



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación experimental del control descendente "Top-Down" en el circuito microbiano del lago volcánico Atexcac.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Omar Moreno Mondragón

DIRECTOR DE TESIS :

Dr. Justo Salvador Hernández Avilés



CD.MX.,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

A la Universidad Nacional Autónoma de México, con la cual estaré eternamente agradecido por brindarme todo lo necesario para mi formación académica y cultural desde el bachillerato hasta la actualidad.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por ser mi casa de formación profesional en esta Carrera, Biología.

Al Proyecto de Investigación en Limnología Tropical de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por brindarme las instalaciones para poder realizar el trabajo de microscopía de epifluorescencia.

Al Dr. Miroslav Macek por su asesoría y la ayuda que me proporcionó durante mi trabajo en la FES Iztacala.

Por los recursos financieros otorgados a través del Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PE216016) para la realización del trabajo de campo y presentación de resultados obtenidos en eventos académicos.

Al jurado de mi tesis Dr. José Luis Gómez Márquez, Dr. Justo Salvador Hernández Avilés, Biól. Angélica E. González Shaff, Biól. José Luis Guzmán Santiago y Dr. Jorge A. Valdivia Anistro por los comentarios, revisiones y el tiempo que dedicaron a este escrito para mejorar el presente trabajo.

A mi familia

A mis padres, simplemente no tengo palabras para decirles lo mucho que les agradezco todo lo que me han dado, por haberme escuchado y no dejarme solo en mi momento más difícil, nunca se los terminaré de expresar.

A mi madre por toda esa preocupación que siempre me has tenido, porque no hubo momento en que no quisieras ver por mí y por mi bienestar como solo una madre puede hacerlo. Simplemente no puedo pensar en palabras para decirte lo mucho que te amo.

A mi padre, gracias por todo lo que me has enseñado, que en su momento no quise escuchar y hoy digo “cuánta razón tenía mi padre” como tú siempre lo decías. Se que no soy el mejor hijo, que nuestra relación no es la mejor de todas o que a veces no nos entendemos, pero quiero decirte que a pesar de todo te amo.

A mis hermanas, sé que no pasamos mucho tiempo juntos o platicando, pero sé que cuento con ustedes y no las cambiaría a ninguna de ustedes. Mónica, Beatriz y Verónica las amo a las tres.

Agradecimientos personales

Para empezar, primero quiero agradecer a 4 personas que me han demostrado un total y completo apoyo incondicional y a quienes siempre tendré presentes, no solo como amigos sino como hermanos:

A Chucho, gracias por esta gran amistad que me has brindado durante estos años y por la gran enseñanza que me diste hace ya varios años y que siempre tendré presente.

A Iván, porque a veces lo que más necesita uno nos son palabras, sino alguien que esté presente para recordarnos que no estamos solos. Dato curioso, fuiste el único con quien estuve los 4 años de la carrera.

A Ulises, con quien no había platicado mucho hasta hace pocos años, pero en cuanto estuve en una situación difícil no dudaste en brindarme tu ayuda, por eso y por tu amistad, gracias.

A Jovas, a pesar de que fuiste el último en integrarte al grupo, y que en un inicio hacías que dudara de ti, me has demostrado ser una de las pocas personas en quien puedo confiar plenamente.

A Yazmín, para mi amiga de toda la carrera, con quien he compartido los consejos y todas esas pláticas ocasionales y a veces muy seguido que hemos tenido. Gracias por toda la ayuda que me has brindado en estos años.

Al Doc Salvador quien no solo ha sido mi maestro sino un amigo con quien hemos compartido momentos de diversión. A pesar de que nos regañaba de más...

A mi gran amigo de la prepa, quien siempre me ha ayudado y con quien he compartido momentos y vivencias increíbles. Gracias Yabin.

Gracias Paco, por la constante motivación durante este último año.

A Liz, por ser una gran amiga, por tu apoyo y lo poco o mucho que hemos convivido.

Por todas esas pláticas ociosas, por haberme aguantado un buen rato y escucharme, por animarme cuando era necesario o simplemente hacerme reír Jovana, gracias.

Al grupo de trabajo de limnoecología con quienes he pasado buenos momentos Jebus, Iván, Jair, Angie, Alexei, Fernanda, Itza, Ana, Vicky, Ramiro, Irving, Moy y David.

Algunos buenos amigos que he conocido en la carrera: Poncho, Liz, Nadia, David, Marco, Fernando, Uriel, Monse, Mony, Paco y Eyra.

Y finalmente a quien me ayudó como no tiene idea durante estos últimos meses, quien sin darse cuenta me motivó a seguir adelante y me volvió a dar esperanza, muchas gracias Marilyn.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
<i>Zooplancton</i>	9
<i>Nanoflagelados Heterotróficos</i>	9
<i>Picoplancton</i>	11
<i>Picoplancton Autotrófico</i>	11
<i>Picoplancton Heterotrófico</i>	12
<i>Circuito microbiano</i>	12
<i>Control Descendente “Top-Down”</i>	17
Antecedentes	18
<i>Estrategias del picoplancton</i>	19
<i>Formación de filamentos</i>	19
<i>Agregados o colonias</i>	20
<i>Motilidad bacteriana</i>	21
<i>Producción de toxinas</i>	21
<i>CARD-FISH</i>	21
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO	25
Objetivos particulares	25
ZONA DE ESTUDIO	26
MATERIAL Y MÉTODO	28
<i>Campo</i>	28
Montaje del experimento	28
<i>Laboratorio</i>	31
<i>CARD-FISH</i>	32
<i>Trabajo de gabinete</i>	35
RESULTADOS.....	35
Picoplancton Heterotrófico	37
<i>Comparación por tiempos</i>	37
<i>Comparación de T_0 a T_f</i>	39
<i>Carbón orgánico por célula</i>	40

Picoplancton Autotrófico	43
<i>PPA individual</i>	45
<i>Colonias de PPA</i>	48
<i>Número de células que conforman la colonia</i>	50
Nanoflagelados heterotróficos	52
<i>Comparación por tiempos</i>	53
<i>Comparación de T_0 a T_f</i>	54
CARD-FISH	56
Dominio <i>Archea</i> (ARCH 915).....	58
Dominio <i>Bacteria</i> (EUB I-III).....	59
Clase <i>Betaproteobacteria</i> (BET 42a+C).....	62
<i>Comparación por tiempos</i>	62
Clase <i>Gammaproteobacteria</i> (GAM 42a+C).....	65
Clase <i>Alphaproteobacteria</i> (ALF 968).....	66
Clado <i>LD12</i> (LD12 121).....	68
Género <i>Paracoccus</i> (PAR 1457).....	69
Phyllum <i>Bacteroidetes</i> (CF3 19a).....	70
Phyllum <i>Planctomycetes</i> (PLA 886).....	71
<i>Sulfatoreductoras</i> (SRB 385).....	72
Phyllum <i>Actinobacteria</i> (HGC 69a).....	74
Phyllum <i>Thaumarchaeota</i> (CREN 335).....	77
DISCUSIÓN	77
<i>PPH</i>	77
<i>PPA</i>	81
<i>PPA individual</i>	81
<i>Colonias de PPA</i>	83
<i>Número de células que conforman la colonia</i>	85
CARD-FISH	86
Dominio <i>Archaea</i> (ARCH 915).....	86
Dominio <i>Bacteria</i> (EUB I-III).....	86
Clase <i>Betaproteobacteria</i> (BET 42a+C).....	87
Clase <i>Gammaproteobacteria</i> (GAM 42a+C).....	88
Clase <i>Alphaproteobacteria</i> (ALF 968).....	89

Clado <i>LD12</i> (LD12 121)	90
Phyllum <i>Bacteriodetes</i> (CF3 19a)	91
Phyllum <i>Planctomicetes</i> (PLA886)	92
Sulfatoreductoras (SRB 385)	93
Phyllum <i>Actinobacteria</i> (HGC 69a)	94
CONCLUSIONES.....	96
RECOMENDACIONES.	97
REFERENCIAS	98

INTRODUCCIÓN

Hasta hace algunos años, el fitoplancton era considerado como la única base de la red trófica en los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, en años recientes se ha encontrado que la comunidad bacteriana es un componente importante del circuito microbiano “microbial loop”, a través del cual, se transfieren cantidades significativas de carbono hasta los niveles tróficos superiores, particularmente en latitudes tropicales (Sarmiento, 2012).

Zooplancton

Dentro el macrozooplancton, oceánico o de aguas interiores, exceptuando a los copépodos, los apendicularios (Gorsky *et al.*, 1999), los cladóceros (Sanders *et al.*, 1989; Lipej *et al.*, 1997), rotíferos (Sanders *et al.*, 1989) y algunas larvas de bivalvos (Tomaru *et al.*, 2000) son conocidos por alimentarse del picoplancton.

Indirectamente, se asume la depredación sobre los HNF a partir del comportamiento inversamente proporcional de su población con ciertos grupos de macrozooplancton (Güde, 1988). Mientras de forma directa, experimentos con comunidades de macrozooplancton han demostrado altas mortalidades tanto en grupos de flagelados heterotróficos como de autotróficos (Carrick *et al.*, 1991).

Nanoflagelados Heterotróficos

Los nanoflagelados heterotróficos son considerados como los principales consumidores de bacterias dentro del plancton en una larga variedad de sistemas marinos y cuerpos acuáticos intercontinentales (Sanders *et al.*, 1992). Estos protistas pertenecen a distintos grupos taxonómicos, pero pueden ser englobados

dentro de un grupo funcional caracterizado por sus tallas pequeñas (2.0 – 20.0 μm) y su habilidad de crecer con concentraciones naturales de bacterias planctónicas (Gasol *et al.*, 1995; Jürgens *et al.*, 1996).

Los factores que probablemente regulan la abundancia de los nanoflagelados heterotróficos (HNF, por sus siglas en inglés heterotrophic nanoflagellates) en mayor medida son: a) fuentes de recursos (principalmente picoplancton), b) depredación por otros fagótrofos y c) la temperatura (Jürgens *et al.*, 1996); así mismo, existe una correlación entre las bacterias y la densidad poblacional de estos protozoarios a través de una amplia gama de sistemas marinos e intercontinentales en diferentes estados tróficos (Sanders *et al.*, 1992) y a pesar de esto, se han encontrado que en cuerpos con estados tróficos similares la variación en la abundancia de HNF es bastante amplia (Jürgens, 1992) la cual ha sido asumida como resultado de un grado variable en el control “top-down” (Jürgens *et al.*, 1996).

Los protistas heterotróficos son considerados importantes no solo por el rol que juegan regulando la abundancia y producción de las bacterias, sino también porque se ha visto que su actividad de pastoreo es un factor clave para controlar el reciclaje de los paquetes de nutrientes acumulados por las bacterias (Caron & Goldman, 1990; Jürgens *et al.*, 1996).

Al ser los depredadores más eficientes del bacterioplancton y del fitoplancton ≤ 2.0 μm (picoplancton) y, al mismo tiempo, la mayor fuente potencial de recursos para ciliados y crustáceos (Sanders & Wickham, 1993), los nanoflagelados heterotróficos

son una piedra fundamental para el flujo trófico dentro del circuito microbiano (Sherr & Sherr, 1988).

Picoplancton

El picoplancton (0.2 - 2.0 μm) incluye organismos procariontes (picocianobacterias y bacterias heterotróficas) además de eucariontes autótrofos y heterótrofos; se distribuye mundialmente y puede encontrarse de forma ubicua en todo tipo de lagos (Stockner, 1991). El criterio para distinguir entre fotótrofos y los de alimentación heterotrófica es la presencia de pigmentos fotosintéticos y su capacidad de mostrar autofluorescencia (Callieri & Stockner, 2002).

Picoplancton Autotrófico

El picoplancton autotrófico (PPA) se encuentra distribuido en una gran variedad de sistemas de agua dulce, incluidos lagos ultraoligotróficos (Boraas *et al.*, 1991), a grandes altitudes (Hawley & Whitton, 1991; Ruggiu *et al.*, 1998), lagos polares y subpolares (Vincent, 2000) y en lagos eutróficos poco profundos y estanques (Vörös *et al.*, 1998). Las picocianobacterias individuales son muy abundantes en lagos oligotróficos a mesotróficos, mientras que las formas coloniales ocurren con mayor frecuencia en lagos mesotróficos a eutróficos o estanques (Stockner *et al.*, 2000).

Se ha documentado en la literatura la gran importancia que juegan las algas de tallas correspondientes al picoplancton en la productividad primaria global de sistemas acuáticos (Stockner & Antia, 1986; Stockner, 1988). En lagos oligotróficos cerca del 50% al 70% de la fijación anual de carbono se le atribuye a organismos que son capaces de pasar a través de filtraciones con poro de 1.0 – 2.0 μm (Caron

et al., 1985; Munavar & Fahnenstiel, 1982). En lagos oligotróficos dimícticos cuando los depredadores y la concentración de nutrientes limitantes impiden la competencia con otros organismos fitoplanctónicos, el picoplancton es capaz de tener una remarcable producción primaria y subsecuente reciclaje de materia orgánica disuelta (MOD) (Porter , 1988).

Picoplancton Heterotrófico

Desde hace varios años las bacterias heterotróficas, o picoplancton heterotrófico (HPP, por sus siglas en inglés heterotrophic picoplankton) han sido estudiadas y cuantificadas en la columna de agua (e.g., Zobell, 1946) demostrando ser importantes en los medios acuáticos, no solo por su papel como descomponedores, sino por ser una vía a través de la cual los sustratos disueltos en el medio y los nutrientes inorgánicos pasan a niveles tróficos superiores por efecto de depredación de protozoarios y macrozooplancton (Azam *et al.*, 1983; Jürgens & Jeppesen, 2000; Jezbera *et al.*, 2005). Además de ser el mayor contribuyente de biomasa en los sistemas planctónicos (Cole *et al.*, 1988).

Circuito microbiano

Mientras que la existencia de pequeños fotoautótrofos, bacterias y protistas heterotróficos en la columna de agua había sido reconocida por largo tiempo, la mayoría de los biólogos oceanógrafos creían que lo verdaderamente importante en el flujo de carbono a lo largo de la columna de agua era únicamente la producción procedente de la fracción grande del fitoplancton, especialmente diatomeas y dinoflagelados, las cuales sirven de alimento al zooplancton, principalmente

copépodos, que a su vez son consumidos por los peces más pequeños (Fenchel, 2008).

No fue hasta que Azam *et al.* (1983) acuñó el término de circuito microbiano “microbial loop”, quien concluyó que una parte sustancial de la productividad primaria se perdía en el ambiente en forma de MOD, suceso también reportado por Fogg (1983), además de que ésta MOD era utilizada por las bacterias que a su vez eran consumidas por los protozoarios y finalmente éstos últimos podían entrar a la cadena clásica conformada por organismos de tallas mayores.

La red trófica microbiana en la columna de agua de lagos, ríos y océanos está compuesta por virus, procariontes quimiorganotróficos y cianobacterias, así como también por eucariontes unicelulares autotróficos y heterotróficos. La mayor parte del carbono producido y consumido en esta red microbiana es también acoplada a la red de pastoreo clásica (algas-zooplancton-peces) (Pernthaler, 2005).

Los nanoflagelados heterotróficos y en menor medida pequeños ciliados, crean un puente entre la MOD consumida por microorganismos del picoplancton, los cuales poseen tallas que van desde los 0.2 μm hasta 2.0 μm (Sieburth *et al.*, 1978), y aquellos organismos del plancton que solo se pueden alimentar de células con dimensiones mayores a 3.0 μm , tal es el caso de los crustáceos zooplanctónicos, rotíferos, ciliados grandes y dinoflagelados heterótrofos y mixótrofos (Jürgens *et al.*, 1996).

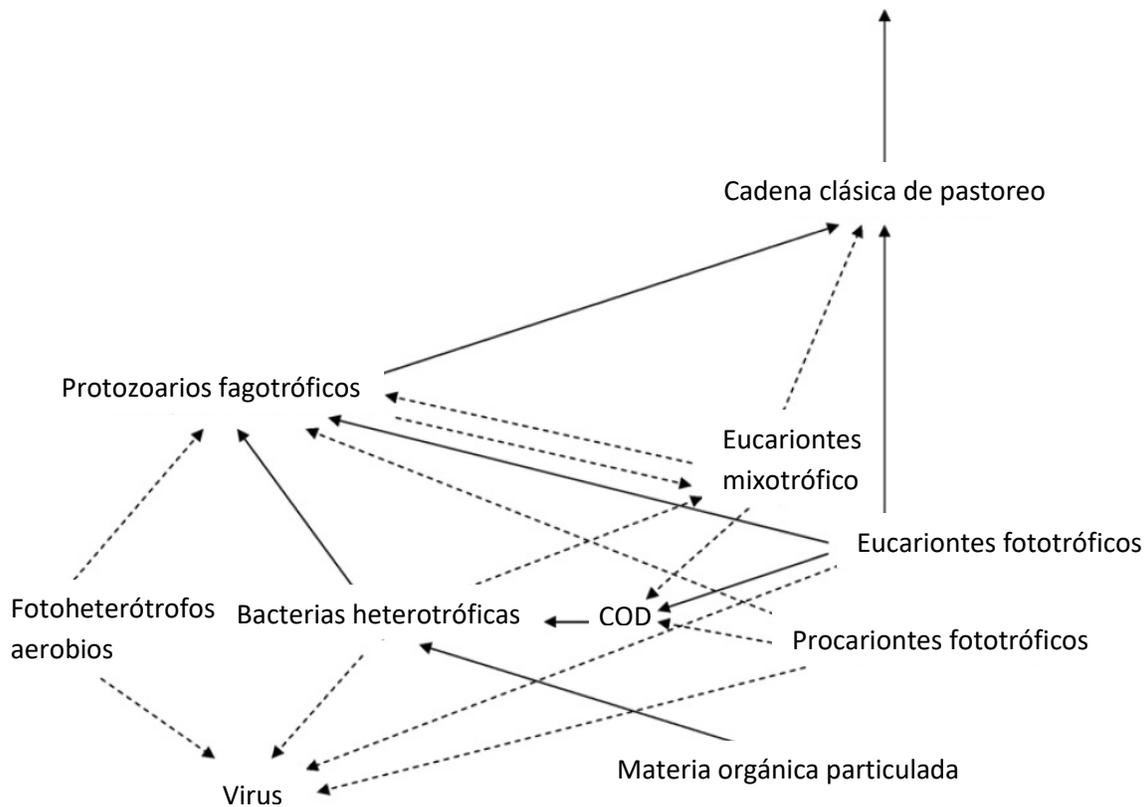


Figura 1: El circuito microbiano "microbial loop" descrito en Azam *et al.* (1983) (líneas sólidas) con modificaciones en Fenchel (2008) (líneas punteadas). DOC hace referencia a la materia orgánica disuelta, por sus siglas en inglés dissolved organic matter (Tomado de Fenchel 2008).

El circuito microbiano tiene especial relevancia en cuerpos de agua oligotróficos, dado que la competencia por nutrientes limitantes favorece a organismos de tallas pequeñas, como las picocianobacterias que son las responsables de la producción primaria como principales regeneradores de nutrientes en la columna de agua (Chisholm, 1992; Kjørboe, 1993). Mientras, que la red de pastoreo del plancton se manifiesta principalmente bajo circunstancias en donde hay un suministro elevado de nutrientes, como por ejemplo durante los florecimientos algales "blooms" de primavera en aguas templadas y zonas de afloramientos oceánicos relacionados con las surgencias.

Además de los primeros organismos que fueron incluidos dentro del circuito microbiano en un inicio (fitoplancton, bacterias heterotróficas y protistas fagotróficos), los procariontes unicelulares fotosintéticos, como lo es *Synechococcus*, juegan su papel como productores primarios y junto con la proclorofita *Prochlorophyton* dominan la fotosíntesis en las aguas oceánicas (Chisholm *et al.*, 1988, 1992; Cambell & Vaultot, 1993). La actividad del picoplancton autotrófico y heterotrófico constituye un importante recurso de energía dentro del circuito microbiano (Pomeroy, 1974; Azam *et al.*, 1983) y provee una vía a través de la cual el carbón orgánico disuelto (COD) y los nutrientes llegan hasta las redes tróficas convencionales por medio de las interacciones depredador-presa de protozoarios y el picoplancton.

Otro importante grupo funcional que fue adicionado al circuito microbiano está constituido por los virus. Éstos se encuentran en densidades cercanas a 10^9 m L⁻¹ en el océano y su tasa de renovación puede ser estimar a partir de su tasa de supervivencia en ausencia de una célula huésped (Proctor & Fuhrman, 1974; Bratbak *et al.*, 1992; Thingstad *et al.*, 1993). La mortalidad provocada a partir de los ataques virales es muy similar en magnitud al pastoreo de los protozoarios; pero a comparación de estos últimos, el hecho de que los virus sean altamente específicos en cuanto a sus hospederos provoca un efecto diferente. En lugar de afectar a la población total de bacterias, los virus desencadenan cambios sucesivos dentro del bacterioplancton y quizás mantienen una mayor diversidad de especies bacterianas en el plancton a comparación de si no hubiera virus. Esto se debe a que los tipos de bacterias más numerosas en los cuerpos de agua son, comunmente, susceptibles a los ataques virales (Fenchel, 2008).

Los protistas mixotróficos conforman otro complejo el cual fue adicionado posteriormente al circuito microbiano. Estos poseen tanto la capacidad de fagocitar a otros organismos así como la de ser fototróficos, una cualidad que les ha permitido distribuirse ampliamente a lo largo y ancho del mundo.

Existen diferentes tipos de mixótrofos, algunos protozoarios, en particular ciliados, se alimentan de algas y retienen sus cloroplastos durante varios días, siendo capaces de usarlos para realizar fotosíntesis, fenómeno llamado retención de cloroplastos (Stoecker *et al.*, 1989; Jones, 1994). Otras especies poseen cloroplastos y son capaces de fagocitar al mismo tiempo, esto es común entre los dinoflagelados y algunos flagelados; mientras que en algunos otros no se tiene claro si poseen cloroplastos o si se trata de células en simbiosis, hecho presente en dinoflagelados (Havskum & Hansen, 1997).

Una forma básica de clasificar al plancton es en i) bacterioplancton (constituido principalmente por procariontes heterotróficos), ii) fitoplancton (incluidas las cianobacterias y los eucariontes) y iii) zooplancton (formado por eucariontes unicelulares y organismos pluricelulares); y coincidiendo con esta subdivisión está el criterio de agruparlos por tamaño (Callieri & Stockner, 2002). Quizás el sistema más simple fue el que propuso Dussart (1965) quien dividió al plancton en una escala logarítmica: i) macroplancton (200.0 - 2000.0 μm), ii) microplancton (20.0 - 200.0 μm) y nanoplancton (2.0 - 20.0 μm). Posteriormente Sieburth *et al.* (1978) incluyó en esta clasificación los términos de picoplancton (0.2 - 2.0 μm) y femtoplancton (0.02 - 0.2 μm).

Control Descendente “Top-Down”

Algunos de los factores que determinan el tamaño de la población en los ecosistemas es el balance entre la natalidad y la tasa de mortalidad (Campbell & Reece, 2007), y los microorganismos no son la excepción a este hecho ecológico. Dentro de los ecosistemas acuáticos la depredación es la fuerza que tiene mayor influencia sobre la organización, tamaño de la estructura y la composición específica a diferentes niveles de la red trófica (Brooks & Dodson, 1965; Hairston & Hairston, 1993).

Algunas investigaciones han demostrado que los cambios en la abundancia de los depredadores tienen grandes consecuencias en la estructura, función y resiliencia del ecosistema, ya que al eliminar grupos de organismos también se anula el nicho ecológico que desempeñaba dicha presa (Paine, 1969; Duffy 2002) mientras que estudios en nanoflagelados heterotróficos sugieren que los protistas pueden influir en el tamaño y estructura de las comunidades bacterianas a través de una eliminación selectiva de las células con mayor tamaño (Chrzanowski & Šimek, 1990; González, *et al.*, 1990). Conforme las dimensiones de la célula bacteriana incrementan durante el ciclo celular, se espera que la intensidad de pastoreo de los depredadores selectivos sea mayor antes o durante la división celular (Sherr *et al.*, 1992) por lo que se supone que si la presión de pastoreo sobre el bacterioplancton se incrementa, entonces la tasa de crecimiento celular tenderá a disminuir, mientras que aquellas células con la mayor actividad de crecimiento celular serán las que sufran los rangos de mortalidad más grandes (Pernthaler *et al.*, 1996).

El control descendente “Top-Down” (que en el documento se mencionará en inglés, por su conceptualización internacional) del procarioplancton acoplado a los hábitats pobres en nutrientes, implica que el crecimiento de los depredadores también está limitado por la baja disponibilidad de la presa (recursos), esto es, el control ascendente “Bottom-Up”. En contraste los sistemas ricos en nutrientes (eutróficos) pueden sostener a una comunidad diversa de grandes depredadores (protistas grandes, zooplancton y larvas de peces) que controlan la abundancia de nanoflagelados heterotróficos, liberando de este modo a la comunidad procarionte del control por depredación (Pernthaler, 2005). Pero en los sistemas de agua dulce el patrón se ve sustancialmente modificado por otros parámetros, como lo son la entrada de materia orgánica a través de ríos o por arrastre de la cuenca (Šimek *et al.*, 2001) y el efecto cascada desde los niveles superiores en la red trófica, esto es, el tipo de alimentación que predomina en las especies de zooplancton (Jürgens & Jeppesen, 2000) puesto que las bacterias y arqueas pueden crecer en condiciones oligotróficas y copiotróficas (Schut *et al.*, 1997).

Antecedentes

Desde su descubrimiento, el circuito microbiano (Azam *et al.*, 1983) ha comenzado a ganar relevancia para tener un mejor entendimiento de las redes tróficas en los medios acuáticos. Adquiriendo importancia los estudios en donde se evalúa la interacción que existe entre sus distintos componentes (nanoflagelados, ciliados, bacterias heterotróficas y picoplancton autotrófico), pero haciendo énfasis en los procesos de depredación (“Top-down”), de entre los que destacan autores como Šimek, Jürgens, Posch, Stockner, Salcher, Amann, Fuchs, Callieri, Glöckner,

González, Sherr, Jezbera, Pernthaler, Sarmiento, Gasol, entre otros que han aportado un vasto conocimiento de estos organismos, cuyas referencias se citan a lo largo de los diferentes apartados de la tesis.

Estrategias del picoplancton.

Varias características fenotípicas de las bacterias acuáticas se han interpretado como adaptaciones para escapar de la presión de pastoreo. Algunas de estas características, como la secreción de exopolímeros y la formación de filamentos, podrían ser la consecuencia de condiciones fisiológicas que no están relacionadas necesariamente con la depredación, sino la tasa de crecimiento (Hahn *et al.*, 1999), no obstante, experimentos en laboratorio han demostrado la aparición de estas estrategias bajo el estímulo específico de los depredadores sobre la comunidad bacteriana (Wu, 2004). Mientras que otras, como la movilidad (Matz & Jürgens, 2005), la reducción celular (Boenigk *et al.*, 2004) y la producción de toxinas (Matz *et al.*, 2004) parece haber evolucionado específicamente en respuesta a la mortalidad por pastoreo (Pernthaler & Amann, 2005).

Formación de filamentos.

Se considera que la formación de filamentos es un medio eficiente de protección contra la depredación de protistas. Ya sea porque las bacterias filamentosas exceden el rango de tamaño que la mayoría de los protozoarios bacterívoros pueden consumir o que los filamentos son mucho menos depredados que las bacterias más pequeñas (Shikano *et al.*, 1990; Hahn & Höfle, 1998; Wu *et al.*, 2004).

Agregados o colonias.

Las bacterias heterotróficas producen una amplia gama de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés “extracellular polymeric substances”) que comprenden polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras macromoléculas biológicas (Flemming & Wingender, 2001). En experimentos de laboratorio la secreción de EPS mejoró significativamente la supervivencia bacteriana en la exposición al intenso pastoreo de HNF (Matz *et al.*, 2004). Comúnmente, las bacterias que producen EPS desarrollan subpoblaciones de células y microcolonias que están incrustadas en una matriz de EPS (Hahn *et al.*, 2004).

El cambio al tipo de célula colonial puede ser una consecuencia pasiva de la alimentación selectiva en células individuales (Hahn *et al.*, 2004), pero la formación de microcolonias también puede inducirse específicamente en presencia de depredadores mediante la comunicación célula-célula (Matz *et al.*, 2004)

La protección contra el pastoreo de protistas podría además estar mediada por las propiedades de la pared celular bacteriana. Las bacterias gram-positivas son mucho menor depredadas que las Gram-negativas (Iriberry *et al.*, 1994). A partir del análisis de vacuolas alimenticias en protistas se deduce que las bacterias del Phylum *Actinobacteria*, las cuales son gram-positivas, son evitadas por estos (Jezbera *et al.*, 2005).

Motilidad bacteriana.

La motilidad bacteriana parece tener dos enfoques opuestos. Por un lado, la probabilidad de contactos aleatorios entre depredadores y presas aumenta con el movimiento de esta última y las bacterias móviles pueden, por lo tanto, ser consumidas con mayor frecuencia por los nanoflagelados heterotróficos (González *et al.*, 1993). Por otro lado, la eficacia de captura de las bacterias que son capaces de nadar rápidamente, por parte de los flagelados, se reduce en comparación con los nadadores menos rápidos (Matz & Jürgens, 2005).

Producción de toxinas.

Algunas bacterias pueden incluso envenenar a sus depredadores de manera concertada: *Chromobacterium violaceum* indujo específicamente la respuesta apoptótica en flagelados después de ser ingerido (Matz, 2004). Esta misma secreción de toxinas se ha referido sobre biofilms maduros de *Pseudomonas aeruginosa* (Matz *et al.*, 2004).

CARD-FISH

Para una mayor comprensión de las redes tróficas en el plancton se incrementó el interés por conocer a los organismos involucrados, su diversidad y propiedades funcionales. Por un lado, los eucariontes más pequeños son organismos identificables por microscopia y relativamente fácil de cultivar en laboratorios, en cambio los procariontes presentan más complicaciones en ambos casos (Fenchel, 2008).

