



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

COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE Y SU
RELACIÓN CON LA DINÁMICA LIMNOLÓGICA DEL LAGO CRÁTER LA
PRECIOSA, CUENCA DE ORIENTAL, MÉXICO.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
EUNICE GONZÁLEZ FLORES

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Miroslav Macek, FES Iztacala

ASESOR EXTERNO
Dr. Justo Salvador Hernández Avilés, FES Zaragoza

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, FES Iztacala
Dr. Alfonso Lugo Vázquez, FES Iztacala
Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez, Instituto de Ecología
Dr. Gustavo Montejano Zurita, Facultad de Ciencias

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México
Ejército de oriente, 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



COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL PICOPLANCTON
PROCARIONTE Y SU RELACIÓN CON LA DINÁMICA
LIMNOLÓGICA DEL LAGO CRÁTER LA PRECIOSA,
CUENCA DE ORIENTAL, MÉXICO.

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias
(Limnología)

p r e s e n t a

BIÓL. EUNICE GONZÁLEZ FLORES

Director de Tesis: Dr. Miroslav Macek

Asesor Externo: Dr. Justo Salvador Hernández Avilés

Comité Tutorial: Dra. Gloria Vilaclara Fatjó

Dr. Alfonso Lugo Vázquez

Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez

Dr. Gustavo Montejano Zurita

Febrero 2017

DEDICATORIA

A mis padres Mario y Rosalba personas humildes que me gusta contemplar pasivamente al admirar su perseverancia y creatividad que demuestran día a día.

A mis hermanos Rosalinda y Christian, a mis sobrinos Adali y Ángel; personas que me han recordado lo que hace tanto no valoraba, la autenticidad y goce de vivir.

A Juan Antonio que además de ser un compañero en el ámbito académico hemos compartido vivencias personales que nos han ido modelando; que nos hemos equivocado, pero a pesar de ello haber entendido lo bueno y lo malo para hacer la diferencia.

A la familia Arellano Posadas les agradezco, porque desde que los conozco me han brindado su atención y cariño al recibirme como parte de su familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme nuevamente me desarrolle en el ámbito profesional al ingresar en el Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza e Iztacala por ayudarme a consolidar el proyecto de Investigación de Maestría, agradezco por todas las facilidades otorgadas.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN219313) con el proyecto: Dinámica del plancton procariota en lagos monomícticos cálidos volcánicos en la Cuenca Oriental Puebla por el financiamiento para la realización de esta tesis de maestría.

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.

Agradezco a mis directores el Dr. Miroslav Macek y el Dr. Justo Salvador Hernández Avilés, al comité tutor integrado por la Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, la Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez, el Dr. Alfonso Lugo Vázquez y el Dr. Gustavo Montejano Zurita, gracias a todos por el interés, así como por las sugerencias y comentarios que favorecieron en consolidar y finalizar esta investigación.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CLASIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PLANCTON.....	1
1.2 TAXONOMÍA Y PAPEL ECOLÓGICO DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE.....	1
1.3 MÉTODOS DE ESTUDIO Y SU IMPORTANCIA EN EL ESTUDIO AMBIENTAL.....	4
2. ANTECEDENTES	6
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	7
5. OBJETIVO GENERAL	7
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
6. ZONA DE ESTUDIO	8
7. MÉTODO	10
7.1 TRABAJO DE CAMPO.....	10
7.1.1 Muestreo biológico y medición de parámetros físicos y químicos	10
7.2 TRABAJO DE LABORATORIO	11
7.2.2 Protocolo de la técnica Hibridación in situ fluorescente a través de la deposición del receptor catalizado (CARD-FISH) propuesto por Salcher et al. (2011a).	12
7.2.3 Análisis de muestras de agua	15
7.3 TRABAJO DE GABINETE	16
7.3.1 Cuantificación de la abundancia del picoplancton procarionte total y Picocianobacterias.....	16
7.3.2 Cuantificación de la biomasa del picoplancton procarionte total y Picocianobacterias.....	16
7.3.3 Cuantificación del porcentaje de hibridación para dominios y grupos específicos del picoplancton procarionte total.....	17
7.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	17
8. RESULTADOS	18
8.1 CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS	18
8.1.1 Temperatura	18
8.1.2 Zona eufótica.....	22
8.1.3 Oxígeno disuelto	22
8.1.4 Salinidad, conductividad, alcalinidad y pH.....	23
8.1.5 Nutrientes.....	24
8.2 PARÁMETROS BIOLÓGICOS.....	30
8.2.1 Abundancia del picoplancton procarionte total.....	30
8.2.2 Biomasa del picoplancton procarionte total.....	31

8.2.3 Abundancia de Picocianobacterias.....	32
8.2.4 Biomasa de Picocianobacterias	36
8.3 COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS PROCARIONTES DETERMINADOS POR CARD-FISH.....	36
8.4 Relación de los grupos bacterianos con los parámetros limnológicos del lago la preciosa	46
9. DISCUSIÓN	51
9.1 VARIABILIDAD EN LA COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS TAXA EN LAS FASES HIDRODINÁMICAS DEL LAGO LA PRECIOSA.....	53
9.1.1 DOMINIO ARCHAEA	53
9.1.1.1 Filo Thaumarchaeota.....	54
9.1.2 DOMINIO BACTERIA.....	55
9.1.2.1 Filo Cyanobacteria: Picocianobacterias	57
9.1.2.2 Filo Proteobacteria	59
9.1.2.2.1 Clase Alphaproteobacteria.....	59
9.1.2.2.1.1 Género Paracoccus.....	60
9.1.2.2.1.2 Subclado SAR 11-IIIb (LD12).....	60
9.1.2.2.2 Clase Betaproteobacteria	62
9.1.2.2.3 Clase Deltaproteobacteria.....	62
9.1.2.2.4 Clase Gammaproteobacteria.....	64
9.1.2.3 Filo Actinobacteria.....	65
9.1.2.4 Filo Bacteroidetes.....	66
9.1.2.5 Filo Planctomycetes	67
10. CONCLUSIONES	68
11. REFERENCIAS	69

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. A) Mapa batimétrico del lago La Preciosa, Puebla (tomado de Arredondo-Figueroa et al., 1983), B) Imagen satelital del lago La Preciosa (Google Earth, NASA-INEGI, 2014).....	9
FIGURA 2. Diagramas espacio-tiempo de A) Temperatura y B) Oxígeno disuelto para la columna de agua del lago La Preciosa durante el año 2014. Se indican las fases hidrodinámicas: en la barra inferior se marca en azul y en rosa los periodos de mezcla y estratificación, respectivamente.	20
FIGURA 3. Perfiles verticales de temperatura y oxígeno disuelto para la fase de mezcla y estratificación. Se han indicado las etapas de la estratificación, así como el mes que lo representa; se indica en cada perfil la amplitud zona eufótica, termoclina (línea sólida) y termoclina planar (línea punteada).	21
FIGURA 4. Concentración promedio de nitrato en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago la preciosa.	25
FIGURA 5. Concentración promedio de amonio en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.....	27
FIGURA 6. Concentración promedio del fósforo soluble reactivo (FSR) en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.	28
FIGURA 7. Concentración promedio de fósforo total (FT) en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.	29
FIGURA 8. A) Imagen del picoplancton procarionte total al ser observado en el microscopio de epifluorescencia bajo excitación de luz ultravioleta. B) Valor medio y desviación estándar de la abundancia del picoplancton procarionte total durante las fases hidrodinámicas y en los estratos de la columna de agua.....	31
FIGURA 9. Valor medio y desviación estándar de la biomasa del picoplancton procarionte total durante las fases hidrodinámicas y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.	32
FIGURA 10. A) Imagen de Picocianobacterias individuales y coloniales al ser observadas en el microscopio de epifluorescencia. B) Valor medio y desviación estándar de la abundancia de Picocianobacterias registradas durante las fases hidrodinámicas y en los estratos de la columna de agua.....	33
FIGURA 11. A) Promedio del número de células presentes en cada colonia para las fases hidrodinámicas y estratos en la columna de agua. B) Numero de colonias por fase hidrodinámica. C) Promedio y desviación estándar de la abundancia de células coloniales.....	35
FIGURA 12. Valor medio y desviación estándar de la biomasa de las Picocianobacterias durante las fases hidrodinámicas y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.	36

- FIGURA 13. Las imágenes muestran la detección de células del picoplancton procarionte a través del empleo de la técnica de hibridación in situ fluorescente mediante la deposición del receptor catalizado (CARD-FISH). A) Observación de una muestra de agua del lago La Preciosa al ser excitado el fluorocromo Alexa 488 con luz azul, al estar asociado a la sonda de oligonucleótido. B) Observación de la misma muestra del lago La Preciosa teñidas con DAPI las cuales fueron excitadas con luz UV. 37
- FIGURA 14. Distribución temporal de la abundancia absoluta del picoplancton procarionte total (PPT) y la abundancia relativa (expresados en cél. mL⁻¹ y porcentaje de hibridación) del dominio Bacteria y Archaea. 38
- FIGURA 15. Porcentaje de hibridación de los fila del dominio Bacteria durante las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa. Se indica con abreviaturas los filo: Proteobacteria (PRO), Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA), Bacteroidetes (BAC). 40
- FIGURA 16. Composición del filo Proteobacteria. Se han señalado con abreviaturas los nombres de las clases: Alphaproteobacteria (ALF), Betaproteobacteria (BET), Deltaproteobacteria (DEL) y Gammaproteobacteria (GAM) para las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa a través de sondas de oligonucleótidos de CARD-FISH. 41
- FIGURA 17. Composición y distribución de los taxa de procariontes en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa durante los periodos de A) Estratificación temprana y B) Estratificación bien establecida. Los nombres de los taxa han sido abreviados, como es el caso del género *Paracoccus* (PAR) y el subclado SAR 11-IIIb (LD12); las clases Betaproteobacteria (BET), Gammaproteobacteria (GAM), Deltaproteobacteria (DEL) y de los fila Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA) y Bacteroidetes (BAC). 44
- FIGURA 18. Composición de los taxa y su distribución en los estratos de la columna de agua durante el periodo de estratificación tardía del lago La Preciosa. Los nombres de los taxa se han abreviado, por ejemplo, el género *Paracoccus* (PAR) y el subclado SAR 11-IIIb (LD12); las clases Betaproteobacteria (BET), Gammaproteobacteria (GAM) y los fila Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA) y Bacteroidetes (BAC). 45
- FIGURA 19. Análisis de correspondencia canónica sin tendencia (ACCST). Ejes canónicos 1 y 2 explican el 72.3% de la varianza acumulada de la relación de los grupos bacterianos y parámetros limnológicos. Se han abreviado tanto los dominios y taxa del picoplancton procarionte, así como algunas de las variables limnológicas. Dominios: Archaea (ARCH) y Bacteria (EUB). Grupos específicos, por ejemplo: *Paracoccus* (PAR) y subclado SAR 11-IIIb (LD12). Las clases: Betaproteobacteria (BET), Gammaproteobacteria (GAM) y Deltaproteobacteria (la mayoría de las Bacteria sulfato reductoras (BSR)) y los fila: Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA), Bacteroidetes (BAC) y Picocianobacterias (Pcy). Variables limnológicas: temperatura (T), potencial de hidrógeno (pH), fósforo soluble reactivo (FSR), oxígeno disuelto (OD) y fósforo total (FT). 50

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sondas de oligonucleótidos marcadas con peroxidasa de rábano picante (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 receptor catalizado (CARD-FISH), propuesto por Salcher et al. (2011a).	14
Cuadro 2. Cuantificación de abundancia celular del Picoplancton procarionte	16
Cuadro 3. Estimación de la abundancia relativa para los taxa del lago La Preciosa.....	17
Cuadro 4. Concentraciones promedio y desviación estándar de parámetros químicos para las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa.	23
Cuadro 5. Concentración promedio y desviación estándar de nutrientes y del ion sulfato para las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa.	24
Cuadro 6. Concentración promedio de nitrato en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.	26
Cuadro 7. Concentración promedio del ion sulfato en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.	30
Cuadro 8. Correlación producto-momento de Pearson para la fase de estratificación entre el picoplancton procarionte y los parámetros limnológicos del lago La Preciosa.	47
Cuadro 9. Eigenvalores, coeficiente de correlación y varianza acumulada de los ejes canónicos 1-4 que corresponden a la figura 18.	48
Cuadro 10. Coeficientes de correlaciones múltiples del ACCST de la figura 19. Las variables limnológicas con el mayor coeficiente de correlación se encuentran indicadas en negritas.	48

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la composición y distribución espacio-temporal de los dominios Archaea, Bacteria y de grupos específicos: la clase Alphaproteobacteria y taxa que forman parte de esta clase como SAR 11-IIIb y el género *Paracoccus*, así también las clases Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria (Bacterias sulfato reductoras) y Gammaproteobacteria, los fila Actinobacteria, Bacteroidetes y Planctomycetes durante la fase de mezcla y de estratificación del lago La Preciosa, empleando la técnica de Hibridación *in situ* fluorescente a través de la deposición del receptor catalizado (CARD-FISH). El dominio de mayor abundancia para el lago La Preciosa se encontró representado por Bacteria, al mostrar porcentajes de hibridación del 40-70% con respecto al picoplancton procarionte total. El dominio Bacteria se encontró distribuido a lo largo de la columna de agua, alcanzando el máximo porcentaje de hibridación cerca de la termoclina. Para el dominio Archaea se halló una hibridación máxima del 10%, de acuerdo con el picoplancton procarionte total. Se registró una distribución variable para este dominio en los distintos estratos de la columna de agua durante la fase de estratificación. El patrón de distribución espacio-temporal del picoplancton procarionte dependió del comportamiento de monomixis cálida del lago, con base en la dominancia de diferentes categorías taxonómicas en las fases hidrodinámicas; registrando una mayor variabilidad de grupos taxonómicos en la fase de estratificación en comparación con la fase de mezcla. Para el dominio Bacteria se encontró variabilidad temporal de los taxa que se evaluaron, identificando para la fase de mezcla la presencia mayoritaria en forma decreciente de los filos Proteobacteria, Planctomycetes y Bacteroidetes; por otro lado, en la fase de estratificación destacó la aparición del filo Actinobacteria y la presencia del dominio Archaea.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CLASIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PLANCTON

La denominación plancton se refiere al grupo de organismos que están adaptados a vivir en aparente suspensión en el agua de los diferentes ecosistemas acuáticos (Reynolds, 1984), éste grupo de organismos planctónicos pueden ser subdivididos bajo criterios taxonómicos, fisiológicos (Malone 1980; Stockner y Antia, 1986) o dimensionales; esta última subdivisión considera el criterio de separar a los organismos por tamaño de acuerdo con una escala logarítmica, permitiendo identificar una fracción conocida como picoplancton ($<2\mu\text{m}$, Sieburth *et al.*, 1978); la cual incluye tanto organismos procariontes y eucariontes (Callieri y Stockner, 2002), donde particularmente el picoplancton procarionte cumple un papel ecológico relevante en los procesos biogeoquímicos al aportar biomasa de manera significativa a los diferentes sistemas acuáticos, especialmente en los oligotróficos.

1.2 TAXONOMÍA Y PAPEL ECOLÓGICO DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE

En el picoplancton procarionte se incluyen microorganismos de los dominios Archaea y Bacteria; estos representan un componente clave y fundamental en el flujo de materia y energía del circuito microbiano (*microbial loop*) de los sistemas acuáticos (Azam *et al.*, 1983). La taxonomía procariota en los sistemas acuáticos se caracteriza por la predominancia de los filo bacterianos: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes y Cyanobacteria (fotoautótrofos) constituyendo casi la totalidad de las células bacterianas en una amplia variedad de ambientes acuáticos (Glöckner *et al.*, 2000; Callieri, 2008).

El filo Proteobacteria se encuentra constituido en su mayoría de bacterias Gram-negativas quimiheterótrofas. El filo se subdivide en seis clases designadas por las letras griegas: Alpha (α), Beta (β), Delta (δ), Epsilon (ϵ), Gamma (γ) y Zetaproteobacteria (ζ) (Newton *et al.*, 2011).

La clase Alphaproteobacteria es uno de los grupos más abundantes de las comunidades microbianas acuáticas, son capaces de crecer a niveles muy bajos de nutrientes (oligotróficos) y están presentes tanto en ambientes marinos como dulceacuícolas; aunque en estos últimos ambientes suelen ser ubicuas y menos numerosas (Newton, 2011). Ésta clase alberga organismos del género *Paracoccus*; microorganismos Gram-negativo que crecen heterotrófica y quimiautotróficamente en una amplia gama de compuestos orgánicos, aunque

algunas especies utilizan el nitrato u óxido nitroso como aceptor de electrones. Los miembros de este género son versátiles, ya que pueden adaptar su metabolismo a las condiciones prevalecientes del ambiente; presentan una morfología cocoide, y entre las especies que comprende a este género se exhibe una similitud genética que va del 93.5 - 99.8 %. Se sabe que este género crece favorablemente en temperaturas que van de un rango de 15 a 37 °C con un pH de 6.5 a 8.5 (Ludwig *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 2006).

Otro grupo que forma parte de la clase Alphaproteobacteria es SAR 11-IIIb (agua dulce) también llamado ultramicrobacteria por su pequeño tamaño (Heinrich *et al.*, 2013; Salcher *et al.*, 2011b) es un subclado hermano de SAR 11-IIIa (ambientes salados), estos grupos mantienen una alta similitud genética (86.6%). El subclado de agua dulce fue recientemente nombrado como LD12 (Zwart *et al.*, 2002; Herlemann *et al.*, 2014) y puede ser tan numeroso como SAR11-IIIa del océano; donde se tiene la hipótesis que este grupo probablemente se originó a partir eventos de transición de las bacterias SAR11 de ambientes marinos a sistemas de aguas dulce (Logares *et al.*, 2010; Zwart *et al.*, 2002; Salcher *et al.*, 2011b). Actualmente sólo hay información limitada sobre su abundancia, estacionalidad, y los rasgos metabólicos.

La clase Betaproteobacteria incluye organismos numéricamente dominantes característicos de ambientes de agua dulce y sistemas oligotróficos (Glöckner *et al.*, 1999, 2000). Presentan un rápido crecimiento cuando existen elevadas concentraciones de nutrimentos; ésta clase tiene preferencia por la profundidad, pH y sustratos de carbono pues este microorganismo emplea como fuente de energía compuestos que se producen en áreas de descomposición anaerobia de la materia orgánica (Newton *et al.*, 2011). Se ha propuesto que estas bacterias son particularmente competitivas en ambientes de agua dulce debido a que tienen una forma de vida oportunista en el que ellas mantienen el balance.

Casi todas las Bacterias reductoras del azufre y de los sulfatos forman parte de la clase Deltaproteobacteria, estas bacterias junto con las desnitrificantes favorecen la diferenciación química de la columna de agua durante la estratificación térmica en lagos monomícticos cálidos. Anteriormente se consideraba que las Bacterias sulfato reductoras se restringían hacia las zonas anóxicas, lo que afectó la percepción de estas bacterias sobre el proceso que

llevan a cabo en la precipitación y litificación del carbonato en los sistemas acuáticos (Fröstl y Overmann, 2000; Eckert *et al.*, 2002).

Se ha reportado que la clase Gammaproteobacteria es más abundante en el océano (Biers *et al.*, 2009), mientras que, en los sistemas de agua dulce este grupo no es tan numeroso (Zwart *et al.*, 2002). Éste taxón se constituye de una gran variedad de organismos con diferente actividad metabólica, incluyendo a organismos quimilitoautotróficos, que fijan el carbono inorgánico de los lagos contribuyendo significativamente al ciclo del carbono y nitrógeno (Zwart *et al.*, 2002).

El filo Actinobacteria decrece en abundancia con el aumento de la profundidad y a bajas concentraciones de oxígeno; así mismo este filo presenta diferentes características químicas y biológicas (Newton *et al.*, 2011); por ejemplo se les clasifica como bacterias Gram-positivas debido a que en su ácido desoxirribonucleico (ADN) poseen un alto contenido de guanina y citosina, además este filo presenta pequeños tamaños por lo que se les denomina también como “ultramicrobacterias” (Heinrich *et al.*, 2013; Salcher *et al.*, 2011a).

El filo Bacteroidetes son bacterias Gram-negativas y fue conocido antiguamente como Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides, éste grupo es comúnmente de aguas dulces y marinas (Lemarchand *et al.*, 2006), aunque son numéricamente más abundantes en ambientes marinos, así como en algunos lagos con una amplia variedad de salinidad (Eilers *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006). Algunos grupos pertenecientes a este filo tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos de alto peso molecular y biopolímeros a través de la excreción de exoenzimas (Wu *et al.*, 2006).

El filo Planctomycetes es un grupo de bacterias que habitan una amplia gama de ambientes acuáticos y terrestres con diversas condiciones ambientales, a estos se les ha detectado en una amplia variedad de temperaturas (-2 a 27 °C), pero es más común encontrarlos en sistemas de baja temperatura (Ivanova *et al.*, 2016).

Los microorganismos del dominio Archaea se encuentran también en ambientes donde las condiciones físico-químicas son extremas (temperaturas muy altas, elevadas concentraciones salinas o valores de pH extremadamente bajos); aun así, han sido detectados

en hábitats de agua dulce y salina donde las condiciones ambientales no son tan hostiles (Nold y Zwart, 1998). Aparentemente, las Archaea suelen constituir una proporción relativamente pequeña de las comunidades microbianas acuáticas (DeLong *et al.*, 1994). El dominio Archaea se encuentra integrado por varios fila de entre los que se puede mencionar a Euryarchaeota, Crenarchaeota y el filo Thaumarchaeota; éste último descrito por Brochier-Armanet *et al.* (2008). El filo Thaumarchaeota incluye a organismos amoníaco-oxidantes capaces de realizar importantes procesos dentro del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Callieri *et al.*, 2015).

La distribución del picoplancton procarionte en ambientes acuáticos, puede verse afectada por factores espaciales y ambientales (Langenheder y Ragnarsson, 2007), entre los factores ambientales que influyen en mayor proporción en la composición de los microorganismos procariontes se encuentra la salinidad (Barberán y Casamayor, 2010); ya que el efecto de la salinidad se refleja en los patrones de distribución de los principales grupos bacterianos planctónicos tales como Beta y Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes y Planctomycetes (Wu *et al.*, 2006), pues se ha reportado una abundancia relativamente alta en ambientes de agua dulce y una disminución de su abundancia con el incremento de la salinidad (Kirchman *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2011).

En general, el estudio de la composición microbiana y de los factores que determinan su distribución contribuyen en el entendimiento de la composición de las comunidades microbianas a escala global y de las fuerzas evolutivas que la forman (Ramette y Tiedje, 2007); dado que los microorganismos son indispensables en el mantenimiento de la biosfera al regular los ciclos biogeoquímicos de los principales elementos, participando en los procesos de descomposición de materia orgánica, reciclando nutrientes o degradando compuestos contaminantes; además de ser útiles en diversas aplicaciones biotecnológicas (Madsen, 2005). Tal es el caso del filo Planctomycetes donde recientemente se ha investigado su participación en la ruta metabólica de oxidación anaerobia del amonio (Newton *et al.*, 2011).

1.3 MÉTODOS DE ESTUDIO Y SU IMPORTANCIA EN EL ESTUDIO AMBIENTAL

Con la introducción de los métodos para evaluar cuantitativamente a las bacterias a través de microscopia de epifluorescencia o citometría de flujo, se descubrió que el picoplancton

procarionte es relevante no solo en abundancia, sino además en diversas funciones ecosistémicas (producción-respiración) y es fundamental para la mineralización de la materia orgánica en los sistemas acuáticos (Revilla *et al.*, 2000).

Para determinar la diversidad filogenética y taxonómica, así como la cuantificación de su abundancia de los grupos procariontes se requiere de estudios con técnicas moleculares (Callieri *et al.*, 2009). Las técnicas moleculares principalmente están basadas en el uso del ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr) como marcador filogenético, siendo a través de éste que se comenzó a revelar la composición taxonómica y los patrones evolutivos de los microorganismos procariontes (Amann *et al.*, 1995). La información filogenética generada con base en este marcador, permitió identificar una inesperada diversidad de bacterias que tienen poca semejanza con la de los organismos cultivados encontrando además que existían filos enteros de los que no se tenían representantes cultivados y/o registrados.

La ecología microbiana actualmente enfrenta problemas para obtener información de índole diversa; sin embargo, a través de métodos moleculares se ha logrado refinar el entendimiento de los procariontes en general, ya que algunas de estas técnicas identifican células individuales *in situ* lo que ha favoreciendo no solo en su identificación, sino que también en la obtención de sus abundancias, permitiendo tener un conocimiento de la diversidad prevaleciente en el ecosistema (Kubota, 2013). Por ejemplo, una de estas técnicas es la Hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés); sin embargo, dado que no siempre los procariontes presentan contenidos suficientes de ARNr ha hecho que éste método se ha renovado al emplear un catalizador para amplificar la señal de las células hibridadas y a esta nueva técnica ha sido denominada como Hibridación *in situ* fluorescente a través de la deposición del receptor catalizado (CARD-FISH, por sus siglas en inglés). La ventaja de éste método es que tiene la sensibilidad para el análisis del picoplancton procarionte (Pernthaler *et al.*, 2002) de ambientes acuáticos donde la actividad metabólica de estos microorganismos es extremadamente baja (Hoshino *et al.*, 2008), pues ésta técnica incrementa hasta 12 veces la detección de las células, lo que resulta especialmente útil en el caso de que exista un bajo número de copias del ARNr (Kubota, 2013).

La técnica parte de una fase de filtración de la muestra, montaje de las membranas en agarosa, permeabilización de la célula, hibridación y amplificación de la señal de tiramida;

la fijación permite estabilizar las macromoléculas y estructuras celulares evitando la lisis y favoreciendo la permeabilización de la membrana celular para facilitar la penetración de la sonda fluorescente con la deposición de un gran número de moléculas marcadas con tiramida por actividad de la peroxidasa, permitiendo unirse y formar moléculas de cadena doble de acuerdo al protocolo propuesto por Salcher *et al.* (2011a).

2. ANTECEDENTES

Actualmente se está generando información de interés en lagos profundos tropicales de México; en estos se ha descrito la dinámica del ensamblaje planctónico de los picoprocariontes unicelulares, a través del empleo de la técnica de biología molecular FISH (Hernández-Avilés *et al.*, 2010) y CARD-FISH (Bautista-Reyes y Macek, 2012) en particular en el lago volcánico Alchichica. Estos trabajos sirven de referencia en el entendimiento de la dinámica del picoplancton procarionte del lago La Preciosa, que al igual que Alchichica se encuentra en la Cuenca de Oriental y cuyo origen de formación y comportamiento térmico es similar, aunque su salinidad es menor. Se tiene conocimiento que en los lagos profundos tropicales como Alchichica los cambios en la composición bacteriana son debido a que a lo largo de la columna de agua se forman capas o estratos de diferente densidad debido a diferencias en la temperatura entre unas y otras, así como gradientes de intensidad de luz, de oxígeno y de concentraciones de nitrógeno y otros nutrientes; esto provee un amplio rango de condiciones ambientales que se puede reflejar en una amplia diversidad de grupos de picoprocariontes (Hernández-Avilés *et al.*, 2010). Otras variables como la disponibilidad de recursos y el contenido salino que presenta un hábitat también influyen en la composición de los diversos grupos de picoplancton procarionte.

