



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA TIERRA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**Caracterización del componente bacteriano en los sedimentos superficiales del
lago cráter Alchichica, México**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA TIERRA**

PRESENTA:

JAZMIN DE JESUS SANTILLAN MANJARREZ

Directora de tesis:

**Dra. Rocio Jetzabel Alcántara Hernández
Instituto de Geología**

Miembros del comité evaluador

**Dra. Ma. Aurora Armienta Hernández - Instituto de Geofísica, UNAM
Dr. Hugo Bruno Beraldi Campesi - Instituto de Geología, UNAM
Dra. Elcia Margareth Souza Brito - Universidad de Guanajuato, UNAM
Dra. Liseth Carolina Pérez Alvarado - Instituto de Geología, UNAM**

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., Enero de 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias de la Tierra de la UNAM por la formación académica otorgada.

Al proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA209516 y proyecto CONACYT-CB 256332 por financiar esta investigación,

A Yislem Beltrán, Osiris Gaona, Olivia Zamora Martínez, Javier Tadeo León, Iris Suárez Quijada, Lucy Mora Palomino, Luis A. Oseguera, Sergio Castillo Sandoval, Teresa Piñ Puig y Jonathan Montes de Oca Romero, por su apoyo técnico en la realización de este proyecto.

A mi directora de tesis, la Dra. Rocío J. Alcántara Hernández, quien es una académica excepcional y que me guió en todo momento en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del comité evaluador de la tesis: Dra. Elcia Margareth Souza Brito, Dra. Liseth Carolina Pérez Alvarado, Dra. Ma. Aurora Armienta Hernández y al Dr. Hugo Bruno Beraldi Campesi, por sus comentarios y sugerencias para mejorar el escrito.

Agradecimientos a título personal

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de BiogeoMi: Bernardo Águila, Eduardo Aguilar, David Portillo y Jesús Torres, por todas las horas de laboratorio compartido.

A mis amigos del posgrado: Karla Rosas, Pablo Román, Guadalupe Isidro Óscar Pérez, y Francisco E. Saldaña, por su apoyo durante los semestres.

Índice

1. RESUMEN.....	01
2. ABSTRACT.....	02
3. INTRODUCCIÓN.....	03
4. MARCO TEÓRICO.....	05
4.1. Lagos tipo <i>maar</i>	05
4.1.1. Origen, distribución y características geoquímicas.....	05
4.1.2. Lagos tipo <i>maar</i> en México.....	07
4.1.3. Los lagos de la Cuenca Oriental de México y el lago cráter Alchichica.....	08
4.2. Lagos salino alcalinos.....	13
4.2.1. Origen, distribución y características geoquímicas.....	13
4.2.2. Comunidades microbianas en sistemas salino alcalinos.....	15
4.2.3. Cadenas tróficas microbianas.....	16
4.2.4. Microbiología de los lagos salino alcalinos.....	18
4.3. Metagenómica para la caracterización del componente bacteriano.....	19
4.3.1. Generalidades.....	19
4.3.2. La región V4 para análisis filogenéticos.....	21
4.3.3. Técnicas de secuenciación masiva.....	23
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	25
6. HIPÓTESIS.....	25
7. OBJETIVOS.....	26
7.1.General.....	27
7.2.Particulares.....	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
8.1. Sitio de trabajo y colección de muestras.....	27
8.2. Trabajo de laboratorio.....	29
8.2.1. Análisis de agua.....	29
8.2.2. Análisis de sedimentos.....	30

8.2.3. Identificación molecular de bacterias y arqueas.....	31
8.2.4. Análisis estadísticos.....	33
9. RESULTADOS.....	35
9.1. Agua	35
9.1.1. Parámetros fisicoquímicos del agua <i>in situ</i>	35
9.1.2. Análisis de iones mayores y nutrientes	36
9.2. Sedimentos	37
9.2.1. Mineralogía	37
9.2.2. Contenido de carbono, nitrógeno y otros elementos	39
9.3. Identificación molecular de bacterias y arqueas en sedimentos	41
9.4. Variabilidad de la diversidad procariontica a nivel intramuestra	44
9.5. Abundancia relativa de bacterias y arquea a nivel fila	46
9.6. Abundancia relativa de bacterias y arquea a nivel clase	50
9.7. Abundancia relativa de bacterias y arquea a nivel orden	52
9.8. Relaciones entre la estructura de la comunidad bacteriana con las características geoquímicas.....	53
10. DISCUSIÓN	56
10.1. Mineralogía	56
10.2. Principales grupos taxonómicos y su distribución	56
10.3. Fijación de carbono	57
10.4. Heterotrofia	59
10.5. Metanogénesis	61
10.6. Sulfato reducción	62
10.7. Quimiolitotrofias	63
10.8. Modelo de ciclaje de nutrientes en los sedimentos del lago cráter de Alchichica	64
11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	67
12. REFERENCIAS	68
13. ANEXOS	80
13.1. Anexo A. Difractograma de sedimentos	80
13.2. Anexo B. Abundancia elemental en sedimentos del lago Alchichica	82

13.3. Anexo C. Abundancia relativa de los fila encontrados en sedimentos superficiales	83
13.4. Anexo D. Distribución de las diferentes secciones de los núcleos.....	86
13.5. Anexo E. Metabolismos inferidos a partir de la diversidad microbiana mediante las secuencias 16S ARNr	87
13.6. Anexo F. Porcentaje de abundancia relativa de bacterias sulfato reductoras y aqueas metanogénicas en los sedimentos del lago cráter de Alchichica	88

❖ Índice cuadros

❖ Cuadro 1. Lagos cráter tipo <i>maar</i> del mundo y México.....	06
❖ Cuadro 2. Lagos cráter en México y lagos tipo <i>maar</i>	07
❖ Cuadro 3. Características físicas y químicas de los principales de los lagos de la Cuenca Oriental.....	10
❖ Cuadro 4. Algunas bacterias y arqueas aisladas de columna de agua de lagos salino alcalinos.....	18
❖ Cuadro 5. Algunas especies descritas en sedimentos de lagos salino alcalinos	19
❖ Cuadro 6. Porcentaje de bacterias cultivables con cuenta total determinadas como Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	20
❖ Cuadro 7. Comparación de la confiabilidad taxonómica de la región V4 y del gen 16S ARNr.....	22
❖ Cuadro 8. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados en la reacción de PCR.....	32
❖ Cuadro 9. Parámetros fisicoquímicos tomados <i>in situ</i> del agua circundante a los sedimentos.....	35
❖ Cuadro 10. Concentración de iones mayores en muestras de agua del lago cráter Alchichica.....	36
❖ Cuadro 11. Concentración de nutrientes en muestras de agua del lago cráter Alchichica.....	37
❖ Cuadro 12. Fases minerales identificadas y su proporción relativa de intensidad (RIR) en sedimentos del lago cráter Alchichica, con control LS2.....	38
❖ Cuadro 13. Porcentaje de carbono total (C_{Tot}), orgánico (C_{Org}), inorgánico (C_{Ino}), nitrógeno total (N_{Tot}), fósforo total (P) y azufre total (S) en sedimentos del lago cráter Alchichica.....	39
❖ Cuadro 14. Concentración de algunos elementos en sedimentos del lago cráter Alchichica.....	40
❖ Cuadro 15. Número de secuencias obtenidas de sedimentos del lago Alchichica..	41
❖ Cuadro 16. Porcentaje de secuencias mitocondriales, de cloroplastos y no asignadas dentro del dominio procarionte.....	42

- ❖ Cuadro 17. Porcentaje de secuencias no eucarióticas en sedimentos del lago Alchichica.....43
- ❖ Cuadro 18. Porcentaje de abundancia de heterótrofos con mayor representatividad pertenecientes a Bacteroidetes.....60

❖ Índice figuras

❖ Figura 1. Diagrama de un <i>maar</i>	06
❖ Figura 2. Los lagos cráter de la Cuenca Oriental de México y su posición en el Eje Neovolcánico Transversal.....	09
❖ Figura 3. Mapa de la localización del lago cráter Alchichica.....	11
❖ Figura 4. Representación esquemática de la composición iónica predominante en los diferentes tipos de lagos salino y/o alcalinos.....	14
❖ Figura 5. Evolución geoquímica de salmueras y secuencia de precipitación mineral.....	15
❖ Figura 6. Esquema representativo de las cadenas tróficas en lagos salino alcalinos.....	17
❖ Figura 7. Estructura secundaria y terciaria del gen 16S ARNr.....	22
❖ Figura 8. Puntos de muestreo de sedimentos en el litoral y en la cuenca del lago Alchichica.....	28
❖ Figura 9. Medición de parámetros fisicoquímicos <i>in situ</i>	29
❖ Figura 10. Núcleos del sedimento extraído del lago Alchichica.....	30
❖ Figura 11. Gel de electroforesis para verificación de amplicones 16S ADNr.....	33
❖ Figura 12. Paisaje del sitio S12.....	37
❖ Figura 13. Porcentaje de secuencias 16S ADNr obtenidas de Bacteria y Arquea, así como las secuencias no asignadas.....	44
❖ Figura 14. Análisis de componentes principales de las réplica técnicas de los sedimentos S4, S8 y S10.....	45
❖ Figura 15. Mapa de abundancias relativas de los diferentes fila encontrados en sedimentos del lago cráter Alchichica.....	47
❖ Figura 16. Comparación del agrupamiento de las submuestras por medio de PCA.....	48
❖ Figura 17. Análisis de componentes principales a nivel fila en sedimentos y los principales grupos que determinan la distribución.....	50
❖ Figura 18. Análisis de componentes principales a nivel clase.....	51
❖ Figura 19. Análisis de componentes principales a nivel orden.....	52

❖ Figura 20. Análisis de componentes principales de las características geoquímicas de los sedimentos analizados.	53
❖ Figura 21. Análisis de correlación canónica entre la matriz de datos de abundancia a nivel orden y las características geoquímicas de sedimentos de Alchichica.....	55
❖ Figura 22. Abundancia relativa de los órdenes de Cyanobacteria encontrados en sedimentos del lago cráter Alchichica.....	57
❖ Figura 23. Abundancia relativa de Cianobacterias y Chromatiales en los sedimentos del lago Alchichica.....	59
❖ Figura 24. Análisis de componentes principales del contenido de Corg, Cino, Ctot y la proporción Corg/Cino en los sedimentos del lago cráter Alchichica.....	61
❖ Figura 25. Porcentaje de abundancia relativa de organismos fermentadores y acetogénicos.....	62
❖ Figura 26. Porcentaje de abundancia relativa de organismos sulfato reductores...	63
❖ Figura 27. Porcentaje de abundancia relativa de organismos nitrificadores y oxidadores de metano.....	64
❖ Figura 28. Modelo de ciclaje biogeoquímico y los procariontes responsables en los sedimentos superficiales del lago cráter de Alchichica.....	66
❖	

1. RESUMEN

El lago Alchichica es un lago cráter en el centro de México (19° 24' N, 97° 24' O, 2300 m s.n.m.) perteneciente a una serie de lagos cuaternarios permanentes de tipo *maar* localizados en el Eje Neovolcánico Transversal. Éste representa uno de los más profundos en México con más de 60 m de profundidad. El sistema es clasificado como un lago salino alcalino (pH > 8.9 y conductividad eléctrica $\sim 13.4 \text{ mS cm}^{-1}$ en la superficie), formado por una explosión freática y principalmente alimentado por un flujo subterráneo rico en sodio proveniente de materiales volcánicos y bicarbonato de calizas cretácicas. Existen varios estudios que han descrito la diversidad filogenética en las microbialitas del lago y algunos de ellos han incluido la composición bacteriana de la columna de agua. Sin embargo, no se han reportado estudios sobre los sedimentos, que son un componente principal en la biogeoquímica del lago.

En este estudio, exploramos la diversidad genética de las bacterias y arqueas en varias muestras de sedimentos, empleando fragmentos de secuenciación masiva del 16S ARNr. También se determinó la mineralogía y geoquímica ambiental para relacionarlas con la estructura de la comunidad bacteriana. Un total de 2,015,053 secuencias fueron obtenidas ($119,447 \pm 40,737$ por muestra), de las cuales, la mayoría estuvieron relacionadas al dominio Bacteria (89.15%), y una menor proporción a Arquea (3.78%), incluyendo secuencias no asignadas/clasificadas (7.28%). Las familias más importantes fueron Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria y Euryarchaeota. Los sedimentos estuvieron principalmente compuestos de aragonita (29-42%), hidromagnesita (26-67%) y plagioclasas de composición intermedia (12-30%). La composición bacteriana fue principalmente determinada por la profundidad de los sedimentos y no existieron relaciones con el contenido de C_{Org} . En las muestras superficiales (0-4 cm) se tuvieron grupos característicos como Flavobacteriales y Saprospirales. Mientras que en las muestras de 3 a 7 cm se encontró principalmente al orden E2 de Thermoplasmata (Arquea).

Este estudio representa uno de los primeros en aportar conocimiento sobre la diversidad microbiana en los sedimentos de uno de los lagos cráter mejor estudiados de México, y da pie al conocimiento de los procesos biogeoquímicos que allí ocurren.

2. ABSTRACT

Lake Alchichica is a crater-lake in Central Mexico (19° 24' N, 97° 24' W, 2300 m a.s.l.), belonging to a series of permanent quaternary *maars* type crater-lakes located in the Neovolcanic axis. This lake is the deepest crater-lake in Mexico with over 60 m depth. The system is classified as a soda lake (pH > 8.9 with electrolytic conductivity ~13.4 mS cm⁻¹ at the surface), formed by a phreatic explosion and mainly fed by an influx of water rich in sodium from volcanic materials, and bicarbonates from Cretaceous limestone. Several studies have described the phylogenetic diversity in the microbialites of lake and some of them have included bacterial composition in column water. Yet, there is a lack of reported studies regarding the sediments, which are an important component of the lake's biogeochemistry.

In this study, we surveyed the bacterial and archaeal genetic diversity of several sediment samples from the lake, using high throughput sequencing methods of the 16S rRNA. We also determined the mineralogical and geochemical composition to relate them to the community structure. A total of 2,015,053 sequences were obtained (119,447 ± 40,737 per sample), from which most of them were related to Bacteria (89.15%), with a minor proportion of Archaea (3.78%), including unassigned sequences (7.28%). The most important phyla were Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Cyanobacteria and Euryarchaeota. Sediments were mainly composed by aragonite (29-42%), hydromagnesite (Mg₅(CO₃)₄(OH)₂·4H₂O) (26-67%), and plagioclases of intermediate composition (12-30%). The bacterial composition was mainly determined by the depth of the sediment, and no relationship was found with organic C. In the surface samples (0-4 cm), groups such as Flavobacteriales and Saprospirales were characteristic. While in samples from 3-7 cm the order E2 from Thermoplasmata (Archaea).

This study represents the first reporting the prokaryotic composition in the sediments from one of the most studied crater lakes in Mexico, and provides knowledge for interpreting local biogeochemical processes.

3. INTRODUCCIÓN

México es un país con un relieve altamente marcado por la actividad volcánica. Asociada a ésta, existen una serie de sistemas lacustres cuya composición química depende de varios factores como la geología regional, el clima, y la actividad volcánica pasada y presente (Armienta *et al.*, 2008). Los lagos tipo *maar* –o lagos cráter–, son formados durante explosiones freático-magmáticas y son generalmente circulares, de entre 2-3 km de diámetro y por debajo el nivel circundante (Ollier, 1967). Algunos lagos cráter también se caracterizan por tener aguas salinas o hipersalinas, y sus principales iones suele ser CO_3^{2-} , HCO_3^- y Na^+ , con bajas de concentraciones de Ca^{2+} . La formación de estos ambientes salino alcalinos acuáticos se ve también favorecida en climas áridos o semiáridos, donde la tasa de evaporación es mayor a la de precipitación, por lo que es común encontrarlos en las regiones subtropicales (Grant *et al.*, 2011). Las altas concentraciones de $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ permiten la formación de un ambiente alcalino natural estable, con valores de pH reportados de entre 9.0 y 10.5, y son de interés por su microbiología, fisicoquímica y sus procesos biogeoquímicos (Grant *et al.*, 2011; Pecoraino *et al.*, 2015).

La microbiología de estos sistemas ha sido una pregunta constante de investigación, donde han abundado los trabajos en la columna de agua (Grant *et al.*, 2011), pero con una falta de información sobre los sedimentos lacustres. Algunos trabajos –como el de Zolitschka *et al.* (2013)– se han concentrado en estudiar la hidrología de la cuenca y en hacer reconstrucciones de paleoambientes, dejando de un lado el factor biológico. Sin embargo, este último es muy importante ya que se ha reportado que existe una correlación entre las comunidades microbianas; los procesos geológicos y los paleoambientes; además de que, parte de la comunidad microbiana representa un proxy geomicrobiológico a conocer y considerar (*p.e.* Vuillemin & Ariztegui, 2013). Paralelamente, los procesos biogeoquímicos son sensibles a los cambios en los parámetros ambientales, físicos o químicos del sistema (Glombitza *et al.*, 2013), y se pueden reflejar como cambios en la estructura de la comunidad bacteriana.

En México existen varios lagos de tipo *maar*, especialmente distribuidos dentro del Eje Neovolcánico Transversal. El lago cráter Alchichica (Puebla, México) pertenece a un conjunto de lagos de tipo *maar*, conocidos localmente con el nombre de Axalapazcos. Es

uno de los lagos con mayor número de estudios en el país de los cuales se conoce su hidrodinámica y en los últimos años, su microbiología (Couradeau *et al.*, 2011; Centeno *et al.*, 2012; Valdespino-Castillo *et al.*, 2014; Alcántara-Hernández *et al.*, 2017). Aunque varios estudios han descrito el componente biológico de este sistema, existen pocos estudios sobre la caracterización microbiológica en sus sedimentos, y hasta la fecha no se conoce la diversidad bacteriana de los mismos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Lagos tipo *maar*

4.1.1. Origen, distribución y características geoquímicas

La definición de *maar* es compleja y engloba varios aspectos. En general, los *maar* son formaciones en el paisaje causadas por explosiones volcánicas, que consisten en un cráter que alcanza o se extienden bajo el nivel del suelo, son considerablemente más anchos que profundos, y con un anillo periférico construido por el material eyectado del cráter (Ollier, 1967). Estas construcciones pueden o no, tener agua dentro de ellas, y en esta tesis, será objeto de estudio aquellos en los que hay agua y son considerados “lagos tipo *maar*”. Éstos se forman a partir de erupciones explosivas que crean un cráter o depresión en el relieve, el cual posteriormente, se llena de agua. Dichas explosiones son ocasionadas por el calentamiento del agua subterránea por acción del magma al aproximarse a la capa freática (Armienta *et al.*, 2008). Estas erupciones crean un anillo alrededor del respiradero, formadas principalmente por depósitos de inmersión hacia el exterior, pero con capas de inmersión en el cráter.

Se pueden encontrar dos tipos de *maar*. El más común es en el que parte del material del interior de la rampa vuelve a caer al interior del cráter; y en el segundo tipo, sólo hay corte de inmersión de toba, que indica su origen explosivo (Fig. 1). La mayoría de los lagos tipo *maar* tienen una forma circular, aunque con bordes asimétricos y de altura muy variable (Ollier, 1967). El diámetro que presentan también es variable y no se encuentra muy bien definido. Hay reportes de lagos *maar* de apenas 70 m de diámetro –como el Hutsche (Eifel, Alemania)–, y de hasta 3 km de diámetro. Sin embargo, la mayoría se encuentran en el rango de 2 a 3 km (López-Rojas *et al.*, 2015).

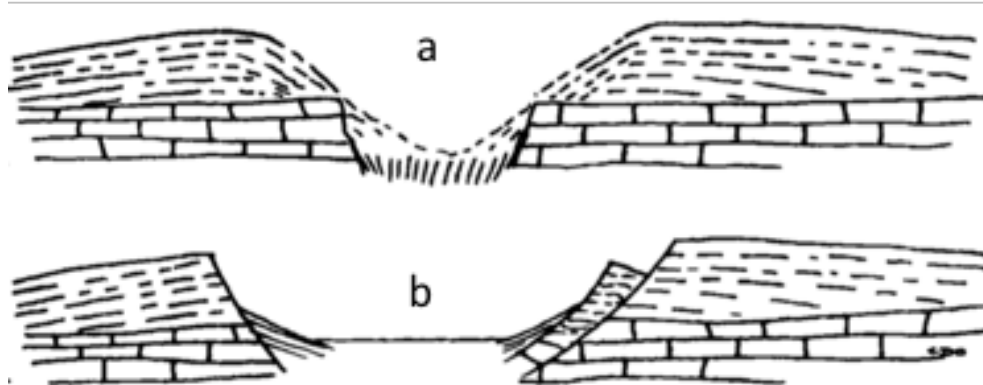


Figura 1. Diagrama de un *maar*. a) donde hay cierta cantidad de caída de material de toba en el cráter, y b) un sólo corte de inmersión de toba (tomado de Ollier, 1967).

Al estar relacionados con la actividad volcánica, los lagos cráter del tipo *maar* se encuentran dispersos en todo el mundo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Lagos cráter tipo *maar* del mundo.

Lago	País
Albano	Italia
Alchichica	México
Aljojuca	México
Bange	Tíbet
Bolsena	Italia
Bracciano	Italia
Campo volcánico de Bayuda	Sudán
Devil Mountain Lakes	Estados Unidos de América
El Elegante	México
El Rincón	México
Hoya del Mortero	España
Hutsche	Alemania
Kibourne Hole	Estados Unidos de América
La Alberca	México
La Joya Honda	México
La Posadilla	España
Lago Verde	México
Nyos	Camerún
Pilvermaar	Alemania
Pupuke	Nueva Zelanda
Santa María del Oro	México
Schalken Mehrener	Alemania
Weinfelder	Alemania
Zuñi Salt	Estados Unidos de América

4.1.2. Lagos tipo *maar* en México

México es un país con un relieve altamente marcado por la actividad volcánica. Debido a la actividad pasada y presente del Cinturón Volcánico Transversal Mexicano, se han formado una serie de sistemas lacustres asociados a volcanes (Cuadro 2), de los cuales destacaremos a los lagos que se formaron por las explosiones freatomagmáticas, o tipo *maar* (Armienta *et al.*, 2008). En México, desde los tiempos prehispánicos, se han diferenciado a los *maar*, siendo nombrados aquellos sin agua como xalapazcos (del náhuatl y que significa, vasija con arena; *xale* - arena y *apaxtle* - vasija de barro) y con agua, axalapazcos.

Cuadro 2. Lagos cráter en México y lagos tipo *maar* (Armienta *et al.*, 2008; Cano-Cruz & Carrasco Núñez, 2008)

Lago	Estado	Tipo de lago
Alchichica	Puebla	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Pleistoceno)
Aljojuca	Puebla	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Pleistoceno)
Atexcac	Puebla	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Pleistoceno)
Chichón	Chiapas	Lago cráter de explosión magmática
El Sol	Edo Mex.	Lago cráter de explosión magmática
Hoya de Estrada	Guanajuato	<i>Maar</i> ; (riolítico) cráter de explosión (Cuaternario)
La Alberca	Guanajuato	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Cuaternario)
La Luna	Edo Mex.	Lago cráter de explosión magmática
La Preciosa	Puebla	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Pleistoceno)
Lago Verde	Veracruz	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Pleistoceno-Holoceno)
Popocatepetl	Puebla	Lago cráter de explosión magmática
Quechulac	Puebla	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Pleistoceno)
Rincón Parangueo	Guanajuato	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Cuaternario)
Santa María del Oro	Nayarit	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Pleistoceno)
Tecuitlapa	Puebla	<i>Maar</i> ; explosión magmática (Pleistoceno)

Aunque los lagos tipo *maar* tienen una amplia distribución en México, existen principalmente tres campos volcánicos con este tipo de estructuras en el territorio: San Luis Potosí, Valle de Santiago y la cuenca Serdán Oriental (Carrasco-Núñez & Ort, 2015). Los últimos dos últimos pertenecen a la sección Cuaternaria del Eje Volcánico Transversal,

mientras que el primero es del Plioceno. Estos sistemas *maar* han sido caracterizados principalmente en tres tipos (Carrasco-Núñez & Ort, 2012):

- a) La Alberca-Cintora, caracterizados por una fase magmática precursora (actividad hawaiana-estromboliana), seguido de una fase de erupciones freatomagmáticas altamente explosivas. Aquí se encuentra el sistema de Alchichica.
- b) El tipo Atexcac-Tecuitlapa, iniciado con erupciones en acuíferos no consolidados o kársticos facturados, con migración del centro eruptivo a lo largo del cráter, produciendo deposiciones laterales variables.
- c) Tipo Hoya Estrada-Tepexitl, caracterizado por actividad riolítica “tuff –ring”.

4.1.3. Los lagos de la Cuenca Oriental de México y el lago cráter Alchichica

La Cuenca Oriental de México es una extensión de terreno árido a semiárido con una superficie de 958.6 km² en el Cinturón Volcánico Trasmexicano, y que se encuentra distribuida en los estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala (Falcón-Ordaz *et al.*, 2012). El conjunto de los lagos cráter se distribuyen en la parte este del Estado de Puebla bajo las coordenadas 19°05' y 19°24' Norte de latitud, 97°21' y 97°34' Oeste de longitud, a una cota promedio de 2300 m s.n.m. (Fig. 2a). Los lagos tipo *maar* del área se encuentran distribuidos en dos grandes llanos de origen lacustre: i) el Llano de San Andrés, en el que se encuentran los lagos de Aljojuca y Tecuitlapa; y ii) el Llano de San Juan, el cual cuenta con Atexcac, La Preciosa, Quechulac y Alchichica (Mancilla *et al.*, 2014) (Fig. 2b). Este conjunto de lagos es conocido como los Axalapazcos, y se encuentran dentro de una cuenca cerrada, originados por explosiones durante el Pleistoceno.

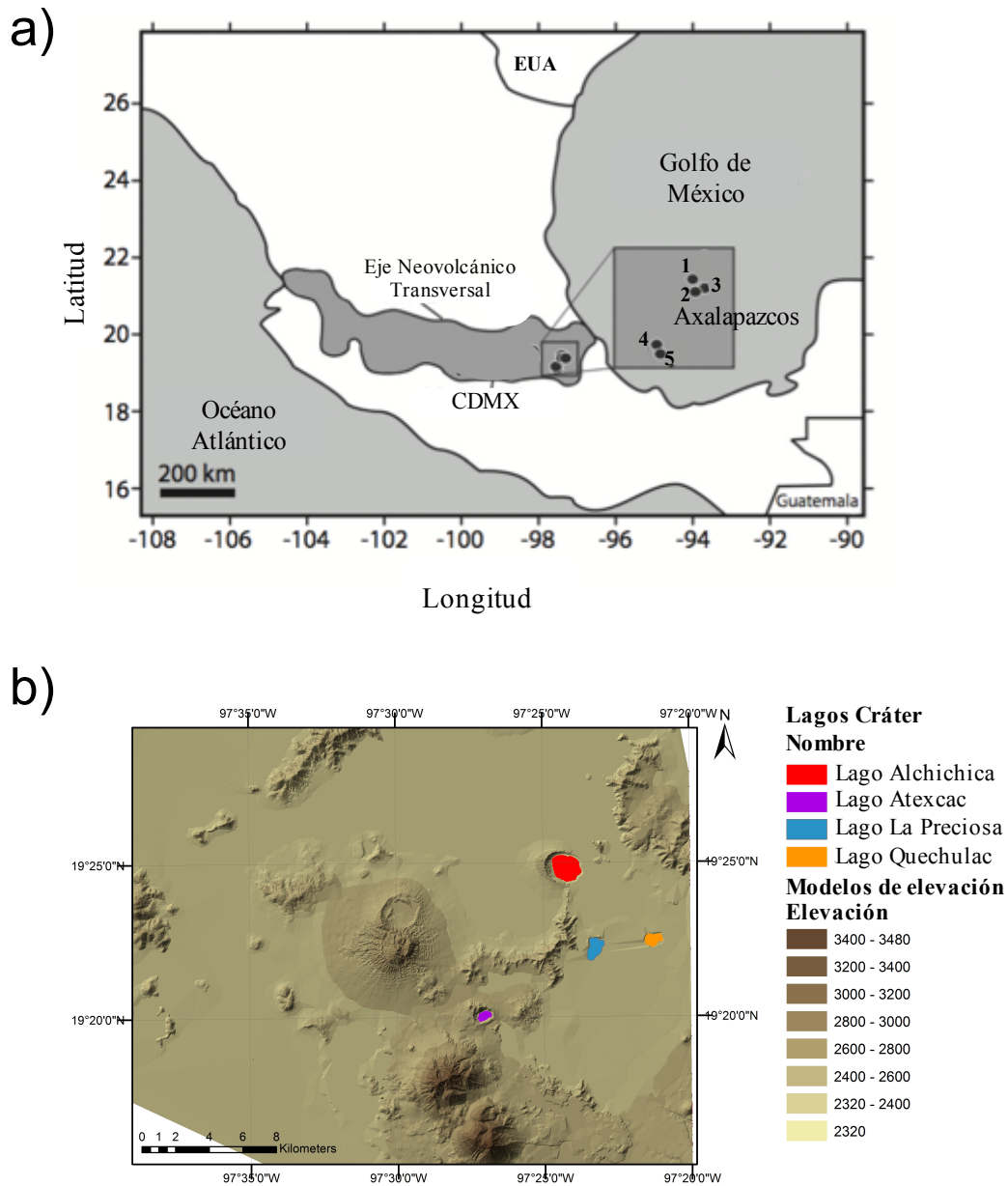


Figura 2. Los lagos cráter de la Cuenca Oriental de México y su posición en el Eje Neovolcánico Transversal.