Mientras que los procariontes autotróficos (cianobacterias) han probado ser relativamente fáciles de aislar en cultivos, la mayoría de las bacterias heterotróficas mostraron una gran resistencia a los intentos por cultivarlas y solo con una minoría de especies marinas se ha logrado conseguir colonias por el método clásico para obtener cepas aisladas en agar. Existen varias razones por las cuales solo algunas bacterias marinas logran formar colonias; una de ellas es que estos organismos unicelulares son oligótrofos obligados por lo que no pueden prosperar al colocarlos en un medio rico en nutrientes (Pointdexter, 1981). También es posible que al usar estos medios de cultivos con altas cantidades de nutrientes se induzca un rápido crecimiento de la población bacteriana, lo cual activa la lisis celular provocada por virus y la formación de colonias se vea interrumpida (Hagström *et al.*, 2001). Por lo que el desarrollo de nuevas técnicas moleculares que permitieran dilucidar sobre la diversidad de estos microorganismos tomó especial importancia.

He aquí cuando entró en escena la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) que desde su aparición se ha convertido en una de las técnicas moleculares más utilizadas y de rutina en la ecología microbiana; esta técnica puede ser usada para detectar, identificar y enumerar microorganismos sin la necesidad de un cultivo, e inclusive puede ser utilizada para dilucidar la ecología microbiana de algunos hábitats, entre los que se encuentran el suelo, sedimentos, ambientes acuáticos e inclusive la superficie de algas marinas (Amann *et al.*, 1995; Amann *et al.*, 2001; Tujula *et al.*, 2006; Okabe *et al.*, 2010). Sin embargo, el principal problema en la aplicación de esta técnica es su insuficiente sensibilidad por el bajo número de objetivos

moleculares en la célula, la baja permeabilidad de la sonda en las células y la pobre eficiencia de hibridación (Amann *et al.*, 1995).

El protocolo de CARD- (Catalyzed reporter deposition)- FISH propuesto por Pernthaler *et al.* (2002) permitió la detección de pequeñas bacterias marinas con un bajo contenido ribosómico, ya no siendo un impedimento para detectarlas con sondas monocromáticas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué papel desempeña el control top-down en la composición y abundancia de la comunidad bacteriana como parte del circuito microbiano del lago volcánico maar Atexcac?

JUSTIFICACIÓN

Se ha planteado que los lagos volcánicos maar de la cuenca oriental presentan limitación de recursos alimenticios temporal y espacialmente, como se ha descrito para los rotíferos en el lago Alchichica (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011).

De manera similar, el lago volcánico tipo maar Atexcac es un sistema clasificado como oligo-mesotrófico (Cárcamo, 2017), donde la comunidad presente de copépodos, *Leptodiptomus cf. sicilis* (Barrera-Moreno *et al.*, 2015), se podría encontrar aparentemente en condiciones donde los recursos alimenticios sean limitados, principalmente el fitoplancton; siendo el aporte de carbono a través del circuito microbiano una fuente alimentaria complementaria para este grupo de

organismos debido a que en los lagos tropicales se ha observado que éste aporta cantidades significativas de carbono a niveles tróficos superiores (Sarmiento, 2012) siendo que representa una vía alternativa importante en la transferencia del mismo. De aquí, deriva la importancia de estudiar el control top-down, es decir las relaciones depredador-presa entre los diferentes componentes del circuito microbiano en estos sistemas lacustres, como un mecanismo relevante para explicar el funcionamiento de las redes tróficas en este tipo de ambientes.

HIPÓTESIS

1. Al incrementar la concentración de copépodos, en la muestra, éstos se comerán a los organismos del microzooplancton y como consecuencia los nanoflagelados heterotróficos, al ya no tener depredadores, aumentarán y provocarán decrementos sobre la población de bacterias heterotróficas.
2. Tras eliminar a los copépodos (macrozooplancton), la población del microzooplancton, al no tener depredadores, consumirán en mayor medida a los nanoflagelados heterotróficos. Por lo que el bacterioplancton, al no ser depredado, experimentará aumentos en sus abundancias.
3. Al eliminar tanto a los copépodos y al microzooplancton, los nanoflagelados heterotróficos incrementarán su densidad poblacional los cuales provocarán disminuciones en sus presas, las bacterias heterotróficas.
4. El aumento de la población de nanoflagelados promoverá que los distintos grupos bacterianos recurran a diferentes estrategias para evitar su

depredación (formación de colonias, cambio en su morfología o reducción de tamaños).

5. Se espera que cada depredador tenga una preferencia diferencial hacia los distintos grupos bacterianos, consumiendo específicamente algunos y evitando otros.

OBJETIVO

Evaluar experimentalmente el efecto del control descendente “Top-down” de distintos depredadores (macrozooplancton, microzooplancton y nanoflagelados) sobre la abundancia, composición por grupos y morfológica del picoplancton procarionte.

Objetivos particulares

- Contabilizar la abundancia de nanoflagelados y bacterias autotróficas y heterotróficas por microscopia de fluorescencia.
- Determinar por microscopia, si las bacterias heterotróficas cambian su morfología tras finalizar el experimento.
- Calcular el contenido de carbono por célula para el picoplancton heterotrófico.
- Evaluar la composición de grupos procariontes en los experimentos con técnica molecular CARD-FISH.

ZONA DE ESTUDIO

La Cuenca Oriental se encuentra en la parte oriente del Eje Neovolcánico, es una cuenca endorreica ubicada entre las coordenadas 97° 09' y 98° 03' O y entre los 18° 48' y 19° 43' N (Arredondo, 2002) entre el Eje Neovolcánico y el sureste de la Sierra Madre Oriental, con una elevación mayor a 2 300 m.s.n.m. (CONABIO, 2015). Posee una superficie aproximadamente de 4 982 km² (CONABIO, 2015) y abarca los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz (Alcocer *et al.*, 2007). Predominan suelos con sustrato calizo tipo Rendzina, además de Regosol, Litosol, Feozem, Andosol y Cambisol. Tiene contacto con zonas tropicales húmedas al este y templadas al norte y al oeste (CONABIO, 2015).

La Cuenca Oriental presenta un clima árido con una evaporación anual entre 1690 mm y una precipitación menor a 500 mm, una temperatura entre -5.05 a 30 °C con una media de 12.9 °C (Adame *et al.*, 2008).

El clima varia de acuerdo a la altitud. La parte mas baja de la cuenca, comprendida entre las coordenadas 97° 10' y 97° 50' O y 19° 00' y 19° 40' N (Can-Chulim *et al.*, 2011) presenta un clima semiárido (BSi) distribuido en la parte central de la cuenca a una altitud entre los 2300 m y 2400 m. mientras que el clima templado subhúmedo con lluvias en verano (C (w1)) se eubica entre los 2400 m y 3000 m en la parte norte y entre los 2300 a 2500 en las zonas este, oeste y sur de la cuenca, rodeando de forma concentrica al BSi (Alcocer *et al.*, 2007).



Figura 2: Vista aérea del lago Atexcac. Tomado de Google Earth

El lago de San Luis Atexcac se encuentra localizado entre los paralelos $19^{\circ} 19' 50.68''$ - $20^{\circ} 20' 12.30''$ N y los meridianos $97^{\circ} 26' 45.99''$ - $97^{\circ} 27' 15.37''$ O; es un lago volcánico tipo maar, considerado como un cuerpo de agua oligo-mesotrófico (Cárcamo, 2017), clasificado como un lago hiposalino, al presentar una salinidad de 6 g L^{-1} (Arellano, 2017).

Arredondo-Figueroa *et al.* (1983) realizó la descripción de los lagos ubicados en la cuenca oriental y para el lago estudiado reporta un área superficial de 0.29 km^2 , un volumen de 6.15 millones m^3 . Su forma se aproxima a una elipse (Figura 2), cuya longitud máxima es de 0.78 km con orientación SO-NE. La pared tiene una fuerte

inclinación que llega a la plataforma de 30 m en la parte central de la cuenca, interrumpida con zonas más profundas ligeramente desplazadas hacia el este y con una profundidad aproximada de 39 m, mientras que en trabajos más recientes (Vizuet, 2015; Arellano, 2017; Cárcamo, 2017) se ha registrado una profundidad máxima de 34 m.

MATERIAL Y MÉTODO

Campo

Se realizó un muestreo en el lago de Atexcac durante el periodo de estratificación bien establecida en el mes de agosto correspondiente al año 2016, en donde se midió el perfil vertical de temperatura y de oxígeno disuelto del lago con un oxímetro marca Hach con precisión de $\pm 0.05 \text{ mgL}^{-1}$ en una estación de muestreo ubicada al noreste del cuerpo lacustre, para determinar la ubicación del metalimnion y en donde, de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos previos del laboratorio se encuentra una mayor concentración de organismos (Vizuet, 2015; Arellano, 2017; Cárcamo, 2017; Reyes-Nopal, datos no publicados). Se tomaron muestras de agua a una profundidad de 15 metros con ayuda de una botella Van Dorn marca Wildco de 2.5 litros de capacidad las cuales fueron trasvasadas al epilimnion.

Montaje del experimento

El experimento se montó a una profundidad de 10.0 metros, correspondiente a la zona eufótica para asegurar una continua producción de oxígeno por parte de los

organismos autotróficos, en un sistema que consistió en botellas tipo Winkler suspendidas en garrafas de plástico transparente de 20.0 L horadadas para tal fin.

Para el experimento se realizaron 3 tratamientos y su control (detallados debajo en el texto), cada tratamiento o control representa una botella tipo Winkler que se dejó en incubación, y para cada una de estas condiciones se prepararon 3 botellas, dando como resultado final la cantidad de 12 botellas suspendidas a 10.0 metros dentro del lago (Figura 3).

Además de estas incubaciones se preparó una botella más de cada condición que no fue introducida al lago y se fijó con formaldehído al 2.0% después de su preparación, esto con el fin de tener un punto de referencia inicial del experimento.

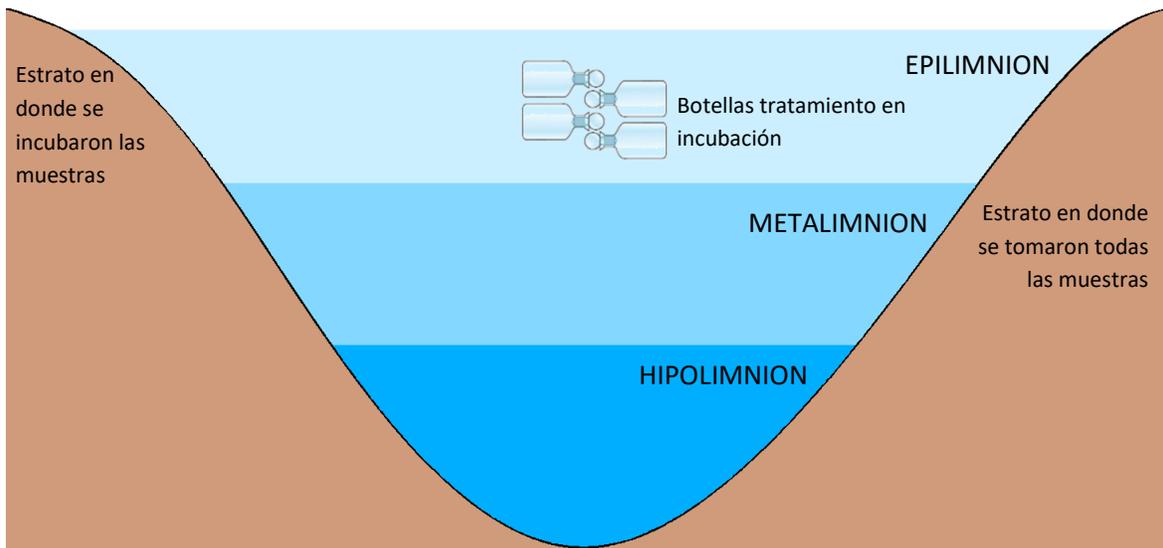


Figura 3: Modelo esquemático del experimento en donde se observa el estrato de donde fueron tomadas las muestras de agua (metalimnion) y en donde fueron incubadas (epilimnion).

Tratamiento 1. Adición de macrozooplancton. Referido en el texto como **tratamiento, incubación o botella de/con macrozooplancton o simplemente con copépodos**. Con ayuda de una caja muestreadora Schindler-Patalas marca

Wildco con capacidad de 10.0 L equipada con una red colectora con una luz de malla de 63.0 μm , con la que se queda atrapado todo el macrozooplancton dentro de la caja, se tomó una muestra de macrozooplancton desde el metalimnion. A partir de esta muestra se vertieron 100.0 mL de la misma a una botella tipo Winkler y, finalmente, se terminó de llenar con agua tomada desde el metalimnion con la botella Van Dorn.

Tratamiento 2. Adición de microzooplancton y remoción del macrozooplancton. Referido en el texto como ***tratamiento, incubación o botella de/con microzooplancton o simplemente con ciliados***. Se filtraron 100.0 mL de muestra procedente del metalimnion a través una malla con poro de 100.0 μm para eliminar el macrozooplancton, para volver a ser filtrada a través de 63.0 μm con el fin de concentrar al microzooplancton (ciliados) (Macek *et al.*, 1994) y finalmente verter esta alícuota dentro de una botella tipo Winkler y terminar de llenar con agua procedente del metalimnion filtrada por malla de 100.0 μm para eliminar a todo el macrozooplancton de este tratamiento.

Tratamiento 3. Adición de nanozooplancton y remoción de macrozooplancton y microzooplancton. Referido en el texto como ***tratamiento, incubación o botella de/con nanozooplancton o simplemente con nanoflagelados***. Se filtraron 100.0 mL de muestra tomada del metalimnion por una malla de 100.0 μm y otra de 63.0 μm para eliminar al macrozooplancton y por una membrana de policarbonato de 3.0 μm , para dejar únicamente al nanozooplancton, que se depositaron en una botella tipo Winkler y posteriormente se llenaron con muestra filtrada por malla de 100.0 μm y 63.0 μm .

Control. Referido en el texto como ***incubación o botella control o simplemente como testigo***. Se realizó llenando las botellas tipo Winkler con muestra tomada directamente de la botella Van Dorn desde el metalimnion.

Todas las botellas tipo Winkler se incubaron dentro de la zona eufótica en la profundidad anteriormente referida por un periodo de 24 horas, tras los cuales fueron fijados con formaldehído al 2.0% dentro de botellas de PET y conservadas en hielo bajo condiciones de obscuridad hasta su procesamiento en laboratorio.

Laboratorio

Para cada tratamiento se evaluó el picoplancton autotrófico (PPA), el picoplancton heterotrófico (PPH), los nanoflagelados, el macrozooplancton (copépodos) y la composición bacteriana (CARD-FISH) de la siguiente manera:

PPA. Se filtró al vacío un volumen de 5.0 mL a través de una membrana de policarbonato de 0.2 μm y se evaluó en microscopio de epifluorescencia (Leica Alemania) (Davis & Sieburth, 1982) con un lente de inmersión 100x apocromático por autofluorescencia de ficocianinas y ficoeritrinas con un filtro Cy3 que emite luz verde. Se contabilizó un total de ± 400 células en campos al azar (Porter & Feig, 1980). Posteriormente se tomaron de 10 a 15 fotografías de cada repetición con una cámara digital (Canon PowerShot S-45) acoplada al microscopio. Asimismo, se registró las tendencias bacterianas de agregarse o encontrarse en forma individual dependiendo del tratamiento.

PPH. Se filtraron al vacío 1.5 mL de muestra, previamente teñida con 50.0 μL de DAPI por 3 minutos, en condiciones de obscuridad a través de una membrana negra

de policarbonato de 0.2 μm a cuya preparación se le adicionó VectaShield y se observó al microscopio de epifluorescencia con luz UV, contándose un total de ± 400 células por preparación (Porter & Feig, 1980) y las tendencias bacterianas a agregarse, formar filamentos o encontrarse en forma individual través del programa ImagenJ (v1.33h, 2004) Se tomaron las mediciones del área, perímetro y Feret bacteriano calculando, la longitud, ancho, volumen celular a partir de estos parámetros morfométricos en una hoja de Excel con macros realizados por el Instituto de Hidrobiología de la Academia de Ciencias de la República Checa.

NFH. Se filtraron al vacío 10 mL de muestra previamente teñida con 50.0 μL de DAPI por 3 minutos, en condiciones de obscuridad con una membrana de policarbonato teñida con poro de 0.8 μm para ser posteriormente evaluadas en el microscopio de epifluorescencia con luz UV. Se consideró la abundancia por conteos de 30 campos al azar (Porter & Feig, 1980).

Macrozooplancton. Se observó una muestra de 5 mL bajo un microscopio óptico marca Zeiss con aumento de 40X para contabilizar la cantidad de macrozooplancton (copépodos) presentes en cada muestra.

CARD-FISH

Se llevó a cabo la técnica molecular CARD-FISH siguiendo el protocolo establecido por Pernthaler *et al.* (2002) modificado por Sekar *et al.* (2003).

Para llevar a cabo ésta técnica se filtraron 10 mL de cada muestra a través de una membrana de policarbonato blanca con poro de 0.2 μm . Posteriormente las

membranas se sumergieron en una solución de agarosa al 0.1% a una temperatura de 30 °C y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Cuadro 1: Sondas de oligonucleótidos utilizadas en CARD-FISH. Modificado de (Vizuet, 2015).

Sonda	Especificidad	Secuencia	Referencia
EUB I-III	La mayoría de las bacterias, Dominio <i>Bacteria</i> , Orden <i>Planctomicetales</i> , Orden <i>Verrucomicrobiales</i> .	5'- GCW GCC WCC CGW AGG AGW GT -3'	Daims <i>et al.</i> (1999)
ARCH 915	Dominio <i>Archea</i> .	5'- GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT -3'	Stahl & Amann (1991)
ALF 968	Clase <i>Alphaproteobacteria</i> .	5'- GGT AAG GTT CTG CGC GTT -3'	Neef (1997)
BET 42a+C	Clase <i>Betaproteobacteria</i> .	5'- GCC TTC CCA CTT CGT TT -3'	Manz <i>et al.</i> (1992)
GAM42a+C	Clase <i>Gammaproteobacteria</i> .	5'- GCC TTC CCA CAT CGT TT -3'	Manz <i>et al.</i> (1992)
HGC 69a	Phyllum <i>Actinobacteria</i> .	5'- TAT AGT TAC CAC CGC CGT -3'	Roller <i>et al.</i> (1995)
CF3 19a	La mayoría de las <i>Flavobacterias</i> , algunos <i>Bacteroidetes</i> , algunos <i>Sphingobacteria</i> .	5'- TGG TCC GTG TCT CAG TAC -3'	Manz <i>et al.</i> (1996)
LD12 121	Familia SAR11, Genero <i>Candidatus LD12</i> .	5'- CAC AAG GCA GAT TCC CAC AT -3'	Salcher <i>et al.</i> (2011)
PAR 1457	Género <i>Paracoccus</i> .	5'- CTA CCG TGG TCC GCT GCC -3'	Neef <i>et al.</i> (1996)
PLA 886	Familia <i>Planctomycataceae</i> .	5'- GCC TTG CGA CCA TAC TCC C -3'	Neef <i>et al.</i> (1998)
SRB 385	La mayoría de los <i>desulfovibrionales</i> y otras bacterias.	5'- CGG CGT CGC TGC GTC AGG -3'	Amann <i>et al.</i> (1990)
CREN 537	Filo Thaumarchaeota.	5'- TGA CCA CTT GAG GTG CTG -3'	Teira <i>et al.</i> (2004)
NON 338	Sonda utilizada como control complementario a EUB 338 I-III.	5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC -3'	Amann <i>et al.</i> (1990)

Se realizó un pretratamiento enzimático con una solución de lisozima, para degradar la pared celular en las bacterias y permitir posteriormente el libre paso de las sondas de oligonucleótidos (Cuadro 1) hacia el ADN, durante una hora a una temperatura de 37 °C.

Para la sonda de Actinobacteria se cortaron 1/13 de cada membrana para ponerlas a incubar en una solución de acromopeptidasa durante 30 minutos, mientras que el resto de la membrana se incubó en una solución de Proteinasa K, igualmente por 30 minutos a 37 °C.

Tras el término de la incubación, se procedió a cortar las membranas tratadas con Proteinasa K en banderines para cada sonda utilizada, 12 sondas en total, y se dejaron incubando en buffer de hibridación (Anexo 1) con la sonda de oligonucleótidos correspondiente de cada banderín en un termorregulador (Thermomixer confort, marca Eppendorf) durante 24 horas a una temperatura constante de 35 °C. Para ser incubados en una solución de tiramida marcada con el fluorocromo ALEXA-448 por 30 minutos a 37 °C en condiciones de oscuridad.

Cada banderín se almacenó a -20°C envueltos en papel aluminio hasta su conteo en el microscopio de epifluorescencia.

Para los conteos en microscopio se tiñó la muestra con Vectashield con DAPI para cuantificar el número total de células y la cantidad de células hibridadas para cada grupo procarionte analizado con el fluorocromo ALEXA-448.

Trabajo de gabinete

Análisis gráfico de datos. Una vez obtenidos los porcentajes de hibridación de cada sonda por medio de los conteos en el microscopio, se procedió a realizar graficas de barras de la densidad contra los tratamientos por grupo para comparar la proporción de individuos presentes por cada tratamiento.

Cálculo de contenido de carbono. A través del procesamiento de imágenes con el programa "Imagen J" se obtuvieron las dimensiones de cada célula con las cuales, por medio de las ecuaciones de Loferer-Krößbacher *et al.* (1998) para el PPH.

Análisis estadístico. Con las densidades poblacionales de cada grupo se procedió a realizar el análisis exploratorio de datos en los paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV (v15.2.06, 2005), comprobando su normalidad con la curva de probabilidad y la prueba de Kolmogorov-Smirnov, y la homocedasticidad de acuerdo con la prueba de Levene, tras rechazar la distribución normal de los datos se procedió a utilizar la prueba de Kruskal-Wallis (H) para corroborar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos y la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon para buscar entre cuales de estos las hubo (Marques, 1990).

RESULTADOS

Para el mes de agosto la zona eufótica se encontró a los 10.00 metros dentro de la columna de agua, lugar en donde se ubicó el experimento. Este mes corresponde con la estratificación bien establecida, donde la termoclina se registró desde los 10.00 hasta los 16.00 metros. A partir de los 20.00 metros la cantidad de oxígeno disuelto fue menor a 1

mg O₂ L⁻¹ por lo que se consideró una condición microaerobia a partir de esta profundidad (Figura 4).

Dentro de la zona eufótica, tanto la temperatura como la concentración de O₂ se mantuvieron constantes alrededor de 20.4°C y 7 mg O₂ L⁻¹, comenzando a descender a partir de los 10 metros hasta sus valores más bajos de 16.1 °C y 0.15 mg O₂ L⁻¹ respectivamente.

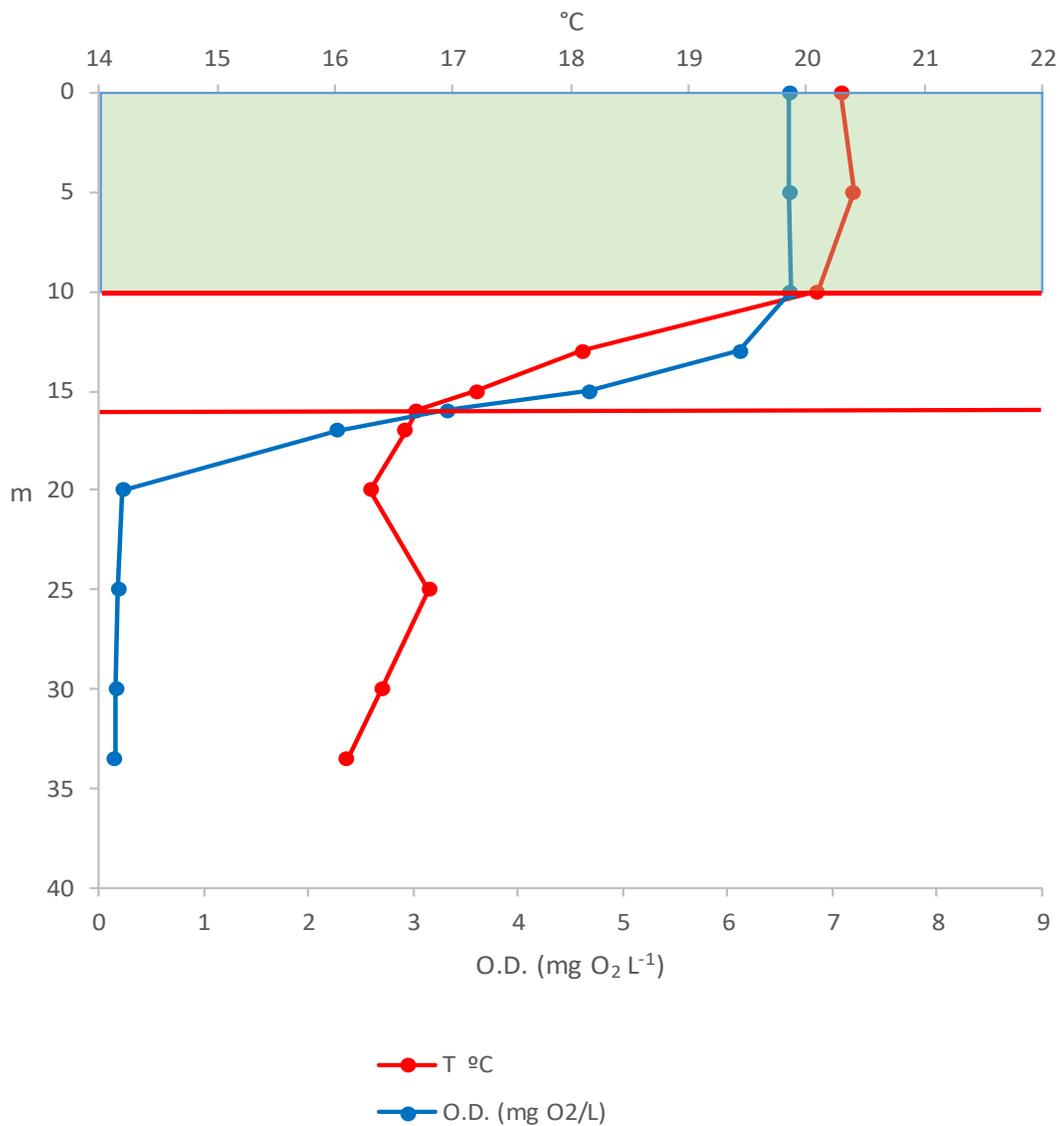


Figura 4: Perfil de temperatura y oxígeno disuelto para el mes de agosto de 2016 en el lago Atexcac. En donde se marca a la zona eufótica con un recuadro verde y a la termoclina con líneas horizontales rojas.

Picoplancton Heterotrófico

La densidad promedio de picoplancton heterotrófico registrada al inicio del experimento fue de 3.57×10^6 cél. mL⁻¹. Valor correspondiente al metalimnion, de donde fueron tomadas las muestras.

Comparación por tiempos.

Tanto al inicio del experimento (tiempo inicial o T₀) como al finalizar la incubación de 24 horas (tiempo final, T_f) existieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos H= 55.0, p<0.01 y H= 22.8, p<0.01 respectivamente para cada tiempo del experimento.

Al comparar los tratamientos del T₀ entre si se encontró que todas las botellas presentaron diferencias. La única excepción fue al contrastar la incubación del microzooplancton contra la de nanoflagelados en donde la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon demostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas.

Asimismo, para el T₀, el tratamiento con copépodos presentó diferencias al contrastarlo contra el de microzooplancton y de los nanoflagelados W= -1857.0, p<0.01 y W= -2247.0, p<0.01, respectivamente. Y como se muestra también en el análisis de cajas múltiples con muesca (Figura 5).

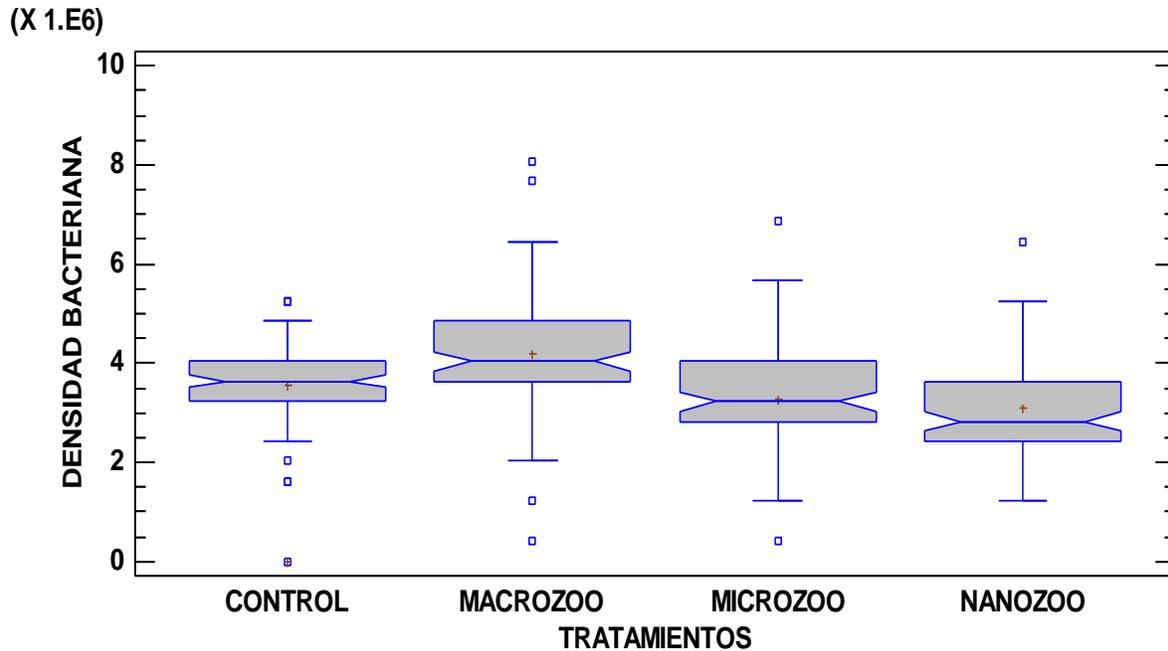


Figura 5: Cajas múltiples con muesca de la densidad bacteriana en el tiempo inicial del experimento (T_0). Macrozoo = tratamiento con macrozooplancton. Microzoo = tratamiento con microzooplancton. Nanzoo = tratamiento con nanozooplancton.