3. JUSTIFICACIÓN

La importancia y participación del picoplancton procarionte en las redes tróficas acuáticas ha sido bien documentada en las últimas décadas para las zonas templadas, boreales (Straškrabová *et al.*, 2009) y en los sistemas marinos (Eilers *et al.*, 2001), generando importantes avances en la descripción de la composición de los procariontes. Cabe resaltar que las investigaciones generadas en latitudes tropicales son incipientes, dadas las escasas investigaciones realizadas y referencias publicadas.

Los lagos volcánicos profundos al comportarse como monomícticos cálidos, presentan un período largo de estratificación térmica que favorece una estratificación de tipo química, en la que se definen importantes gradientes ambientales a lo largo de la columna de agua. En estos se establecen diferentes procesos vinculados con los ciclos biogeoquímicos en los que participan diferentes grupos microbianos y cuyo papel empieza a ser dilucidado. De tal forma que estos cuerpos de agua son laboratorios naturales donde se puede estudiar y entender con mayor precisión la participación de grupos procariontes asociados con las características químicas propias de cada estrato.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es la composición del picoplancton procarionte en el lago cráter La Preciosa?
- ¿Cómo se distribuyen verticalmente los taxa del picoplancton procarionte durante las cuatro etapas hidrodinámicas del lago La Preciosa?
- ¿Qué parámetros limnológicos se relacionan con la presencia o ausencia de grupos picoprocariontes en el lago La Preciosa?

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición y distribución espacio-temporal de los dominios y grupos específicos del picoplancton procarionte durante las fases hidrodinámicas, y relacionarlo con la dinámica limnológica del lago La Preciosa.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Cuantificar la abundancia y biomasa del picoplancton procarionte total y de Picocianobacterias para el período de estudio.
- b) Analizar el % de hibridación (abundancia relativa) de los dominios Bacteria y Archaea y de grupos específicos como: Alphaproteobacteria, el subclado SAR 11-IIIb y el género *Paracoccus* ambos grupos del linaje de las Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria (incluyendo las principales Bacterias sulfato reductoras), Gammaproteobacteria y los filos Actinobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes y Thaumarchaeota, durante la fase de mezcla y de estratificación (temprana, bien establecida y tardía) del lago La Preciosa.

- c) Evaluar los patrones de variación de la temperatura, oxígeno disuelto, potencial de hidrógeno (pH), conductividad, así como la concentración de nutrimentos (amonio, nitrito, nitrato, fósforo soluble reactivo y fósforo total) y de los iones sulfato, carbonato y bicarbonato.
- d) Establecer las posibles relaciones de los grupos procariontes con algunos parámetros físico-químicos analizados en el lago La Preciosa.

6. ZONA DE ESTUDIO

La Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) es un arco magmático continental, constituido por cerca de 8,000 estructuras volcánicas y algunos cuerpos intrusivos, que se extienden desde el oeste en las costas del Pacífico hasta el este de las costas del Golfo de México. La FVTM, alcanza una longitud aproximada de 1,000 km y una amplitud de entre 80 y 230 km (Gómez-Tuena *et al.*, 2005). Esta provincia geológica contiene numerosas cuencas endorreicas con lagos, como es el caso de la cuenca Oriental, ubicada en el extremo este de la FVTM, abarcando los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz; es en ésta cuenca endorreica donde se ubica el lago La Preciosa, conocido localmente como “Las Minas”.

El clima de la zona es variable y está influido notablemente por la altitud, la exposición de los vientos secos y la sombra orográfica que producen los macizos montañosos (Ramírez-García y Novelo, 1984). Estas montañas interrumpen el flujo de los vientos húmedos (alisios) provenientes del Golfo de México, generando el establecimiento de un clima de tipo semiárido tropical (lluvias en verano) dentro de la cuenca (García, 2004; Vilaclara *et al.*, 1993), mostrando generalmente una temperatura media anual de 12-16 °C y una precipitación total anual de 400-800 mm (García, 2004; Arriaga *et al.*, 1998).

La Preciosa forma parte de un conjunto de lagos de origen volcánico, localizados en los llanos de San Andrés y San Juan, en este último se ubica el sitio de estudio (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983). La Preciosa se ubica entre los paralelos 19° 22' 32.78'', 19° 21' 49.14'' N y los meridianos 97° 22' 56.77'', 97° 23' 30.58'' O a una altitud de 2330 m s.n.m. Los cráteres del lago La Preciosa son de tipo “maar” y se remontan al Pleistoceno tardío, su forma es aproximadamente triangular, ya que su formación fue producto de una triple explosión freatomagmática ocurrida en puntos muy próximos y casi simultáneos, estas

explosiones fueron el resultado de diferencias térmicas entre el magma y el agua del manto freático [Fig. 1] (Carrasco-Núñez *et al.*, 2006; Armienta *et al.*, 2008). Como resultado de estas explosiones La Preciosa de acuerdo con Arredondo-Figueroa *et al.* (1983), registra una longitud máxima de 1,340 m con orientación noroeste-suroeste, una anchura máxima de 920 m, línea de costa de 3,850 m, área superficial de 0.78 km², profundidad máxima de 45 m en la zona noroeste y en la parte sur una profundidad media de 20.7 m; sin embargo, con el paso del tiempo se ha observado una disminución en el volumen del lago.

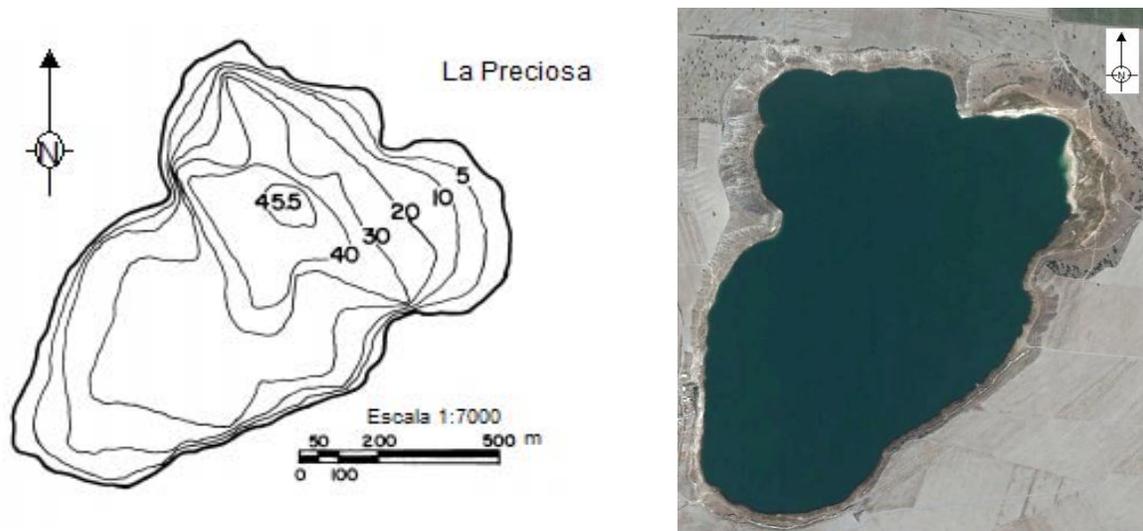


Figura 1. A) Mapa batimétrico del lago La Preciosa, Puebla (tomado de Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983), B) Imagen satelital del lago La Preciosa (Google Earth, NASA-INEGI, 2014).

De acuerdo con la clasificación de Lewis (1983), el lago La Preciosa es catalogado como un lago de tipo monomíctico cálido, ya que sigue un patrón de variación térmica; mostrando una fase de mezcla y una fase de estratificación. El agua que alimenta al lago es principalmente subterránea, suele presentar una salinidad de 1.3 a 1.4 g L⁻¹, por lo que, desde el punto de vista biológico no puede ser clasificado como un lago salino ya que el criterio es aplicable para aquellos ambientes que presenta o superan los 3 g L⁻¹ (Williams, 1996); sin embargo, no puede ser considerado estrictamente dulceacuícola ya que de ser así debería presentar una salinidad parecida a 1 g L⁻¹ (APHA, 2005), por lo que se caracteriza como subsalino. Presenta generalmente una conductividad de 2.150 mS cm⁻¹ y un pH de 8.7, considerándose como un lago alcalino, con dominancia de sodio y magnesio sobre potasio y calcio, y de cloruros y bicarbonatos sobre sulfatos y carbonatos (Vilaclara *et al.*, 1993, 2002).

La flora acuática está representada por cuatro familias: Cyperaceae, Juncaceae, Lemnaceae y Ranunculaceae (Ramírez-García y Novelo, 1984). Dentro de las comunidades biológicas características del lago destaca la presencia de ictiofauna de la familia Atherinidae (*Poblana letholepis*) reportado por Álvarez (1950). Entre los organismos zooplanctónicos se reportan copépodos calanoides, rotíferos y especies típicas de aguas dulces entre las que destacan los cladóceros (Martínez, 2010). Se relacionan cinco clases características de fitoplancton entre las cuales se haya Bacillariophyceae (*Chaetoceros* sp. y *Cyclotella* sp. la primera, filamentosa hallada durante todas las etapas hidrodinámicas, y la segunda sólo durante la mezcla), Cryptophyceae (*Campylomonas* sp., *Plagioselmis lacustris*, encontradas en todas las etapas), Chlorophyceae (en su mayoría presentes durante todas las etapas hidrodinámicas), Cyanobacteria (*Planktolyngbya tallingii*, filamentosa) y Dinophyceae (*Peridinium* sp.) halladas generalmente durante la estratificación bien establecida (Martínez, 2010).

7. MÉTODO

7.1 TRABAJO DE CAMPO

7.1.1 MUESTREO BIOLÓGICO Y MEDICIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS

En el lago La Preciosa se ubicó una estación de muestreo que correspondió a la zona de la profundidad máxima, donde se llevaron a cabo muestreos mensuales desde febrero hasta noviembre del 2014. Para la caracterización de las fases hidrodinámicas relacionadas con su comportamiento de monomixis cálida sólo fueron considerados cuatro meses representativos. Así para la fase de mezcla se eligió el mes de febrero; para el inicio de la estratificación el mes de abril; para la estratificación bien establecida el mes de agosto y para el término de la estratificación el mes de noviembre.

En campo se evaluó la variación de la temperatura y del oxígeno disuelto a lo largo de la columna de agua, a través de la colecta de muestras de agua de diferentes profundidades con una botella muestreadora (van Dorn marca Wildco, Michigan, USA); con la consecutiva medición de los parámetros anteriormente mencionados a través de un equipo de medición portátil (Hach HQ30d con precisión ± 1 °C y ± 0.01 mg L⁻¹).

Con el registro de dichas mediciones se elaboraron los perfiles verticales, mismos que sirvieron para establecer las diferentes profundidades de muestreo. Asimismo, se midió la

visibilidad del disco de Secchi con la finalidad de estimar la profundidad de la zona eufótica a partir de multiplicar ésta por una constante de 3.5 (Cole y Weihe, 2015).

Durante el periodo de mezcla se tomaron 6 muestras que incluyeron (1) la capa superficial, (2) profundidad eufótica y (3) el fondo y otras tres distribuidas a lo largo de la columna de agua. Para el período de estratificación se tomaron de igual manera muestras que comprendían (1) la zona del epilimnion -masa de agua cálida y menos densa-, (2) profundidad eufótica, (3) termoclina -lugar en el que existió una variación de la temperatura con respecto a la profundidad del cuerpo de agua y así mismo fue posible identificar una máxima diferencia en temperatura denominada termoclina planar-, (4) oxiclina, (5) hipolimnion-masa de agua fría y densa- y (6) fondo. La colecta de muestras de agua se realizó también con el empleo de una botella muestreadora van Dorn (marca Wildco, Michigan, USA) de 2.5 L de capacidad; las muestras fueron almacenadas y transportadas en botellas de polietileno de 1 L las cuales fueron colocadas en hielo con sal.

Una vez tomadas las muestras de agua en campo, se determinó para cada una de ellas el potencial de hidrógeno (pH) al emplear un equipo de medición portátil (Hach HQ30d precisión ± 0.001). Tanto la conductividad eléctrica como los sólidos disueltos totales fueron medidos con un equipo Checkmate modelo 90 (marca Corning, New York, USA con una precisión $\pm 0.01 \mu\text{S}$), asimismo se evaluó la alcalinidad por la técnica colorimétrica con indicadores.

Para el plancton procarionte se tomaron muestras de agua las cuales fueron fijadas con formol libre de partículas (obtenido mediante la filtración a través de una membrana de policarbonato de $0.2 \mu\text{m}$) cuya concentración final fue del 2% de acuerdo con lo propuesto por Porter y Feig (1980). Las muestras se procesaron antes de 24 horas permaneciendo en refrigeración hasta el momento de su análisis.

7.2 TRABAJO DE LABORATORIO

7.2.1 FILTRACIÓN DE MUESTRAS DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE TOTAL Y PICOCIANOBACTERIAS

El picoplancton procarionte total se cuantificó tiñéndolo con DAPI (4'-diamidino-2-fenilindol) sobre membranas negras de policarbonato (GTTP Millipore, Osmonics, Alemania) con tamaño de poro de $0.2 \mu\text{m}$ montadas en aceite de inmersión; las células fueron

contabilizadas empleando un microscopio de epifluorescencia (Leica, Alemania) con un lente de inmersión 100x en campos seleccionados al azar hasta que fueron contadas de 400 a 600 bacterias de acuerdo con Hobbie *et al.* (1977) y Porter y Feig (1980).

Las Picocianobacterias fueron concentradas en membranas de policarbonato blancas con tamaño de poro de 0.2 μm montadas en aceite de inmersión. Para su análisis no se requirió de ningún fluorocromo debido a que las Picocianobacterias a parte de tener clorofilas, poseen ficobilinas (ficocianinas y ficoeritrinas) que presentan fluorescencia cuando se les excitaba bajo un haz de luz verde de un filtro de tipo Cy3 (cianina), se contabilizaron 600 células de Picocianobacterias a través del empleo de imágenes tomadas al azar.

A su vez se tomaron fotografías con una cámara digital (Canon PowerShot S-45) misma que se encontraba ajustada al microscopio de epifluorescencia las fotografías fueron tomadas con el programa Canon Utilities Zoom Browser 6.9. De cada preparación se tomaron entre 10 y 15 imágenes para medir aproximadamente 1×10^3 células.

7.2.2 PROTOCOLO DE LA TÉCNICA HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE A TRAVÉS DE LA DEPOSICIÓN DEL RECEPTOR CATALIZADO (CARD-FISH) PROPUESTO POR SALCHER *ET AL.* (2011A).

Se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- a) Filtración de muestras para determinar dominios y grupos específicos del picoplancton procarionte

Las muestras de picoplancton procarionte fueron filtradas antes de cumplir 24 h, dicha filtración se llevó a cabo al interior de una campana de extracción. La filtración fue a través de una torre de filtración (3.5 cm de diámetro) misma que era ajustada a un sistema de vacío de baja presión. En la torre se encontraba integrada una membrana de soporte (0.45 μm) y sobre ella una membrana de policarbonato blanca de 0.2 μm de diámetro de poro (GTTP Millipore, USA u Osmonics, Alemania, 47 mm de diámetro), donde quedó concentrado el picoplancton procarionte. Fue depositado un volumen de entre 10 y 20 mL de muestra sobre la copa de la torre de filtración con una pipeta automática (se cuidó la homogenización de la muestra antes de tomar la alícuota), una vez confirmada la filtración se adicionaba agua libre de partículas (filtrada en membranas de 0.2 μm) para lavar las membranas. Finalizada la filtración se prosiguió a desmontar el sistema de filtrado para retirar la membrana la cual fue

rotulada y almacenada en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento de continuar con los siguientes pasos de la técnica.

b) Montaje en agarosa

Con la finalidad de tener baja pérdida celular a lo largo del proceso de CARD-FISH se preparó agarosa de alta calidad (temperatura de solidificación $35.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) al 0.1%, ésta fue depositada en cajas Petri para ser calentada en un microondas hasta su ebullición. La temperatura óptima de la agarosa fue aproximadamente $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, una vez verificada la temperatura se sumergieron las membranas de policarbonato, cerciorándose que el lado de la membrana que soporta a las bacterias se encontrara hacia arriba. Inmediatamente, las membranas fueron retiradas y colocadas sobre cajas Petri para ser secadas en un horno de incubación, durante al menos 30 minutos a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez secas las membranas, se pipeteó etanol (80%) sobre los bordes de las mismas; con la finalidad de deshidratarlas y desprenderlas de las cajas Petri, las membranas fueron colocadas sobre papel absorbente a temperatura ambiente. Debido a que algunos microorganismos tienen sus propias peroxidasas o proteínas con actividad pseudoperoxidasa, se procedió a su inactivación mediante la incubación de los filtros en ácido clorhídrico (0.01 M) por al menos 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con buffer de fosfato salino ($1\times$; $\text{pH}=7.6$) a temperatura ambiente.

c) Permeabilización con lisozima y acromopeptidasa o proteinasa K

Para facilitar el acceso de las sondas marcadas dentro de la célula, se preparó solución de lisozima (esta puede facilitar la desintegración de algunas capas de mureina que constituyen la pared celular de algunos procariontes). Las membranas fueron incubadas en cajas Petri en una solución de lisozima durante 60 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; pasado este tiempo se incubaron las membranas en solución de acromopeptidasa o proteinasa K (de acuerdo con la especificidad de la sonda ya que algunos grupos por ejemplo Actinobacteria, son resistentes a la digestión con lisozima por lo que se introduce una segunda digestión con acromopeptidasa) durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; llegado este tiempo las membranas fueron lavadas dos veces, primero con agua libre de partículas y después con etanol; fueron secados sobre papel absorbente (después de la permeabilización las membranas pudieron ser almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por varias semanas).

d) Hibridación

Para llevar a cabo la hibridación, las membranas de 47 mm de diámetro se cortaron en secciones iguales, las cuales fueron rotuladas con lápiz sobre el borde; cada sección se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad, fueron 13 tubos eppendorf que contenían un tipo de sonda universal o específica las cuales se encontraban marcadas con peroxidasa de rábano picante (del inglés *horseradish peroxidase* o HRP, 50 ng/μL), además de agregar el competidor correspondiente. Paralelamente se agregó el buffer de hibridación de acuerdo con la concentración de formamida recomendada para cada especificidad (Greuter *et al.*, 2016). Se dejó hibridar en un ultratermostato (Thermomixer, Eppendorff) a 35 °C por al menos 15h. Todas las sondas empleadas en este análisis fueron sintetizadas por Thermo Scientific [Cuadro 1].

Cuadro 1. Sondas de oligonucleótidos marcadas con peroxidasa de rábano picante (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 receptor catalizado (CARD-FISH), propuesto por Salcher *et al.* (2011a).

<i>Sonda</i>	<i>Grupo objetivo</i>	<i>Secuencia de la sonda (5' - 3')</i>	<i>Referencias</i>
EUB I-III	Bacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Amann <i>et al.</i> , 1990 Daims <i>et al.</i> , 1999
NON338	Control negativo	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Daims <i>et al.</i> , 1999
ALF968	Alphaproteobacteria	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	Wallner <i>et al.</i> , 1993
PAR1457	Género <i>Paracoccus</i>	GGT AAG GTT CTG CGC GTT	Neef, 1997
LD12-121	Clado SAR11 III-b	CTA CCG TGG TCC GCT GCC	Neef <i>et al.</i> , 1996
BET42a	Betaproteobacteria	CAC AAG GCA GAT TCC CAC AT	Salcher <i>et al.</i> , 2011
BET42a-C	Competidor para BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	Manz <i>et al.</i> , 1992
GAM42a	Gammaproteobacteria	GCC TTC CCA CAT CGT TT	Manz <i>et al.</i> , 1992
GAM42a-C	Competidor para GAM42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	Manz <i>et al.</i> , 1992
SRB385	Bacterias sulfato reductoras	GCC TTC CCA CAT CGT TT	Manz <i>et al.</i> , 1992
PLA 886	Planctomycetes	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	Amann <i>et al.</i> , 1990
CF319a	Bacteroidetes	GCCTTGCGACCATACTCCC	Neef <i>et al.</i> , 1998
HGC 69a	Actinobacteria	TGG TCC GTG TCT CAG TAG	Manz <i>et al.</i> , 1996
ARCH915	Archaea	TA TAGTTACCACCGCCGT	Roller <i>et al.</i> , 1994
CREN537	Thaumarchaeota	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Stahl y Amann, 1991
		TGA CCA CTT GAG GTG CTG	Teira, 2004

e) Lavado

Las secciones de las membranas se lavaron durante 20 minutos en buffer de lavado (precalentado a 37 °C). Una vez transcurrido el tiempo las secciones de las membranas fueron retiradas del buffer de lavado y fueron colocadas en tubos eppendorf el cual contenía buffer

salino de fosfatos (1×; pH: 7.6) durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad (cuidando de no dejar secar las secciones de los filtros por un tiempo prolongado ya que podría reducir la actividad de la enzima HRP).

f) Deposición catalizada (amplificación de la señal CARD)

Se mezcló en un tubo eppendorf buffer de amplificación más solución de peróxido de hidrógeno y tiramida marcada con Alexa 448. Se colocaron las secciones de las membranas en la mezcla anterior y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 37 °C. Fueron removidas las membranas de la solución quitando el exceso de líquido sobre un papel absorbente. Las membranas fueron lavadas en una caja de Petri con solución salina de fosfatos (1×; pH: 7.6) a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente las membranas fueron lavadas con agua libre de partículas y etanol. En cajas Petri y en oscuridad fueron almacenadas las secciones de las membranas al ser resguardadas también en congelación (-20 °C) hasta el momento de su observación.

7.2.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA

El análisis de las muestras de agua se llevó a cabo a través de empleo de métodos estándar para el análisis de aguas y aguas residuales (APHA, 2005).

Se evaluó la alcalinidad con el método de indicadores, mediante la titulación con fenolftaleína y anaranjado de metilo. Los sulfatos fueron analizados a través del método turbidimétrico.

Se determinaron las concentraciones de los nutrimentos a través de métodos colorimétricos: los nitratos con columna de reducción de cadmio-cobre y por el método de nitritos; los nitritos se analizaron por el método del ácido sulfanílico; el amonio con el método de azul de indofenol; el fósforo total a través de la digestión de la muestra con persulfato y mediante el método de fosfomolibdato; a su vez, este último fue empleado para determinar fósforo soluble reactivo (APHA, 2005).

7.3 TRABAJO DE GABINETE

7.3.1 CUANTIFICACIÓN DE LA ABUNDANCIA DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE TOTAL Y PICOCIANOBACTERIAS

El cálculo de la abundancia celular del picoplancton procarionte total se llevó acabo retomando el conteo directo de las células y transfiriéndolos en hojas de Microsoft Excel, a su vez se empleó la corrección debida al fijador, así como una constante (obtenida al considerar el área de filtración y área del campo contado), el promedio de células bacterianas y el volumen de la muestra [Cuadro 2].

Las Picocianobacterias fueron contabilizadas a través de utilizar cuadrículas diseñadas en el programa Microsoft Power Point; estas se colocaron sobre las imágenes previamente tomadas, posteriormente se llevó acabo el mismo procedimiento empleado para calcular la abundancia del picoplancton procarionte total.

Cuadro 2. Cuantificación de abundancia celular del Picoplancton procarionte

$$Abundancia \text{ (cél. mL}^{-1}\text{)} = \frac{(cf * cte * Pm \text{ cél.})}{Vol. muestra}$$

Corrección debida al fijador = cf
Constante = cte
Promedio de células bacterianas = Pm cél.
Volumen de la muestra filtrada (mL⁻¹) = Vol. muestra

7.3.2 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE TOTAL Y PICOCIANOBACTERIAS

La biomasa del picoplancton procarionte se evaluó a partir de analizar imágenes fotográficas, mediante el uso del programa de análisis de imagen Image J versión 1.33 (USA), las dimensiones morfométricas bacterianas (área, perímetro, Feret o largo máximo) obtenidas por este programa de computo fueron transferidas a una hoja de cálculo de Microsoft Excel con macros, los cuales ayudaron a calcular los parámetros bacterianos como lo fue el contenido de carbono.

El contenido de carbono del picoplancton procarionte total se determinó de acuerdo con las relaciones alométricas que guarda con el volumen celular empleando para ello la ecuación alométrica de Loferer-Krößbacher (Posch *et al.*, 2001), mientras que para las Picocianobacterias se empleó la constante de Weisse y Stadler (2006).

Con los datos del volumen celular y del contenido de carbono multiplicados por la abundancia de los grupos autotróficos y heterotróficos del picoplancton se estimó el biovolumen y la biomasa respectivamente.

7.3.3 CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE HIBRIDACIÓN PARA DOMINIOS Y GRUPOS ESPECÍFICOS DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE TOTAL

El paso final de la hibridación *in situ* fue la detección de la sonda marcada que hibridó con las células, por lo que se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Leica, Alemania), con un lente de inmersión 100× apocromático. Se seleccionaron campos al azar, donde la observación fue a través del empleo de un cubo de filtros I3 (FITC, AO) con un haz de luz azul que permite la excitación del fluorocromo Alexa 488 permitiendo observar la fluorescencia verde de aquellas células hibridadas, así mismo fueron contabilizadas todas las células de la misma área teñidas con DAPI (células totales) las cuales presentan una coloración azul, al ser excitadas con un haz de luz ultravioleta (emisión 470 nm, con un cubo de filtros A -UV-). El propósito de este conteo con DAPI es obtener la abundancia relativa o el porcentaje de células presentes para cada sonda universal y específica de oligonucleótidos. Entre 400 y 600 células teñidas con DAPI fueron contabilizadas para obtener un error de conteo inferior al ±5% (Hobbie *et al.*, 1977; Porter y Feig, 1980).

Una vez contabilizado el total de células procariontes teñidas con DAPI se obtuvo el porcentaje de las células hibridadas para cada sonda específica de oligonucleótido [Cuadro 3].

Cuadro 3. Estimación de la abundancia relativa para los taxa del lago La Preciosa.

$$\% \text{ de hibridación del taxon } X = \frac{\text{Células marcadas con Alexa 488}}{\text{Células teñidas con DAPI}} \times 100$$

7.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos del picoplancton procarionte se integraron a una base de datos con la finalidad de evaluar gráficamente su patrón de variación espacial y temporal de los grupos funcionales heterótrofos y autótrofos (con el programa Microsoft Excel).