- a) Localización de los lagos tipo *maar*: 1, Alchichica; 2, La Preciosa; 3, Quechulac; 4, Tecuitlapa; y 5, Aljojuca (Tomado de Pérez *et al.*, 2015). b) Localización de los lagos cráter en el Llano de San Juan.

El clima de la Cuenca Oriental de México es semiárido con una marcada temporada de lluvias en los meses de mayo a octubre. En el verano, el aumento de la actividad convectiva es impulsada por el calentamiento estacional de la superficie terrestre (Bhattacharya *et al.*,

2015). El tipo de vegetación predominante es de pastizales alcalinos y matorrales áridos en los valles (Falcón-Ordaz *et al.*, 2012).

Los lagos tipo *maar* de Alchichica, Atexcac, La Preciosa, Quechulac, Tecuitlapa y Aljojuca (Cuadro 3), pueden ser clasificados como anillos de tufa (*tuff rings*). Todos los lagos se comportan como templados monomícticos, a pesar de sus profundidades y de sus niveles tróficos, los cuales van desde escasamente productivos u oligotróficos (Atexcac), hasta altamente productivos o hipereutróficos (Tecuitlapa) (Vilaclara *et al.*, 1993; Alcocer *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Características físicas y químicas de los principales lagos de la Cuenca Oriental de México (Armienta *et al.*, 2008; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012; Mancilla *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2015; Zeyen *et al.*, 2015)

Concepto	Alchichica	La Preciosa	Quechulac	Aljojuca	Atexcac	Tecuitlapa
Localización	19°22'N 97°24'O	19°22'N 97°23'O	19°22'N 97°21'O	19°05'N 97°32'O	19°20'N 97°27'O	19°08'N 97°33'O
Área (km ²)	2.3	0.78	0.5	0.44	0.3	0.26
Volumen (m ³ x10 ⁶)	69.9	16.2	10.9	11.6	6.1	0.35
Profundidad máxima (m)	64.6	45.5	4	50.6	2.5	2.5
pH	8.8-9.0	8.6	8.4-8.7	8.7	8.4	8.7
Salinidad (g/L)	8.5± 0.2	1.18-1.35	0.5-0.95	0.2	6.54-7.39	2.4
Tipo de iones	Cl-Na	Bic-Mg	Bic-Mg	Bic-Na	Cl-Na	Bic-Na

El lago cráter Alchichica es el lago *maar* más grande de la Cuenca Oriental de México, con una superficie de 2.3 km², y una longitud actual de 1.8 km (noreste-sureste) (Fig. 3). Se localiza a los 19°24'13''N y 97°24'00''O y a una altitud de *ca.* de 2300 m s.n.m. (Alcocer *et al.*, 2008). El lago se encuentra alojado en el cráter del volcán con una forma subcircular (diámetro 1.8 km), con orientación SE-NE y una gran cresta al suroeste, de 1000 m de altura sobre el nivel del agua. Su profundidad máxima es de 62 m y la media de 40.9 m (Filonov *et al.*, 2006).

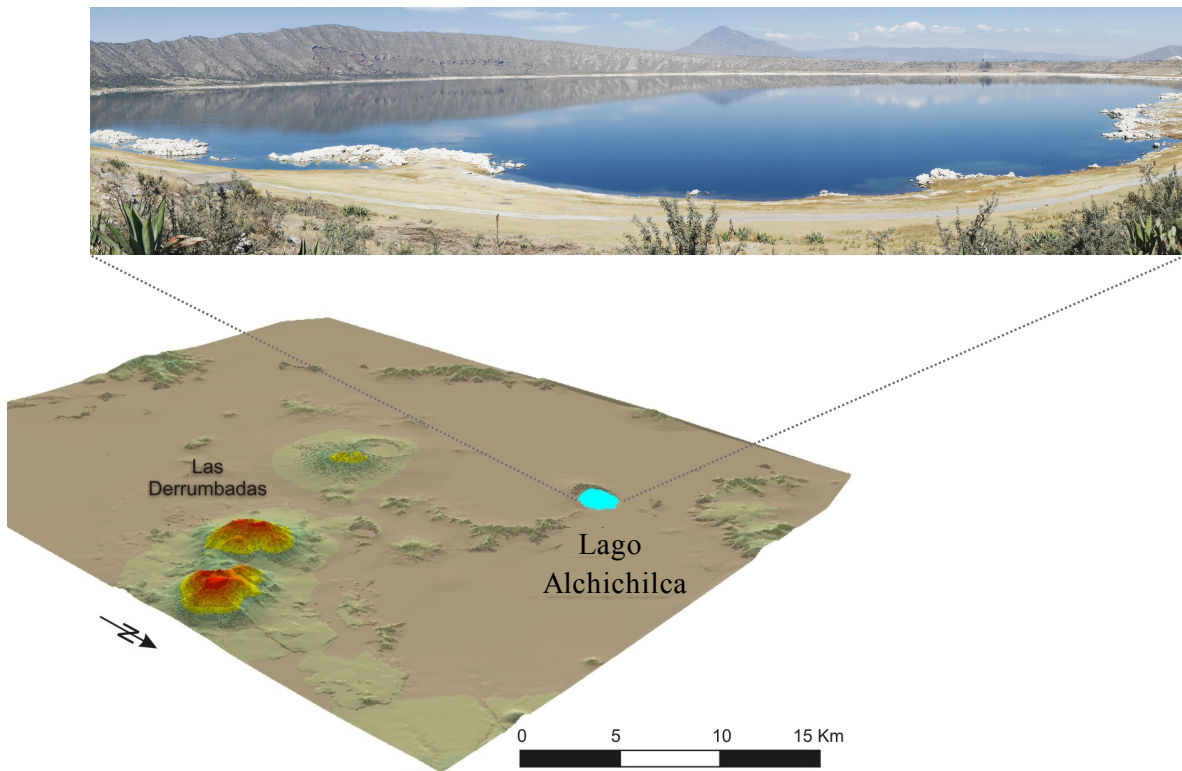


Figura 3. Mapa de la localización del lago cráter Alchichilca. En la fotografía se aprecia la vista panorámica del lago.

La región donde se ubica el lago cráter Alchichilca se caracteriza por un clima semi-árido (Bs según la clasificación de Köppen), con tasas de precipitación y evaporación anualmente menores a 500 y 1690 mm, respectivamente; y una temperatura media anual de 12.9 °C (García, 1988; Adame *et al.*, 2008). Entre sus propiedades se encuentra que es un lago monomítico cálido, por lo tanto, presenta una etapa de mezcla de agua entre finales de diciembre y principios de marzo; y una etapa de estratificación de diferentes grados durante el resto del año (Adame *et al.*, 2008; Alcocer *et al.*, 2008). La etapa de estratificación a su vez se subdivide en: estratificación temprana, bien establecida y tardía. La estratificación temprana abarca los meses de marzo-mayo, en este tiempo la termoclina tiene una profundidad de aproximadamente 10 m.

El lago recibe alimentación hídrica a partir de la red hidrográfica subterránea de la región. Es hiposalino (8.5‰) y atalasoalino (aguas no marinas con un considerable

contenido de sal de acuerdo con Alcocer y Escobar (1993). Su composición iónica se asemeja al agua de mar en cuanto a la dominancia de cloruros y sodio, pero se diferencia por ser de aguas mucho más alcalinas (elevada reserva alcalina que se refleja asimismo en pH de 8.7 a 9.2) (Vilaclara *et al.*, 1993). La temperatura de la masa de agua tiene una variación anual que va desde 14.5°C (durante la mezcla), hasta 20°C, aproximadamente. En la zona fótica se observa frecuentemente una sobresaturación de oxígeno, mientras que el hipolimnion se encuentra anóxico durante la estratificación (Alcocer *et al.*, 2001; Filinov & Alcocer, 2002).

En el lago Alchichica ocurren dos grandes picos de crecimiento fitoplanctónico durante el año (Alcocer & Lugo, 2003). En invierno, durante el período de mezcla hay un crecimiento significativo de diatomeas (Oliva *et al.*, 2001) y en verano (estratificación temprana, mayo) uno de cianobacterias (Lugo *et al.*, 2000). La comunidad del fitoplancton del lago de Alchichica contiene cerca de 19 especies (Oliva *et al.*, 2001). Kaźmierczak y colaboradores (2011) realizaron estudios moleculares de productores primarios en las microbialitas del lago Alchichica, encontrando una gran diversidad de cianobacterias dentro de estos seis ordenes: i) Oscillatoriales, ii) Chroococcales, iii) Nostocales, iv) Pleurocapsales, v) Prochlorales y vi) Synechococcales. Las especies fotosintéticas oxigénicas planctónicas más importantes de este ecosistema son las mayores o iguales a 2 μm como: *Cyclotella alchichica* (diatomea), *C. choctawhatcheena* (diatomea), *Chaetoceros elmorei* (alga) y *Nodularia spumigena* (cianobacteria), –a diferencia de lo reportado en océanos donde predomina el fito-picoplancton–. Las especies pico fotosintéticas < 2 μm consisten en *Monoraphidium minutum* (microalga verde), *Synechocystis aquatilis* (cianobacteria), *Oocystis parva* (microalga verde) y *O. submarina* (microalga verde) (Adame *et al.*, 2008).

También se han reportado tres especies como principales componentes del zooplancton en el lago de Alchichica: un copépodo (*Leptodiptomus novamexicanus*) y dos rotíferos (*Brachionus plicatilis* y *Hexarthra jenkiniae*). Los copépodos son más abundantes y frecuentes que los rotíferos (Lugo *et al.*, 1999; Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011; Alcántara-Rodríguez *et al.*, 2012;). De acuerdo a Lugo *et al.* (1999), la abundancia de copépodos en este lago muestra dos picos relacionados con los dos florecimientos de fitoplancton que toma lugar en el lago Alchichica.

Existe pocos estudios sobre los microorganismos encontrados en los sedimentos del lago Alchichica, los cuales describen principalmente la composición de diatomeas (incluyendo *Achnanthes delicatula*, *Nitzschia* eff. *fonticola*, *Navicella pusilla*, *Navicula cryptotenella* y *Rhopalodia opperculata*), así como, de los copépodos (v.g. *Limnocytherina axalapasco*) y otros eucariontes (Caballero *et al.*, 2003; Cohuo-Durán *et al.*, 2014).

4.2. Lagos salino-alkalino

4.2.1 Origen, distribución y características geoquímicas

Los lagos salino alcalinos son escenarios naturales que representan unos de los sistemas acuáticos alcalinos más estables del planeta (pH *ca.* 9-10.5). La alcalinidad se caracteriza en tener una alta concentración de carbonatos y bicarbonatos, dando origen a un sistema amortiguado con pH alcalino estable en el tiempo (Fig. 4). Gran parte de los lagos salino alcalinos se concentran en las zonas subtropicales (Grant & Sorokin, 2011), donde las condiciones climáticas favorecen una tasa de evaporación más alta que de precipitación, y las formaciones geológicas ayudan a que los factores geoquímicos evolucionen hacia un ambiente alcalino (Pecoraino *et al.*, 2015). Existen diversas concentraciones de iones, dependiendo la génesis y las condiciones ambientales de cada lago. Generalmente, el catión predominante es el Na^+ ; y $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2^{-2}$ y SO_4^{-2} los aniones más importantes (Sorokin & Kuenen, 2005).

Entre los factores ambientales a resaltar se encuentra la salinidad, ya que ésta moldea la composición de las comunidades bacterianas favoreciendo a ciertos grupos bacterianos. La salinidad tiene un mayor impacto en la composición bacteriana que factores como la altitud e inclusive la distribución geográfica (Wu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

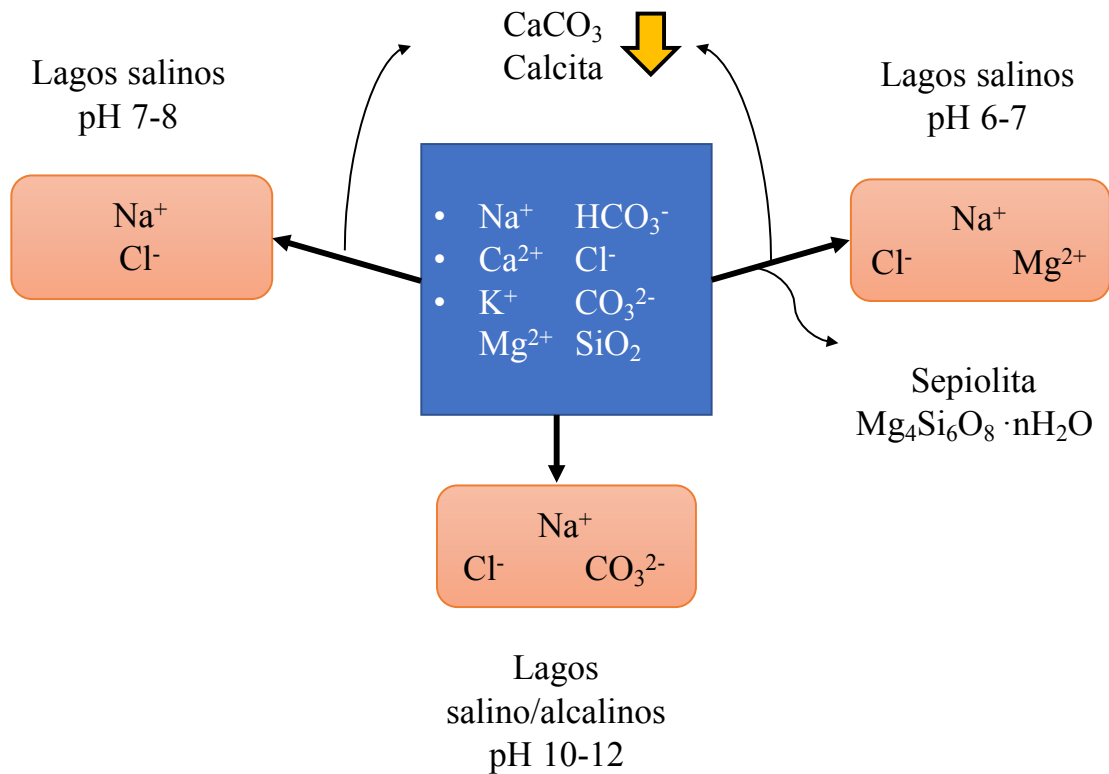


Figura 4. Representación esquemática de la composición iónica predominante en los diferentes tipos de lagos salino y/o alcalinos (Modificado de Grant, 2006).

Uno de los procesos geoquímicos más importantes en los lagos salino alcalinos es el aumento de solutos por la tasa de evaporación del sistema. Ante la pérdida de agua por evaporación en los lagos, comienza una serie de precipitaciones minerales. Los carbonatos de Ca y Mg son los primeros en precipitar ya que son los minerales menos solubles, y son seguidos de los sulfatos (v.g. yeso). Consecuentemente, estos iones son removidos de la fase líquida pasando a una fase sólida. Una vez precipitado el mineral, la solubilidad de los iones en el sistema adquiere un nuevo equilibrio ($K_s=[X^-][Y^+]$), donde el ion soluble más abundante será el dominante del sistema (Fig. 5). El resultado de este proceso son tres tipos principales de salmuera: i) las alcalinas ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, CO_3^{2-} o Cl^-), ii) las ricas en sulfatos ($\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$, Cl^-) y iii) las ricas en calcio (Na^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{Cl}^-$). Aunque estas salmueras dependen fuertemente de la composición inicial del agua, no se debe subestimar la relación litológica con la composición iónica final del lago (Pecoraino *et al.*, 2015).

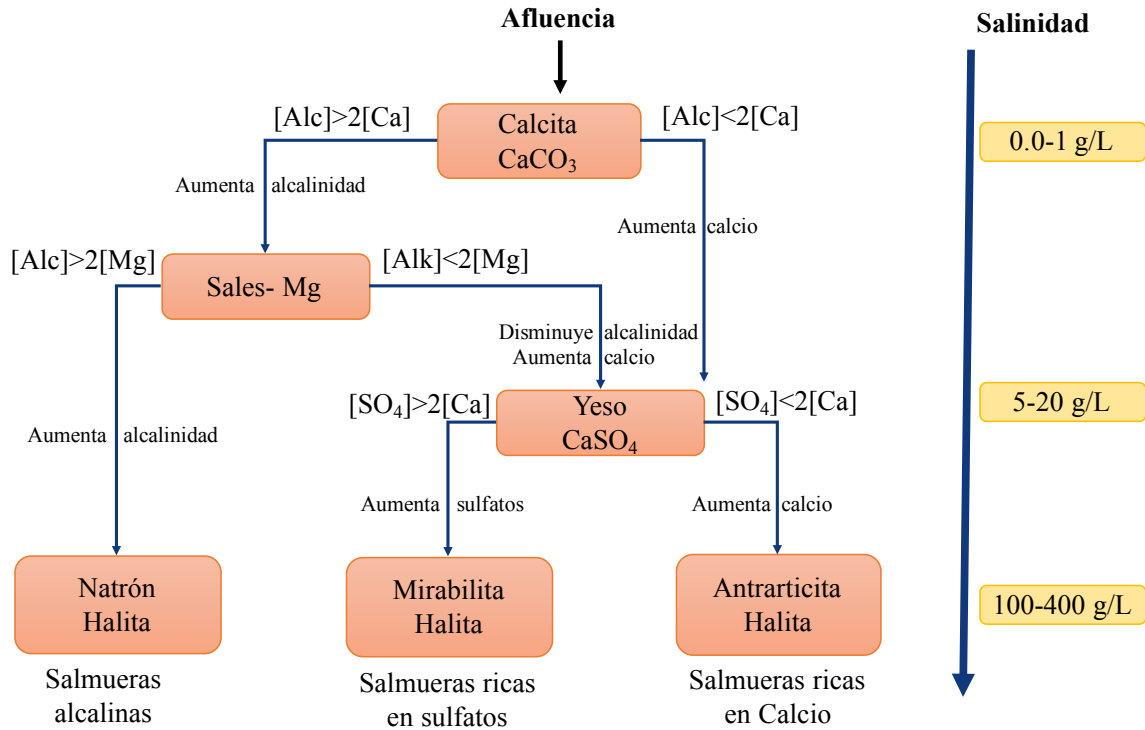


Figura 5. Evolución geoquímica de salmueras y secuencia de precipitación mineral (modificado de Pecoraino *et al.*, 2015). *Alc: alcalinidad; Ca: calcio; Mg: magnesio; SO_4^{2-} : sulfatos.

4.2.2 Comunidades microbianas en sistemas salinos alcalinos

Los ambientes salino alcalinos están habitados principalmente por procariontes que pueden formar comunidades densas, incluso en condiciones salino alcalinas saturadas (Imhoff *et al.*, 1979; Zavarzin *et al.*, 1999; Duckworth *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1998; Sorokin *et al.*, 2004). Generalmente las cianobacterias alcalífilas (*Spirulina*, *Arthrospira*, *Anabaenopsis*, *Cyanospira*) son las principales productoras primarias, además de fijadoras de nitrógeno (Oremland, 1990; Gerasimenko *et al.*, 1996; Herbst, 1998). Los polímeros producidos por los productores primarios son degradados por microorganismos hidrolíticos aerobios y anaerobios. Los principales grupos de anaerobios primarios y secundarios usan los monómeros y oligómeros (v.g. glucosa, sacarosa), y pueden ser fermentadores (*Spirochaeta alkalica*, *Spirochaeta asiatica*, *Spirochaeta africana*, *Tindalia magadii*, *Alkalibacter*, *Alkaliflexus*), acetogénicos (*Natroniella acetigena*, *Natronoincola histidinovorans*), metanogénicos (*Methanohalophilus zhilinae*, *Methanosalsum zhilinae*), metilótrofos

(*Methylophaga alcalica*), metanótrofas (*Methylomicrobium buryatense*) o bacterias sulfato reductoras (*Desulfonatronovibrio*, *Desulfonatronum*). Lo que realmente hace sobresalir a este ecosistema salino alcalino es la alta tasa de productividad que excede los 10 g/cm² por día (Grant, 2006).

La mayoría de los lagos alcalinos poseen concentraciones de sales en un rango de 1-35 g/L (Sorokin *et al.*, 2014). En estos ecosistemas la salinidad repercute en la composición de las comunidades bacterianas, correlacionándose positivamente o negativamente con ciertos grupos bacterianos (Lozupone & Knigh, 2007; Tang *et al.*, 2012). Los trabajos de Sorokin y Kuenen (2005), y de Oren (2011) ejemplifican cómo la comunidad microbiana quimiolitotrófica se ve afectada por el contenido de sales y la alcalinidad, lo cual significa una disminución en la abundancia de nitrificadores, metanógenos y metanotróficos, e hidrogenotróficos, entre otros.

4.2.3 Cadenas tróficas microbianas en lagos salinos alcalinos

En los lagos salino alcalinos podemos encontrar diferentes grupos funcionales de microorganismos como los organismos fotosintéticos oxigénicos y anoxigénicos, fijadores de C, fijadores de N, heterótrofos, fermentadores, metanógenos, metanótrofos, metilótrofos, desnitrificantes, sulfato reductores y sintrofos, entre muchos otros.

La diversidad microbiana de los lagos salino alcalinos está correlacionada con los procesos biogeoquímicos, los cuales se ven afectados por la concentración de sales en el medio. La respiración aerobia, la fotosíntesis (oxigénica y anoxigénica), la fijación de carbono y la desnitrificación, se ven poco inhibidas por la salinidad y pueden encontrarse en altas tasas de actividad (μ) en estos ambientes. Otros procesos llegan a estar activos a concentraciones de sal >200 mg/L, pero con tasas de transformación muy bajas. Ejemplos de éstos son la fermentación, la oxidación aerobia autotrófica de compuestos azufre, la reducción de sulfato por “oxidadores incompletos” –que convierten su sustrato (*e.g.* lactato) en acetato–, la metanogénesis de aminas metiladas y los homoacetogénicos, –que producen acetato a partir de H₂ y CO₂–. Por último, se encuentran los procesos que son altamente sensibles a la salinidad, e incluso disminuyen notablemente o desaparecen a

concentraciones de sales >200 mg/L. Éstos son la oxidación autotrófica de amonio y nitrito, la metanogénesis por reducción del CO₂ con H₂ (metanogénesis hidrogenotrófica), la metanogénesis de acetato (metanogénesis acetoclástica) y la sulfato reducción, empleando acetato como donador de electrones (Oren, 2011).

Los sistemas salino alcalinos poseen una compleja red alimentaria, que por un lado, interconecta varios ciclos biológicos mediante reacciones óxido reducción (redox), y por otro, impacta en la producción y consumo de gases de efecto invernadero (v.g. CO₂, N₂O y CH₄) (Fig. 6) (Antony *et al.*, 2013).

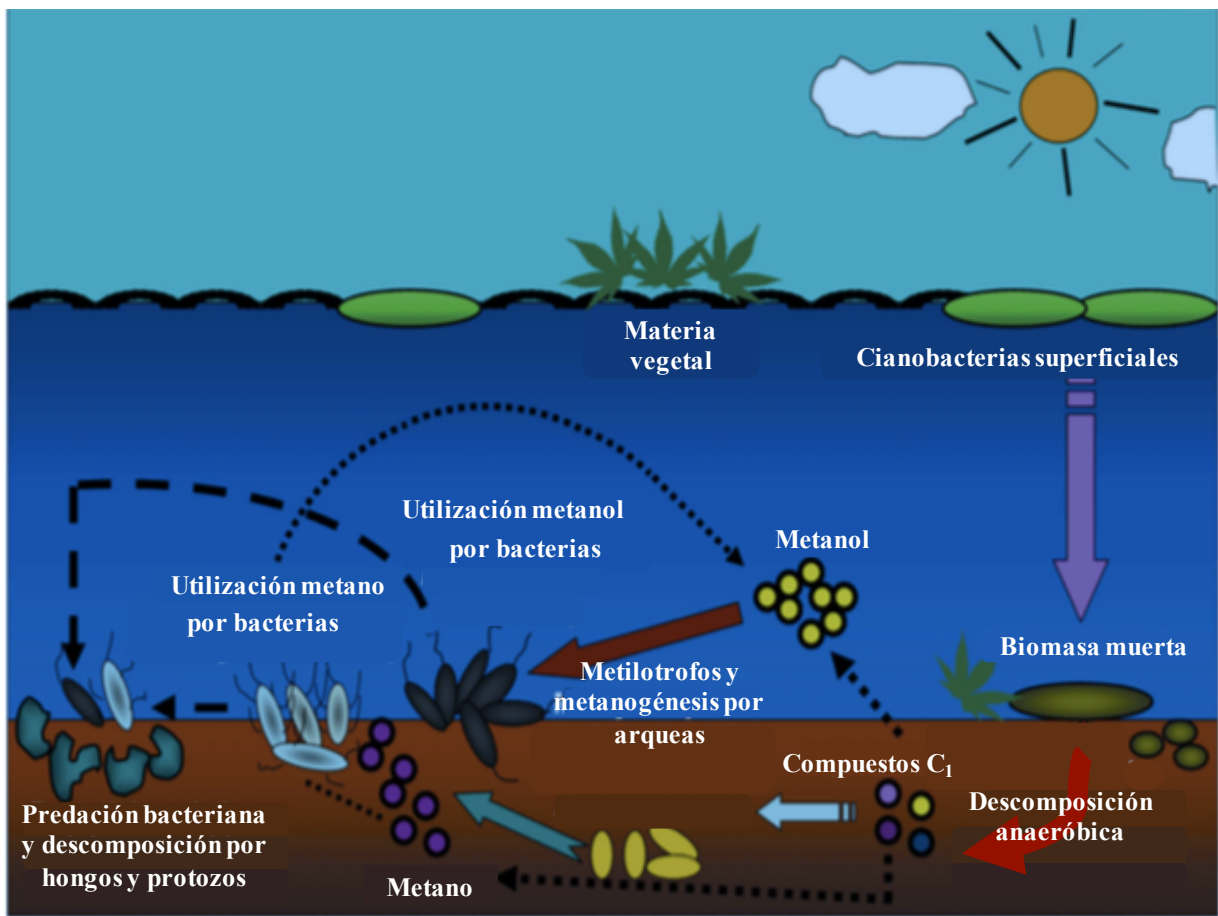


Figura 6. Esquema representativo de las cadenas tróficas en lagos salino alcalinos (tomado de Antony *et al.*, 2013).

4.2.4. Microbiología de lagos salino alcalinos

En la columna de agua se encuentran los microorganismos de vida libre, los cuales se encuentran dispersos y por lo tanto, están sometidos a una mayor dinámica física, química y biológica de lo que se encuentran en las comunidades bénticas (Zinger *et al.*, 2011). Por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes puede cambiar mucho dependiendo de la época del año, y del viento, entre otros fenómenos. Algunos ejemplos de organismos planctónicos se pueden ver el Cuadro 4.

Cuadro 4. Algunas bacterias y arqueas aisladas de columna de agua de lagos salino alcalinos.

Especie	Lago	Referencia
Arqueas		
<i>Natronomonas pharaonis</i>	Magadii, Kenia	Tindal <i>et al.</i> , 1984 Kamekura <i>et al.</i> , 1997
<i>Natrialba magadii</i>	Magadii, Kenia	Tindal <i>et al.</i> , 1984 Kamekura <i>et al.</i> , 1997
<i>Natronolimnobius baerhuensis</i>	Baer, Mongolia	Itoh <i>et al.</i> , 2005
<i>Natronolimnobius innermongolicus</i>	Baer, Mongolia	Itoh <i>et al.</i> , 2005
<i>Halorubrum vacuolatum</i>	Magadii, Kenia	Kamekura <i>et al.</i> , 1997
<i>Halorubrum luteum</i>	Chahannao, Mongolia	Hu <i>et al.</i> , 2008
Bacterias		
<i>Indibacter alkaliphilus</i>	Lonar, India	Anil <i>et al.</i> , 2010a
<i>Nitritalea halalkaliphila</i>	Lonar, India	Anil <i>et al.</i> , 2010b
<i>Cecembia lonarensis</i>	Lonar, India	Anil <i>et al.</i> , 2012

En contraste con las comunidades microbianas de la columna de agua, en los sedimentos se encuentra una mayor densidad poblacional. Esto debido a que este ambiente es menos cambiante y ofrece una mejor repartición de recursos. Los sedimentos cuentan con una vasta matriz sólida con material orgánico e inorgánico, que ofrece una mezcla heterogénea y compleja de polímeros orgánicos que sirven como sustrato para el crecimiento bacteriano (Zinger *et al.*, 2011). También existe mucha competencia entre los microorganismos.

Los sedimentos albergan distintas comunidades microbianas que son importantes para el mantenimiento de la estructura en la red alimenticia bentónica (Yang *et al.*, 2016b). Muchos de ellos incluyen los organismos heterotróficos, sulfato reductores, sulfuro

oxidadores, metilotróficos y metanogénicos (Cuadro 5). Aunque la metanotrofia y metilotrofia se ven afectadas *in situ* por la salinidad, se han obtenido cultivos anoxigénicos de metanótrofos (*p.e.* de los géneros *Methylomicrobium*, *Methylobacter*, *Methylothermus* y *Methylocystis*). Las especies pertenecientes a *Methylomicrobium* también han sido señaladas como las responsables del mayor consumo de metano (Deng *et al.*, 2017).

Cuadro 5. Algunas especies descritas en sedimentos de lagos salino alcalinos.

