) Bacteria, Archaea, and Crenarchaeota in the Epilimnion and Hypolimnion of a Holo-Oligomictic Lake. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7298-7300.
28. Callieri C (2010) Single cells and microcolonies of freshwater picocyanobacteria: a common ecology. *Journal of Limnology* 69: 257-277.
29. Callieri C, Cronberg G, Stockner JG (2012) "Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms" in *Ecology of Cyanobacteria II*, Whitton BA (Ed). Springer Business Media, pp. 229-269.
30. Callieri C, Coci M, Eckert EM, Salcher M, Bertoni R (2014). Archaea and Bacteria in deep lake hypolimnion: in situ dark inorganic carbon uptake. *Journal of Limnology* 73: 47-54.
31. Callieri C, Hernández-Avilés S, Salcher MM, Fontaneto D, Bertoni R (2015) Distribution patterns and environmental correlates of Thaumarchaeota abundance in six deep subalpine lakes. *Aquatic Sciences* 78:215-225.
32. Camacho A, Vicente E (1998) Carbon photoassimilation by sharply stratified phototrophic communities at the chemocline of lake Arcas (Spain). *Microbial Ecology* 25: 11-22.
33. Camacho A, Miracle RM, Vicente E (2003) Which factors determine the abundance and distribution of picocyanobacteria in inland waters? A comparison among different types of lakes and ponds. *Archiv für Hydrobiologie* 157: 321-338.
34. Carrasco-Núñez G, Ort HM, Romero C (2006) Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern México). *Journal of Vulcanology and Geothermal Research* 159: 179-197.

35. Casamayor EO, Borrego CM (2009) Archaea, in Encyclopedia of Inland Waters, Likens GE, (Ed), Elsevier, Oxford, pp. 167–181.
36. Coci M, Odermatt N, Salcher M, Pernthaler J, Corno G (2015) Ecology and distribution of Thaumarchaea in the deep hypolimnion of Lake Maggiore, Archaea, ID 590434 Hindawi Publishing Corporation, pp. 1-11.
37. Cole GA, Weihe PE (2015) “Light and the Aquatic Ecosystem” In: Textbook of limnology, Cole GA, Weihe PE (eds) Waveland press, 440 p.
38. Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology 66: 5116-5122.
39. Craig SR (1987) The distribution and contribution of picoplankton to deep photosynthetic layers in some meromictic lakes. Acta Academiae Aboensis 47: 55-81.
40. Daims H, Brühl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M (1999) The domain specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. Systematic and Applied Microbiology 22: 434-444.
41. De-Wever A, Muylaer K, Van der Gucht K, Pirlot S, Cocquyt C, Descy JP, Plisnier PD, Vyverman W (2005) Bacterial community composition in Lake Tanganyika: vertical and horizontal heterogeneity. Applied and Environmental Microbiology 71: 5029-5037.
42. Demergasso, C, Casamayor, EO, Chong, G, Galleguillos, P, Escudero, L, Pedrós-Alió, C (2004) Distribution of prokaryotic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, Northern Chile. FEMS Microbiology Ecology 48: 57-69.
43. Díez-Vives C, Gasol MJ, Acinas SG (2014) Spatial and temporal variability among marine Bacteroidetes populations in the NW Mediterranean Sea. Systematic and Applied Microbiology 37: 68-78.