Se validaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, para determinar si se aplicaba estadística paramétrica o no paramétrica, considerando el uso de transformaciones de los datos con el propósito de estandarizar y normalizar.

Para la estratificación se calculó la media aritmética de las abundancias de los taxa y nutrimentos con el propósito de regionalizar los estratos de la columna de agua (epilimnion, metalimnion e hipolimnion).

Las abundancias de los taxa procariontes y las variables ambientales fueron examinadas a través de un método de ordenación multivariado, para ello se empleó un análisis de correspondencia canónica sin tendencia (ACCST) (Ter Braak, 1986) empleando el programa de cómputo CANOCO versión 4.5. El objetivo de emplear este método permitió observar y analizar de manera simultánea las relaciones de los grupos procariontes con las diversas variables físico-químicas analizadas.

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS

8.1.1 TEMPERATURA

El agua del lago La Preciosa para el año 2014 registró una temperatura mínima de 14.5 °C hacia el fondo, y hacia la superficie una temperatura máxima de 21 °C. Al comienzo de este ciclo, la temperatura registrada permaneció homogénea, lo que favoreció que la columna de agua se mantuviera mezclada; esta fase de mezcla comprendió desde finales de diciembre del 2013 a finales de marzo 2014 [Fig. 2A]; por lo que en el presente trabajo se eligió el mes de febrero como representativo de esta fase [Fig. 3], registrando un intervalo de temperatura de 14.5 a 16.5 °C.

En el mes de marzo disminuyó la acción del viento y empezó a intensificarse la radiación solar, lo que generó un aumento en la temperatura superficial del lago, produciendo diferencias en densidad dentro de la columna de agua, dando como resultado para el lago La Preciosa la formación de una segunda fase; denominada como estratificación, la cual se presentó para el resto de los meses que comprende el año 2014 [Fig. 2A].

Durante la fase de estratificación se establecieron tres etapas hidrodinámicas características:

-Estratificación temprana, la cual quedó representada por el mes de abril [Fig. 3], donde fue notorio el incremento de la temperatura superficial del agua al registrar una temperatura máxima de 19.5 °C y en el fondo de la columna una temperatura de 15 °C (Fig. 2A).

Al aumentar la temperatura superficial se originaron dos masas de agua; una ubicada desde la superficie hasta los 13 m de profundidad la cual correspondió al epilimnion y otra masa de agua ubicada desde los 23 m hipolimnion, misma que registró una temperatura de 14.5 °C.

La termoclina en la estratificación temprana se ubicó desde los 13 hasta los 22 m de profundidad, indicando así una amplitud de 9 m de profundidad, mientras que la termoclina planar se localizó a los 20 m y cuyo gradiente máximo fue de 0.27°C [Fig. 3].

-Estratificación bien establecida representada en el mes de agosto. Para esta etapa hidrodinámica se observó una temperatura superficial promedio de 19.5 °C y hacia la parte más profunda del cuerpo de agua una temperatura de 16.0 °C. Durante esta fase, el límite superior de la termoclina se profundizó cercanamente a los 16 m de profundidad, con un límite inferior aproximado a 25 m, registrando una temperatura que osciló de 18.0 a 16.0 °C [Fig. 3], en tanto que la termoclina planar se ubicó a los 18 m, registrando una diferencia máxima por metro de profundidad de 0.65 °C.

-Estratificación tardía caracterizada en el mes de noviembre. Etapa en la cual la termoclina se profundiza y disminuye en amplitud (2m), se observa en la figura [Fig. 3] que el límite superior de la termoclina se ubicó a 28 m de profundidad, mientras que el límite inferior se localizó a 30 m de profundidad. La mezcla comienza a afectar a gran parte de la columna de agua, permitiendo notar el rompimiento de la estratificación.

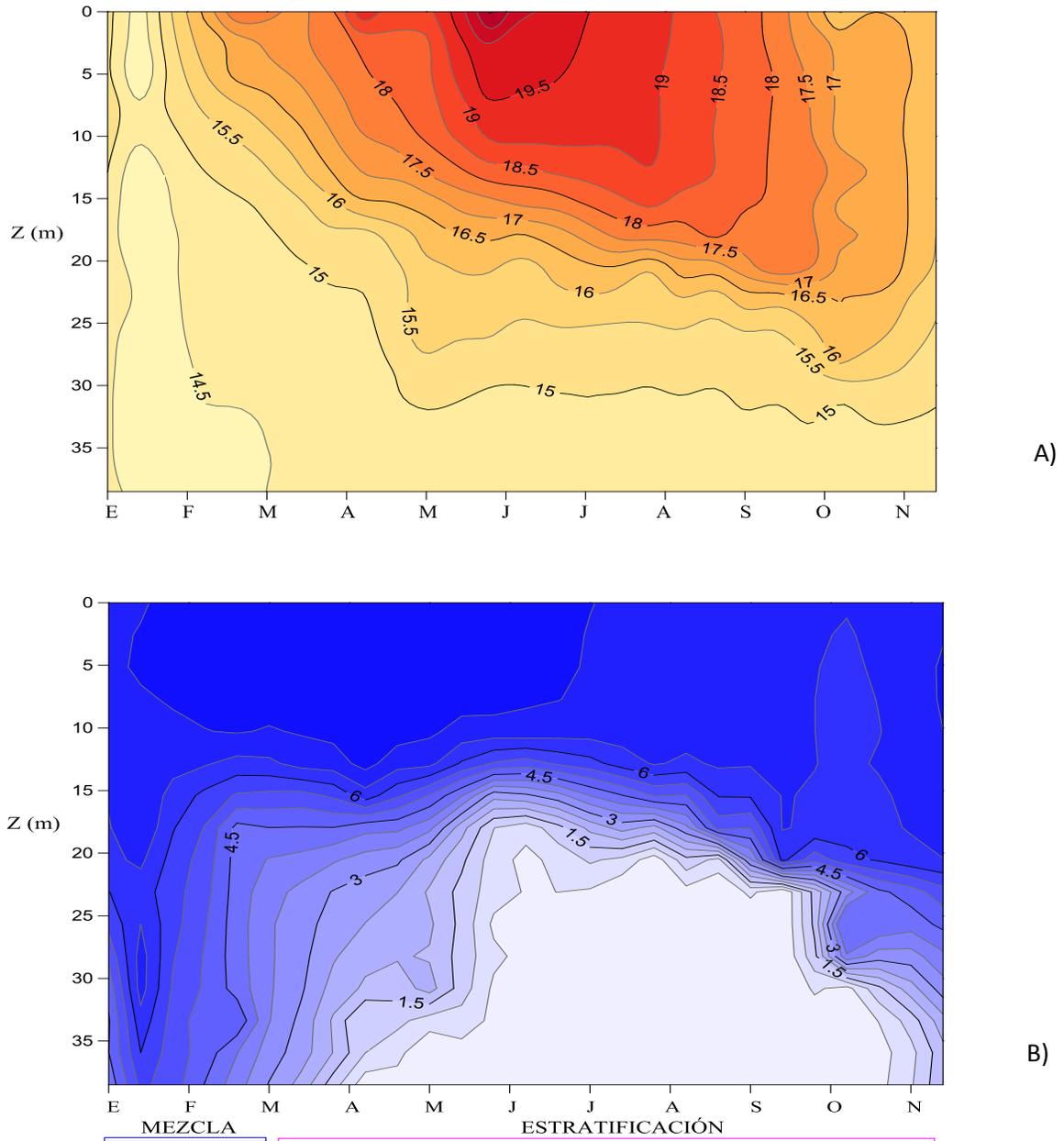


Figura 2. Diagramas espacio-tiempo de A) Temperatura y B) Oxígeno disuelto para la columna de agua del lago La Preciosa durante el año 2014. Se indican las fases hidrodinámicas: en la barra inferior se marca en azul y en rosa los periodos de mezcla y estratificación, respectivamente.

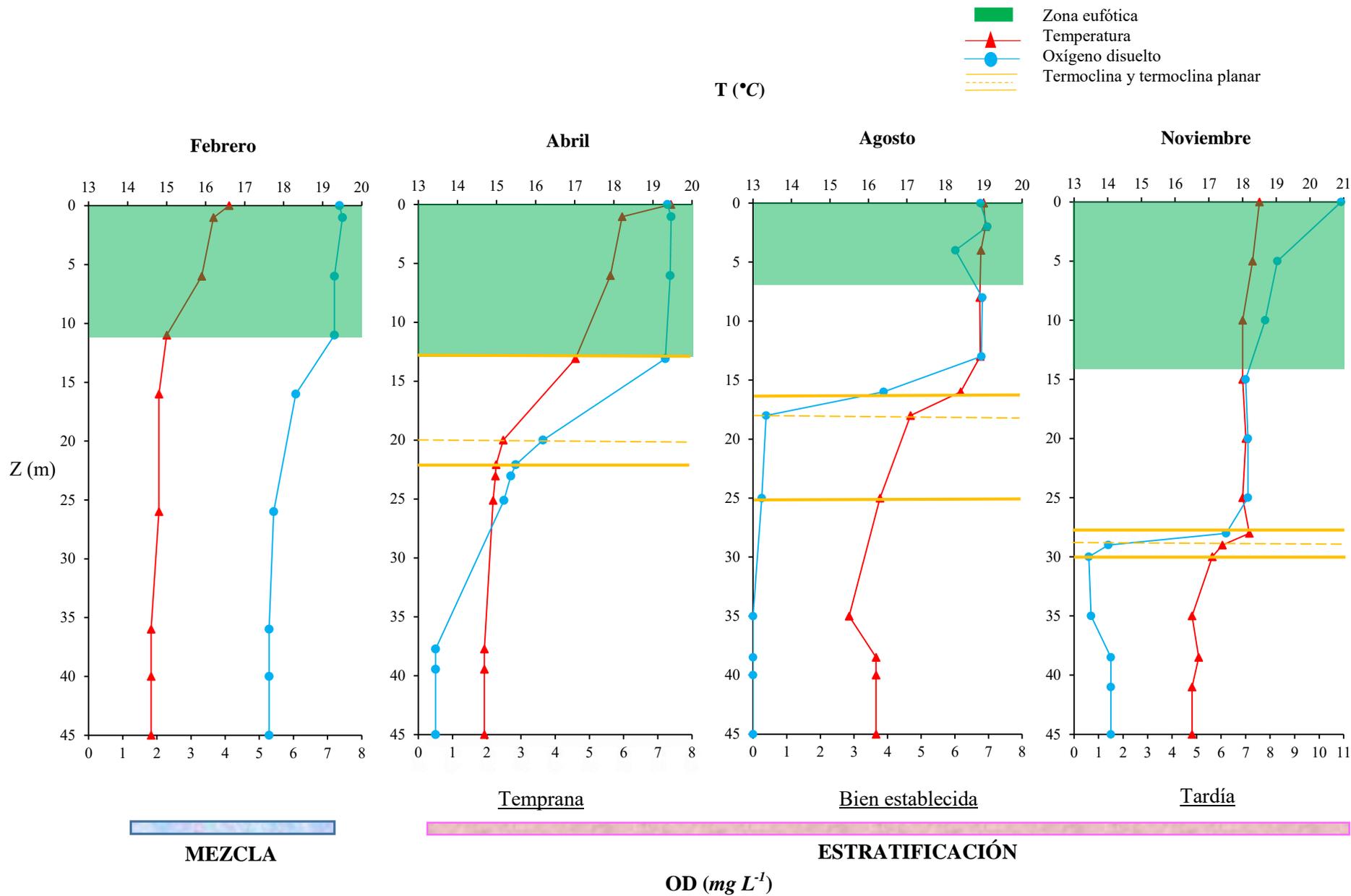


Figura 3. Perfiles verticales de temperatura y oxígeno disuelto para la fase de mezcla y estratificación. Se han indicado las etapas de la estratificación, así como el mes que lo representa; se indica en cada perfil la amplitud zona eufótica, termoclina (línea sólida) y termoclina planar (línea punteada).

8.1.2 ZONA EUFÓTICA

La profundidad eufótica fluctuó a través del tiempo, así para el periodo de mezcla (febrero) la zona eufótica llegó hasta los 12 m de profundidad aproximadamente, en tanto que para la estratificación temprana (abril) aumenta en 1 m con respecto al mes anterior [Fig. 3].

Durante la estratificación bien establecida (agosto) se registró una reducción de la zona eufótica, llegando a tener una amplitud de 8 m, observando en la figura [Fig. 3] que la zona eufótica se encontró marcadamente distante de la termoclina.

Finalmente, para la estratificación tardía, se aprecia que la zona eufótica gana profundidad a diferencia de la fase de mezcla y a los periodos de estratificación que antecedieron a ella, alcanzando una profundidad máxima de 15 m de profundidad [Fig. 3].

8.1.3 OXÍGENO DISUELTO

En la fase de mezcla para el lago La Preciosa, la concentración del oxígeno disuelto osciló entre 5.3 y 7.4 mg L⁻¹ a lo largo de toda la columna de agua [Fig. 3].

Para la etapa temprana de la fase de estratificación se observó una concentración de oxígeno disuelto de 7.2 mg L⁻¹ en el epilimnion, en tanto que el metalimnion mostró un gradiente en la concentración de oxígeno que osciló entre 5.3 y 7.24 mg L⁻¹, comparado con el hipolimnion, quien registró un decremento en concentración, disminuyendo de 2.8 a 0.5 mg L⁻¹.

En la estratificación bien establecida para el epilimnion se registró una concentración máxima de 6.9 mg L⁻¹, mientras en el metalimnion alcanza una concentración máxima de 3.9 mg L⁻¹, registrando una oxíclina marcada que se ubicó entre los 13 y 18 m. Por otra parte, para el hipolimnion se observó un decremento de oxígeno disuelto, hallando concentraciones de cero mg L⁻¹ hacia el fondo del sistema [Fig. 3].

Finalmente, para la tercera etapa de estratificación, se registraron en la capa superficial del epilimnion concentraciones 10.9 mg L⁻¹ y en el resto del estrato de 7.1 mg L⁻¹. El metalimnion mostró una concentración máxima de 6.2 mg L⁻¹ [Fig. 3] con un claro descenso de la oxíclina la cual se acopló con la termoclina. En el hipolimnion las concentraciones de oxígeno disuelto fluctuaron alrededor de 1.5 mg L⁻¹.

8.1.4 SALINIDAD, CONDUCTIVIDAD, ALCALINIDAD Y PH

En el cuadro 4 se muestra la concentración promedio de parámetros químicos, algunos de ellos, a pesar de mostrar variaciones mínimas a través del tiempo, representan un cambio significativo para las condiciones prevalecientes en el sistema; un ejemplo es el potencial de hidrógeno (pH), que de manera particular para la fase de mezcla registró un pH de 8.9 ± 0.1 , mientras que para la estratificación temprana se obtuvo un pH de 8.7 ± 0.2 ; pero cuando se dio el establecimiento de la estratificación se observó un incremento, registrando un pH de 9.2 ± 0.1 , en tanto que, al final de la estratificación se mantuvo éste pH en valores de 9.1 ± 0.1 .

Cuadro 4. Concentraciones promedio y desviación estándar de parámetros químicos para las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa.

pH	Alcalinidad <i>meq. L⁻¹</i>	Sólidos disueltos totales <i>g L⁻¹</i>	Conductividad eléctrica <i>mS cm⁻¹</i>
9.0 ± 0.3	Carbonato 9.3 ± 1.5 Bicarbonato 5.3 ± 1.2	1.1 ± 0.2	2.2 ± 0.1

La conductividad eléctrica está relacionada con la presencia de sales en disolución cuya disociación genera iones positivos y negativos capaces de transportar energía eléctrica, como lo fue a la hora de evaluar la conductividad para muestras de agua que fueron tomadas para el lago La Preciosa, la cual registró un valor promedio de 2.2 ± 0.1 mS cm⁻¹ y donde los sólidos disueltos totales calculado fue de 1.1 ± 0.2 g L⁻¹

Durante las fases de mezcla y estratificación del lago La Preciosa se registró una dominancia de carbonato (9.3 ± 1.5 meq. L⁻¹) sobre bicarbonato (5.3 ± 1.2 meq. L⁻¹). De manera particular para la fase de mezcla se midió una alcalinidad de carbonato de 12.3 ± 1.5 meq. L⁻¹, mientras que la alcalinidad de bicarbonato para esta fase hidrodinámica fue de 3.5 ± 1.2 meq. L⁻¹. Al dar paso a la segunda fase; que correspondió con la estratificación, ésta registró en su primera etapa una alcalinidad de carbonato de 8.7 ± 1.5 meq. L⁻¹, en tanto que su alcalinidad de bicarbonato fue de 6.4 ± 1 meq. L⁻¹. La estratificación bien establecida mostró un incremento en la alcalinidad de carbonato (11.4 ± 3.2 meq. L⁻¹) a diferencia de la etapa anterior, siendo que para la alcalinidad de bicarbonato se observó variación en su

concentración al registrar 3.1 ± 2.0 meq. L⁻¹. Finalmente, para la última etapa de la estratificación la alcalinidad de carbonato (8.4 ± 1.4 meq. L⁻¹) y bicarbonato (4.9 ± 1.0 meq. L⁻¹) vuelven a mostrar variación [Cuadro 4].

8.1.5 NUTRIMENTOS

Durante la fase de mezcla la concentración de nitrato registrado en la columna de agua fue de 0.29 ± 0.16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO₃⁻, este nutriente aumenta significativamente durante el comienzo de la primera etapa de estratificación, registrando una concentración promedio de 0.45 ± 0.35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO₃⁻. En las siguientes etapas de estratificación este máximo alcanzado decrece consecutivamente, registrando una concentración promedio en la estratificación tardía de 0.04 ± 0.02 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO₃⁻ [Cuadro 5].

Cuadro 5. Concentración promedio y desviación estándar de nutrientes y del ion sulfato para las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa.

Nutriente	MEZCLA	ESTRATIFICACIÓN		
	$\mu\text{mol L}^{-1}$	$\mu\text{mol L}^{-1}$		
	Febrero	Temprana Abril	Bien establecida Agosto	Tardía Noviembre
Nitrato (NO ₃ ⁻)	0.29 ± 0.16	0.45 ± 0.35	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Nitrito (NO ₂ ⁻)	0.012 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.02 ± 0.01	0.014 ± 0.01
Amonio (NH ₄ ⁺)	3.37 ± 4.00	4.28 ± 1.00	4.59 ± 1.00	3.81 ± 4.00
Fósforo soluble reactivo (FSR)	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01
Fósforo total (FT)	0.57 ± 0.24	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.09 ± 0.04
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	732 ± 78	339 ± 19	413 ± 22	472 ± 22

De manera particular, se pueden observar cambios en la concentración de nitrato para los diferentes estratos que componen las etapas de estratificación. Notando, por ejemplo, que existe una mayor concentración de nitrato hacia la zona del hipolimnion de la columna de agua, registrado una concentración 0.78 ± 0.23 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO₃⁻ para la etapa temprana de la estratificación, mientras que, el epilimnion fue el estrato con la mínima concentración de nitratos registrado 0.06 ± 0.06 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO₃⁻, en tanto que el metalimnion mostró una concentración de 0.21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO₃⁻.

La estratificación bien establecida mostró una máxima concentración en la zona del epilimnion alcanzando 0.06 $\mu\text{mol L}^{-1}$ NO₃⁻, tanto el metalimnion como los hipolimnion

pertenecientes a esta etapa hidrodinámica registraron homogeneidad en sus concentraciones las cuales fueron $0.05 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_3^-$.

Destaca una mayor concentración de este nutriente en la zona del metalimnion, correspondiente a la última etapa de estratificación, donde registró una concentración de $0.08 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_3^-$. Es posible observar en la figura [Fig. 4], que el epilimnion es el siguiente estrato con mayor concentración $0.04 \pm 0.01 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_3^-$, comparado con el hipolimnion cuya concentración fue de $0.020 \pm 0.001 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_3^-$.

Con respecto a los nitritos, la concentración promedio para la fase de mezcla fue de $0.012 \pm 0.01 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$, comparado con la fase de estratificación; en la que destaca un incremento durante la etapa bien establecida ($0.02 \pm 0.01 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$) a diferencia de la etapa que antecede, cuya concentración ($0.002 \pm 0.001 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$) fue la mínima registrada durante esta fase. Se registró una disminución en la concentración de los nitritos durante la etapa tardía la cual fue de $0.014 \pm 0.01 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$ [Cuadro 4].

En la fase de estratificación, destaca una variabilidad en la concentración de este nutriente [Cuadro 6], notando en el caso de la etapa temprana máximos alcanzados en la zona del epilimnion y metalimnion ($0.003 \pm 0.001 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$), comparado con el metalimnion cuya concentración fue de $0.002 \pm 0.001 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$.

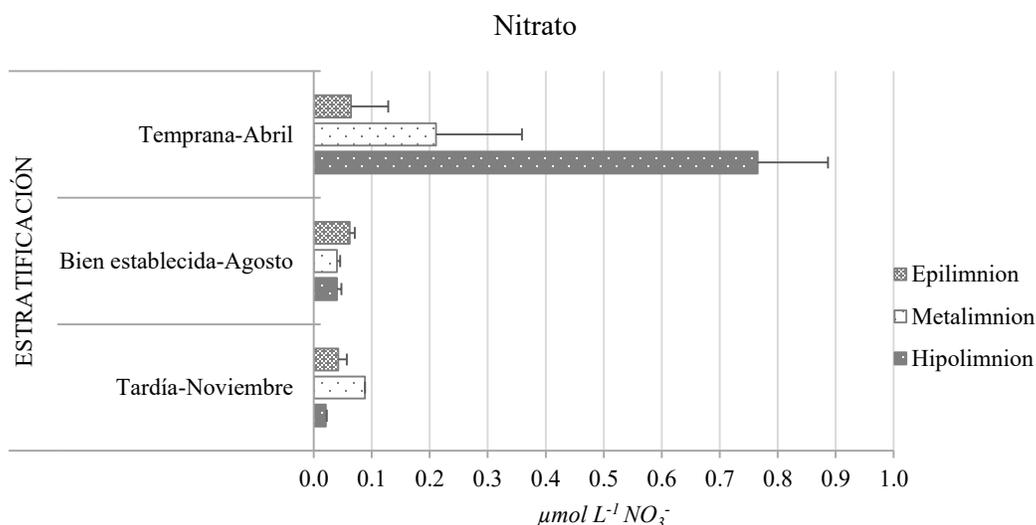


Figura 4. Concentración promedio de nitrato en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.

Durante la estratificación se registró un incremento en la concentración de nitrito; lo anterior ocurrió en la sucesión de la etapa temprana a la bien establecida, en esta última etapa se registró un máximo ubicado en la zona del metalimnion; hallando una concentración de $0.033 \pm 0.007 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$, seguido de este máximo se registró la concentración de $0.022 \pm 0.012 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$ localizado en la capa profunda, finalmente en la zona del epilimnion se registró una concentración de $0.020 \pm 0.006 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$.

Cuadro 6. Concentración promedio de nitrito en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.

		Epilimnion	Metalimnion	Hipolimnion
ESTRATIFICACIÓN <i>$\mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$</i>	Temprana-Abril	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.002 ± 0.001
	Bien establecida- Agosto	0.020 ± 0.006	0.033 ± 0.007	0.022 ± 0.013
	Tardía-Noviembre	0.017 ± 0.005	0.008 ± 0.007	0.008 ± 0.007

En el último periodo de estratificación; se observó un descenso gradual de la concentración de este nutriente para los distintos estratos, registrando una concentración de $0.017 \pm 0.005 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$, en tanto que el metalimnion e hipolimnion registraron una concentración de $0.008 \pm 0.007 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NO}_2^-$.

En el cuadro 4 se observa que el amonio fue el nutriente que registró una evidente variación entre la fase de mezcla y estratificación, mostrando concentraciones máximas para la mezcla de $3.37 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$, seguido a su vez por la estratificación temprana y bien establecida, cuyas concentraciones oscilaron entre 4.28 a $4.59 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$, mientras que, para el resto de la estratificación, se registró una disminución ($3.8 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$) en las concentraciones alcanzadas de este nutriente; sin embargo, resulta interesante observar que la distribución de este nutriente durante la fase de estratificación, presenta diferencias en los distintos estratos de la columna de agua [Fig. 5].

La distribución de la concentración del amonio en los estratos de la columna de agua fue de manera creciente desde la capa superficial hacia el fondo, observando en la estratificación temprana máximos ubicados en la zona del metalimnion ($4.32 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$) seguida del hipolimnion ($4.58 \pm 1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$), en tanto que el epilimnion registró una concentración de $3.59 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$.

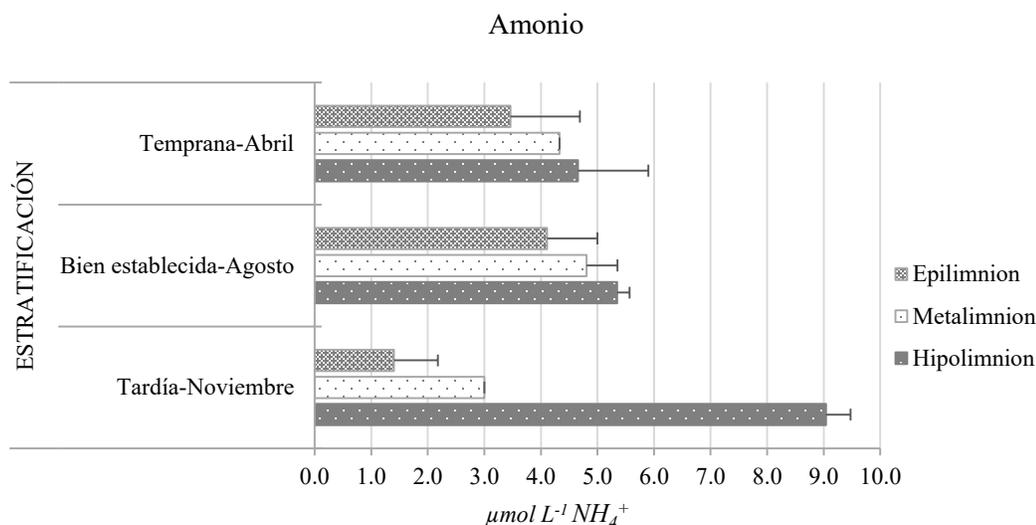


Figura 5. Concentración promedio de amonio en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.

La estratificación bien establecida mostró una concentración de $4.10 \pm 0.89 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$ en la zona del epilimnion, situando en el hipolimnion una máxima concentración del amonio de $5.34 \pm 0.21 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$, en tanto que el metalimnion registró un valor de $4.80 \pm 0.054 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$.

El periodo de estratificación tardía mostró una disminución de la concentración del amonio registrado tanto para la zona del epilimnion ($1.39 \pm 0.78 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$) como del metalimnion ($2.99 \pm 0.012 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$); comparado con los estratos de las etapas hidrodinámicas anteriores. En esta última etapa se observó un máximo en la zona del hipolimnion, cuya concentración alcanzó $9.03 \pm 0.43 \mu\text{mol L}^{-1} \text{NH}_4^+$ [Fig. 5].

