



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias del Agua

**“CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA
COMUNIDAD DE MICROORGANISMOS EN CUERPOS
DE AGUA DULCE DEL NORTE DE LA PENÍNSULA DE
YUCATÁN”**

Tesis que presenta

Victor Hugo Carrillo Jovel

En opción al título de

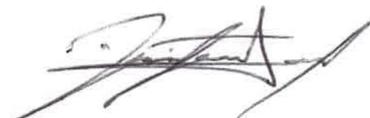
Maestro en Ciencias del Agua

Cancún, Quintana Roo, México

Noviembre, 2019

Declaración de Propiedad

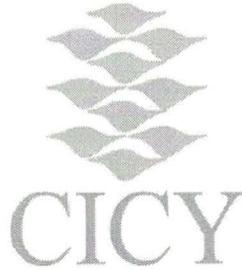
Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Victor Hugo Carrillo Jovel

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS DEL AGUA



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Victor Hugo Carrillo Jovel titulado "Caracterización de la estructura de la comunidad de microorganismos en cuerpos de agua dulce del norte de la Península de Yucatán" fue realizado en la Unidad de Ciencias del Agua, en la línea de Ecología y Dinámica de Ecosistemas Acuáticos, en el laboratorio de Biología Molecular, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección de la Dra. Cecilia Hernández Zepeda, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias del Agua de este Centro y la co-dirección de la Dra. Judith K. Brown de la Universidad de Arizona.

Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 09 de octubre de 2019

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado (beca 619276) para realizar mis estudios de maestría y mi estancia en el extranjero.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, al Posgrado en Ciencias del Agua y el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Ciencias del Agua que me otorgaron las facilidades para el desarrollo de este proyecto.

A la Escuela de Ciencias de las Plantas de la Universidad de Arizona, por las facilidades para realizar mi estancia.

Al proyecto de colaboración entre Texas A&M y el CONACYT (número de Proyecto 2018-009-2), titulado “Linkages between land use, ground water pollution, and cyanotoxins: a comparison between lake-like and stream-like systems, and between urban and rural landscapes” por el apoyo otorgado.

A la Dra. Cecilia Hernández Zepeda, quien me recibió en la Unidad de Ciencias del Agua y me abrió las puertas del Laboratorio de Biología Molecular. Gracias por ser una guía, por las exigencias y motivaciones necesarias para el desarrollo y culminación de este proyecto. Agradezco tu paciencia y, sobre todo, la confianza depositada en mí.

A la Dra. Judith K. Brown por aceptar este proyecto, por la secuenciación de las muestras, por sus preguntas, las pláticas y el tiempo invertido. Gracias por recibirme en la Universidad de Arizona y por la ayuda en el proceso del viaje y la estancia.

A la M. en C. Gabriela Rosiles por instruirme en el laboratorio, por los conocimientos compartidos, las sugerencias, los comentarios y la ayuda para el desarrollo de mi tesis, los cuales fueron indispensables. Gracias Gaby por el compañerismo y tu amistad, por el apoyo que siempre me brindaste, por reconocer mis defectos y mis virtudes, sin duda influiste en mi crecimiento personal y profesional.

A Seth Steichen por los conocimientos compartidos, los cuales fueron clave para esta tesis. Gracias por ser maestro, compañero y amigo. Te agradezco el tiempo compartido y las caminatas con Steph y Codie.

Al Dr. Eduardo Cejudo por haber sido parte de mi comité, por acompañarme en las salidas de campo y en el análisis de las muestras, por las enseñanzas, por el tiempo para las revisiones y los comentarios a mi trabajo. Agradezco también los consejos, las pláticas, la confianza y tu amistad.

Al Dr. Oscar Moreno quiero agradecer por ser parte de mi comité, por los conocimientos y las experiencias compartidas. También, por la salida de campo y por la ayuda para el desarrollo de los experimentos y de mi investigación. Gracias por los cuestionamientos y los comentarios, los cuales no solo enriquecieron mi trabajo, también mi visión sobre la investigación y el desarrollo personal.

A la Quim. Daniela Ortega quiero agradecer por la ayuda brindada para el análisis de mis muestras, por los comentarios y los consejos brindados.

A la Dra. Rosa Ma. Leal Bautista por ser parte de mi jurado, por la revisión y los comentarios a mi tesis.

Al Dr. Gilberto Acosta por la ayuda para el análisis de los datos y los comentarios realizados a mi trabajo.

Al personal académico, técnico y administrativo de la Unidad de Ciencias del Agua, siempre tuvieron la disposición para ayudarme y enseñarme.

A Luis, quien fue mi compañero de maestría, de laboratorio, de estancia y amigo. Gracias por los conocimientos compartidos, las discusiones, por la complicidad y las aventuras.

A Tere, por tu ayuda y conocimientos para el análisis de los datos.

A todos en el laboratorio, Carlos, Tere, Luis, Ramón, Gera, Jovana, Gaby, Ceci, que no solo compartimos micropipetas, también conocimientos, experiencias y diversión.

A Felipe y Gaby, que me brindaron su apoyo cuando lo necesitaba, gracias amigos.

A los “chidos del cicy”, mis compañeros de la maestría que me dieron su apoyo y consuelo cuando fue necesario, por las alegrías celebradas y por todos los momentos compartidos que hicieron este camino único.