44. Donner G, Schwartz K, Hoppe HG, Muyzer G (1996) Profiling the succession of bacterial populations in pelagic chemoclines. *Archive of Hydrobiology Specs Issue Advance Limnology* 48: 7–14.
45. Drakare S (2002) Competition between picoplanktonic cyanobacteria and heterotrophic bacteria along crossed gradients of glucose and phosphate. *Microbial Ecology* 44: 327-335.
46. Dubey G, Kollah B, Ahirwar U, Tiwari S, Mohanty SR (2015) Significance of Archaea in terrestrial biogeochemical cycles and global climate change. *African Journal of Microbiology Research* 9(4): 201-208.
47. Ducklow HW (2000) Bacterial production and biomass in the oceans. DL. Kirchman (ed.), In *Microbial Ecology of the Ocean* 1st edn. Wiley-Liss, pp. 85–120.
48. Eckert W, Imberger J, Saggio A (2002) Biogeochemical response to physical forcing in the water column of a warm monomictic lake. *Biogeochemistry* 61: 291-307.
49. Eiler A, Langenheder S, Bertilsson S, Tranvik LJ (2003) Heterotrophic Bacterial Growth Efficiency and Community Structure at Different Natural Organic Carbon Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3701-3709.
50. Eilers H, Pernthaler J, Peplies J, Glöckner FO, Gerds G, Amann R (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5134-5142.
51. Erguder TH, Boon N, Wittebolle L, Marzorati M, Verstraete W (2009) Environmental factors shaping the ecological niches of ammonia-oxidizing Archaea. *FEMS Microbiology Review* 33: 855-869.
52. Escalante AE, Eguiarte LE, Asuar EL, Forney LJ, Noguez MA, Saldivar SV (2008) Diversity of aquatic prokaryotic communities in the Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 50-60.

53. Fröstl JM, Overmann J (2000) Phylogenetic affiliation of the bacteria that constitute phototrophic consortia. *Archives of Microbiology* 174: 50-58.
54. García ME (2004) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Quinta edición Ed. García ME. México. pp. 91.
55. García SI, McMahon KD, Martinez-Garcia M, Srivastava A, Sczyrba A, Stepanauskas R, Grossart HP, Woyke T, Warnecke F (2013) Metabolic potential of a single cell belonging to one of the most abundant lineages in freshwater bacterioplankton. *ISME Journal* 7: 137-147.
56. Gasol JM, Comerma M, García JC, Armengol J, Casamayor EO, Kojecká P, Šimek K (2002) A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnology and Oceanography* 47: 62–77.
57. Ghai R, Mizuno CM, Picazo A, Camacho A, Rodriguez-Valera F (2013) Metagenomics uncovers a new group of low GC and ultra-small marine Actinobacteria. *Scientific Reports* 3: 1-8.
58. Glöckner FO, Zaichikov E, Bel'kova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11): 5053-5065.
59. Google Earth (2016) NASA Digital Globe INEGI, Imagen Aérea del Lago de Atexcac con una altura de ojo 3.37 km
60. Grant W (2006) Alkaline environments and biodiversity in extremophiles (Life Under Extreme Environmental Condition). Gerday C, Glansdorff N (Eds). in *Encyclopedia of Life Support Systems*. Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [<http://www.eolss.net>].

61. Greuter D, Loy A, Maixner F, Wagner M, Horn M (2016) probeBase-an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2016. *Nucleic Acids Reserchs.* pp. 1-4.
62. Gupta SR (2000) The phylogeny of Proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 367-402.
63. Hagström A, Pommier T, Rohwer F, Simu K, Stolte W, Svensson D, Zweifel UL (2002) Use of 16s ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3628-3633.
64. Hawes I (1990) "Eutrophication and Vegetation Development in Maritime Antarctic Lakes" In *Antarctic Ecosystems, Ecological Change and Conservation*, Kerry KR, Hempel G (Eds). Springer Berlin Heidelberg. pp. 83–90.
65. Heinrich F, Eiler A, Bertilsson S (2013) Seasonality and environmental control of freshwater SAR11 (LD12) in a temperate lake (Lake Erken, Sweden). *Aquatic Microbial Ecology* 70: 33-44.
66. Heinrich F (2015) Drivers of population dynamics in bacterioplankton spotlight on alphaproteobacteria and its dominant SAR11 lineage. *Acta Universitatis Upsaliensis (PhD Thesis)* Uppsala University, Sweden. pp. 40.
67. Herlemann DPR, Woelk J, Labrenz M, Jürgens K (2014) Diversity and abundance of "Pelagibacterales" (SAR11) in the Baltic Sea salinity gradient. *Systematic and Applied Microbiology* 37: 601-604.
68. Hernández-Avilés JS, Macek M, Alcocer J, López–Trejo B, Merino-Ibarra M (2010) Prokaryotic picoplankton dynamics in a warm-monomictic saline lake: temporal and spatial variation in structure and composition. *Journal of Plankton Research* 32: 1301-1314.
69. Hernández-Avilés JS, Bertoni R, Macek M, Callieri C (2012) Why bacteria are smaller in the epilimnion than in the hypolimnion? A hypothesis comparing temperate and tropical lakes. *Journal of Limnology* 71(1): 104-111

70. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MC, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Review Microbiology* 8: 15–25.
71. Hobbie JD, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 22: 1225-1228.
72. Hollibaugh JT, Gifford SM, Moran MA, Ross MJ, Sharma S, Tolar BB (2014) Seasonal variation in the metatranscriptomes of a Thaumarchaeota population from SE USA coastal waters. *ISME Journal* 8: 685-698.
73. Horner-Devine M, Lage M, Hughes JB, Bohannon BJM (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* 432: 750-753.
74. Hoshino T, Yilmaz LS, Noguera DR, Daims H, Wagner M (2008) Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5068–5077.
75. Hughes JBM, Bohannon BJM, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL, Horner-Devine MC, Kane M, Krumins JA, Kuske CR, Morin PJ, Naaem S, Ovreas L, Reysenbach AL, Smith VH, Staley JT (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4: 102-112.
76. Jetten MS, Sliemers O, Kuypers M, Dalsgaard T, van Niftrik L, Cirpus I, van de PasSchoonen K, Lavik G, Thamdrup B, Le Paslier D, Op den Camp HJ, Hulth S, Nielsen LP, Abma W, Third K, Engström P, Kuenen JG, Jørgensen BB, Canfield DE, Sinninghe Damste JS, Revsbech NP, Fuerst J, Weissenbach J, Wagner M, Schmidt I, Schmid MC, Strous M (2003) Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 107-114.
77. Jones BE, Grant WD, Duckworth AW, Owenson GG (1998) Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2: 191-200.

78. Josephson KC, Gerba CP., Pepper IL (2009) Cultural methods. In: Raina MM, Ian LP, Charles PG, (Eds.) Environmental Microbiology. San Diego California: Elsevier Academic Press. pp. 213-217
79. Karnachuk OV, Pimenov NV, Yusupov SK, Frank YA, Puhakka YA, Ivanov MV (2006) Distribution, diversity, and activity of sulfate-reducing bacteria in the water column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan. Microbiology 75(1): 82- 89.
80. Kelly PD, Rainey FA, Wood AP (2006) "The Genus *Paracoccus*" In: The Prokaryotes: a handbook on the biology of Bacteria: Proteobacteria: Alpha and Beta subclasses, Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stascebrandt E (Eds). Springer USA, Third edition pp. 232-249.
81. Kilham P (1981) Pelagic bacteria: Extreme abundances in African saline lakes. Naturwissenschaften, 68: 380-381.
82. Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT (2005) Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. Limnology and Oceanography 50: 1697-1706.
83. Komárek J, Komárková-Legnerová J (2002) Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central México. Preslia Praha 74: 207-233.
84. La Cono V, La Spada G, Arcadi E, Placenti F, Smedile F, Ruggeri G, Michaud L, Raffa C, De Domenico E, Sprovieri M, Mazzola S, Genovese L, Giuliano L, Slepak VZ, Yakimov MM (2013) Partaking of Archaea to biogeochemical cycling in oxygen-deficient zones of meromictic saline Lake Faro (Messina, Italy). Environmental Microbiology 15: 1717-1733.
85. Lagunas MYS, Martínez JTD (2015) Estructura de la comunidad del plancton procarionte en el lago volcánico, hiposalino y monomíctico cálido Atexcac, Puebla. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