Especie	Obtención	Lago	Referencia
Arquea			
<i>Methanocalculus natronophilus</i>	Aislado	Tanatar, Rusia	Zhilina <i>et al.</i> , 2013
<i>Natrialba hulunbeirensis</i>	Aislado	S/N, Mongolia	Xu <i>et al.</i> , 2001
<i>Natrialba chahannaoensis</i>	Aislado	Chahannao, Mongolia	Xu <i>et al.</i> , 2001
<i>Natronorubrum bangense</i>	Aislado	Bange, Tibet	Xu <i>et al.</i> , 1999
<i>Natronorubrum tibetense</i>	Aislado	Bange, Tibet	Xu <i>et al.</i> , 1999
Bacteria			
<i>Georgenia satyanarayanai</i>	Aislado	Lonar, India	Antony <i>et al.</i> , 2012
<i>Methylomicrobium</i> spp.	Aislado	Lonar, india	Antony <i>et al.</i> , 2010
<i>Nitriliruptor alkaliphilus</i>	Aislado	Varios	Sorokin <i>et al.</i> , 2009
<i>Natronocella acetinitrilica</i>	Aislado	Lagos salino alcalinos	Sorokin <i>et al.</i> , 2007
<i>Desulfonatronovibrio hydrogenovorans</i>	Ambiental	Lago Tanatar II, Rusia	Foti <i>et al.</i> , 2007
<i>Desulfonatronum laustre</i>	Ambiental	Lago Tanatar III, Rusia	Foti <i>et al.</i> , 2007
<i>Thioalkalibacter halophilus</i>	Aislado	Lagos en Siberia, Rusia	Banciu <i>et al.</i> , 2007

4.3. Metagenómica para la caracterización del componente bacteriano

4.3.1. Generalidades

Es conocido el hecho que menos del 1% de las bacterias ambientales son cultivables (Amann *et al.*, 1995) (Cuadro 6). Debido a esto, los métodos dependientes de cultivo pueden arrojar ideas erróneas sobre la diversidad total y la estructura de las comunidades, ya que se puede sobre estimar algunos organismos y dejar de lado especies bacterianas clave para el funcionamiento de la comunidad (Vartoukian *et al.*, 2012). Por lo tanto, la medición y determinación del componente microbiano dentro de su hábitat natural se

vuelve muy importante. No hay que olvidar que, tanto los cultivos como las muestras ambientales tienen diferentes puntos de vista, pero se pueden complementar entre ellas.

Cuadro 6. Porcentaje de bacterias cultivables con cuenta total determinadas como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Amann *et al.*, 1995).

Hábitat	Porcentaje de cultivables (%)	Referencias
Agua marina	0.001-0.1	Kogure <i>et al.</i> , 1980; Ferguson <i>et al.</i> , 1984
Agua dulce	0.25	Jones, 1977
Lago mesotrófico	0.1-1	Stanley & Konopka, 1985
Agua de estuarios	0.1-3	Ferguson <i>et al.</i> , 1984
Lodos activados	1-15	Wagner <i>et al.</i> , 1993;1994
Sedimentos	0.25	Jones, 1977
Suelos	0.3	Torsvik <i>et al.</i> , 1990

Las técnicas metagenómicas han tenido un gran auge en las últimas décadas, gracias a la creciente tecnología y al avance de diferentes técnicas para obtener muestras metagenómicas de diferentes ambientes. El metagenoma se define como el ADN total en una muestra ambiental (Hårdeman & Sjöling, 2007). Al secuenciarse y analizarse, provee de gran información, y otorga un acercamiento más real a la verdadera diversidad genética microbiana de las muestras ambientales, así como su función dentro de su hábitat (Lee *et al.*, 2006; Hernández-León *et al.*, 2010).

En 1977, Woese y Fox, demostraron que las secuencias 16S/18S ARNr servían como clasificadores moleculares de cepas cultivadas. Este trabajo que revolucionó la microbiología y definió los dominios de la vida como los conocemos actualmente. En la década de 1980 se comenzó a buscar un nuevo estándar para ser utilizado en la identificación de bacterias ambientales, el cual debería contener información de las relaciones filogenéticas. En estos estudios, los genes 5S, 16S y el 23S fueron los principales candidatos para tal fin, e incluso, uno de los primeros trabajos ecológicos moleculares fue empleando segmentos 5S ARNr (Stahl *et al.*, 1985). Los trabajos de Woese (1987) detectaron ciertas características del gen 16S que servían a modo de cronómetro molecular. Por ejemplo, su alto grado de conservación hace que sea un marcador detectable entre varios microorganismos mediante el uso de sondas específicas. Sin embargo, la tasa de

cambio a lo largo del gen llega a ser diferente a nivel género/especie, en especial, en ciertas regiones con una mayor tasa de cambio (mutaciones), conocidas como hipervariables. Otra característica es que el gen ADNr 16S puede ser comparado no sólo entre las bacterias sino también con arqueas, que también cuentan con regiones 16S ARNr (Clarridge, 2004). Desde los trabajos de Woese, el análisis comparativo de los genes ADNr 16S se utiliza comúnmente para examinar los constituyentes de las comunidades microbianas e inferir su estructura y evolución. Actualmente la tasa de producción de registros de secuencias 16S ARNr es muy alta, siendo los organismos no cultivados la mayor parte de éstas (DeSantis *et al.*, 2006). Aunque el 16S ARNr es un marcador confiable para obtener clasificaciones taxonómicas, puede presentar problemas en cuanto a la obtención del ADN y en la PCR, por lo que éstas pueden llevar contaminación que se secuenciara junto con el gen de interés.

4.3.2. La región V4 para análisis filogenéticos.

El gen 16 ARNr es uno de los genes más utilizados por las técnicas moleculares de 2ª generación, su tamaño aproximado es de 1500 pb y pese a que es un gen pequeño, sigue siendo grande para estas técnicas. Por lo cual, una de las estrategias ha sido detectar las mejores regiones hipervariables del gen 16S ARNr para realizar un análisis filogenético adecuado. Yang *et al.* (2016) señalan que las mejores regiones para este caso son las regiones V4, V5 y V6; de las cuales, V4 es que la presenta un mayor tamaño (Fig. 7).

Con la secuenciación de la región V4 se ahorra en el costo de secuenciación y pese a que se pierde un poco en la clasificación de los microorganismos, ésta sigue siendo fiable. Cuando se hace una comparación entre las secuencias obtenidas y clasificadas considerando la información de la región V4 contra todo el gen 16S se observa que la pérdida de clasificación es del 12% a nivel familia, y hasta un 25% a nivel especie (Cuadro 7).

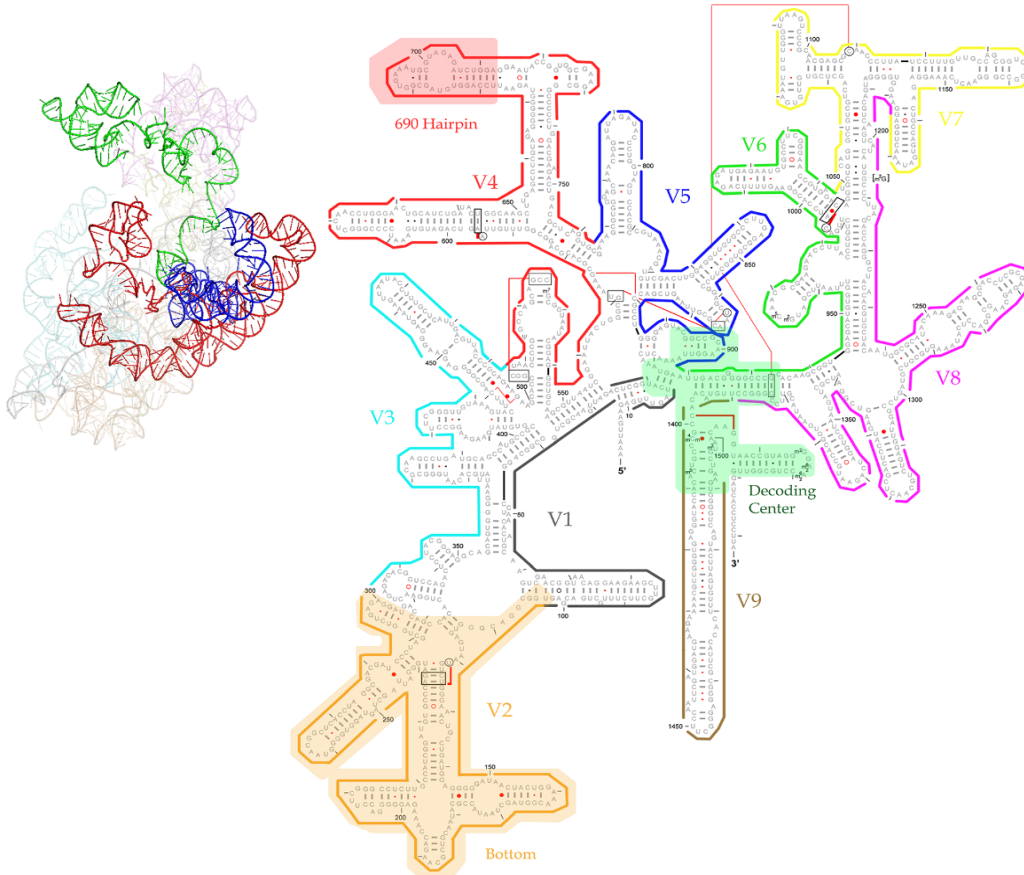


Figura 7. Estructura secundaria y terciaria del gen 16S ARNr. A la derecha la estructura secundaria, donde se muestra la región V4 delimitada por la línea de color rojo (modificado de Yang *et al.*, 2016a).

Cuadro 7. Comparación de la confiabilidad taxonómica de la región V4 y del gen 16S ARNr (Sanger *et al.*, 2016).

Nivel taxonómico	% secuencias clasificadas V4	% secuencias clasificadas con el gen completo
Filo	82.9	94.6
Clase	80.7	92.9
Familia	71.5	88.8
Género	62.2	85.8
Especie	49.9	74.5

4.3.3. Técnicas de secuenciación masiva

Como fue citado anteriormente, las primeras técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos factibles surgieron a partir de 1977, siendo la técnica Sanger la que contó con mayor desarrollo y que aún continúa siendo empleada. Actualmente, la técnica de secuenciación Sanger es conocida como 1ª generación; mientras que, los secuenciadores de 2ª generación se refieren a aquellos capaces de generar cientos de miles de reacciones de secuencias en paralelo. Esto último minimiza la cantidad de reactivos, lo que reduce significativamente el costo de las secuenciaciones respecto al número de secuencias producidas, por lo tanto, ha aumentado en órdenes de magnitud la base de datos de las bibliotecas (Gifford *et al.*, 2011). Una de las grandes ventajas de estas técnicas de secuenciación de 2ª generación es la generación de miles de secuencias de una sola muestra, lo que permite tener una mayor cobertura de la diversidad bacteriana en sistemas complejos con gran riqueza de especies, como suelo y sedimentos. La diferencia principal entre las técnicas de 1ª generación con respecto a las de 2ª, es que la tipo Sanger produce secuencias de calidad de hasta 1000 pb mientras que las nuevas usan un tamaño más reducido de aproximadamente 300 pb.

Entre las técnicas moleculares que se pueden llegar a utilizar para conocer la estructura de la comunidad microbiana se encuentran: el análisis automatizado de espacios intergénicos ribosomales ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), el análisis electroforético en geles con gradiente desnaturizante DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), el análisis de polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción TRFL (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) y la secuenciación por amplicones. Para conocer la funcionalidad de la comunidad encontramos técnicas como qPCR (*Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) y Microarreglos (Birrer *et al.*, 2017).

Aunque todas estas técnicas se siguen utilizando, en los últimos 5 años la metagenómica se ha convertido en el protocolo dominante en el estudio de la diversidad microbiana (Shahsavari *et al.*, 2016); ya que puede proveer de información estructural y funcional de las comunidades microbianas. Esto a través de las secuencias resultantes del ADN que son asignadas a grupos taxonómicos o genes funcionales, usando como referencia una base de datos.

Existen diferentes plataformas de secuenciación que han surgido con el tiempo como: 454 GS Junior y GS FLX+ (Roche), Ion PGM y Proton (Life Technologies), MiSeq y HiSeq2000 (Illumina) y PacBio (Pacific Biosciences). Estas plataformas se seleccionan con base a diferentes criterios necesarios para la investigación, *v.g.* tamaño del amplicón, número de amplicones (*reads* o lecturas) generados, costo de generación de una secuencia, tiempo de secuenciación, calidad de la información generada, entre otros (Loman *et al.*, 2012).

Actualmente, los estudios de diversidad bacteriana son principalmente llevados a cabo con las plataformas Illumina HiSeq2000 y MiSeq (Caporaso *et al.*, 2012), debido a su calidad y costo/eficiencia. La plataforma HiSeq2000 produce > 50 Gb al día, la corrida regular puede tardar 12 días (600 Gb por corrida), y generar con fragmentos pareados de 125 pb. La plataforma MiSeq se diseñó para ser accesible y los equipos son de “mesa” (*bench-top instruments*), tarda aproximadamente 65 h en una corrida, generando 15 Gb de información, en secuencias pareadas de 300 pb (Buermans & Dunnen, 2014). Estas características han conllevado a que sea incluso parte de los protocolos para explorar la diversidad microbiana planetaria por el *Earth Microbiome Project* (Gilbert *et al.*, 2011).

5. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Planteamiento del problema

A la fecha, el lago cráter Alchichica ha sido de los mejores caracterizados limnológicamente en México y existen varios estudios que describen las comunidades planctónicas de la columna de agua (Alcocer & Lugo, 2003; Adame *et al.*, 2008; Ramírez-Olvera *et al.*, 2009; entre otros); así como de las microbialitas (Couradeau *et al.*, 2011; Kaźmierczak *et al.*, 2011; Centeno *et al.*, 2012; Valdespino-Castillo *et al.*, 2014; Alcántara-Hernández *et al.*, 2017). Sin embargo, no existen a la fecha estudios microbiológicos que identifiquen a las comunidades bacterianas presentes en los sedimentos de este lago, las cuales forman parte importante de este sistema. De esta forma surge la pregunta: ¿cuál será la diversidad microbiana en los sedimentos de un lago cráter tipo *maar* alcalino y qué papel juegan éstas dentro de los ciclos biogeoquímicos del lago?

Justificación

Se sabe muy poco sobre las comunidades microbianas en sedimentos de lagos cráter alcalinos de México. Los pocos estudios que hay sobre sedimentos se han enfocado principalmente en sus componentes minerales para ver cómo era el clima o la historia pasada de estos cuerpos (Caballero *et al.*, 2003). Sin embargo, han dejado de lado cómo es la composición actual microbiana que se encuentra en los sedimentos, y cuál es su papel dentro de los procesos biogeoquímicos que ocurren en el lago cráter.

6. HIPÓTESIS

La estructura de la comunidad bacteriana en los sedimentos del lago cráter Alchichica será diferenciada principalmente por el contenido del carbono orgánico en las muestras y la profundidad a la que se encuentran, favoreciendo las comunidades con procesos quimiorganotróficos, sobre los quimiolitotróficos.

7. OBJETIVOS

7.1. General

Determinar la estructura filogenética del componente bacteriano en los sedimentos del lago cráter Alchichica, y establecer sus relaciones con las características geoquímicas y la composición de la matriz mineral.

7.2. Particulares

- Determinar la estructura y la diversidad del componente bacteriano en sedimentos superficiales (0-7 cm) de un lago cráter, encontrados en el litoral (0-1 m) y a profundidad (12 y 30 m).
- Caracterizar el ambiente geoquímico y la matriz mineral de los sedimentos muestreados.
- Establecer las relaciones de la estructura de la comunidad bacteriana con las características geoquímicas.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Sitio de trabajo y colección de muestras

El lago cráter Alchichica se localiza 19°22'N y 97°24'O, a una altitud de 2320 m s.n.m. Su área superficial es casi circular (1.8 km²) y con una profundidad máxima de 63 m (Alcocer & Filonov, 2007). Para caracterizar el componente bacteriano en los sedimentos del lago cráter Alchichica se incluyeron muestras colectadas en: i) el litoral (a ~0.5 m de profundidad (*i.e.* bénticas) y distribuidas a lo largo del litoral) y ii) en la cuenca del lago (a 12 y 30 m de profundidad) (Fig. 8). La colección del material se hizo con nucleadores o contenedores que nos permitieron considerar las capas superiores de los mismos, es decir, un rango entre los primeros 7 cm (Fig. 8c).

Los muestreos estuvieron divididos en tres temporadas:

- Abril, 2016. Se muestrearon 4 puntos de sedimento superficial (0-1 cm) por triplicado en el área de litoral. Los cuales se encontraban sumergidos a una profundidad de *ca.* 50 cm (S4, S8, S10, S12).
- Mayo, 2016. Se muestrearon cuatro puntos con nucleadores de 12 cm en el área de litoral (N1, N2, N3, N4 y N5). Se recuperaron cerca de ~7 cm de sedimentos a 50 cm de la superficie agua. Paralelamente, se colectó un núcleo en la cuenca del lago a 12 m de profundidad, con la ayuda de un equipo de buzos científicos, el núcleo obtenido tuvo cerca de 65 cm de sedimentos (NZ12).
- Septiembre, 2016. Se muestreó un último punto con un núcleo en la cuenca del lago, a 30 m de profundidad. El sedimento colectado tuvo una longitud de 56 cm (NZ30).

Para la conservación del ADN, las muestras fueron congeladas en N₂ líquido inmediatamente después de su colecta en campo, cuando fue posible. Cuando los núcleos contenían agua, se mantuvieron a 4°C (10 h) y se congelaron al removerse el agua, en el laboratorio. Las muestras fueron procesadas en condiciones asépticas y congeladas a -20°C hasta la extracción de ácidos nucleicos.

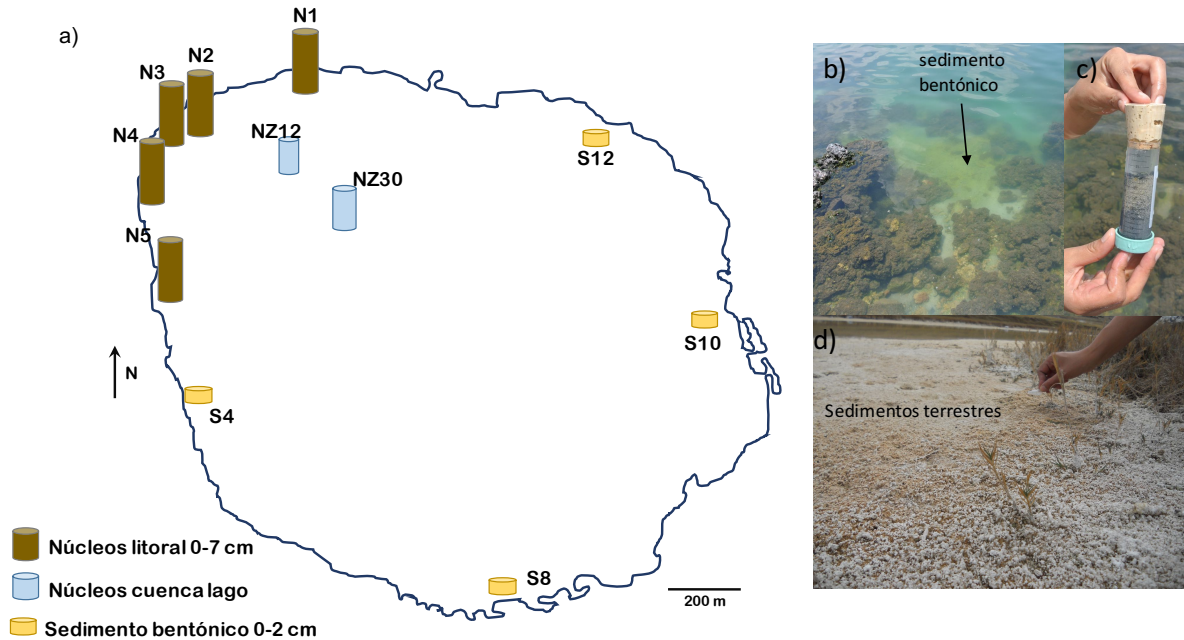


Figura 8. Puntos de muestreo de sedimentos en el litoral y en la cuenca del lago Alchichica. a) Esquema de muestreo en vista superior. Se tomaron 4 tipos de muestras: sedimentos bentónicos (S4, S8, S10, S12), núcleos de litoral (N1, N2, N3, N4 y N5), núcleos en la cuenca del lago (NZ12 y NZ30), y los controles terrestres (LS1 y LS2). b) Ejemplo de sitio de colección de muestras de sedimentos bentónicos. c) Ejemplo de toma de núcleos de litoral. d) sedimento terrestre no sumergido, considerado como control.

Caracterización fisicoquímica “in situ”

En todos los puntos de litoral se determinó pH, temperatura, conductividad eléctrica, salinidad y oxígeno disuelto, en el agua circundante con una sonda multiparamétrica HI 9828, Hanna Instruments (Fig. 9). También se colectaron muestras para determinación de nutrientes y iones mayores (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-}). Para ello las muestras (~50 ml) se filtraron con membranas de nylon 0.45 μm (Millipore, USA) y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis.

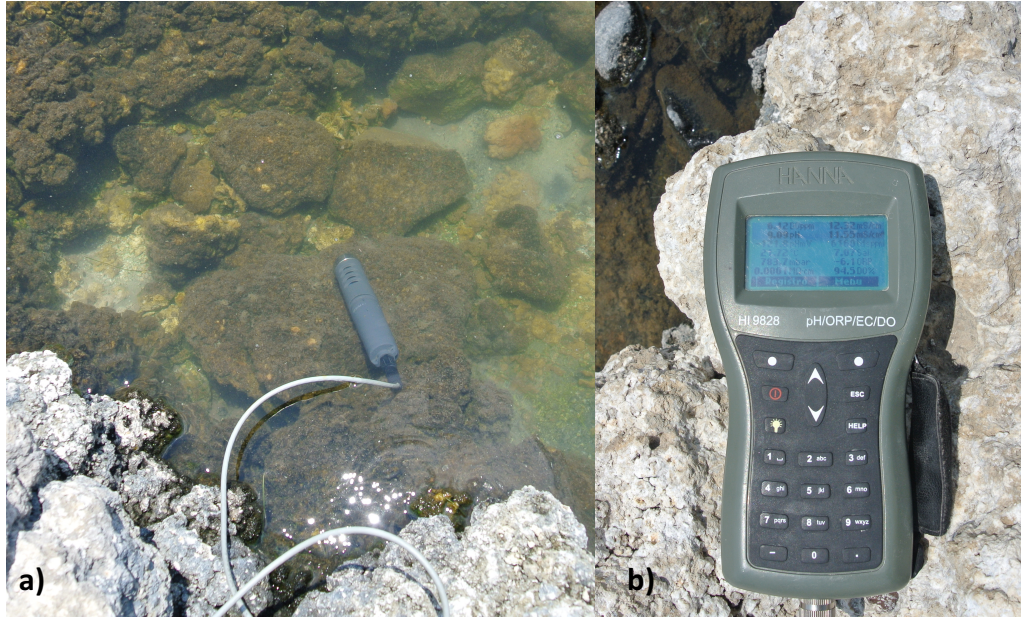


Figura 9. Medición de parámetros fisicoquímicos *in situ*. a) sensor, b) pantalla de lectura de datos.

8.2. Trabajo de laboratorio

8.2.1. Análisis agua

Los análisis fisicoquímicos del agua de iones mayores, v.g. HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; se realizaron por cromatografía de iones en el laboratorio de cromatografía del LANGEM (Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía). Los cationes (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2}) fueron separados con la columna Metrosep C6 250 (Metrohm), mientras que para los aniones (HCO_3^- , Cl^- , NO_3^- , PO_4^{-3} , SO_4^{-2}) se empleó la columna IC-Pak Anion HR (Waters), siguiendo la metodología descrita en Zamora Martínez *et al.* (2016). Las formas de nitrógeno solubles (nitritos, nitratos y amonio), fosfatos, silicatos, fósforo total y nitrógeno total fueron determinados mediante espectrofotometría en el laboratorio de Química Acuática de Ciencias del Mar y Limnología. Para ello se empleó un autoanizador Skalar SanPlus (Skalar Analytical) empleando los métodos de Grasshoff *et al.* (1983) y los circuitos de Kirkwood (1994).

8.2.2. Análisis de sedimentos

Pre-procesamiento de las muestras

Las muestras que pertenecían a los núcleos fueron seccionadas considerando el análisis visual de subcapas (Fig. 10). Este proceso fue realizado en condiciones asépticas, y se obtuvieron de 2 a 4 secciones por núcleo. Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento, ya fuese para extracción de ADN, determinación de C_{Tot} y N_{Tot} , o difracción de rayos X.

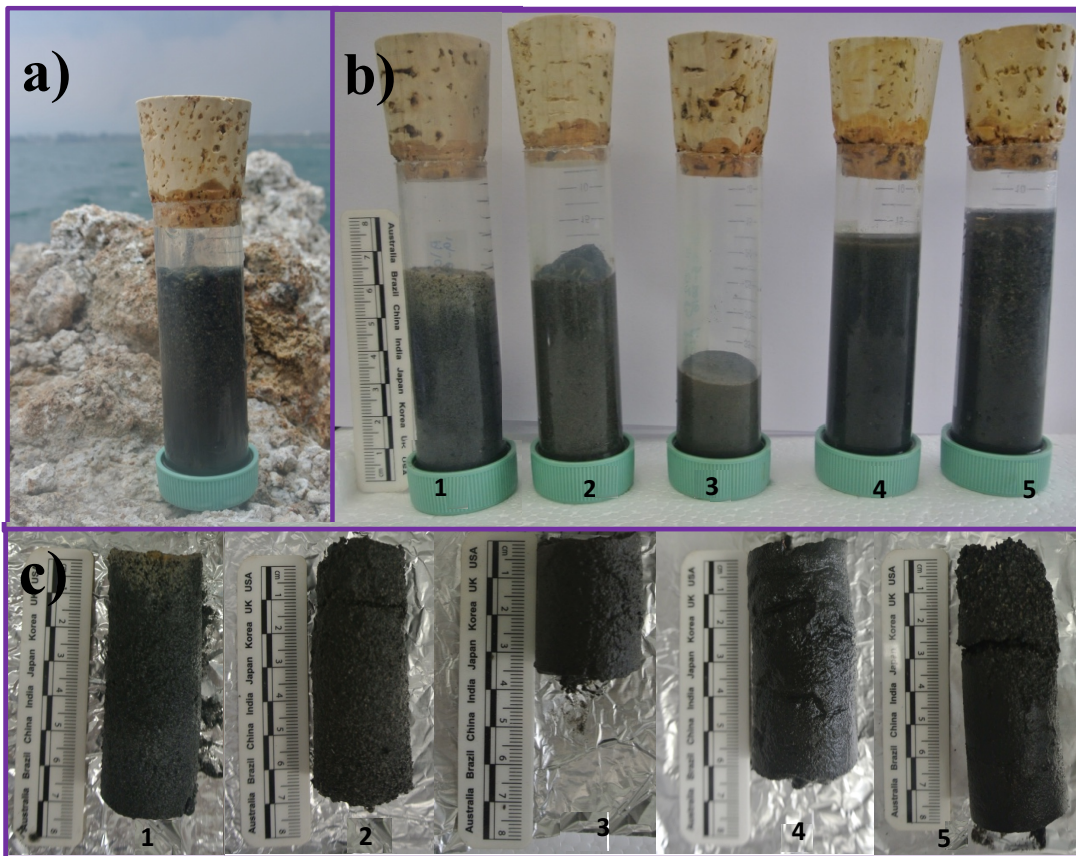


Figura 10. Núcleos del sedimento extraído del lago Alchichica en el mes de Mayo de 2016. a) Muestra recolectada en campo, con agua por encima del sedimento. b) Todos los núcleos obtenidos ya sin agua o con una mínima cantidad. c) Medición de los sedimentos en laboratorio antes de seccionarlos. El nombre/número de la muestra se encuentra debajo de todas las muestras.

Difracción de rayos X

Se caracterizó la composición mineralógica de un núcleo de litoral (N1), los dos núcleos de profundidad (NZ12 y NZ30), y un control en el Laboratorio de Difracción de Rayos X del LANGEM. Las muestras (1 g) se molturaron y homogeneizaron mediante un mortero de ágata, se tamizaron y se midieron utilizando un portamuestras de aluminio (fracciones no orientadas) de doble carga. La medición se realizó en el intervalo angular 2θ de 5° a 70° en escaneo por pasos con un “step scan” de 0.003° (2 Theta) y un tiempo de integración de 40 s por paso en un Difractómetro EMPYREAN equipado con filtro de Ni, tubo de Cu de foco fino y detector PIXcel3D.

Contenido de carbono orgánico, inorgánico y nitrógeno total

Las muestras de los sedimentos se secaron por liofilización y se pesaron. Para la determinación de C_{Tot} y N_{Tot} las muestras se analizaron en un equipo Flash 2000 Elemental Analyzer, mientras que el carbono inorgánico se determinó por el método del calcímetro.

Para el análisis elemental por ICP, se pesaron 0.5 g de muestra, se adicionaron 9 mL de HNO_3 conc. JT. Baker Instra 69-70% y 3 mL de HCl JT Baker Instra 36.5-38%. Las muestras se prepararon en un horno Anton Paar Multiwave 3000 en un ciclo EPA 3051A. Una vez frías, las muestras fueron filtradas y llevadas a un volumen final de 50 mL con agua Milli Q (agua clase I, 18.2 Mohms de resistividad). Finalmente, las muestras fueron analizadas en un equipo Perkin Elmer ICP-OES Optima 8300 empleando Ytrio como estándar interno.