A pesar todas las diferencias que se tuvieron entre los tratamientos al inicio del experimento en las densidades de las bacterias heterotróficas, tras concluir el tiempo de incubación las botellas del microzooplancton y macrozooplancton junto con el testigo, a pesar de haber registrado variaciones, no demostraron tener diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de estas ($H= 3.01$, $p>0.05$). Por otro lado, en la botella con nanoflagelados se reportaron diferencias estadísticamente significativas con todos los demás tratamientos ($H= 22.80$, $p<0.01$) y una tendencia a disminuir la densidad bacteriana dentro de este tratamiento con respecto a todos los demás (Figura 6).

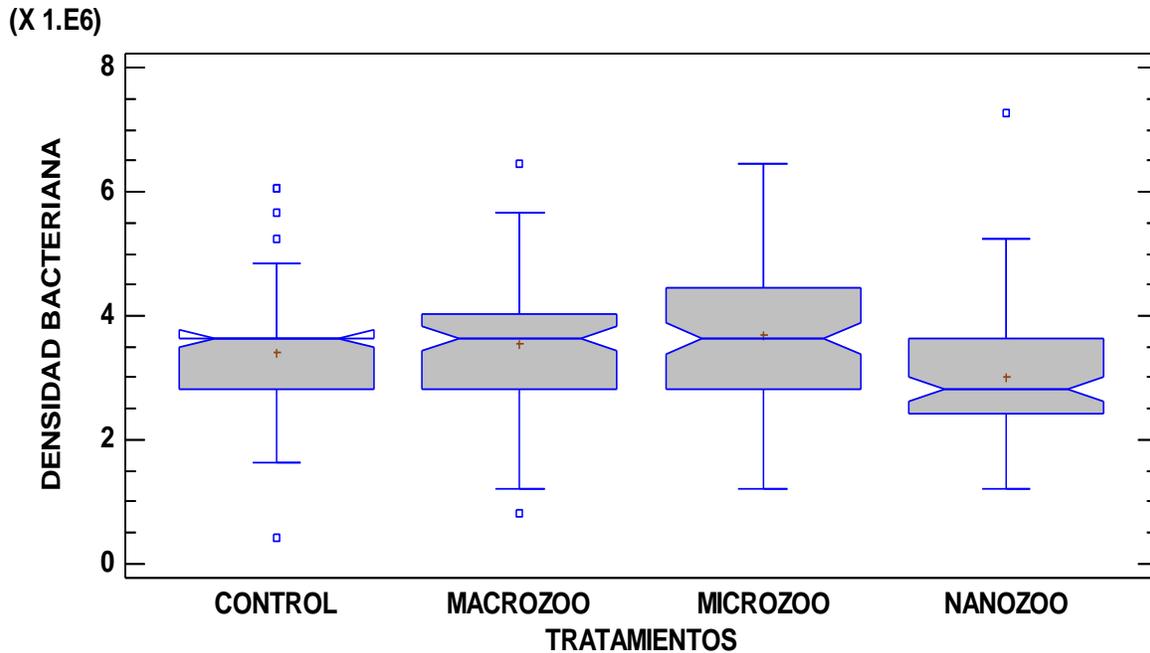


Figura 6: Cajas múltiples con muesca de la densidad bacteriana en el tiempo final (T_f) del experimento.

Comparación de T_0 a T_f .

Tras terminar el experimento se procedió a comparar el tiempo inicial de cada tratamiento contra su propio T_f , de esta forma se encontró que las incubaciones con copépodos y microzooplancton presentaron diferencias estadísticamente significativas con $W = -1366.5$, $p < 0.01$ y $W = 877.0$, $p < 0.05$, respectivamente.

Para el tratamiento con aumento en la densidad poblacional del macrozooplancton (copépodos) la diferencia encontrada resultó en un decremento en la densidad bacteriana (Figura 7), pasando de un valor de densidad promedio inicial de $4.17 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ a un valor promedio final de $3.34 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Esta población promedio inicial ($4.17 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) representó la mayor cantidad de bacterias heterotróficas registrada dentro de todo el experimento.

Mientras que para la incubación del microzooplancton la diferencia representó un incremento en la población bacteriana (Figura 7), empezando con una densidad promedio de $3.27 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ a un valor promedio final de $3.68 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, por lo que este tratamiento terminó con la mayor población de bacterias heterotróficas.

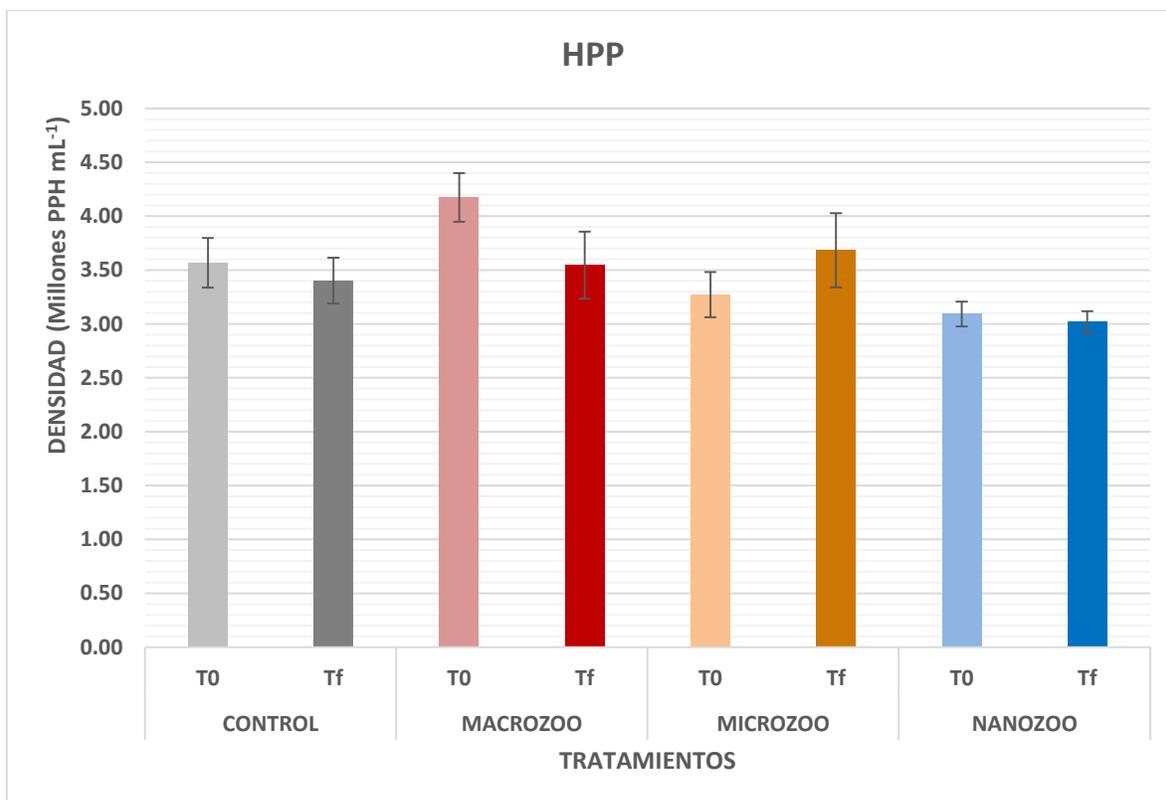


Figura 7: Densidad promedio del picoplancton heterotrófico al principio y al final del experimento, con barras de desviación estándar, en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento. CONTROL: Incubación testigo; MACROZOO: Tratamiento con macrozooplancton (copépodos); MICROZOO: Tratamiento con microzooplancton; NANOZOO: Tratamiento con nanoflagelados.

Carbón orgánico por célula.

Comparación por tiempos.

Por otro lado, al comparar la concentración de carbón orgánico por célula al inicio del experimento, medida en femtogramos de carbón por célula bacteriana (fg C

célula⁻¹), se demostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre los distintos tratamientos y el testigo ($H= 7.47$, $p>0.05$) (Figura 8).

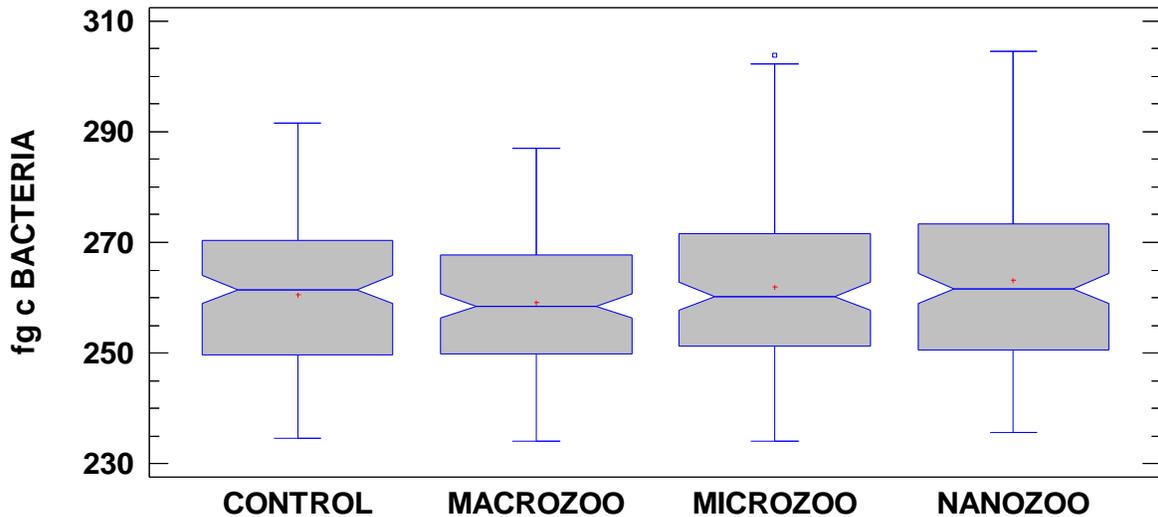


Figura 8: Cajas múltiples con muesca del contenido de carbono orgánico por célula del picoplancton heterotrófico en el tiempo inicial (T_0) del experimento.

De la misma manera al finalizar la incubación de 24 horas con la prueba estadística de Kruskal-Wallis no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en T_0 ($H= 4.83$, $p>0.05$) (Figura 9).

Comparación de T_0 a T_f .

Sin embargo, al contrastar cada tratamiento contra su propio T_0 se obtuvieron diferencias significativas para 2 de los 4 tratamientos. Tanto para la botella testigo como para la del microzooplancton la variación en la cantidad de carbono presente en cada bacteria desde T_0 a T_f no representó un cambio significativo.

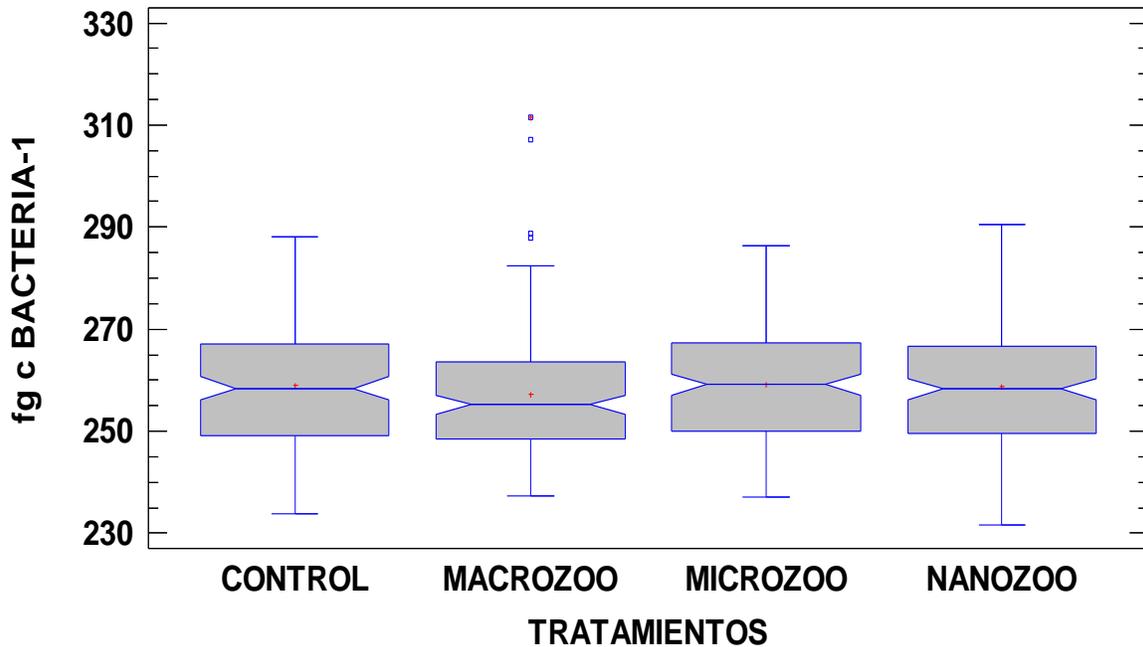


Figura 9: Cajas múltiples con muesca del contenido de carbono orgánico por célula del picoplancton heterotrófico en el tiempo final (T_f) del experimento.

Pero para el tratamiento con copépodos se registró una disminución en la cantidad de C por célula que fue estadísticamente significativa ($W = -1630.5$, $p < 0.05$) y para la botella con nanoflagelados la diferencia ($W = -2058.0$, $p < 0.05$) también presentó un decremento en este parámetro, que dicho de otra forma representa un cambio en el tamaño celular pasando a ser bacterias más pequeñas (Figura 10).

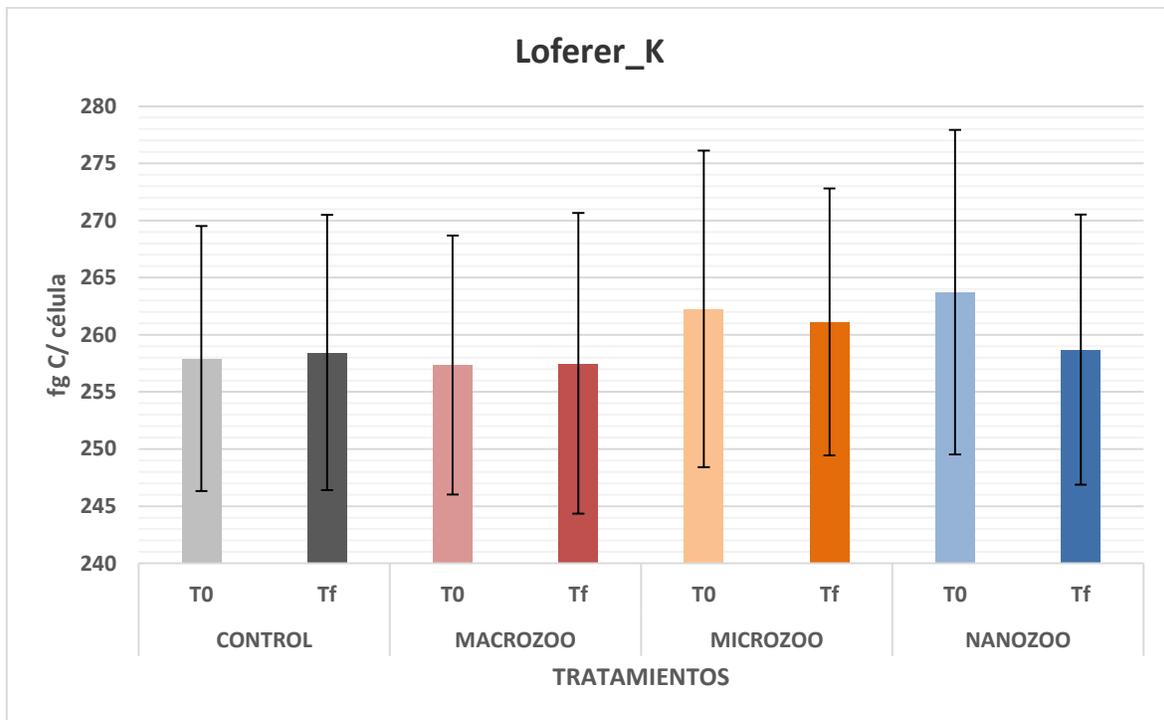


Figura 10: Promedio de contenido de carbono orgánico por célula del picoplancton heterotrófico, con barras de desviación estándar, en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Picoplancton Autotrófico

Para su contabilización, el picoplancton autotrófico se dividió en tres grupos: 1) células individuales, 2) colonias o agregados: cuando se observaba que la pared celular de un individuo se juntaba con la de otro, y 3) número de células que conforman la colonia o agregado; entre los cuales se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes para comprobar su normalidad, la cual al no ser

cumplida se optó por utilizar pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis y Mann-Whitney-Wilcoxon).

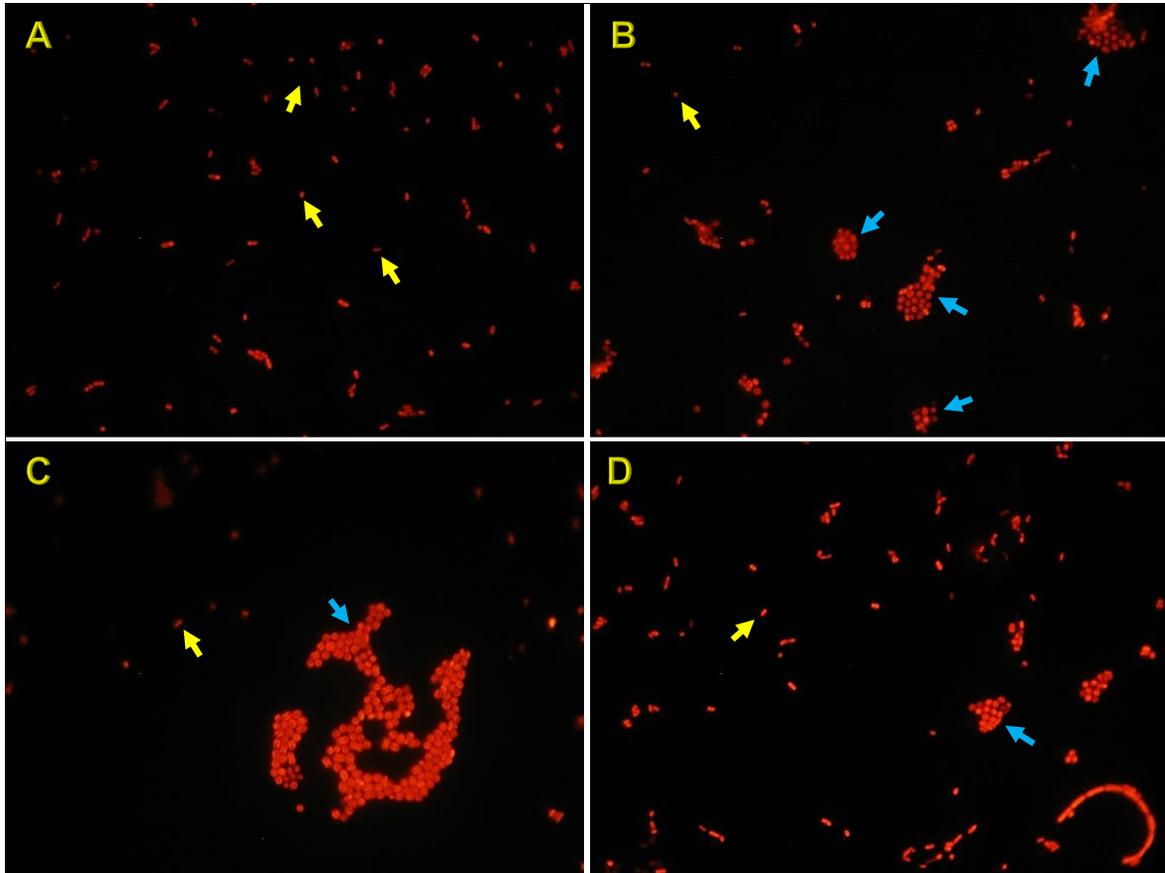


Figura 11: Fotografías de picoplancton autótrofo en donde se pueden observar células individuales (flechas amarillas) y colonias (flechas azules) vistas con filtro CY3; A. Fotografía tomada de la botella testigo al finalizar el experimento; B. Fotografía tomada del tratamiento con nanoflagelados; C. Fotografía tomada del tratamiento con macrozooplancton tras finalizar la incubación; D. Fotografía tomada del tratamiento con microzooplancton.

La densidad promedio de picoplancton autótrofo registrada al inicio del experimento fue de 1.23×10^6 cél. mL⁻¹. Valor correspondiente al metalimnion, de donde fueron tomadas las muestras.

PPA individual

Comparación por tiempos.

La densidad del picoplancton autotrófico en forma individual durante su T_0 presentó diferencias entre los tratamientos ($H= 73.28$, $p<0.01$) generando dos grupos separando: 1) el primero fue de la botella con copépodos junto con el control entre los que no se encontraron cambios significativos, 2) mientras que el segundo grupo de la incubación con el microzooplancton y el tratamiento de nanoflagelados que tampoco mostraron diferencias significativas; pero al contrastar estos dos grupos se observó que los valores de uno diferían con respecto al otro, resultando en que la población del primer grupo fuese mayor a la del segundo grupo (Figura 12).

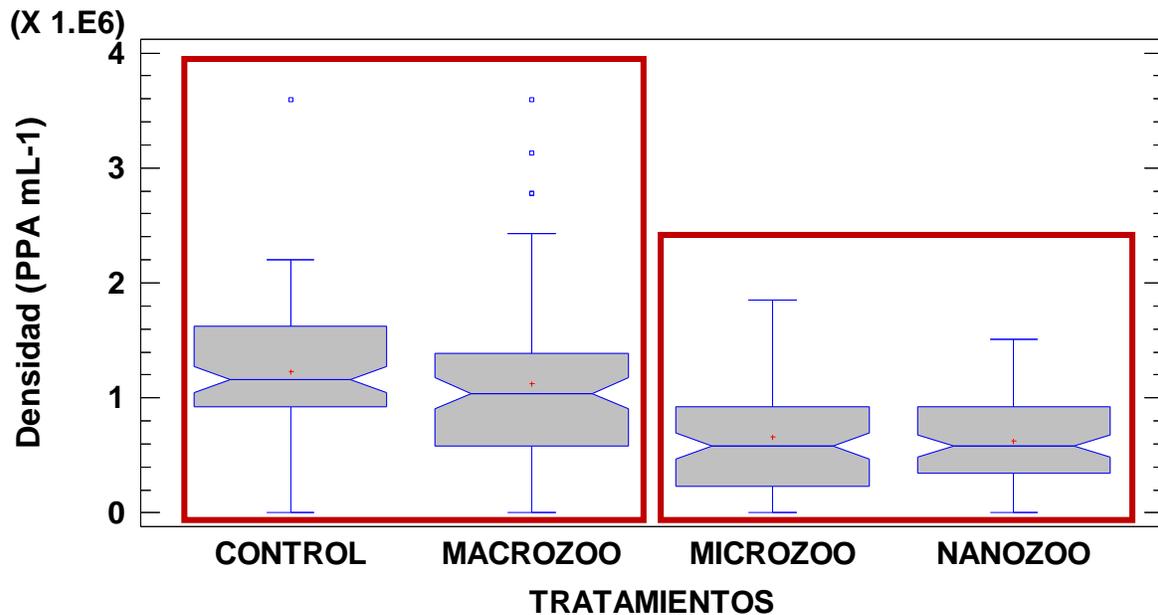


Figura 12: Cajas múltiples con muesca de la densidad de picoplancton autotrófico de forma individual en el tiempo inicial del experimento (T_0) en donde se puede observar los dos grupos que se forman en cuanto a sus similitudes en densidad.

Sin embargo, al finalizar el experimento estos dos grupos no se mantuvieron y se comenzaron a presentar diferencias entre las incubaciones ($H= 67.30$, $p<0.01$).

La botella testigo presentó diferencias con respecto a todos los demás tratamientos, la cual registró la mayor densidad de PPA a comparación de las demás incubaciones en su T_f . Mientras que el tratamiento con microzooplancton presentó la menor cantidad de PPA, dando como resultado diferencias con las incubaciones de copépodos ($W= -890.5$, $p<0.01$), nanozooplancton ($W= 1610.5$, $p<0.01$) y el control ($W= -890.5$, $p<0.01$) (Figura 13).

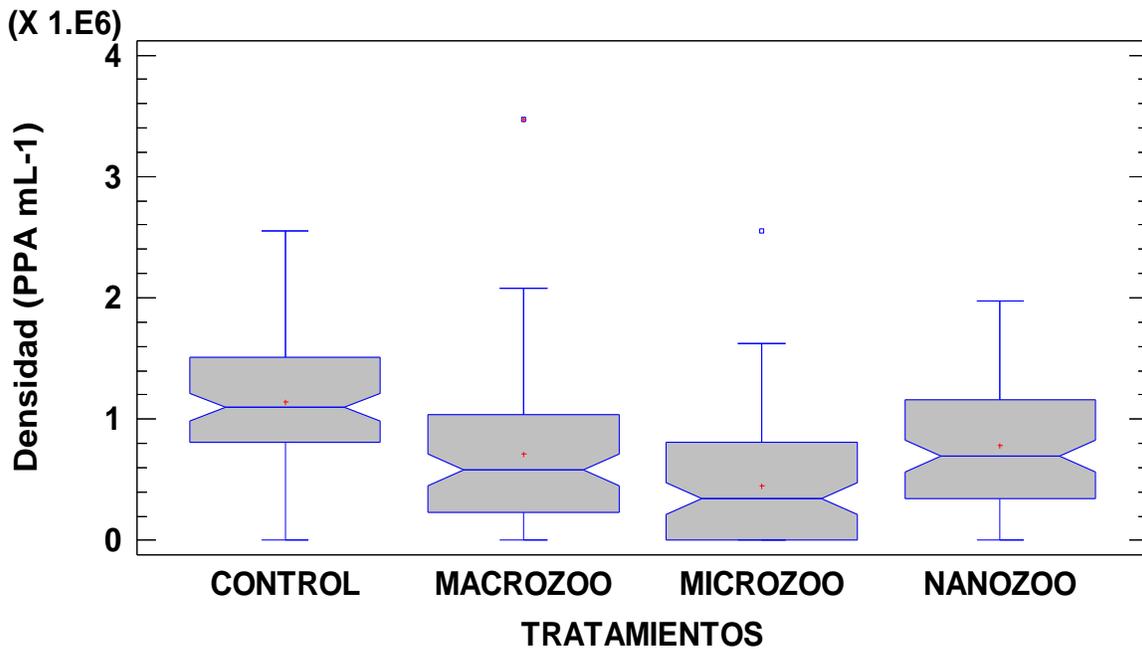


Figura 13: Cajas múltiples con muesca de la densidad de picoplancton autotrófico de forma individual en el tiempo final del experimento (T_f).

Comparación de T_0 a T_f .

La única botella que no presentó diferencias después de comparar el T_0 contra su propio T_f fue el testigo ($W= 318.0$, $p>0.05$), mientras que en los demás tratamientos las densidades de PPA iniciales demostraron no ser iguales a las contabilizadas tras finalizar el experimento.

Para la incubación con macrozooplancton se registró un decremento estadísticamente significativo en su densidad de PPA ($W= -1617.0$, $p<0.01$), la cual empezó con un valor promedio de $1.15 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ y finalizó con un valor promedio de $0.70 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ (Figura 14).

En la botella con microzooplancton la prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon demostró que existieron diferencias estadísticamente significativas del inicio a la densidad final de PPA individual ($W= 1080.5$, $p<0.01$) y a partir del análisis de cajas se observó que este tratamiento registró la menor cantidad de PPA individual al terminar la incubación (Figura 13).

Finalmente, en la incubación con nanoflagelados la variación en su densidad de PPA dio como resultado una diferencia estadística ($W= 686.5$, $p<0.05$) y un decremento en este mismo parámetro tras finalizar el experimento (Figura 13).

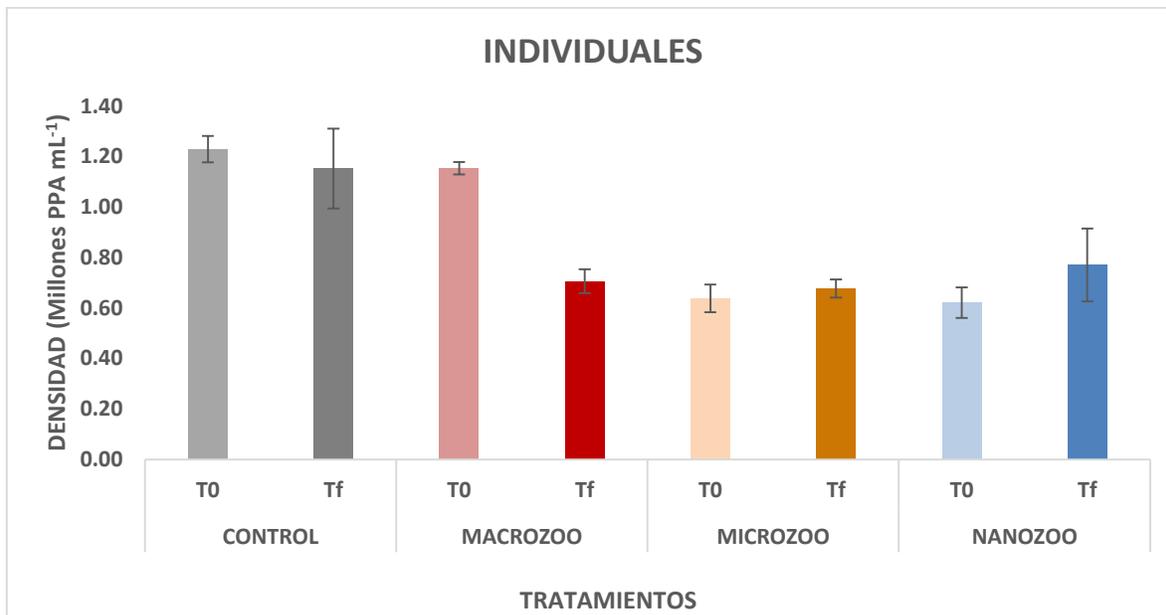


Figura 14: Densidad promedio del picoplancton autotrófico individual, con barras de desviación estándar, en donde se muestra el tiempo inicial (T₀) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Colonias de PPA

Comparación por tiempos.