86. Lefort T, Gasol JM (2013) Global-scale distributions of marine surface bacterioplankton groups along gradients of salinity, temperature, and chlorophyll: a meta-analysis of fluorescence in situ hybridization studies. *Aquatic Microbial Ecology* 70: 111-130.
87. Lemarchand C, Jardillier L, Carrias JF, Richardot M, Debroas M, Sime-Ngando T, Amblard C (2006) Community composition and activity of prokaryotes associated to detrital particles in two contrasting lake ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 442-451.
88. Lewis WM (1983) A revised classification of lakes based on mixing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40: 1779-1787.
89. Lindeman RL (1942) The Trophic-Dynamic Aspect of Ecology. *Ecology*, 23(4) 399-417
90. Logares R, Brate J, Heinrich F, Shalchian-Tabrizi K, Bertilsson S (2010) Infrequent transitions between saline and fresh waters in one of the most abundant microbial lineages (SAR11). *Molecular Biology and Evolution* 27: 347-357.
91. Ludwig W, Neumaier J, Klugbauer N, Brockmann E, Roller C, Jilg S, Reetz K, Schachtner I, Ludvigsen A, Bachleitner, Fischer U, Schleifer KH (1993) Phylogenetic relationships of Bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase, -subunit genes. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 285-305.
92. Macek M, Vilaclara G, Lugo A (1994) Changes in protozoan assemblage structure and activity in a stratified tropical lake. *Marine Microbial Food Webs* 8: 235-249.
93. Macek M, Lugo A, Vilaclara G (2000) Pelagic ciliates assemblage of high altitude lake Atexcac (Puebla, México) In: *Aquatic ecosystems of Mexico: Status and scope*, Munawar M, Lawrence SG, Munawar IF, Malley DF (Eds). *Ecovision World Monograph Series*. Backhuys Publishers b. v., Netherlands, pp. 45-59.

94. Macek M, Vilaclara FG, Lugo VA, Alcocer DJ (2007) "Lago de Atexcac", en: De la Lanza Espino G, Hernandez-Pulido H (Eds). Las aguas interiores de México: conceptos y casos. Editorial. AGT Editor S. A., México, pp. 201-212.
95. Malinsky-Rushansky NZ, Berman T, Dubinsky Z (1997) Seasonal photosynthetic activity of autotrophic picoplankton in lake Kinneret, Israel. *Journal of Plankton Research* 19: 979- 993.
96. Margalef R (1983) *Limnología*. Omega, Barcelona. pp. 1010.
97. Massana R y Logares R (2013) Eukaryotic versus prokaryotic marine picoplankton ecology. *Environmental Microbiology* 15 (5): 1254-1261.
98. Matthew, TC, Kirchman, DL (2000) Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5116-5122.
99. Morita RY (1997) *Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyle*. Microbiology Series, Chapman & Hall, New York, N.Y. pp. 529.
100. Moter A, Gobel UB (2000) Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41: 85–112.
101. Mullins TD, Britschgi TB, Krest RL, Giovannoni SJ (1995) Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnology and Oceanography* 40: 48–158.
102. Mulholland MR, Gobler CJ, Lee C (2002) Peptide hydrolysis, amino acid oxidation, and nitrogen uptake in communities seasonally dominated by *Aureococcus anophagefferens*. *Limnology and Oceanography* 47: 1094–1108.
103. Neef A (1997) Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. (PhD Thesis) Technische Universität München.

104. Neef A, Amann R, Schlesner H, Schleifer KH (1998) Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144: 3257-3266.
105. Neef A, Zaglauer A, Meier H, Amann R, Lemmer H, Schleifer KH (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4329-4339.
106. Newton RJ, Stuart EJ, Matthew RH, McMahon KD (2007) Phylogenetic ecology of the freshwater Actinobacteria acI Lineage. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7169-7176.
107. Newton RJ y McMahon KD (2011a) Seasonal differences in bacterial community composition following nutrient additions in a eutrophic lake. *Environmental Microbiology* 13: 887-899.
108. Newton RJ, Jones ES, Elier A, McMahon KD, Bertilsson S (2011b) A guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology* 75 :14-49.
109. Oliva MG, Lugo A, Alcocer J, Peralta L, Sanchez Ma del R (2001) Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia* 466: 299-306.
110. Oliva MG, Lugo A, Alcocer J, Peralta L, Oseguera LA (2009) Phytoplankton bloom-forming *Nodularia* in the saline Lake Alchichica, México. *Natural Resources and Environmental Issues* 15 (22):121-126.
111. Papke RT, Ramsing NB, Bateson MM, Ward DM (2003) Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology* 5: 650-659
112. Papke RT y Ward DM (2004) The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 293-303.
113. Pedrós-Alió C (1993) Diversity of bacterioplankton, *Trends in Ecology and Evolution* 8: 86–90.