A la “comuna”, gracias Tavo, Andrés, Omar, Berni, Nico, Eri, Lu, Fer y Ali, por haber estado y soportado los malos momentos y muchísimas gracias por todos aquellos buenos momentos, por todas las buenas vibras. Valeria, gracias por las pláticas tan necesarias.

A Fernanda y Alfrancis, quienes fueron mis mejores amigas, por escucharme, entenderme y aconsejarme, gracias por todos los momentos vividos, por las lágrimas, los berrinches y el cariño compartido.

A Paco, mi amigo, mi hermano. Juntos siempre en el camino. Gracias por todo tu apoyo.

A Alberto, gracias por todo tu apoyo, por confiar en mí, por preocuparte, por tus consejos tan valiosos, por estar en mi vida y ser parte de mi familia.

A Esli por ser la mejor compañera en esta etapa, por estar en los momentos complicados y en los venturosos, por ser mi confidente y por siempre darme ánimos para continuar. Gracias por tu paciencia, por tu comprensión, por siempre confiar en mí y gracias, sobre todo, por tu amor.

A mi familia, Victor, Rosa, Iris y Ricardo. Gracias por todo el amor y la confianza, por su apoyo en todas mis decisiones, por siempre estar juntos.

Dedicatoria

Con todo mi amor

A mi padre, a mi madre y a mis hermanos

Tabla de contenido

Introducción	1
Antecedentes	3
1 El acuífero de la Península de Yucatán	3
1.1 Los cenotes	3
1.2 Eutrofización de los cenotes	4
2 Diversidad de microorganismos en ambientes acuáticos.....	6
2.1 Diversidad bacteriana en ambientes de agua dulce	6
2.1.1 Diversidad bacteriana en ambientes cársticos	8
2.2 Las cianobacterias.....	9
2.2.1 Caracterización de cianobacterias mediante técnicas moleculares ..	10
2.3 Diversidad de cianobacterias en México	12
2.3.1 Diversidad de cianobacterias en la Península de Yucatán.....	13
3 Métodos para el estudio de los microorganismos	14
3.1 Metagenómica para el estudio de la diversidad.....	15
3.2 Técnicas para el estudio de los metagenomas.....	16
3.3 Gen 16S ADN como marcador molecular.....	18
3.4 Herramientas computacionales para el análisis metagenómico	19
4 Justificación.....	21
4.1 Hipótesis.....	22
4.2 Objetivos.....	22
4.2.1 Objetivo General	22
4.3 Objetivos Particulares.....	22
5 Metodología	23

5.1	Área de Estudio	23
5.1.1	Chen-ha	25
5.1.2	Xcolac (Xcholac)	26
5.1.3	Mumundzonot	26
5.1.4	Kanaha	26
5.1.5	Kikil	26
5.1.6	Sucila	27
5.1.7	Punta Laguna	27
5.1.8	Muestras colectadas en 2014	27
5.2	Colecta de muestras y medición de parámetros fisicoquímicos	28
5.3	Cuantificación de nutrientes	29
5.4	Cuantificación de Clorofila	29
5.5	Extracción y cuantificación de ADN	30
5.6	Secuenciación del gen 16S ARNr	30
5.7	Amplificación del gen 23S ARNr	31
5.8	Clonación de los fragmentos del gen 23S ARNr	31
5.9	Análisis bioinformático	32
5.9.1	Análisis bioinformático del marcador 16S	32
5.9.2	Análisis bioinformático del marcador 23S	33
5.10	Análisis de la diversidad	34
6	RESULTADOS	36
6.1	Características físico-químicas de los cuerpos de agua	36
6.1.1	Nutrientes: nitratos y fosfatos	37
6.1.2	Composición iónica	39

6.1.3	Clorofila	41
6.2	Diversidad genética: marcador 16S ARNr	43
6.2.1	Diversidad bacteriana.....	43
6.2.2	Estructura de la comunidad bacteriana a nivel de phylum y clase	45
6.2.3	Abundancia bacteriana a nivel de familia y género	48
6.2.4	Diversidad de cianobacterias: marcador 16S.....	51
6.3	Creación de las bibliotecas del gen 23S ARNr	53
6.3.1	Extracción y cuantificación de ADN.....	53
6.3.2	Amplificación y clonación de los fragmentos del gen 23S ARNr	54
6.4	Diversidad genética y estructura de la comunidad de cianobacterias: marcador 23S ARNr	55
6.4.1	Estructura de la comunidad a nivel de phylum.....	57
6.4.2	Estructura de la comunidad a nivel de orden	59
6.4.3	Estructura de la comunidad a nivel de familia y especie	61
6.4.4	Estado trófico de los ambientes acuáticos y su relación con la composición de la comunidad de cianobacterias	64
6.4.5	Composición de la comunidad de cianobacterias en relación al ambiente y el mes de muestreo	66
6.4.6	Análisis comparativo de las variables ambientales y la comunidad de cianobacterias	68
7	Discusión.....	70
7.1	Características de los ambientes acuáticos.....	70
7.2	Diversidad bacteriana en ambientes acuáticos de la Península de Yucatán utilizando el gen 16S.....	71
7.3	Cianobacterias en el acuífero cárstico de la Península de Yucatán 16S	74