Para el T₀ se encontraron que las diferencias estadísticas en la formación de colonias (H= 72.88, p<0.01) volvieron a formar el primer grupo anteriormente mencionado, grupo de testigo y macrozooplancton entre los cuales no demostraron ser diferentes.

Por otro lado, cada uno de los tratamientos de microzooplancton y nanozooplancton registraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad de colonias presentes en cada uno contra todas las demás incubaciones en T₀ a partir del análisis de cajas múltiples con muescas.

En el tiempo final del experimento la formación de colonias de PPA en la botella testigo demostró ser estadísticamente diferente a las formadas en los tratamientos de macrozooplancton ($W= 1606.5$, $p<0.01$) y microzooplancton ($W= -1074.0$, $p<0.01$).

Mientras que tanto la incubación con nanoflagelados como la del microzooplancton presentaron diferencias estadísticamente significativas contra todas las demás botellas, siendo la del microzooplancton en donde se registraron la mayor cantidad de colonias de PPA (Figura 15).

Comparación de T_0 a T_f .

Pero al contrastar el T_0 cada tratamiento contra su propio T_f los únicos que presentaron variaciones estadísticamente significativas fueron la botella con copépodos y la incubación con nanoflagelados.

Para la incubación con copépodos ($W= 1679.0$, $p<0.01$) la diferencia en la cantidad de colonias por mL resultó en un incremento por parte de estas al finalizar el experimento, pasando de un valor promedio inicial de 3.62×10^4 colonias mL^{-1} del a una densidad media final de 15.94×10^4 colonias mL^{-1} .

Siendo este tratamiento, junto con el del microzooplancton, quienes reportaron las mayores cantidades de colonias promedio en el T_f , 15.94×10^4 colonias mL^{-1} y 11.45×10^4 colonias mL^{-1} respectivamente (Figura 15).

Por otro lado, tratamiento con nanoflagelados tuvo el comportamiento opuesto, de disminuir la densidad de colonias de PPA por mililitro, iniciando en un número

promedio de 11.45×10^4 colonias mL^{-1} y terminando con una media de 7.22×10^4 colonias mL^{-1} al final de la incubación, con $W = -784.5$, $p < 0.01$.

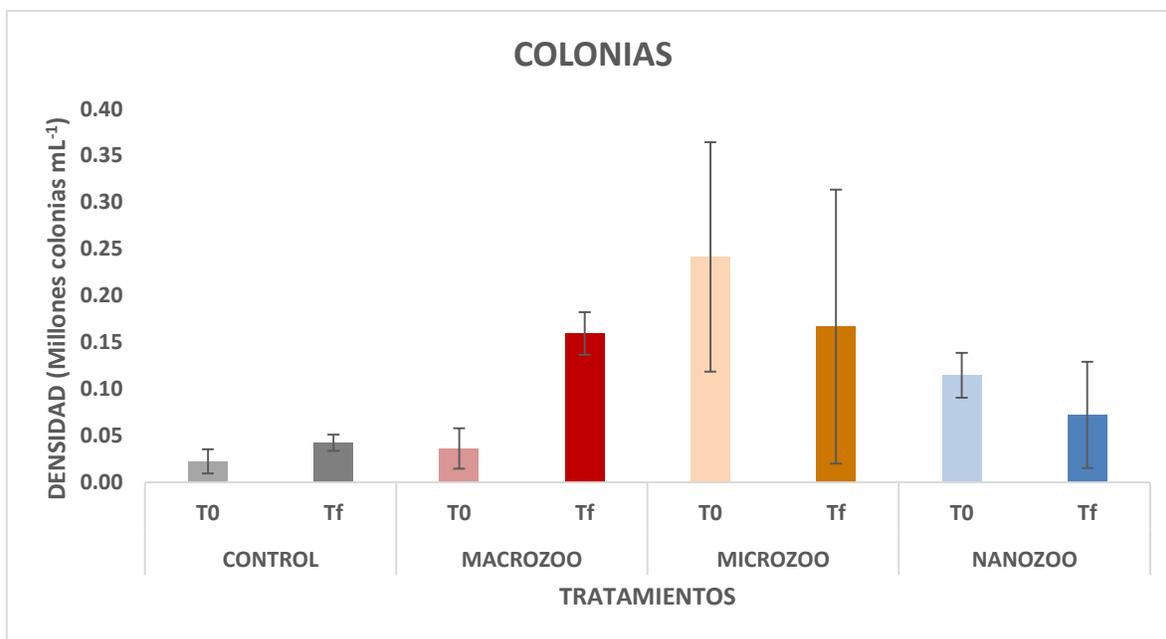


Figura 15: Densidad promedio del picoplancton autotrófico, con barras de desviación estándar, en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Número de células que conforman la colonia.

Comparación por tiempos.

Finalmente, en el T_0 , el número de células que formaban cada colonia siguió el mismo comportamiento que la densidad de colonias en donde se volvió a generar el mismo grupo sin diferencias significativas entre el testigo y la botella con macrozooplancton, mismos tratamientos que presentaron los valores más bajos para este parámetro, lo cual se traduce en que las colonias para estas incubaciones tuvieron en promedio de 2 a 3 células por colonia.

De la misma forma que pasó con el grupo anterior (colonias de PPA), las incubaciones de microzooplancton y nanoflagelados difirieron con respecto a todas las demás al inicio del experimento, siendo la del microzooplancton en donde se presentaron las colonias de PPA más grandes (de 11 a 12 células por colonia) (Figura 14).

A partir de las diferencias obtenidas al finalizar el experimento (T_f) se pudieron agrupar los tratamientos en dos nuevos conjuntos entre los que existieron variaciones significativas: 1) el primero está conformado por el testigo y la incubación con nanoflagelados entre los cuales no se encontraron diferencias, 2) mientras que en el segundo se juntaron a las botellas con microzooplancton y con copépodos, entre los cuales no registraron diferencias.

Al término del experimento la incubación con microzooplancton se mantuvo con las colonias más grandes entre los distintos tratamientos, con un promedio de 15 a 16 células por colonia. Sin embargo, se puede observar (Figura 16) que en la botella con los copépodos se dio un aumento en este parámetro (de 12 a 13 células por colonia), que se interpreta como un incremento en el tamaño de las colonias.

Comparación de T_0 a T_f .

Desde el principio hasta finalizar el experimento la botella testigo no presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la cantidad de células que conforman las colonias ($W= 4463.5$, $p>0.05$), caso contrario para los demás tratamientos.

Al inicio del experimento la incubación con copépodos contaba con un promedio de 2 - 3 células por colonia, y al finalizar la incubación estas pasaron a estar conformadas de 12 – 13 células ($W= 1761.5$, $p<0.01$), lo cual refleja que para este tratamiento el PPA aumento tanto el numero como el tamaño de sus agregados (Figura 16).

Por otro lado, la botella con microzooplancton, que inicio con un promedio de 11 a 12 células por colonia, presento un incremento para este parámetro finalizando con una media de 15 a 16 células por agregado (Figura 16). Este aumento a pesar de no ser tan grande como el observado en la incubación de macrozooplancton resulto ser estadísticamente diferente ($W= 386.5$, $p<0.05$).

Finalmente, para el tratamiento con nanoflagelados la variación con $W= 782.0$, $p<0.01$, al contrario de las demás incubaciones, resulto en una disminución por parte del PPA por colonia, pasando de un promedio de 4 a 5 células por agregado a una media de 3 a 4 células (Figura 16).

Nanoflagelados heterotróficos

La densidad promedio de nanoflagelados registrada al inicio del experimento fue de 9.19×10^1 cél. mL⁻¹ correspondiente al metalimnion, de donde fueron tomadas las muestras.

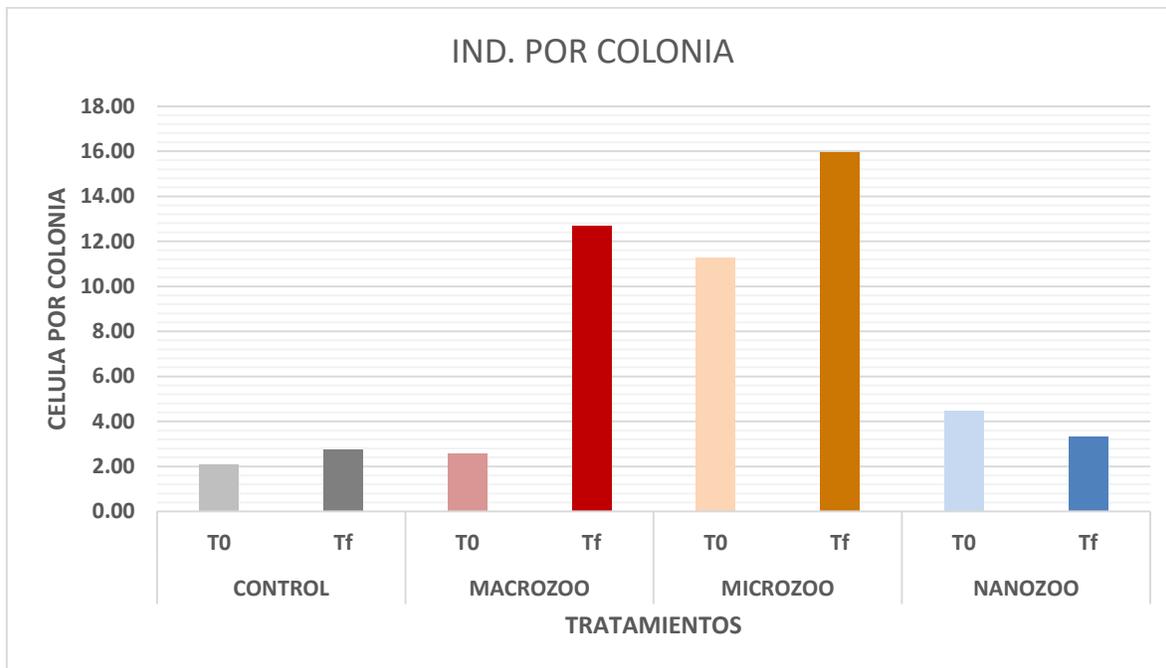


Figura 16: Promedio de células que conforman cada colonia del picoplancton autotrófico, en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Comparación por tiempos.

Al inicio del experimento la densidad poblacional de los NFH no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las incubaciones, con excepción de la botella con nanoflagelados ($H= 13.40$, $p<0.01$) en donde se tuvo la mayor cantidad de estos organismos con una densidad promedio de 236 NFH mL^{-1} , como se tenía previsto para este tratamiento (ver Tratamiento 3 en Material y método).

Tras finalizar el experimento (T_f) el tratamiento con nanozooplankton mantuvo la máxima densidad de NFH, con un promedio de 190 NFH mL^{-1} , y continuó presentando diferencias significativas de todos los tratamientos $W= 22,43$, $p<0.01$. Sin embargo, al contrastar el testigo con la botella del macrozooplankton en su T_f se demostró que la variación de densidad entre estas incubaciones resultó ser

significativa $W = -543.0$, $p < 0.01$, observando una población menor de NFH en la incubación de copépodos (Figura 18).

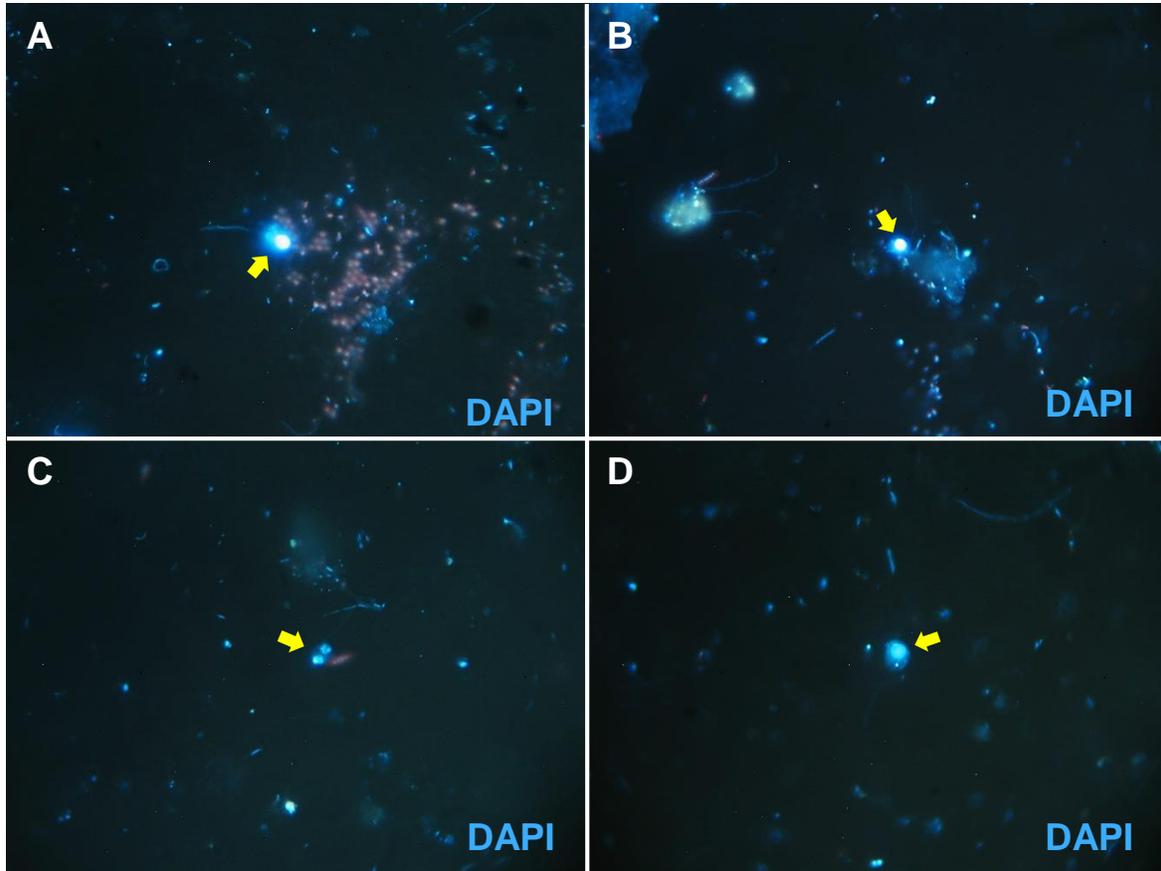


Figura 17: Fotografías de nanoflagelados heterotróficos teñidos con DAPI (flechas amarillas) vistos con luz ultravioleta; A. fotografía tomada de la botella testigo en T_0 en donde se puede observar al NFH unido a células de PPA que brillan en autofluorescencia anaranjada B. Fotografía tomada de la incubación con copépodos en T_0 ; C. Fotografía tomada del tratamiento con microzooplancton en T_f ; D. Fotografía tomada de la botella con nanozooplancton en T_0 .

Comparación de T_0 a T_f .

En el tratamiento con copépodos el número de nanoflagelados inicio el experimento con una densidad promedio de 72 NFH mL^{-1} y al terminar la incubación pasó a tener un promedio de 13 NFH mL^{-1} (Figura 18), esta variación fue lo suficientemente grande para demostrar que la cantidad final de nanoflagelados fue estadísticamente diferente a la inicial $W = -361.0$, $p < 0.05$.

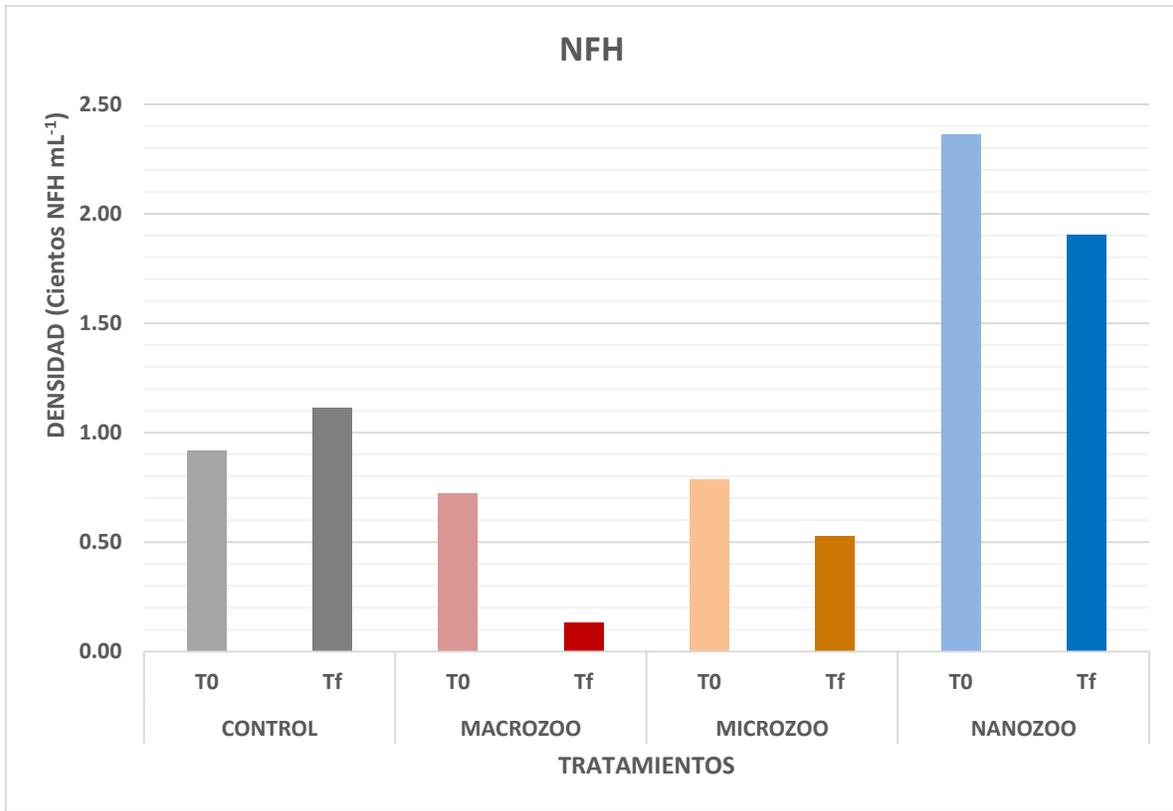


Figura 18: Densidad promedio de los nanoflagelados heterotrófico, en donde se muestra el tiempo inicial (T₀) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Durante los conteos en el microscopio de epifluorescencia se observó que los nanoflagelados se ubicaban comúnmente próximos a células del picoplancton autotrófico, además de encontrar células el mismo PPA ocasionalmente dentro del cuerpo de estos NFH (Figura 19).

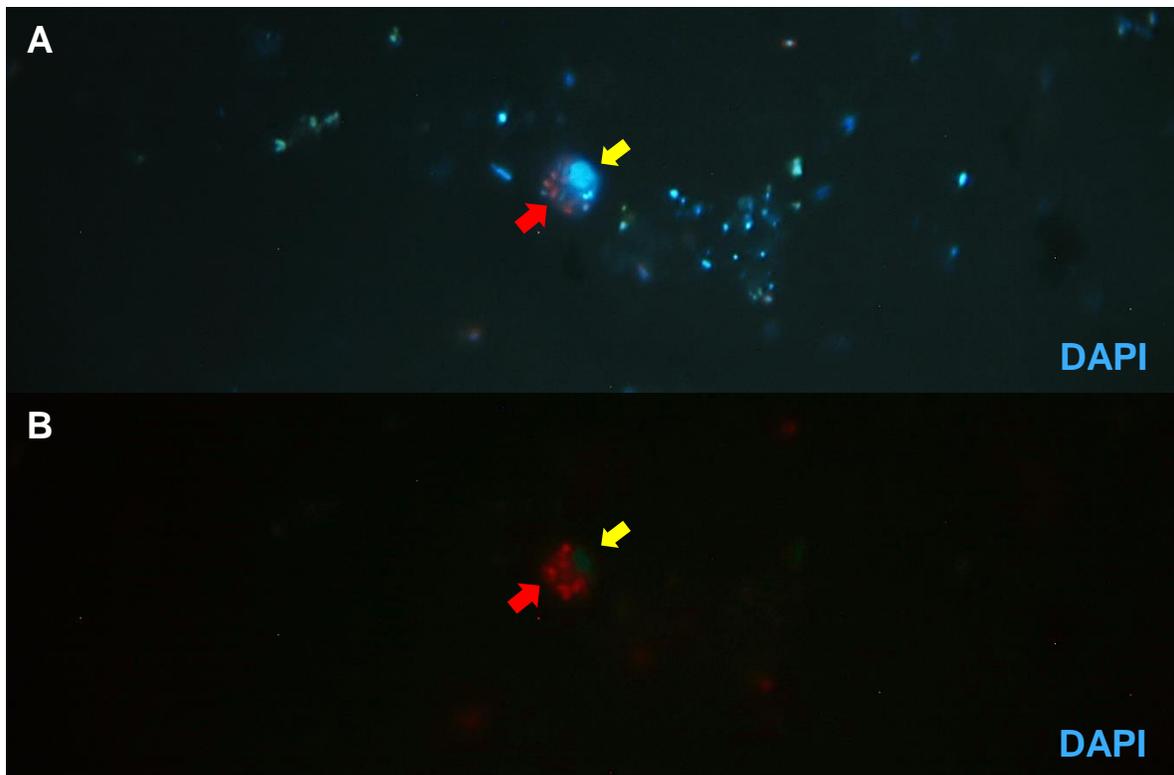


Figura 19: Fotografías tomadas de la misma vista de un nanoflagelado teñido con DAPI (flechas amarillas) donde se pueden observar células de PPA dentro del cuerpo de este protozooario (flechas rojas); A. Vista con luz ultra violeta; B. Vista con filtro compuesto.

CARD-FISH

Al inicio del experimento (T_0) los porcentajes más altos de hibridación registrados para los distintos tratamientos pertenecieron a las sondas correspondientes al Phylum *Actinobacteria* (HGC 69a), con el 5.7%; la clase Betaproteobacteria (BET 42a+C), con el 3.7%; y el Phylum *Planctomycete* (PLA 886), con el 3.3%. Y al término de la incubación estos mismos grupos se mantuvieron como los más representativos con 12.7%, 8.2% y 1.9%, respectivamente, junto con las *Sulfatoredutoras* (SRB 385), con 2.8 %; el género *Paracoccus* (PAR 1437), con 1.9 %; y el clado *LD12* (LD12 121), con 1.1% (Cuadro 2).

Cuadro 2: Porcentajes de hibridación máximos y mínimos para cada sonda utilizada en CARD-FISH obtenidos al principio (T_0) y al final (T_f) del experimento.

Sonda	Grupo bacteriano	Tiempo inicial		Tiempo final	
		(T_0)		(T_f)	
		Valor mínimo	Valor máximo	Valor mínimo	Valor máximo
ARCH 915	Dominio <i>Archea</i> .	0.5 %	1 %	0.4 %	1.6 %
EUB I-III	La mayoría de las bacterias, Dominio <i>Bacteria</i> , Orden <i>Planctomycetales</i> , Orden <i>Verrucomicrobiales</i> .	30.4 %	36.3 %	19.8 %	44.6 %
BET 42a+C	Clase <i>Betaproteobacteria</i> .	2.4 %	3.7 %	1.5 %	12.7 %
GAM 42A+C	Clase <i>Gammaproteobacteria</i> .	0.4 %	0.6 %	0.2 %	0.7 %
ALF 968	Clase <i>Alphaproteobacteria</i> .	0.2 %	0.2 %	< 0.1 %	0.2 %
LD12 121	Familia SAR11, Genero <i>Candidatus LD12</i> .	0.3 %	1 %	< 0.2 %	1.1 %
SRB 385	La mayoría de los <i>desulfovibrionales</i> y otras bacterias.	0.2 %	0.7 %	0.08 %	2.8 %
HGC 69a	Phyllum <i>Actinobacteria</i> .	3.7 %	5.7 %	1.2 %	8.2 %
CF3 19a	La mayoría de las <i>Flavobacterias</i> , algunos <i>Bacteroidetes</i> , algunos <i>Sphingobacteria</i> .	0.1 %	0.2 %	< 0.1 %	0.3 %
PLA 886	Familia <i>Planctomycataceae</i> .	2.3 %	3.3 %	1.5 %	1.9 %
NON 338	Sonda utilizada como control complementario a EUB 338 I-III.	0.1 %	0.3 %	< 0.09 %	0.3 %
PAR 1437	Género <i>Paracoccus</i> .	0.3 %	1.3 %	0.8 %	1.9 %
CREN 335	Filo <i>Thaumarchaeota</i>	0 %	0 %	0 %	0 %

Dominio *Archea* (ARCH 915)

Comparación por tiempos.

Para el dominio *Archea* no se presentaron diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos en T_0 ($H= 4.68$, $p>0.05$), con porcentajes de hibridación que fueron desde el 0.49 % hasta el 0.99%, siendo la botella testigo en la que se registró el porcentaje más alto, mientras que el tratamiento con microzooplancton obtuvo los conteos más bajos (Figura 20).

Al término del experimento (T_f) el menor porcentaje de hibridación para la sonda ARCH915 se encontró en la incubación con nanoflagelados, con un 0.43%; mientras que el valor más alto lo tuvo la botella con macrozooplancton, con un 1.62%, sin embargo, esta variación no resultó ser significativa, $H= 2.44$, $p>0.05$.

Comparación de T_0 a T_f .

A pesar de que la prueba estadística de Mann-Whitney-Wilcoxon demostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas de un inicio al final de cada tratamiento, al observar las medias de los porcentajes de hibridación se puede distinguir cierto cambio.

Para la botella con copépodos la media refleja un aumento de 0.64% a 1.62%; en la incubación con microzooplancton el incremento va de 0.49% a 0.83%; mientras que en el tratamiento con nanoflagelados se percibe una disminución de 0.77% a 0.43% (Figura 20).

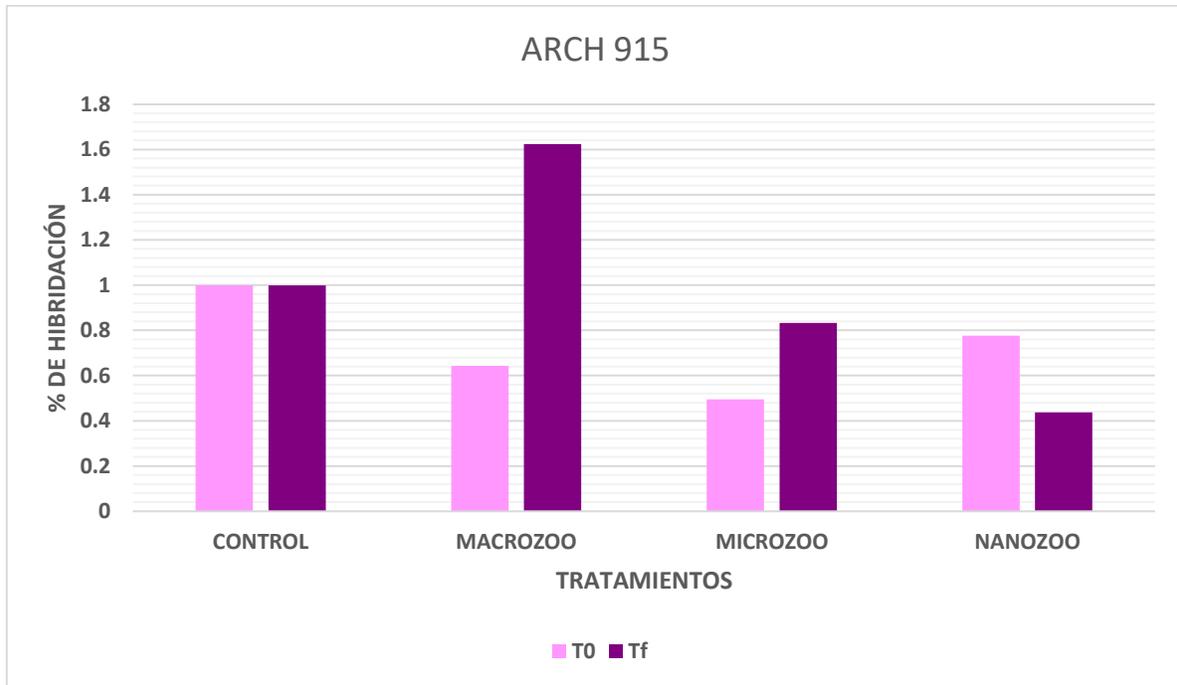


Figura 20: Promedio de porcentaje de hibridación para el dominio *Archea* (ARCH 915), en donde se muestra el tiempo inicial (T₀) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Dominio *Bacteria* (EUB I-III)

Comparación por tiempos.

Desde el inicio del experimento (T₀) se encontró que el porcentaje de hibridación para el dominio *Bacteria* presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (H= 26.64, p<0.01).

La botella control presentó variaciones con respecto a todas las demás; para las incubaciones con copépodos y microzooplancton, W= -176.0, p<0.01 y W= -150.5, p<0.05, respectivamente, el porcentaje de hibridación para EUB I-III fue mayor en el testigo; mientras que en el tratamiento con nanoflagelados (W= 195.0, p<0.01) el número de células hibridadas fue mayor en este último.

Por otro lado, la incubación con nanozooplancton registró los valores más altos para el porcentaje de hibridación por lo que presentó diferencias con la botella testigo ($W= 195.0$, $p<0.01$); el tratamiento con microzooplancton ($W= 287.5$, $p<0.01$); y el de los nanoflagelados ($W= 265.5$, $p<0.01$) (Figura 21).