La concentración de fósforo soluble reactivo (FSR) permaneció homogénea tanto para la fase de mezcla como para la etapa de estratificación temprana [Cuadro 4]; obteniendo concentraciones promedio para ambos de $0.03 \pm 0.01 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FSR}$, en tanto que las siguientes fases de la estratificación mostraron un aumento considerable, siendo la concentración máxima alcanzada para la estratificación bien establecida $0.09 \pm 0.11 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FSR}$.

El epilimnion de la etapa temprana de estratificación presentó baja concentración de fósforo soluble reactivo ($0.027 \mu\text{mol L}^{-1}$ FSR), notando un incremento desde la zona del metalimnion hacia el hipolimnion y cuyas concentraciones oscilaron entre 0.030 y $0.034 \pm 0.007 \mu\text{mol L}^{-1}$ FSR. El fósforo soluble reactivo se incrementa considerablemente durante el comienzo del periodo de estratificación bien establecida, localizando este máximo en el epilimnion ($0.166 \pm 0.11 \mu\text{mol L}^{-1}$ FSR), comparado con la zona del metalimnion donde se registró una disminución en su concentración ($0.006 \pm 0.003 \mu\text{mol L}^{-1}$ FSR) y que aumenta de manera significativa en el hipolimnion, obteniendo una concentración de $0.033 \pm 0.003 \mu\text{mol L}^{-1}$ FSR.

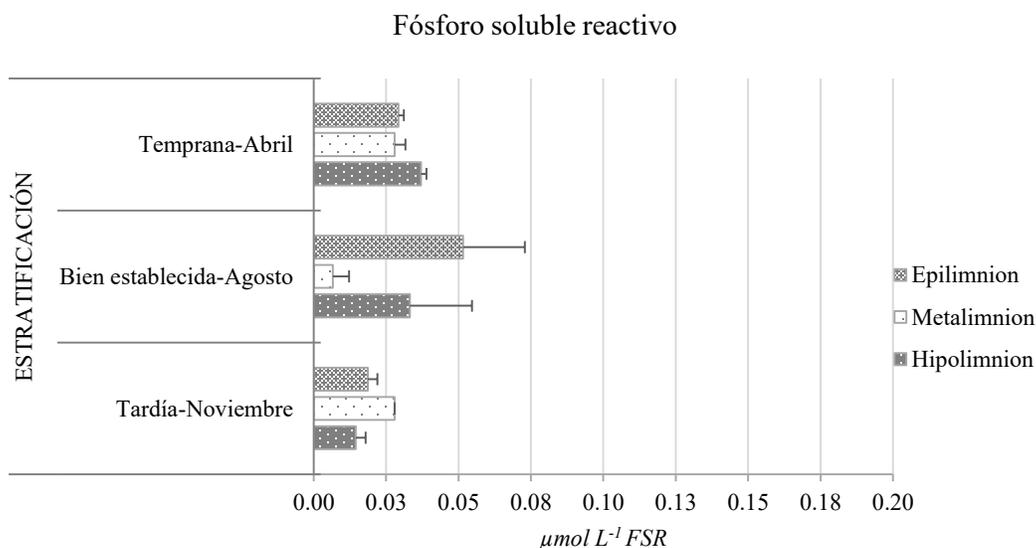


Figura 6. Concentración promedio del fósforo soluble reactivo (FSR) en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.

Para el último periodo de la fase de estratificación, se observó un comportamiento descendente de la concentración de este nutriente, observando que se llega a un mínimo en el hipolimnion ($0.06 \pm 0.001 \mu\text{mol L}^{-1}$ FSR) [Fig. 6].

Fueron registrados dos máximos de concentración de fósforo total (FT), uno correspondió a la fase de mezcla y otro al final de la fase de estratificación. En el periodo de estratificación temprana y bien establecida, se observa un incremento en la concentración del fósforo total [Cuadro 4].

Durante la estratificación temprana se observó en el epilimnion un incremento, registrando la máxima concentración de este nutriente ($0.15 \mu\text{mol L}^{-1}$ FT), mientras que el

metalimnion se observó un descenso en su concentración comparado a lo registrado en el hipolimnion (0.05 ± 0.01 y $0.10 \pm 0.01 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FT}$).

La concentración de fósforo total tanto para la estratificación bien establecida y tardía mostró un incremento desde los estratos superficiales hasta el fondo de la columna de agua [Fig. 7], donde el periodo de estratificación bien establecida registró un máximo en la zona del hipolimnion cuya concentración fue de $0.14 \pm 0.007 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FT}$, mientras que la zona del metalimnion fue de $0.07 \pm 0.02 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FT}$ y el epilimnion registró una concentración mínima de fósforo total $0.03 \pm 0.001 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FT}$ [Fig. 7].

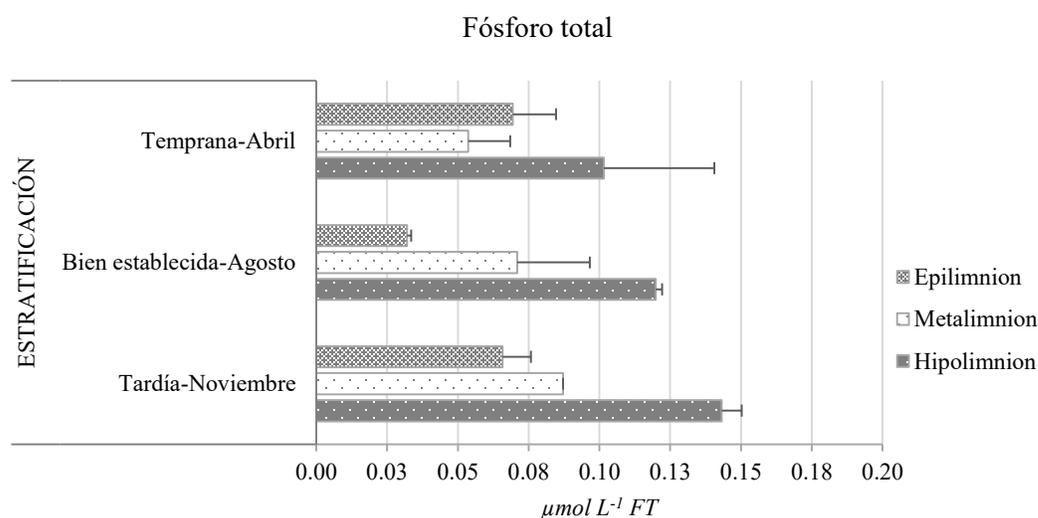


Figura 7. Concentración promedio de fósforo total (FT) en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.

En el último periodo de estratificación se registró en la zona del epilimnion una concentración de $0.06 \pm 0.009 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FT}$, a diferencia del metalimnion ($0.08 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FT}$) cuya concentración fue rebasada en el estrato del hipolimnion ($0.14 \pm 0.007 \mu\text{mol L}^{-1} \text{FT}$).

Las concentraciones de sulfato durante las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa mostraron variabilidad; por ejemplo, las concentraciones promedio durante la fase de mezcla fueron de $732 \pm 78 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$ [Cuadro 7]. En la estratificación se observó una distribución variable de las concentraciones del sulfato, por ejemplo, durante la primera etapa de la estratificación se halló una concentración promedio de $339 \pm 19 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$, observando un patrón creciente de su concentración conforme se desarrollaron las siguientes

etapas, alcanzando un máximo de $472 \pm 22 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$ al término de la estratificación [Cuadro 7].

Los estratos de las diferentes etapas hidrodinámicas indican una variabilidad en su concentración de sulfato, apreciando para la primera etapa una máxima concentración en el metalimnion ($337 \pm 21 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$) seguido del hipolimnion, mismo que registró una concentración de $339 \pm 16 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$. Finalmente, el epilimnion obtuvo una concentración de $341 \pm 36 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$. Para la segunda etapa de la estratificación, se registró una máxima concentración de sulfatos en la zona del epilimnion ($425 \pm 24 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$), comparado con una disminución en el metalimnion ($391 \pm 13 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$) y un incremento registrado en el hipolimnion ($413 \pm 11 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$) [Cuadro 7]. La última etapa de estratificación registró una concentración decreciente entre sus estratos, mostrando su máxima concentración desde el epilimnion ($485 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$), seguida del metalimnion ($465 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$) e hipolimnion ($447 \mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$).

Cuadro 7. Concentración promedio del ion sulfato en la fase de estratificación y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.

ESTRATIFICACIÓN <i>$\mu\text{mol L}^{-1} \text{SO}_4^{2-}$</i>		Epilimnion	Metalimnion	Hipolimnion
	Temprana-Abril	341 ± 36	337 ± 21	339 ± 16
	Bien establecida- Agosto	425 ± 24	391 ± 13	413 ± 11
	Tardía-Noviembre	485 ± 17	$465 \pm --$	447 ± 11

8.2 PARÁMETROS BIOLÓGICOS

8.2.1 ABUNDANCIA DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE TOTAL

La abundancia promedio del picoplancton procarionte total; registrado para la fase de mezcla mostró una abundancia correspondiente a $1.58 \times 10^6 \text{cél. mL}^{-1}$, comparado con el comienzo de la siguiente fase hidrodinámica ya que se observa de manera general un incremento entre las etapas de la estratificación, registrando para la estratificación temprana una abundancia celular promedio de $1.81 \times 10^6 \text{cél. mL}^{-1}$, mientras que en la estratificación bien establecida y tardía mostró una abundancia de $2.00 \times 10^6 \text{cél. mL}^{-1}$.

En la fase de estratificación se nota de manera particular que en las masas de agua por estratos mostraron un comportamiento decreciente de abundancia. Durante la estratificación se registró para la zona del epilimnion una abundancia promedio entre 2.21 y $2.30 \times 10^6 \text{cél. mL}^{-1}$ [Fig. 8B].

En el metalimnion la abundancia del picoplancton procarionte total fluctuó en un intervalo entre 2.13×10^6 y 2.19×10^6 cél. mL⁻¹; mientras que en el hipolimnion oscilaron entre 1.30×10^6 y 1.58×10^6 cél. mL⁻¹ [Fig. 8B].

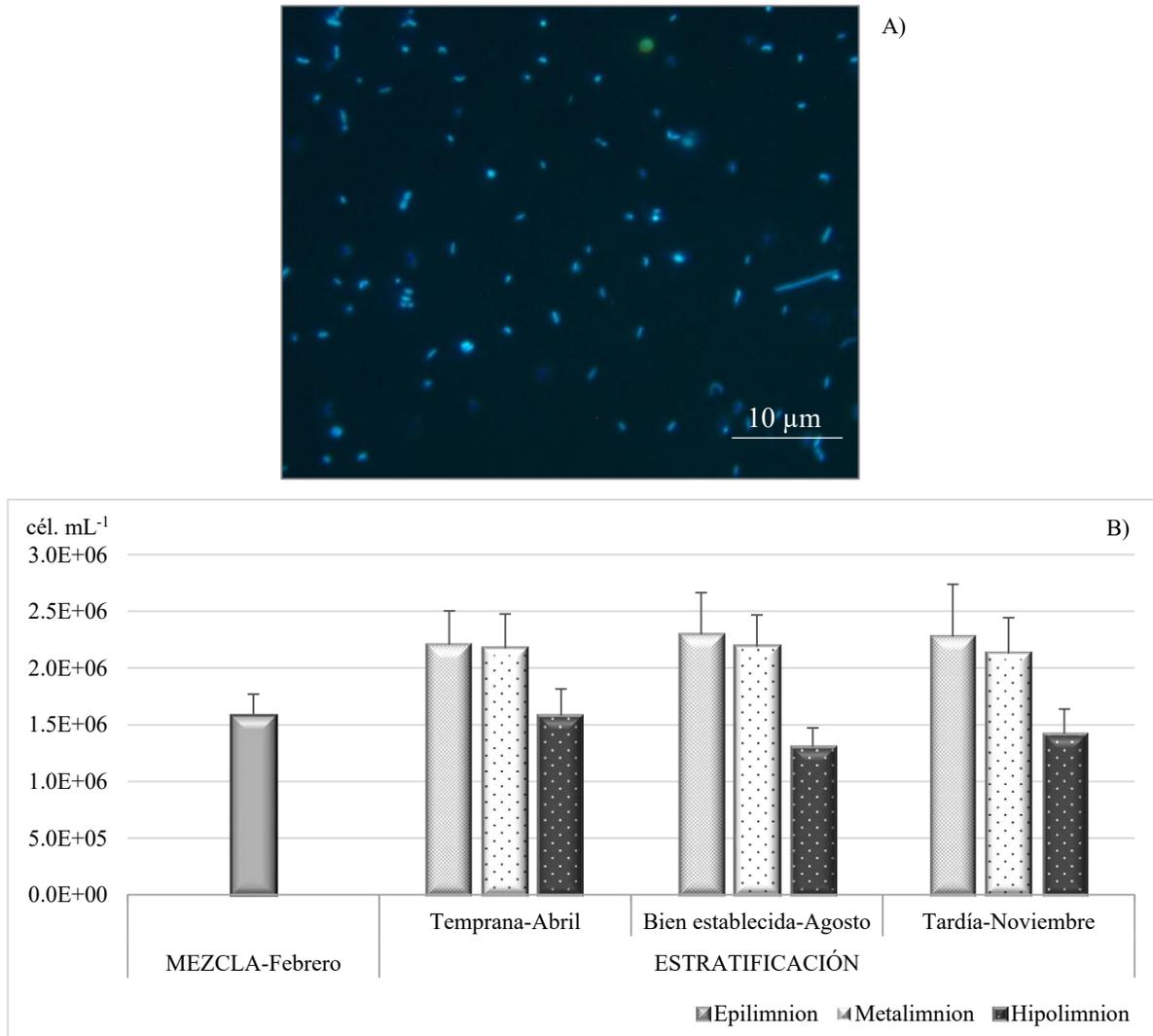


Figura 8. A) Imagen del picoplancton procarionte total al ser observado en el microscopio de epifluorescencia bajo excitación de luz ultravioleta. B) Valor medio y desviación estándar de la abundancia del picoplancton procarionte total durante las fases hidrodinámicas y en los estratos de la columna de agua.

8.2.2 BIOMASA DEL PICOPLANCTON PROCARIONTE TOTAL

La variación temporal de la biomasa del picoplancton procarionte total durante la fase de estratificación, mostró un comportamiento variable; registrando para el comienzo de la estratificación un máximo de biomasa de $37.51 \mu\text{g L}^{-1} C_{\text{org}}$, mientras que la biomasa promedio

tanto para la mezcla, así como para el resto de las estratificaciones varió de 31.48 a 36.94 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$. Para el periodo de estratificación temprana se observa un máximo localizado en la zona del metalimnion (45.25 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$) seguido de una disminución en biomasa para la zona del hipolimnion la cual fue de 33.61 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$, en tanto que el epilimnion mostró una biomasa (41.58 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$) cercanamente parecida a la del metalimnion [Fig. 9]. Contrario a este periodo de estratificación, la bien establecida registró una biomasa máxima en el epilimnion (47.18 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$) y donde se observó poca variabilidad para los estratos del metalimnion e hipolimnion cuya biomasa fluctuó entre 27.17 y 26.22 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$.

En la estratificación tardía se registraron dos máximos de biomasa, uno localizado en la zona del hipolimnion (33.94 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$) y el segundo en epilimnion (32.16 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$); mientras que para el metalimnion se registró una biomasa de 23.87 $\mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$.

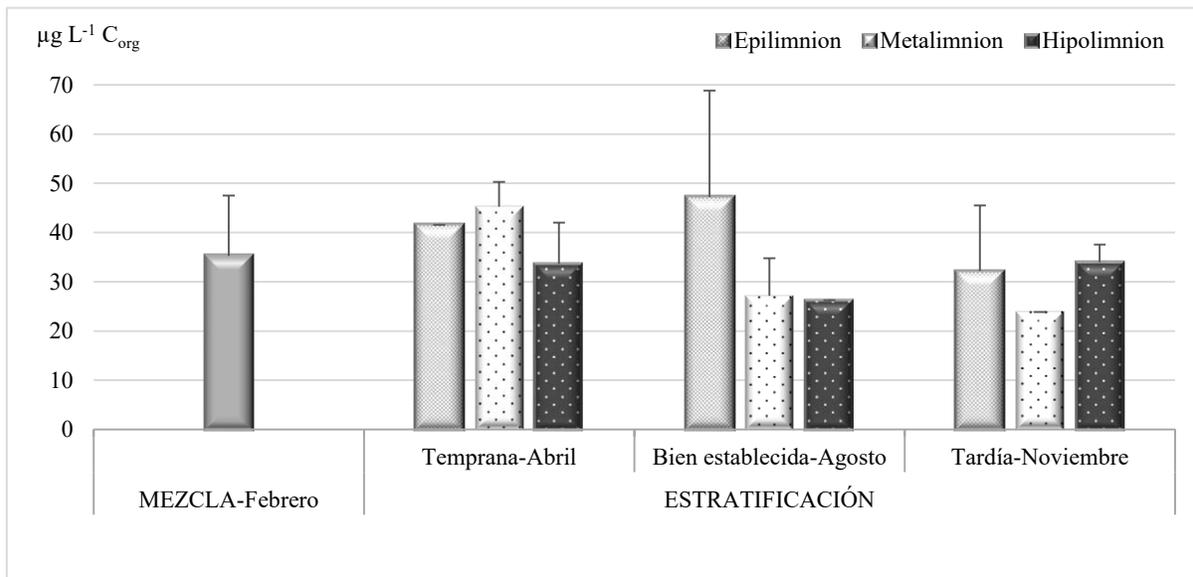


Figura 9. Valor medio y desviación estándar de la biomasa del picoplancton procarionte total durante las fases hidrodinámicas y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.

8.2.3 ABUNDANCIA DE PICOCIANOBACTERIAS

La abundancia de las Picocianobacterias individuales [Fig. 10A] en el lago La Preciosa fue de 7.55×10^4 cél. mL^{-1} durante la mezcla, mientras que en la fase de estratificación se registró un incremento al mostrar una abundancia de 1.54×10^5 cél. mL^{-1} durante la etapa de estratificación temprana, éste incremento no es observado cuando se presenta la bien establecida (9.51×10^4 cél. mL^{-1}) ya que en ella se presenta un descenso en la abundancia de

las Picocianobacterias. Durante el último periodo de estratificación se obtuvo un máximo de abundancia con un valor de 2.22×10^5 cél. mL⁻¹.

En la estratificación temprana se registró un máximo de abundancia que correspondió al epilimnion; cuyo máximo fue de 1.86×10^5 cél. mL⁻¹, mientras que para la etapa de estratificación bien establecida se registró su máximo en la zona del metalimnion con valor de 1.43×10^5 cél. mL⁻¹, finalmente para la estratificación tardía, se cuantificó el máximo de abundancia hacia la zona del epilimnion (3.07×10^5 cél. mL⁻¹) [Fig. 10B].

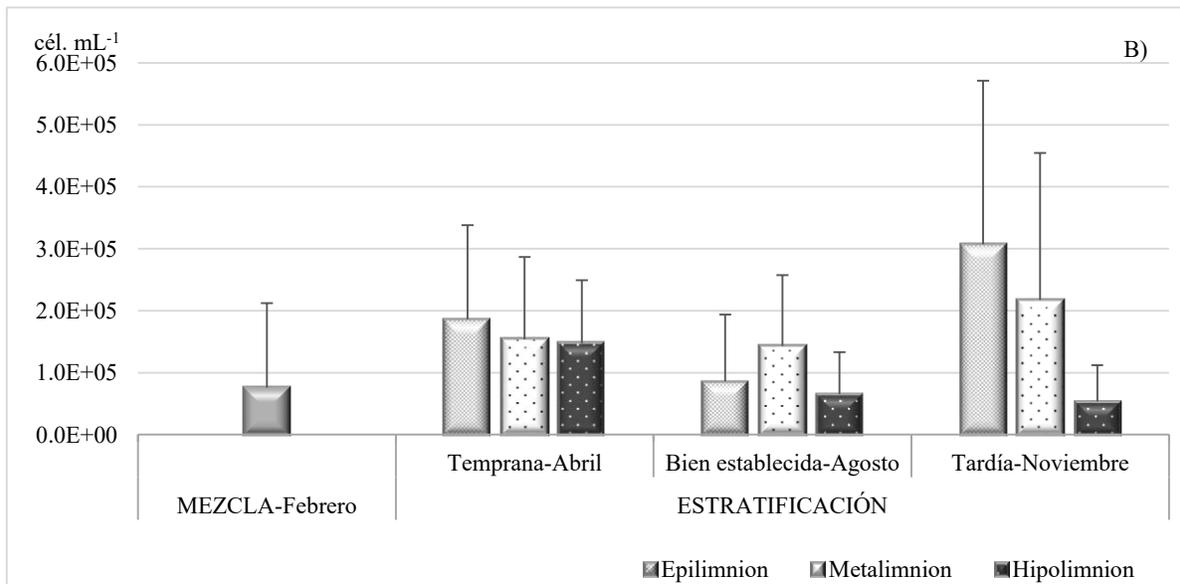
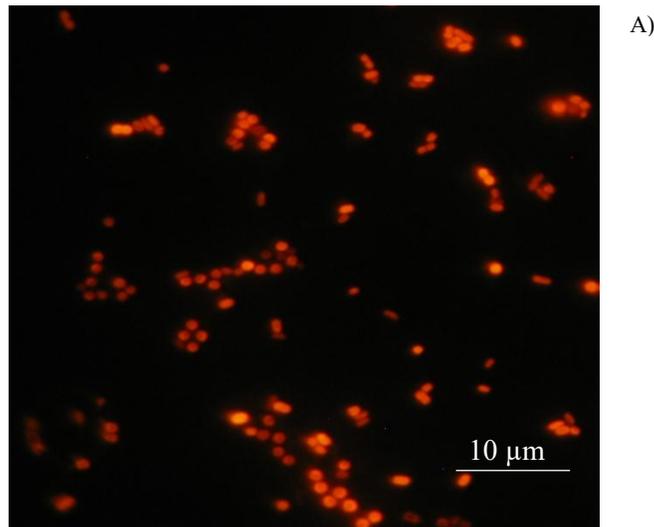


Figura 10. A) Imagen de Picocianobacterias individuales y coloniales al ser observadas en el microscopio de epifluorescencia. B) Valor medio y desviación estándar de la abundancia de Picocianobacterias registradas durante las fases hidrodinámicas y en los estratos de la columna de agua.

Se contabilizó el número de células que contenían las colonias [Fig. 10A], hallando que en promedio para la fase de mezcla se presentaron 16 ± 14 células por colonia [Fig. 11A], registrando así para la misma fase alrededor de 189 ± 13 colonias [Fig. 11B], y que en promedio presentó una abundancia de células coloniales de 1.01×10^4 cél. mL⁻¹ [Fig. 11C].

En la estratificación temprana se registró en promedio que una colonia contenía de 13 a 15 células; donde el último valor fue registrado para el epilimnion [Fig. 11A]; sin embargo, en este estrato se registraron pocas colonias siendo el metalimnion e hipolimnion los estratos que indicaron mayor presencia de colonias (40 y 165) [Fig. 11B] pero con bajo contenido de células (13 ± 6), mientras que la abundancia de las células colonias para estos estratos fue de 8.54×10^3 y 1.90×10^4 cél. mL⁻¹ [Fig. 11C].

En la estratificación bien establecida se registró de 17 a 21 células en promedio por colonia [Fig. 11A], observando que en esta etapa de la estratificación fueron abundantes las colonias para los diferentes estratos; dominando mayoritariamente en el metalimnion y epilimnion (111 ± 9 y 83 ± 19 colonias) [Fig. 11B] y cuya abundancia promedio de células coloniales fue de 9.12×10^3 y 1.25×10^4 cél. mL⁻¹ [Fig. 11C].

El número de células en cada colonia para la estratificación tardía fue en promedio de 15 a 44 células, registrando poca presencia de colonias para los estratos de la columna de agua [Fig. 11B] y en promedio la abundancia de las células coloniales registradas fue de 7.59×10^3 cél. mL⁻¹ para el hipolimnion, mientras que en el metalimnion fue de 2.77×10^4 cél. mL⁻¹ y finalmente para el epilimnion de 4.93×10^4 cél. mL⁻¹ [Fig. 11C].