8.2.3. Identificación molecular de bacterias y arqueas

Extracción ADN

La extracción del ADN fue llevada a cabo con el kit de PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio, ahora Qiagen), empleando ~250 mg de sedimento húmedo y siguiendo las instrucciones del fabricante. En el paso final se eluyó el ADN en 40 μ L de solución incluida en el kit (buffer TE). Se extrajeron cerca de 30 muestras de diferentes porciones de núcleos, sedimentos béticos de litoral y sedimentos de la cuenca. El rendimiento del ADN

obtenido se determinó mediante fluorometría empleando el equipo Qubit™ 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), y con los ensayos de alta y amplia sensibilidad dependiendo de la muestra (Qubit dsDNA HS Assay Kit y Qubit dsDNA BR Assay Kit).

Amplificación y secuenciación gen 16S ARNr

El protocolo de amplificación que se adoptó fue apegándose a los principios del *Earth Microbiome Project* con la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq, y la metodología de análisis descritas en Caporaso *et al.* (2011; 2012). Brevemente, para la amplificación de secuencias 16S ARNr a partir de ADN metagenómico se emplearon los primers 515F/806R que flanquean la región V4 de bacterias y arqueas (~290 pb) (cuadro 8) (Carrillo-Araujo *et al.*, 2015). Cada primer reverso de PCR contenía una secuencia Golay específica, la cual sirvió como identificador de cada muestra amplificada.

Cuadro 8. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) utilizados en la reacción de PCR.

*La secuencia no incluye los adaptadores, ni la secuencia Golay.

Iniciador	Secuencia (5'-3')
515 forward	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
806 reverse	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Para la mezcla de PCR (25 µl) se incluyeron 2 µl de ADN o templado (2-20 ng ADN), 1X Takara ExTaq PCR buffer, 200 µM Takara dNTPs mix, 0.6 µg BSA, 0.75 µl de cada primer a 10 µM y 0.125 U Takara Ex DNA Taqpolimerasa (TaKaRa Corp., Shiga, Japan). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial 95°C por 3 min; 35 ciclos de i) desnaturalización a 95°C por 30 s, ii) alineamiento a 52°C por 30 s y iii) extensión a 72°C por 30 s; y un tiempo final de extensión a 72°C por 12 min. Después se verificó la presencia de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9% con bromuro de etidio, en amortiguador TAE (tris-acetato-EDTA) al 1.0%. La migración se efectuó a 80 V por 30 min. Los productos fueron visualizados en un sistema fotodocumentador para verificar el tamaño correcto de la banda (~ 450 pb) (Fig. 11). De cada muestra, se realizaron amplificaciones por triplicado en días separados para evitar

sesgos de amplificación. Los triplicados (75 μ l en total) fueron juntados y purificados. La purificación se llevó a cabo por medio de perlas magnéticas mediante el Agencourt AMPure XP PCR purification system (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

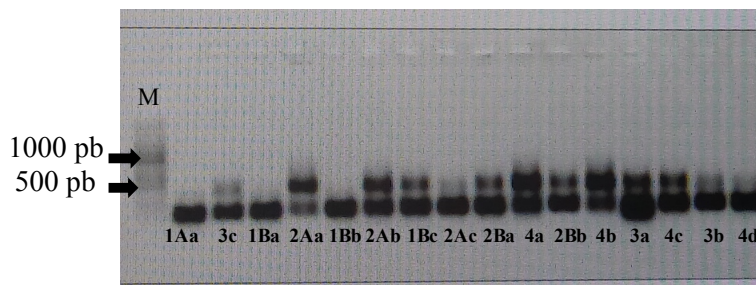


Figura 11. Gel de electroforesis para verificación de amplicones 16S ADNr. M=marcador de tamaño molecular.

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

8.2.4. Análisis estadísticos

Para comparar la diversidad procariótica (Bacteria y Arquea) y sus relaciones con los parámetros geoquímicos determinados, se llevaron a cabo diferentes análisis estadísticos. Para ello se consideraron las tablas de abundancia relativa a diferentes niveles de asignación taxonómica (v.g. fila, clase, orden, familia y género), y los datos geoquímicos

obtenidos. Los análisis se realizaron en la plataforma R (R Development Core Team 2012) bajo el ambiente integrado RStudio (versión 1.0.143). Para los análisis de componente principales (PCA) se empleó la función 'fviz_pca' en 'factoextra', y para los análisis de correspondencia canónica (CCA) se utilizó la función 'cca' en 'vegan', basada en Legendre y el algoritmo de Legendre & Legendre (2012). Las gráficas fueron hechas con 'ggvegan', 'ggplot2' y 'factoextra'.

9. RESULTADOS

9.1. Agua

9.1.1. Parámetros fisicoquímicos del agua *in situ*.

En el cuadro 9 se muestra los parámetros fisicoquímicos determinados *in situ* del agua circundante a los sedimentos muestreados. Los datos mostraron una tendencia similar, con un pH alcalino promedio de 8.91 ± 0.14 y una conductividad eléctrica (C.E.) de 10.56 ± 0.85 mS cm^{-1} . Aunque existieron ligeras variaciones en los subsitios, éstas no fueron superiores al 10%. La temperatura si mostró diferencias; sin embargo, los muestreos se realizaron en dos temporadas diferentes, y se observa un aumento conforme el avance de la primavera (mayo 2016). El oxígeno disuelto en la columna de agua se mantuvo entre 91 y 143%, y está relacionado con la actividad fotosintética oxigénica de los microorganismos de la columna de agua, de las microbialitas y de los sedimentos.

Cuadro 9. Parámetros fisicoquímicos tomados *in situ* del agua circundante a los sedimentos.

Muestra	pH	Temp. (°C)	C. E. (mS cm^{-1})	Salinidad (g L^{-1})	O ₂ disuelto (%)
S4 ^a	9.08	17.28 ^a	10.15	5.76	120.5
S8 ^a	9.03	16.98 ^a	9.59	5.42	119.6
S10 ^a	8.93	16.97 ^a	9.89	5.6	96.0
S12 ^a	8.92	17.46 ^a	9.74	5.51	109.3
N1 ^b	9.09	21.96 ^b	12.27	7.03	98.0
N2 ^b	8.78	21.7 ^b	11.15	6.34	98.4
N3 ^b	8.78	21.7 ^b	11.15	6.34	98.4
N4 ^b	8.71	22.6 ^b	10.59	6.0	143.3
N5 ^b	8.87	21.79 ^b	10.57	6.0	91.0
Promedio	8.91 ± 0.14	19.82 ± 2.5	10.56 ± 0.85	6.0 ± 0.51	108.3 ± 16.8

^a Parámetros determinados en abril 2016, ^b parámetros determinados en mayo 2016

9.1.2. Análisis de iones mayores y nutrientes.

En cuadro 10 se muestra que los iones mayores en el agua circundante a los sedimentos se distribuyeron de forma casi similar en la periferia del lago (Cuadro 11). Siendo Na^+ y el Cl^- los iones dominantes, como previamente se ha reportado por Armienta *et al.* (2008). Debido a esta homogeneidad, las muestras de iones y nutrientes sólo se determinaron en el muestreo de mayo (S4, S8, S10 y S12).

Cuadro 10. Concentración de iones mayores en muestras de agua circundante a los sitios de muestreo de sedimentos, del lago cráter Alchichica.

Muestra	Na^+ mg/L	K^+ mg/L	Ca^{2+} mg/L	Mg^{2+} mg/L	HCO_3^- mg/L	Cl^- mg/L	SO_4^{2-} mg/L
S4	2272.2	213.5	11.4	412.2	1529.9	3473.5	1071.9
S8	2182.2	203.4	11.8	396.8	1700.4	3365.1	1011.4
S10	2254.9	210.5	12.0	409.7	1718.4	3398.1	1035.3
S12	2221.0	208.0	10.9	415.5	1670.7	3393.2	1014.8
Promedio	2238.3	209.2	12.6	409.4	1670.5	3419.1	1021.5

Respecto a los nutrientes, sí existieron variaciones significativas entre los sitios. En general, la concentración de N-NH_4^+ varió entre 1.21 y 12.89 μM , siendo el sitio S12 aquel con mayor concentración. Los nitratos y los nitritos fueron homogéneos en el sistema. Para los fosfatos, las variaciones fueron de 0.81-1.98 μM , siendo S8 y S10 los más altos en esta especie química. Para los silicatos los valores oscilaron fuertemente entre 36.72-135.15 μM , con S8 como el de mayor concentración. Finalmente, S12 fue el sitio con mayor concentración de P y N totales. Esto posiblemente a la posición de S12 en el lago, ya que las microbialitas funcionan como una barrera de protección al oleaje, y se puede vislumbrar vida silvestre que aporta materia orgánica y nutrientes a los sedimentos (Fig. 12).

Cuadro 11. Concentración de nutrientes en muestras de agua circundante a los sitios de muestreo de sedimentos, del lago cráter Alchichica.

Muestra	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	N-NO ₂ ⁻	P-PO ₄ ³⁻	Si-SiO ₂	P _{Tot} ^a	N _{Tot} ^b
	μM						
S4	3.92	2.33	0.12	1.18	36.72	0.77	57.75
S8	1.21	1.72	0.08	1.94	135.15	0.36	32.11
S10	1.26	2.00	0.11	1.98	40.06	0.41	25.42
S12	12.89	1.18	0.18	0.81	44.21	7.17	183.06

^aP_{Tot}: fósforo total; N_{Tot}: nitrógeno total



Figura 12. Paisaje del sitio S12 (tomado de <https://hiveminer.com/Tags/alchichica>).

9.2. Sedimentos

9.2.1. Mineralogía

Los difractogramas resultantes del análisis de DRX (Anexo A), mostraron que los sedimentos en general están compuestos principalmente de tres fases minerales: aragonita, hidromagnesita y plagioclasas de composición intermedia (Cuadro 12). El sedimento terrestre que se usó como control (LS2), tuvo una mayor cantidad de fases minerales (cinco) y es la única con presencia de nesquelonita y huntita; siendo su mineral principal la

hidromagnesita. En sedimentos de litoral y de la cuenca, la aragonita y la hidromagnesita fueron los dos principales minerales. La aragonita tuvo dominancia sobre la hidromagnesita con sólo dos excepciones. Los núcleos más someros, como los de profundidad parece tener una composición mineral muy similar.

Cuadro 12. Fases minerales identificadas y su proporción relativa de intensidad (RIR) en sedimentos del lago cráter Alchichica, con control LS2.

Submuestra	Fases identificadas	Semicuantitativas (RIR)
LS2 (Control)	Aragonita: CaCO_3	3
	Hidromagnesita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	67
	Plagioclasa de composición intermedia: $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ a $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	3
	Huntita: $\text{Mg}_3\text{Ca}(\text{CO}_3)_4$	15
	Nesquelonita: $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12
N1.a 0-2 cm	Aragonita: CaCO_3	29
	Hidromagnesita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	56
	Plagioclasa de composición intermedia: $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ a $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	14
N1.b 2-4 cm	Aragonita: CaCO_3	48
	Hidromagnesita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	31
	Plagioclasa de composición intermedia: $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ a $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	21
	<i>Trazas de filosilicatos (mica y/o arcilla)</i>	
N1.c 4-7 cm	Aragonita: CaCO_3	41
	Hidromagnesita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	32
	Plagioclasa de composición intermedia: $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ a $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	19
	Calcita: CaCO_3	8
NZ12.a 0-4 cm	Aragonita: CaCO_3	42
	Hidromagnesita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	35
	Plagioclasa de composición intermedia: $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ a $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	24
NZ12.b 11-16.5 cm	Aragonita: CaCO_3	47
	Hidromagnesita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	30
	Plagioclasa de composición intermedia: $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ a $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	24
NZ12.c 33.5-46 cm	Aragonita: CaCO_3	48
	Hidromagnesita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	33
	Plagioclasa de composición intermedia: $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ a $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	19
NZ12.d 56-62 cm	Aragonita: CaCO_3	48
	Hidromagnesita: $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	32
	Plagioclasa de composición intermedia: $\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$ a $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$	20
	<i>Trazas de filosilicatos (mica y/o arcilla)</i>	

Submuestra	Fases identificadas	Semicuantitativas (RIR)
NZ12.e 62-65cm	Aragonita: CaCO ₃	57
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	27
	Plagioclasa de composición intermedia: NaAlSi ₃ O ₈ a	16
	CaAl ₂ Si ₂ O ₈	
NZ30.a 0-4 cm	Aragonita: CaCO ₃	43
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	26
	Plagioclasa de composición intermedia: NaAlSi ₃ O ₈ a	30
	CaAl ₂ Si ₂ O ₈	
N30Z.b 16-21 cm	Aragonita: CaCO ₃	35
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	48
	Plagioclasa de composición intermedia: NaAlSi ₃ O ₈ a	
	CaAl ₂ Si ₂ O ₈	17
NZ30.c 33-38 cm	Aragonita: CaCO ₃	46
	Hidromagnesita: Mg ₅ (CO ₃) ₄ (OH) ₂ ·4H ₂ O	38
	Plagioclasa de composición intermedia: NaAlSi ₃ O ₈ a	12
	CaAl ₂ Si ₂ O ₈	
	Calcita magnesiana: CaCO ₃	4

9.2.2. Contenido de carbono, nitrógeno y otros elementos

El análisis de carbono y nitrógeno las submuestras de sedimentos mostraron un porcentaje de carbono total que osciló entre 2.68 y 12.68%, y nitrógeno total 0.04 y 0.61% (Cuadro 13). La proporción de carbono inorgánico siempre fue mayor; sin embargo, la concentración de carbono orgánico parece aumentar conforme a la profundidad, aunque no de forma homogénea. Respecto al nitrógeno, parece no existir una relación clara entre las muestras.

Cuadro 13. Porcentaje de carbono total (C_{Tot}), orgánico (C_{Org}), inorgánico (C_{Ino}), nitrógeno total (N_{Tot}), fósforo total (P) y azufre total (S) en sedimentos del lago cráter Alchichica.

Submuestra	% C _{Tot}	% C _{Ino}	% C _{Org}	C _{Org} /C _{Ino}	% N _{Tot}	P (mg/Kg)	S (mg/Kg)
S7.a (0-2 cm)	10.32	7.08	3.24	0.46	ND	ND	ND
S8.a (0-2 cm)	5.94	5.16	0.79	0.15	ND	ND	ND
S12.a (0-2 cm)	9.95	9.07	0.88	0.10	ND	ND	ND
N1.a (0-2 cm)	8.43	7.26	1.17	0.16	ND	177.5	2067.2
N1.b (2-4 cm)	9.79	8.16	1.63	0.20	0.09	157.6	2424.4
N1.c (4-6 cm)	10.33	8.84	1.49	0.17	0.09	148.2	2186.6
N2.a (0-1 cm)	5.42	4.73	0.69	0.15	0.012	241.8	2215.3
N2.b (1-4 cm)	6.86	5.82	1.04	0.18	0.023	261.0	3057.3
N3.a (0-2 cm)	6.16	5.19	0.97	0.19	0.08	250.8	3501.9

Submuestra	% C _{Tot}	% C _{Ino}	% C _{Org}	C _{Org} /C _{Ino}	% N _{Tot}	P (mg/Kg)	S (mg/Kg)
N3.b (2-4 cm)	6.55	5.11	1.44	0.28	0.11	259.6	4541.1
N4.a (0-1cm)	4.83	4.27	0.56	0.13	0.09	267.6	3023.1
N4.b (1-4 cm)	5.27	4.40	0.87	0.20	0.07	260.3	3418.7
N4.c (4-6 cm)	5.68	3.94	1.74	0.44	0.12	301.7	4426.2
N5.a (0-1 cm)	5.19	3.23	1.96	0.61	0.04	240.5	2962.2
N5.b (1-3 cm)	5.52	3.43	2.08	0.61	0.04	243.3	2974.4
N5.c (3-5 cm)	3.17	1.87	1.30	0.70	0.11	321.4	7693.8
N5.d (5-7 cm)	2.68	1.57	1.11	0.71	0.07	283.3	8040.8
NZ12.a (0-2cm)	10.47	8.28	2.19	0.26	0.25	ND	ND
NZ30.a (0-2cm)	9.86	8.53	1.32	0.15	0.17	395.9	2145.3

ND = no determinado

Se analizaron 28 elementos, y en el Cuadro 14 se muestran las concentraciones totales de los elementos más abundantes que fueron Na, K, Ca, Mg, Si y Al. Los 22 elementos restantes analizados se encuentran en el Anexo B.

Cuadro 14. Concentración de algunos elementos en sedimentos del lago cráter Alchichica.

Submuestra	Na (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Si (mg/kg)	Al (mg/kg)
N1.a	2,930.7	692.4	89,587.9	110,405.9	508.1	3,927.7
N1.b	3,197.9	639.6	87,814.6	131,899.4	541.5	2,890.6
N1.c	3,105.9	555.2	78,234.3	142,674.3	506.5	2,476.7
N2.a	2,534.2	1,527.7	135,774.0	7,170.5	490.3	7,574.7
N2.b	4,080.3	1,473.8	137,706.4	12,728.9	348.7	12,905.6
N2.c	2,706.2	808.5	172,128.1	9,482.2	401.7	5,946.6
N3.a	3,182.7	1,411.2	168,521.3	11,011.0	441.9	5,799.1
N3.b	3,230.7	1,433.9	165,989.7	11,528.8	109.4	6,596.0
N4.a	2,641.5	1,328.8	112,410.3	17,456.7	81.8	6,735.5
N4.b	2,675.8	1,357.6	138,277.0	18,353.5	117.7	7,444.8
N4.c	3,219.2	1,509.9	94,347.7	19,165.8	331.3	9,514.8
N5.a	3,319.1	1,127.2	138,603.7	20,402.2	402.4	7,074.7
N5.b	3,361.3	1,189.3	141,072.2	18,037.1	423.1	7,512.6
N5.c	4,073.5	2,691.4	50,826.9	11,941.5	421.7	14,969.8
N5.d	3,359.8	2,076.1	57,047.8	11,389.7	361.9	12,343.7
NZ12.a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NZ30.a	3,789.1	879.4	108,670.5	145,989.1	222.5	3,543.1

ND = no determinado

9.3. Identificación molecular de bacterias y arqueas en sedimentos

En total, se extrajeron cerca de 30 muestras de ADN de sedimentos béticos, litoral y de núcleos. De las cuales, se obtuvieron amplicones ADN_r de 16S de 18 submuestras con las condiciones ensayadas en el laboratorio. El tamaño del fragmento enviado fue de ~450 pb y éste contaba con las secuencias Golay, los iniciadores y las *linker pad*; sin éstas, el fragmento fue de ~250 pb. Las secuencias mandadas obtenidas por el secuenciador fueron 2,805,329 (Cuadro 15). La calidad de éstas se puede ver en las Figs. C1 y C2 del Anexo C. Después del pretratamiento para eliminar quimeras y singletones se recuperaron 2,015,053 secuencias, lo cual da una eficiencia del 72%.

Cuadro 15. Número de secuencias de ADN obtenidas de sedimentos del lago Alchichica.

Submuestra	Secuencia Golay o identificador	Secuencias prefiltrado	Secuencias no quiméricas
S4.a ^a (0-1 cm)	CTGCTATTCCTC	91,009	71,642
S4.a ^b (0-1 cm)	AGCATGTCCCGT	208,881	168,313
S8.a ^a (0-1 cm)	ACTTCCAACCTC	159,434	122,920
S8.a ^b (0-1 cm)	ATGATGAGCCTC	222,500	178,238
S10.a ^a (0-1 cm)	GAGCCATCTGTA	224,492	175,876
S10.a ^b (0-1 cm)	CAAATTCGGGAT	180,077	136,416
S12.a (0-1cm)	ATCGCACAGTAA	153,507	115,106
N1.a (0-2 cm)	AATTGTGTCGGA	163,669	146,105
N1.c (4-6 cm)	ATGGCTGTCAGT	120,309	72,884
N2.a (0-2 cm)	TATCGACACAAG	188,286	14,804
N2.b (2-4 cm)	TATACCGCTGCG	158,761	113,199
N3.b (1-3 cm)	CAAACAACAGCT	85,953	56,083
N4.c (4-6 cm)	TGCGCTGAATGT	101,090	66,524
N5.a (0-1 cm)	CAACTCCCCTGA	218,956	178,384
N5.b (1-3 cm)	CAGCTCATCAGC	162,633	134,366
N5.c (3-5 cm)	TACAGCGCATAAC	94,990	64,106
NZ12.a (0-2 cm)	ATGTCACCGCTG	131,267	94,046
NZ30.a (0-2 cm)	AAGGCGCTCCTT	139,515	106,041
Total		2,805,329	2,015,053

^{a, b} repeticiones de una misma submuestra de sedimento, y se trataron como submuestras individuales para observar variaciones a nivel intramuestra.

Se realizó una clasificación taxonómica de las secuencias finales de ADN_r 16S, y para observar exclusivamente la diversidad de arqueas y bacterias, se eliminaron las secuencias

de cloroplastos (Cyanobacteria, Chloroplast) y de mitocondrias (Proteobacteria, Alphaproteobacteria, mitochondria). El porcentaje de secuencias mitocondriales fue bajo y no alcanzó el 0.5 % (Cuadro 16). Por otro lado, la abundancia de cloroplastos si llegó a ser significativo, con casi el 20% de abundancia (N1.a). Se observó que el menor porcentaje de secuencias eucarióticas (mitocondriales y cloroplastos), corresponden a la capa más profunda de núcleos pequeños (N1, N2, N3, N4 y N5) y a las muestras colectadas a mayor profundidad en la cuenca del lago (NZ12 y NZ30). Para el caso de las secuencias no asignadas, éstas aumentan su abundancia en los núcleos pequeños conforme su profundidad (Cuadro 16).

Cuadro 16. Porcentaje relativo de secuencias mitocondriales, de cloroplastos y no asignadas dentro del dominio procarionte.

Submuestra	Mitocondriales	Cloroplastos	No asignadas (procarionticas)
	% relativo de las secuencias totales		
S4.a ^a (0-1 cm)	0.2	8.3	6.7
S4.a ^b (0-1 cm)	0.4	6.4	6.1
S8.a ^a (0-1 cm)	0.4	13.2	5.0
S8.a ^b (0-1 cm)	0.3	9.0	4.2
S10.a ^a (0-1 cm)	0.2	5.2	5.9
S10.a ^b (0-1 cm)	0.1	1.3	6.8
S12.a (0-1 cm)	0.2	2.6	4.5
N1.a (0-2 cm)	0.1	0.8	4.4
N1.b (4-6 cm)	0.0	0.0	15.1
N2 (0-2 cm)	0.2	17.8	6.3
N2 (2-4 cm)	0.2	14.8	6.9
N3 (1-3 cm)	0.000	0.0	12.4
N4 (4-6 cm)	0.0	0.1	10.8
N5 (0-1 cm)	0.2	15.2	5.4
N5 (1-3 cm)	0.2	19.6	6.7
N5 (3-5 cm)	0.1	2.6	9.6
NZ12 (0-2 cm)	0.0	0.0	4.9
NZ30 (0-2 cm)	0.0	0.0	9.2
Promedio	0.161±0.13	6.482±6.66	7.28±2.92

*en negritas se encuentran los valores máximos y mínimos encontrados

Las secuencias eucarióticas se eliminaron para no tener un error dentro de la abundancia relativa de las bacterias y arqueas. Una vez eliminada la porción eucariótica, se recalcularon las abundancias relativas y se observó una clara dominancia de Bacteria sobre Arquea en todos los sedimentos (Cuadro 17). También se observó una abundancia relativa de 4.4 hasta 15.1% de secuencias 16S ADNr que no pudieron ser asignadas taxonómicamente.

Cuadro 17. Porcentaje relativo de secuencias no eucarióticas en sedimentos del lago Alchichica.

Submuestra	No asignadas	Arquea	Bacteria
		%	
S4 ^a (0-1 cm)	6.7	0.6	92.7
S4 ^b (0-1 cm)	6.1	0.3	93.5
S8 ^a (0-1 cm)	5.0	0.1*	94.9
S8 ^b (0-1 cm)	4.2	0.1	95.7
S10 ^a (0-1 cm)	5.9	2.2	91.9
S10 ^b (0-1 cm)	6.8	2.9	90.3
S12 (0-1 cm)	4.5	1.5	94.0
N1A (0-2 cm)	4.4	0.8	94.8
N1A (4-6 cm)	15.1	6.5	78.4
N2A (0-2 cm)	6.3	0.8	92.8
N2A (2-4 cm)	6.9	1.4	91.7
N2B (1-3 cm)	12.4	22.3	65.2
N3 (4-6 cm)	10.8	10.2	79.0
N4 (0-1 cm)	5.4	0.1	94.5
N4 (1-3 cm)	6.7	0.2	93.1
N4 (3-5 cm)	9.6	12.3	78.1
N12 (0-2 cm)	4.9	0.1	94.9
N30 (0-2 cm)	9.2	1.6	89.2
Promedio	7.28	3.78	89.15

*en negritas se encuentran los valores máximos y mínimos encontrados

Respecto a las secuencias afiliadas a la división Arquea, se puede observar que cuentan con una abundancia relativa entre 0.1 y 22%, hay una ligera tendencia en las capas inferiores de los núcleos (>1 cm de profundidad) se tienen porcentajes más altos, lo cual se

traduce en que la abundancia de la división Bacteria en dichos sedimentos disminuye conforme a la profundidad dentro de los núcleos (Fig.13).

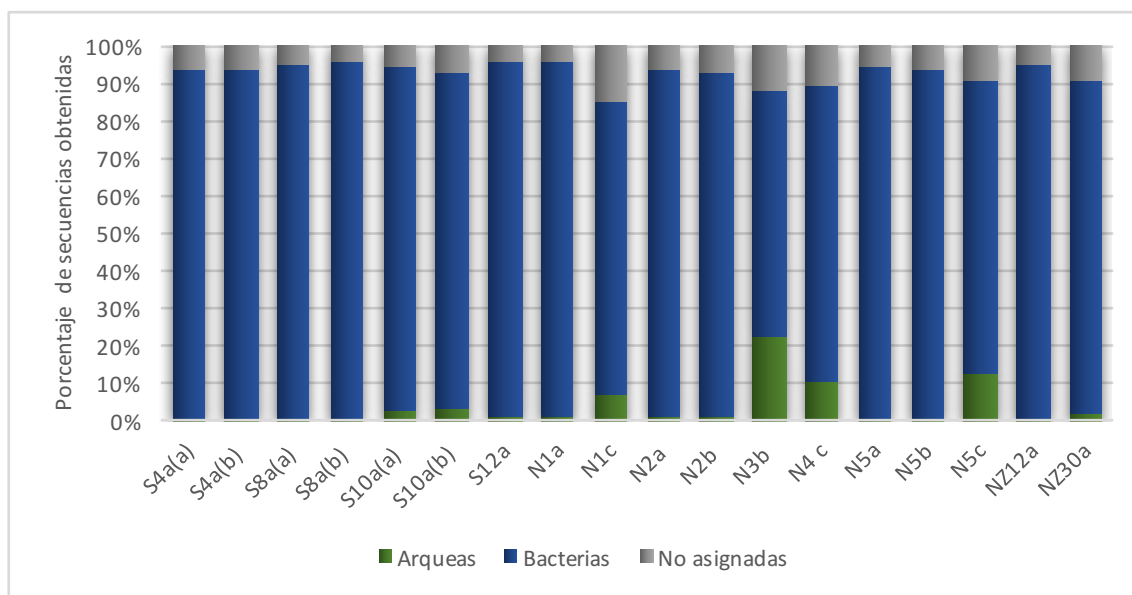


Figura 13. Porcentaje de secuencias 16S ADNr obtenidas de Bacteria y Arquea, así como las secuencias no asignadas.

9.4. Variabilidad de la diversidad procariótica a nivel intramuestra.

Con el fin de determinar la variabilidad intramuestra, se realizaron 2 réplicas técnicas para observar posibles variaciones en la diversidad microbiana de cada muestra. Cabe destacar que éstas se tomaron en el mismo subsitio y a la misma profundidad, fueron tratadas y procesaron como muestras individuales (S4a, S4b, S8a, S8b, S10a y S10b). Para el análisis de los resultados se utilizó un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de apreciar la variabilidad microbiológica que existía entre ellas (Fig. 14). Como se observa en la Figura 14, la variación intramuestra es poca, ya que las réplicas de cada subsitio se agrupan cercanas entre ellas. Con ello se prueba que, al estudiar una muestra por subsitio, ésta es representativa del subsitio analizado.