7.4	Cianobacterias en el acuífero cárstico de la Península de Yucatán identificadas con el gen 23S	76
8	Conclusión	78
9	Referencias bibliográficas	80

Índice de tablas

Tabla 1. Sitios de estudio. Se muestra el nombre común del cuerpo de agua y su ubicación en la Península de Yucatán.....	24
Tabla 2. Valores de los parámetros fisicoquímicos obtenidos de los 4 sitios de estudio en los muestreos realizados en 2014.....	28
Tabla 3. Valores de los parámetros fisicoquímicos obtenidos en los 7 sitios de estudio en los muestreos de octubre de 2017 y febrero de 2018.....	36
Tabla 4. Concentración de los nutrientes determinados para cada uno de los sitios de estudio (NID: Nitrógeno Inorgánico Disuelto; SRP: Fosforo Reactivo Soluble; N/P: Relación NID/SRP).....	38
Tabla 5. Concentración de los iones presentes en los sitios de muestreo.	39
Tabla 6. Concentración de la clorofila a, b y c determinados para cada uno de los sitios de muestreo.	41
Tabla 7. Grado de eutrofia con base en el índice del estado trófico de Carlson (1977) de los sitios de estudio.....	42
Tabla 8. Riqueza genética estimada en los sitios de estudio mediante el índice de Chao.1, y diversidad estimada mediante el índice de Shannon y de Simpson.....	43
Tabla 9. Abundancia relativa de las ASV's clasificadas a nivel de orden en el phylum <i>Cyanobacteria</i> . Se enlistan los taxones de menor a mayor en relación a su abundancia relativa de todas las secuencias. (*: se agruparon dos ASV's diferentes con la misma clasificación).....	51
Tabla 10. Concentración de ADN extraído de las muestras de agua de cada uno de los sitios de estudio.	54
Tabla 11. Diversidad estimada de cianobacterias con base en los resultados de las secuencias obtenidas del gen 23S. Riqueza estimada mediante el Índice de Chao.1, diversidad estimada mediante el Índice de Shannon y el índice de Simpson para cada uno de los siete sitios de estudio.....	55
Tabla 12. Clasificación taxonómica a nivel de especie identificada en los sitios de estudio.....	64

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación del área de estudio y los sitios de muestreo. (CH) Chen ha, (XC) Xcolac, (MZ) Mumundzonot, (KU) Kanaha, (SC) Sucila, (KK) Kikil, (PL) Punta Laguna, (YP2) Leona Vicario, (YP4) Aguada y (YP5) Acuario.	25
Figura 2. Composición iónica de los sitios de muestreo. (CH) Chen ha, (XC) Xcolac, (MZ) Mumundzonot, (KU) Kanaha, (SC) Sucila, (KK) Kikil, (PL) Punta Laguna.	40
Figura 3. Comparación de la frecuencia observada y la abundancia observada mayor al 0.1 % de las variantes de secuencia (ASV's).	44
Figura 4. Dendograma de comparación entre los sitios de estudio con base en el coeficiente de similitud de Jaccard.	45
Figura 5. Composición de la comunidad y distribución de los siete phyla observados en los cenotes muestreados. El gráfico muestra los grupos con abundancia mayor al 1 %.....	46
Figura 6. Composición de la comunidad y distribución de los 32 phyla observados en los cenotes muestreados con abundancia menor al 1 %.....	47
Figura 7. Distribución de las clases identificadas pertenecientes a los seis phyla más abundantes en los sitios de muestreo.....	48
Figura 8. Composición de la comunidad de bacterias a nivel de familia con abundancia relativa mayor al 1% en los diferentes sitios de estudio.....	49
Figura 9. Distribución de los géneros más abundantes en los diferentes sitios de estudio. Se muestran los géneros con abundancia mayor al 1%, se omitieron los géneros clasificación de “no cultivado” y de “metagenoma”.....	50
Figura 10. Distribución de los géneros de cianobacterias en los diferentes sitios de estudio, entre paréntesis se muestra la abundancia relativa de género en el total de las secuencias.	52
Figura 11. Extracción de ADN ambiental de muestras de agua (octubre 2017). Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1 %; técnica de tinción EtBr. (MZ,	

Mumundzonot; KU, Kanaha; KK, Kikil; XC, Xcolac; CH, Chen-ha; SC, Sucila; PL, Punta Laguna).	53
Figura 12. Distribución de los phyla clasificados mediante el análisis del gen 23S ARNr.	58
Figura 13. Composición de cianobacterias y algas eucariotas en los diferentes sitios de estudio y muestreos.	59
Figura 14. Abundancia relativa de los órdenes de cianobacterias identificados en cada sitio de estudio durante los meses de octubre y febrero.	60
Figura 15. Abundancia relativa de las familias de cianobacterias identificados en cada sitio de estudio durante los meses de octubre y febrero.	62
Figura 16. Composición de los géneros de cianobacterias identificados en las diferentes formas de los cenotes y su relación con el estado trófico.	65
Figura 17. Composición de los géneros de cianobacterias identificadas en los dos meses de muestreo (octubre y febrero) y la relación con el tipo de cuerpo de agua.	67
Figura 18. Gráfico de ordenación en dos dimensiones MDS de los sitios de muestreo por el tipo de ambiente y las proyecciones de las variables ambientales definidas por el análisis de componentes principales.	69