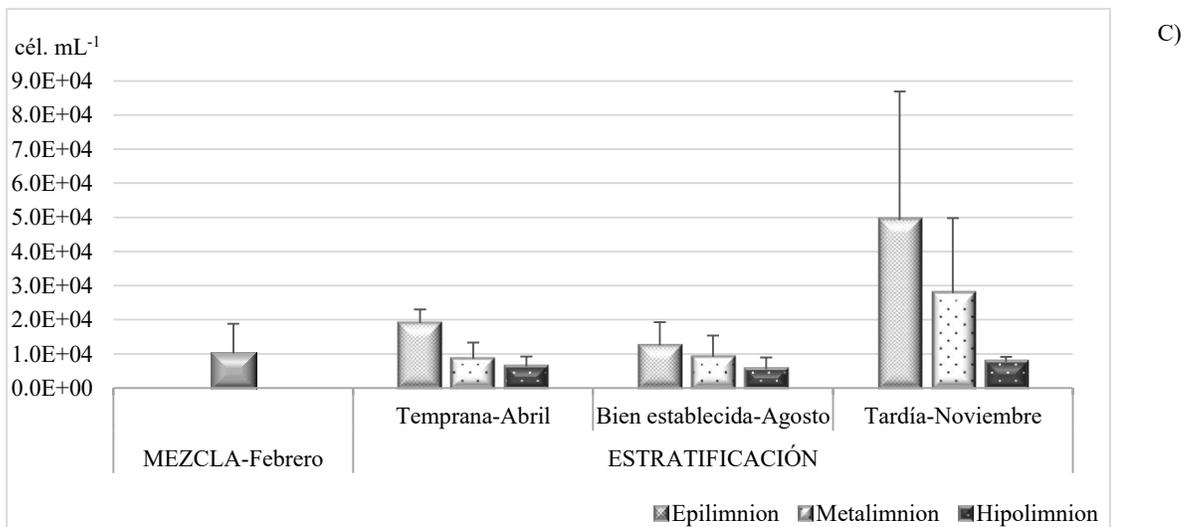
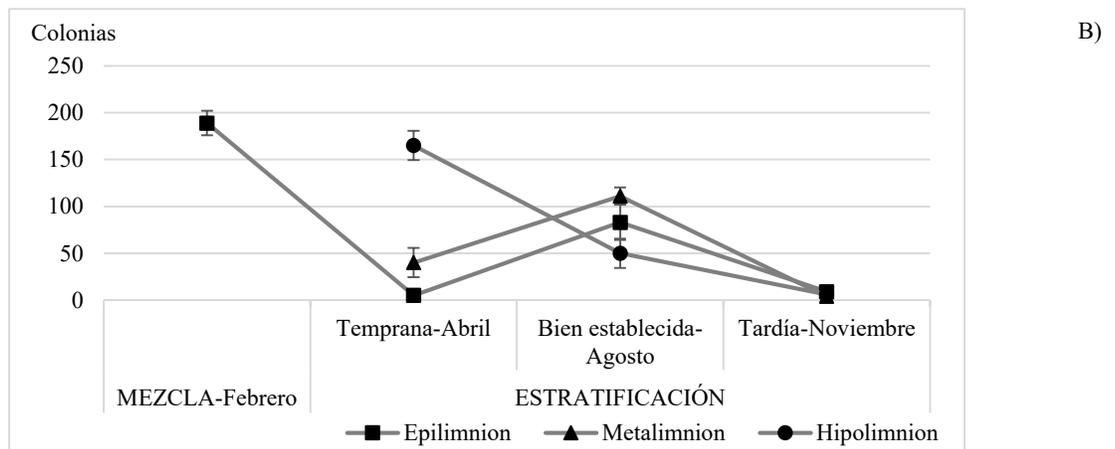
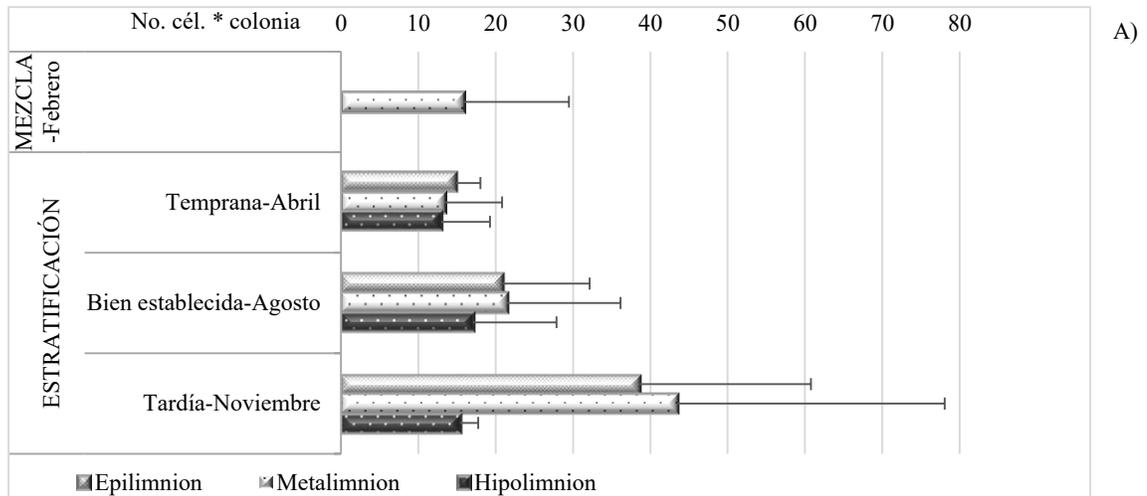


Figura 11. A) Promedio del número de células presentes en cada colonia para las fases hidrodinámicas y estratos en la columna de agua. B) Numero de colonias por fase hidrodinámica. C) Promedio y desviación estándar de la abundancia de células coloniales.

8.2.4 BIOMASA DE PICOCIANOBACTERIAS

La fase de mezcla registró una biomasa de $21.89 \mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$, mientras que la fase de estratificación registró una biomasa de $12.30 \mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$ que correspondió a la estratificación temprana, en tanto que para la segunda etapa de estratificación se registró una biomasa de $3.94 \mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$, y en la última etapa se observó una mayor contribución de biomasa para las Picocianobacterias individuales al registrar un incremento considerable de $39.97 \mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$.

La variación espacial de la biomasa de las Picocianobacterias en el primer momento de la estratificación muestra un incremento localizado hacia el hipolimnion ($13.79 \mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$), comparado con la estratificación bien establecida y tardía cuyos máximos se localizaron en la región del metalimnion ($5.69 \mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$) y el epilimnion ($57.03 \mu\text{g L}^{-1} \text{C}_{\text{org}}$) [Fig. 12].

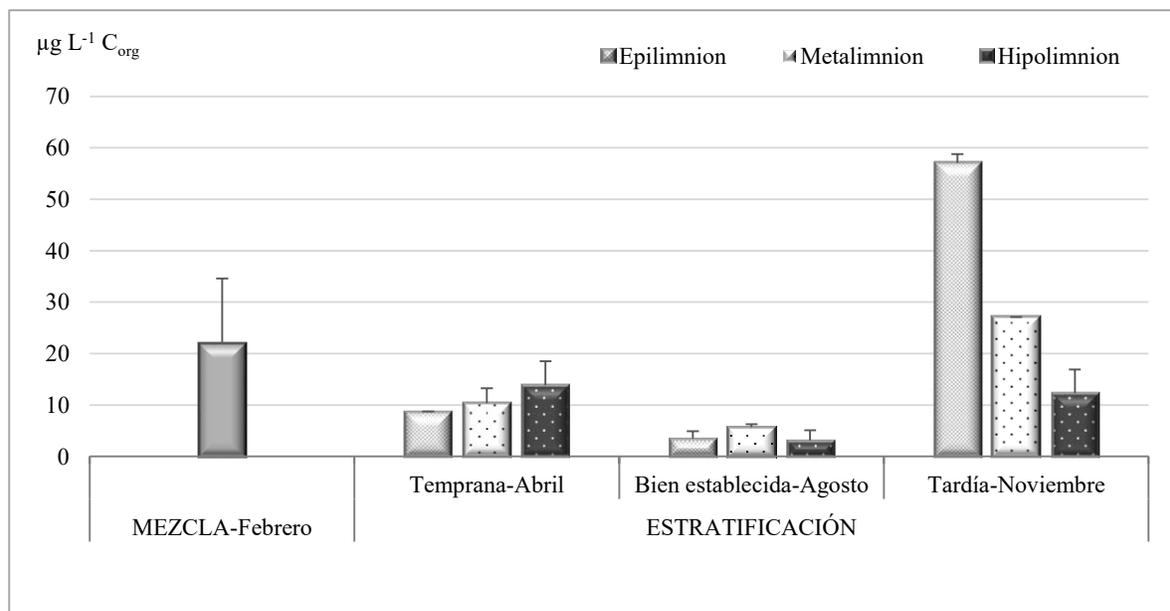


Figura 12. Valor medio y desviación estándar de la biomasa de las Picocianobacterias durante las fases hidrodinámicas y en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa.

8.3 COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS PROCARIONTES DETERMINADOS POR CARD-FISH

El dominio Bacteria registró para la fase de mezcla (58%) y al final de la fase de estratificación (63%) los mayores porcentajes de hibridación promedio; mientras que en la estratificación temprana se registraron valores porcentuales del 57%, en tanto que en la bien establecida fue del 47% [Fig. 14].

El dominio Archaea fue detectado únicamente en la fase de estratificación; específicamente en la temprana y bien establecida; donde sus porcentajes promedio de hibridación fueron del 7 y 9%. La sonda de oligonucleótido CREN 537, cuyo objetivo era detectar al filo Thaumarchaeota, no reveló hibridación de este taxón para ninguna de las fases hidrodinámicas [Fig. 14].

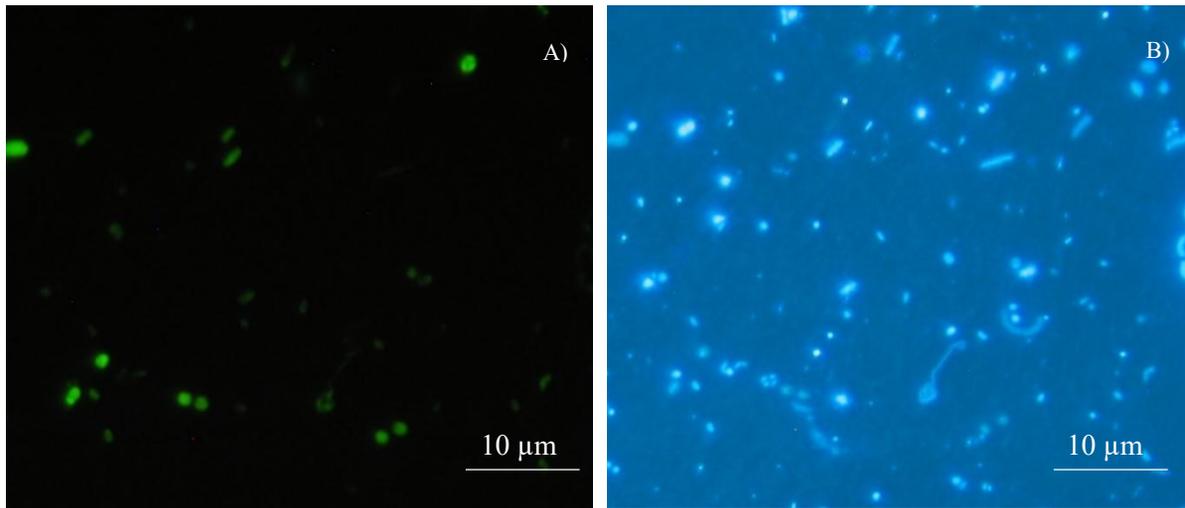


Figura 13. Las imágenes muestran la detección de células del picoplancton procarionte a través del empleo de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente mediante la deposición del receptor catalizado (CARD-FISH). A) Observación de una muestra de agua del lago La Preciosa al ser excitado el fluorocromo Alexa 488 con luz azul, al estar asociado a la sonda de oligonucleótido. B) Observación de la misma muestra del lago La Preciosa teñidas con DAPI las cuales fueron excitadas con luz UV.

En la fase de mezcla y en las diferentes etapas de estratificación el dominio Bacteria registró abundancias relativas que mostraron variabilidad; donde algunos estratos coinciden con respecto a la distribución que mantiene la abundancia absoluta del picoplancton procarionte total [Fig. 14].

Se registró una abundancia relativa del 58% para el dominio Bacteria en la mezcla, en tanto que la abundancia absoluta para este filo fue de $9.15 \times 10^5 \pm 3.62 \times 10^4$ cél. mL⁻¹ a diferencia del reportado para el picoplancton procarionte total cuya abundancia absoluta superó en una orden de magnitud ($1.58 \times 10^6 \pm 1.88 \times 10^5$ cél. mL⁻¹). En la fase de estratificación temprana se registraron abundancias relativas para Bacteria que fueron del 56 al 58%; éste último registrado en el epilimnion mismo que registró una abundancia absoluta de $1.26 \times 10^6 \pm 4.33 \times 10^4$ cél. mL⁻¹, mientras que el picoplancton procarionte total para este estrato registró una abundancia absoluta de $2.16 \times 10^6 \pm 3.16 \times 10^5$ cél. mL⁻¹ [Fig. 14].

En la estratificación bien establecida se registraron para el epilimnion y metalimnion valores porcentuales de 48 y 52%, mientras que su abundancia absoluta se encontró en $1.09 \times 10^6 \pm 3.63 \times 10^4$ cél. mL^{-1} para el epilimnion, en tanto que el metalimnion registró $1.13 \times 10^6 \pm 4.00 \times 10^4$ cél. mL^{-1} . La abundancia del picoplancton procarionte total para estos estratos correspondió a $2.30 \times 10^6 \pm 3.68 \times 10^5$ y $2.19 \times 10^6 \pm 2.81 \times 10^5$ cél. mL^{-1} ; el hipolimnion para esta etapa registró una abundancia relativa de 43% y una abundancia absoluta de $5.62 \times 10^5 \pm 1.68 \times 10^4$ cél. mL^{-1} comparado con la abundancia hallada para el picoplancton procarionte total la cual fue de $1.30 \times 10^6 \pm 1.67 \times 10^5$ cél. mL^{-1} [Fig.14]. Al final de la estratificación se observó que en el epilimnion mostró una abundancia porcentual para Bacteria del 64%, mientras que la abundancia registrada para picoplancton procarionte total fue de $2.28 \times 10^6 \pm 4.61 \times 10^5$ cél. mL^{-1} , en cambio en la zona del metalimnion se registró 67% de la abundancia relativa para Bacteria, y el picoplancton procarionte total registró una abundancia de $2.13 \times 10^6 \pm 3.14 \times 10^5$ cél. mL^{-1} , finalmente para la zona del hipolimnion se halló una abundancia relativa del 58% para Bacteria, en tanto que el picoplancton procarionte total reportó una abundancia de $1.42 \times 10^6 \pm 2.21 \times 10^5$ cél. mL^{-1} [Fig.14].

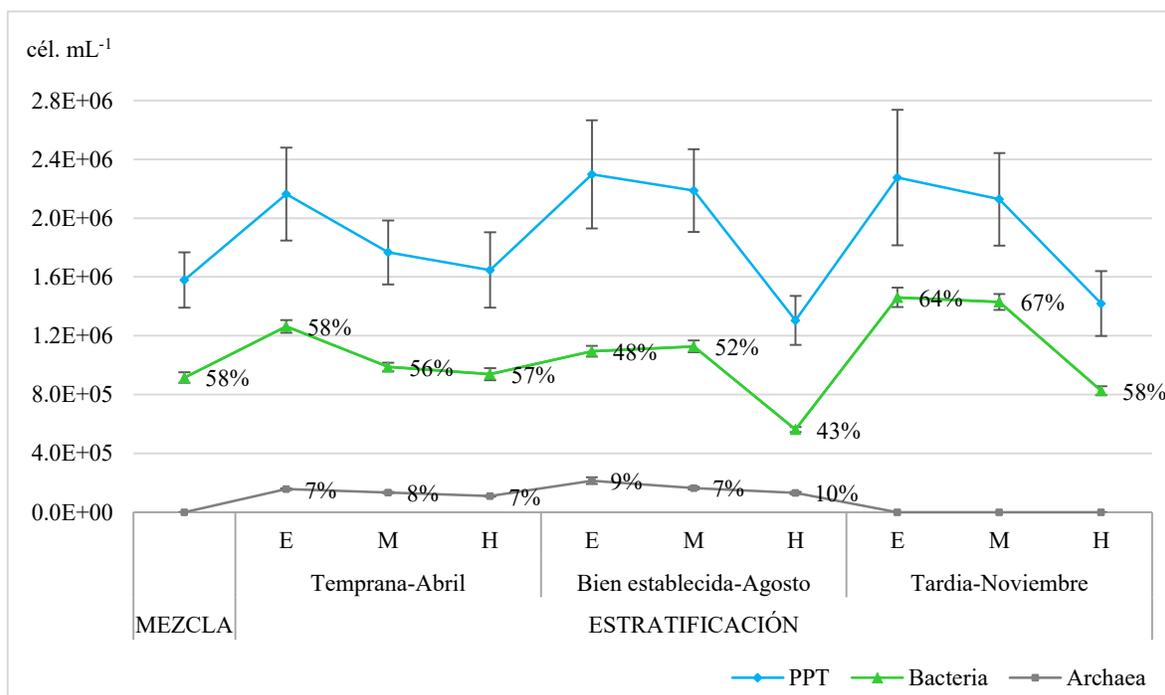


Figura 14. Distribución temporal de la abundancia absoluta del picoplancton procarionte total (PPT) y la abundancia relativa (expresados en cél. mL^{-1} y porcentaje de hibridación) del dominio Bacteria y Archaea.

El dominio Archaea solo fue registrado en la fase de estratificación temprana y bien establecida, donde sus abundancias relativas para los diferentes estratos de la columna de agua no superan el 10% y donde se puede notar una distribución variable para los distintos estratos que conforma [Fig. 14], registrando abundancias absolutas de $1.09 \times 10^5 \pm 4.36 \times 10^3$ a $1.57 \times 10^5 \pm 5.89 \times 10^3$ cél. mL⁻¹ para la primera etapa de la estratificación, en tanto que la segunda etapa registró abundancias absolutas de $1.31 \times 10^5 \pm 8.06 \times 10^3$ a $2.14 \times 10^5 \pm 2.28 \times 10^4$ cél. mL⁻¹.

Tanto para la mezcla como para la estratificación, se consideró el filo Proteobacteria a partir de sumar la abundancia relativa de las clases Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria (Bacterias sulfato reductoras) y Gammaproteobacteria.

Se observó que, durante la fase de mezcla y la primera etapa de estratificación, el porcentaje acumulado de los filo bacterianos coincide con el registrado para Bacteria, mientras que en la fase de estratificación bien establecida y tardía se observa variabilidad en cuanto al porcentaje acumulado de los filo dominantes [Fig. 15]. En el periodo de mezcla predominaron por su abundancia el filo Proteobacteria al registrar una abundancia relativa del 33%, seguido de manera consecutiva por Planctomycetes con el 15% y Bacteroidetes al registrar una abundancia porcentual del 9%, mientras que el filo Actinobacteria no fue registrado durante esta fase [Fig. 15].

Para la estratificación temprana la suma porcentual de los filo no superó al de Bacteria, registrando como filo dominante a Proteobacteria (36%), conformado por las clases Alpha, Beta y Gammaproteobacteria, así como Bacterias sulfato reductoras, como lo muestra la figura 15. Los filo que precedieron a Proteobacteria en esta etapa de estratificación fueron Planctomycetes (8%) seguido de Bacteroidetes y Actinobacteria al presentar ambos una abundancia relativa del 6%, señalando la presencia por primera vez de Actinobacteria durante esta fase [Fig. 15].

La estratificación bien establecida nuevamente registró como grupo dominante al filo Proteobacteria al registrar el 34% de abundancia relativa. Los filo que dominaron durante esta etapa hidrodinámica fueron Planctomycetes (9%), Actinobacteria (7%) y Bacteroidetes al registrar una abundancia relativa del 6% [Fig. 15].

Finalmente, para la última etapa de estratificación, se registró el 37% de la abundancia relativa del filo Proteobacteria, al ser constituido principalmente por la clase Beta, Alpha y Gammaproteobacteria, identificando que las Bacterias sulfato reductoras no registraron presencia durante esta última etapa de estratificación (Fig. 16). El filo Planctomycetes precedió a Proteobacteria al registrar una abundancia relativa del (15%), mientras que Bacteroidetes fue del 13% y Actinobacteria el 10% [Fig. 15].

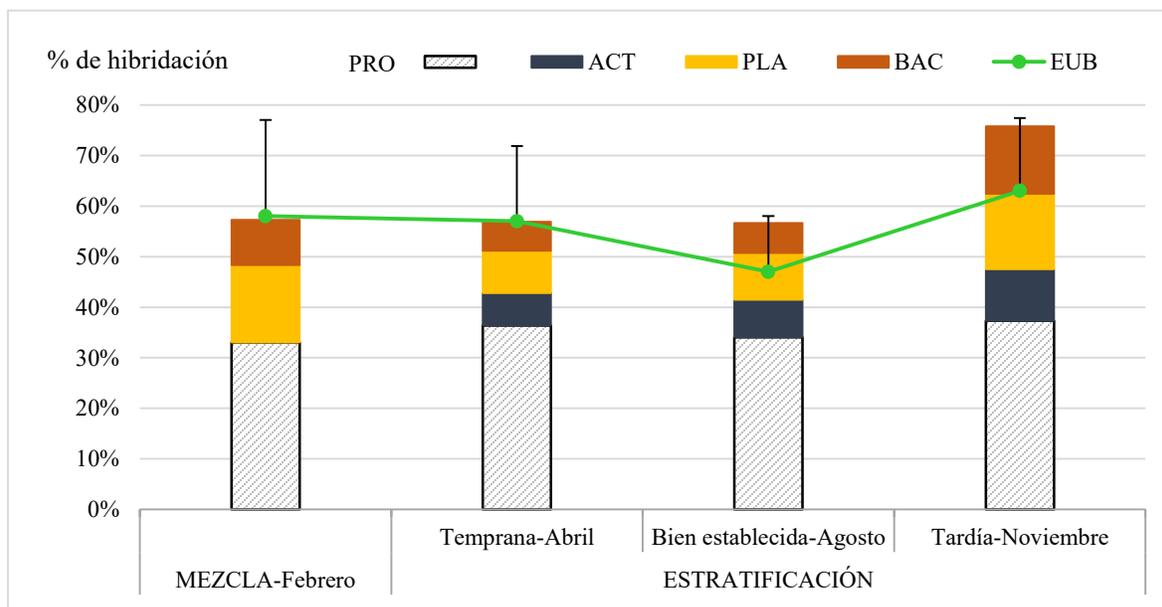


Figura 15. Porcentaje de hibridación de los filamentos del dominio Bacteria durante las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa. Se indica con abreviaturas los filamentos: Proteobacteria (PRO), Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA), Bacteroidetes (BAC).

Durante la fase de mezcla el filo Proteobacteria se encontró conformado de las clases: Alphaproteobacteria quien registró una abundancia del 13%, mientras que Gammaproteobacteria registró un valor porcentual del 12% y Betaproteobacteria fue la clase que mostró una baja abundancia relativa al ser del 8% [Fig. 16].

Para las tres etapas de estratificación, no se registró hibridación de la clase Alphaproteobacteria. Sin embargo, se encontró hibridación del género *Paracoccus* y el subclado SAR 11-IIIb pertenecientes a esta clase, por lo que se estimó su abundancia relativa con la suma de estos dos grupos.

Para la primera etapa de estratificación el filo Proteobacteria se encontró conformado por las clases Betaproteobacteria (19%) como clase dominante, seguida de Alphaproteobacteria quien registró una abundancia del 8%, mientras que las Bacterias sulfato reductoras, comparada con la mezcla, sí se presentan al registrar una abundancia del 7%, en tanto que Gammaproteobacteria solo mostró el 2% de abundancia relativa. Tanto la estratificación temprana como la bien establecida revelaron una variabilidad de las clases que forman parte del filo Proteobacteria [Fig. 16] hallando así para el periodo de estratificación bien establecida que el filo Proteobacteria se encontró conformado por las clases Gammaproteobacteria (13%) como grupo dominante, seguida de la presencia de Alphaproteobacteria (9%), Betaproteobacteria (8%) y Deltaproteobacteria, esta última en menor proporción (4%) [Fig. 16].

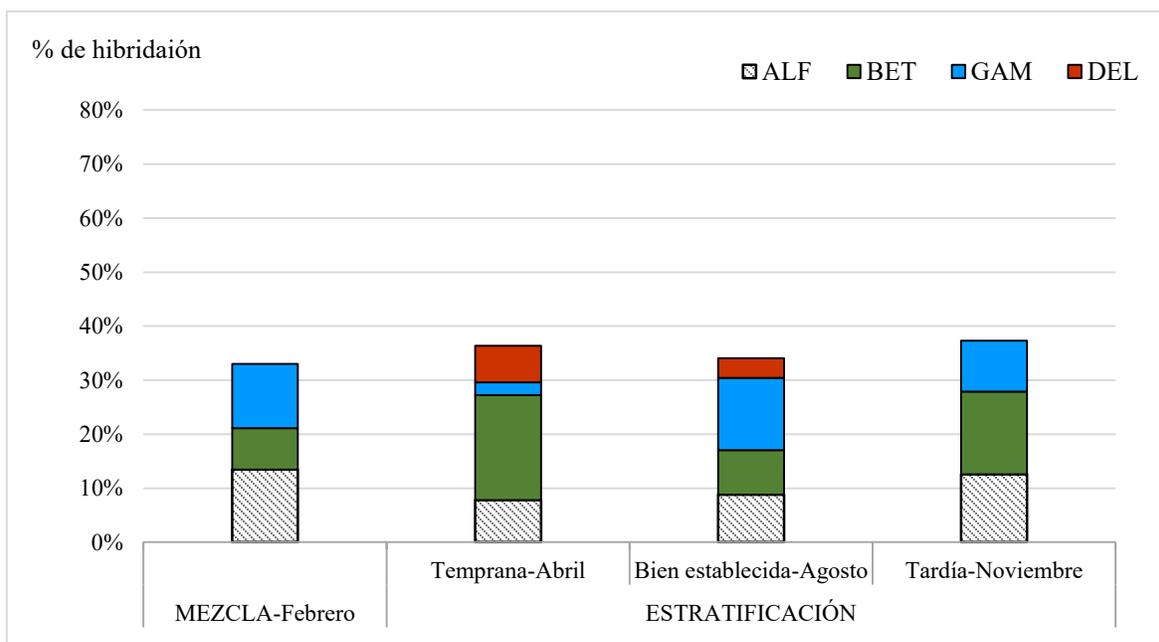


Figura 16. Composición del filo Proteobacteria. Se han señalado con abreviaturas los nombres de las clases: Alphaproteobacteria (ALF), Betaproteobacteria (BET), Deltaproteobacteria (DEL) y Gammaproteobacteria (GAM) para las fases hidrodinámicas del lago La Preciosa a través de sondas de oligonucleótidos de CARD-FISH.

La estratificación tardía, mostró un aumento en abundancia relativa de las clases, lo que corrobora la presencia de grupos bacterianos que han sido dominantes desde el comienzo de la mezcla como Alphaproteobacteria (13%), Betaproteobacteria (15%) y Gammaproteobacteria. Este último grupo disminuyó en abundancia comparado con el

periodo anterior al registrar un porcentaje de hibridación del 9%. Durante esta fase no se registró hibridación de Deltaproteobacteria [Fig. 16].

Los grupos específicos que forman parte del dominio Bacteria, mostraron variabilidad en su distribución dentro de la columna de agua, por ejemplo, para el género *Paracoccus* fue ubicado en toda la columna de agua observando un máximo en el epilimnion del 9%, mientras que hacia los siguientes estratos decreció hasta un 7%. El subclado SAR 11-IIIb se ubicó preferentemente en el epilimnion y metalimnion al registrar 10% de abundancia relativa, en tanto que en el hipolimnion no sobrepasó el 7%. Por otra parte, la clase Betaproteobacteria fue quien dominó para esta etapa hidrodinámica, mostrando de manera homogénea en los distintos estratos, una abundancia relativa del 19 al 20 %, mientras que Gammaproteobacteria sólo fue identificado en el epilimnion (6%) y metalimnion, con una disminución hacia este último estrato (3%). Deltaproteobacteria fueron halladas de manera homogénea en los diferentes estratos de la columna de agua, registrando una abundancia del 7%. Finalmente, para la siguiente categoría taxonómica se registró que el filo Gram-positivo (Actinobacteria) se presentó de manera homogénea en cada estrato al registrar una abundancia del 6%. El filo Planctomycetes mostró dos máximos ubicados en el epilimnion y metalimnion los cuales varían entre 9 y 10%. El filo Bacteroidetes de igual forma mantuvo poca variabilidad en las diferentes capas de la columna de agua al mostrar una abundancia relativa que osciló del 5 al 6% [Fig. 17A].