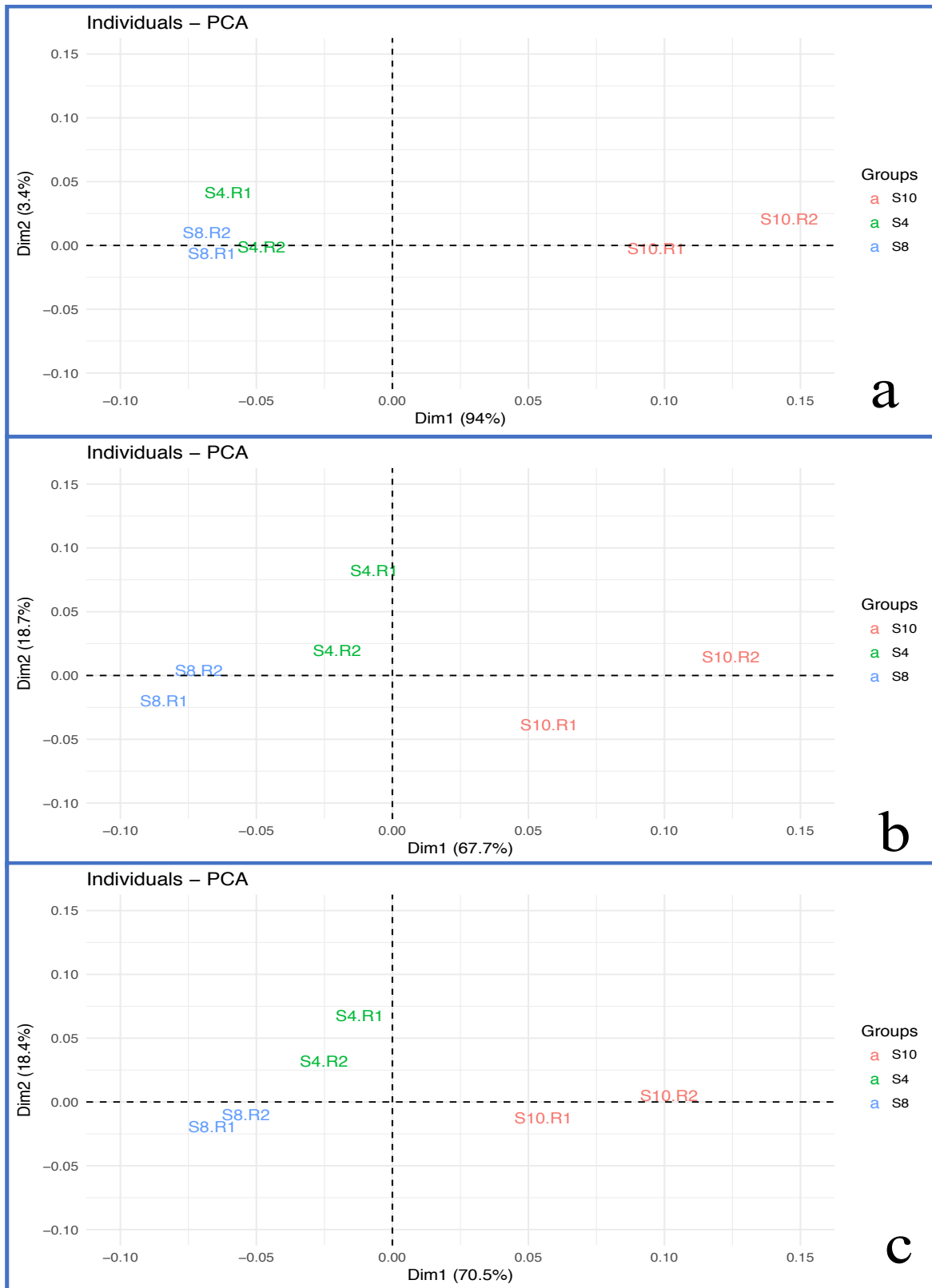


Figura 14. Análisis de componentes principales de las réplicas técnicas de los sedimentos S4, S8 y S10. a) nivel fila; b) nivel orden y c) nivel género. Cada subsitio muestreado está representado en el mismo color.

9.5. Abundancia relativa de bacterias y arquea a nivel fila

Seguido del nivel dominio, los fila representan el próximo nivel de asignación taxonómica. Las secuencias de los sedimentos del lago Alchichica se clasificaron dentro de tres fila pertenecientes a Arquea y 68 a Bacteria, comparando con las secuencias del banco de datos de GreenGenes y el RDP (Anexo C).

En la Fig. 15 se muestra un Heatmap con los fila con mayor abundancia que fueron: Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Verrumicrobia y Cyanobacteria de Bacteria; y Euryarchaeota de Arquea. Este análisis mostró que, de acuerdo a los fila encontrados y a su abundancia relativa, las submuestras en un primer corte se agruparon en dos grupos principales. El primero contiene a las muestras NZ12.a, N1.a y NZ30.a, los cuales son sedimentos superficiales de entre 0 y 2 cm de profundidad, y además se encuentran en zonas muy cercanas del lago. El otro grupo corresponde las demás muestras (Fig. 15).

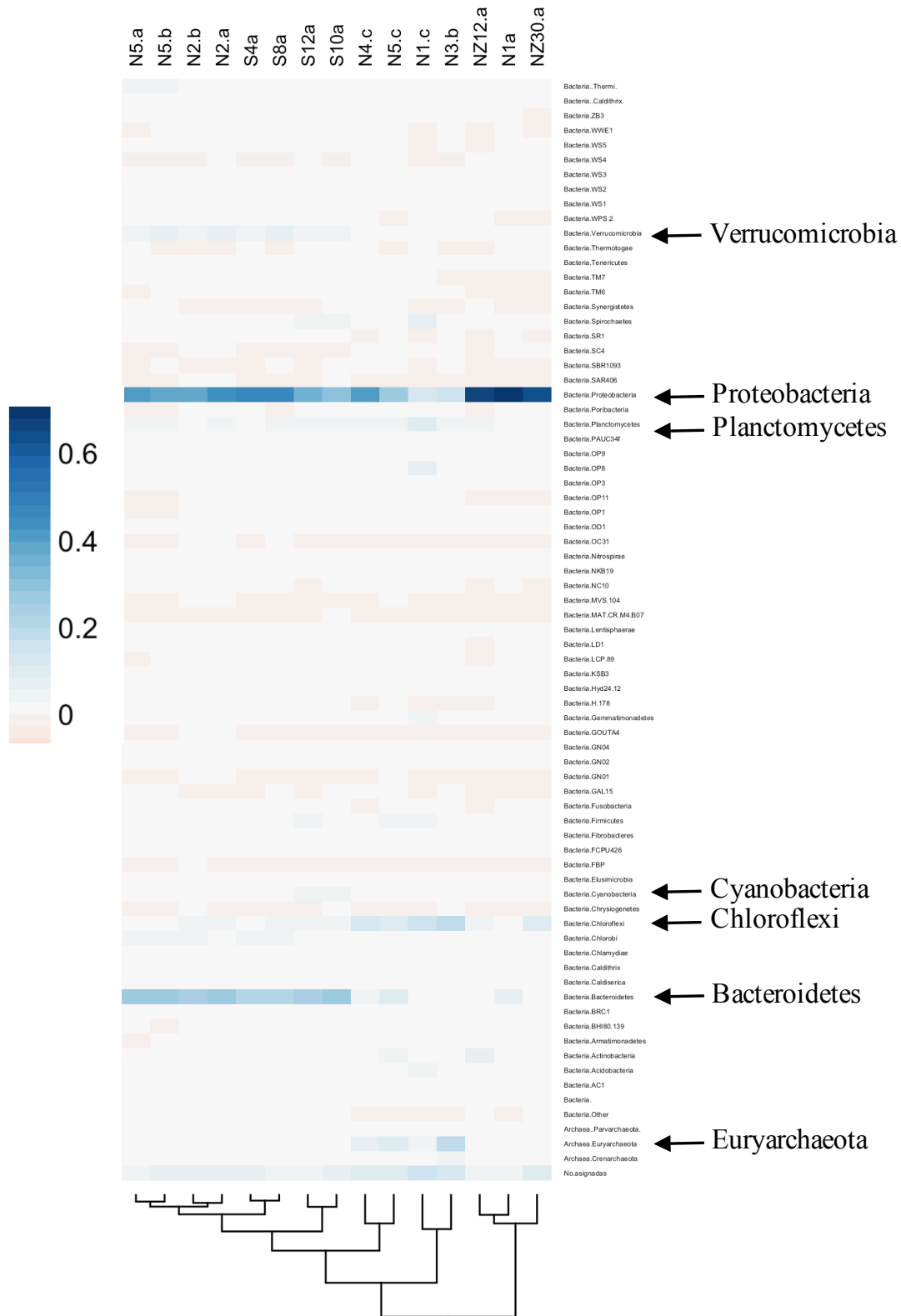


Figura 15. Mapa de abundancias relativas de los diferentes fila encontrados en sedimentos del lago cráter Alchichica. En la parte superior se menciona la muestra representada y en la parte inferior, el agrupamiento de las mismas. La escala a la izquierda representa la abundancia relativa (escala de 0 al 1).

Para corroborar el análisis de agrupamiento observado en el mapa de abundancia, se realizaron análisis de componente principales a diferentes niveles taxómicos (Fig. 16). El análisis PCA a nivel fila mostró que las muestras tienen un comportamiento esperado a aquel encontrado en el análisis de agrupamiento o cluster (Fig. 16a). Sin embargo, a nivel orden y género (Figs. 16 c, e), las muestras colapsaban en un grupo y N1.a se distanciaba mucho (Fig. 16, columna izquierda).

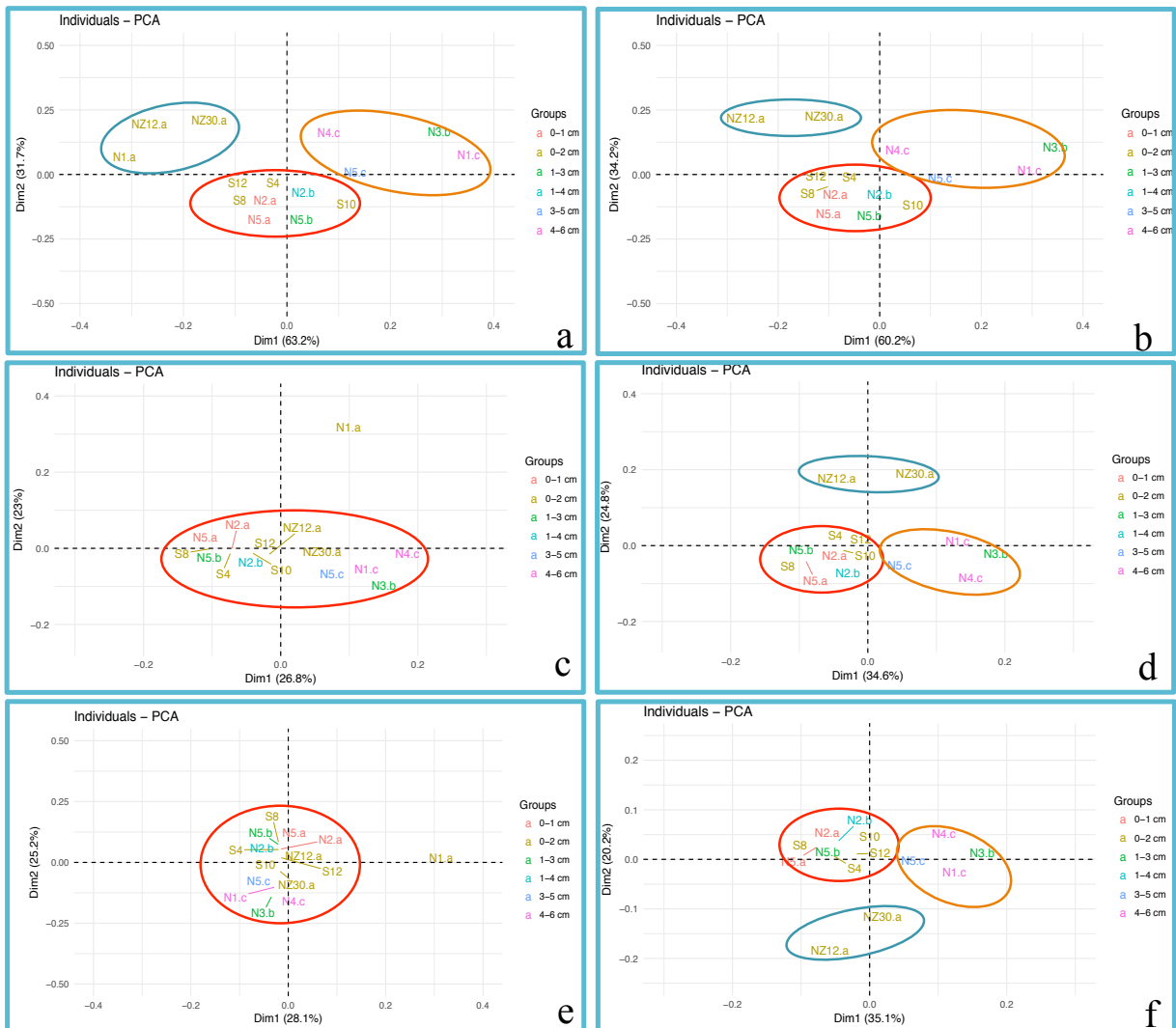


Figura 16. Comparación del agrupamiento de las submuestras por medio de PCA. a) a nivel fila con N1a; b) a nivel fila Sin N1a; c) a nivel orden con N1a; d) a nivel orden sin N1a; e) a nivel género con N1a; f) a nivel género sin N1a.

Con ello se notó que la muestra N1.a tenía un comportamiento especial. En un análisis más profundo, se notó que esta muestra tenía una abundancia muy alta de proteobacterias (>70%), en especial del género *Vibrio* que representaba casi el 30% del aporte procariótico de todas las secuencias. Mientras que, en otras muestras, este género no estaba presente. Por lo cual se determinó que esta muestra no era representativa del sistema y mostraba variaciones debido a condiciones puntuales de este género en particular. Consecuentemente, se eliminó la muestra N1.a de los análisis posteriores.

Como se puede apreciar en la figura 16 (columna derecha) -cuando no se considera la muestra N1.a en los análisis-, las muestras se agrupan en tres grupos, en los tres diferentes niveles taxonómicos analizados: fila (Fig. 16.b), orden (Fig. 16.d) o género (Fig. 16.f). Por lo que consideramos este último, el agrupamiento más fidedigno. Los análisis entonces confirman que las muestras, independiente del nivel taxonómico analizado, se agrupan dependiendo i) la profundidad del sedimento muestreado y ii) su ubicación en el lago (las del centro con las del borde), ver Anexo D.

Las variables principales que determinaron este agrupamiento es la abundancia que hay de diferentes grupos procarióticos. En la figura 17 se observa cómo en los sedimentos más superficiales < 4 cm (S4, S8, S10, S12, N2.a, N2.b, N5.a y N5.b), hay un mayor peso de contribución por el filo Bacteroidetes; mientras que en la cuenca (NZ30.a y NZ12.a) el filo de Proteobacteria es el que tiene un mayor peso. Por último, en los sedimentos 1-7 cm (N1.c, N3.b, N4.c y N5.c) los filo que tienen un mayor peso de son Euryarchaeota y Chloroflexi (Fig. 17a).

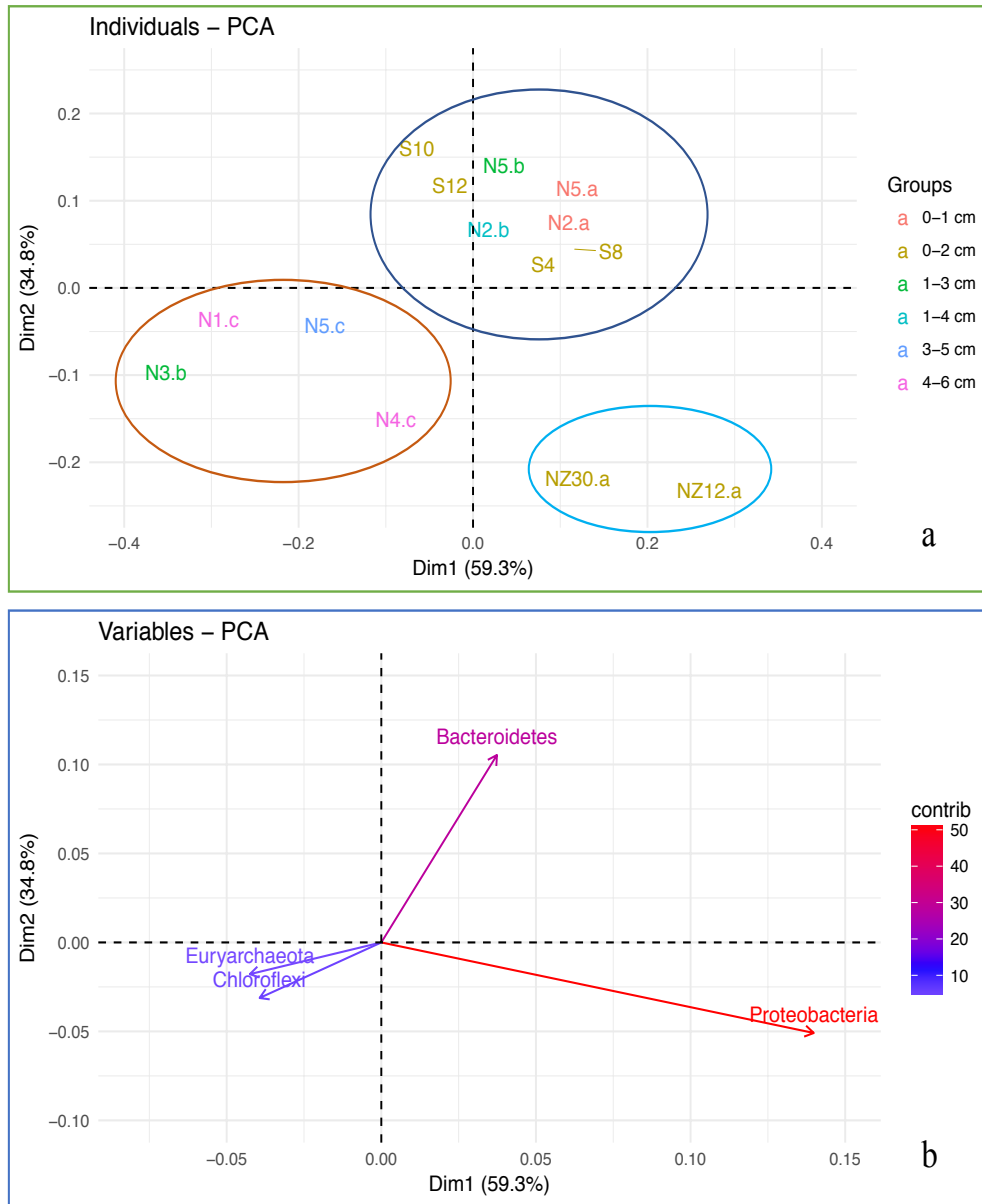


Figura 17. Análisis de componentes principales a nivel fila en sedimentos y los principales grupos que determinan la distribución. a) Distribución de las muestras y su agrupamiento. b) Principales fila bacterianos que determinan la distribución de las muestras de sedimentos, a la derecha se encuentra la escala del porcentaje de contribución.

9.6. Abundancia relativa de bacterias y arqueas a nivel clase

Cuando se realiza el análisis de contribución y estructura de la comunidad a nivel clase, se observa que aquella con más peso de contribución es Gammaproteobacteria. Asimismo, es la principal causa de la separación de las muestras NZ12 y NZ30 (0-2cm). Por el lado, las

muestras que son de sedimentos más profundos [N1.c (4-6 cm), N3.b (1-3 cm), y N5.c (3-5 cm)], su acomodo es asociado a la clase Thermoplasmata (Arquea, Euryarchaeota), Anaerolineae (Bacteria, Chloroflexi) y por las secuencias que no fueron asignadas. El último grupo (S4, S8, S10, S12, N2.a, N2.b, N5.a y N5.b), se agrupan la mayoría de las principales clases como Bacteroidia, Flavobacteriia, Saprospirae, Alphaproteobacteria Betaproteobacteria; aunque su peso de contribución es menor (10-15%) (Figura 18).

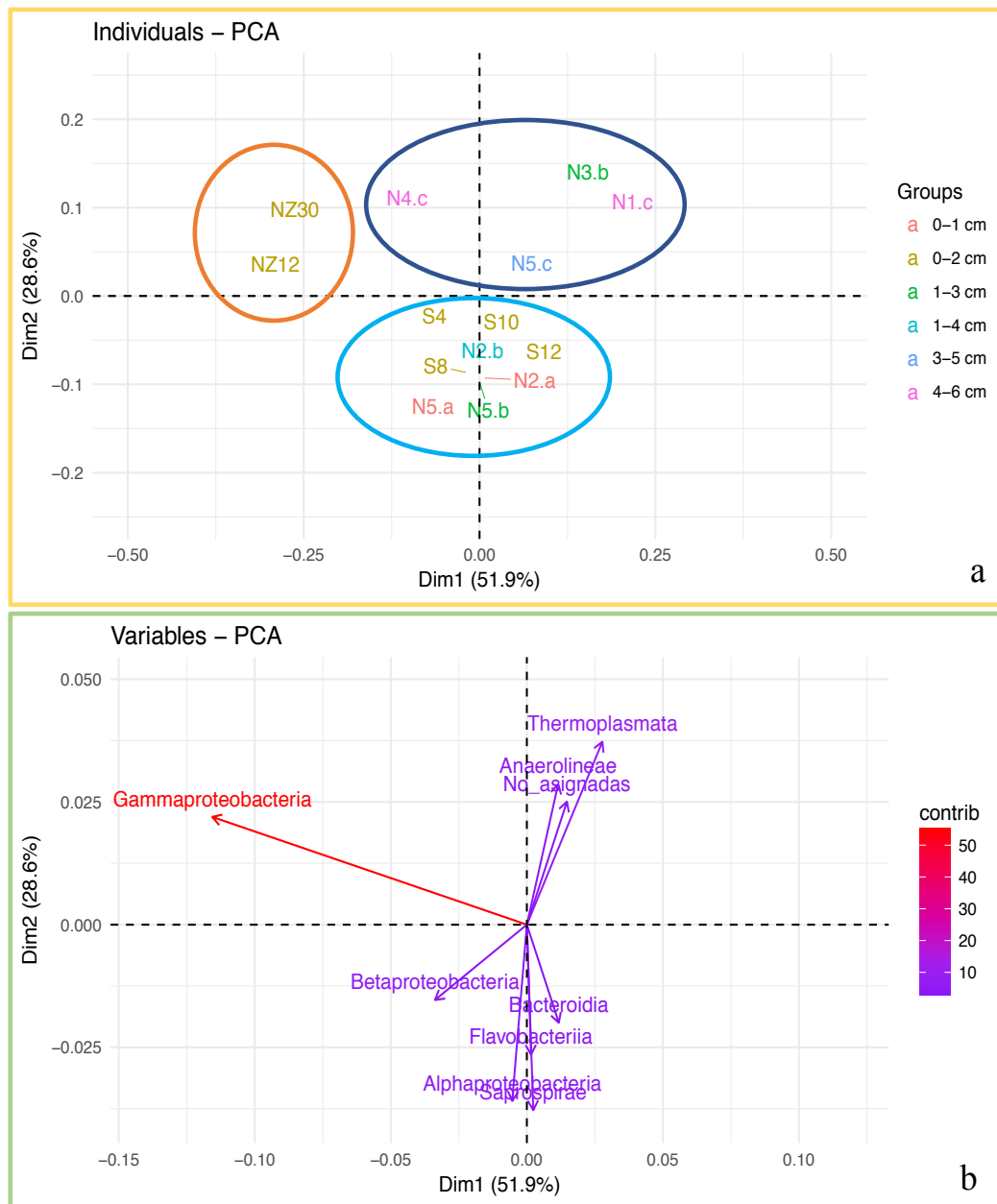


Figura 18. Análisis de componentes principales a nivel clase. a) Agrupamiento de las submuestras; b) clases con más peso de contribución al agrupamiento.

9.7. Abundancia relativa de bacteria y arquea a nivel de orden

Cuando el análisis se realizó a nivel de orden, se observó que, en las muestras de los sedimentos de 0 a 4 cm, los órdenes principales que se encuentran y se relacionan a éstos son Saprospirales y Flavobacteriales. Mientras que, para los sedimentos más profundos, los determinantes fueron el orden E2 (Thermoplasma Euryarchaeota) y los Pseudomonales, así como las secuencias no asignadas que en los sedimentos. En NZ12.a y NZ30.a los órdenes que más destacan son Chromatiales y Thiotrichales, ambos pertenecientes a Gammaproteobacteria (Fig. 19).

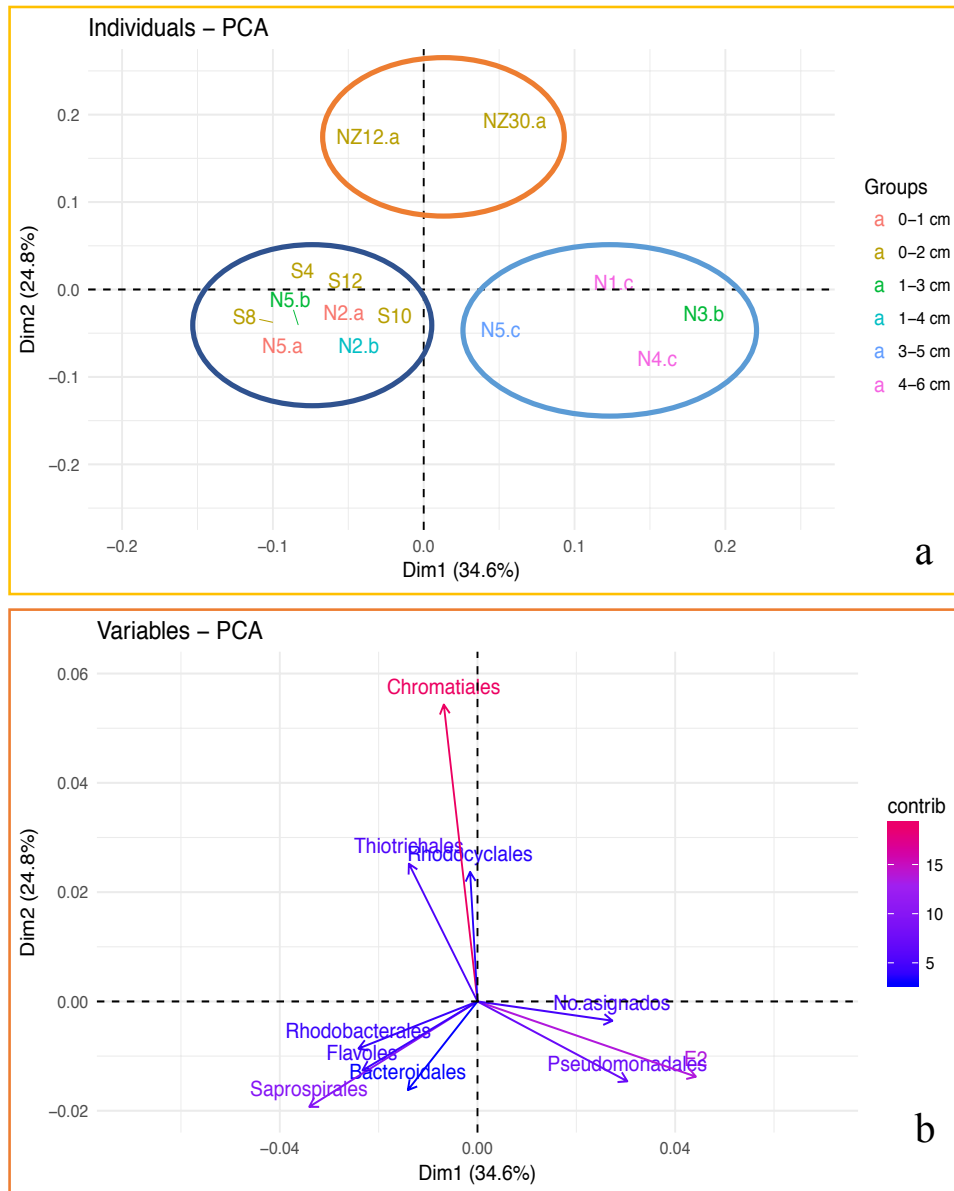


Figura 19. Análisis de componentes principales a nivel orden. a) Agrupamiento de las submuestras; b) órdenes con más peso de contribución al agrupamiento.

9.8. Relaciones entre la estructura de la comunidad bacteriana con las características geoquímicas

Como parte de este estudio también se analizó si existía una relación entre la estructura de la comunidad bacteriana y los valores geoquímicos determinados como C_{Org} , C_{Ino} , N_{Tot} , P, S, Si, Al, K, Na, Ca y Mg. Para ello, se realizó primeramente un análisis de componentes principales para observar la relación entre las muestras y las variables (Fig. 20).

En este análisis se observan de forma similar tres grandes grupos. El primero se encuentra compuesto por las muestras de N1 (N1.a, N1.b y N1.c), así como el núcleo de profundidad NZ30.a. Este agrupamiento sugiere que en la zona noroeste del lago posiblemente existen fenómenos de sedimentación de partículas orgánicas (material particulado y biomasa) que incrementan el contenido de C_{Org} , C_{Ino} y Si, —éste último proveniente posiblemente de diatomeas—. El segundo grupo contiene muestras principalmente superficiales N2.a, N3.a, N3.b N4.a, N4.b, N5.a y N5.b y están relacionados principalmente con la presencia de Ca y Mg. Mientras que el tercer agrupamiento se encuentra compuesto por sedimentos profundos N4.c, N5.c y N5.d (3-7 cm) y están altamente determinados por la presencia de formas de S y Na; la presencia de S puede ser debido a que se ven favorecidos los procesos de sulfato reducción en subcapas no superficiales. Sin embargo, estos resultados necesitan confirmarse mediante un estudio con un número mayor de muestras representativos de todos los segmentos del lago.