114. Pérez MT y Sommaruga R (2006) Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnology and Oceanography* 51: 2527-2537.
115. Pernthaler J, Glöckner FO, Schönhuber W, Amann R (2001) Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology* 30: 207-226.
116. Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition (CARD) for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3094–3101.
117. Pester M, Christa S, Wagner M (2011) The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology* 14: 300-306.
118. Peštová D, Macek M, Martínez-Pérez ME (2008) Ciliates and their picophytoplankton feeding activity in a high-altitude warm-monomictic saline lake. *European Journal of Protistology* 44: 13-25.
119. Piwosz K, Salcher MM, Zeder M, ameryk a, Pernthaler J (2013) Seasonal dynamics and activity of typical freshwater bacteria in brackish waters of the Gulf of Gdansk. *Limnology and Oceanography* 58: 817-826.
120. Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948.
121. Posch T, Krößbacher LM, Gao G, Alfreider A, Pernthaler J, Psenner R (2001) Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to carbon conversion factors. *Aquatic Microbial Ecology* 25: 55-63.
122. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos (2009) Clave geoestadística 21067, Guadalupe Victoria, Puebla, INEGI.

123. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Reserchs* 41: 590-596.
124. Ramírez-García P, Novelo RA (1984) La vegetación acuática vascular de seis lagos-cráter del estado de Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 46: 75–88.
125. Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni S J (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418: 630–633.
126. Reyes CM, (1979) Geología de la Cuenca Oriental. Estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. Colección científica Prehistoria. *Anales del Instituto Nacional de Antropología e Historia de México*. pp. 50.
127. Roller C, Wagner M, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH (1994) In situ probing of Gram positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140: 2849-2858.
128. Rubbin MA, Leff LG (2007) Nutrients and other abiotic factors affecting bacterial communities in an Ohio River (USA). *Microbial Ecology* 53: 374-383.
129. Rzedowski J (1981) La vegetación de México. Limusa, México DF. pp. 342.
130. Salcher MM (2005) Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquatic Microbial Ecology* 38: 215-229.
131. Salcher MM, Pernthaler J, Frater N, Posch T (2011a) Vertical and longitudinal distribution patterns of different bacterioplankton populations in a canyon-shaped, deep prealpine lake. *Limnology and Oceanography* 56 (6): 2027-2039.
132. Salcher MM, Pernthaler J, Posch T (2011b) Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria ‘that rule the waves’ (LD12). *ISME Journal* 5: 1242–1252.