Listado de abreviaturas

Península de Yucatán	PY
Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Ácido Ribonucleico ribosomal	ARNr
Amplicon Sequence Variant	ASV
National Center of Biotechnology Information	NCBI
Next Generation Sequencing	NGS
Nitrógeno Inorgánico Disuelto	NID
Pasteur Culture Collection	PCC
Quantitative Insights Into Microbial Ecology	QIIME
Reacción en Cadena de la Polimerasa	PCR
Ribosomal Data Project	RDP
U.S. Environmental Protection Agency	US EPA
Unidad Taxonómica Operativa	OTU
Península de Yucatán	PY
Ácido Desoxirribonucleico	ADN

RESUMEN

Las técnicas metagenómicas han permitido el estudio de las comunidades microbianas en múltiples ambientes, no obstante, los estudios ecológicos empleando esta técnica en el acuífero de la Península de Yucatán (PY) son escasos. En el presente estudio se utilizó la secuenciación masiva del gen 16S ARNr para determinar la diversidad y abundancia de la comunidad de bacterias de cinco cuerpos de agua dulce (cenotes) ubicados en el norte de la PY. Además, se determinó la diversidad de la comunidad de cianobacterias en siete cuerpos de agua (cenotes, lago cárstico) mediante la secuenciación por Sanger de un fragmento del gen 23S ARNr. La colecta de muestras de agua se realizó mediante el uso de una red de fitoplancton de 0.45 μm para concentrar 100 L de agua en un volumen final de 1 litro. En cada sitio se determinaron las variables fisicoquímicas de temperatura, pH, sólidos disueltos totales y conductividad eléctrica; y se tomaron muestras de agua para determinar las concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto ($\text{NID} = \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$), ortofosfatos, clorofila, cationes (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2}) y aniones (SO_4^{-2} y Cl^-). A partir de las muestras de agua concentradas, se realizó la extracción del ADN total y se realizó la secuenciación del gen 16S ARNr (Illumina seq); además, se amplificó un fragmento del gen 23S de aproximadamente 410 pares de bases, el cual fue clonado y secuenciado. En total, se obtuvieron 213,517 secuencias de la región V4 del gen 16S ARNr de las cuales se obtuvieron en 1,646 ASV's (Amplicon Sequence Variants). El análisis bioinformático indicó la presencia de 46 phyla bacterianos identificados a partir de los cinco sitios muestreados, además, se identificó que la comunidad de bacterias en los cenotes está dominada por Proteobacterias y Bacteriodetes. Se encontró una alta riqueza de especies (Índice de Simpson: 0.90-0.98) y diversidad (Índice de Shannon: 3.3-4.5). El análisis bioinformático de 380 secuencias correspondientes al gen 23S ARNr indicaron la presencia de 239 ASV's identificados a en los siete sitios estudiados. Se identificaron los órdenes *Nostocales*, *Phormidesmiales* y *Synechococcales*. Los resultados de este estudio expanden nuestro conocimiento en la diversidad de microorganismos en el acuífero de la península de Yucatán.

Abstract

Metagenomic techniques have allowed the study of microbial communities in multiple environments; however, ecological studies in the aquifer of Yucatan Peninsula (YP) using this technique are scarce. In the present study, amplicon sequencing of 16S rRNA gene was used to determine the diversity and abundance of the bacterial community in five freshwater bodies (cenotes) located in the north of the YP. In addition, a fragment of the 23S rRNA gene was sequenced by Sanger to identify the diversity of the cyanobacterial community in seven bodies of water (cenotes, karstic Lake). Water samples were collected using a phytoplankton net of 0.45 μm to concentrate 100 L of water in a final volume of 1 liter. In each site the physicochemical parameters of temperature, pH, total dissolved solids and electrical conductivity were measured; and water samples were collected to determine the concentrations of dissolved inorganic nitrogen ($\text{DIN} = \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$), orthophosphates, chlorophyll, cations (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2}) and anions (SO_4^{-2} y Cl^-). From the concentrated water samples, total DNA extraction was performed and sequencing of the 16S rRNA gene (Illumina seq) was performed; in addition, a fragment of the 23S gene of approximately 410 base pairs was amplified, cloned and sequenced. A total of 213'517 sequences from the V4 region of the 16S rRNA gene were generated, of which 1'646 ASV's (Amplicon Sequence Variants) were constructed. Analysis of the sequences indicated the presence of 46 bacterial lineages were identified from the five sites, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* dominate the bacterial community in the cenotes. High species richness (Simpson Index: 0.90-0.98) and diversity (Shannon Index: 3.3-4.5) were found. Bioinformatic analysis of 380 sequences corresponding to the 23S rRNA gene indicated the presence of 239 ASV's from the seven sites. *Nostocales*, *Phormidesmiales* and *Synechococcales* were identified. The results of this study expand our knowledge of the diversity of microorganisms in the aquifer of the Yucatan Peninsula.

Introducción

Los microorganismos son el componente más abundante de la biosfera y son parte fundamental en el mantenimiento de la vida en el planeta (Pace, 1997). El conocimiento de la diversidad de los microorganismos es necesario para entender los patrones y las actividades que éstos realizan en los ambientes acuáticos. Esto proporciona información general para la sostenibilidad de los recursos acuáticos, y permite predecir las futuras respuestas y funciones de los microorganismos en un mundo cambiante (Zehr, 2010) donde la presencia de diferentes factores puede resultar en un decremento de la calidad del agua (Reid *et al.*, 2018).