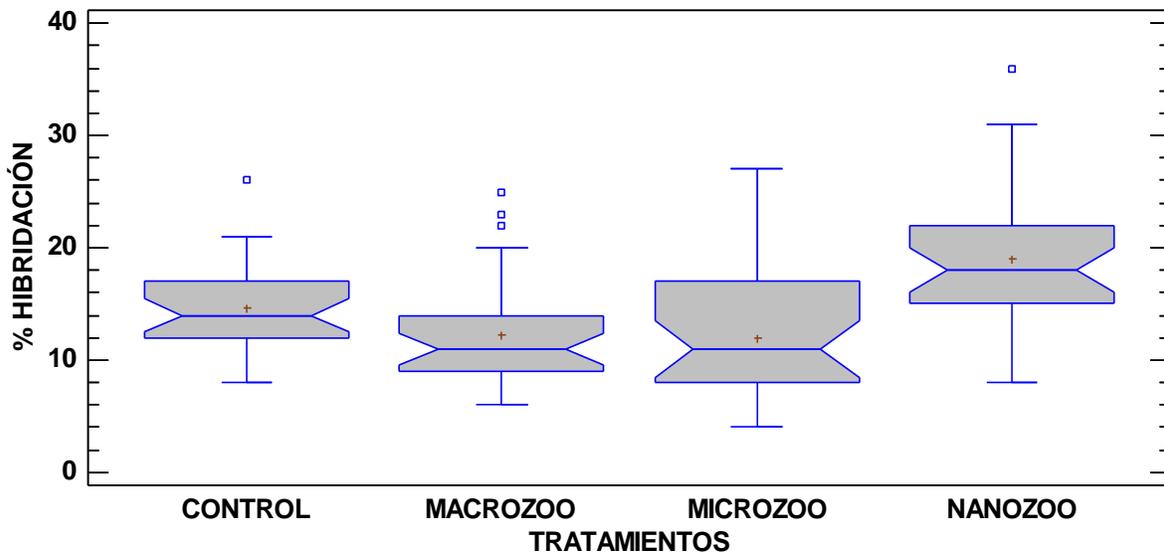


Figura 21: Cajas múltiples con muesca de porcentaje de hibridación al inicio del experimento (T_0) para el dominio *Bacteria* (EUB I-III).

Para el T_f la incubación con copépodos demostró variaciones estadísticamente significativas con respecto a la botella control ($W= -310.0$, $p<0.01$); el tratamiento con microzooplancton ($W= 406.5$, $p<0.01$); y el del nanozooplancton ($W= 425.0$, $p<0.01$), presentando siempre los valores más bajos de hibridación para esa sonda (EUB I-III) (Figura 22).

Mientras que las diferencias encontradas en T_0 entre la botella control y los tratamientos de nanoflagelados y microzooplancton, al igual que las variaciones entre este último y la incubación de nanozooplancton, desaparecieron al final del experimento, llegando a ser estadísticamente equiparables entre estos.

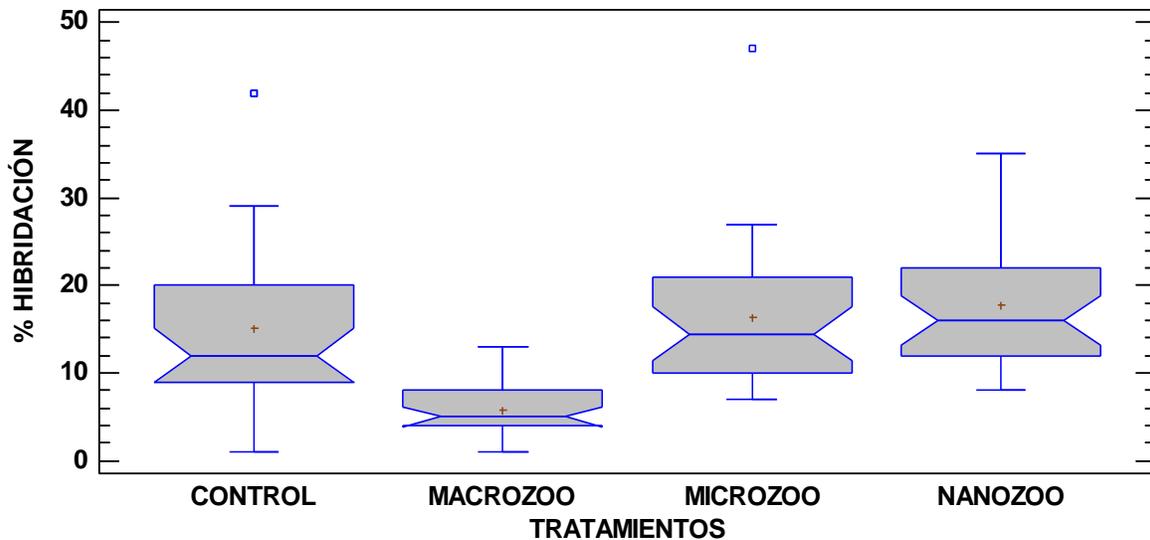


Figura 22: Cajas múltiples con muesca del porcentaje de hibridación al finalizar del experimento (T_f) para el dominio *Bacteria* (EUB I-III).

Comparación de T_0 a T_f .

Tanto el tratamiento con nanoflagelados como la botella control no registraron cambios significativos en el porcentaje de hibridación, por lo que no demostraron ser estadísticamente diferentes de su T_0 a su T_f . Caso contrario para las incubaciones con microzooplancton y copéodos.

En la botella con copéodos se registró una disminución en el porcentaje de hibridación que fue de un promedio inicial del 36.30% a un 19.80% al finalizar el experimento, con una $W = -349.0$, $p < 0.01$.

Mientras que el tratamiento con microzooplancton tuvo el comportamiento inverso, pasando de un porcentaje medio de hibridación inicial del 30.40% a uno final de 44.6% ($W = 165.5$, $p < 0.05$) (Figura 23).

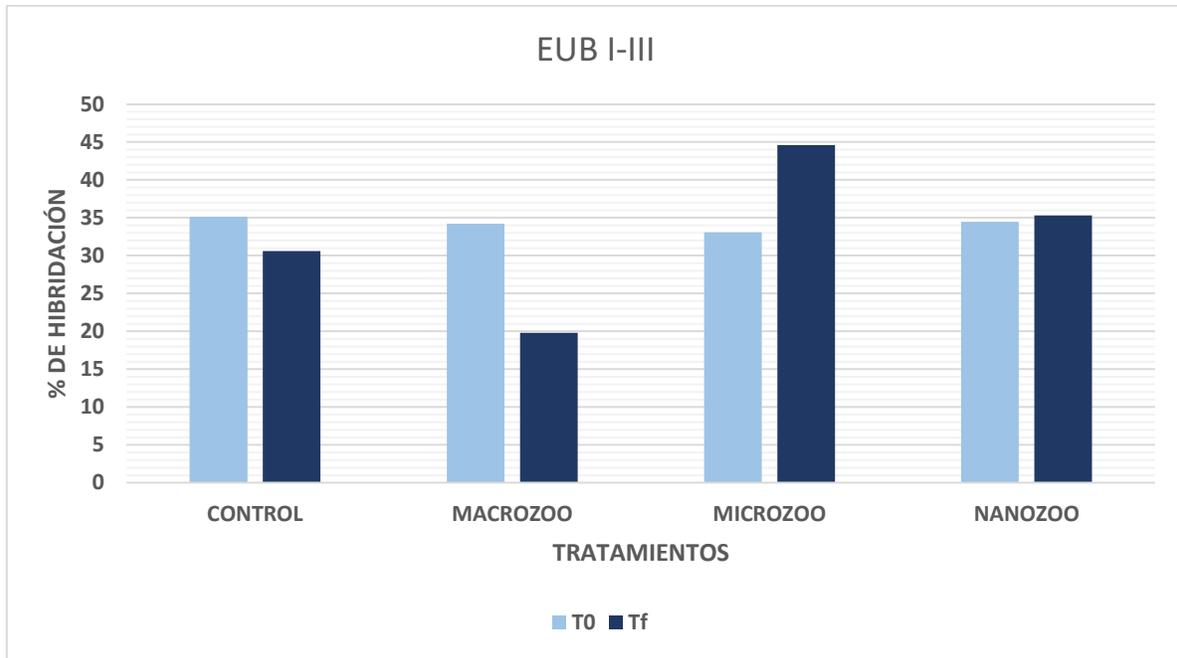


Figura 23: Promedio de porcentaje de hibridación para el dominio *Bacteria* (EUB I-III), en donde se muestra el tiempo inicial (T₀) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Clase *Betaproteobacteria* (BET 42a+C)

La clase *Betaproteobacteria*, marcada con la sonda BET 42a+C, resulto ser la sonda más representativa para el lago Atexcac tanto al inicio, con un porcentaje de hibridación promedio de 3.7%, como al final del experimento, con el 12.7%.

Comparación por tiempos.

Al empezar el experimento los porcentajes de hibridación para BET 42a+C presentaron diferencias estadísticamente significativas ($H= 11.46$, $p<0.01$) entre los distintos tratamientos.

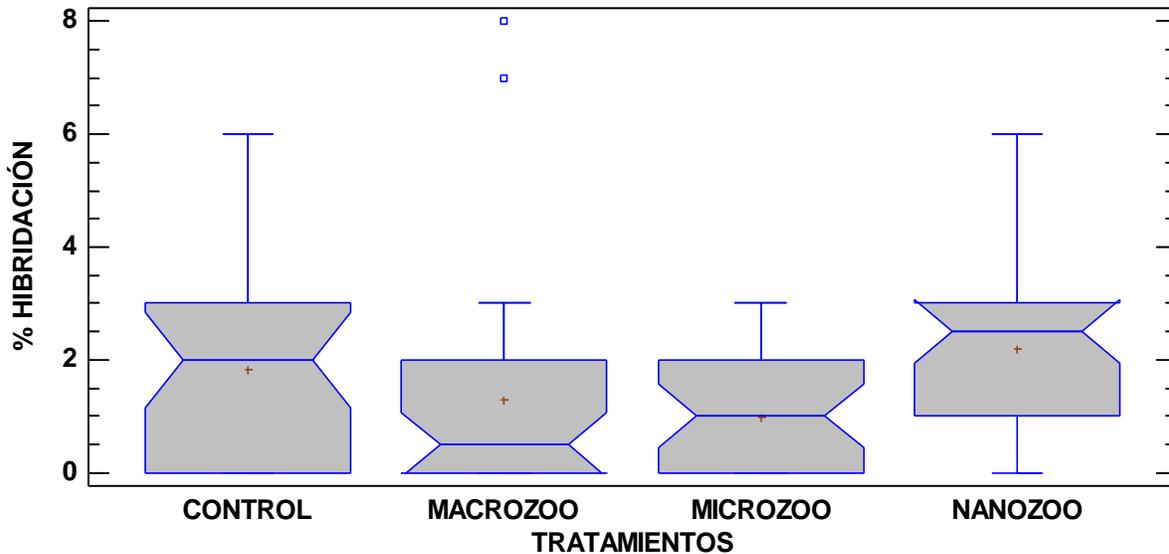


Figura 24: Cajas múltiples con muesca del porcentaje de hibridación al inicio del experimento (T_0) para la clase *Betaproteobacteria* (BET 42a+C).

La incubación con microzooplancton tuvo diferencias al contrastarla con el testigo ($W = -130.0$, $p < 0.05$) y con el nanozooplancton ($W = 190.5$, $p < 0.01$). Mientras que la botella con nanoflagelados también obtuvo variaciones con respecto al tratamiento con copépodos. Cabe mencionar que la botella con NFH presentó una cantidad mayor de porcentajes altos de hibridación en T_0 (Figura 24).

Tras finalizar el tiempo de incubación el tratamiento con copépodos obtuvo diferencias al contrastarlo con todos los demás ($H = 33.85$, $p < 0.01$), resultado de una baja en el porcentaje de hibridación (Figura 25). Mientras que en la incubación con microzooplancton la cantidad de células hibridadas fue la mayor, lo cual causó que al compararla con la botella con nanoflagelados presentaran variaciones significativas ($W = -206.0$, $p < 0.01$).

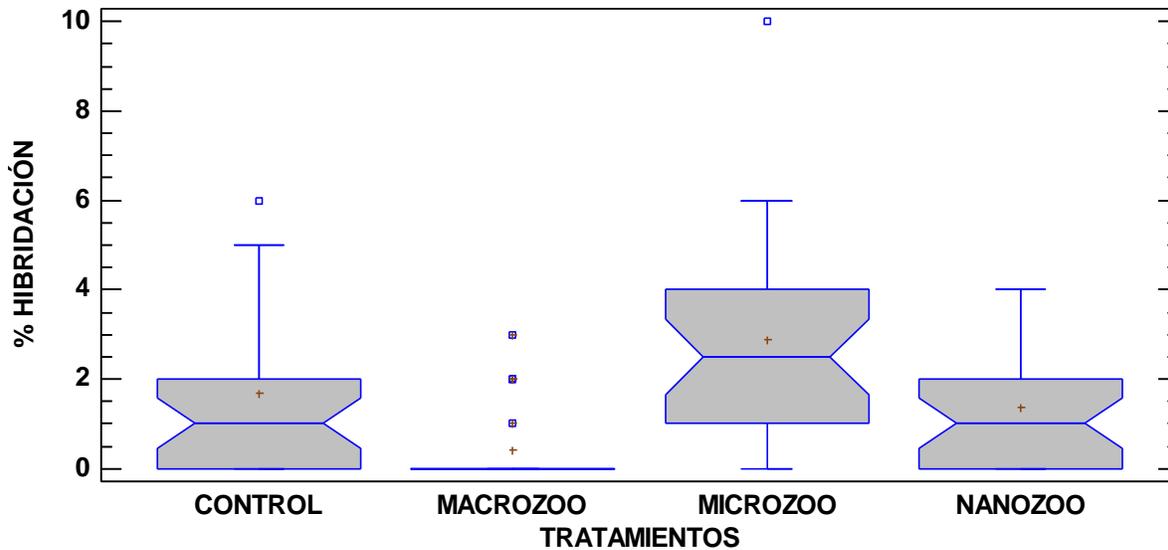


Figura 25: Cajas múltiples con muesca del porcentaje de hibridación al finalizar del experimento (T_f) para la clase *Betaproteobacteria* (BET 42a+C).

Comparación de T_0 a T_f .

Al igual que en la sonda anterior (EUB I-III), la clase *Betaproteobacteria* no presentó diferencias entre el porcentaje de hibridación inicial y final para las botellas testigo y con nanoflagelados, pero sí para las incubaciones con copépodos y microzooplancton.

El tratamiento con microzooplancton inicio con porcentaje de hibridación promedio de 2.43% y finalizó con una media de 12.7% ($W= 268.0$, $p<0.01$), terminando con el mayor número de células hibridadas para esta clase (Figura 26).

Por otro lado, en la botella con copépodos la hibridación pasó de un 3.67% promedio inicial a 1.53% final, siendo esta incubación la que presentó el porcentaje de hibridación más bajo en el T_f .

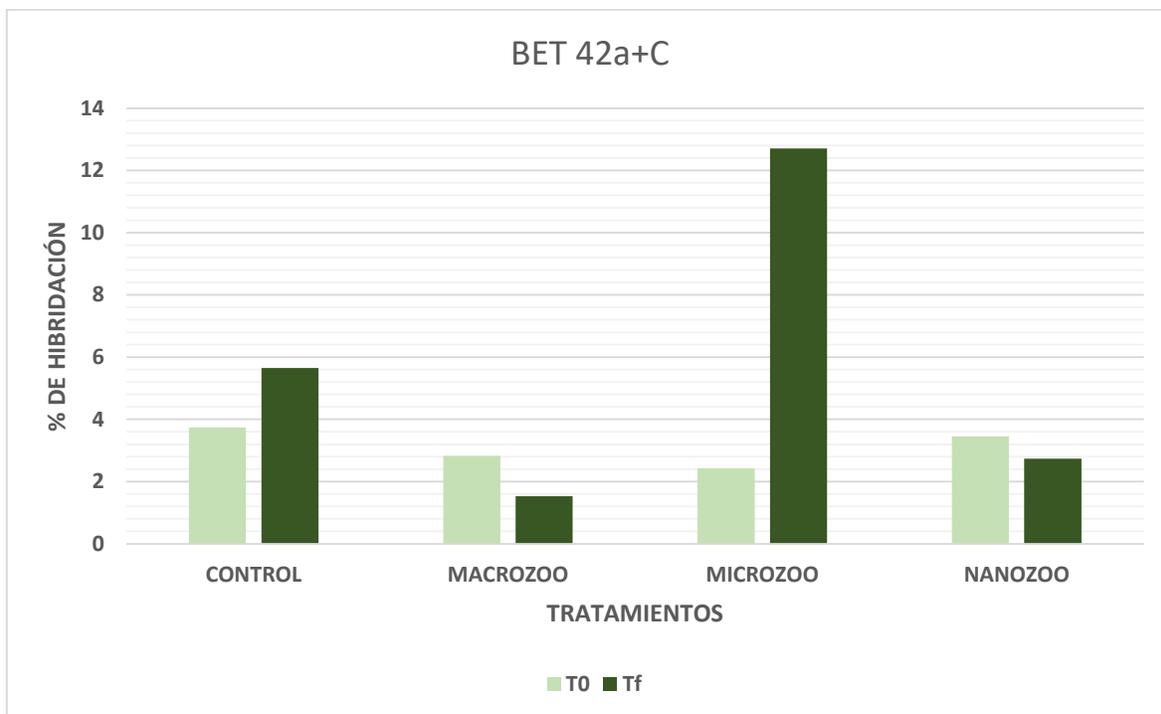


Figura 26: Promedio de porcentaje de hibridación para la clase *Betaproteobacteria* (BET 42a+C), en donde se muestra el tiempo inicial (T₀) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Clase *Gammaproteobacteria* (GAM 42a+C)

Comparación por tiempos.

La clase *Gammaproteobacteria* inicio el experimento con valores de hibridación promedio que iban de 0.43% a 0.58%, sin que estas variaciones resultaran estadísticamente significativas $H= 1.76, p>0.05$.

En T₀ los porcentajes se mantuvieron sin presentar diferencias significativas, con $H= 3.45, p>0.05$. En la botella con macrozooplancton de 0.21%, siendo el más bajo para este tiempo, y la testigo con el valor más alto, de 0.7% (Figura 27).

Comparación de T_0 a T_f .

A pesar de que ninguna botella registro variaciones significativas en la cantidad de células hibridadas al inicio y final del experimento, en la incubación con macrozooplancton se puede observar que el promedio presenta una disminución que va de 0.49% a 0.21% (Figura 27), comportamiento similar a la sonda general de EUB I-III.

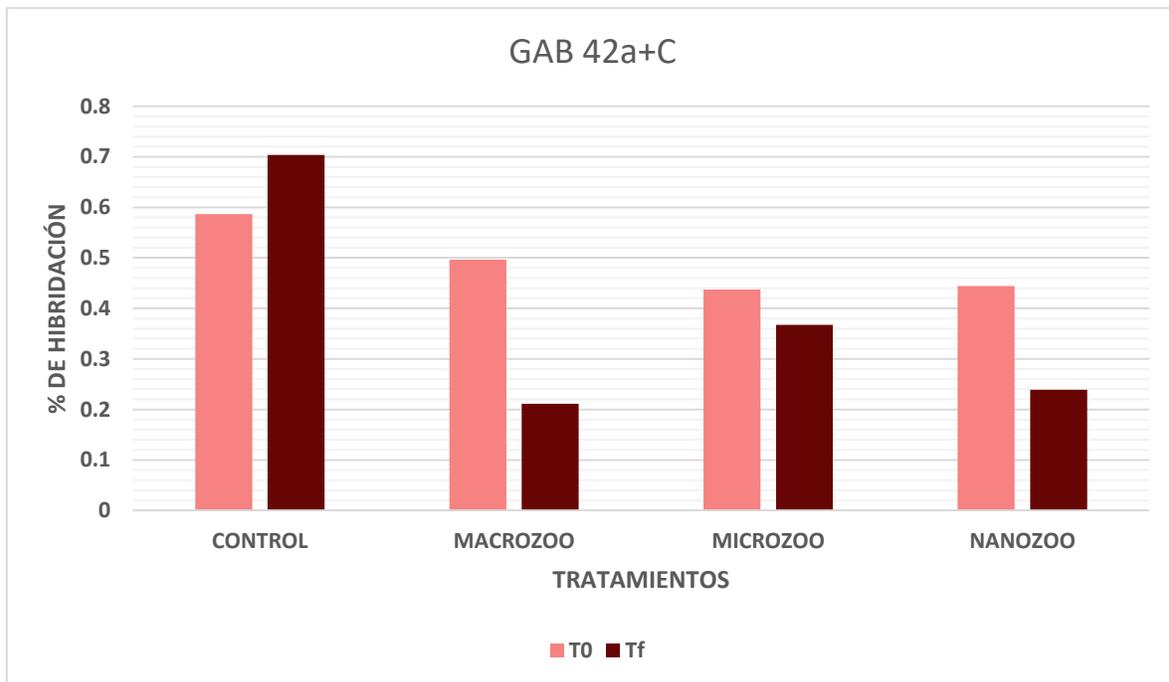


Figura 27: Promedio de porcentaje de hibridación para la clase *Gammaproteobacteria* (GAM 42a+C), en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Clase *Alphaproteobacteria* (ALF 968)

Comparación por tiempos.

Dentro de las sondas utilizadas en CARD-FISH pertenecientes al Phylum *Proteobacteria*, la clase *Alphaproteobacteria* presentó los porcentajes de hibridación

más bajos para para el lago Atexcac. Presentando valores promedio que rondaban el 0.2% para todos los tratamientos en T_0 , con $H= 2.02$, $p>0.05$.

Por otro lado, en T_f los porcentajes de hibridación variaron desde 0% (botella con macrozooplancton) hasta 0.19% (control). Sin embargo, estas variaciones no representaron una diferencia estadísticamente significativa ($H= 1.01$, $p>0.05$).

Comparación de T_0 a T_f .

A pesar de que no se tuvieron diferencias significativas para ningún tratamiento desde su T_0 hasta su T_f , en la botella con copépodos no se detectaron células hibridadas para la sonda ALF 968 tras finalizar el experimento (Figura 28).

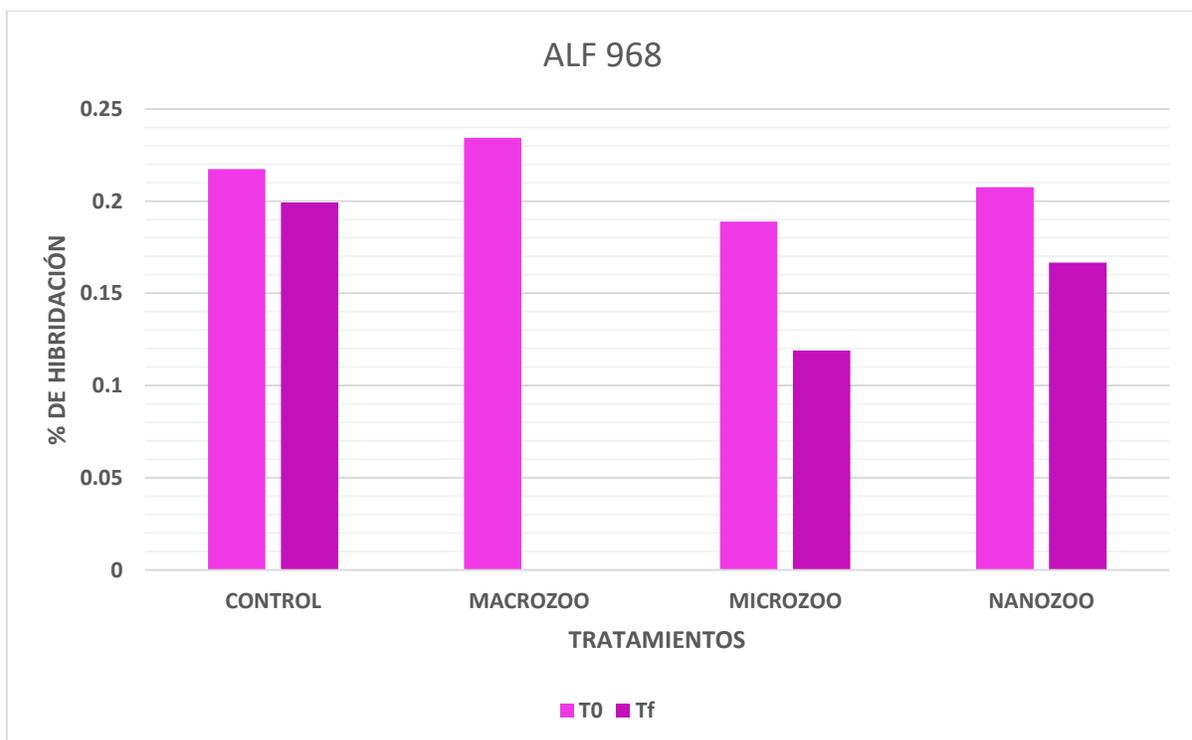


Figura 28: Promedio de porcentaje de hibridación para la clase *Alphaproteobacteria* (ALF 968), en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Clado *LD12* (LD12 121)

Comparación por tiempos.

Al comenzar el experimento el clado *LD12* no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las 4 incubaciones ($H= 2.17$, $p>0.05$), con valores promedio desde 1.11% (control) hasta 0.28% (botella con nanoflagelados).

Por otro lado, al término de la incubación el tratamiento con microzooplancton presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a la botella control ($W= -150.0$, $p<0.01$), con macrozooplancton ($W= -90.0$, $p<0.05$) y con nanoflagelados ($W= 60.0$, $p<0.05$).

Comparación de T_0 a T_f .

El tratamiento con microzooplancton fue el único en presentar diferencias significativas al finalizar el experimento ($W= -75.0$, $p<0.05$). Esto como consecuencia de la disminución en el porcentaje de hibridación, de 0.5% inicial a 0.0% final (Figura 29).

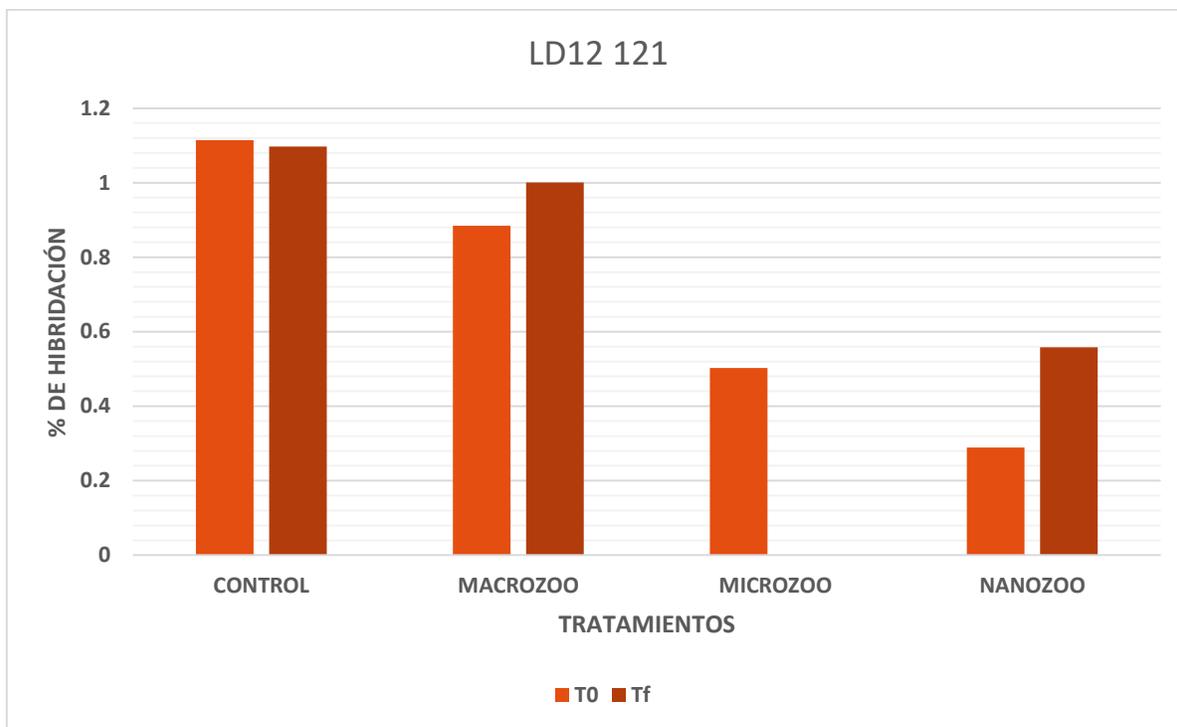


Figura 29: Promedio de porcentaje de hibridación para el clado *LD12* (LD12 121), en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Género *Paracoccus* (PAR 1457)

Comparación por tiempos.

Tanto al inicio como al final del experimento la son PAR 1457 específica al género *Paracoccus* no presentó diferencias estadísticamente significativas, $H= 5.86$, $p>0.05$ y $H= 1.52$, $p>0.05$, respectivamente.

Comparación de T_0 a T_f .

Al igual que el contraste entre tratamientos (Kruskal-Wallis), al comparar cada incubación de T_0 a T_f (Mann-Whitney-Wilcoxon) solo se hallaron variaciones que no representaron una diferencia significativa (Figura 30).