133. Schattenhofer M, Fuchs BM, Amann R, Zubkov MV, Tarran GA, Pernthaler J (2009) Latitudinal distribution of prokaryotic picoplankton populations in the Atlantic Ocean. *Environmental Microbiology* 8: 2073-2093.
134. Schauer MV, Balague C, Pedrós-Alió, Massana R (2003) Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquatic Microbial Ecology* 31: 163–174.
135. Sharma AK, Sommerfeld K, Bullerjahn GS, Matteson AR, Wilhelm SW, Jezbera J, Brandt U, Doolittle WF, Hahn MW (2009) Actinorhodopsin genes discovered in diverse freshwater habitats and among cultivated freshwater Actinobacteria. *ISME Journal* 3: 726-737.
136. Schut F, Princess RA, Gottschall JC (1997) Oligotrophic and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquatic Microbial Ecology* 12: 177-202.
137. Šimek K, Horňák K, Jezbera J, Nedoma J, Vrba J, Straškrábová V, Macek M, Dolan JR, Hahn MW (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environmental Microbiology* 8: 1613-1624.
138. Stepanauskas R, Moran MA, Bergamaschi BA, Hollibaugh JT (2003) Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquatic Microbial Ecology* 31: 85-98.
139. Stocker R (2012) Marine microbes see a sea of gradients. *Science* 338: 628-633.
140. Stockner J, Callieri C, Cronberg G (2000) "Picoplankton and other non-bloom-forming Cyanobacteria in lakes" In *The Ecology of Cyanobacteria*. Whitton, BA, Potts, M (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 195-231.
141. Stomp M, Huisman J, Vörös L, Pick FR, Laamanen M, Haverkamp T, Stal LJ (2007) Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecology Letters* 10: 290-298

142. Teira E, Reinthaler T, Pernthaler A, Pernthaler J, Herndl GJ (2004) Combining catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by Bacteria and Archaea in the deep ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4411-4414.
143. Ter Braak CJF (1986) Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 5: 1167-1179.
144. Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, Øvreås L (1998) Novel techniques for analysing diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64: 53-62.
145. Tortora GJ, Funke BR, Case ChL (2010) "The Prokaryotes: Domains Bacteria and Archaea" In: *Microbiology. An Introduction*. Pearson Education. pp. 290-317.
146. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Van Sinderen D (2007) Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 495-548.
147. Vinner-Mozzini Y, Zohary T, Gasith A (2003) Dinoflagellate bloom development and collapse in lake Kinneret: A sediment trap study. *Journal of Plankton Research* 25: 591-602.
148. Vissers EW, Blaga CI, Bodelier PLE, Muyzer G, Schleper C, Sinninghe Damsté JS, Tourna M, Laanbroek HJ (2013) Seasonal and vertical distribution of putative ammonia-oxidizing thaumarchaeotal communities in an oligotrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology* 83: 515-526.
149. Wagner M, Horny M, Daims H (2003) Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* 6: 302-309.
150. Wallner G, Amann R, Beisker W (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14: 136-143.

151. Warnecke F, Sommaruga R, Sekar R, Hofer JS, Pernthaler J (2005) Abundances, identity, and growth state of actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5551-5559.
152. Weisse T, Müller H, Pinto-Coelho RM, Schweizer A, Springmann D, Baldringer G (1990) Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limnology and Oceanography* 35: 781-794
153. Weisse T, Stadler P (2006) Effect of pH on growth, cell volume and production of freshwater ciliates and implications for their distribution. *Limnology and Oceanography* 51: 1708- 1715.
154. Wetzel, RG (2001) *Limnology. Lake and River Ecosystems*. 3rd. Edition. Academic Press. Elsevier Science. pp. 1006.
155. Whittaker RJ, Willis KJ, Field R (2001) Scale and species richness: towards a general hierarchical theory of species diversity. *Journal of Biogeography* 28: 453-470.
156. Whittaker RJ, Grogan DW, Taylor JW (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic Archaea. *Science* 301: 976-978.
157. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 4576-4579.
158. Wu QL, Zwart G, Schauer M, Kamst-van Agterveld MP, Hahn MW (2006) Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5478-5485.
159. Wurzbacher C, Salka I, Grossart H-P (2012) environmental actinorhodopsin expression revealed by a new in situ filtration and fixation sampler. *Environmental Microbiology Report* 4: 491-497.

160. Yannarell AC, Kent AD, Lauster GH, Kratz TK, Triplett EW (2003) Temporal patterns in bacterial communities in three temperate lakes of different trophic status. *Microbial Ecology* 46: 391-405.
161. Yannarell AC, Triplett EW (2005) Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 227-239
162. Zhu T, Dittrich M (2016) Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 4: 1-21.
163. Zwart G, Crump BC, Kamst-Van Agterveld MP, Hagen F, Han SK (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology* 28: 141-155.