El estudio de la diversidad de los microorganismos se ha realizado ampliamente en el ambiente marino con proyectos a gran escala como la Global Ocean Sampling Expedition, The Malaspina Expedition y el Tara Oceans Expedition (Salazar y Sunagawa, 2017). En las últimas décadas se han realizado también diferentes estudios para determinar la diversidad de los microorganismos en ambientes de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002) y gracias a los avances en la técnicas de secuenciación, hay un creciente interés de la comunidad científica en el estudio de estos ambientes (Newton *et al.*, 2011; Zinger *et al.*, 2012). Algunos otros estudios se han enfocado en la diversidad de microorganismos encontrados en ambientes acuáticos extremos, como en la Antártida (Wilkins *et al.*, 2013) o en agua subterránea (Griebler y Lueders, 2009), en donde se han identificado comunidades específicas en cada tipo de ambiente.

El acuífero de la Península de Yucatán es un sistema muy particular, debido a que la superficie de la península está formada principalmente por roca caliza, la disolución por medio del agua de lluvia forma un acuífero con un paisaje cárstico, el cual ha desarrollado estructuras como los cenotes (dolinas) que son característicos de la región (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Sin embargo, las actividades humanas como la agricultura, las actividades ganaderas y la generación de residuos, así como el desarrollo turístico en la región generan presión en el acuífero, aumentando la cantidad

de contaminantes que llegan al agua subterránea (Bauer-Gottwein *et al.*, 2011). Se han registrado altas concentraciones de nitratos en pozos (Pacheco y Cabrera, 1997) y se ha reportado evidencia de contaminación fecal en cenotes (Leal-Bautista *et al.*, 2011; Rosiles-González *et al.*, 2017). Estos contaminantes representan un factor de riesgo para la salud humana, además que afectan al ecosistema y a las comunidades de microorganismos que habitan en él (Khatri y Tyagi, 2015).

La diversidad de microorganismos que habitan en los ambientes acuáticos de la PY se ha estudiado en los últimos años. Por ejemplo, algunos estudios se han enfocado en identificar la diversidad del fitoplancton en cenotes (Sanchez *et al.*, 2002; Lopez-Adrián y Barrientos-Medina, 2005), y en zonas costeras (Valadez *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de estos estudios han utilizado herramientas de la morfología tradicional para determinar la diversidad del fitoplancton y a la fecha, aún no se cuenta con estudios sobre la estructura y composición de la comunidad de microorganismos en cuerpos de agua dulce mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva o técnicas moleculares.

El presente estudio tiene como objetivo determinar la estructura de la comunidad de microorganismos con énfasis en la comunidad de cianobacterias en diferentes ecosistemas ubicados en el norte de la Península de Yucatán, mediante el análisis metagenómico del gen 16S ARNr y del gen 23S ARNr.

Antecedentes

1 El acuífero de la Península de Yucatán

La península de Yucatán es una plataforma de roca caliza con un área superficial alrededor de 165,000 km², se localiza al sureste de México y comprende los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y parte de Tabasco. La península está caracterizada por dos periodos climáticos, la temporada de lluvias que abarca de Marzo/Abril hasta Octubre/Noviembre y la temporada de secas de Octubre/Noviembre a Marzo/Abril (Alcocer *et al.*, 1998; Bauer-Gottwein *et al.*, 2011).

La península es plana y debido a sus características geológicas, el escurrimiento superficial y el drenaje son prácticamente inexistentes, por lo tanto, el agua subterránea es el único recurso de agua disponible (Bauer-Gottwein *et al.*, 2011). El acuífero de la península de Yucatán es cárstico, está caracterizado por su alta permeabilidad, posee canales subterráneos y cavernas; el agua subterránea fluye a través de la matriz de la roca, y el agua de lluvia se infiltra formando una capa de agua dulce que flota sobre una de agua salada más densa (Schmitter-Soto *et al.*, 2002; Bauer-Gottwein *et al.*, 2011).

Los sistemas acuáticos en la Península de Yucatán son variados, existen lagos, estanques, humedales, pozas, cenotes, ríos y cuerpos de agua costeros, los cuales varían tanto en su superficie, profundidad, estado trófico, entre otras características (Pérez *et al.*, 2011).

1.1 Los cenotes

Los cenotes (dolinas) son una característica del paisaje cárstico de la península de Yucatán, el termino cenote proviene del vocablo Maya ts'onot, su formación se debe principalmente a la disolución de la roca caliza. En el norte de la península además de que existen una gran cantidad de cenotes, se localiza también una formación geológica muy característica en la cual los cenotes están ubicados a lo largo de un semicírculo el cual es conocido como el anillo de cenotes (Schmitter-Soto *et al.*, 2002), esta

formación abarca 27 municipios del estado de Yucatán, desde Celestún hasta Dzilam de Bravo (Ramsar, 2012).

Los cenotes se han agrupado en diferentes tipos con base en sus características geológicas (formas): 1) en forma de jarra; 2) con paredes verticales; 3) como aguada y 4) como cueva. Tradicionalmente, desde la época de los Mayas, los cenotes han sido utilizados como fuente de agua para consumo humano, sin embargo, en la actualidad, estos cuerpos de agua también tienen usos de tipo recreacional y turístico, siendo esta última una de las actividades económicas más importantes en la Península de Yucatán (Bauer-Gottwein, *et al.*, 2011).