En la figura [Fig.17B] se muestra para la estratificación bien establecida la distribución de las diferentes categorías taxonómicas que conforman al dominio Bacteria, registrando así para el género *Paracoccus* un incremento en su abundancia al obtener su máximo hacia la zona del epilimnion (12%), en tanto que en el meta e hipolimnion oscilaron entre 8 y 9% de hibridación. El subclado SAR 11-IIIb se distribuye de manera homogénea en la columna de agua alcanzando un 8% de abundancia. Durante esta etapa de la estratificación la clase Betaproteobacteria destacó en la zona del meta e hipolimnion obteniendo un 11 y 10% de hibridación, mientras que, en el epilimnion solo registró un 7%. La clase Gammaproteobacteria fue el grupo dominante para este periodo, alcanzando su máximo en la zona del metalimnion (17%), tanto el epilimnion como el hipolimnion no sobrepasan 14% de valor porcentual. Deltaproteobacteria únicamente registró hibridación en

las zonas del metalimnion e hipolimnion; donde este último presentó su máximo al alcanzar el 8% de abundancia relativa. Los taxa como Actinobacteria (8%), Planctomycetes (10%) y Bacteroidetes (6%) se hallaron de manera homogénea en los diferentes estratos del lago La Preciosa, identificando que Bacteroidetes fue el filo que registró una menor proporción de su abundancia.

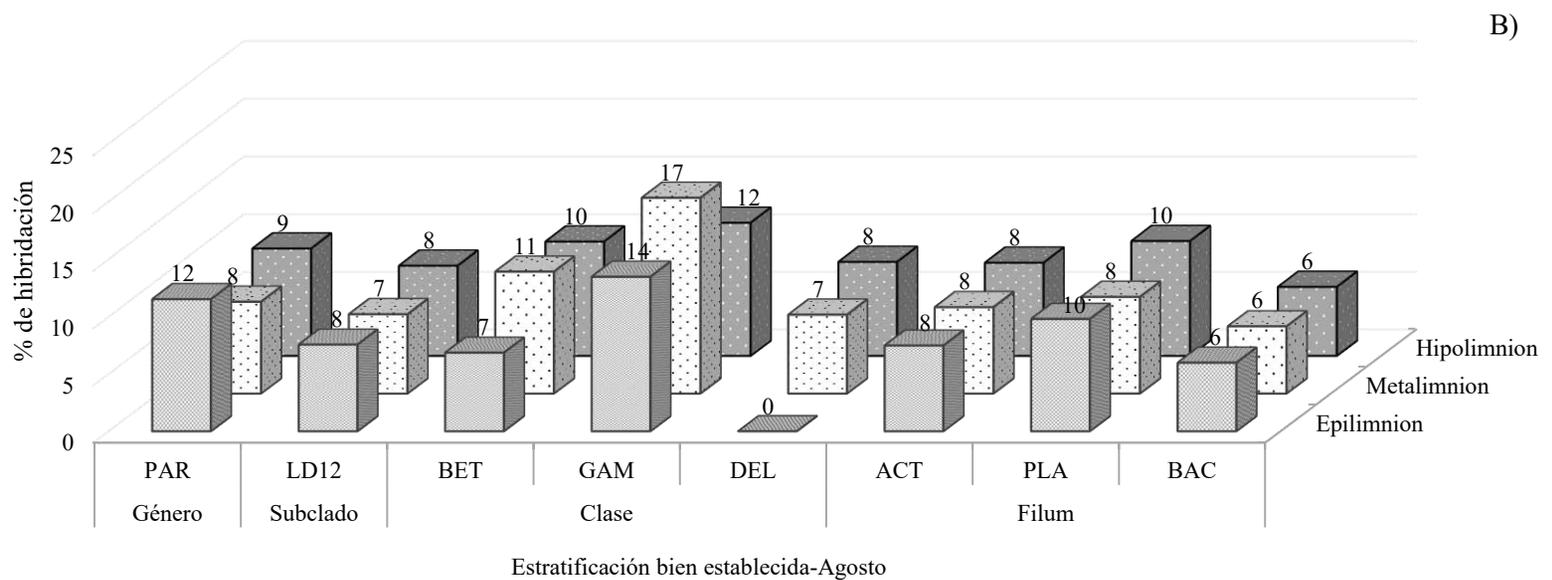
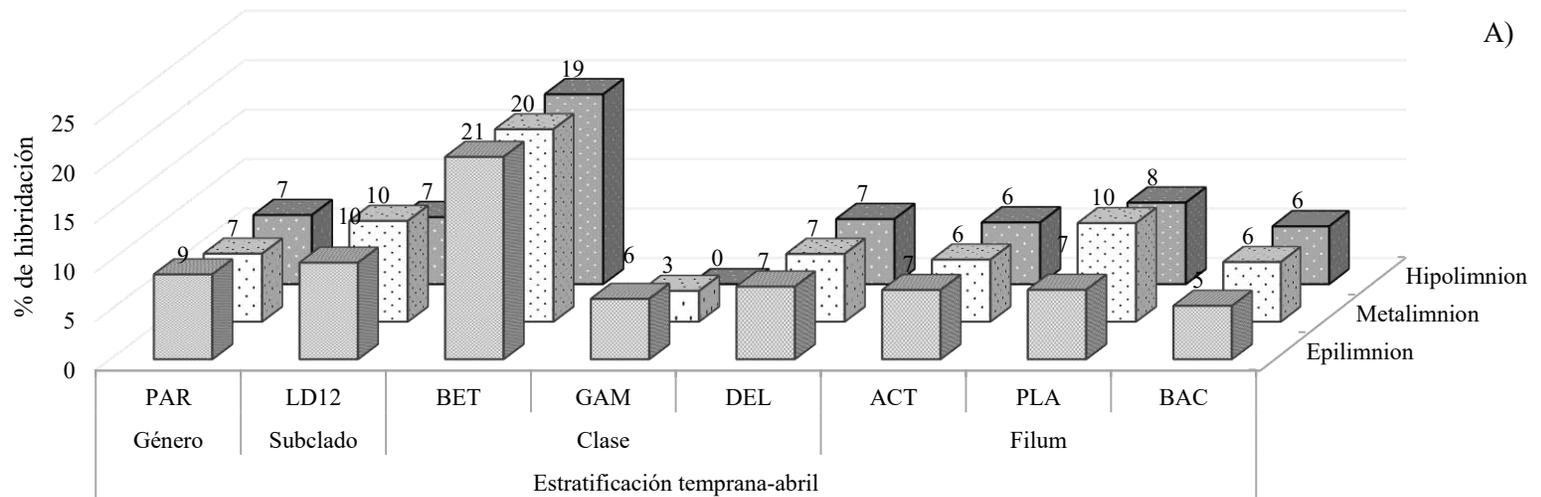


Figura 17. Composición y distribución de los taxa de procariontes en los estratos de la columna de agua del lago La Preciosa durante los periodos de A) Estratificación temprana y B) Estratificación bien establecida. Los nombres de los taxa han sido abreviados, como es el caso del género *Paracoccus* (PAR) y el subclado SAR 11-IIIb (LD12); las clases Betaproteobacteria (BET), Gammaproteobacteria (GAM), Deltaproteobacteria (DEL) y de los fila Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA) y Bacteroidetes (BAC).

Los grupos mayormente distribuidos para la última etapa de estratificación fueron Betaproteobacteria como clase dominante, que además mostró una distribución homogénea en las diferentes capas de la columna de agua; durante esta etapa no se registra la presencia de Bacteria sulfato reductoras. En cuanto a los fila, el taxón dominante fue Planctomycetes quien siguió una distribución continua al indicar una abundancia del 16%, mientras que Bacteroidetes mostró una distribución decreciente hacia las capas profundas, registrando su mayor abundancia relativa hacia el epilimnion al registrar 15%; por otro lado, Actinobacteria mantuvo una distribución ascendente con respecto a las masas de agua de la columna al mostrar que el hipolimnion fue el estrato con mayor abundancia relativa la cual fue del 12%.

El género *Paracoccus* y el subclado registraron comportamientos inversos en su distribución al encontrar que *Paracoccus* se registra predominantemente en las primeras capas, en tanto que, el subclado SAR 11-IIIb en las capas profundas del lago La Preciosa [Fig. 18].

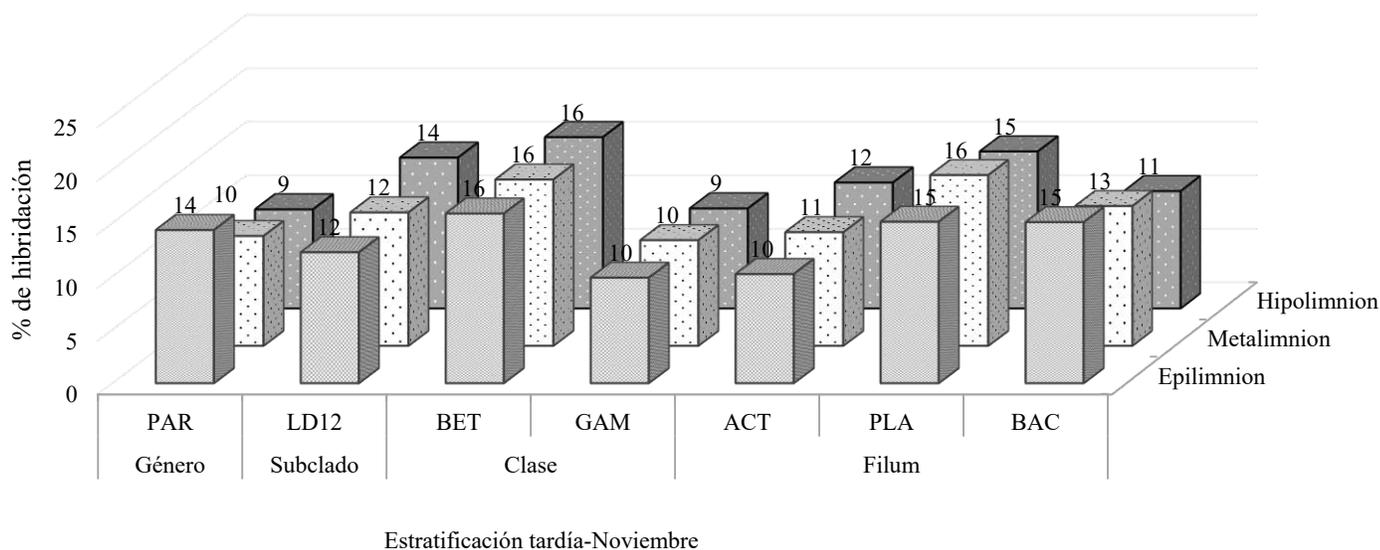


Figura 18. Composición de los taxa y su distribución en los estratos de la columna de agua durante el periodo de estratificación tardía del lago La Preciosa. Los nombres de los taxa se han abreviado, por ejemplo, el género *Paracoccus* (PAR) y el subclado SAR 11-IIIb (LD12); las clases Betaproteobacteria (BET), Gammaproteobacteria (GAM) y los fila Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA) y Bacteroidetes (BAC).

8.4 RELACIÓN DE LOS GRUPOS BACTERIANOS CON LOS PARÁMETROS LIMNOLÓGICOS DEL LAGO LA PRECIOSA

Se llevaron a cabo las correlaciones producto-momento de Pearson para el periodo de mezcla entre las variables limnológicas y los parámetros biológicos (ambos fueron normalizados mediante su transformación, aplicando para las variables fisicoquímicas -excepto el pH- el $\text{Log}(b+1)$, en tanto que las variables biológicas se transformaron al aplicar la raíz cuadrada de 2π). Se obtuvo una correlación positiva entre el oxígeno disuelto y las Picocianobacterias ($r^2=0.89$, $p<0.05$) a su vez las Picocianobacterias tuvieron correlación negativa con el fósforo total ($r^2=0.90$, $p<0.05$). El oxígeno disuelto se correlacionó positivamente con el subclado SAR 11-IIIb ($r^2=0.83$, $p<0.05$) durante esta fase hidrodinámica, en tanto que el dominio Bacteria se relacionó de manera positiva con la conductividad ($r^2=0.82$, $p<0.05$), mientras que los demás parámetros limnológicos y biológicos no presentaron relación significativa.

Para la fase de estratificación se encontraron correlaciones positivas y negativas para diferentes parámetros limnológicos y biológicos [Cuadro 8].

En el caso particular de la temperatura, solo uno de los grupos, el correspondiente a Deltaproteobacteria mostró una asociación negativa, destacando la no significancia con Archaea, Picocianobacterias y Betaproteobacteria. Por otro lado, el oxígeno disuelto tuvo una relación positiva con el dominio Bacteria y con Picocianobacterias así también con los taxa específicos como *Paracoccus*, el subclado SAR 11-IIIb, la clase Betaproteobacteria y el filo Actinobacteria.

No se halló relación entre la conductividad y algún grupo procarionte. De manera general, los nutrientes presentaron una variación en su grado de relación con los parámetros biológicos, identificando nutrientes que se relacionan de manera directa con los taxa. La alcalinidad a carbonato solo mostró relación directa y significativa con la clase Gammaproteobacteria; por su lado, la alcalinidad de bicarbonato indicó una mayor relación de tipo inverso con grupos bacterianos [Cuadro 8].

Cuadro 8. Correlación producto-momento de Pearson para la fase de estratificación entre el picoplancton procarionte y los parámetros limnológicos del lago La Preciosa.

Se han señalado en abreviaturas los dominios y taxa del picoplancton procarionte, así como las variables limnológicas. Dominios: Archaea (ARCH) y Bacteria (EUB). Taxa que comprenden al dominio Bacteria: Picocianobacterias (Pcy), grupos pertenecientes a la clase Alphaproteobacteria como el género *Paracoccus* (PAR) y el linaje SAR III-b (LD12). Las clases Betaproteobacteria (BET), Gammaproteobacteria (GAM) y Deltaproteobacteria (la mayoría de las Bacterias sulfato reductoras (BSR)) y los fila Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA), Bacteroidetes (BAC) Parámetros limnológicos como: temperatura (T), oxígeno disuelto (OD), conductividad (Cond.), potencial de hidrógeno (pH), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+), fósforo soluble reactivo (FSR), fósforo total (FT), sulfato (SO_4^{2-}), alcalinidad de carbonato (CO_3^{2-}) y alcalinidad de bicarbonato (HCO_3^-).

Con un tamaño de muestra de 23, correlaciones estimadas (nivel de significancia $p < 0.05$) con un nivel de confianza al 95%; Ns= no significancia ($p > 0.05$).

Grupos	T	OD	Cond.	pH	NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+	FSR	FT	SO_4^{2-}	CO_3^{2-}	HCO_3^-
ARCH	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	-0.46	-0.57	Ns	Ns
EUB	0.61	0.65	Ns	Ns	Ns	Ns	-0.59	Ns	-0.44	Ns	Ns	-0.40
Pcy	Ns	0.47	Ns	Ns	Ns	Ns	-0.75	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
PAR	0.74	0.58	Ns	0.55	-0.43	0.47	-0.60	0.45	Ns	0.62	NS	-0.50
LD12	0.58	0.48	NS	0.41	-0.46	Ns	-0.44	Ns	Ns	0.59	Ns	Ns
BET	Ns	0.41	Ns	-0.45	Ns	-0.42	-0.42	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
GAM	0.74	Ns	Ns	0.70	-0.84	0.67	Ns	0.41	Ns	0.64	0.47	-0.75
BSR	-0.52	Ns	Ns	-0.67	0.41	Ns	Ns	-0.63	Ns	-0.78	Ns	Ns
ACT	0.66	0.42	Ns	0.54	-0.52	Ns	Ns	Ns	Ns	0.66	Ns	-0.58
PLA	0.57	NS	NS	0.56	Ns	Ns	-0.54	Ns	Ns	0.65	Ns	Ns
BAC	0.46	NS	NS	0.43	NS	Ns	-0.60	Ns	Ns	0.69	Ns	Ns

A través del empleo del análisis de correspondencia canónica sin tendencia (ACCST) se hallaron relaciones multivariadas entre las variables limnológicas y los grupos taxonómicos procariontes [Fig. 19]. El ACCST llevado a cabo para la fase de estratificación del lago La Preciosa, registró que de las 12 variables limnológicas analizadas, solo 7 fueron seleccionadas, ya que definieron las abundancias de los grupos bacterianos [Cuadro 10]. Se halló una correlación de las variables limnológicas de 0.97 y 0.91 para los ejes canónicos 1 y 2, por lo que la varianza acumulada tanto del primer y segundo eje explican el 72.3% de la relación que existe entre los grupos bacterianos y los parámetros limnológicos reportados para el lago La Preciosa [Cuadro 9].

Cuadro 9. Eigenvalor, coeficiente de correlación y varianza acumulada de los ejes canónicos 1-4 que corresponden a la figura 18.

	Ejes				Inercia total
	1	2	3	4	
Eigenvalor	0.059	0.010	0.004	0.001	0.107
Correlación entre variables limnológicas y taxa	0.971	0.913	0.769	0.823	
Porcentaje de la varianza acumulada para los taxa	55.6	64.7	68.8	69.7	
Porcentaje de la varianza acumulada para las variables limnológicas con los taxa	62.1	72.3	76.9	77.9	

Cuadro 10. Coeficientes de correlaciones múltiples del ACCST de la figura 19. Las variables limnológicas con el mayor coeficiente de correlación se encuentran indicadas en negritas.

Correlaciones múltiples	Eje canónico 1	Eje canónico 2
Temperatura	-0.5570	0.3030
Oxígeno disuelto	-0.2002	0.2410
Amonio	0.4025	-0.0455
Nitrito	-0.2954	0.0690
Nitrato	0.5918	0.1485
Fósforo soluble reactivo	0.2905	0.3576
Fósforo total	0.1052	-0.4548
Sulfato	-0.8845	0.0053
pH	-0.6761	0.3135
Conductividad	0.2491	0.2540
Alcalinidad de carbonato	-0.1658	0.0499
Alcalinidad de bicarbonato	0.4060	-0.1425

A continuación, se describen las variables limnológicas que mostraron altas correlaciones ponderadas dentro de la matriz multivariada. En los ejes canónicos los vectores representan las variables limnológicas, así en el eje 1 destaca los sulfatos (-0.88), pH (-0.67), nitrato (0.59), temperatura (-0.55), amonio y bicarbonato (0.40) siendo estos dos últimos los que presentan una menor magnitud en su vector; por otro lado, el segundo eje canónico solo mostró una mayor correlación ponderada con el fósforo total (-0.45) [Fig. 19].

Dentro del mismo análisis los taxa son señalados por una cruz [Fig. 19]. En el caso del dominio Bacteria se presenta una interacción general con todas las variables, pues se encuentran bastante cercana al punto donde convergen todos los vectores, además de ser un taxón que mantiene relación con otros taxa específicos, como el género *Paracoccus*, el linaje SAR III-b, las clases Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Picocianobacterias, Actinobacteria, Planctomycetes y Bacteroidetes. El taxón Deltaproteobacteria se encuentra distante del conjunto de los taxa, quienes mantienen una semejanza en su abundancia para las diferentes fases hidrodinámicas, por lo que el taxón de Deltaproteobacteria sólo se presentó durante la estratificación bien establecida y tardía [Fig. 19].

En comparación con el dominio Bacteria, Archaea fue el taxón que se encuentra excluido del conjunto de los taxa que se sitúan cercanamente del centro de la convergencia de los vectores, ya que la abundancia que representa éste dominio difirió notablemente por presentarse únicamente durante la estratificación temprana y bien establecida.

El género *Paracoccus*, así como el linaje SAR III-b, la clase Gammaproteobacteria y los fila Actinobacteria, Planctomycetes y Bacteroidetes se encuentran correlacionados negativamente con la temperatura, pH y sulfato, indicando el ACCST que su abundancia en la fase de estratificación pueda estar influenciada por ciertas variables ambientales. La clase Betaproteobacteria se correlaciona de manera positiva con los bicarbonatos y amonio, mientras que las Picocianobacterias registraron una correlación negativa con el fósforo total.

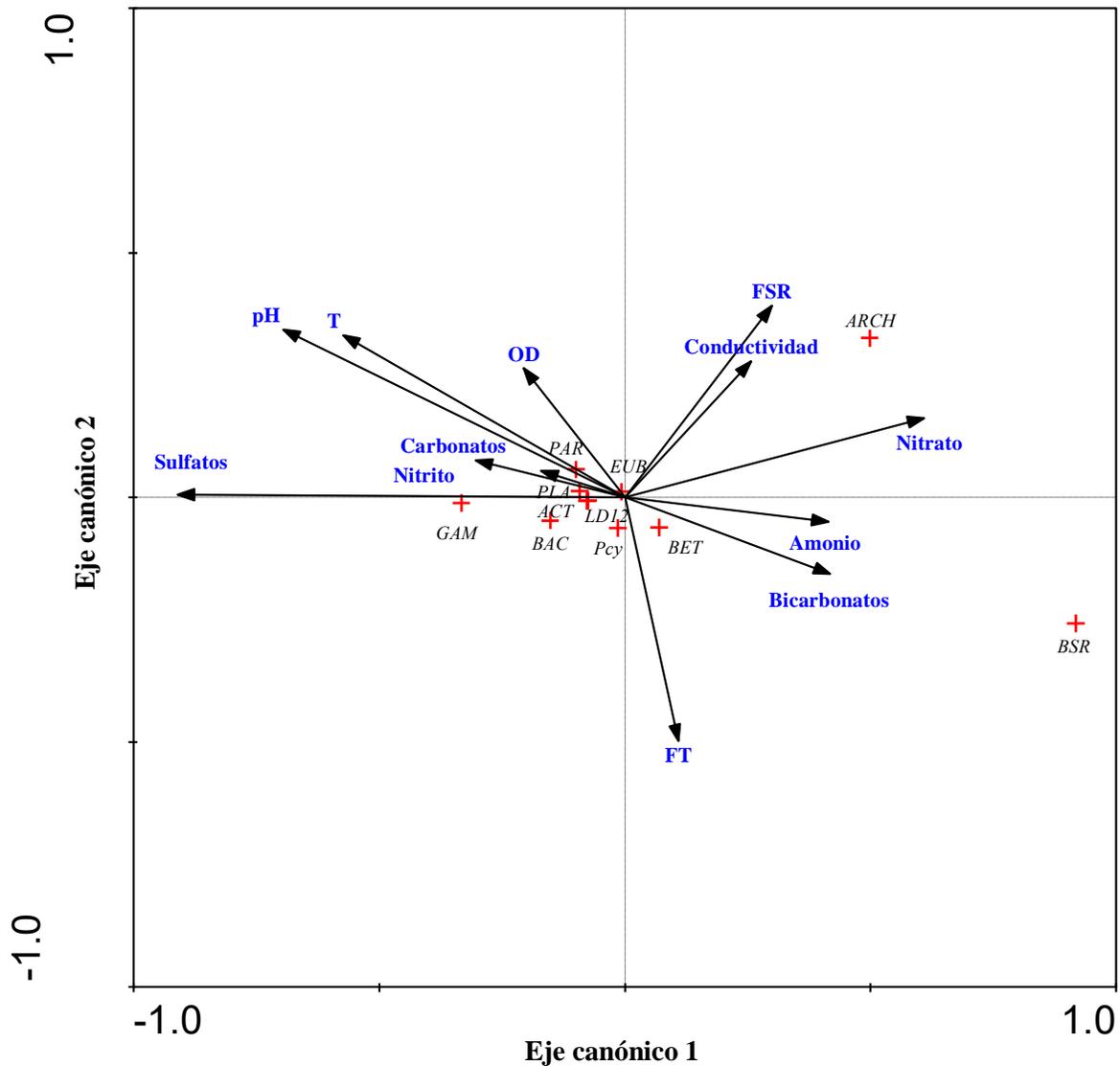


Figura 19. Análisis de correspondencia canónica sin tendencia (ACCST). Ejes canónicos 1 y 2 explican el 72.3% de la varianza acumulada de la relación de los grupos bacterianos y parámetros limnológicos. Se han abreviado tanto los dominios y taxa del picoplancton procarionte, así como algunas de las variables limnológicas. Dominios: Archaea (ARCH) y Bacteria (EUB). Grupos específicos, por ejemplo: *Paracoccus* (PAR) y subclado SAR 11-IIIb (LD12). Las clases: Betaproteobacteria (BET), Gammaproteobacteria (GAM) y Deltaproteobacteria (la mayoría de las Bacteria sulfato reductoras (BSR)) y los fila: Actinobacteria (ACT), Planctomycetes (PLA), Bacteroidetes (BAC) y Picocyanobacterias (Pcy). Variables limnológicas: temperatura (T), potencial de hidrógeno (pH), fósforo soluble reactivo (FSR), oxígeno disuelto (OD) y fósforo total (FT).

9. DISCUSIÓN

De acuerdo con la variación anual de la temperatura en el lago La Preciosa durante el año 2014 representada en el diagrama de espacio -tiempo [Fig. 2]; este sistema acuático, mostró una dinámica térmica que según la clasificación propuesta por Lewis (1983) para lagos profundos tropicales corresponde a un ambiente monomítico cálido, que de acuerdo con el invierno boreal, cuando el clima es frío y seco, pudo observarse en un perfil vertical que la temperatura fue homogénea a lo largo de la columna de agua, lo que facilitó la mezcla, identificando ésta como la primera fase hidrodinámica [Fig. 3]. Mientras que cuando se da un descenso en la acción de los vientos y se incrementa la intensidad y exposición a la radiación solar se comienza a presentar una diferenciación en las masas de agua, lo que hace que el lago se comience a estratificar reconociéndola como la segunda fase hidrodinámica, misma que puede identificarse por etapas, regidas principalmente por la máxima variación de temperatura lo que delimita la amplitud, intensidad y la ubicación tanto de la termoclina como oxiclina [Fig. 3].

Se observó una relación estrecha entre la termoclina y la oxiclina de las diferentes etapas de estratificación, registrando que en la estratificación bien establecida y tardía, éstas se mantuvieron por debajo del límite eufótico [Fig. 3]; el límite eufótico registró una reducción durante la estratificación bien establecida, se considera que existió en el momento del muestreo una turbidez debida probablemente a partículas carbonatadas, ya que se ha registrado para este y otros lagos de características similares ubicados en la misma región un “evento de emblanquecimiento” (Arellano-Posadas y González-Flores, 2011; Marcos y Reyes, 2012; Lagunas y Martínez, 2015) el cual se caracteriza por un cambio en la coloración del agua y a su vez en la precipitación de partículas finas de carbonato de calcio (Thompson *et al.*, 1997; Hodell *et al.*, 1998).

Durante la fase de estratificación existieron variaciones en la concentración de oxígeno de las diferentes masas de agua, lo que influye en la abundancia y diversidad de los organismos planctónicos, particularmente del picoplancton procarionte, y que a su vez determina las formas químicas regidas por los procesos de oxidación-reducción (Nürnberg, 1995). En el lago La Preciosa durante la fase de mezcla, se registró una concentración de oxígeno disuelto más homogénea, a diferencia de la estratificación bien establecida donde se

presentó una marcada hipoxia desde la base de la termoclina al hipolimnion [Fig. 3] debido hundimiento de organismos muertos de las capas superficiales y a la oxidación bacteriana de la materia orgánica (Ducklow, 2000).