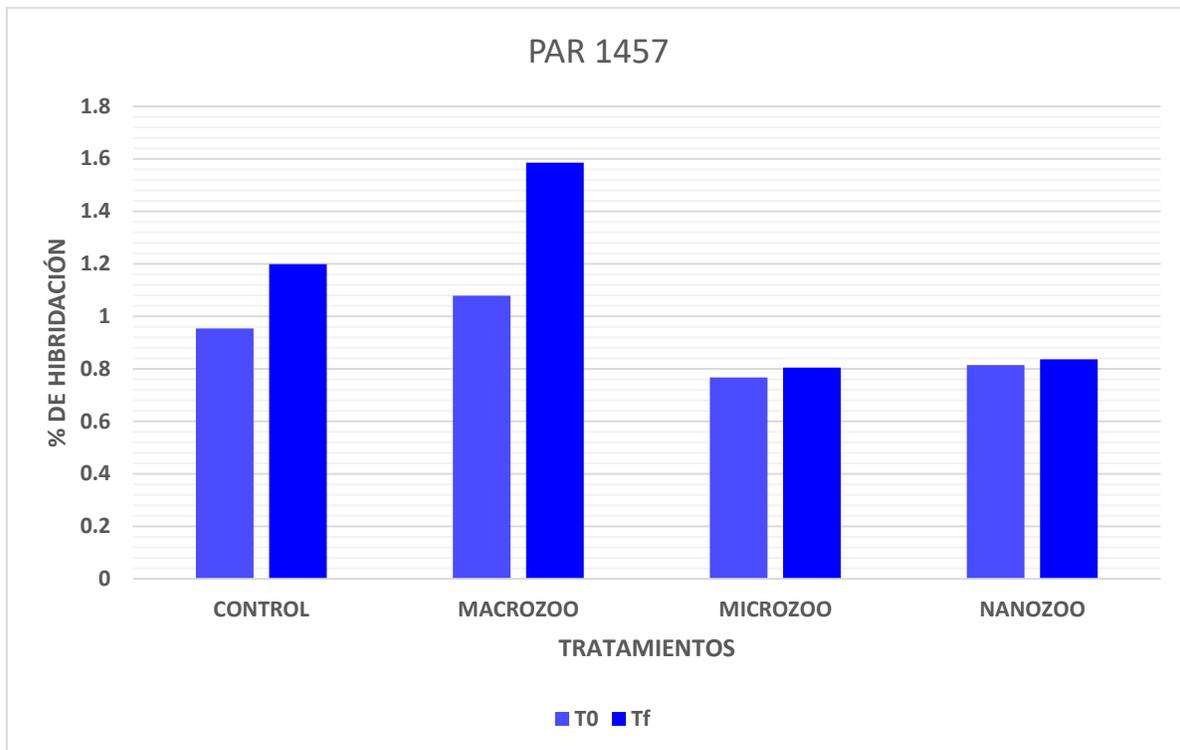


Figura 30: Promedio de porcentaje de hibridación para género *Paracoccus* (PAR 1457), en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Phyllum *Bacteroidetes* (CF3 19a)

Para el Phyllum *Bacteroidetes* se reportó el menor porcentaje de hibridación en el lago Atexcac, obteniendo un valor promedio máximo de 0.24%.

Comparación por tiempos.

Tanto en el tiempo inicial como para el final no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con $H= 0.69$, $p>0.05$ y $H= 5.31$, $p>0.05$, respectivamente.

Comparación de T_0 a T_f .

Dentro de este apartado tampoco se tuvieron diferencias en ninguna incubación. Sin embargo, al observar el porcentaje de hibridación promedio para cada

tratamiento se perciben cambios: el testigo pasó de tener un porcentaje promedio inicial de 0.18% a un 0.34% final; la incubación con microzooplancton registró una media inicial de 0.24% y terminó con 0.10%; mientras que la botella con nanoflagelados finalizó con un porcentaje de hibridación de 0.0% (Figura 31).

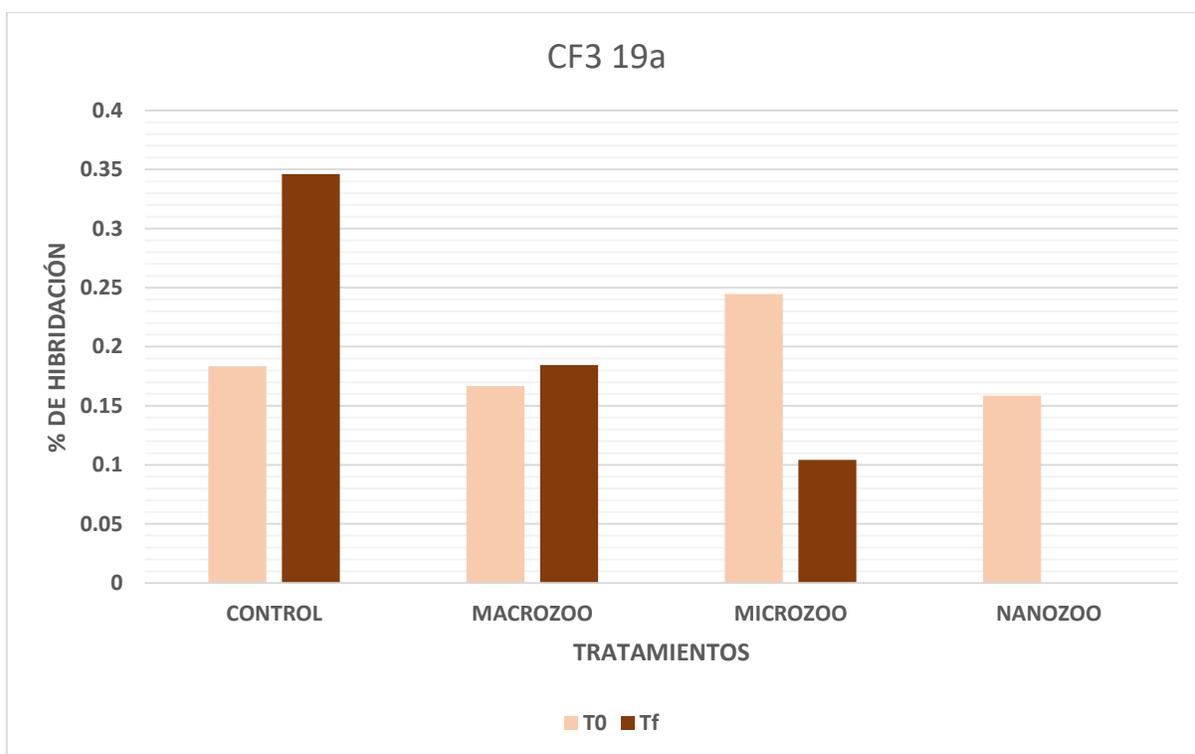


Figura 31: Promedio de porcentaje de hibridación para el Phylum *Bacteroidetes* (CF3 19a), en donde se muestra el tiempo inicial (T₀) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Phylum *Planctomycetes* (PLA 886)

Comparación por tiempos.

Al empezar el experimento (T₀) el porcentaje de hibridación promedio para la sonda PLA886 presentó algunas variaciones, siendo 3.31% el más alto (macrozooplancton) y 2.29% el menor (nanozooplancton) (Figura 32). No obstante, estas variaciones no significaron alguna diferencia estadística $H= 1.99, p>0.05$.

Por otro lado, las hibridaciones para cada incubación en T_f resultaron ser similares (Figura 32) por lo que no se encontraron diferencias estadísticas $H= 4.95$, $p>0.05$.

Todos los tratamientos presentaron la misma tendencia disminuir su porcentaje de hibridación tras finalizar la incubación

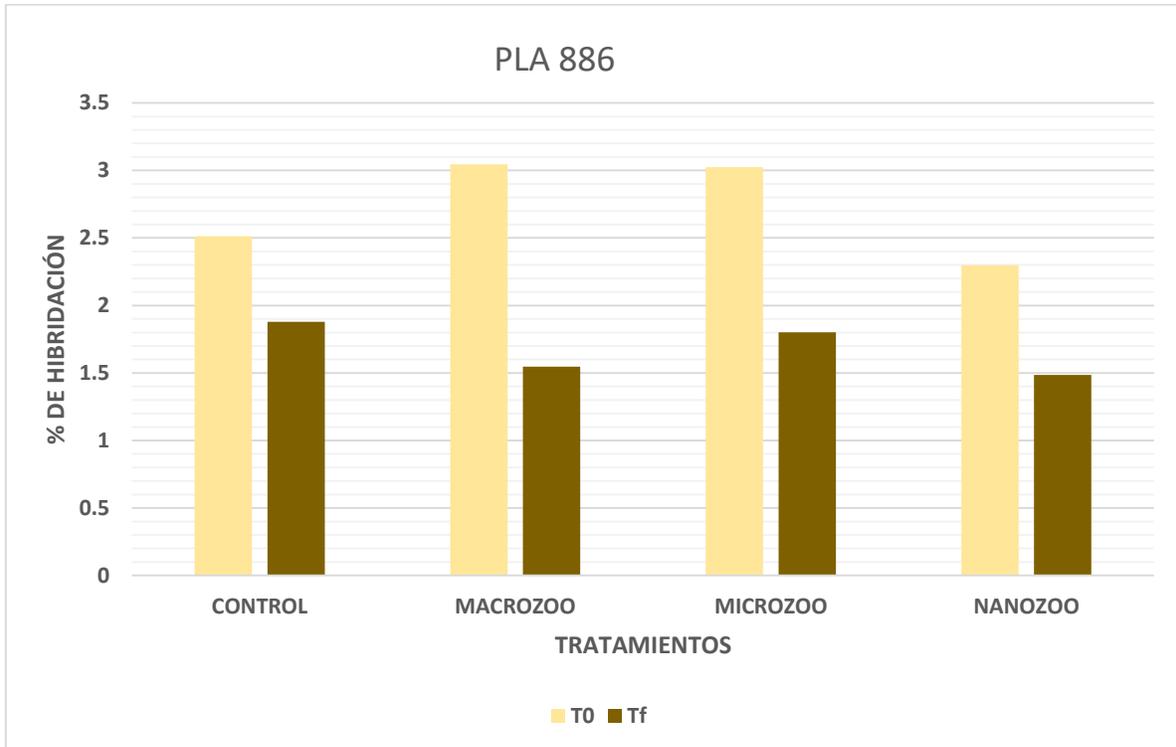


Figura 32: Promedio de porcentaje de hibridación para el Phylum *Planctomycetes* (PLA 886), en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Sulfatoreductoras (SRB 385)

Comparación por tiempos.

Los porcentajes de hibridación para el grupo de las bacterias sulfatoreductoras empezaron el experimento sin presentar diferencias estadísticas ($H= 4.48$, $p>0.05$). Siendo el tratamiento con copépodos quien obtuvo el menor promedio de células hibridadas (0.24%); y la botella testigo el de mayor media (0.70%) (Figura 33).

Pero al término del experimento el tratamiento con microzooplancton presentó diferencias estadísticas con el testigo ($W = -213.5$, $p < 0.01$), la incubación con copépodos ($W = -75.0$, $p < 0.05$) y la botella con nanozoooplancton ($W = 105.0$, $p < 0.01$).

Mientras que la botella control contrastó con el tratamiento de macrozooplancton ($W = -156.0$, $p < 0.01$) y la incubación de nanoflagelados ($W = -133.0$, $p < 0.05$).

Comparación de T_0 a T_f .

La incubación con microzooplancton demostró ser estadísticamente diferente de principio a fin en el experimento ($W = -75.5$, $p < 0.05$), la cual presentó un decremento en la hibridación de células, empezando con un promedio de 0.63% y finalizó con una media de 0.07% (Figura 33).

Mientras que en el control los porcentajes de hibridación tras concluir la incubación fueron mayores que en un inicio, iniciando con un promedio de 0.70% y terminando con una media de 1.58%, con $W = 585.5$, $p < 0.05$ (Figura 33).

Al contrario del microzooplancton y el control, los demás tratamientos sufrieron un incremento en su porcentaje de hibridación promedio: macrozooplancton de 0.24% a 0.79%; y nanozoooplancton de 0.27% a 0.51%. no obstante, estas variaciones no representaron alguna diferencia estadística (Figura 33).

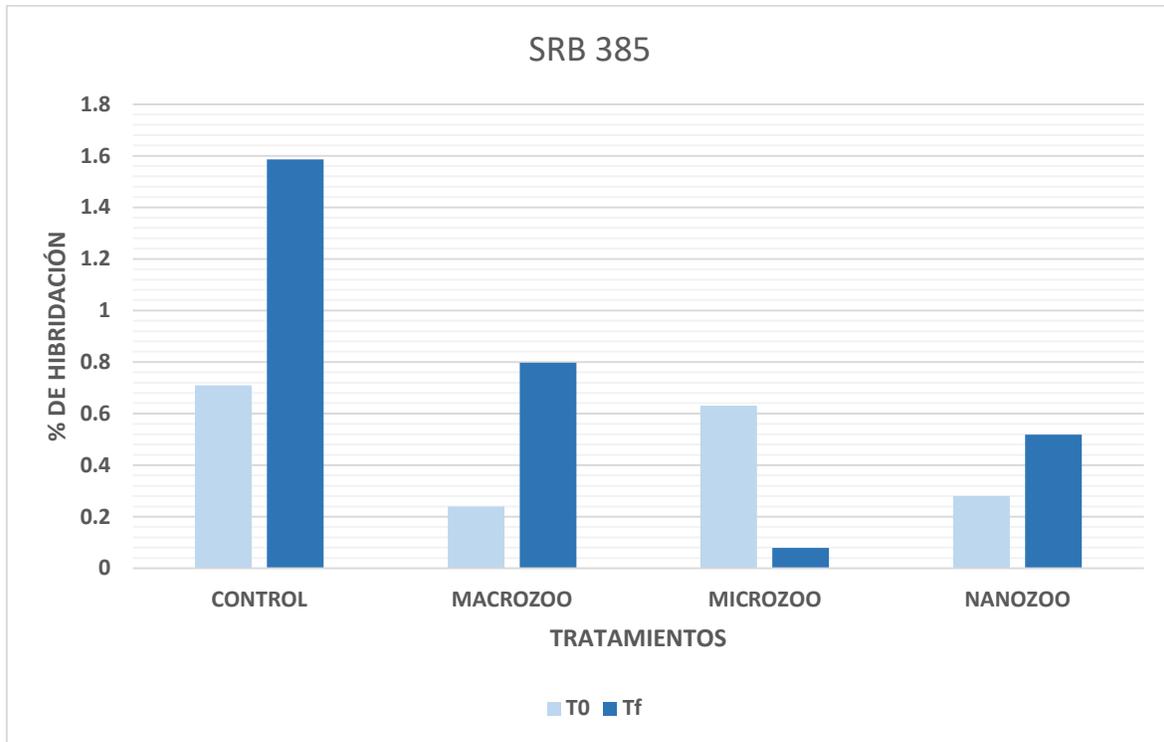


Figura 33: Promedio de porcentaje de hibridación para el grupo de bacterias sulfatoreductoras (SRB 385), en donde se muestra el tiempo inicial (T_0) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Phyllum *Actinobacteria* (HGC 69a)

Comparación por tiempos.

Los porcentajes de hibridación para el Phyllum *Actinobacteria* empezaron el experimento con variación significativas entre los distintos tratamientos ($H= 29.20$, $p<0.01$), con valores promedio que fueron desde 3.71% hasta 5.69% (Figura 36).

En T_0 la botella con copépodos presentó valores menores con respecto al testigo ($W= -237.0$, $p<0.01$) y al tratamiento con microzooplancton ($W= 168.5$ $p<0.01$), mientras que la incubación con nanoflagelados obtuvo diferencias con el control ($W= -298.0$, $p<0.01$) y el microzooplancton ($W= -233.0$, $p<0.01$) (Figura 34).

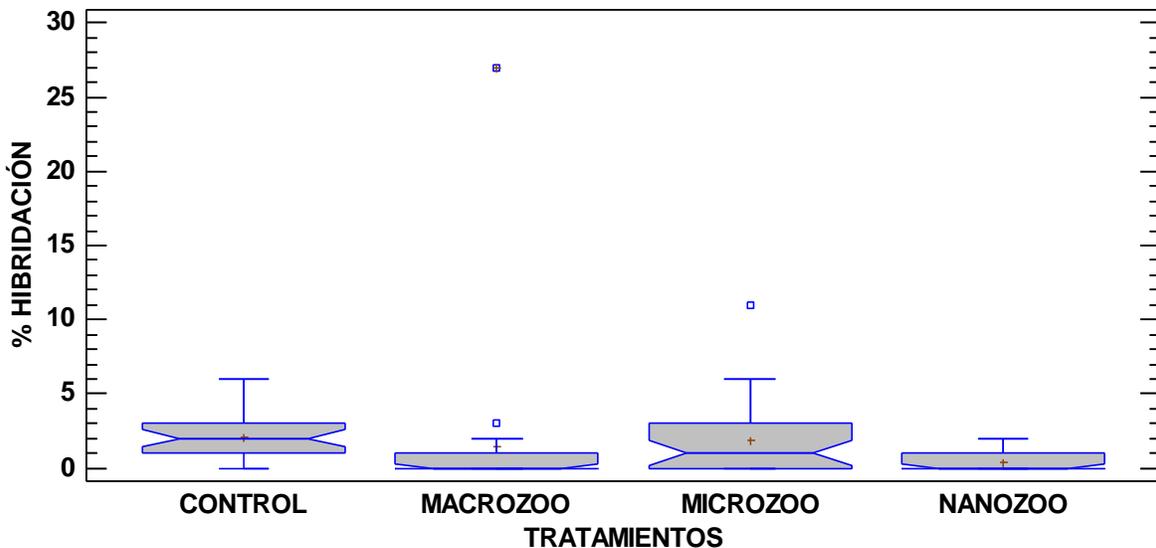


Figura 34: Cajas múltiples con muesca del porcentaje de hibridación al inicio del experimento (T_0) para el Phylum *Actinobacteria* (HGC 69a).

Al concluir el experimento (T_f) aún se presentaron diferencias ($H= 39.34$, $p<0.01$).

El porcentaje de hibridación para la botella con nanoflagelados ya no las presentó con el testigo, pero si con las incubaciones con copépodos ($W= -268.0$, $p<0.01$) y con microzooplancton ($W= 153.0$, $p<0.05$). Mientras que este último tratamiento mantuvo variaciones estadísticamente significativas con la botella de macrozooplancton ($W= -349.5$, $p<0.01$) (Figura 35).

Tras finalizar el experimento el tratamiento con copépodos registró el mayor porcentaje hibridación de las 4 incubaciones, con un promedio de 8.16% (Figura 35).

Comparación de T_0 a T_f .

Las variaciones que ocurrieron de un principio al final de cada incubación resultaron ser estadísticamente diferentes para todos los tratamientos.

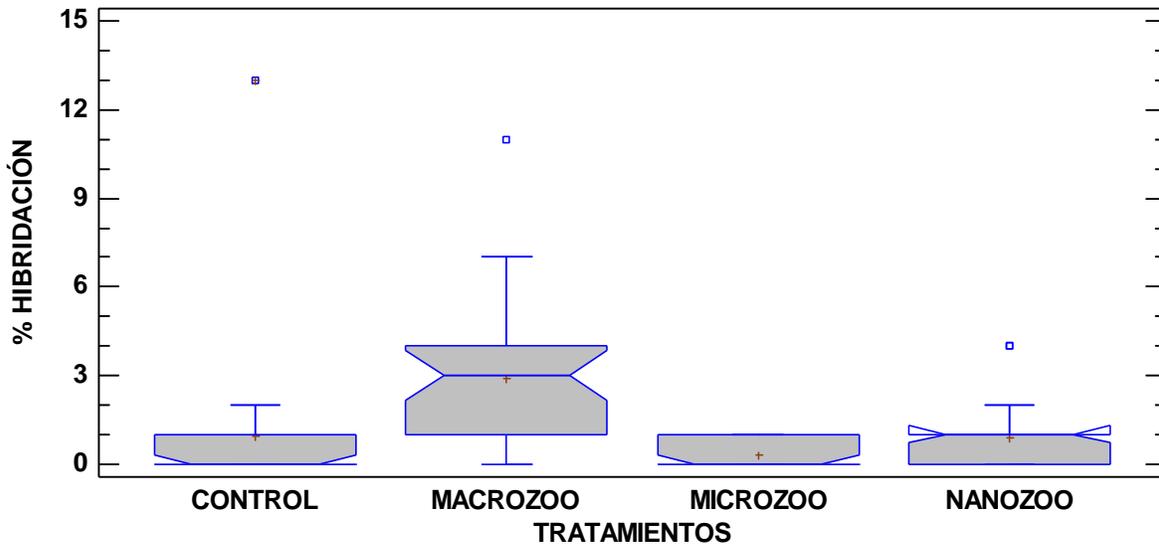


Figura 35: Cajas múltiples con muesca del porcentaje de hibridación al finalizar del experimento (T_f) para el Phylum *Actinobacteria* (HGC 69a).

El testigo exhibió un descenso en el porcentaje de hibridación que se ve reflejado en el promedio de hibridación que pasó de 5.69% inicial a 4.74% final, derivando en una diferencia estadísticamente significativa ($W = -242.5$, $p < 0.01$).

Para el caso de la botella con copépodos los valores de hibridación presentaron un aumento al término del experimento ($W = 288.5$, $p < 0.01$), apreciado en el porcentaje medio de hibridación que comenzó con 4.46% y terminó con un promedio de 8.16% (Figura 36).

En la botella con microzooplancton se observó el cambio más notorio, con una baja en el porcentaje de hibridación ($W = -243.0$, $p < 0.01$) expresado en el promedio de este que inicio con 5.50% y termino con 1.14% (Figura 36).

Finalmente, para la incubación con nanoflagelados, al igual que el testigo y el tratamiento con microzooplancton, el cambio en la hibridación registrada resultó en una disminución, pasando de un promedio inicial de 3.71% a 2.00% (Figura 36).

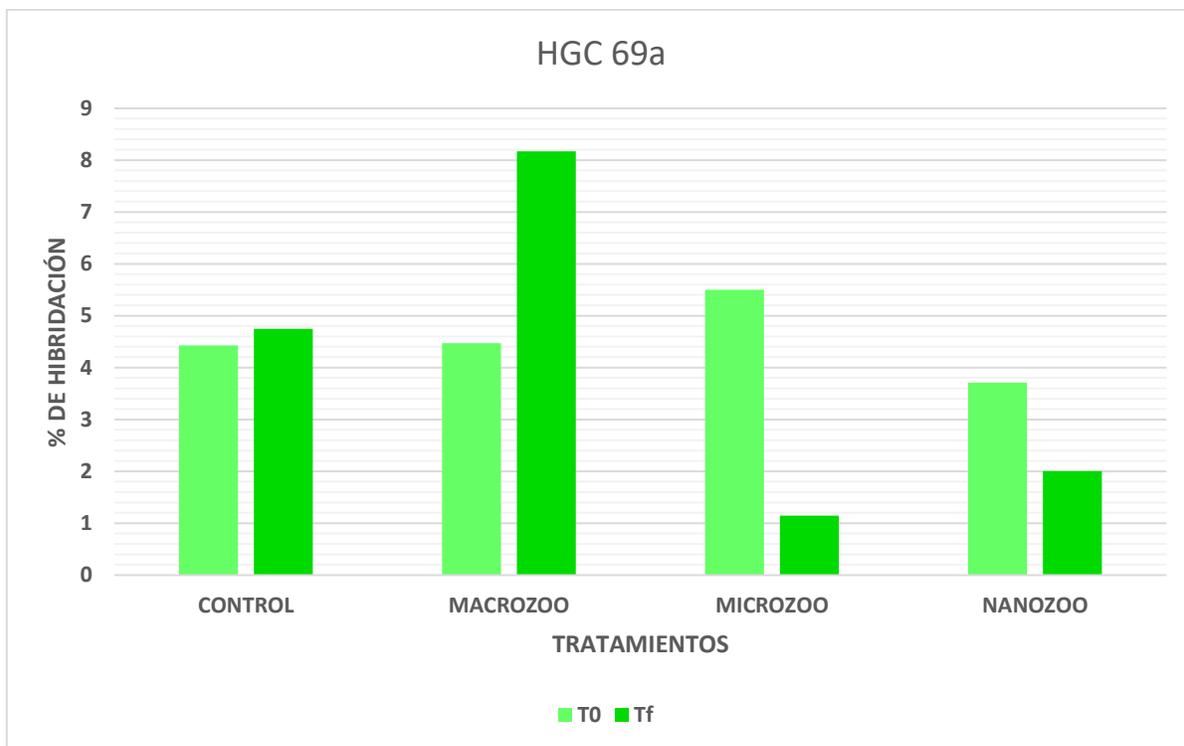


Figura 36: Promedio de porcentaje de hibridación para el Phylum *Actinobacteria* (HGC 69a), en donde se muestra el tiempo inicial (T₀) y el tiempo final del experimento (T_f) para cada tratamiento.

Phylum *Thaumarchaeota* (CREN 335)

Para el lago Atexcac no se reportó la presencia del Phylum *Thaumarchaeota* para ninguna de las distintas incubaciones y tiempos.

DISCUSIÓN

PPH

La densidad promedio de picoplancton heterotrófico registrada al inicio del experimento de 3.57×10^6 cél. mL⁻¹ concuerda con lo reportado por Arellano & González (2011) y Vizuet (2015), mientras que resultó mayor que lo citado en años anteriores (Macek *et al.*, 1994; Laguna & Matínez, 2015; Arellano *et al.*, 2017)

La disminución presentada en el T_0 para los tratamientos con microzooplancton y nanoflagelados (Figura 5) puede ser resultado de las filtraciones realizadas para la separación de los distintos depredadores (por 63 μm y 8 μm) y responde de manera similar al efecto reportado por Grossart *et al.* (2008) en el que registra una baja en la densidad del picoplancton heterotrófico después de filtrar por membranas de 5 μm . Mientras que el aumento del PPH en la incubación con copépodos se le atribuye a que en este tratamiento no se utilizó ninguna filtración dejando pasar a todo el bacterioplancton presente.

No obstante, tras concluir la incubación estas diferencias desaparecieron dejando a los tratamientos con macrozooplancton, microzooplancton y testigo con una densidad bacteriana muy similar entre ellos, así como sucede en algunos estudios de laboratorio en los que pasadas 24 horas la población de bacterias heterotróficas llega a una asíntota (Langenheder & Jürgens, 2001).

Por otro lado, el hecho de que la incubación con nanoflagelados presentó los valores de densidad del bacterioplancton más bajos indica que este grupo de protozoarios ejerció una presión de selección sobre el PPH mayor que los demás depredadores usados en el experimento (copépodos y microzooplancton), alimentándose de las bacterias heterotróficas, cumpliendo así su papel como principal depredador de la biomasa bacteriana (Porter K. , 1988; Berninger *et al.*, 1991; Riemann *et al.*, 1995; Šimek *et al.*, 1995; Kalff, 2002).

Originalmente se había postulado que al incrementar la densidad del microzooplancton, estos se comerían a los nanoflagelados y por este motivo el

picoplancton heterotrófico aumentaría, este efecto final (incremento de PPH) se pudo observar en la incubación ($W= 877.0$, $p<0.05$) (Figura 6). Sin embargo, la sucesión de hechos propuesta no pudo ser confirmada ya que la cantidad de nanoflagelados heterotróficos no se vio estadísticamente afectada ($W= 4373.0$, $p>0.05$), por lo que el crecimiento en la densidad de PPH se podría entender como un crecimiento poblacional natural por parte de este grupo hasta llegar a una cantidad continua de bacterias por mL (Langenheder & Jürgens, 2001).

En cuanto al seguimiento en la botella con copépodos añadidos el resultado al concluir el experimento reflejó un decremento en la cantidad de bacterias heterotróficas presentes en la muestra y de la misma forma que con el tratamiento anterior se cumple el efecto final de la hipótesis planteada, en donde se postuló que el macrozooplancton se comería al microzooplancton por lo que los nanoflagelados consumirían al PPH provocando decrementos en la densidad bacteriana, el bacterioplancton si disminuyó (Figura 7) pero no por efecto de los nanoflagelados ya que estos en lugar de aumentar presentaron una densidad menor al término del experimento (Figura 18).

Este decaimiento en la densidad de PPH en la botella de macrozooplancton se puede explicar a partir de la disminución de picoplancton autotrófico para esta misma incubación (Figura 14) debido a las interacciones de mutualismo que existen entre estos dos grupos (Azam & Malfatti, 2007) ya que el fitoplancton, y para este caso la fracción más pequeña, aporta el mayor recurso de carbón orgánico disuelto para las bacterias heterotróficas (Mague *et al.*, 1980; Karl *et al.*, 1998; Sarmiento & Gasol, 2012).

Contrario a lo que se esperaba en un inicio, la morfología del bacterioplancton no cambió a formas filamentosas, como se ha citado en algunos ensayos (Pernthaler *et al.*, 1996; Hahn & Höfle, 2001; Langenheder & Jürgens, 2001; Jürgens & Matz, 2002). Esto podría deberse a que en experimentos de laboratorio (Pernthaler *et al.*, 1997, 2001; Šimek *et al.*, 1997; Posch *et al.*, 2001; Salcher *et al.*, 2005) e *in situ* (Jürgens *et al.*, 1999; Langenheder & Jürgens, 2001; Šimek *et al.*, 2001, 2003; Gasol *et al.*, 2002; Grossart *et al.*, 2008) los cambios en la morfología de este grupo de organismos procariontes se encontraron aproximadamente a partir de las 48 horas de experimentación y los experimentos del presente estudio se llevaron a cabo solo hasta las 24 horas.

No obstante, en las botellas con nanoflagelados y macrozooplancton se dio una reducción en el tamaño celular (Figura 9).

Para el primer caso la contracción en el volumen celular se adjudica como una respuesta para evitar la depredación por pastoreo de estos protozoarios sobre el picoplancton heterotrófico y así salir del rango de partículas ingeribles de los NFH (González *et al.*, 1990; Pernthaler *et al.*, 2005). Esto habla de la plasticidad que poseen las bacterias y la rapidez con la que se adaptan ante nuevos estímulos a corto plazo, y que se hace más evidentes cuando se manejan periodos experimentales que van desde días hasta 1 mes (Šimek *et al.*, 1997; Posch *et al.*, 1999; Salcher *et al.*, 2005, 2007; Grossart *et al.*, 2008).

PPA

Callieri *et al.* (2013) reporta que el picoplancton autotrófico para el lago Atexcac esta conformado por picocinaobacterias del género *Synechococcus* que están separadas filogenéticamente de las clasificadas dentro del mismo género como halotolerantes de los otros lagos atalasoalinos de la Cuenca Oriental.

La densidad promedio de picoplancton autotrófico registrada al inicio del experimento de 1.23×10^6 cél. mL⁻¹ resultó ser mayor, en un orden de magnitud, que lo citado en años anteriores para el mismo lago (Arellano & González, 2011; Laguna & Matínez, 2015; Vizuet, 2015; Arellano *et al.*, 2017)

PPA individual.