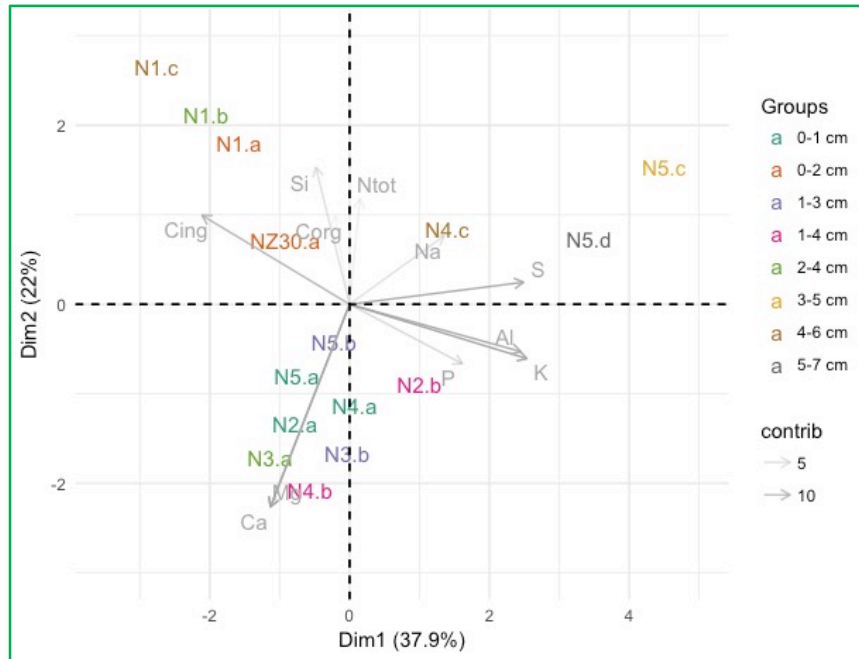


Figura 20. Análisis de componentes principales de las características geoquímicas de los sedimentos analizados. La intensidad del color gris de las flechas representa la contribución de cada variable.

En un segundo análisis se observó si existía la relación entre la estructura de comunidad bacteriana en los sedimentos y los valores geoquímicos. Para ello, se llevó a cabo un análisis de correlación canónica (CCA) entre la matriz de datos de abundancia a nivel orden y las características geoquímicas de las muestras (Fig. 21). Este análisis mostró resultados similares, donde la concentración de S sigue relacionándose con los sedimentos profundos, el Ca con sedimentos superficiales y donde también ahora se nota una importancia del Si. El sedimento NZ30.a se relacionó con el C_{INO} y el P.

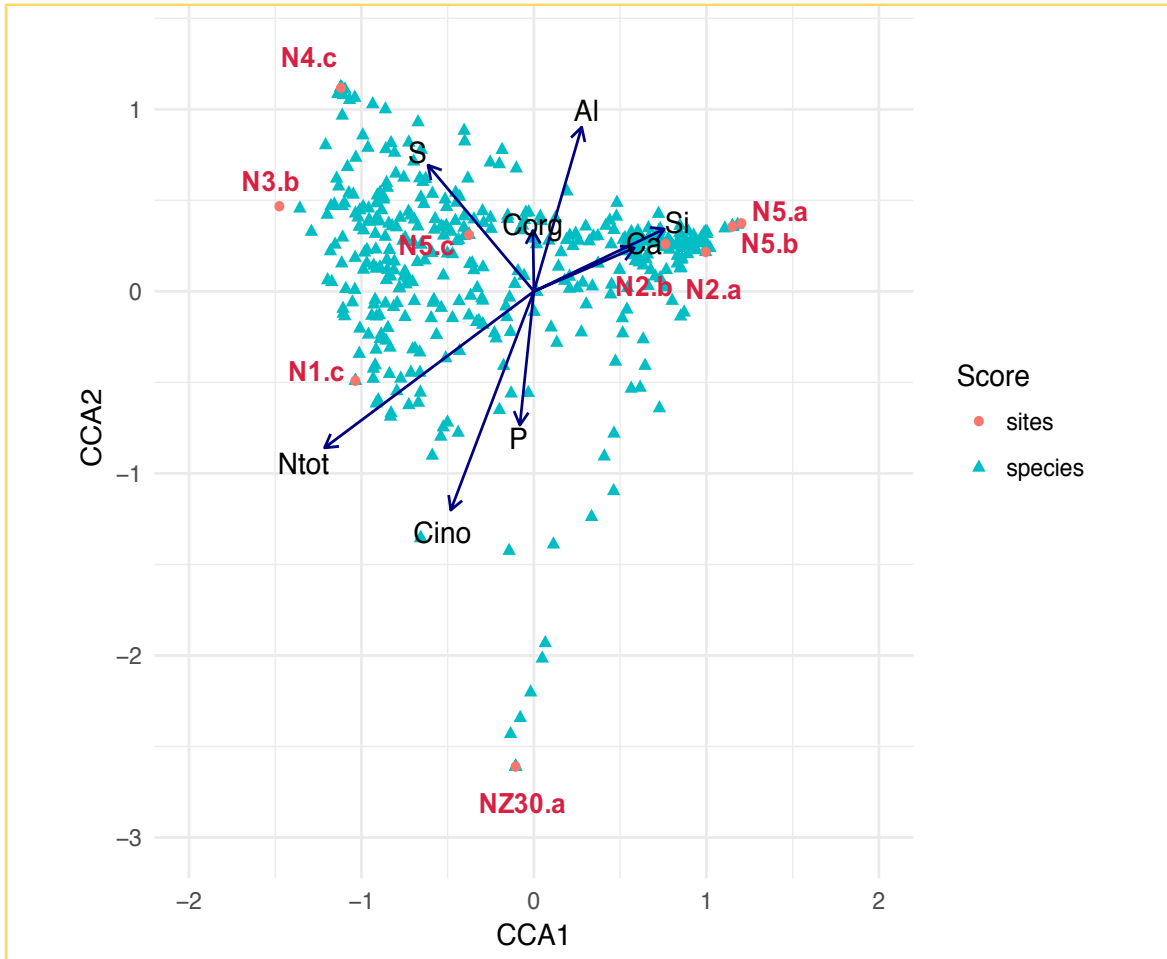


Figura 21. Análisis de correlación canónica entre la matriz de datos de abundancia a nivel orden y las características geoquímicas de sedimentos de Alchichica.

10. DISCUSIÓN

10.1. Mineralogía

La composición mineral principal de los sedimentos del lago Alchichica fue aragonita, hidromagnesita y de plagioclasas de composición media. Los dos primeros son minerales que precipitan mayormente debido a que se encuentran sobresaturados en el sistema (Armienta *et al.*, 2008). Las plagioclasas son de origen ígneo, y en sistemas alcalinos tiende a intercambiarse el ion Na^+ por el Ca^{2+} con el tiempo. El porcentaje mayoritario de la composición mineral en casi todos los sedimentos fue la aragonita, la cual puede deberse a los procesos de biomineralización que realizan principalmente las cianobacterias (Każmierczak *et al.*, 2011). No se observaron tendencias claras de distribución entre las diferentes fases minerales en los sedimentos; por lo que es necesario estudiar más muestras para observar si hay más correlaciones entre estos minerales y su distribución en los sedimentos superficiales del lago.

10.2. Principales grupos taxonómicos y su distribución

Los principales filo y sus respectivas clases encontradas en los sedimentos del lago salino alcalino de Alchichica fueron Proteobacteria (principalmente Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria y Betaproteobacteria); Bacteroidetes (Saprospirae, Flavobacteria y Cytophagia); Chloroflexi (Anaerolineae); Euryarchaeota (Thermoplasmata) y Planctomycetes (Planctomycetia). Esta diversidad de grupos de bacterias y arqueas es muy similar a otros lagos salino alcalinos reportados (*e.g.* Sorokin & Kuenen, 2005). La composición bacteriana en los sedimentos salino alcalinos se diferencia a su vez de aquellos de lagos de agua dulce, donde predominan Proteobacteria (Deltaproteobacteria principalmente, seguido de Gammaproteobacteria); Acidobacteria; Planctomycetes; Verrucomicrobia y Nitrospira (Wang *et al.*, 2012). Inclusive en los sedimentos de agua marina se encuentran grupos dominantes como Proteobacteria; Actinobacteria (Actinobacteria), Bacteroidetes (Flavobacteria), Planctomycetes (Planctomycetia) y Acidobacteria (Acidobacteria) (Zinger *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Algunos metabolismos inferidos a partir de la diversidad microbiana se encuentran en el Anexo E.

10.3. Fijación de carbono

La producción primaria de la mayoría de los lagos salino alcalinos es debido a la gran densidad de las poblaciones de cianobacterias presente (Sorokin, 2004). Las cianobacterias fijan carbono, realizan la fotosíntesis oxigénica y algunas pueden fijar N₂ atmosférico. Kaźmierczak y colaboradores (2011) realizaron un estudio de diversidad de cianobacterias en microbialitas del lago Alchichica encontrando seis órdenes de cianobacterias. En este estudio se identificaron 10 órdenes de Cyanobacteria en los sedimentos (Fig. 22), de los cuales, cuatro se compartían con los encontrados en las microbialitas del mismo lago (Chroococcales, Nostocales, Oscillatoriales y Synechococcales). Los órdenes Synechococcales y Pseudanabaenales fueron los que se encontraron en mayor abundancia en todos los sedimentos, sobre todo, en aquellos de poca profundidad (0-2 cm).

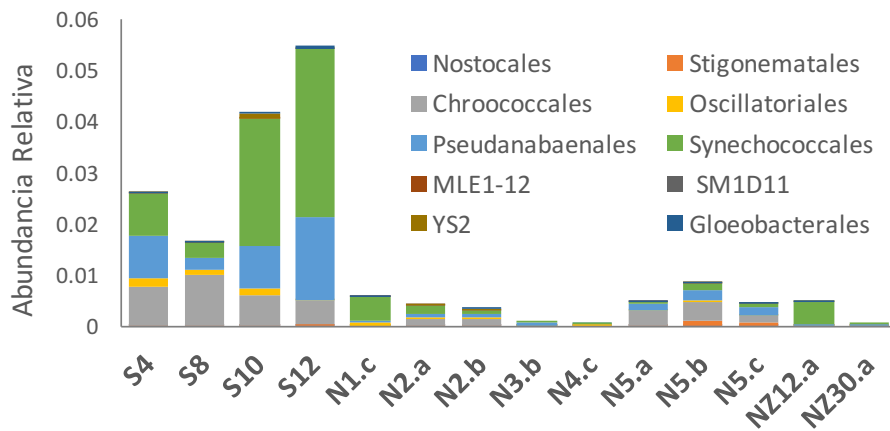


Figura 22. Abundancia relativa de los órdenes de Cyanobacteria encontrados en sedimentos del lago cráter Alchichica.

Los géneros encontrados con mayor abundancia fueron *Synechococcus* y *Halomicronema* (Synechococcales). Estos géneros son halotóxicos y algunas de sus especies se caracterizan por utilizar fotones con longitud de onda hacia el infrarrojo (> 700 nm) (Tomo *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Miao *et al.*, 2016). Con ello, se ve favorecida la

abundancia en los sedimentos de poca profundidad y donde existe una mayor incidencia de esta longitud de onda. En este caso, a profundidades de 12 y 30 m, la abundancia de estos géneros decrece mucho.

Estudios previos en las microbialitas de la zona del litoral sugieren que la fijación de N_2 por cianobacterias –principalmente Nostocales–, es uno de los procesos más activos del ciclo biogeoquímico del N, ya que existen bajas concentraciones de este elemento (Falcón *et al.*, 2002; Alcántara-Hernández *et al.*, 2017). En los sedimentos se encontró que también existen cianobacterias nostocales con potencial de fijación de N como *Nostoc*, *Anabaena* y *Nodularia*, exceptuando en las muestras de profundidad de 12 y 30 m donde no se encontró el orden Nostocales. Los Nostocales se caracteriza por tener estructuras especializadas de fijación de nitrógeno llamadas heterocistos (Whittons & Potts, 2012). Mientras que otros como *Rivularia*, *Phormidium* y *Microcoleus* –las cuales no tienen heterocistos–, emplean otras estrategias para fijar nitrógeno y también fueron encontradas en los sedimentos.

Otros microorganismos que contribuyen a la productividad primaria son los fotótrofos anoxigénicos. Los organismos del orden Chromatiales se caracterizan por llevar a cabo la fotosíntesis anoxigénica empleando formas reducidas de S (v.g. H_2S) como donador electrónico (fotolitotróficos), por lo que sus representantes son conocidas como bacterias púrpuras del azufre. Nuestros análisis sugieren para el ambiente estudiado que los organismos fotosintéticos anoxigénicos (empleando compuestos reducidos de S) son más abundantes que las bacterias fotosintéticas oxigénicas (Fig. 23). Queda claro puntualizar que en este estudio se han discriminado las microalgas, y se considera sólo la fotosíntesis procariótica.

Los principales géneros de Chromatiales detectados fueron *Thioalkalivibrio*, *Halorhodospira*, *Thiorhodospira*, *Ectothiorhodospira*, *Halochromatium*, *Allochromatium*, *Thiocapsa*, *Thiococcus* y *Thiovirga*. En lagos salino alcalinos se han reportado los géneros de *Thiorhodospira*, *Thiorhodovibrio*, y otros de la familia Ectothiorhodospiracea (orden Chromatiales) en salinidades desde 50-130 g/L NaCl (Kompantseva *et al.*, 2009; Gorlenko *et al.*, 2009). Consecuentemente, nuestros datos sugieren que en los ambientes salino alcalinos hay metabolismos ampliamente basados en el ciclaje del S, y coinciden con los anteriormente reportados.

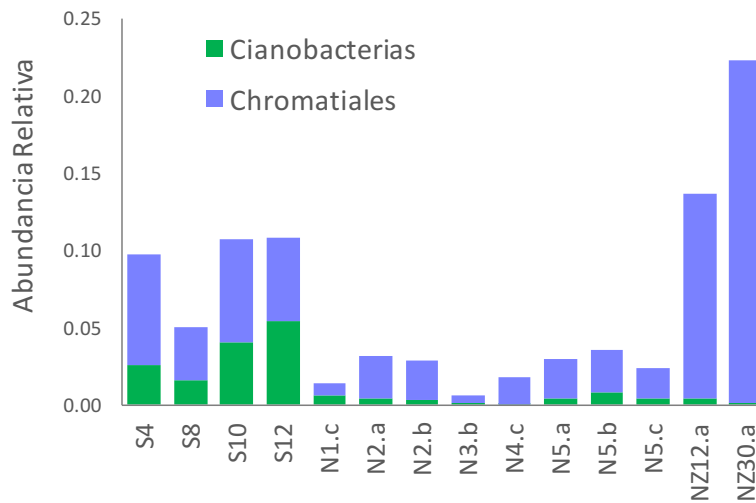


Figura 23. Abundancia relativa de Cianobacterias y Chromatiales en los sedimentos del lago Alchichica.

10.4. Heterotrofia

Los análisis de la estructura del componente bacteriano sugirieron la formación de un grupo con las muestras de las capas superiores de los sedimentos de 0 a 4 cm de profundidad, incluyendo S4, S8, S10, S12, N2.a, N2.b, N5a y N5.b. Este agrupamiento estuvo determinado por el filo Bacteroidetes (Fig. 17b), el cual se encontró mayormente constituido por los órdenes Saprospirales y Flavobacteriales en los sedimentos estudiados (Fig. 19b). Estos órdenes se encuentran involucrados en procesos de transformación de la materia orgánica y en el metabolismo heterotrófico (McIlroy & Nielsen, 2014). Estos organismos son mayormente encontrados en fase sésil, es decir, que se asocian a partículas minerales (v.g. sedimentos) donde hay organismos fototróficos. Consecuentemente, se especializan en hidrolizar polímeros de carbono, particularmente proteínas, mediante exoenzimas en ambientes acuáticos (Kirchman, 2002).

La mayoría de las unidades taxonómicas dentro de estos órdenes no pudieron ser asignados a nivel género (Cuadro 18). El hecho de que no se pudieron afiliar filogenéticamente a nivel género estos organismos, sugiere que existe una gran nueva diversidad aún por identificar y asignar dentro de estos clados para los sistemas salino alcalinos. También se observó una mayor abundancia relativa de estos heterótrofos en las capas superficiales donde pueden degradar los compuestos orgánicos empleando como aceptor electrónico el O₂. En estratos inferiores (3-7 cm) existió una menor proporción de estos organismos.

Cuadro 18. Porcentaje de abundancia de heterótrofos con mayor representatividad pertenecientes a Bacteroidetes.

Unidad taxonómica operacional	Porcentaje de abundancia promedio (%)	
	Sedimentos 0-4 cm (a)	Sedimentos 3-7 cm (b)
1. Bacteria no cultivada de Saprospiraceae	6.36	0.36
2. Bacteria no cultivada de Bacteroidales	3.68	2.57
3. Bacteria no cultivada de Flavobacteriaceae	2.64	0.20
4. Bacteria no cultivada de Flammeovirgaceae	1.71	0.13
5. Bacteria no cultivada de Cytophagaceae	1.50	0.08

(a) sedimentos S4, S8, S10, S12, N2.a, N2.b, N5.a y N5.b; (b) N1.c, N3.b, N4.c y N5.c.

En la hipótesis de trabajo de la presente tesis se planteó que la estructura de la comunidad bacteriana en los sedimentos del lago cráter Alchichica sería diferenciada principalmente por el contenido del carbono orgánico en las muestras y la profundidad de las mismas. Entre los análisis que se realizaron, se observó que el contenido de C_{Org} no tenía una relación clara con la profundidad del segmento estudiado (Fig. 24). El análisis de correlación canónica (Fig. 21) tampoco mostró una fuerte relación entre el C_{Org} y la estructura del componente bacteriano. Lo cual sugiere que las comunidades procarióticas se estructuran de forma similar independiente de la cantidad de C-orgánico presente, pero sí de acuerdo a la profundidad del sedimento (*i.e.* 0-4 cm y de 4-7 cm).

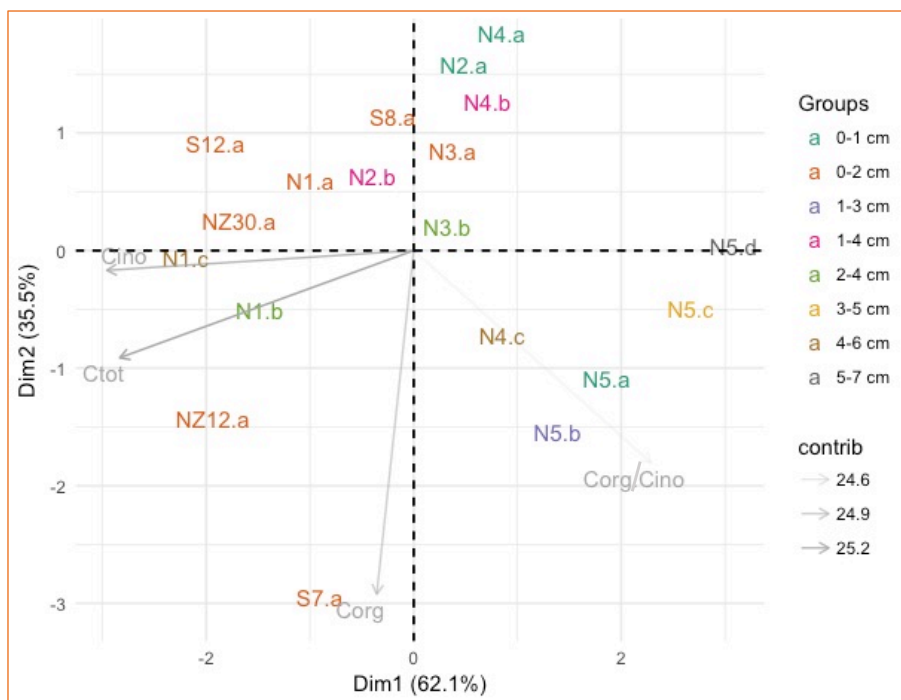


Figura 24. Análisis de componentes principales de contenido de Corg, Cino, Ctot y la proporción Corg/Cino en los sedimentos del lago cráter Alchichica.

10.5. Metanogénesis

El segundo grupo más importante en el análisis incluyó sedimentos de 4 a 7 cm de profundidad y está constituido por las muestras N1.c, N3.b, N4.c y N5.c (Fig. 17a). En este grupo, uno de los fila con más peso y característico fue Euryarchaeota (Arquea); en específico, el orden E2 dentro de la clase Thermoplasmata. Thermoplasmata ha sido reportada como la tercera clase más abundante de arqueas en sistemas oceánicos del norte (Wemheuer *et al.*, 2012). Mientras que E2 ha sido caracterizado como el principal orden de Thermoplasmata en varios ambientes ligera o moderadamente salinos, incluyendo sistemas costeros y ventilas hidrotermales en el océano profundo. Hasta la fecha se ha cultivado un representante como *Methanomassiliicoccus*, el cual ha sido tipificado como anaerobio y metanogénico, y produce metano a partir de metanol en presencia de hidrógeno (Iino *et al.*, 2013). Esto puede sugerir que en las subcapas más profundas de los sedimentos se favorece la producción de metano por arqueas metanogénicas, del orden E2. Asimismo, los organismos metanogénicos aprovechan las moléculas generadas por los heterótrofos

hidrolizadores de biopolímeros como por ejemplo Bacteroidetes y por los fermentadores como aquellos pertenecientes Clostridia, tales como: *Fusibacter*, *Clostridium*, *Syntrophomonas*, *Alkalibacter*, *Tindallia Anoxynatronum*, *Alkaliphilus*, entre otros. Los cuales fueron detectados como los Firmicutes más abundantes en las muestras de sedimentos (Fig. 25) (Worm *et al.*, 2010).

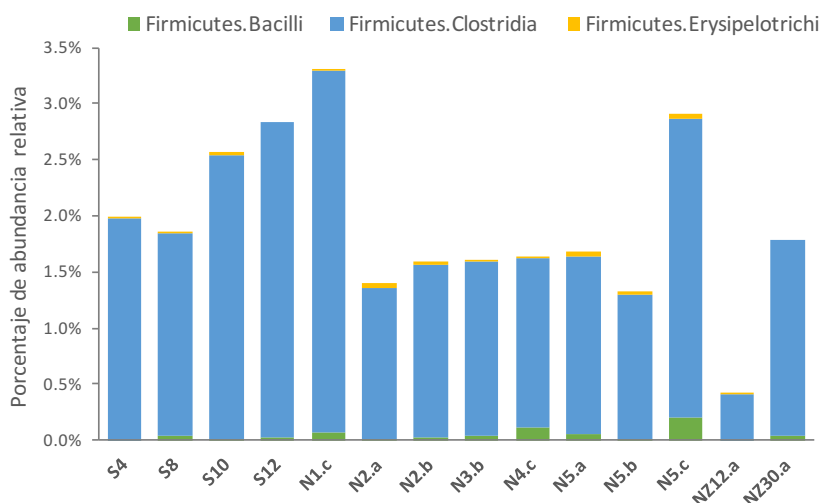


Figura 25. Porcentaje de abundancia relativa de organismos fermentadores y acetogénicos.

10.6. Sulfato reducción

La abundancia de las bacterias sulfato reductoras en comparación con las arqueas metanogénicas, es mayor en casi todos los sedimentos con excepción de las muestras N3b, N4c y N5c (Anexo F). La sulfato reducción es uno de los procesos más importantes en sedimentos marinos, cuantitativamente hablando (Fenchel *et al.*, 2012). En los lagos salinos alcalinos también ha sido detectado como un metabolismo importante y una serie de sulfato reductores han sido aislados (Sorokin *et al.*, 2015). Entre ellos, se encuentran los organismos litotróficos que pueden oxidar H₂, formato o pequeñas moléculas orgánicas, con sulfato, tiosulfato o sulfito como aceptor electrónico. Éstos incluyen deltaproteobacterias haloalcalífilas como *Desulfonatronum*, *Desulfonatronovibrio*, *Desulfonatronospira* y *Desulfohalophilus* (Desulfohalobiaceae) (Sorokin *et al.*, 2011). En la base de datos de Alchichica se encontró *Desulfonatronum* en todos los sedimentos

analizados (0.005-1.3%), mientras que *Desulfonatronovibrio* se encontró sólo en algunos sedimentos y su porcentaje de representación fue de 0-0.3%. En cambio, *Desulfosarcina* (0.1-7.6%) y *Desulfococcus* (0.1-2%) fueron los géneros más encontrados. Estos géneros pertenecen a la familia Desulfobacteraceae, la cual está representada ampliamente en los sedimentos de Alchichica (Fig. 26). El clado Desulfosarcina/Desulfococcus ha sido identificado como clave en la degradación anaerobia de alcanos en filtraciones marinas (Kleindienst *et al.*, 2014); es decir, acoplan metabolismos quimiorganotróficos a la reducción de formas de S.

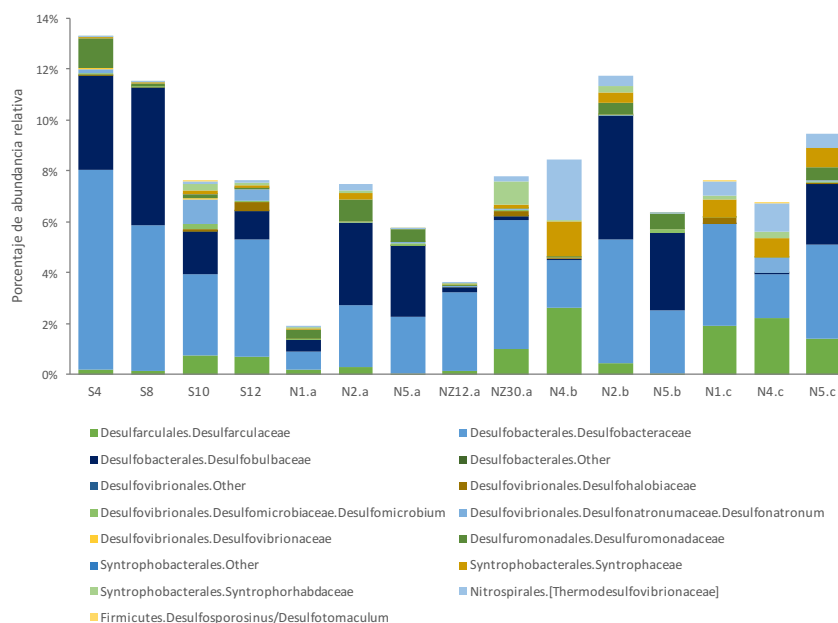


Figura 26. Porcentaje de abundancia relativa de organismos sulfato reductores.

10.7. Quimiolitrotofias

Las quimiolitrotofias son procesos metabólicos en los cuales se emplean principalmente compuestos inorgánicos reducidos como donadores electrónicos. Estos procesos se han encontrados en varios ambientes incluyendo los sistemas salino alcalinos; sin embargo, se han visto disminuidos o en proporción casi nula (Oren, 2011). Los procesos litotróficos más estudiados y de interés en los sistemas ambientales son la oxidación aerobia de amonio y de nitrito; así como la metanotrofia aerobia y anaeróbica. Se encontró que en los sedimentos

del lago cráter de Alchichica, estos cuatro procesos tienen pocos microorganismos representantes, que en su máximo contribuyen el 2.5% de la abundancia relativa del componente procariótico (Fig. 27). Igualmente, la presencia de organismos anaerobios oxidadores de amonio (anammox) sólo se detectaron en una muestra (N4.c) y con una abundancia relativa del 0.01%. Paralelamente, los procesos de nitrificación y anammox han sido detectados en poca abundancia en las microbialitas del mismo lago. Probablemente, limitados por las formas de N presentes en la columna de agua y factores bioenergéticos (Alcántara-Hernández *et al.*, 2017).

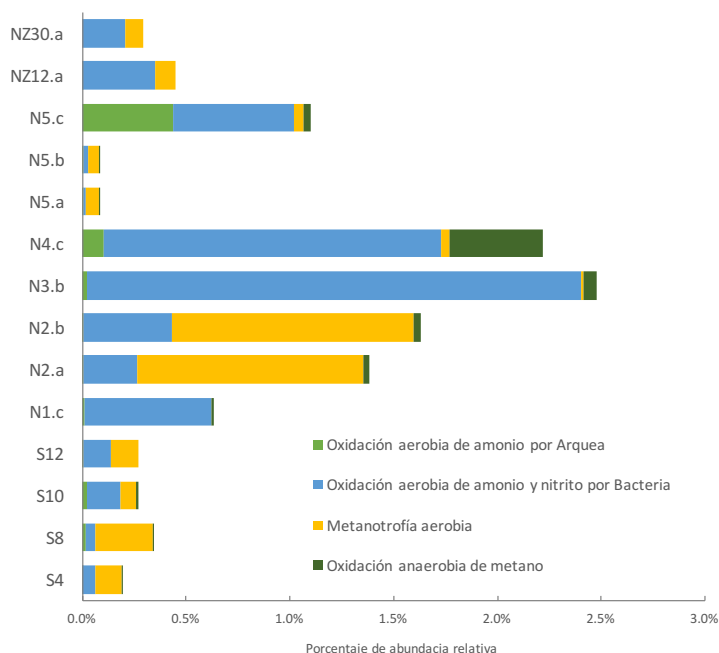


Figura 27. Porcentaje de abundancia relativa de organismos nitrificadores y oxidadores de metano.