1.2 Eutrofización de los cenotes

El estado trófico describe la relación entre la cantidad de nutrientes en un cuerpo de agua y la biomasa, mientras la eutrofización se refiere al proceso de cambio de un estado trófico a otro de nivel superior por la adición de nutrientes (Moreno Franco *et al.*, 2010). El flujo de nutrientes a los sistemas acuáticos es natural, sin embargo, las actividades que realizamos los humanos tienen influencia directamente en aumento de los nutrientes hacia los cuerpos de agua. Las principales causas asociadas a las actividades antropogénicas y que dan como resultado procesos de eutrofización pueden ser la descarga de aguas residuales (Braga *et al.*, 2000), el uso excesivo de fertilizantes mediante el aporte de nitrógeno (nitrato y amonio) y fósforo (fosfatos) (Smith *et al.*, 1998), la deforestación y erosión de suelos agrícolas, la presencia de gases como los óxidos de nitrógeno y de azufre que al entrar en contacto con el agua forman iones nitrato y sulfato (Moreno Franco *et al.*, 2010). La densidad poblacional y el tipo de uso de la tierra influyen fuertemente en la carga de nitrógeno y fósforo (Smith, 2003).

Los cenotes fácilmente pueden cambiar de nivel trófico, favoreciendo la producción de grandes cantidades de materia orgánica ocasionando un incremento en el pH, turbidez, condiciones anóxicas y ácidas en el fondo (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Existe evidencia de contaminación antropogénica en el acuífero de la Península de

Yucatán, a la fecha se han registrado concentraciones de cloruros que exceden el máximo permisible para el consumo humano (250 mgL^{-1}) en pozos cercanos a basureros (Herrera González y Castillo Rodríguez, 2006) también, se han registrado contaminación por nitratos, las cuales varían estacionalmente, siendo mayores durante la temporada de lluvias (Pacheco y Cabrera, 1997; Alcocer *et al.*, 1998) y existe evidencia de contaminación fecal en cenotes turísticos y recreacionales (Leal-bautista *et al.*, 2011; Hoogesteijn Reul *et al.*, 2015; Rosiles-González *et al.*, 2017).

En los ecosistemas acuáticos eutrofizados ocurre una alteración de la diversidad biológica, puesto que el efecto más común del aumento del aporte de nitrógeno y fosforo es el incremento en la abundancia de las algas y las plantas acuáticas (Smith, 2003). Las cianobacterias, componentes del fitoplancton, son organismos comunes de los ecosistemas acuáticos, debido a sus altas capacidades adaptativas pueden resistir cambios en la composición y estructura de sus comunidades como resultado del aporte de nutrientes o de contaminación (Havens *et al.*, 2003). Este grupo se ha utilizado como indicador de eutrofización de los cuerpos de agua, debido a que responden al incremento de nutrientes ocasionando florecimientos masivos que incluso pueden conducir a la producción de toxinas con potencial riesgo para la salud humana (Teta *et al.*, 2017). Dentro de este grupo de microorganismos la presencia de algunas especies de *Oscillatoriales* se han asociado con condiciones eutróficas como: *O. pútrida*, *O. chlorina* u *O. splendida*, entre otras. Por otro lado, la presencia de *Calothrix parietina*, *C. fucsa* y *Tolypotrix distorta*, se ha asociado a ecosistemas acuáticos prístinos (Mateo *et al.*, 2015; Teta *et al.*, 2017).

De acuerdo con Bartram *et al.* (1999) en regiones tropicales, si hay constancia estacional de temperatura y duración del fotoperiodo, se favorece el crecimiento de las algas verde azules (Cianofitas). Otros autores reportan que las cianofitas tienen preferencia por aguas neutras o ligeramente alcalinas y temperaturas cercanas a los 25°C (Shapiro, 2017), condiciones que se pueden encontrar en cenotes de la península de Yucatán (Nava-Ruiz y Valadez, 2012),

2 Diversidad de microorganismos en ambientes acuáticos

Los microorganismos constituyen una fracción importante de la biomasa total, son la principal fuente de la biodiversidad en nuestro planeta y juegan un papel esencial en el mantenimiento de los procesos biogeoquímicos y la regulación del funcionamiento de la biosfera (Hernández-De Lira *et al.*, 2014). Los microorganismos planctónicos dominan los ecosistemas acuáticos en términos de abundancia y biomasa, estos incluyen a las bacterias, las arqueas, algunos eucariotas y virus. Todos ellos son responsables de los mayores procesos biogeoquímicos, por ejemplo, el fitoplancton realiza la mayor parte de la producción primaria en el océano (Zinger *et al.*, 2012).

Los microorganismos pueden habitar prácticamente cualquier lugar en el planeta, incluso en ambientes extremos, como las pozas termales, el hielo glacial o los ecosistemas de agua subterránea, entre algunos otros (Aryal *et al.*, 2015). En los ecosistemas de agua subterránea en donde existe una ausencia de luz, baja disponibilidad de nutrientes y bajas temperaturas, los microorganismos son los colonizadores, por ejemplo, se pueden encontrar bacterias, arqueas, hongos y protozoarios; principalmente aquellos bien adaptados, como los heterótrofos o los litoautótrofos (Griebler y Lueders, 2009).