La formación de los dos grupos en el picoplancton autotrófico (Figura 12) puede explicarse a partir de las filtraciones utilizadas para separar a los distintos depredadores, ya que los tratamientos que registraron la mayor densidad de PPA resultaron ser en donde no se realizó filtrado alguno.

La disminución en la densidad de picoplancton autotrófico para los tratamientos con microzooplancton y nanoflagelados se atribuye al filtrado con la malla de 63 μm el primero y adicionalmente de 8 μm el segundo. Debido, principalmente, a que en la primera filtración el agua quedaba retenida en la malla, porque los poros se obstruían con los organismos de talla mayor impidiendo el paso de esta y como resultado el PPA también resultaba retenido en la misma membrana. Dado que el picoplancton heterotrófico es más pequeño que el autotrófico es congruente pensar

que el efecto reportado por Grossart *et al.* (2008) para el bacterioplancton es igualmente aplicable para el PPA.

Mientras que la filtración adicional a través de 3 μm en la botella con nanozooplancton no significó ninguna diferencia al efecto con la de 63 μm , al igual que lo observa Grossart *et al.* (2008) para membranas de 5 μm y 0.8 μm .

A pesar de estas diferencias al empezar el experimento, cada incubación presentó diferencias al terminar el experimento.

A pesar de que en las muestras evaluadas en el microscopio se observara el consumo aparente del PPA por parte de los nanoflagelados (Figura 19), en el tratamiento con estos protozoarios la densidad del picoplancton autotrófico individual aumento, en lugar de disminuir como se hubiera esperado.

Este comportamiento, junto con el hecho de que para este mismo tratamiento la densidad del bacterioplancton disminuyó, lleva a confirmar que los NFH se alimentan principalmente de PPH como ha sido reportado por diversos autores (Porter K. , 1988; Berninger *et al.*, 1991; Riemann *et al.*, 1995; Šimek *et al.*, 1995; Kalf, 2002) pero al tener otro recurso alimenticio de mayores tallas, y por consiguiente mayor contenido de carbono, como lo es el PPA, también lo pueden estar aprovechando (Hagström *et al.*, 1988; Klut & Stockner, 1991; Hahn *et al.*, 2000; Crosbie *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2004; Tarbe *et al.*, 2011) una posible explicación para este comportamiento es que, al momento de seleccionar su alimento, estos organismos pueden tener preferencia por los individuos de mayores tallas (González *et al.*, 1990) aunque habría que considerar su palatabilidad.

Para el tratamiento con microzooplancton la densidad de células individuales del picoplancton autotrófico se vio reducida al término del experimento, este efecto se atribuye al consumo del PPA por parte de los ciliados (que se encuentran dentro del microzooplancton), ya que estos pueden obtener todos sus requerimientos de carbono en una dieta a base exclusivamente de este tipo de picoplancton (Macek *et al.*, 1994; Šimek *et al.*, 1996)

Por otro lado en la incubación con copépodos la cantidad de células individuales de *Synechococcus* se vio reducida significativamente lo que lleva a pensar en el copépodo *Leptodiatomus cf. sicilis* como el responsable de esta disminución.

Aunque algunos autores mencionan que los copépodos no consumen cianobacterias (McNaught *et al.* 1980) los resultados de este experimento contradicen esa afirmación al igual que lo encuentran otros autores (Work & Havens, 2003). Y puesto que los nanoflagelados también presentaron un decremento en su densidad para este tratamiento, este descenso no puede ser atribuido a ellos.

Colonias de PPA

Al igual que ocurrió con la densidad de PPA individual, el número de colonias presentes se vio afectada por las filtraciones, con la diferencia de que en el tratamiento con nanozooplancton esta cantidad se vio reducida por la filtración con membrana de 3 μm .

Al finalizar la incubación, el tratamiento con copépodos terminó con una cantidad mayor de colonias que las botellas testigo y con nanoflagelados por lo que se lleva a suponer que el copépodo es capaz de consumir estos organismos propiciado la

formación de colonias como un mecanismo de defensa (Stockner & Antia, 1986; Callieri & Stockner, 2002). Se ha reportado que tanto los copépodos ciclopoideos como los calanoideos son eficaces en el pastoreo selectivo de ciliados (Burns & Gilbert, 1993; Wiackowski *et al.*, 1994; Wickham, 1995), lo que haría suponer que el microzooplancton una vez que ha sido consumido por el macrozooplancton calanoide excedente agregado en los experimentos, puede emplear como fuente alternativa de alimento a las PPA.

Este decremento en la población de *Synechococcus* deja en claro que a pesar de que las cianobacterias y las picocianobacterias son conocidas por presentar toxinas (Jakubowska & Szeląg-Wasielewska, 2015) estas parecen no afectar a los copépodos (Hairston *et al.*, 2001; Aliger *et al.*, 2010, 2016). Lo que indica que, al carecer de su fuente predilecta de alimento, el fitoplancton eucarionte, el copépodo *Leptodiptomus cf. sicilis*, opta por consumir la fuente de alimento más abundante en el lago Atexcac, picoplancton autotrófico (López-Vázquez, datos no publicados).

La subsecuente disminución en la densidad de NFH para este mismo tratamiento puede demostrar que el copépodo se adapta a todas las fuentes de alimento que tiene disponibles, así como lo reporta Motwani & Gorokhova (2013).

El hecho de que el número de colonias disminuyera en el tratamiento con nanozooplancton confirma que este grupo de protozoarios no se centra en consumir al PPA ya que, en general, la membrana celular de *Synechococcus* es mas gruesa que la mayoría de las bacterias Gram negativas (Hoiczuk & Hansel, 2000) y a los nanoflagelados les cuesta mas trabajo el poder romper esta mebrana y digerir las

celulas de PPA (Callieri *et al.*, 2002) contradiciendo la supuesta “preferencia” de los NFH por estos organismos autotróficos (Christoffersen, 1994; Pernthaler *et al.*, 1996) .

Número de celulas que conforman la colonia.

El aumento en este parámetro dentro de la incubación con copépodos indica que, además de incrementar la cantidad de colonias, estas se volvieron más grandes. Esta formación de colonias, a pesar de servir como mecanismo de defensa contra la depredación de nanoflagelados al proporcionar refugio a las células (Redfield, 2002), al mismo tiempo las vuelve más susceptibles a ser consumidos por depredadores de mayores tallas (Pernthaler & Amann, 2005).

En la incubación con microzooplancton no se vio un aumento en la densidad de colonias, sin embargo, el tamaño de estas sí, terminando con un mayor número de agregados grandes (Figura 16) como una respuesta defensiva al pastoreo (Jezberová & Komárková, 2007) promovido por el consumo del microzooplancton (Šimek *et al.*, 1996). Lo cual convierte al PPA en un importante recurso de carbono para protozoarios (Nagata, 1988; Sanders *et al.*, 1989; Weisse *et al.*, 1990; Šimek *et al.*, 1995; Pomeroy *et al.* 2007; Parvathi *et al.*, 2014) ya que constituye más del 98% de la biomasa y producción fitoplanctónica en aguas oceánicas (Stockner, 1988; Sorokin *et al.*, 2004).

CARD-FISH

Dominio *Archaea* (ARCH 915)

El número de células hibridadas para la incubación con copépodos puede ser resultado de un incremento en el amonio de la muestra, resultado de los productos de excreción de estos organismos. Un estudio en tres lagos oligotróficos de alta montaña reveló que los cambios temporales en la diversidad y abundancia de las archaeas oxidantes de amonio (AOA) en la superficie están ligada al incremento en verano con la concentración de amonio y nitritos (Auguet *et al.*, 2001).

Por otra parte, en el experimento se encontró un decremento en el porcentaje de hibridación de *Archaea* en el tratamiento de nanoflagelados, lo que no concuerda con lo reportado por Gereá *et al.* (2013) quienes no registraron una depredación de este dominio por parte de nanoflagelados heterotróficos, mixotróficos y ciliados. Sin embargo, la abundancia encontrada en el lago Atexcac corresponde con lo citado por el mismo autor, con hibridaciones menores al 1%, al igual que para lo reportado en el lago Alchichica (Hernández-Avilés *et al.*, 2010).

A partir de las poca o nula variación obtenida de T_0 a T_f se propone que este dominio aparentemente no es consumido por ningún depredador en el lago Atexcac, como lo supone Gereá *et al.* (2013).

Dominio *Bacteria* (EUB I-III)

Siguiendo las hipótesis postuladas, el macrozooplancton consumiría al microzooplancton, dejando de esta manera a los nanoflagelados sin algún

depredador y estos se alimentarían a su vez de las bacterias explicando así la disminución observada en las mismas. Sin embargo, al comparar los resultados del tratamiento en donde se incrementó el número de nanoflagelados no se observó ninguna disminución bacteriana considerable con respecto al control, por lo que dentro del Lago Atexcac no se está siguiendo este supuesto y se infiere que el macrozooplancton al consumir principalmente al fitoplancton influye de manera indirecta en alguna fuente de recursos indispensable para las bacterias, como puede ser los exudados que liberan estos organismos fotoautótrofos (Baines & Pace, 1991).

Clase *Betaproteobacteria* (BET 42a+C)

Los altos valores de hibridación presentados por la clase *Betaproteobacteria* responden a su alta distribución en cuerpos de agua dulce (Glöckner *et al.*, 1999).

Al igual que para la sonda general del dominio *Bacteria*, la clase *Betaproteobacteria* presentó una alta susceptibilidad a los cambios provocados por el copépodo *Leptodiatomus cf. sicilis*, provocando una disminución en su porcentaje de hibridación (Figura 26) a consecuencia del consumo de este crustáceo de *Synechococcus* (Figura 14) afectando indirectamente al bacterioplancton.

Esta propuesta se deriva de la interacción entre el bacterioplancton y el fitoplancton, en donde las excreciones de este organismo autotrófico y su lisis celular sirven como una fuente de carbono orgánico disuelto para los procariontes heterotróficos y, a su vez, la mineralización de esta materia orgánica provee nutrientes para los productores primarios (Zlotnik & Dubinsky, 1989).

La baja variación presente en el tratamiento con nanozooplankton indica que la clase bacteriana *Betaproteobacteria* no es muy depredada por los NFH, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Jezbera *et al.*, 2005; Salcher *et al.*, 2005; Gereá *et al.*, 2013).

El hecho de que en el tratamiento con microzooplankton el porcentaje de hibridación haya sido mayor que en las demás incubaciones indica que este grupo de depredadores no presentan una particular preferencia a consumir a este grupo bacteriano (Figura 26).

Clase *Gammaproteobacteria* (GAM 42a+C)

Los bajos porcentajes de hibridación para la clase *Gammaproteobacteria* responden a que estos organismos son poco abundantes en cuerpos de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002). Además, ya que estos organismos son copiotróficos (Zavarzin *et al.*, 1991), al encontrarse en un ambiente oligo-mesotrófico, como lo es el lago de Atexcac (Cárcamo, 2017), sus poblaciones se ven reducidas.

Debido a que la incubación en donde se aumentó la población de copépodos presentó el mayor decremento en el porcentaje de hibridación se puede asumir que este grupo, al igual que en las sondas anteriores, ejerce una presión de selección de mayor intensidad sobre el bacterioplankton directa o indirectamente.

El incremento inicial registrado en la botella testigo responde de manera similar a lo reportado por Šimek *et al.* (2005).

Para el tratamiento con nanoflagelados la disminución observada en el porcentaje de hibridación (Figura 27) se atribuye a que estos protozoarios seleccionaron activamente a las bacterias de esta clase, de manera similar a como ocurre en otros experimentos (Jezbera *et al.*, 2005)

Clase *Alphaproteobacteria* (ALF 968)

Para la clase de *Alphaproteobacteria* se encontró que, con excepción del tratamiento de macrozooplancton (Figura 28), los tratamientos no presentaron un cambio importante con respecto al control, caso que ha sido documentado a través de diversos estudios, demostrando, al menos al nivel de clase ser resistentes a la depredación (Jürgens & Jeppesen, 2000; Langenheder & Jürgens, 2001; Šimek *et al.*, 2001; Salcher *et al.*, 2005; Comté *et al.*, 2006; Gereá *et al.*, 2013)

Mientras que la reducción en el porcentaje de hibridación para el tratamiento con copépodos es relacionada con la ingesta por parte de estos del PPA, afectando de manera indirecta al bacterioplancton, debido a la relación bacterias autotróficas-heterotróficas.

Por otro lado, los bajos porcentajes de hibridación registrados puede responder a que la clase *Alphaproteobacteria* son raras en la zona limnética en la mayoría de los sistemas lacustres, caso contrario para el marino, con unas algunas excepciones (Abe *et al.*, 2003; Kirchman *et al.*, 2004; Nishimura & Nagata, 2007) aunque hay grupos específicos muy abundantes, como lo es *LD12*.

Clado LD12 (LD12 121)

La sonda utilizada para la detección de la mayoría de *Alphaproteobacteria* (ALF 968) (Amann & Fuchs, 2008) no es adecuada para la identificación de LD12 debido a que presenta incompatibilidades con el genoma de este clado (Salcher *et al.*, 2011).

La mínima cantidad de células hibridadas encontradas en el lago Atexcac (Figura 29) se debe a la tendencia del grupo a distribuirse al epilimnion, tal como lo reporta Salcher *et al.* (2011) quienes, al comparar cuerpos acuáticos en distintos estados tróficos en latitudes templadas, concluyen que LD12 prefiere este estrato, encontrando estos autores bajas proporciones en el hipolimnion.

Esta tendencia a distribuirse a estratos superiores se relaciona con SAR11, el grupo hermano de LD12 presente en ambientes acuáticos, en el que se ha encontrado un pigmento fotosintético en su genoma (proteorodopsina) (Giovannoni *et al.*, 2005).

En la incubación con microzooplancton no se encontraron células dentro de los 30 campos contados al microscopio, dando como resultado un porcentaje de hibridación del 0% para este grupo bacteriano, esto pudo ser resultado del efecto de depredación. Sin embargo, la ausencia de bacterias hibridadas en los conteos solo puede ser un indicativo del bajo número de individuos dentro de este tratamiento.

Phyllum *Bacteroidetes* (CF3 19a)

La sonda CF319a marca a los miembros del Phyllum Bacteroidetes, formado por los filos Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes, la cual fue diseñada para cubrir principalmente a las clases Flavobacteria (90%) y Sphingobacter (90%), bacterias principalmente heterotróficas aerobias muy abundante en ambientes acuáticos, mientras que deja una baja eficiencia de identificación para los miembros del grupo de los Bacteroidetes (30%) (Manz *et al.*, 1996).

El descenso en la cantidad de células hibridadas para *Bacteroidetes* para el tratamiento con nanoflagelados (Figura 31) corresponde con lo citado por otros autores en experimentos donde se aumentó el número de depredadores microeucariontes dando como resultado el descenso en la abundancia de los miembros de este Phyllum en los primeros días (Jürgens *et al.*, 1999; Salcher *et al.*, 2005; Šimek, *et al.*, 2001; Jezbera *et al.*, 2005)

Sin embargo, ya que el tiempo de incubación para el experimento fue de tan solo de 24 horas y el porcentaje de hibridación fue bajo desde un inicio, al momento de someterlos a una presión de selección la mayor por parte de los nanoflagelados abatieron a la comunidad de *Bacteroidetes*, sin dar tiempo a que este Phyllum presentará cambios en su morfología como estrategia defensiva (Salcher *et al.*, 2005; Jezbera *et al.*, 2005).

Debido a que en el tratamiento con microzooplancton la densidad de nanoflagelados no se vio afectada, el decremento en la hibridación de CF319a se atribuye a la

acción de los ciliados como consumidores de este Phylum, al igual que lo encuentra Bautista-Reyes & Macek (2012) en vacuolas alimenticias de ciliados.

El pequeño aumento en el control al finalizar la incubación (Figura 31) se puede explicar con la relación del Phylum con el PPA, ya que en lagos de agua dulce los Bacteroidetes se encuentran comúnmente con altas densidades durante periodos correspondientes a florecimientos de cianobacterias (Eiler & Bertilsson, 2007) y al encontrarse aislados dentro de las botellas DBO y en presencia de pico-cianobacterias la relación se pudo haber visto favorecida.

Phylum *Planctomycetes* (PLA886)

La mínima variación en los porcentajes de hibridación al finalizar la incubación de este Phylum puede ser resultado de la composición de su membrana celular predominantemente constituida por proteínas, la cual muy probablemente sirva como defensa a las enzimas líticas de otras bacterias depredadoras (König *et al.*, 1984; Liesack *et al.*, 1986; Giovannoni *et al.*, 1987); rasgo que, junto con el anammoxoma, el cual puede ser considerado como un análogo bacteriano de la mitocondria en los eucariotas, serviría como mecanismo de resistencia al pastoreo, el cual resulta ser eficaz por el bajo impacto por parte de los distintos depredadores.

El Phylum de los *Planctomycetes* son los mayores contribuidores al ciclo del nitrógeno, hablando a escala global. Se estima que cerca del 50% del nitrógeno presente en la atmósfera es generado por estos organismos (Jetten, 2008).

Los *planctomycetes* anammox son un grupo especializado los cuales llevan a cabo la oxidación anaeróbica del amonio a nitrógeno molecular, usando los nitritos como

aceptor de electrón, con la reducción del dióxido de carbono (Jetten *et al.*, 2009) para lo cual poseen una estructura celular llamada anammoxoma (van Niftrik *et al.*, 2004) el cual posee ATP sintasa en su membrana (van Niftrik *et al.*, 2010), se encuentran tanto en hábitats marinos como en ambientes dulce acuícolas y están extensamente distribuidos en las vastas zonas anóxicas de los océanos (Kuypers *et al.*, 2003; Kuypers *et al.*, 2005; Kirkpatrick *et al.*, 2006; Woebken *et al.*, 2008).

Otra singularidad hallada en este Phylum está en *Gemmata oscuriglobus* ya que presenta una de las estructuras más inusuales dentro de las bacterias, su DNA se encuentra rodeado por un par de membranas muy cercanas (Fuerst & Webb, 1991; Lindsay *et al.*, 2001), emulando al núcleo presente en eucariotas, con la diferencia de que este "cuerpo nuclear" contiene partículas similares a ribosomas (Lieber *et al.*, 2009).

Sulfatoreductoras (SRB 385)

Los bajos valores de hibridación obtenidos inicialmente para la sonda, de 0.2% a 0.7%, son consistentes a lo reportado por Hernández-Avilés *et al.* (2010) para el lago de Alchichica.

A pesar de que las bacterias sulfatoreductoras han sido muy asociadas con los ambientes anaerobios y especialmente a en los sedimentos dentro de los lagos (Ingvorsen *et al.*, 1981; Cypionka *et al.*, 1985; Marschall *et al.*, 1993), dada la naturaleza predominantemente sedimentaria del ciclo del azufre, se han demostrado que la distribución de SRB no está limitada por la presencia de oxígeno (Stahl *et al.*, 2002) y en trabajos se ha evidenciado la distribución de estas bacterias

en zonas no anóxicas oxidando varios compuestos orgánicos usando al oxígeno como aceptor de electrones (Karnachuck *et al.*, 2005, 2006; Lentini *et al.*, 2012).

Aunque este grupo no es comúnmente considerado en los experimentos de depredación bacteriana, tras realizar las incubaciones, se pudo encontrar que la botella en donde se adicionaron nanoflagelados presentó un decremento en el número de células hibridadas por acción de depredación de los flagelados sobre este grupo bacteriano, consumiéndolo activamente.

Los cambios observados en el tratamiento con microzooplancton (Figura 33) representó la mayor disminución en la cantidad de células hibridadas del grupo de las sulfatoredutoras por lo que se propone que este grupo de depredadores tienen una preferencia hacia las bacterias sulfatoredutoras que sobre los nanoflagelados, como ocurre en el lago Alchichica en el que se encontraron organismos de este grupo bacteriano dentro de las vacuolas alimenticias de estos protozoarios (Bautista-Reyes & Macek, 2012).

Phyllum *Actinobacteria* (HGC 69a)

Para este estudio el Phyllum *Actinobacteria*, junto con la clase *Betaproteobacteria*, presentaron los porcentajes de hibridación más altos del dominio *Bacteria*, hecho reportado para este Phyllum, en distintos cuerpos acuáticos: lagos oligotróficos a hipereutrófico y en lagos húmicos (Glöckner *et al.*, 2000; Sekar *et al.*, 2003; Burkert *et al.*, 2003) en donde constituyen una importante fracción del bacterioplancton, además de poseer un amplio espectro ecológico y encontrarse globalmente

distribuidas en ambientes acuáticos (Zwart *et al.*, 1998; Crump *et al.*, 1999; Glökner *et al.*, 2000; Hiorns *et al.*, 1997; Lindström & Leskinen, 2002; Zwart *et al.*, 2002).

En la incubación con nanoflagelados el incremento en el porcentaje de hibridación (Figura 35) se interpreta como una respuesta al incremento en el número de estos protozoarios en el tratamiento, similar a estudios de laboratorio en donde la abundancia de aquellas bacterias que poseen un genotipo afiliado al linaje de este grupo bacteriano típicas de agua dulce se ve rápidamente incrementada en presencia de flagelados (Glöckner *et al.*, 2000; Pernthaler *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 2003)

La poca selección por parte de los NFH se debe a que el Phylum *Actinobacteria* presenta una pared celular del tipo Gram-positiva la cual, de acuerdo con Iriberry *et al.* (1994), le confiere protección contra la digestión por parte de los protistas. Esta característica, junto con su resistencia a la luz UV (Bentley & Parkhill, 2004) explicaría su alto porcentaje de hibridación en el lago.

Mientras que el decremento en la hibridación de células para el tratamiento con microzooplancton solo puede ser atribuido al efecto de depredación por parte de los ciliados.

Por otro lado, el incremento en la hibridación para el tratamiento con copépodos puede estar ligada a que las *Actinobacterias* no sufren cambios drásticos con la reducción en la concentración de nutrientes disponibles (Haukka *et al.*, 2006), por lo que la disminución del PPA no significaría un factor limitante en cuanto a la

disponibilidad de materia orgánica disuelta que podría proporcionar para el desarrollo de este grupo bacteriano.

CONCLUSIONES

El efecto cascada depredador-presa en el circuito microbiano en el lago Atexcac no se cumplió en general, debido a que la abundancia de los nanoflagelados fue baja y sin cambios aparentes en los experimentos realizados. El aumento experimental de nanoflagelados sin la presencia de sus depredadores superiores, promovió la reducción del tamaño celular del picoplancton heterotrófico como única estrategia para evitar ser consumidos.

Los grupos bacterianos dominantes para el lago hiposalino Atexcac fueron la clase *Betaproteobacteria* y el Phylum *Actinobacteria* propios de ambientes lacustres.

El microzooplancton tuvo preferencia por el consumo de *LD12* (LD12 121), bacterias sulfatoreductoras (*SRB385*) y *Actinobacteria* (*HGC69a*). Mientras que los nanoflagelados depredaron principalmente *Betaproteobacteria* (*BET42a+C*) y *Bacteroidetes* (*CF319a*), lo que se infirió a partir de las abundancias experimentales de estos grupos bacterianos.

El Phylum *Actinobacteria* fue resistente a la depredación por los nanoflagelados.

Las densidades iniciales de PPH encontradas en el lago Atexcac durante el experimento concuerdan con lo reportado previamente. Mientras que las de PPA fueron de un orden de magnitud mayor a lo citado con anterioridad.

El copépodo *Leptodiptomus cf. sicilis* se alimentó principalmente de PPA donde se adicionó una sobrepoblación de estos microcrustáceos experimentalmente, favoreciendo la formación de colonias grandes de picocianobacterias, como una estrategia para evitar su depredación.

La fuente de recursos alimenticios más utilizada por los nanoflagelados fue el picoplancton heterotrófico, consumiendo ocasionalmente a las picocianobacterias del género *Synechococcus*.

RECOMENDACIONES.

Extender el tiempo de incubación a por lo menos 48 horas con tomas periódicas cada 6 – 12 horas para tener un panorama más completo de la dinámica entre los organismos incluidos en el experimento.

REFERENCIAS

- Abe, D., Matsumura-Tundisi, T., Rocha, O., & Tundisi, J. (2003). Denitrification and bacterial community structure in the cascade of six reservoirs on a tropical river in Brazil. *Hydrobiologia*, 504, 67–76.
- Adame, M., Alcocer, J., & Escobar, E. (2008). Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology*, 53, 22-31.
- Alcocer, J., Lugo, A., Oseguera, L., & Peralta, L. (2007). Laguna de Totolcingo, Puebla y Tlaxcala. En G. De la Lanza, *Las aguas interiores de México: Conceptos y casos* (págs. 186-198). Ciudad de México: AGT.
- Aliger, K., Arneson, P., Goldman, C., & Jooteh, S. (2010). Species specific differences in the ingestion of *Microcystis* cells by the calanoid copepods *Eurytemora affinis* and *Pseudodiaptomus forbesi*. *Journal of Plankton Research*, 32(10), 1479–1484.
- Aliger, K., Leitao, E., & Panosso, R. (2016). Potential mechanisms for the tropical copepod *Notodiaptomus* to tolerate *Microcystis* toxicity. *Journal of Plankton Research*, 00(00), 1-12.
- Amann, R., & Fuchs, B. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 339–348.
- Amann, R., Fuchs, B., & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Environmental biotechnology*, 12, 231–236.
- Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *American Society for Microbiology*, 59, 143–169.
- Arellano, J. (2017). *Variación espacio-temporal del picoplancton procarionte y su relación con la dinámica limnológica en el lago crater atalashalino Atexcac, Puebla*. Tesis de maestría, UNAM (FES Iztacala), Ciudad de México.
- Arellano, J., & González, E. (2011). *Dinámica espacio-temporal del picoplancton procarionte y su relación con la variabilidad limnológica del lago volcánico Atexcac, Puebla*. Tesis de licenciatura, UNAM (FES Zaragoza), Ciudad de México.

- Arredondo-Figueroa, J. (2002). Los axalapascos de la Cuenca Oriental, Puebla. En G. De la Lanza, & J. García , *Lagos y presas de México* (págs. 81-107). Ciudad de México: AGT.
- Arredondo-Figueroa, J. L., Borrego-Enríquez, L. E., Castillo-Domínguez, R. M., & Valladolid-Laredo, M. A. (1983). Batimetría y morfometría de los lagos "Marrs" de la cuenca de oriental, Puebla, México. *BIOTICA*, 8(1), 37-47.
- Auguet, J.-C., Nomokonova, N., Camarero, L., & Casamayor, E. (2001). Seasonal changes of freshwater ammonia-oxidizing archaeal assemblages and nitrogen species in oligotrophic alpine lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1937-1945.
- Azam, F., & Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 782–791.
- Azam, P., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Series*, 10, 257–263.
- Baines, S., & Pace, M. (1991). The production of dissolved organic-matter by phytoplankton and its importance to bacteria – patterns across marine and fresh-water systems. *Limnology and Oceanography*, 36, 1078–1090.
- Barrera-Moreno, O., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., Alcántara-Rodríguez, J., & Piedra-Ibarra, E. (2015). From Local Adaptation to Ecological Speciation in Copepod Populations from Neighboring Lakes. *PLoS ONE*, 10(4), 1-25.
- Bautista-Reyes, F., & Macek, M. (2012). Ciliate food vacuole content and bacterial community composition in the warm-monomictic crater Lake Alchichica, México. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 85–97.
- Bentley, S., & Parkhill, J. (2004). Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annual Review of Genetics*, 38, 771–791.
- Berninger, U., Caron, D., Sanders, R., & Finlay, B. (1991). Heterotrophic flagellates of planktonic communities, their characteristics and methods to study. En D. Patterson, & J. Larsen, *The biology of free-living heterotrophic* (págs. 39-56). Clarendon Press, Oxford.
- Boenigk, J., Stadler, P., Wiedroither, A., & Hahn, M. (2004). Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the Polynucleobacter cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5787–5793.

- Boraas, M., Bolgrien, D., & Holen, D. (1991). Determination of eubacterial and cyanobacterial size and number in Lake Baikal using epifluorescence. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 76, 537-544.
- Bratbak, G., Heldab, M., Thingstad, T., Rieman, B., & Haslund, D. (1992). Incorporation of viruses into the budget of microbial C transfer. A first approach. *Marine Ecology Progress Series*, 83, 273–280.
- Brooks, J. L., & Dodson, S. I. (1965). Predation, body size, and composition of plankton. *American Association for the Advancement of Science*, 3692(150), 28-35.
- Burkert, U., Warnecke, F., Babenzien, D., Zwirnmann, E., & Pernthaler, J. (2003). Members of a readily enriched beta-proteobacterial clade are common in surface waters of a humic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6550–6559.
- Burns, C., & Gilbert, J. (1993). Predation on ciliates by freshwater calanoid copepods: Rates of predation and relative vulnerabilities of prey. *Freshwater Biology*, 30, 377–393.
- Callieri, C., & Stockner, J. (2002). Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journay of Limnology*, 61, 1-14.
- Callieri, C., Coci, M., Corno, G., Macek, M., Modenutti, B., Balseiro, E., & Bertoni, R. (2013). Phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 85, 293–301.
- Callieri, C., Karjalainen, S., & Passoni, S. (2002). Grazing by ciliates and heterotrophic nanoflagellates on picocyanobacteria in Lago Maggiore, Italy. *Journal of Plankton Research*, 24, 785–796.
- Cambell, L., & Vaultot, D. (1993). Photosynthetic picoplankton community structure in the subtropical North Pacific near Hawaii (Station ALOHA). *Deep Sea Research*, 40, 2043–2060.
- Campbell, N., & Reece, J. (2007). *Biolog[ia]* (7 ed.). Madrid: Médica Panamericana.
- Can-Chulim, A., Ortega-Escobar, H., García-Calderón, N., Reyes-Ortigoza, A., González-Hernández, V., & Flores-Román, D. (2011). Origen y calidad del agua subterránea en la Cuenca Oriental de México|. *TERRA LATINOAMERICANA*, 29(2), 189-200.