10.8. Modelo de ciclaje de nutrientes en los sedimentos del lago cráter de Alchichica

Con el análisis de la composición 16S ARNr del componente bacteriano, es posible inferir un modelo de ciclaje en los sedimentos superficiales en el lago cráter de Alchichica (Fig. 28). Los resultados sugieren que existe fotosíntesis oxigénica y anoxygenica es llevada a cabo por microalgas, cianobacterias y bacterias púrpuras del azufre. Estos organismos pueden fijar C y –junto con los fenómenos de sedimentación en el lago–, contribuyen al

almacén de C_{Org} del sistema. De allí, que existan una gran abundancia de microorganismos quimiorganotróficos en los sedimentos de 0-4 cm, donde se observaron que Bacteroidetes pueden degradar biopolímeros (*i.e.* carbohidratos y proteínas) bajo condiciones aerobias o microaerofílicas. Esta hidrólisis es el primer paso de obtención de moléculas más pequeñas que pueden ser empleadas en sistemas anaerobios fermentadores (*v.g.* Clostridiales) para la obtención de acetato, formato, H_2 , metanol, entre otros. Estas últimas moléculas a su vez, pueden ser usadas por los organismos sulfato reductores organotróficos –*Desulfosarcina/Desulfococcus*– y litotróficos –*Desulfonatronum/Desulfonatronovibrio*–, principalmente. Paralelamente, el metanol, H_2 y acetato, también pueden ser empleados por arqueas metanogénicas, principalmente en sedimentos más profundos, donde creemos que la presión parcial de H_2 es mayor.

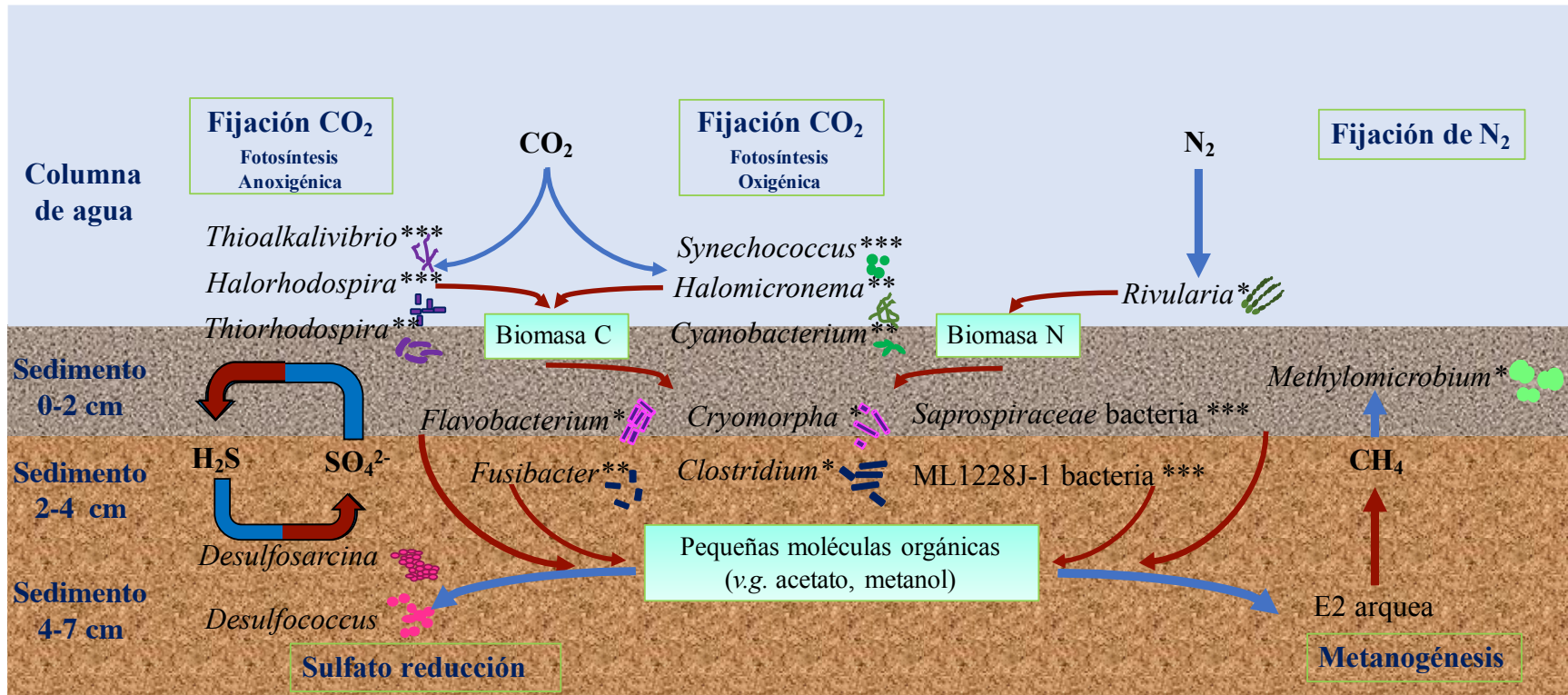


Figura 28. Modelo de ciclaje biogeoquímico y los procariontes responsables en los sedimentos superficiales del lago cráter de Alchichica.

11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo es uno de los primeros en caracterizar el componente bacteriano de sedimentos del lago cráter Alchichica. Este lago es uno de los más importantes lago cráter de México y ha sido catalogado como un lago sumidero de C, principalmente por fenómenos de sedimentación de material particulado y por precipitación de carbonatos. Los procesos asociados al ciclo de C son importantes y relevantes entonces en los sedimentos aquí estudiados. Nuestros datos sugieren que las comunidades bacterianas en los sedimentos se estructuran dependiendo principalmente por la profundidad del sedimento. En estos, los sedimentos superficiales (0-4 cm) contienen una serie de organismos fototróficos oxigénicos y anoxigénicos, y otros heterotróficos encargados de descomponer la materia orgánica. En los estratos de 3-7 cm se establece una biomasa principalmente anaerobia como microorganismos sulfato-reductores quimiorganotróficos y arqueas metanogénicas. Asimismo, en estos segmentos se encuentran un gran número de microorganismos que no han podido ser clasificados o asignados. En ambos estratos se observó que los procesos quimiolitotróficos se encuentran presentes, pero sesgados.

Nuestros análisis sugieren que la estructura de la comunidad no está relacionada con la concentración de C_{Org} , mientras que sí hay un efecto de arreglo de la estructura en un gradiente de profundidad (*i.e.* los sedimentos de 0-4 cm son diferentes de aquellos de 3-7 cm). En estos estratos sí existen relaciones entre elementos como Ca, Mg y Si (para 0-4 cm) y S (en 3-7 cm); sin embargo, se recomienda analizar un mayor número de muestras para confirmar esta tendencia.

En el presente trabajo también se encontraron microorganismos metanogénicos y metanotróficos. Aunque el lago ha sido caracterizado como sumidero de C, sería interesante cuantificar la actividad metanogénica y metanotrófica en los sedimentos para confirmar estas aseveraciones. Por lo que, en futuros trabajos, es necesario considerar el papel biogeoquímico de los sedimentos para tener una perspectiva más completa del lago y sus funciones ecosistémicas.

12. REFERENCIAS

- Adame, M. F., Alcocer, J., & Escobar, E. (2008). Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology*, 53(1), 22-31.
- Alcántara-Hernández, R. J., Valdespino-Castillo, P. M., Centeno, C. M., Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., & Falcón, L. I. (2017). Genetic diversity associated with N-cycle pathways in microbialites from Lake Alchichica, Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, 78(2), 121-133.
- Alcántara-Rodríguez J. A., Ciroso-Pérez, Jorge, Ortega-Mayagoitia Elizabeth, Serrania-Soto, C. R., & Piedra-Ibarra Elías. (2012). Local adaptation in populations of a *Brachionus* group plicatilis cryptic species inhabiting three deep crater lakes in Central Mexico. *Freshwater Biology*, 57(4), 728-740.
- Alcocer, J., & Escobar, E. (1993). Morphometric characteristics of six Mexican coastal-lakes related to productivity. *Revista de biología tropical*, 41(2), 171-179.
- Alcocer, J., Lugo, A., Escobar, E., Sánchez, M. D. R., & Vilaclara, G. (2001). Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 27(5), 3166-3169.
- Alcocer, J., & Lugo, A. (2003). Effects of El Niño on the dynamics of Lake Alchichica, central Mexico. *Geofísica Internacional-México-*, 42(3), 523-528.
- Alcocer, J., & Filonov, A. E. (2007). A note on the effects of an individual large rainfall event on saline Lake Alchichica, Mexico. *Environmental Geology*, 53(4), 777-783.
- Alcocer, J., Escobar, E., & Oseguera, L. A. (2008). Acoplamiento pelágico-bentónico: respuesta de la zona bentónica profunda a la sedimentación del florecimiento invernal de diatomeas en el lago oligotrófico Alchichica, Puebla, México. *Hidrobiológica*, 18, 115-122.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Anil, K. P., Srinivas, T. N., Madhu, S., Sravan, R., Singh, S., Naqvi, S. W., ... & Shivaji, S. (2012). *Cecembia lonarensis* gen. nov., sp. nov., a haloalkalitolerant bacterium of the

- family Cyclobacteriaceae, isolated from a haloalkaline lake and emended descriptions of the genera Indibacter, Nitritalea and Belliella. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt 9), 2252-2258.
- Anil, K. P., Srinivas, T. N. R., Madhu, S., Manorama, R., & Shivaji, S. (2010a). Indibacter alkaliphilus gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from a haloalkaline lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(4), 721-726.
- Anil, K. P., Srinivas, T. N. R., Kumar, P. P., Madhu, S., & Shivaji, S. (2010b). Nitritalea halalkaliphila gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic bacterium of the family 'Cyclobacteriaceae', phylum Bacteroidetes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(10), 2320-2325.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., ... & Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2), 249-258.
- Antony, C. P., Kumaresan, D., Ferrando, L., Boden, R., Moussard, H., Scavino, A. F., ... & Murrell, J. C. (2010). Active methylophages in the sediments of Lonar Lake, a saline and alkaline ecosystem formed by meteor impact. *The ISME journal*, 4(11), 1470-1480.
- Antony CP, Doronina NV, Boden R, Trotsenko YA, Shouche YS, Murrell JC. (2012). Methylophaga lonarensis, a novel moderately haloalkaliphilic methylophage isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62: 1613–1618.
- Antony, C. P., Kumaresan, D., Hunger, S., Drake, H. L., Murrell, J. C., & Shouche, Y. S. (2013). Microbiology of Lonar Lake and other soda lakes. *The ISME journal*, 7(3), 468-476.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., ... & Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178(2), 249-258.
- Banciu, H. L., Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Galinski, E. A., Muntyan, M. S., Kuenen, J. G., & Muyzer, G. (2008). Influence of salts and pH on growth and activity of a novel facultatively alkaliphilic, extremely salt-tolerant, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium Thioalkalibacter halophilus gen. nov., sp. nov. from South-Western Siberian soda lakes. *Extremophiles*, 12(3), 391-404.

- Bhattacharya, T., Byrne, R., Böhnelt, H., Wogau, K., Kienel, U., Ingram, B. L., & Zimmerman, S. (2015). Cultural implications of late Holocene climate change in the Cuenca Oriental, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(6), 1693-1698.
- Birrer, S. C., Dafforn, K. A., & Johnston, E. L. (2017). Microbial Community Responses to Contaminants and the Use of Molecular Techniques. In *Microbial Ecotoxicology* (pp. 165-183). Springer, Cham.
- Buermans, H. P. J., & Den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932-1941.
- Caballero, M., Vilaclara, G., Rodríguez, A., & Juárez, D. (2003). Short-term climatic change in lake sediments from lake Alchichica, Oriental, Mexico. *Geofísica Internacional-México*, 42(3), 529-538.
- Cano-Cruz, M., & Carrasco-Núñez, G. (2008). Evolución de un cráter de explosión (maar) riolítico: Hoya de Estrada, campo volcánico Valle de Santiago, Guanajuato, México. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 25(3), 549-564.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., ... & Gormley, N. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6(8), 1621-1624.
- Carrillo-Araujo, M., Taş, N., Alcántara-Hernández, R. J., Gaona, O., Schondube, J. E., Medellín, R. A., ... & Falcón, L. I. (2015). Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Carrasco-Núñez, G., Ort, M. H., & Romero, C. (2007). Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 159(1), 179-197.
- Carrasco-Núñez, G., & Ort, M.H., 2012. Contrasting eruptive styles of Mexican maar volcanoes. Hopi Buttes Volcanic field Workshop: Maar-diatreme volcanism, Flagstaff, AZ, USA., abstract volume, oct 2012.

- Centeno, C. M., Legendre, P., Beltrán, Y., Alcántara-Hernández, R. J., Lidström, U. E., Ashby, M. N., & Falcón, L. I. (2012). Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS microbiology ecology*, 82(3), 724-735.
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.
- Cohuo-Durán, Sergio, Pérez, Liseth, & Karanovic, Ivana. (2014). On *Limnocytherina axalapasco*, a new freshwater ostracod (Podocopida: Limnocytheridae) from Mexican crater lakes. *Revista de Biología Tropical*, 62(1), 29-46.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., ... & Tiedje, J. M. (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic acids research*, 35(suppl 1), D169-D172.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gerard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R., & López-García, P. (2011). Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PloS one*, 6(12), e28767.
- Deng, Y., Liu, Y., Dumont, M., & Conrad, R. (2017). Salinity Affects the Composition of the Aerobic Methanotroph Community in Alkaline Lake Sediments from the Tibetan Plateau. *Microbial ecology*, 73(1), 101-110.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., ... & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069-5072.
- Duckworth, A. W., Grant, W. D., Jones, B. E., & Van Steenberg, R. (1996). Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 19(3), 181-191.
- Edgar RC (2013) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461.
- Falcón L, Escobar-Briones E, Romero D (2002) Nitrogen fixation patterns displayed by cyanobacterial consortia in Alchichica crater-lake, Mexico. *Hydrobiologia* 467:71-78
- Falcón-Ordaz, J., Acosta, R., Fernández, J. A., & Lira-Guerrero, G. (2012). Helminths y sifonápteros parásitos de cinco especies de roedores en localidades de la Cuenca Oriental, en el centro de México. *Acta zoológica mexicana*, 28(2), 287-304.

- Fenchel, T., King, G.M., & Blackburn T.H., (2012) Chapter 7 - Aquatic Sediments. En *Bacterial Biogeochemistry* (3a ed.), Academic Press, Boston, 2012, Pág. 121-142.
- Ferguson, R. L., Buckley, E. N., & Palumbo, A. V. (1984). Response of marine bacterioplankton to differential filtration and confinement. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), 49-55.
- Filonov, A., & Alcocer, J. (2002). Internal waves in a tropical crater lake: Alchichica, Central Mexico. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 28(4), 1857-1860.
- Filonov, A., Tereshchenko, I., & Alcocer, J. (2006). Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophysical Research Letters*, 33(7).
- Foti, M., Sorokin, D. Y., Lomans, B., Mussman, M., Zacharova, E. E., Pimenov, N. V., ... & Muyzer, G. (2007). Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied and environmental microbiology*, 73(7), 2093-2100.
- García, E. (1988). *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. (No. 551.59 G37). CETENAL, 1970. Hoja Colima. Carta de Climas. Esc, 1(500,000).
- Gifford, S. M., Sharma, S., Rinta-Kanto, J. M., & Moran, M. A. (2011). Quantitative analysis of a deeply sequenced marine microbial metatranscriptome. *The ISME journal*, 5(3), 461.
- Gilbert, J. A., & Dupont, C. L. (2011). Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*, 3, 347-371.
- Glombitza, C., Stockhecke, M., Schubert, C. J., Vetter, A., & Kallmeyer, J. (2013). Sulfate reduction controlled by organic matter availability in deep sediment cores from the saline, alkaline Lake Van (Eastern Anatolia, Turkey). *Frontiers in microbiology*, 4, 209.
- Grant, W. D. (2006). *Alkaline environments and biodiversity* (pp. 1-19). Eolss Publishers Oxford, UK.
- Grant, W. D., & Sorokin, D. Y. (2011). Distribution and diversity of soda lake alkaliphiles. In *Extremophiles handbook* (pp. 27-54). Springer Japan. Gifford, S. M., Sharma, S., Rinta-Kanto, J. M., & Moran, M. A. (2011). Quantitative analysis of a deeply sequenced marine microbial metatranscriptome. *The ISME journal*, 5(3), 461-472.
- Grasshoff K, Ehrhardt M, Kremling K (1983) *Methods of seawater analysis*, 2nd edn. Verlag Chemie, Weinheim

- Gorlenko, V. M., Bryantseva, I. A., Rabold, S., Tourova, T. P., Rubtsova, D., Smirnova, E., ... & Imhoff, J. F. (2009). Ectothiorhodospira variabilis sp. nov., an alkaliphilic and halophilic purple sulfur bacterium from soda lakes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4), 658-664
- Hårdeman, F., & Sjöling, S. (2007). Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. *FEMS microbiology ecology*, 59(2), 524-534.
- Herbst, D. B. (1998). Potential salinity limitations on nitrogen fixation in sediments from Mono Lake, California. *International Journal of Salt Lake Research*, 7(3), 261-274.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)*, 79(2), 133-139.
- Hu, L., Pan, H., Xue, Y., Ventosa, A., Cowan, D. A., Jones, B. E., ... & Ma, Y. (2008). Halorubrum luteum sp. nov., isolated from Lake Chagannor, inner Mongolia, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(7), 1705-1708.
- Iino, T., Tamaki, H., Tamazawa, S., Ueno, Y., Ohkuma, M., Suzuki, K. I., ... & Haruta, S. (2013). Candidatus Methanogranum caenicola: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of Methanomassiliicoccaceae fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a methanogenic lineage of the class Thermoplasmata. *Microbes and environments*, 28(2), 244-250.
- Imhoff, J. F., Sahl, H. G., Soliman, G. S., & Trüper, H. G. (1979). The Wadi Natrun: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. *Geomicrobiology Journal*, 1(3), 219-234.
- Itoh, T., Yamaguchi, T., Zhou, P., & Takashina, T. (2005). Natronolimnobius baerhuensis gen. nov., sp. nov. and Natronolimnobius innermongolicus sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in Inner Mongolia, China. *Extremophiles*, 9(2), 111-116.
- Jones, J. G. (1977). The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planktonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biology*, 7(1), 67-91
- Kamekura, M., Dyall-Smith, M. L., Upasani, V., Ventosa, A., & Kates, M. (1997). Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of Natronobacterium vacuolatum,

- Natronobacterium magadii, and Natronobacterium pharaonis to Halorubrum, Natrialba, and Natronomonas gen. nov., respectively, as Halorubrum vacuolatum comb. nov., Natrialba magadii comb. nov., and Natronomonas pharaonis comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 853-857.
- Kaźmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D., & Tavera, R. (2011). Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies*, 57(4), 543-570.
- Kirkwood, D. S. (1994). *Sanplus segmented flow analyzer and its applications*. Seawater analysis. Skalar. Amsterdam.
- Kirchman DL (2002) The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* 39:91–100
- Kogure, K., Simidu, U., & Taga, N. (1980). Distribution of viable marine bacteria in neritic seawater around Japan. *Canadian journal of microbiology*, 26(3), 318-323.
- Kompantseva, E. I., Komova, A. V., Rusanov, I. I., Pimenov, N. V., & Sorokin, D. Y. (2009). Primary production of organic matter and phototrophic communities in the soda lakes of the Kulunda steppe (Altai krai). *Microbiology*, 78(5), 643-649.
- Lee, M. H., Lee, C. H., Oh, T. K., Song, J. K., & Yoon, J. H. (2006). Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: evidence for a new family of bacterial lipases. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7406-7409.
- Legendre, P., & Legendre, L. F. (2012). *Numerical ecology* (Vol. 24). Elsevier.
- Li, Y., Lin, Y., Garvey, C. J., Birch, D., Corkery, R. W., Loughlin, P. C., ... & Chen, M. (2016). Characterization of red-shifted phycobilisomes isolated from the chlorophyll f-containing cyanobacterium Halomicronema hongdechloris. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(1), 107-114.
- Liu, X., Yao, T., Kang, S., Jiao, N., Zeng, Y., & Liu, Y. (2010). Bacterial community of the largest oligosaline lake, Namco on the Tibetan Plateau. *Geomicrobiology Journal*, 27(8), 669-682.
- Liu, Y., Yao, T., Jiao, N., Zhu, L., Hu, A., Liu, X., ... & Chen, Z. Q. (2013). Salinity impact on bacterial community composition in five high-altitude lakes from the Tibetan Plateau, Western China. *Geomicrobiology Journal*, 30(5), 462-469.

- Loman, N. J., Constantinidou, C., Chan, J. Z., Halachev, M., Sergeant, M., Penn, C. W., ... & Pallen, M. J. (2012). High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 599-606.
- López-Rojas, M., & Carrasco-Núñez, G. (2015). Depositional facies and migration of the eruptive loci for Atexcac axalapazco (central Mexico): implications for the morphology of the crater. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 32(3), 377-394.
- Lugo, A., González, M. E., del Rosario Sánchez, M., & Alcocer, J. (1999). Distribution of *Leptodiatomus novamexicanus* (Copepoda: Calanoida) in a Mexican hyposaline lake. *Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 47(1), 141-148.
- Lugo, A., Alcocer, J., Sanchez, M. D. R., Escobar, E., & Macek, M. (2001). Temporal and spatial variation of bacterioplankton abundance in a tropical, warm-monomictic, saline lake: Alchichica, Puebla, Mexico. *Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 27(5), 2968-2971.
- Lozupone, C. A., & Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11436-11440.
- Magoč, T., & Salzberg, LS. (2011) FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27: 2957-63
- Mancilla Villa, O. R., Bautista Olivas, A. L., Ortega Escobar, H. M., Sánchez Bernal, E. I., Can Chulim, Á., Gutiérrez, G., ... & Manuel, Y. (2014). Hidrogeoquímica de salinas Zapotitlán y los lagos-cráter Alchichica y Atexcac, Puebla. *Idesia (Arica)*, 32(1), 55-69.
- McIlroy, S. J., & Nielsen, P. H. (2014). *The family saprospiraceae*. In *The Prokaryotes* (pp. 863-889). Springer Berlin Heidelberg.
- Miao, D., Ding, W. L., Zhao, B. Q., Lu, L., Xu, Q. Z., Scheer, H., & Zhao, K. H. (2016). Adapting photosynthesis to the near-infrared: non-covalent binding of phycocyanobilin provides an extreme spectral red-shift to phycobilisome core-membrane linker from *Synechococcus* sp. PCC7335. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(6), 688-694.
- Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer, J., Peralta, L., & del Rosario Sánchez, M. (2001). *Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake*. In *Saline Lakes* Springer Netherlands (pp. 299-306).

- Ollier, C. D. (1967). Maars their characteristics, varieties and definition. *Bulletin Volcanologique*, 31(1), 45-73.
- Oremland, R. S. (1990). Nitrogen fixation dynamics of two diazotrophic communities in Mono Lake, California. *Applied and environmental microbiology*, 56(3), 614-622.
- Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental microbiology*, 13(8), 1908-1923.
- Ortega-Mayagoitia, E., Ciroso-Pérez, J., & Sánchez-Martínez, M. (2011). A story of famine in the pelagic realm: temporal and spatial patterns of food limitation in rotifers from an oligotrophic tropical lake. *Journal of plankton research*, 33(10), 1574-1585.
- Pecoraino, G., D'Alessandro, W., & Inguaggiato, S. (2015). *The other side of the coin: geochemistry of alkaline lakes in volcanic areas*. In *Volcanic Lakes* (pp. 219-237). Springer Berlin Heidelberg.
- Pérez, L., Lozano-García, S., & Caballero, M. (2015). Non-marine ostracodes from highland lakes in East-central Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 63(2), 401-425.
- Ramírez-Olvera, M. A., Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., & Lugo, A. (2009). Nutrient limitation in a tropical saline lake: a microcosm experiment. *Hydrobiologia*, 626(1), 5-13.
- Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Taha, M., & Ball, A. S. (2016). A quantitative PCR approach for quantification of functional genes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. *MethodsX*, 3, 205-211.
- Singer, E., Bushnell, B., Coleman-Derr, D., Bowman, B., Bowers, R. M., Levy, A., ... & Hallam, S. J. (2016). High-resolution phylogenetic microbial community profiling. *The ISME journal*, 10(8), 2020-2032.
- Sorokin, D. Y., Banciu, H. L., & Muyzer, G. (2015). Functional microbiology of soda lakes. *Current opinion in microbiology*, 25, 88-96.
- Sorokin, D. Y., Kuenen, J. G., & Muyzer, G. (2011). The Microbial Sulfur Cycle at Extremely Haloalkaline Conditions of Soda Lakes. *Frontiers in Microbiology*, 2, 44.
- Sorokin, D. Y., & Kuenen, J. G. (2005). Alkaliphilic chemolithotrophs from soda lakes. *FEMS Microbiol Ecol*, 52, 287-295.
- Sorokin, D. Y., Berben, T., Melton, E. D., Overmars, L., Vavourakis, C. D., & Muyzer, G. (2014). Microbial diversity and biogeochemical cycling in soda lakes. *Extremophiles*, 18(5), 791-809.

- Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., & Pace, N. R. (1985). Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Applied and environmental microbiology*, 49(6), 1379-1384.
- Staley, J. T., & Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Reviews in Microbiology*, 39(1), 321-346.
- Tang, X., Xie, G., Shao, K., Chen, Y., & Gao, G. (2012). Influence of salinity on the bacterial community composition in Lake Bosten, a large oligosaline lake in arid northwestern China. *Applied and environmental microbiology*, 78(13), 4748-4751.
- Tindall, B. J., Ross, H. N. M., & Grant, W. D. (1984). *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(1), 41-57.
- Tomo, T., Shinoda, T., Chen, M., Allakhverdiev, S. I., & Akimoto, S. (2014). Energy transfer processes in chlorophyll f-containing cyanobacteria using time-resolved fluorescence spectroscopy on intact cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(9), 1484-1489.
- Torsvik, V., Goksøyr, J., & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 56(3), 782-787.
- Valdespino-Castillo, P. M., Alcántara-Hernández, R. J., Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., Macek, M., & Falcón, L. I. (2014). Alkaline phosphatases in microbialites and bacterioplankton from Alchichica soda lake, Mexico. *FEMS microbiology ecology*, 90(2), 504-519.
- Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., & Wade, W. G. (2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. *FEMS microbiology letters*, 309(1), 1-7.
- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., & González, H. (1993). Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla State, Mexico. *Proceedings-international association of theoretical and applied limnology*, 25, 435-435.
- Vuillemin, A., & Ariztegui, D. (2013). Geomicrobiological investigations in subsaline maar lake sediments over the last 1500 years. *Quaternary Science Reviews*, 71, 119-130.
- Wang, Y., Sheng, H. F., He, Y., Wu, J. Y., Jiang, Y. X., Tam, N. F. Y., & Zhou, H. W. (2012). Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine

- sediments by using millions of illumina tags. *Applied and environmental microbiology*, 78(23), 8264-8271.
- Wanger, M. (1993). Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1520-1525.
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., & Schleifer, K. H. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(3), 792-800.
- Whitton, B.A., & Potts M. (2012). *Introduction to the Cyanobacteria*, p. 1-13. In: B.A. Whitton (ed.), *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer Netherlands.
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221.
- Worm, P., Müller, N., Plugge, C. M., Stams, A. J., & Schink, B. (2010). *Syntrophy in methanogenic degradation*. In (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea (pp. 143-173). Springer Berlin Heidelberg.
- Wu, Q. L., Zwart, G., Schauer, M., Kamst-van Agterveld, M. P., & Hahn, M. W. (2006). Bacterioplankton community composition along a salinity gradient of sixteen high-mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5478-5485.
- Xu, Y., Zhou, P., & Tian, X. (1999). Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen. nov., sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 261-266.
- Xu, Y., Wang, Z., Xue, Y., Zhou, P., Ma, Y., Ventosa, A., & Grant, W. D. (2001). *Natrialba hulunbeirensis* sp. nov. and *Natrialba chahannaoensis* sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea from soda lakes in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(5), 1693-1698
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P. Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*, 17(1), 135.

- Yang, J., Ma, L. A., Jiang, H., Wu, G., & Dong, H. (2016). Salinity shapes microbial diversity and community structure in surface sediments of the Qinghai-Tibetan Lakes. *Scientific reports*, 6, 25078.
- Zavarzin, G. A., Zhilina, T. N., & Kevbrin, V. V. (1999). The alkaliphilic microbial community and its functional diversity. *Microbiology-aibs-c/c of mikrobiologiia*, 68, 503-521.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Li, J., Groleau, A., Balan, E., Estève, I., ... & López-García, P. (2015). Formation of low-T hydrated silicates in modern microbialites from Mexico and implications for microbial fossilization. *Frontiers in Earth Science*, 3, 64.
- Zhilina, T., Zavarzina, D., Kevbrin, V., & Kolganova, T. (2013). Methanocalculus natronophilus sp. nov., a new alkaliphilic hydrogenotrophic methanogenic archaeon from a soda lake, and proposal of the new family Methanocalculaceae. *Microbiology* (00262617), 82(6).
- Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., ... & Ramette, A. (2011). Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One*, 6(9), e24570.
- Zolitschka, B., Anselmetti, F., Ariztegui, D., Corbella, H., Francus, P., Lücke, A., ... & Wastegård, S. (2013). Environment and climate of the last 51,000 years—new insights from the Potrok Aike maar lake Sediment Archive Drilling prOject (PASADO). *Quaternary Science Reviews*, 71, 1-12.