El potencial de hidrógeno (pH) registró variaciones en las diferentes fases hidrodinámicas, definiendo al lago La Preciosa como un sistema alcalino ya que durante el tiempo de estudio mantuvo una dominancia de carbonatos sobre bicarbonatos comparado con lo que ha sido registrado regularmente para este mismo lago, donde suele presentarse una dominancia debida a bicarbonatos (Vilaclara *et al.*, 1993, 2002; Armienta *et al.*, 2008; Marcos y Reyes, 2012) pero que sin duda puede llevarse a cabo debido a su alta reserva alcalina, lo que puede producir una sucesión de las formas aniónicas de acuerdo al sistema amortiguador carbónico-carbonatos, como ha sido reportado recientemente para el lago vecino Atexcac, donde Escobar y Torres (2016) asumen que dependiendo de las condiciones específicas en el momento del muestreo existe una variación temporal y espacial en la concentración de carbonatos y bicarbonatos, asociado con las variaciones en el pH.

El picoplancton procarionte total del lago La Preciosa, se caracterizó por células individuales simples, identificando una variada morfología a través de la observación en el microscopio de epifluorescencia [Fig. 8]. Se observó que la abundancia celular promedio del picoplancton procarionte total tuvo un incremento de la mezcla a la estratificación con respecto al epilimnion y metalimnion, mientras en el hipolimnion se encontró una densidad menor. El incremento de la abundancia del picoplancton procarionte total en estas zonas, pudo estar en respuesta a la disponibilidad de nutrimentos y a la distribución de los mismos entre la columna de agua y los estratos como producto de la variación estacional que sufre la temperatura del agua (Hibbing *et al.*, 2010).

Durante las diferentes etapas de la estratificación, los taxa que forman parte del picoplancton procarionte total no mostraron un patrón general de variación con respecto a la profundidad, de tal forma que en la estratificación temprana y tardía la abundancia de la mayoría de los taxa disminuyó hacia el hipolimnion; por otro lado en la estratificación bien establecida la abundancia de algunos taxa fue equivalente entre los estratos, mientras que otros grupos sólo registraron su máximo en el metalimnion y otros tantos sólo tuvieron máximos en el epilimnion e hipolimnion. La variabilidad registrada en la abundancia y

distribución de los taxa a través de la columna de agua y en el tiempo es debido a que la mayoría de los taxa no solo se ven afectados por la concentración de nutrientes sino también a causa de parámetros como luz ultravioleta, depredación, profundidad del sistema, estado trófico y fase hidrodinámica prevaeciente (Wetzel, 2001; Gasol *et al.*, 2002).

La biomasa promedio del picoplancton procarionte total en las fases hidrodinámicas mostró un comportamiento inverso a la registrada para su abundancia celular ya que la etapa de estratificación temprana es quien registra la máxima biomasa comparada con las siguientes etapas de la estratificación, éste comportamiento puede ser producto de las condiciones hidrodinámicas prevaecientes así también de las condiciones oligotróficas del sistema pues se conoce que estas generan adaptaciones bacterianas que afectan al volumen celular y a su vez el contenido de carbono (Schut *et al.*, 1997).

9.1 VARIABILIDAD EN LA COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS TAXA EN LAS FASES HIDRODINÁMICAS DEL LAGO LA PRECIOSA.

9.1.1 DOMINIO ARCHAEA

Archaea juegan un papel importante en la oxidación del amonio en los ambientes acuáticos (Auguet *et al.*, 2012; Auguet y Casamayor, 2013); aunque su distribución espacio-temporal en los ambientes de agua dulce ha sido pobremente estudiado (Casamayor *et al.*, 2001; Lliros *et al.*, 2008, 2010; Auguet *et al.*, 2011).

Las investigaciones llevadas a cabo mediante la secuenciación genómica han permitido conocer que este dominio tiene una extensa presencia en ambientes de agua dulce; los cuales también han sido considerados como uno de los reservorios más grandes de diversidad genética (Lliros *et al.*, 2008; Auguet *et al.*, 2010). De manera particular se ha observado que este dominio no es abundante en los lagos, ya que no constituyen un alto porcentaje del total de las células presentes (Abe *et al.*, 2003) lo que corrobora que se haya encontrado en el lago La Preciosa una baja abundancia relativa, ya que este dominio no superó el 10% de las células totales [Fig. 14].

La detección del dominio Archaea en el lago La Preciosa, se hizo a través de la sonda ARCH 915 la cual cubre un 90% de los taxa (Greuter *et al.*, 2016; Quast *et al.*, 2013).

Las máximas abundancias relativas fueron registradas durante la fase de estratificación temprana (epilimnion y metalimnion) y bien establecida (epilimnion e

hipolimnion) con abundancias relativas no mayores al 10%, estas abundancias relativas difieren con lo reportado por Coci *et al.* (2015) para el lago Maggiore, al indicar abundancias promedio de 14.7-31.3 %, aunque este último ambiente es muy profundo (380 m) y se encuentra en latitudes templadas. Las bajas abundancias relativas de las Archaea y su ausencia durante la fase de mezcla y en la etapa de estratificación tardía del lago La Preciosa pueden deberse a que en lagos de agua dulce exista algún tipo de Archaea que no está adaptada a las condiciones prevalecientes en ese momento (Lliros *et al.*, 2008); también se puede considerar que su tasa de crecimiento es baja o su actividad metabólica es reducida por lo que están a la espera de los cambios ambientales provenientes de la dinámica del lago (Lliros *et al.*, 2008; Lennon y Jones, 2011).

Por otro lado, durante la estratificación bien establecida del lago La Preciosa fueron registradas abundancias máximas; las cuales se ubicaron hacia el epilimnion e hipolimnion y cuyo comportamiento ha sido reportado por Callieri *et al.* (2009) en lago Maggiore. Callieri *et al.* (2009) proponen que los estratos del epilimnion e hipolimnion van a contener las mayores abundancias relativas contribuyendo a la actividad bacteriana de manera diferente para ambas zonas, lo que coincide con un comportamiento típico asociado a los océanos.

Cabe mencionar que existe un precedente con FISH y CARD-FISH para la sonda ARCH 915 llevado a cabo en el Lago Vilar por Lliros *et al.* (2008); el objetivo fue determinar la composición de las Archaea, pero tras varios intentos y modificaciones al protocolo no se registraron conteos por medio de microscopia de epifluorescencia, donde la causa es algo incierta para los ambientes no extremos; sin embargo, cuando sí se registra la presencia de este grupo; es en bajas abundancias, similar a lo encontrado para La Preciosa durante la estratificación temprana y bien establecida; mientras que la ausencia de estas en la mezcla y estratificación tardía puede ser un problema similar a lo encontrado por Lliros *et al.* (2008).

9.1.1.1 FILO THAUMARCHAEOTA

El filo Thaumarchaeota en el lago La Preciosa no fue detectado; se sabe que la sonda CREN 537, la cual cubre un 49% de los taxa (Greuter *et al.*, 2016; Quast *et al.*, 2013) tiene como objetivo detectar al grupo MG1.1a (Callieri *et al.*, 2014; Coci *et al.*, 2015) que tiene preferencia por ambientes salinos (La Cono *et al.*, 2013).

La preferencia de esta sonda hacia ambientes salinos no es una restricción, pues este taxón ha sido hallado en ambientes de agua dulce al emplear la sonda de oligonucleótido CREN 537 (Callieri *et al.*, 2014), esto es debido a que el grupo MG1.1a que detecta esta sonda tiene una alta similitud genética (89%) con el grupo SAGMCG-1 de ambientes de agua dulce (Auguet y Casamayor, 2013; Coci *et al.*, 2015).

La detección de Thaumarchaeota a través del empleo de la sonda CREN 537 en ambientes salinos y su posible ausencia en ambientes de agua dulce, puede ser corroborado a través del estudio realizado para el lago Atexcac en el 2014 cuyo origen de formación es similar para el lago La Preciosa; pero difieren notablemente en términos de salinidad, ya que el lago de Atexcac presenta una salinidad $\pm 6.0 \text{ g L}^{-1}$, mientras que a través de la medida indirecta de los sólidos disueltos totales del lago La Preciosa registró para este estudio una salinidad de 1.1 g L^{-1} , considerando a este último como un ambiente subsalino. Sin embargo, el filo Thaumarchaeota sí fue detectado en el lago Atexcac únicamente durante la etapa de estratificación bien establecida, atribuyendo su presencia a determinadas variables limnológicas dentro de las que se incluye el amonio, mismo que mantuvo una correlación negativa con el filo Thaumarchaeota (Arellano-Posadas, com. pers.). Este taxón tiene preferencia a bajas concentraciones de amonio, siendo este último parámetro determinante para la presencia o ausencia de este filo, puesto que su rango óptimo de crecimiento es por debajo de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Pester *et al.*, 2011; Hollibaugh *et al.*, 2014). En el lago La Preciosa las concentraciones de amonio durante el periodo de estudio superan esta concentración [Cuadro 4 y Fig.5].

Cabe decir que para evitar la no detección de este taxón en ambientes de agua dulce Coci *et al.* (2015) recomiendan el uso de la sonda de oligonucleótido MG1-535 de reciente creación, la cual tiene como objetivo la detección de microorganismos de ambientes marinos (MG1.1a) y de agua dulce (SAGMCG-1).

9.1.2 DOMINIO BACTERIA

Las Bacterias son los mediadores de los ciclos biogeoquímicos, su distribución y abundancia dentro de los sistemas acuáticos está determinada por la heterogeneidad del ambiente ya que se ha demostrado que la disponibilidad de nutrientes y los cambios consecutivos en el sistema pueden afectar la composición de la comunidad bacteriana (Yannarell *et al.*, 2003), por lo

que muchas de estas comunidades frecuentemente difieren entre los distintos sistemas de lagos (Newton *et al.*, 2011).

En el lago La Preciosa el dominio Bacteria registró una variabilidad en las abundancias relativas durante la fase de mezcla y la estratificación, teniendo en la mezcla una máxima abundancia de 58%, mientras que en la estratificación este máximo fue detectado al final de la misma (63%). Las abundancias relativas anteriormente mencionadas son superiores a las registradas en los estudios llevados a cabo por Hernández-Avilés *et al.* (2010) empleando FISH y Bautista-Reyes y Macek (2012) a través de CARD-FISH para el lago Alchichica.

La fase de estratificación registró variabilidad en los taxa que constituyen al dominio Bacteria [Fig. 14 y 15], debido a que estos cambios verticales en la composición del picoplancton procarionte en los lagos tropicales está aparentemente relacionado con cambios térmicos, de oxígeno y con la estratificación de los nutrientes (De Wever *et al.*, 2005).

La etapa de estratificación bien establecida registró la mínima abundancia relativa y una alta variabilidad de temperatura, oxígeno y nutrimentos [Figs. 2 y 4]; donde la temperatura actúa en varios aspectos del dominio Bacteria incluida la reproducción, tasa de crecimiento y requerimientos nutricionales (McArthur, 2006); mientras que el oxígeno gobierna la composición química del agua por procesos de óxido-reducción y puede influir también en la composición biológica y abundancia de los organismos dentro de un sistema acuático (Nürnberg, 1995). Las abundancias relativas también varían en función del agotamiento o incremento de nutrientes, donde las Bacterias han desarrollado diferentes estrategias que tienen como resultado cambios significativos en la composición taxonómica (Boucher *et al.*, 2006; Bertoni *et al.*, 2008; Hibbing *et al.*, 2010). Esto puede explicar lo que ocurre en La Preciosa durante la fase de estratificación [Fig. 14], donde por medio del análisis canónico no se encuentran interacciones muy claras; dado que este dominio se encuentra ubicado en el punto de convergencia de las variables limnológicas [Fig. 19], lo que indica que mantiene una interacción con bajo peso compartido con todas las variables; sin embargo, esto no sucede con las correlaciones de Pearson pues es aquí donde se registra una alta correlación positiva con la temperatura y el oxígeno [Cuadro 8] lo que podría explicar la variabilidad de este dominio durante la estatificación bien establecida; mientras que con los

nutrientes, esta relación no se encuentra reflejada en las correlaciones de Pearson para la fase de estratificación, pero esto no significa que no tengan una interacción específica con algún taxón perteneciente al dominio Bacteria.

9.1.2.1 FILO CYANOBACTERIA: PICOCIANOBACTERIAS

En el lago La Preciosa se observó la presencia de Picocianobacterias, cuya morfología fue redonda u oval, y donde sus morfotipos generalmente estuvieron constituidos tanto por células individuales como por micro y macrocolonias de diferente tamaño, las cuales se observó se encontraban contenidas en un mucílago; lo anterior ha sido mencionado por Callieri *et al.* (2012) al indicar que en condiciones favorables algunas Picocianobacterias desarrollan un mucílago o vaina, y estas permanecen cerca de la célula madre formadora de un grupo, aunque también se sugiere que posiblemente las microcolonias pueden ser consideradas como formas de transición a partir de células individuales de acuerdo con trabajos llevados a cabo por Crosbie *et al.* (2003).

Las colonias de Picocianobacterias en la fase de estratificación registraron una distribución variable, indicando un máximo para el epilimnion únicamente durante la estratificación bien establecida [Fig. 11B], se ha reportado que generalmente las colonias se encuentran presentes en toda la zona eufótica, aunque en baja abundancia en los lagos oligotróficos (Callieri *et al.*, 2012).

Con un metalimnion bien establecido y profundo como el que se registró en la estratificación bien establecida del lago La Preciosa se favorece a la formación de colonias de Picocianobacterias, ya que en esta zona las condiciones de nutrientes y de baja intensidad de luz son favorables para el desarrollo de las mismas (Camacho *et al.*, 2003; Callieri *et al.*, 2007).

En la mezcla, en la estratificación temprana y bien establecida se registraron abundantes colonias, pero con bajo contenido de células; sin embargo, en la estratificación tardía se presentó un comportamiento inverso al disminuir las colonias y registrar mayor cantidad de células [Fig. 11]. Pernthaler *et al.* (1996) y Mühling *et al.* (2005) indican que la presencia o ausencia, así como la abundancia y distribución de las colonias dentro de la columna de agua puede cambiar rápidamente en función a los cambios térmicos y de luz y dependen también de la presencia de depredadores

Las Picocianobacterias individuales (0.2 a 2 μm) son señaladas como el componente principal de la comunidad del picofitoplancton (Callieri *et al.*, 2012), donde recientemente el género *Synechococcus* fue estudiado por Callieri *et al.* (2013) para un estudio filogenético de ambientes epicontinentales, en el cual fue incluido el lago La Preciosa y en el que se concluye la presencia de este género con la cepa 8C7.

La abundancia de las Picocianobacterias individuales en los lagos tropicales muestra un máximo de abundancia celular que oscila en dos órdenes de magnitud (10^5 a 10^6 cél. mL^{-1}) y que preferentemente llegan a un máximo cercanamente a la primavera o verano de la región tropical (Malinsky-Rushansky *et al.*, 1997; Peštová *et al.*, 2008) lo que coincide con lo registrado para La Preciosa al presentar sus máximos a inicios y finales de la estratificación con abundancias de 1.54×10^5 y 2.22×10^5 cél. mL^{-1} , donde éste último fue favorecido por la proximidad de la circulación [Fig.10].

Weisse (1993) sugiere que la temperatura puede ser el causante del inicio del crecimiento de las Picocianobacterias en aguas marinas y dulces, pero no para la regulación de su dinámica poblacional. Lo anterior puede ser confirmado, ya que no se halló alguna relación entre la abundancia de este taxón con la temperatura para el lago La Preciosa [Cuadro 8]; aunque las células de las Picocianobacterias son pequeñas, su abundancia y distribución dentro de la columna de agua pueden cambiar rápidamente con diferentes factores bióticos y abióticos (Callieri *et al.*, 2012). Así existen estudios para lagos que demuestran máximos de abundancia de Picocianobacterias en diferentes estratos de la columna de agua, con condiciones limnológicas variables, aunque con patrones similares. Así el máximo del epilimnion del lago La Preciosa en la estratificación temprana coincide con lo registrado para el epilimnion del lago Alchichica, México (Peštová *et al.*, 2008); mientras el máximo en el metalimnion de la estratificación bien establecida en La Preciosa concuerda con lo reportado para los Lago Constanza y el Lago Maggiore (Weisse y Schweizer, 1991; Callieri y Pinolim, 1995), y por último en el hipolimnion en la estratificación tardía del lago La Preciosa [Fig.10] como también fue registrado para el lago Michigan (Fahnenstiel y Carrick, 1992).

Camacho *et al.* (2003) reportan que las Picocianobacterias muestran máximos de biomasa durante la estratificación bien establecida y tardía, específicamente en el

metalimnion, lo que coincide con lo encontrado para la biomasa de las Picocianobacterias en la estratificación bien establecida para el lago La Preciosa [Fig. 12], ya que se ha sugerido que estas poseen una alta eficiencia fotosintética a bajas condiciones de radiación lumínica y se sabe que en donde se ubica el metalimnion predomina un espectro de luz verde, mismo que puede ser aprovechado por este taxón (Camacho y Vicente, 1998); además de que la estructura celular procariota de las Picocianobacterias hace que estas mantengan un bajo costo metabólico de mantenimiento, considerando lo anterior como una razón importante de su éxito (Weisse, 1993).

9.1.2.2 FILO PROTEOBACTERIA

Este filo es uno de los principales y más numerosos dentro del dominio Bacteria, en este filo se incluye la mayoría de las bacterias quimioheterótrofas Gram-negativas (Gupta, 2000) que generalmente son anaerobias facultativas.

En el presente trabajo el filo Proteobacteria se estimó a partir de las abundancias relativas de las clases Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria (que incluye a la mayoría de las Bacterias sulfato reductoras) y Gammaproteobacteria [Fig.16].

9.1.2.2.1 Clase Alphaproteobacteria

En ambientes de agua dulce, la clase Alphaproteobacteria es poco estudiada, y se sabe que su abundancia en estos es menos numerosa ya que se ha reportado una correlación positiva entre la abundancia relativa de organismos de esta clase con el incremento de la salinidad (Wu *et al.*, 2006). En ambientes de agua dulce oligotróficos la abundancia de esta clase se ve favorecida (Eiler *et al.*, 2003), ya que este filo se caracteriza por tener un alto metabolismo y diversidad genética (Hagström *et al.*, 2002).

Alphaproteobacteria sólo registró hibridación para la fase de mezcla, mientras que para la fase de estratificación no se registró presencia de esta clase, contrariamente el género *Paracoccus* y el subclado SAR 11-IIIb, los cuales forman parte de esta clase y cuya sonda de oligonucleótido ALF968 también debiera considerarlas al quedar incluidas dentro de los órdenes Rhodobacterales y Pelagibacterales; donde estos grupos específicos antes mencionados si registraron detección durante las diferentes etapas de la estratificación.

La sonda de oligonucleótido ALF968 se empleó para detectar la clase Alphaproteobacteria; a pesar de que ésta sonda presenta una elevada sensibilidad (76.6%) (Greuter *et al.*, 2016; Quast *et al.*, 2013), registró una abundancia relativa muy baja o nula a lo largo del período de estudio, de donde se puede inferir que una de las causas de su bajo éxito de hibridación tiene que ver con el tamaño tan pequeño de las células y su bajo contenido de RNA ribosomal, que preferentemente puede ser detectado con sondas muy específicas como sería el caso del subclado SAR 11-IIIb las cuales son considerada por su tamaño como ultramicroplancton (Heinrich *et al.*, 2013). O bien como consecuencia de que ALF968 detecta todos los filamentos conocidos pertenecientes a (Kragelund *et al.*, 2009), que fueron poco abundantes en el lago.

9.1.2.2.1.1 Género *Paracoccus*

El género *Paracoccus*, mantuvo una contribución importante y variable en las diferentes fases hidrodinámicas, registrando así su máxima abundancia relativa durante la fase de mezcla (14%) y al final de la estratificación (13%), que de manera particular para la primera etapa de estratificación este género registró homogeneidad en sus abundancias porcentuales, mientras que en la segunda etapa este taxón mostró un ligero aumento en su abundancia relativa, la cual se distribuyó preferentemente hacia la zona del epilimnion (12%) e hipolimnion (9%) en tanto que en la última etapa de estratificación se observó un patrón decreciente registrando su máximo de abundancia relativa en la zona del epilimnion (14%). La posibilidad de encontrar este género en condiciones aerobias o anaerobias puede responder a su versatilidad metabólica al poder participar en procesos de respiración oxigénica o de desnitrificación (Baker *et al.*, 1998). Este mismo patrón de abundancia del género en el estrato superficial y profundo del sistema fue registrado para el lago Alchichica de acuerdo con Hernández-Avilés *et al.* (2010), aunque para este sistema hubo una mayor abundancia en el hipolimnion durante la estratificación bien establecida, diferencia atribuida al presentar una mayor profundidad con un fondo anóxico desarrollado donde predominan la desnitrificación.

9.1.2.2.1.2 Subclado SAR 11-IIIb (LD12)

Dentro de la clase Alphaproteobacteria se ubica el orden Pelagibacterales, es en éste donde se incluye el subclado SAR 11-IIIb, que a través de la sonda de oligonucleótido ALF968 es

posible detectar en una baja proporción (1.2%) (Greuter *et al.*, 2016; Quast *et al.*, 2013), por lo que se empleó una sonda más específica conocida como LD12-121 la cual registra una mejor cobertura (84%) de este grupo (Greuter *et al.*, 2016).

La distribución del grupo LD12 se encuentra controlado por el pH (Stepanauskas *et al.*, 2003) coincidiendo con Newton *et al.* (2011) al indicar que LD12 es más común y abundante en lagos con pH alto y decrementos en el contenido de amonio, lo anterior resulta coincidente y puede ser corroborado ya que este taxón registró correlación positiva con el pH, mientras que para el amonio este mantuvo una relación negativa, esto de acuerdo con las correlaciones de Pearson.

Las abundancias relativas de LD12 registradas durante la estratificación, indicaron una alta variabilidad a nivel espacial y temporal [Figs. 17 y 18] lo que se contrapone a lo reportado por Heinrich (2015) quien menciona que este taxón va a mantener una distribución estable a nivel espacial y temporal aun con variaciones ambientales con preferencia particulares a las concentraciones de oxígeno, esto último corresponde a lo hallado para la distribución de LD12 en el lago La Preciosa ya que su distribución espacial puede estar sujeta tanto a la distribución del oxígeno disuelto como a la de la temperatura.

El grupo LD12 en lagos prealpinos exhibe patrones de distribución espacio-temporal, registrando máximos en la capa superficial durante los meses de verano cuando las temperaturas exceden 15.0 °C (Salcher *et al.*, 2011b), este mismo comportamiento siguió el grupo LD12 en el lago La Preciosa; además de ser poco abundante durante la estratificación temprana se le sitúa a este grupo como el menos dominante de los grupos que conforman la clase Alphaproteobacteria durante esta etapa, lo que coincide con las abundancias observadas de SAR11 para ambientes marinos (Heinrich, 2015). Esto se debe a que durante esta etapa el grupo LD12 es menos competitivo bajo condiciones de alta productividad como lo que se presenta regularmente al inicio de la estratificación, que regularmente están acompañados de florecimientos de fitoplancton (Alonso y Pernthaler, 2006; Heinrich *et al.*, 2013), donde los estudios apuntan a que sus abundancias relativas tiene una relación positiva con bajas productividades pues este taxón tienen la habilidad de competir exitosamente bajo estas condiciones.

9.1.2.2.2 Clase Betaproteobacteria

Una de las clases del filo Proteobacteria que es más abundante y predominante en los ambientes de agua dulce son las Betaproteobacteria (Glöckner *et al.*, 2000; Zwart *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006). Esta clase registró hibridación para ambas fases hidrodinámicas del lago La Preciosa, que de manera particular para la estratificación registró variabilidad en el promedio de sus abundancias relativas [Figs. 17A y B].

Se ha reportado para los lagos hiposalinos (1.9 a 3.6 g L⁻¹) localizados en la región del Altiplano del Tibet, China la abundancia relativa de Betaproteobacteria se encuentran en un intervalo de 2.2 a 6.8% (Wu *et al.*, 2006) que en comparación con el lago La Preciosa son inferiores dado que para Betaproteobacteria se registró una abundancia mínima de 8% y una abundancia máxima del 19%.

Se sabe que Betaproteobacteria tiene rápidos crecimientos como respuesta a los aumentos de nutrientes orgánicos e inorgánicos, por lo que se le suele considerar como organismos oportunistas, confiriéndole a esta fracción del picoplancton procarionte ser la más activa y versátil (Pérez y Sommaruga, 2006; Šimek *et al.*, 2006; Newton y McMahon, 2011; Salcher *et al.*, 2011a), lo que hace suponer que la distribución de este grupo en la columna de agua para La Preciosa, al comienzo y al final de la estratificación, se encuentra ligada a la disponibilidad de los recursos; de acuerdo con la estacionalidad y la pérdida de estabilidad dentro de la columna de agua, lo que favorece la homogenización de los nutrientes, confiriéndole a este grupo su permanencia y dominancia.

Durante la estratificación bien establecida, Betaproteobacteria registró su máximo de abundancia relativa hacia la zona del hipolimnion [Fig. 17B], entendiendo que, durante esta etapa, este grupo participe en el proceso de nitrificación (Callieri *et al.*, 2015; Fig. 5) que de acuerdo al ACCST confirma su relación no solo con el amonio sino también con los bicarbonatos.

9.1.2.2.3 Clase Deltaproteobacteria

La clase Deltaproteobacteria alberga a la mayoría de las bacterias capaces de reducir los sulfatos (Baumgartner *et al.*, 2006). Deltaproteobacteria fueron detectadas con la sonda de

oligonucleótido SRB385 la cual se encarga de detectar específicamente a las Bacterias sulfato reductoras, y cuya cobertura de la sonda es del 20% de acuerdo con Quast *et al.* (2013).

En el lago La Preciosa ésta clase se localizó hacia el metalimnion e hipolimnion de la estratificación temprana, mismo comportamiento fue registrado durante la estratificación bien establecida; sin embargo, en la zona del epilimnion no se registró presencia de este taxón, coincidiendo con la idea de que las bacterias sulfato reductora o sulfurógenas (Atlas y Bartha, 2002) no solo se encuentran restringidas a las zonas carentes de oxígeno al considerarlas como heterótrofos anaerobios estrictos, sino que también se les puede atribuir su presencia en la zona aeróbica llevando a cabo la oxidación de varios substratos orgánicos con oxígeno como aceptor de electrones (Baumgartner *et al.*, 2006; Karnachuk *et al.*, 2006; Braissant *et al.*, 2007).