2.1 Diversidad bacteriana en ambientes de agua dulce

En los años 80's se creía que las bacterias que habitan los ecosistemas de agua dulce no diferían en la composición de las bacterias que se encuentran en los ambientes terrestres circundantes (Hahn, 2006). Recientemente se ha demostrado que la mayoría de las secuencias obtenidas de los ambientes de agua dulce se relacionan más con otros ambientes de agua dulce y menos con secuencias obtenidas de ambientes terrestres o marinos (Zwart *et al.*, 2002).

Glöckner *et al.* (2000) realizaron un análisis comparativo de secuencias del 16S ARNr del bacterioplancton de muestras provenientes de tres lagos en Australia, Alemania y Rusia, este estudio reveló que la mayoría de las secuencias provenían del

agua dulce o del suelo; mostraron que *Actinobacteria* es un grupo abundante en el bacterioplancton y, al igual Zwart et al. (2002) infirieron la distribución global de un grupo de bacterioplancton típico de agua dulce. Las comunidades bacterianas de ambientes de agua dulce están caracterizadas por *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes*, siendo las *Beta-Proteobacterias* particularmente las más abundantes en los ambientes de agua dulce y ausentes en ambientes marinos (Logue et al., 2008).

A partir del 2004 con la aplicación de las nuevas técnicas de secuenciación aumentaron los estudios con métodos moleculares en ambientes acuáticos en general (Zinger et al., 2012). Por ejemplo, en ambientes como los ríos hubo un creciente interés en determinar los factores que pueden influir en la composición de las comunidades de microorganismos (Zeglin, 2015). Otros sistemas acuáticos de agua dulce que también se han explorado comprenden a lagos ubicados en la Antártida, en los cuales la comunidad de bacterias está caracterizada por *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria* y *Cianobacteria* (Wilkins et al., 2013).

En el caso del agua subterránea, se considera que es un ambiente con alto grado de endemismo (Gibert et al., 2009) y que contiene una gran diversidad en la comunidad de microorganismos (Korbel et al., 2017), también se ha sugerido que las características del agua subterránea permiten el desarrollo de un nicho específico para el desarrollo de algunas especies (Danielopol et al., 2003). Por ejemplo, Smith y colaboradores (2012) compararon las comunidades de los acuíferos confinados y no confinados en el sur de Australia, en el cual se reportó que en el acuífero no confinado se reportó la dominancia de *Rhodospirillales*, *Rhodocyclales*, *Chlorobia* y *Circovirus*, mientras que en el acuífero confinado estuvo sobrerrepresentado por *Deltaproteobacteria* y *Clostridiales*. Se ha reconocido la importancia de este ecosistema, tanto en su diversidad como en los servicios que proporciona (Griebler et al., 2014).

2.1.1 Diversidad bacteriana en ambientes cársticos

En un estudio realizado en el acuífero cárstico de Madison, en Dakota del Sur, USA, se obtuvieron muestras de agua superficial de un manantial y una cueva inundada para comparar la comunidad microbiana del acuífero. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas a partir de la pirosecuenciación de la región V4 del gen 16S, se reportó que la comunidad de bacterias estuvo compuesta por 11 phyla en el manantial y 14 en la cueva, sin embargo, la comunidad en el manantial estuvo dominada por un filotipo perteneciente a las *Gammaproteobacteria* (Orden *Acidithiobacillales*) y la comunidad en la cueva fue más diversa (Hershey *et al.*, 2018).

Chen *et al.* (2019), realizaron un estudio comparativo de la estructura de la comunidad de bacterias entre agua dulce, salada y marina de diferentes pozos y a diferentes profundidades en el noreste de la península de Jiaodong en China, con la finalidad de explorar el efecto de la intrusión salina en la calidad del agua subterránea. Mediante secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen 16S, encontraron que el agua de mar tiene la menor riqueza y equitatividad a diferencia del agua de irrigación que tiene las mayores. Sus resultados mostraron que el oxígeno disuelto, el potencial de óxido-reducción y los cloruros afectan la distribución de los microorganismos en el agua subterránea, siendo el porcentaje del oxígeno disuelto el factor que más influencia la diversidad de la comunidad microbiana (Chen *et al.*, 2019).

En lo que respecta a México, Centeno *et al.* (2012) realizaron un estudio sobre la diversidad genética y la composición de la comunidad de microbialitas ubicadas en diferentes ambientes dentro de la república, incluyendo pozas en el desierto (Cuatro Ciénegas), lagunas costeras (Muyil y Bacalar) y un lago de cráter (Lago Alchichica), mediante pirosecuenciación de las regiones V4-V6 del gen 16S: los resultados obtenidos mostraron que en las lagunas costeras del acuífero de la PY se observa una mayor diversidad y que las microbialitas que se desarrollan en ambientes similares albergan comunidades similares de procariotas, incluso cuando están separadas por grandes distancias. En este trabajo los phyla más abundantes fueron *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Cyanobacteria*; además se determinó que existen patrones

geográficos asociados a las comunidades de microbialitas y que el pH, así como la conductividad se correlacionan con la composición de la comunidad (Centeno *et al.*, 2012).