13. ANEXOS

13.1. ANEXO A. Difractograma de sedimentos

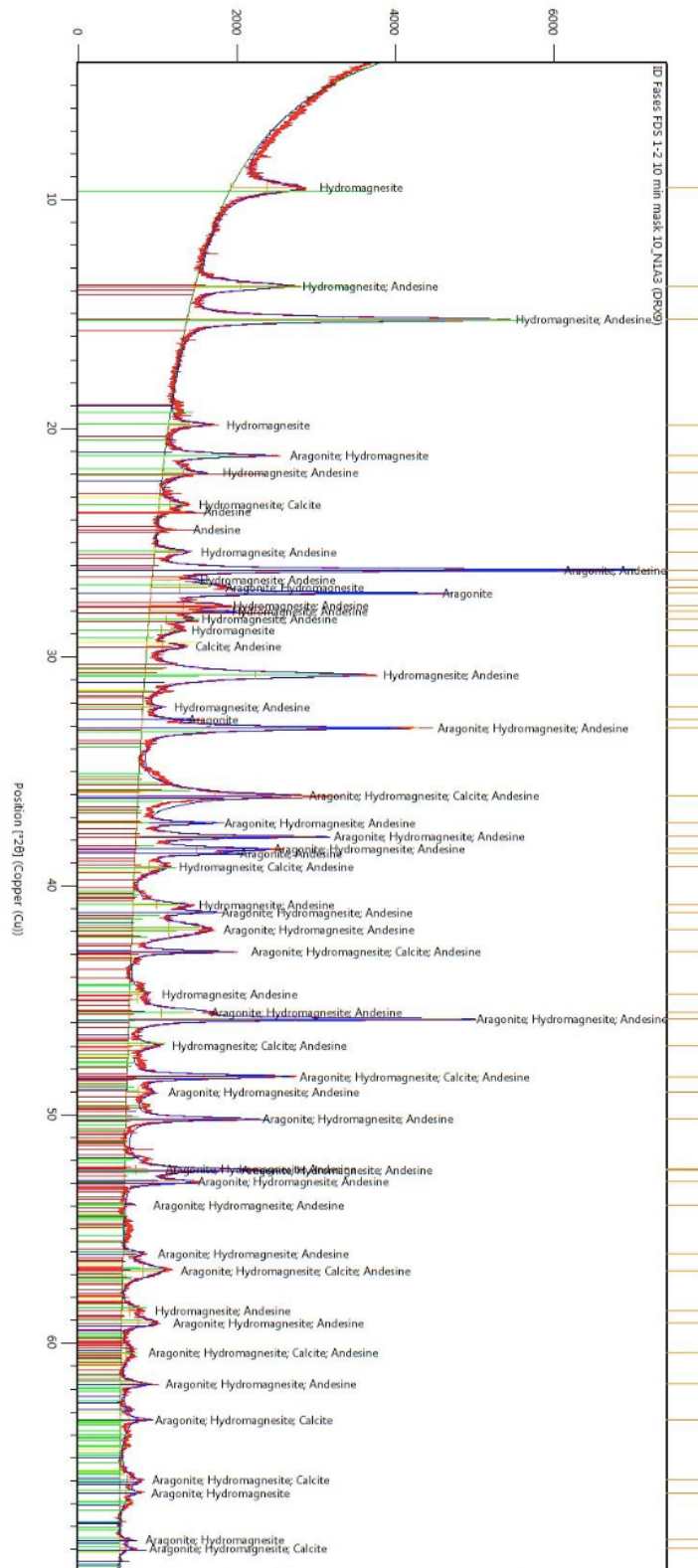


Fig. A1. Difractograma resultante de la difracción de rayos X de la submuestra N1c.

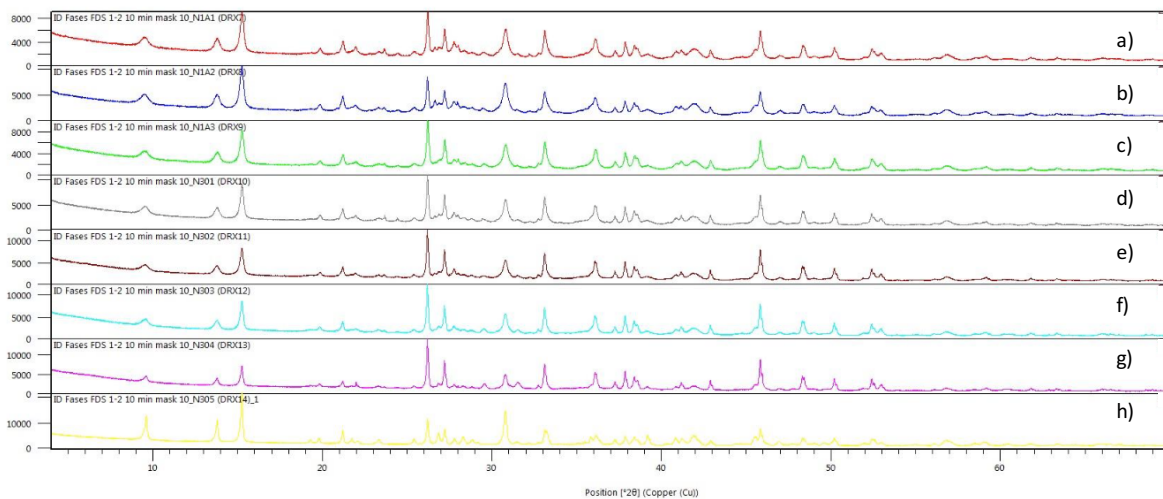


Fig. A2. Resumen de difractogramas de los sedimentos. Se muestra consistencia y similitud mineral en todos los difractogramas realizados.

13.2. ANEXO B. Abundancia elemental en sedimentos del lago Alchichica.

Cuadro B1. Concentración de elementos obtenidos de los sedimentos del lago cráter Alchichica.

Elemento mg/kg	N1.a	N1.b	N1.c	N2.a	N2.b	N2.c	N3.a	N3.b	N4.a	N4.b	N4.c	N5.a	N5.b	N5.c	N5.d	NZ30.a
Al	3928	2891	2477	7575	12906	5947	5799	6596	6735	7445	9515	7075	7513	14970	12344	3543
Ba	199	182	161	342	397	478	385	370	281	327	226	282	279	94	118	197
Ca	89588	87815	78234	135774	137706	172128	168521	165990	112410	138277	94348	138604	141072	50827	57048	108670
Cd	2	1	1	2	3	2	1	1	1	1	2	2	2	3	3	0
Co	3	3	2	7	11	7	5	4	6	6	7	9	9	11	10	2
Cr	3	2	1	10	15	12	7	10	9	11	11	12	12	18	17	5
Cu	10	11	10	4	10	15	5	10	10	9	8	6	8	10	6	10
Fe	5068	3660	3091	8882	14647	8851	7727	9298	11216	11462	11047	11665	12063	17773	17103	4324
K	692	640	555	1528	1474	808	1411	1434	1329	1358	1510	1127	1189	2691	2076	879
Li	22	23	21	12	13	15	20	37	30	32	28	18	18	27	23	37
Mg	110406	131899	142674	7171	12729	9482	11011	11529	17457	18353	19166	20402	18037	11942	11390	145989
Mn	174	153	144	225	313	238	351	342	261	303	245	368	380	337	310	402
Mo	0	0	0	0	0	0	2	4	5	2	0	0	0	0	0	4
Na	2931	3198	3106	2534	4080	2706	3183	3231	2641	2676	3219	3319	3361	4074	3360	3789
Ni	6	6	5	14	18	20	11	16	15	13	14	12	12	18	17	6
P	177	158	148	242	261	218	251	260	268	260	302	240	243	321	283	396
S	2067	2424	2187	2215	3057	2857	3502	4541	3023	3419	4426	2962	2974	7694	8041	2145
Si	508	541	507	490	349	402	442	109	82	118	331	402	423	422	362	222
Sr	908	834	765	1424	1499	2179	1795	1726	1293	1579	1074	1446	1444	261	405	887
Ti	365	266	224	566	1018	589	518	577	631	702	870	756	793	1261	1122	260
V	9	7	6	20	31	23	16	21	15	18	21	20	22	37	33	13
Zn	17	14	11	26	30	22	27	29	29	30	31	23	25	37	32	20

13.3. ANEXO C. Abundancias relativas de los fila encontrados en sedimentos superficiales.

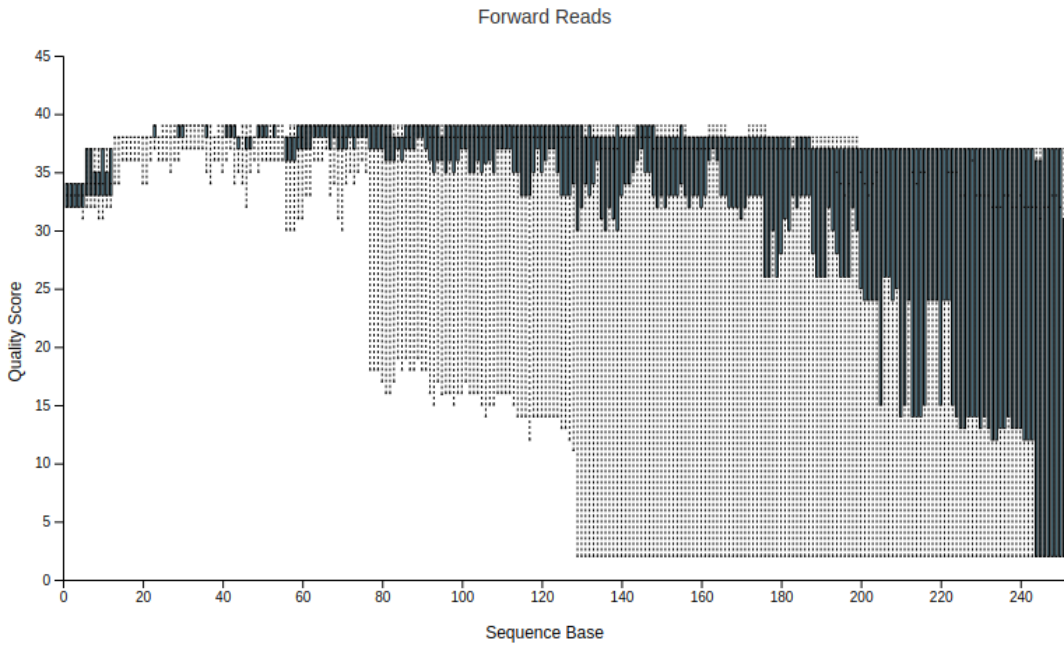


Figura C1. Calidad de las secuencias. La posición 41 del gráfico se generó usando un muestreo aleatorio de 10000 fuera de las 3400996 secuencias sin remplazo. La longitud de secuencias mínima identificada fue de 251 bases

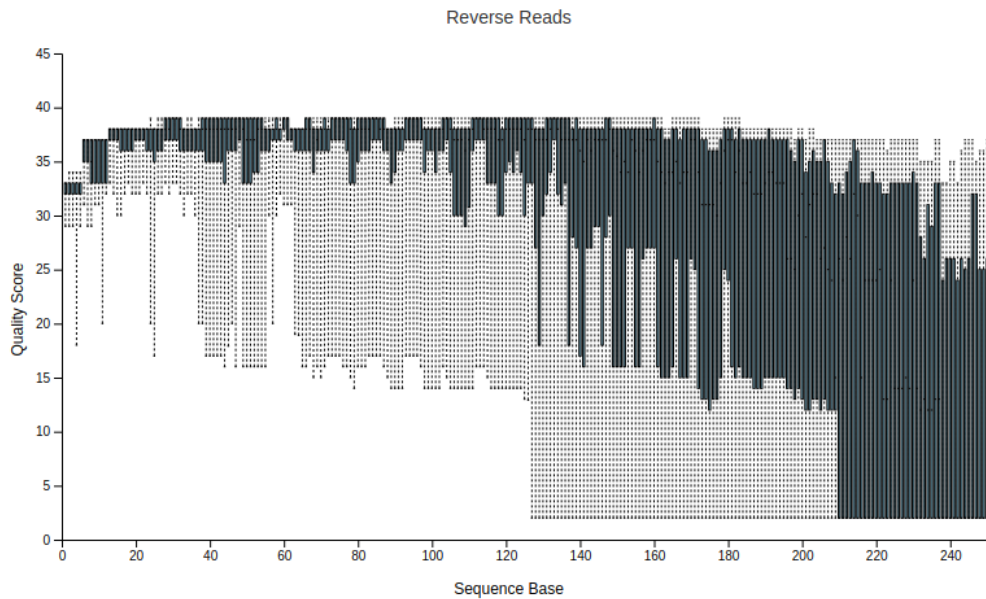


Figura C2. Calidad de las secuencias inversas. La posición 90 del gráfico se generó usando un muestreo aleatorio de 10000 fuera de las 3400996 secuencias sin remplazo. La longitud de secuencias mínima identificada fue de 251 bases

Cuadro C1. Abundancia relativa de las secuencias obtenidas y los fila a los que se asociaron

Fila	S4	S8	S10	S12	N1.c	N2.a	N2.b	N3.b	N4.c	N5.a	N5.b	N5.c	NZ12.a	NZ30.a
No asignadas	6.41	4.59	6.38	4.19	15.10	6.32	6.89	12.43	10.80	5.40	6.67	9.60	4.95	9.22
Crenarchaeota	0.03	0.03	0.16	0.05	1.45	0.24	0.29	4.16	1.71	0.01	0.02	2.16	0.02	0.24
Euryarchaeota	0.19	0.03	1.80	0.04	5.04	0.49	0.87	18.10	8.30	0.01	0.04	9.86	0.11	1.32
[Parvarchaeota]	0.25	0.06	0.61	0.06	0.03	0.12	0.25	0.14	0.24	0.10	0.14	0.27	0.00	0.02
Bacteria NA	0.01	0.00	0.01	0.00	0	0.00	0.00	0	0	0.00	0.00	0	0.01	0.01
Bacteria NA	0.04	0.02	0.08	0.04	0.54	0.04	0.09	0.18	0.19	0.00	0.00	0.17	0.01	0.03
AC1	0.01	0.00	0.03	0.00	0.12	0.03	0.04	0.37	0.45	0.00	0.00	0.16	0.00	0.05
Acidobacteria	0.54	0.32	0.58	0.37	2.84	0.37	0.51	1.10	2.06	0.51	0.41	0.70	1.56	0.40
Actinobacteria	1.98	2.11	0.66	2.31	2.78	1.27	1.49	1.79	1.94	0.85	1.13	4.37	7.50	2.00
Armatimonadetes	0.01	0.02	0.02	0.02	0.13	0.01	0.01	0.08	0.11	0	0.00	0.19	0.01	0.20
BHI80-139	0.01	0.00	0.04	0.00	0.03	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0	0.01	0.00	0.00
BRC1	0.05	0.02	0.12	0.02	0.03	0.02	0.04	0.13	0.12	0.05	0.06	0.42	0.13	0.02
Bacteroidetes	20.51	20.97	27.34	20.30	1.90	25.50	24.00	2.74	3.84	27.17	26.90	9.87	1.00	1.36
Caldiserica	0.06	0.06	0.11	0.06	0.00	0.02	0.05	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
Caldithrix	0.05	0.05	0.10	0.05	0.45	0.10	0.17	1.63	0.71	0.03	0.01	0.19	0.06	0.27
Chlamydiae	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
Chlorobi	2.90	3.20	0.91	3.46	0.13	2.73	4.05	0.49	1.24	4.03	3.22	1.79	0.24	0.14
Chloroflexi	2.34	2.92	3.92	3.51	14.42	3.19	4.53	18.08	12.09	1.77	2.03	8.75	4.54	10.96
Chrysiogenetes	0	0	0.00	0	0	0	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0
Cyanobacteria	2.62	1.68	4.19	1.43	0.61	0.45	0.34	0.08	0.06	0.48	0.85	0.45	0.47	0.09
Elusimicrobia	0.02	0.03	0.10	0.03	0.07	0.05	0.08	0.18	0.07	0.01	0.01	0.10	0.01	0.02
FBP	0	0	0	0	0	0	0.00	0	0	0	0	0	0	0
FCPU426	0.03	0.02	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.04	0.02	0.06	0.07	0.06	0.04	0.02
Fibrobacteres	0.12	0.03	0.35	0.03	0.08	0.02	0.04	0.06	0.08	0.01	0.04	0.05	0.01	0.02
Firmicutes	1.98	1.85	2.57	2.22	3.30	1.41	1.59	1.60	1.63	1.68	1.33	2.91	0.41	1.78
Fusobacteria	0.03	0.01	0.04	0.01	0.02	0.07	0.09	0.00	0	0.10	0.06	0.12	0	0.00
GAL15	0	0.00	0.01	0.00	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0
GN01	0	0	0	0	0	0.02	0.01	0	0	0	0	0.00	0	0
GN02	0.03	0.02	0.04	0.04	0.00	0.03	0.02	0.01	0.07	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00
GN04	0.01	0.01	0.03	0.01	0.62	0.04	0.06	1.21	0.29	0.00	0.00	0.16	0.02	0.04
GOUTA4	0	0	0	0	0	0.00	0.01	0	0	0	0	0	0	0
Gemmatimonadetes	0.79	0.47	1.05	0.50	5.28	0.54	0.57	0.71	0.77	0.79	0.64	0.72	1.58	1.20
H-178	0.01	0.00	0.03	0.00	0	0.03	0.10	0	0	0.01	0.02	0.03	0	0.05
Hyd24-12	0.06	0.05	0.16	0.07	0.09	0.03	0.10	0.00	0.06	0.01	0.01	0.04	0.02	0.05
KSB3	0.01	0.01	0.24	0.01	0.06	0.00	0.02	0.08	0.11	0.00	0.00	0.07	0.01	0.01
LCP-89	0.01	0.00	0.07	0.00	0.08	0.02	0.02	0.45	0.19	0	0.00	0.11	0	0.01
LD1	0.00	0.00	0.01	0.01	0.52	0.01	0.02	0.36	0.09	0.00	0.00	0.11	0	0.02
Lentisphaerae	0.08	0.02	0.30	0.02	0.06	0.05	0.13	0.03	0.07	0.01	0.04	0.08	0.03	0.05
MAT-CR-M4-	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fila	S4	S8	S10	S12	N1.c	N2.a	N2.b	N3.b	N4.c	N5.a	N5.b	N5.c	NZ12.a	NZ30.a
B07														
MVS-104	0	0	0	0	0	0.00	0.01	0	0	0	0	0.01	0	0
NC10	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.04	0.06	0.45	0.00	0.00	0.04	0	0
NKB19	0.02	0.03	0.06	0.03	0.05	0.04	0.11	0.04	0.04	0.07	0.09	0.09	0.08	0.02
Nitrospirae	0.06	0.04	0.16	0.06	0.61	0.26	0.43	2.38	1.62	0.01	0.02	0.57	0.32	0.20
OC31	0	0.00	0	0	0	0.00	0.01	0	0	0	0	0	0	0
OD1	0.11	0.03	0.12	0.03	0.02	0.08	0.07	0.02	0.06	0.04	0.05	0.06	0.00	0.00
OP1	0.01	0.00	0.10	0.00	0.80	0.02	0.03	0.19	0.42	0	0	0.09	0.02	0.26
OP11	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02	0.01	0.02	0.06	0.03	0	0	0.02	0	0
OP3	0.06	0.04	0.55	0.05	0.81	0.19	0.38	1.87	0.75	0.02	0.02	1.03	0.02	0.15
OP8	0.21	0.13	0.28	0.21	7.69	0.40	0.48	2.62	2.31	0.01	0.03	1.75	0.09	1.44
OP9	0.01	0.00	0.08	0.00	0.22	0.02	0.01	0.11	0.04	0.00	0.00	2.33	0.01	0.03
PAUC34f	0.02	0.01	0.04	0.01	0.29	0.01	0.03	0.11	0.06	0.01	0.01	0.06	0.06	0.13
Planctomycetes	2.69	3.75	2.96	3.74	8.52	3.23	2.81	5.56	3.03	4.42	5.46	5.51	2.95	1.56
Poribacteria	0.00	0	0.00	0	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0	0	0.01	0	0.01
Proteobacteria	45.72	46.59	30.50	46.51	12.70	42.50	39.50	15.50	39.80	41.67	38.95	27.83	66.54	62.37
SAR406	0	0	0.00	0	0	0.00	0.01	0	0	0	0	0	0	0
SBR1093	0	0.00	0.00	0.00	0	0	0	0.00	0.31	0	0.00	0.00	0	0
SC4	0	0	0	0	0.04	0.02	0.02	0.15	0.01	0	0.00	0.16	0	0.00
SR1	0.03	0.05	0.04	0.07	0.00	0.05	0.04	0.01	0.00	0.02	0.03	0.04	0	0
Spirochaetes	1.77	0.78	3.81	0.91	7.71	1.22	2.11	1.48	1.06	0.87	0.90	1.95	2.57	2.23
Synergistetes	0	0	0.03	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0
TM6	0.00	0.00	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02	0.08	0.06	0.00	0.00	0.04	0	0
TM7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0	0.00	0.01	0.01	0.00	0	0
Tenericutes	0.30	0.13	2.56	0.13	0.19	0.71	1.03	0.01	0.30	0.34	0.60	0.46	0.01	0.03
Thermotogae	0.00	0	0.02	0	0.03	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Verrucomicrobia	5.41	6.92	3.25	6.54	0.90	6.38	4.58	0.46	0.73	4.46	6.08	1.73	0.85	0.62
WPS-2	0.06	0.04	0.02	0.04	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.00	0.00	0
WS1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.09	0.00	0.02	0.06	0.05	0.00	0.00	0.03	0.02	0.03
WS2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.01	0.02	0.15	0.03	0.00	0.00	0.13	0.00	0.02
WS3	0.41	0.18	0.31	0.23	2.50	0.21	0.29	2.19	0.96	0.52	0.35	0.87	0.89	0.80
WS4	0	0	0	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.01	0.01	0.00
WS5	0.08	0.01	0.03	0.00	0	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0	0.00
WWE1	0.02	0.02	0.03	0.04	0	0.01	0.02	0.01	0.06	0	0.00	0.36	0	0
ZB3	0.02	0.00	0.03	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.00	0
[Caldithrix]	0.06	0.00	1.86	0.00	0.50	0.02	0.05	0.53	0.40	0.00	0.00	0.25	0.01	0.27
[Thermi]	1.72	2.59	1.03	2.44	0.29	1.22	1.32	0.09	0.11	4.34	3.60	0.98	2.80	0.23

0.00: indica que están presentes, pero en muy bajo porcentaje de abundancia; 0: no se encontraron secuencias en la submuestra.

13.4. ANEXO D. Distribución de las diferentes secciones de los núcleos

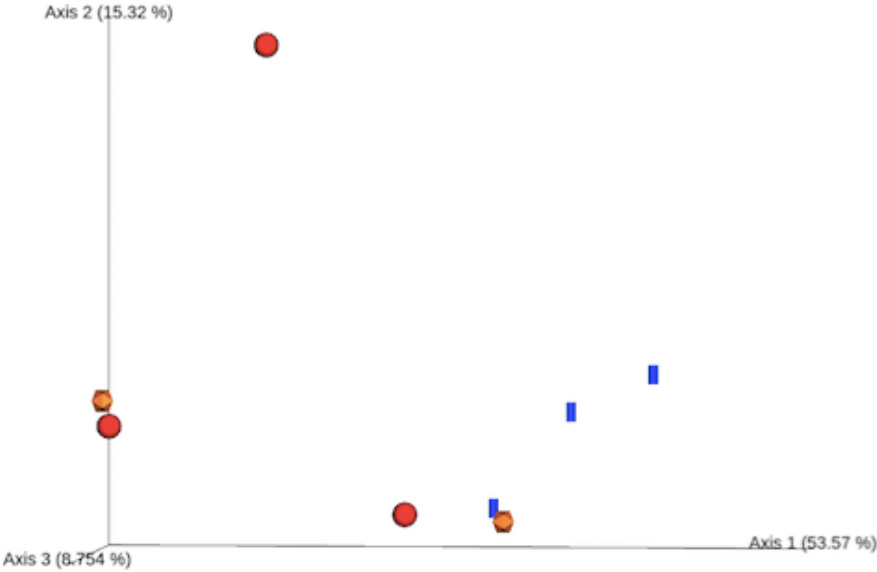


Figura D1. PCA-Unifrac ponderado que muestra la distribución de las diferentes secciones de los núcleos N1, N4 y N5: superficiales (rojos), medios (naranjas) y profundos (azules). El análisis de PCA-Unifrac distribuye las muestras de acuerdo a la distancia filogenética de los OTUs asignados y su abundancia relativa.

13.5. ANEXO E. Metabolismos inferidos a partir de la diversidad microbiana mediante las secuencias 16S ARNr

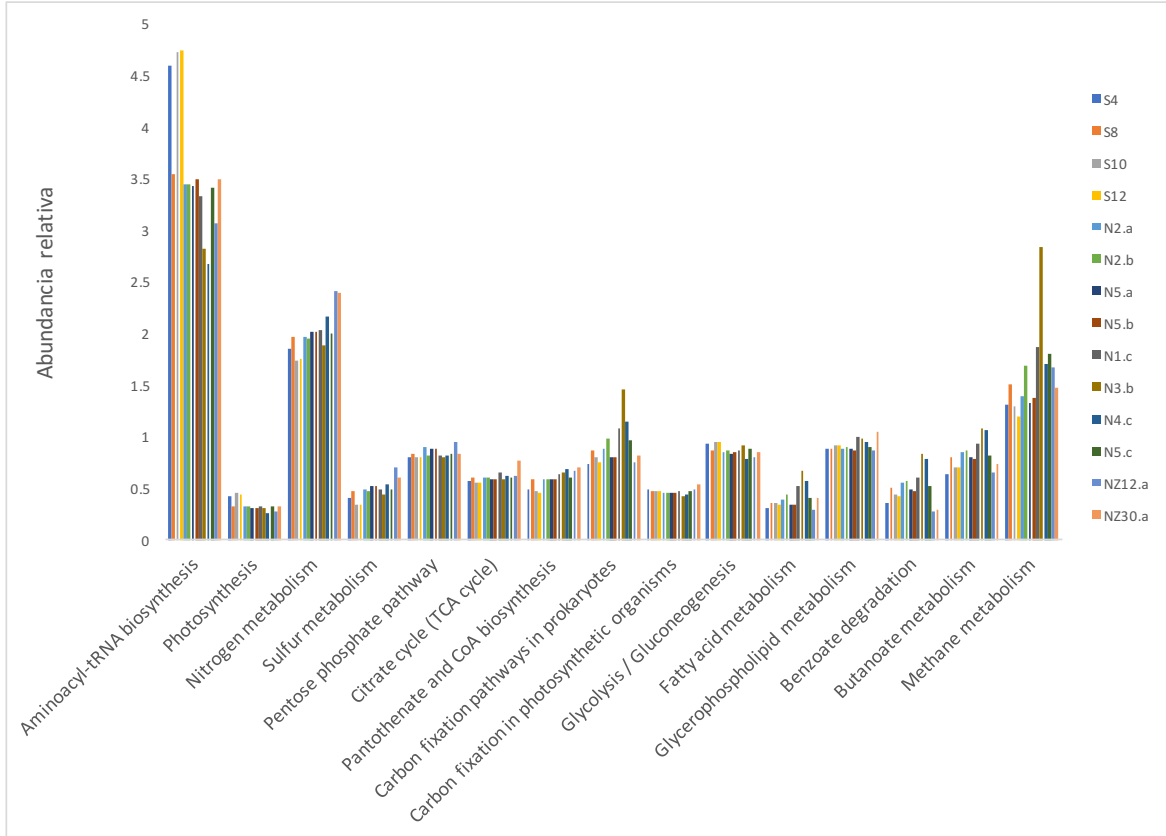


Figura E1. Metabolismos potenciales en los sedimentos del lago Alchichica inferidos mediante la diversidad 16S ARNr empleando el programa Tax4fun.

13.6. ANEXO F. Porcentaje de abundancia relativa de bacterias sulfato reductoras y aneas metanogénicas en los sedimentos del lago cráter de Alchichica.

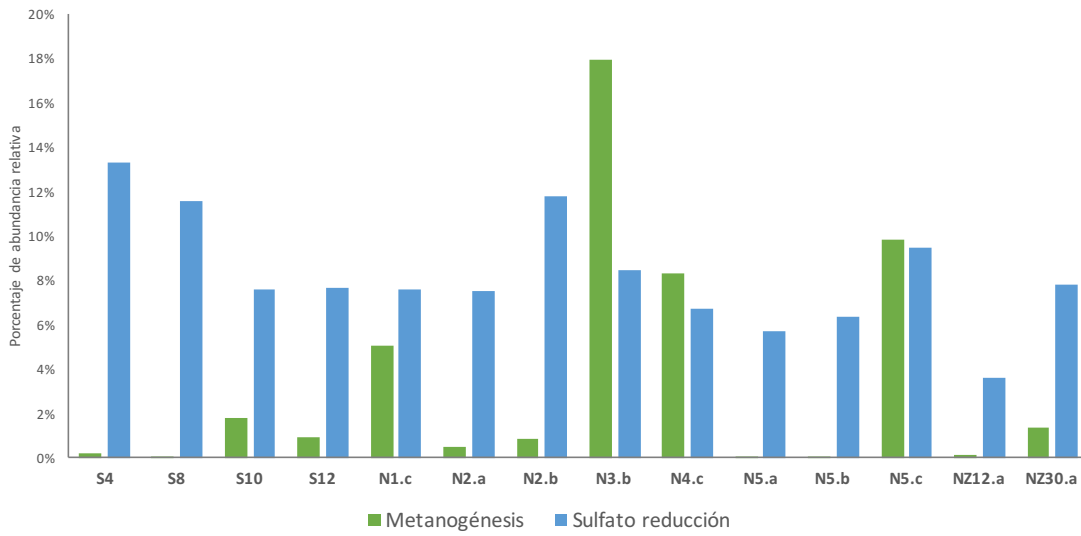


Figura F1. Gráfica del porcentaje de abundancia relativa de bacterias sulfato reductoras y aneas metanogénicas.