- Cárcamo, J. R. (2017). *Evaluación de la productividad primaria y la concentración de clorofila a en los lagos cráter La Preciosa y Atexcac, en la cuenca oriental, Puebla. (tesis de licenciatura)*. Ciudad de México: UNAM.
- Caron, D., & Goldman, J. (1990). Protozoan nutrient regeneration. En G. Capriulo, *Ecology* (págs. 283-306). New York: Oxford University Press.
- Caron, D., Pick, F., & Lean, D. (1985). Chroococcoid cyanobacteria in Lake Ontario: seasonal and vertical distribution during 1982. *Journal of Phycology*, 21, 171-175.
- Carrick, H., Fahnenstiel, G., Stoermer, E., & Wetzel, R. (1991). The importance of zooplankton-protozoan trophic couplings in Lake Michigan. *Limnology and Oceanography*, 36, 1335-1345.
- Chisholm, S. (1992). Phytoplankton size. En P. Falkowski, & A. Woodhead, *Primary Productivity and Biogeochemical Cycle in the Sea* (págs. 213–231). New York: Plenum Press.
- Chisholm, S., Olson, R., Zettler, E., Goericke, R., Waterbury, J., & Welschmeyer, N. (1988). A Novel Free-Living Prochlorophyte Abundant in the Oceanic Euphotic Zone. *Nature*, 334, 340–343.
- Christoffersen, K. (1994). Variation of feeding activities of heterotrophic nanoflagellates on picoplankton. *Mar Microb Food Web*, 8, 11-123.
- Chrzanowski, T. H., & Šimek, K. (1990). Prey-size selection by flagellated protozoa. *Limnology and Oceanography*, 35(7), 1429-1436.
- Cole, J., Findlay, S., & Pace, M. (1988). Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: A cross-system overview. *Marine Ecology Progress Series*, 43, 1-10.
- Comté, J., Jacquet, S., Viboud, S., Fontvieille, D., Millery, A., Paolini, G., & Domaizon, I. (2006). Microbial Community Structure and Dynamics in the Largest Natural French Lake (Lake Bourget). *Microbial Ecology*, 52, 72–89.
- CONABIO. (2015). 70. CUENCA ORIENTAL. Obtenido de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp_070.html
- Crosbie, N., Teubner, K., & Weisse, T. (2003). Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 33, 53–66.

- Crump, B., Armbrust, E., & Baross, J. (1999). Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3192–3204.
- Cypionka, H., Widdel, F., & Pfennig, N. (1985). Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiology Letters*, 31, 39-45.
- Davis, P., & Sieburth, J. (1982). Differentiation of phototrophic and heterotrophic nanoplankton populations in marine waters by epifluorescence microscopy. *Annales de l'Institut Océanographique*, 58, 249-260.
- Duffy, J. E. (2002). Biodiversity and ecosystem function: the consumer connection. *OIKOS*, 99(1), 201-219.
- Dussart, B. (1965). Les different categories de plancton. *Hydrobiologia*, 26, 72-74.
- Eiler, A., & Bertilsson, S. (2007). Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3511–3518.
- Fenchel, T. (2008). The microbial loop – 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 366, 99-103.
- Flemming, H., & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) — Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science & Technology*, 43, 1–8.
- Fogg, G. (1983). The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Botanica Marina*, 26, 3-14.
- Fuerst, J., & Webb, R. (1991). Membrane-bounded nucleoid in the eubacterium *Gemmatata obscuriglobus*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 88(18), 8184–8188.
- Gasol, J., Comerma, M., Garcia, J., Armengol, J., Casamayor, E., Kojacká, P., & Šimeck, K. (2002). A transplant experiment to identify the factors controlling bacterial abundance, activity, production, and community composition in a eutrophic canyon-shaped reservoir. *Limnology and Oceanography*, 47, 62–77.
- Gasol, J., Simons, A., & Kalff, J. (1995). Patterns in the top-down versus bottom-up regulation of heterotrophic nanoflagellates in temperate lakes. *Journal of Plankton Research*, 17(10), 1879-1903.

- Gerea, M., Queimaliños, C., Schiaffino, M., Izaguirre, I., Forn, I., Massana, R., & Unrein, F. (2013). In situ prey selection of mixotrophic and heterotrophic flagellates in Antarctic oligotrophic lakes: an analysis of the digestive vacuole content. *Journal of Plankton Research*, 35(1), 201–212.
- Giovannoni, S., Bibbs, L., Cho, J.-C., Stapels, M., Desiderio, R., & Vergin, K. (2005). Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. *Nature*, 438, 82–85.
- Giovannoni, S., Godchaux, W., Schabtach, E., & Castenholz, R. (1987). Cell wall and lipid composition of *Isosphaera pallida*, a budding eubacterium from hot springs. *Journal of Bacteriology*, 169(9), 2702–2707.
- Glöckner, F., Fuchs, B., & Amann, R. (1999). Bacterioplankton composition of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3721–3726.
- Glökner, F., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., & Amann, R. (2000). Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 5053–5065.
- González, J., Sherr, E., & Sherr, B. (1990). Size-Selective Grazing on Bacteria by Natural Assemblages of Estuarine Flagellates and Ciliates. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3), 583-589.
- González, J., Sherr, E., & Sherr, B. (1993). Differential feeding by marine flagellates on growing versus starving, and on motile versus nonmotile, bacterial prey. *Marine Ecology Progress Series*, 102, 257–267.
- Gorsky, G., Chrétiennot-Dinet, M., Blanchot, J., & Palazzoli, I. (1999). Picoplankton and nanoplankton aggregation by appendicularians: Fecal pellet contents of *Megalocercus huxleyi* in the equatorial Pacific. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 104, 3381–3390.
- Grossart, H.-P., Jezbera, J., Hornák, K., Hutalle, K., Buck, U., & Šimek, K. (2008). Top-down and bottom-up induced shifts in bacterial abundance, production and community composition in an experimentally divided humic lake. *Environmental Microbiology*, 10(3), 635–652.
- Güde, H. (1988). Direct and indirect influences of crustacean zooplankton on bacterioplankton of Lake Constance. *Hydrobiologia*, 159, 63-73.

- Hagström, A., Azam, F., Andersson, A., Wikner, J., & Rassoulzadegan, F. (1988). Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Marine Ecology*, *49*, 171-178.
- Hagström, A., Zweifel, U., & Pinhassi, J. (2001). Burst of rapid growth of marine bacterioplankton induced by substrate shift. *Aquatic Microbial Ecology*, *24*, 109–115.
- Hahn, M., & Höfle, M. (1998). Grazing pressure by a bacterivorous flagellate reverses the relative abundance of *Comamonas acidovorans* PX54 and *Vibrio* strain CB5 in chemostat cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 1910–1918.
- Hahn, M., & Höfle, M. (2001). Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, *35*, 113–121.
- Hahn, M., Lunsdorf, H., & Janke, L. (2004). Exopolymer production and microcolony formation by planktonic freshwater bacteria: defence against protistan grazing. *Aquatic Microbial Ecology*, *35*, 297–308.
- Hahn, M., Lunsdorf, H., Wu, O., Schauer, M., Höfle, M., Boenigk, J., & Stadler, P. (2003). Isolation of Novel Ultramicrobacteria Classified as Actinobacteria from Five Freshwater Habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(3), 1442–1451.
- Hahn, M., Moore, E., & Höfle, M. (1999). Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 25–35.
- Hahn, M., Moore, E., & Höfle, M. (2000). Role of microcolony formation in the protistan grazing defence of the aquatic bacterium *Pseudomonas* sp. *Microbial Ecology*, *39*, 175–85.
- Hairton, N. G., & Hairton, N. G. (1993). Cause-effect relationships in energy flow, trophic structure, and interspecific interactions. *The American Naturalist*, *142*(3), 379-411.
- Hairton, N., Holtmeier, C., Lampert, W., Weider, L., Post, D., Fischer, J., . . . Gaedke, U. (2001). NATURAL SELECTION FOR GRAZER RESISTANCE TO TOXIC CYANOBACTERIA: EVOLUTION OF PHENOTYPIC PLASTICITY? *Evolution*, *55*(11), 2203–2214.

- Haukka, K., Kolmonen, E., Hyder, R., Hietala, J., Vakkilainen, K., Kairesalo, T., . . . Sivonen, K. (2006). Effect of nutrient. *Microbial Ecology*, *51*, 137–146.
- Havskum, H., & Hansen, A. (1997). Importance of pigmented and colourless nano-sized protists as grazers on nanoplankton in a phosphate-depleted Norwegian fjord and its enclosures. *Marine Ecology Progress Series*, *12*, 139–151.
- Hawley, G., & Whitton, B. (1991). Survey of algal picoplankton from lakes in five continents. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, *24*, 1220–1222.
- Hernández-Avilés, J., Macek, M., Alcocer, J., López-Trejo, B., & Merino-Ibarra, M. (2010). Prokaryotic picoplankton dynamics in a warm-monomictic saline lake: temporal and spatial variation in structure and composition. *Journal of Planckton Research*, *32*(9), 1301–1314.
- Hiorns, W., Methé, B., Nierzwicki-Bauer, S., & Zehr, J. (1997). Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(7), 2957–2960.
- Hoiczyk, E., & Hansel, A. (2000). Cyanobacterial cellwalls: news from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology*, *182*, 1191–1199.
- Ingvorsen, K., Zeikus, J., & Brock, T. (1981). Dynamics of Bacterial Sulfate Reduction in a Eutrophic Lake. *Applied and Environmental Microbiology*, *42*(6), 1029–1036.
- Iriberry, J., Azúa, I., Labirua-Iturburu, A., Artolozaga, I., & Barcina, I. (1994). Differential elimination of enteric bacteria by protists in a freshwater system. *Journal of Applied Microbiology*, *77*(5), 476–483.
- Jakubowska, N., & Szelaġ-Wasielewska, E. (2015). Toxic Picoplanktonic Cyanobacteria—Review. *Marine Drugs*, *13*, 1497–1518.
- Jetten, M. (2008). The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology*, *10*(11), 2903–2909.
- Jetten, M., van Niftrik, L., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J., & Op den Camp, H. (2009). Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *44*(2-3), 65–84.
- Jezbera, J., Hornák, K., & Simek, K. (2005). Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, *52*, 351–363.

- Jezberová, J., & Komárková, J. (2007). Morphological transformation in a freshwater Cyanobium sp. induced by grazers. *Environmental Microbiology*, 9, 1858–1862.
- Jones, R. (1994). Mixotrophy in planktonic protists as a spectrum of nutritional strategies. *Marine Microbial Food Webs*, 8, 87–96.
- Jürgens, K. (1992). Is there plenty of food for bacterivorous flagellates in eutrophic waters? *Ergebnisse der Limnologie*, 37, 195-205.
- Jürgens, K., & Jeppesen, E. (2000). The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake. *Journal of plankton research*, 22(6), 1047-1070.
- Jürgens, K., & Matz, C. (2002). Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Anton Leeuw Int J Gen Mol Microbiol*, 81, 413–434.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., & Amann, R. (1999). Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1241–1250.
- Jürgens, K., Wickham, S. A., Rothhaupt, K. O., & Santer, B. (1996). Feeding rates of macro- and microzooplankton on heterotrophic nanoflagellates. *Limnology and oceanography*, 41(8), 1833-1839.
- Kalff, J. (2002). *Limnology*. New Jersey: Prentice Hall.
- Karl, D., Hebel, D., Bjorkman, K., & Letelier, R. (1998). The role of dissolved organic matter release in the productivity of the oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*, 43, 1270–1286.
- Karnachuk, O., Pimenov, N., Yusupov, S., Frank, Y., Kaksonen, A., Puhakka, J., . . . Tuovinen, O. (2005). Sulfate Reduction Potential in Sediments in the Norilsk Mining Area, Northern Siberia. *Geomicrobiology Journal*, 22, 11-25.
- Karnachuk, O., Pimenov, N., Yusupov, S., Frank, Y., Puhakka, Y., & Ivanov, M. (2006). Distribution, Diversity, and Activity of Sulfate-Reducing Bacteria in the Water Column in Gek-Gel Lake, Azerbaijan. *Microbiology*, 75, 82–89.
- Kjørboe, T. (1993). Turbulence, phytoplankton cell size, and the structure of pelagic food webs. *Advances in Marine Biology*, 29, 1–72.

- Kirchman, D., Dittel, A., Findlay, S., & Fischer, D. (2004). Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, New York. *Aquatic Microbial Ecology*, 35, 243–257.
- Kirkpatrick, J., Oakley, B., Fuchsman, C., Srinivasan, S., Staley, J. T., & Murray, J. W. (2006). Diversity and Distribution of Planctomycetes and Related Bacteria in the Suboxic Zone of the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 3079–3083.
- Klut, E., & Stockner, J. (1991). Picoplankton associations in an ultraoligotrophic lake on Vancouver Island, British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 1092–1099.
- König, E., Schlesner, H., & Hirsch, P. (1984). Cell wall studies on budding bacteria of the Planctomyces/Pasteuria group and on a Prosthecomicrobium sp. *Archives of Microbiology*, 138(3), 200–205.
- Kuypers, M. M., Lavik, G., Woebken, D., Schmid, M., Fuchs, B. M., Amann, R., . . . Jetten, M. S. (2005). Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), 6478–6483.
- Kuypers, M. M., Sliemers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jørgensen, B. B., Kuenen, J. G., . . . Jetten, M. S. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 422, 608–611.
- Laguna, M., & Matínez, J. (2015). *Estructura de la comunidad del plancton procarionte en el lago volcánico, hiposalino y monomítico cálido Atexcac, Puebla*. Tesis de licenciatura, UNAM (FES Zaragoza), Ciudad de México.
- Langenheder, S., & Jürgens, K. (2001). Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnology and Oceanography*, 46, 121–134.
- Lentini, V., Gugliandolo, C., & Maugeri, T. (2012). Vertical Distribution of Archaea and Bacteria in a Meromictic Lake as Determined by Fluorescent In Situ Hybridization. *Current Microbiology*, 64, 66–74.
- Lieber, A., Leis, A., Kushmaro, A., Minsky, A., & Medalia, O. (2009). Chromatin organization and radio resistance in the bacterium Gemmata obscuriglobus. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1439–1445.

- Liesack, W., König, H., Schlesner, H., & Hirsch, P. (1986). Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the *Pirella/Planctomyces* group. *Archives of Microbiology*, *145*(4), 361–366.
- Lindsay, M., Webb, R., Strous, M., Jetten, M., Butler, M., Forde, R., & Fuerst, J. (2001). Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Archives of Microbiology*, *175*(6), 413–429.
- Lindström, E., & Leskinen, E. (2002). Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton Comparison of 16S rRNA gene fingerprints and sequences from three geographic regions. *Microbial Ecology*, *44*, 1-9.
- Lipej, L., Mozeti, P., Turk, V., & Malej, A. (1997). The trophic role of the marine cladoceran *Penilia avirostris* in the Gulf of Trieste. *Hydrobiologia*, *360*, 197–203.
- Loferer-Krößbacher, M., Klima, J., & Psenner, R. (1998). Determination of Bacterial Cell Dry Mass by Transmission Electron Microscopy and Densitometric Image Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(2), 688-694.
- Macek, M., Vilaclara, G., & Lugo, A. (1994). Changes in protozoan assemblage structure and activity in a stratified tropical lake. *Marine Microbial Food Webs*, *8*, 235-249.
- Mague, T., Friberg, E., Hughes, D., & Morris, I. (1980). Extracellular release of carbon by marine-phytoplankton – a physiological approach. *Limnology and Oceanography*, *25*, 262–279.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., & Schleifer, K. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga–flavobacter–bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, *142*, 1097–1106.
- Marques, M. (1990). *Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas*. México: McGraw Hill.
- Marschall, C., Frenzel, P., & Cypionka, H. (1993). Influence of oxygen on sulfate reduction and growth of sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, *159*(2), 168–173.
- Matz, C. (2004). Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*, 1593–1599.

- Matz, C., & Jürgens, K. (2005). High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 921–929.
- Matz, C., Bergfeld, T., Rice, S., & Kjelleberg, S. (2004). Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing. *Environmental Microbiology*, 6, 218–226.
- McNaught, D., Griesmer, D., & Kennedy, M. (1980). Resource characteristics modifying selective grazing by copepods. En W. Kerfoot, *Evolution and Ecology of Zooplankton Communities*. University Press of New England.
- Motwani, N., & Gorokhova, E. (2013). Mesozooplankton Grazing on Picocyanobacteria in the Baltic Sea as Inferred from Molecular Diet Analysis. *PLOS ONE*, 8(11), 1-8.
- Munavar, M., & Fahnenstiel, G. (1982). The abundance and significance of ultraplankton and microalgae at an offshore station in central Lake Superior. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1153, 1-13.
- Nagata, T. (1988). The microflagellate-picoplankton food linkage in the water column of Lake Biwa. *Limnology Oceanography*, 33, 504–517.
- Nishimura, Y., & Nagata, T. (2007). Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquatic Microbial Ecology*, 48, 231–240.
- Okabe, S., Oshiki, M., Kamagata, Y., Yamaguchi, N., Toyofuku, M., Yawata, Y., . . . Minamisawa, K. (2010). A Great Leap forward in Microbial Ecology. *Microbes and Environments*, 25(4), 230–240.
- Ortega-Mayagoitia, E., Ciro-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.
- Paine, R. T. (1969). A note on trophic complexity and community stability. *The American Naturalist*, 929(103), 91-93.
- Parvathi, A., Zhong, X., Pradeep Ram, A., & Jacquet, S. (2014). Dynamics of auto- and heterotrophic picoplankton and associated viruses in Lake Geneva. *Hydrology and Earth System Sciences*, 18, 1073–1087.

- Pernthaler, A., Pernthaler, J., & Amann, R. (2002). Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 3094–3101.
- Pernthaler, J. (2005). Predation on procaryotes in the water column and its acological implications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 537–546.
- Pernthaler, J., & Amann, R. (2005). Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 440–461.
- Pernthaler, J., Posch, T., Šimeck, K., Vrba, J., Amann, R., & Psenner, R. (1997). Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 596–601.
- Pernthaler, J., Posch, T., Šimeck, K., Vrba, J., Pernthaler, A., Glöckner, F., . . . Amann, R. (2001). Predator-Specific Enrichment of Actinobacteria from a Cosmopolitan Freshwater Clade in Mixed Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2145–2155.
- Pernthaler, J., Šimek, K., Sattler, B., Schwarzenbacher, A., Bobkova, J., & Psenner, R. (1996). Short-term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligo-mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 18(3), 443-462.
- Pointdexter, J. (1981). Oligotrophy: feast and famine existence. *Advances in Microbial Ecology*, 5, 63–91.
- Pomeroy, L. (1974). The ocean's food web, a changing paradigm. *Bioscience*, 24(9), 499-504.
- Pomeroy, L., Williams, P., Azam, F., & Hobbie, J. (2007). The microbial loop. *Oceanography*, 2, 28–33.
- Porter, K. (1988). Phagotrophic phytoflagellates in microbial food webs. *Hydrobiologia*, 159, 89-97.
- Porter, K., & Feig, Y. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microfloral. *Limnology and Oceanography*, 25(5), 943-948.
- Posch, T., Jezbera, J., Vrba, J., Šimeck, K., Pernthaler, J., Andreatta, S., & Sonntag, B. (2001). Size Selective Feeding in *Cyclidium glaucoma* (Ciliophora, Scuticociliatida) and Its Effects on Bacterial Community Structure: A Study from a Continuous Cultivation System. *Microbial Ecology*, 42, 217–227.

- Posch, T., Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Nedoma, J., Saltter, B., . . . Psenner, R. (1999). Predator-induced cancrs of bacterial sizestructure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquatic Microbial Ecology*, 18, 235-246.
- Proctor, L., & Fuhrman, J. (1974). Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 343, 60–62.
- Redfield, R. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology*, 10, 365–370.
- Riemann, B., Havskum, H., Thingstad, F., & Bernard, C. (1995). The role of mixotrophy in pelagic environments. En I. Joint, *Molecular ecology of aquatic microbes* (págs. 88-114). Berlin: Springer Verlag.
- Ruggiu, D., Bertoni, R., Callieri, C., Manca, M., & Nocentini, A. (1998). Assessment of biota in lakes from the Khumbu Valley, High Himalayas. En G. Tartari, R. Baudo, & M. Munavar, *Top of the world environmental research* (págs. 219-233). Ecovision World Monograph Series.
- Salcher, M. M., Hofer, J., Hornák, K., Jezbera, J., Sonntag, B., Vrba, J., . . . Posch, T. (2007). Modulation of microbial predator-prey dynamics by phosphorus availability: Growth patterns and survival strategies of bacterial phylogenetic clades. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 40–50.
- Salcher, M., Pernthaler, J., & Posch, T. (2011). Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria ‘that rule the waves’ (LD12). *International Society for Microbial Ecology*, 5, 1242–1252.
- Salcher, M., Pernthaler, J., Psenner, R., & Posch, T. (2005). Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquatic Microbial Ecology*, 38, 215–229.
- Sanders, R., & Wickham, S. (1993). Planktonic protozoa and metazoa: predation, food quality and. *Marine Microbial Food Webs*, 7, 197-22.
- Sanders, R., Caron, D., & Berninger, U. (1992). Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: An inter-ecosystem comparison. *Marine Ecology Progress Series*, 86, 1-14.
- Sanders, R., Porter, K., Bennet, S., & DeBiase, A. (1989). Seasonal patterns of bacterivory by flagellates, ciliates, rotifers and cladocerans in a freshwater plankton community. *Limnology and Oceanography*, 34, 673–687.

- Sarmiento, H. (2012). New paradigms in tropical limnology: the importance of the microbial food web. *Hydrobiologia*, 686(1), 1-14.
- Sarmiento, H., & Gasol, J. (2012). Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. *Environmental Microbiology*, 14(9), 2348–2360.
- Schut, F., Prins, R. A., & Gottschal, J. C. (1997). Olygotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquat. Microb. Ecol*, 12(1), 177-202.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T., & Amann, R. (2003). An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2928–2935.
- Sherr, B. F., Sherr, E. B., & McDaniel, J. (1992). Effect of protistan grazing on the frequency of dividing cells in bacterioplankton assemblages. *Applied and environmental microbiology*, 58(8), 2381-2385.
- Sherr, E., & Sherr, B. (1988). Role of microbes in pelagic food webs. *Limnology and Oceanography*, 33, 1225-1227.
- Shikano, S., Luckinbill, L., & Kurihara, Y. (1990). Changes of traits in a bacterial population associated with protozoal predation. *Microbial Ecology*, 20, 75–84.
- Sieburth, J., Smetacek, V., & Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography*, 23(6), 1256-1263.
- Šimek, K., Bobkova, J., Maceka, M., Nedoma, J., & Psenner, R. (1995). Ciliate grazing on picoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: a study at the species and community level. *Limnology and Oceanography*, 40, 1077-109.
- Šimek, K., Hornák, K., Jezbera, J., Masín, M., Nedoma, J., Gasol, J., & Schauer, M. (2005). Influence of Top-Down and Bottom-Up Manipulations on the R-BT065 Subcluster of b-Proteobacteria, an Abundant Group in Bacterioplankton of a Freshwater Reservoir . *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2381–2390.
- Šimek, K., Hornák, K., Masín, M., Christaki, U., Nedoma, J., Weinbauer, M., & Dolan, J. (2003). Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, 31, 123–135.

- Šimek, K., Macek, M., Pernthaler, J., Straskrabová, V., & Psenner, R. (1996). Can freshwater planktonic ciliates survive on a diet of picoplankton? *Journal of Plankton Research*, 18(4), 597-613.
- Šimek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M. G., Hornák, K., Dolan, J. R., Nedoma, J., . . . Amann, R. (2001). Changes in Bacterial Community Composition and Dynamics and Viral Mortality Rates Associated with Enhanced Flagellate Grazing in a Mesoeutrophic Reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2723–2733.
- Šimek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Posch, T., Hartman, P., Nedoma, J., & Psenner, R. (1997). Morphological and Compositional Shifts in an Experimental Bacterial Community Influenced by Protists with Contrasting Feeding Modes. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 63(2), 587–595.
- Sorokin, P., Sorokin, Y., Boscolo, R., & Giovanardi, O. (2004). Bloom of picocyanobacteria in the Venice lagoon during summer–autumn 2001: Ecological sequences. *Hydrobiologia*, 523, 71–85.
- Stahl, D., Fishbain, S., Klein, M., Baker, B., & Wagner, M. (2002). Origins and Diversification of Sulfate- Respiring Microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 189–195.
- Stockner, J. (1988). Phototrophic picoplankton: An overview from marine and freshwater ecosystems. *Limnology and Oceanography*, 33, 765–775.
- Stockner, J. (1991). Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: the view from the summit. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 76, 483-492.
- Stockner, J., & Antia, N. (1986). Algal picoplankton from marine and freshwater. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43, 2472–2503.
- Stockner, J., Callieri, C., & Cronberg, G. (2000). Picoplankton and other non-bloom forming cyanobacteria in lakes. En B. Whitton, & M. Potts, *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* (págs. 195-238). Kluwer Academic Publishers.
- Stoecker, D., Silver, M., & Davis, L. (1989). Enslavement of algal chloroplasts by four Strombidium spp. (Ciliophora, Oligotrichida). *Marine Microbial Food Webs*, 3, 79–100.

- Tarbe, A.-L., Unrein, F., Stenuite, S., Pirlot, S., Sarmiento, H., Sinyinza, D., & Descy, J.-P. (2011). Protist Herbivory: a Key Pathway in the Pelagic Food Web of Lake Tanganyika. *Microbial Ecology*, 62, 314–323.
- Thingstad, T., Heldal, G., Bratbak, G., & Dundas, I. (1993). Are viruses partners in pelagic food webs? *TREE*, 8, 209–213.
- Tomaru, Y., Kawabata, K., & Nakano, S. (2000). Consumption of picoplankton by the bivalve larvae of Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Marine Ecology Progress Series*, 192, 195–202.
- Tujula, N., Holmström, C., Mußmann, M., Amann, R., Kjelleberg, S., & Crocetti, G. (2006). A CARD–FISH protocol for the identification and enumeration of epiphytic bacteria on marine algae. *Journal of Microbiological Methods*, 65, 604–607.
- van Niftrik, L., Fuerst, J., Sinninghe Damsté, J., Kuenen, J., Jetten, M., & Strous, M. (2004). The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 233, 7-13.
- van Niftrik, L., van Helden, M., Kirchen, S., van Donselaar, E., Harhangi, H., Webb, R., . . . Strous, M. (2010). Intracellular localization of membrane-bound ATPases in the compartmentalized anammox bacterium ‘Candidatus Kuenenia stuttgartiensis’. *Molecular Microbiology*, 77(3), 701–715.
- Vincent, W. (2000). Cyanobacterial dominance in the polarregions. En B. Whitton, & M. Potts, *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* (págs. 321-340). Kluwer Academic Publishers.
- Vizuet, L. A. (2015). *Evaluación de la composición del procarioplancton durante el fenómeno del emblanquecimiento "Whiting Event" en el lago Volcánico Atexcac, Estado de Puebla*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México (FES Zaragoza), Laboratorio de Limnoecología, Cd. Mx.
- Vörös, L., Callieri, C., Balogh, K., & Bertoni, R. (1998). Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. En M. Alvarez-Cobelas, C. Reynolds, P. Sanchez-Castillo, & J. Kristiansen, *Phytoplankton and trophic gradients* (Vol. 369/370, págs. 117–125). Hydrobiologia.
- Weisse, T., Müller, H., Pinto-Coelho, R., Schweizer, A., Springman, D., & Baldringer, G. (1990). Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limnology Oceanography*, 35, 781–794.

- Wiackowski, K., Brett, M., & Goldman, C. (1994). Differential effects of zooplankton species on ciliate community structure. *Limnology Oceanography*, 39, 486–492.
- Wickham, S. (1995). Cyclops predation on ciliates: Species-specific differences and functional responses. *Journal of Plankton Research*, 17, 1633–1646.
- Woebken, D., Lam, P., Kuypers, M., Nagvi, S., Kartal, B., Strous, M., . . . Amann, R. (2008). A microdiversity study of anammox bacteria reveals a novel Candidatus Scalindua phylotype in marine oxygen minimum zones. *Environmental Microbiology*, 10(11), 3106-3119.
- Work, K., & Havens, K. (2003). Zooplankton grazing on bacteria and cyanobacteria in a eutrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 25(10), 1301–1307.
- Wu, O., Boenigk, J., & Hahn, M. (2004). Successful predation of filamentous bacteria by a nanoflagellate challenges current models of flagellate bacterivory. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 332–339.
- Zavarzin, G., Stackebrandt, E., & Murray, R. (1991). A correlation of phylogenetic diversity in the Proteobacteria with the influences of ecological forces. *Canadian Journal of Microbiology*, 37, 1-6.
- Zlotnik, I., & Dubinsky, Z. (1989). The effect of light and temperature on DOC excretion by phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 34, 831–839.
- Zobell, C. (1946). *Marine Microbiology. A monograph on hydrobacteriology*. Waltham: Chronica Botanica Company.
- Zwart, G., Crump, B., Kamst-van Agterveld, M., Hagen, F., & Han, S. (2002). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology*, 28, 141–155.
- Zwart, G., Hiorns, W., Methé, B., Kamst-van Agterveld, M., Hursmans, R., Nold, S., . . . Laanbroek, H. (1998). Nearly identical 16S rRNA Sequences Recovered from Lakes in North America and Europe Indicate the Existence of Clades of Globally Distributed Freshwater Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 21, 546-556.

Anexo 1: Porcentajes de formamida necesario para el buffer de hibridación correspondiente a cada sonda de oligonucleótidos.

SONDA DE OLIGONUCLEOTIDOS	PROTEINA DE PRETRATAMIENTO	% FORMAMIDA
EUB I-III	PROTEINASA K	55%
BET 42a+C	PROTEINASA K	
GAM 42a+C	PROTEINASA K	
CF3 19a	PROTEINASA K	
ARCH 915	PROTEINASA K	
PLA 886	PROTEINASA K	
NON 338	PROTEINASA K	
SRB 385	PROTEINASA K	50%
ALF 968	PROTEINASA K	45%
LD12 121	PROTEINASA K	
PAR 1457	PROTEINASA K	35%
HGC 69a	ACROMOPEPTIDASA	35%
CREN 537	PROTEINASA K	20%