La dinámica en su distribución estacional corresponde con lo reportado para el lago Alchichica al hallar las Bacterias sulfato reductoras también con SRB385 como un grupo que contribuye porcentualmente en estas zonas específicas (Hernández-Avilés *et al.*, 2010) y que este grupo de bacterias junto con las desnitrificantes favorecen en la diferenciación química de la columna de agua durante la estratificación térmica de los lagos monomícticos cálidos (Eckert *et al.*, 2002).

La reducción de sulfato se puede dar en un amplio margen de pH, temperatura y salinidad (Atlas y Bartha, 2002), el ACCST aplicado para la fase de estratificación (temprana y bien establecida), por ser la única etapa en la que se reportó la presencia de este grupo, no mostró una relación con alguna variable limnológica, debido a que es incipiente la información aportada por este grupo; hallando de manera particular por las correlaciones de Pearson, que este taxón mantiene una correlación negativa con la temperatura, pH y sulfatos.

Recientemente se ha informado que las Bacterias sulfato reductoras se encuentran involucradas en la precipitación de carbonato de calcio, por ejemplo, en el estudio realizado por Escobar y Torres (2016) para confirmar la presencia de las Bacterias sulfato reductoras durante el “evento de emblanquecimiento” (*whiting event*) del lago Atexcac, se empleó un equipo de detección por inmunoensayo enzimático (QuickChek™, MODERNWATER), cuya funcionalidad de esta prueba es emplear anticuerpos purificados para detectar la enzima adenosina-5'-fosfosulfonato (APS) reductasa, la cual se encuentra presente en la membrana

de las Bacterias sulfato reductoras y así mismo permanece activa en el proceso de formación del trifosfato de adenosina (del inglés *adenosine triphosphate* o ATP). Los resultados obtenidos mediante esta prueba indicaron que las Bacterias sulfato reductoras mostraron un patrón de variación de su abundancia antes y durante el evento, registrando para el “evento de emblanquecimiento” un aumento hacia la zona del metalimnion e hipolimnion (10^4 cél. mL⁻¹).

Por otro lado, el empleo de este equipo de detección (QuickChek™, MODERNWATER) en el lago La Preciosa durante el “evento de emblanquecimiento” en el mes de agosto del 2014, se encontró que tanto en el epilimnion como en el hipolimnion la abundancia de las Bacterias sulfato reductoras fue de 10^3 cél. mL⁻¹ (Hernández-Avilés *et al.*, datos no publicados). La actividad registrada durante este evento también puede ser resultado de otro grupo de bacterias, como el picoplancton autotrófico particularmente Picocianobacterias, Cyanobacteria o incluso otras bacterias heterótrofas aerobias (Baumgartner *et al.*, 2006); donde la disponibilidad de iones de carbonato en solución, es promovida por las Bacterias sulfato reductoras, al consumir sulfato y producir sulfuro, propiciando un aumento del pH y por lo tanto de alcalinidad (Braissant *et al.*, 2007), lo que hace pensar que su presencia está ligada a la estacionalidad.

9.1.2.2.4 Clase Gammaproteobacteria

El porcentaje de abundancia registrado para Gammaproteobacteria generalmente es menor al registrado para Betaproteobacteria (Wu *et al.*, 2006). En el lago La Preciosa, Gammaproteobacteria mantuvo un intervalo de abundancia relativa del 2 al 13%, encontrando este máximo durante la estratificación bien establecida, indicando a este taxón como grupo dominante y no a Betaproteobacteria, al registrar una abundancia de 8%, así mismo durante la fase de mezcla Betaproteobacteria queda nuevamente superada por Gammaproteobacteria al registrar una abundancia superior (12%), lo anterior puede ser explicado, debido a que Gammaproteobacteria presenta estilos de vida competitivos y de rápido crecimiento lo que les permite dominar el ensamblaje microbiano después de un enriquecimiento de nutrientes además de tener preferencia por temperaturas cálidas (Newton y McMahon, 2011; Lefort y Gasol, 2013).

En las zonas oxigenadas de la columna de agua, Gammaproteobacteria utiliza el tiosulfato por ser estable en la presencia de oxígeno (Glaubitz *et al.*, 2013; Marshall y Morris 2013), este puede ser usado probablemente durante la estratificación temprana para La Preciosa, al ubicarse este grupo en la región del epilimnion y metalimnion, mientras que en la zona del hipolimnion no se registró su presencia, es por ello que en los sistemas acuáticos se presume que el papel de estos sea el de un organismo turista. Newton *et al.* (2011) sugieren que las Gammaproteobacteria son organismos copiótrofos, lo que podría relacionarse al comportamiento y adaptabilidad que mantiene ésta clase.

9.1.2.3 FILO ACTINOBACTERIA

Actinobacteria es un filo que mantiene una distribución cosmopolita en los diferentes ambientes acuáticos, tendiente a dominar frecuentemente en los ambientes de agua dulce (Newton *et al.*, 2007; Heinrich *et al.*, 2013; Salcher *et al.*, 2011a). Sin embargo, durante la fase de mezcla, no fue registrada la presencia de este filo, asumiendo probablemente que este taxón se encuentra condicionando tanto a características nutricionales estacionales, como a las propiedades físicas y químicas de los lagos de agua dulce, o muy probablemente por su pequeño tamaño no fue posible su observación en este período, se conoce que Actinobacteria presentan pequeños tamaños de acuerdo a los primeros aislamientos procedentes de lagos con diferente estado trófico Hahn *et al.* (2003), este hallazgo fue confirmado posteriormente al emplear la técnica FISH (Warnecke *et al.*, 2005).

Actinobacteria puede convertirse en uno de los grupos mayoritarios del picoplancton procarionte durante los florecimientos de fitoplancton (Newton *et al.*, 2011); por ejemplo en el estudio que evalúa la estructura de la comunidad fitoplanctónica llevado a cabo por Moran (2016) para el lago La Preciosa en el 2014, registra que la fase de mezcla se encontró dominada por Bacillariophyta, mientras que para este estudio se denota la ausencia del filo Actinobacteria, por otro lado en la fase de estratificación dominó mayoritariamente Chlorophyta, siendo durante esta fase hidrodinámica cuando se registra la presencia del filo Actinobacteria.

De acuerdo con la correlación de Pearson aplicado para la fase de estratificación, el filo Actinobacteria mantuvo una correlación positiva con la temperatura, oxígeno, pH y sulfatos [Cuadro 7]. El pH a menudo controla la presencia y permanencia de los componentes

biológicos (Fierer y Jackson 2006) y para éste filo puede ser el caso ya que se registró variabilidad del pH a través del tiempo, identificando un incremento mientras transcurrían las etapas de estratificación, lo que hace suponer que estos organismos se ven favorecidos al presentar máximas abundancias durante y al final de la estratificación [Figs. 17B y 18].

9.1.2.4 FILO BACTEROIDETES

CFE319a fue la sonda de oligonucleótido empleada para detectar a Flavobacteria, Sphingobacterias y Bacteroidetes, cubriendo el 43% del total de los grupos (Greuter *et al.*, 2016; Quast *et al.*, 2013).

Bacteroidetes ha sido reconocido como otro de los fila que domina mayoritariamente en los ambientes de agua dulce. Este filo presenta una variada diversidad fenotípica y metabólica al ser capaces de degradar aeróbicamente un amplio espectro de substratos (Bernardet *et al.*, 1996) unas cuantas especies de *Cytophaga* son anaerobias facultativas (descomponen celulosa, quitina o agar); mientras que, *Flavobacterium* es una bacteria típica del plancton de aguas salinas, que crece quimiolitotótróficamente en presencia de H₂ (Tortora *et al.*, 2016).

El estudio realizado por Díez-Vives *et al.* (2014) para ambientes marinos soporta la idea de que los Bacteroidetes son la población predominante durante periodos de tiempo muy cortos; registrándolos estacionalmente durante los periodos de florecimiento y senectud del fitoplancton; ya que los Bacteroidetes pueden ser sustituidos rápidamente por genotipos relacionados que se encuentran mejor adaptados a las condiciones cambiantes, hecho que puede asociarse a que el filo Bacteroidetes registrado en el lago La Preciosa se haya presentado en ambas fases hidrodinámicas, mostrando valores porcentuales máximos en la fase de mezcla y en la etapa de la estratificación tardía, de manera que en los estratos reflejó poca variabilidad en sus abundancias porcentuales [Fig. 17].

La abundancia relativa registrada en el estudio de Díez-Vives *et al.* (2014) muestra que los Bacteroidetes contribuyen a la estructura de la comunidad a través de su relación con algunas variables ambientales; por ejemplo, los Bacteroidetes registran correlación con la duración del día, lo cual es atribuido a la resistencia de estos a la radiación solar en comparación con otros grupos del bacterioplancton; también los Bacteroidetes muestran una correlación positiva con la temperatura, lo que es coincidente con lo registrado para La

Preciosa al relacionar las abundancia relativas de este taxón no solo con la temperatura si no con el pH y los sulfatos [Fig.7].

9.1.2.5 FILO PLANCTOMYCETES

El oligonucleótido PLA 886 posee una cobertura del 74% para detectar su grupo objetivo Planctomycetes (Greuter *et al.*, 2016; Quast *et al.*, 2013).

Hernández-Avilés *et al.* (2010) menciona en su estudio llevado para el lago Alchichica, que los Planctomycetes fueron el grupo más abundante en la fase de mezcla, reportando una contribución menor en otros estratos durante la fase de estratificación, mientras que para el lago La Preciosa, los Planctomycetes fueron uno de los filo dominante tanto para la fase de mezcla y estratificación, hallándolo de manera variable en los diferentes estratos de la columna de agua para las diferentes etapas de estratificación. Se ha reportado que este filo alberga especies aerobias quimioorganoheterótrofas y otras son quimiolitautotróficas anaerobias, estas últimas capaces de poder llevar a cabo la oxidación anaerobia del amonio (anammox) en sistemas dulceacuícolas (Jetten *et al.*, 2003), por lo que puede considerarse la presencia y actividad de alguna de estas especies o ambas en la columna de agua del lago La Preciosa.

En general la abundancia relativa para el filo Planctomycetes del lago monomítico cálido La Preciosa fue mayor comparada al de otros lagos, aunque en estos últimos se empleó únicamente FISH (Glöckner *et al.*, 1999; Hernández-Avilés *et al.*, 2010)

10. CONCLUSIONES

El patrón de distribución espacio-temporal del picoplancton procarionte dependió del comportamiento de monomixis cálida del lago, lo que se reflejó por la dominancia de diferentes categorías taxonómicas en las fases hidrodinámicas, registrando una mayor variabilidad de grupos taxonómicos en la fase de estratificación en comparación con la fase de mezcla.

Para el dominio Bacteria se encontró variabilidad temporal de los taxa que se evaluaron, identificando para la fase de mezcla la presencia mayoritaria en forma decreciente de los fila Proteobacteria, Planctomycetes y Bacteroidetes, mientras que en la fase de estratificación destacó la aparición del filo Actinobacteria y la presencia del dominio Archaea.

Para la clase Deltaproteobacteria, en las que se incluyen Bacterias sulfato reductoras presentó variabilidad durante la fase de estratificación, mientras que para la fase de mezcla no fueron detectadas.

Las Picocianobacterias registraron una distribución variable en su abundancia y biomasa; como resultado de la disponibilidad de nutrientes y a las condiciones favorables de luz; encontrando máximos en la fase de estratificación, así como en los diferentes estratos de la columna de agua.

Los gradientes físicos y químicos durante la estratificación en el lago La Preciosa influyeron de manera significativa en la distribución, abundancia y biomasa del picoplancton procarionte, aunque no se encontró un patrón general de variación de los taxa con respecto a la profundidad, lo que puede atribuirse a las características propias de cada etapa hidrodinámica en cuanto a la amplitud y ubicación de los estratos, así como a las funciones específicas asociadas de los grupos del picoplancton procarionte analizados.

La abundancia y biomasa del picoplancton procarionte, así como su actividad y crecimiento se encuentran limitados e influenciados principalmente por la disponibilidad de nutrientes, así como la variabilidad de la temperatura, el oxígeno disuelto y el pH.

11. REFERENCIAS

- 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.
- Alonso C, Pernthaler J (2006) *Roseobacter* and SAR11 dominate microbial glucose uptake in coastal North Sea waters. *Environmental Microbiology* 8:2022-2030.
- 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.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59(1): 143-169.
- APHA-AWWA, WEF (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Arrellano-Posadas JA, González-Flores E (2011) Dinámica espacio-temporal del picoplancton procarionte y su relación con la variabilidad limnológica del lago volcánico Atexcac, Puebla. (Tesis) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, 75 p.
- 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.
- 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.
- Arriaga CL, Aguilar V, Alcocer J, Jiménez, Muñoz E, Vázquez E (1998) Regiones hidrológicas prioritarias: fichas técnicas y mapa (1: 4,000,000). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 142 p.

- Atlas R, 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.
- Auguet JC, Barberan A, Casamayor EO (2010) Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal* 4:182-190.
- Auguet JC, Nomokonova N, Camarero L, Casamayor EO (2011) Seasonal changes of freshwater ammonia-oxidizing archaeal assemblages and nitrogen species in oligotrophic alpine lakes. *Applied and Environmental Microbiology* 77:1937-1945.
- 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.
- Auguet JC, Casamayor EO (2013) Partitioning of Thaumarchaeota populations along environmental gradients in high mountain lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 84:154-164.
- Azam F, Fenchel T, Field JG, Gray JS, Meyer-Reil L, Thingstad F (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Marine Ecology - Progress Series* 10:257-263.
- 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.
- Barberán A, Casamayor EO (2010) Global phylogenetic community structure and β -diversity patterns in surface bacterioplankton metacommunities. *Aquatic Microbial Ecology* 59(1):1-10.
- 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.

- 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.
- 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 aquatilis* Stohtl and Tait 1978. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:128-148.
- 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(2):120-127.
- 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.
- 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.
- Braissant O, Decho AW, Dupraz C, Glunk C, Przekop KM, Visscher PT (2007) Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. *Geobiology* 5(4):401-411.
- 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.
- Callieri C, Pinolim ML (1995) Picoplankton in Lake Maggiore, Italy. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 80(3):491-501.
- Callieri C, Stockner JG (2002) Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of Limnology* 61(1):1-14.

- Callieri C, Modenutti B, Queimaliños C, Bertoni R, Balseiro E (2007) Production and biomass of picophytoplankton and larger autotrophs in Andean ultraoligotrophic lakes: differences in light harvesting efficiency in deep layers. *Aquatic Ecology* 80:345–362.
- Callieri C (2008) Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Reviews* 1608:10-23.
- 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-oligotrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology* 75(22):7298-7300.
- Callieri C, Cronberg G, Stockner JG (2012) Freshwater picocyanobacteria: single cells, microcolonies and colonial forms. *Ecology of Cyanobacteria II*. Whitton BA (ed.) Springer Business Media, pp. 229-269.
- Callieri C, Coci M, Corno G, Macek M, Modenutti B, Balseiro E, Bertoni R (2013). Phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 85:293-301.
- Callieri C, 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(1):47-54.
- 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.
- Camacho A, Vicente E (1998) Carbon photoassimilation by sharply stratified phototrophic communities at the chemocline of lake Arcas (Spain). *Microbial Ecology* 25:11-22.
- 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.

- Carrasco-Núñez G, Ort HM, Romero C (2006) Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastem México). *Journal of Vulcanology and Geothermal Research* 159:179-197.
- Casamayor EO, Muyzer G, Pedrós-Alió C (2001) Composition and temporal dynamics of planktonic archaeal assemblages from anaerobic sulfurous environments studied by 16S rDNA denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing. *Aquatic Microbial Ecology* 25:237-246.
- 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, 1-11.
- Cole GA, Weihe PE (2015) “Light and the Aquatic Ecosystem” In: *Textbook of limnology*, Cole GA, Weihe PE (eds) Waveland press, 440 p.
- Crosbie ND, Pöckl M, Weisse T (2003) Rapid establishment of clonal isolates of freshwater autotrophic picoplankton by single-cell and single-colony sorting. *Journal of Microbiological Methods* 55:361-370.
- DeLong EF, Wu KY, Prezeh BB, Jovine RVM (1994) High abundance of Archaea In Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371:695-697.
- De Wever A, Aaike DW, Muylaer K (2005) Bacterial community composition in Lake Tanganyika: vertical and horizontal heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5029-5037.
- 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.
- Ducklow HW (2000) “Bacterial production and biomass in the oceans” In: *Microbial Ecology of the Oceans*. Kirchman DL (ed.) Wiley-Liss, 1st edition, pp. 85-120.
- 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.

- 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.
- 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.
- Escobar LL, Torres HJ (2016) Aislamiento y caracterización de la diversidad de Bacterias sulfato reductoras durante el Evento de Emblanquecimiento “Whiting Event” en el lago cráter Atexcac, Puebla. (Tesis) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, México, 80 p.
- Fahnenstiel GL, Carrick HJ (1992) Phototrophic picoplankton in lakes Huron and Michigan: abundance, distribution, composition and contribution to biomass and production. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49:379-388.
- Fierer N, Jackson RB (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:626-631.
- Fröstl JM, Overmann J (2000) Phylogenetic affiliation of the bacteria that constitute phototrophic consortia. *Archives of Microbiology* 174: 50-58.
- García ME (2004) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köeppen. Quinta edición. García ME (ed.) México. 90p.
- Gasol JM, Comerma M, García JC, Armengol J, Casamayor EO, Kojacká P, Šimek K (2002) A transplat 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.
- Glaubitz S, Kießlich K, Meeske C, Labrenz M, Jürgens K (2013) SUP05 Dominates the Gammaproteobacterial Sulfur Oxidizer Assemblages in Pelagic Redoxclines of the Central Baltic and Black Seas. *Applied and Environmental Microbiology* 79(8): 2767-2776.

- Glöckner FO, Fuchs BM, Amann R (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 65:3721-3726.
- Glöckner FO, Zaichikov E, Belkova N, Denissova L, Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R. (2000) Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66(11):5053-5065.
- Gómez-Tuena A, Orozco-Esquivel T, Ferrari Luca (2005) Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 57(3):227-283.
- Google Earth (2010) NASA, INEGI. Transnavicom USA. Ltd., Europa Technologies
- 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 Research* 44:1-4.
- Gupta SR (2000) The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 24:367-402.
- 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(7):3628-3633.
- Hahn MW, Lünsdorf H, Wu QL, Schauer M, Höfle J, Boenigk J, Stadler P (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1442-1451.
- Heinrich F (2015) Drivers of Population Dynamics in Bacterioplankton *Spotlight on Alphaproteobacteria and its dominant SAR11 Lineage*. (PhD Thesis) Uppsala University, Sweden 40 p.
- 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.

- 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.
- 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(9):1301-1314.
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology* 8:15-25.
- Hobbie JD, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 22:1225-1228.
- Hodell AD, Schelske CL, Fahnenstiel GL, Robbins LL (1998) Biologically induced calcite and its isotopic composition in Lake Ontario. *Limnology and Oceanography* 3:187-199.
- 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(3):685-698.
- Hoshino T, Yilmaz LS, Noguera DR, Holger D, 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.
- Ivanova AA, Kulichevskaya IS, Merkel AY, Toshchakov ST, Dedysh SN (2016) High Diversity of Planctomycetes in soils of two lichen-dominated sub-arctic ecosystems of Northwestern Siberia, *Frontiers in Microbiology* 20:1-12.
- 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.
- 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.
- 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, Stacebrandt E (eds.) Springer USA, 3rd edition, pp. 232-249.
- Kirchman DL, Dittel AI, Malmstrom RR, Cottrell MT (2005) Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnology and Oceanography* 50:1697-1706.
- Kragelund C, Müller E, Schade M, Nguyen HTT, Lemmer H, Seviour R, Nielsen PH (2009) “Identification of filamentous bacteria by FISH” In: *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment*. Nielsen PH, Daims H, Lemmer H (eds.) IWA Publishing, 1st edition, pp. 49.
- Kubota K (2013) CARD-FISH for environmental microorganisms: Technical advancement and future applications. *Microbes and Environments* 28:3-12.
- 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.
- Lagunas MYS, Martínez JTD (2015) Estructura de la comunidad del plancton procarionte en el lago volcánico, hiposalino y monomítico cálido Atexcac, Puebla. (Tesis) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, 86p.
- Langenheder S, Ragnarsson H (2007) The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities. *Ecology* 88:2154-2161.

- 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.
- Lennon JT, Jones ES (2011) Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature Reviews Microbiology* 9:119-130.
- Lewis WM (1983) A revised classification of lakes based on mixing. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40:1779-1787.
- Lliros M, Casamayor EO, Borrego C (2008) High archaeal richness in the water column of a freshwater sulfurous karstic lake along an interannual study. *FEMS Microbiology Ecology* 66 (2):331-342.
- Lliros M, Gich F, Plasencia A, Auguet JC, Darchambeau F, Casamayor EO, Descy JP, Borrego C (2010) Vertical Distribution of Ammonia-Oxidizing Crenarchaeota and Methanogens in the Epipelagic Waters of Lake Kivu (Rwanda-Democratic Republic of the Congo) *Applied and Environmental Microbiology* 76(20):6853-6863.
- 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.
- 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, β -subunit genes. *Antonie van Leeuwenhoek* 64:285-305.
- Madsen EL (2005) Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. *Nature Reviews Microbiology* 3:439-446.
- 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.
- Malone TC (1980) "Algal size" In: *The physiological ecology of phytoplankton. Studies in Ecology*. Morris (ed.) Blackwell Science Publications, pp. 433-463.

- Marcos H, Reyes M (2012) Variabilidad anual del picoplancton procarionte en el lago monomóctico cálido La Preciosa, Puebla. (Tesis) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, 82p.
- Marshall KT, Morris RB (2013) Isolation of an aerobic sulfur oxidizer from the SUP05/Arctic96BD-19 clade. *ISME Journal* 7:452-455.
- Martínez CM (2010) Efecto de cladóceros y copépodos sobre el fitoplancton del lago La Preciosa, Puebla. (Tesis) Maestría en Ciencias del Mar y Limnología UNAM, México, 80 p.
- Massana R y Logares R (2013) Eukaryotic versus prokaryotic marine picoplankton ecology. *Environmental Microbiology* 15(5):1254-1261.
- McArthur V (2006) "Species Interactions and Processes" In: *Microbial ecology. An evolutionary approach*. University of Georgia. Academic Press (Elsevier), pp. 317-318.
- Morán VM (2016) Estructura de la comunidad fitoplanctónica durante las etapas hidrodinámicas del lago La Preciosa, Puebla. (Tesis) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, México, 66 p.
- Mühling M, Fuller NJ, Millard A, Somerfield PJ, Marie D, Wilson WH, Scanlan DJ, Post AF, Joint I, Mann NH (2005) Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage community: evidence for viral control of phytoplankton. *Environmental Microbiology* 7:499–508.
- Newton RJ, Stuart EJ, Matthew RH, McMahon KD (2007) Phylogenetic ecology of the freshwater Actinobacteria acl Lineage. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7169-7176.
- Newton RJ, Jones ES, Elier A, McMahon KD, Bertilsson S (2011) A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology* 75(1):14-49.

- Newton RJ y McMahon KD (2011) Seasonal differences in bacterial community composition following nutrient additions in a eutrophic lake. *Environmental Microbiology* 13:887-899.
- Nold SC, Zwart G (1998) Patterns and governing forces in aquatic microbial communities. *Aquatic Ecology* 32:17-35.
- Nürnberg GK (1995) Quantifying anoxia in lakes. *Limnology and Oceanography* 40:1100-1111.
- Pérez MT, 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.
- Pernthaler J, Šimek K, Sattler B, Schwarzenbacher A, Bobkova J, Psenner R (1996) Short-term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligo-mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research* 18:443–462.
- Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2002) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3094-3101.
- Pester M, Christa S, Wagner M (2011) The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology* 14:300-306.
- Peřtová 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.
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-94
- 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.

- 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 Research* 41:590-596.
- Ramette A, Tiedje J (2007) Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microbial Ecology* 53:197-207.
- 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.
- Revilla M, Iriarta A, Madriasa I, Orive E (2000) Bacterial and phytoplankton dynamics along a tropic gradient in a shallow temperate estuary. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 50: 297-313.
- Reynolds CS (1984) *The ecology of freshwater phytoplankton*. Nueva York, Cambridge University Press 384 p.
- 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.
- 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.
- Schut F, Princess RA, Gottschall JC (1997) Oligotrophic and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquatic Microbial Ecology* 12:177-202.
- Sieburth MJ, Smetacek V, Lenz J (1978) Pelagic ecosystems structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography* 23(6):1256-1263.
- 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.

- Sorokin DY, Berben T, Melton ED, Overmars L, Vavourakis CD, Muyzer G (2014) Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles* 18:791-809.
- 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.
- Stockner JG, Antia NJ (1986) Algal picoplankton from marine and freshwater: a multidisciplinary perspective. *Canadian Journal of Fisheries and aquatic Sciences* 43: 2472-2503.
- Straškrabová V, Bertoni R, Blažo M, Callieri C, Forsstrom L, Fott J, Kernan M, Macek M, Stuchlík E, Tolotti, M (2009) “Structure of pelagic food webs in European mountain lakes during ice-free season” In: Patterns and factors of biota distribution in remote European mountain lakes. Catalan J, Curtis JC, Kernan M (eds.) *Advances in Limnology* 62:19-53.
- Ter Braak, CJF (1986) Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology* 5:1167-1179.
- Thompson JB, Schultze-Lam S, Beveridge TJ, Des Marais DJ (1997) Whiting events: biogenic origin due to the photosynthetic activity of cyanobacterial picoplankton. *Limnology and Oceanography* 42(1): 133-141.
- Tortora GJ, Funke BR, Case ChL (2016) “The Prokaryotes Domains Bacteria and Archaea” In: *Microbiology. An Introduction*. Pearson Education, pp. 290-317.
- Vilaclara G, Chávez M, Lugo A, González H, Gaytán M (1993) Comparative description basic chemistry of crater-lakes in Puebla State, Mexico. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 25: 435-440
- Vilaclara G, Armienta MA, Alcocer J, Carrasco G, Baños L, Ortega B (2002) Limnogeología de los lagos cráter de la Cuenca Oriental, México. *Memorias del II Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Limnología. Hacia la unificación de conceptos.*

Conjunto Amoxcalli de la Facultad de Ciencias, UNAM. México. Resumen p. 12.
(<http://aml.iztacala.unam.mx/Memorias%20II%20AML.pdf>).

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.

Weisse T, Schweizer A (1991) Seasonal and interannual variation of autotrophic picoplankton in a large prealpine lake (Lake Constance). *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 24:821-825.

Weisse T (1993) Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. *Advances in Microbial Ecology* 13:327-370.

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.

Wetzel RG (2001) *Limnology. Lake and River Ecosystems*. 3rd. Edition. Academic Press. Elsevier Science. pp. 1006.

Williams WD (1996) The largest, highest and lowest lakes of the world: saline lakes. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 26: 61-79.

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.

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.

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.