Un estudio realizado en el noreste de México, en el sistema Zacatón comparó la estructura de la comunidad de microorganismos de 3 cenotes adyacentes mediante la secuenciación del gen 16S ARNr (Sahl *et al.*, 2011). Los resultados demostraron la presencia de secuencias correspondientes a *Epsilonproteobacteria*, *Chlorobi*, *Chlorophyceae*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria*. Los tres cenotes difirieron en la estructura de la comunidad, estas diferencias se atribuyeron a la profundidad en la columna de agua, la mezcla de la columna de agua y las variaciones geoquímicas de los cenotes (Sahl *et al.*, 2011). Estos resultados muestran que incluso las diferencias más sutiles entre cuerpos de agua similares en sitios que son cercanos geográficamente pueden influir o determinar la composición de la comunidad de microorganismos.

2.2 Las cianobacterias

Las cianobacterias, también conocidas como algas verde-azules, son los organismos fotoautótrofos oxigénicos más antiguos en la tierra, aparecieron aproximadamente hace 2600 - 3500 millones de años. Tienen una organización celular de tipo procariota, no presentan flagelos y poseen pigmentos como clorofila y algunos pigmentos accesorios como ficobilinas. Son morfológicamente diversas, pueden presentarse unicelulares o multicelulares, con vida libre o en formación de colonias, en algunos casos filamentosas. Son organismos ubicuos tanto en ambientes acuáticos como terrestres (Lee, 2008; Sahoo y Seckbach, 2015).

Las cianobacterias poseen amplias capacidades metabólicas y mecanismos adaptativos, como la fijación del nitrógeno mediante células especializadas llamadas heterocistos y la habilidad de establecer relaciones simbióticas con diversos organismos eucariotas (Gupta *et al.*, 2013). Han sido llamados como eco-estrategas debido a que pueden modificar las condiciones de su hábitat, también han sido

clasificadas en grupos funcionales basados en sus características fisiológicas, principalmente la flotabilidad, la formación de colonias y la fijación de nitrógeno (Gupta *et al.*, 2013).

Las cianobacterias se han utilizado para diferentes aplicaciones como la producción de biocombustibles, la depuración del exceso de gases de efecto invernadero, la producción de metabolitos secundarios y sustancias con aplicación terapéutica (Sahoo y Seckbach, 2015). Las algas verde azules en agua dulce pueden presentarse como organismos no deseados, formadores de florecimientos densos ocasionando efectos adversos en las actividades humanas como la producción de toxinas, proporcionar olor y sabor desagradable, obstrucción del curso del agua y dificultando las actividades recreativas. (Bellinger y Sigee, 2014; Oliva-Martínez *et al.*, 2014)

2.2.1 *Caracterización de cianobacterias mediante técnicas moleculares*

La identificación y clasificación de las cianobacterias es compleja por poseer células de tamaño muy pequeño, morfología similar a distintas entidades filogenéticas, poseer especies crípticas y la coexistencia de dos códigos diferentes de nomenclatura, el botánico y el bacteriológico (Sciuto y Moro, 2015). Tradicionalmente han sido clasificadas mediante observaciones morfológicas y por los pigmentos que poseen, sin embargo, los métodos moleculares pueden utilizarse como un complemento para su identificación, especialmente para aquellos organismos que tienen pocas características morfológicas distintas que permitan su identificación, como el caso del picoplancton (0.2 – 2 μm) por ejemplo (Ebenezer *et al.*, 2012).

Las técnicas moleculares para el estudio de las microalgas, incluidas las cianobacterias, se empezaron a emplear en los años 1970's, desde esa época se ha ampliado el desarrollo de los métodos moleculares basados en el ADN para extender nuestro conocimiento sobre la diversidad genética y la taxonomía molecular. La mayoría de los métodos moleculares que se desarrollaron fueron principalmente para la

identificación de las microalgas planctónicas, particularmente aquellas que pueden ser nocivas, como las que pueden desarrollar florecimientos (Ebenezer *et al.*, 2012).

En general, los métodos para el estudio de cianobacterias se pueden categorizar en cinco grupos de acuerdo a la molécula objetivo que se pretenda analizar: toxinas, proteínas, carbohidratos, ARN y ADN. Los métodos basados en el ADN se han desarrollado para la identificación taxonómica de las especies de microalgas, además, las secuencias obtenidas a partir de estos métodos permiten realizar análisis filogenéticos (Ebenezer *et al.*, 2012).

Las técnicas de secuenciación de ADN de nueva generación permiten obtener datos con rapidez y analizar una mayor cantidad de información en comparación con la metodología de secuenciación de Sanger (1997). El primer genoma cianobacteriano publicado fue el de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en 1996, desde ese entonces más de 400 genomas están disponibles en las bases de datos, la mayoría de estos genomas fueron obtenidos de organismos marinos y se encuentran depositados en la colección de cultivos de cianobacterias Pasteur (PCC, por sus siglas en inglés).

Las técnicas moleculares se utilizan para complementar la información taxonómica en el grupo de cianobacterias, particularmente se utilizan las secuencias de los genes ribosomales, gracias a las cuales las cianobacterias fueron clasificadas dentro del dominio bacterias (Hoffman *et al.*, 2005). Recientemente, se propuso una clasificación para las cianobacterias basada en información obtenida a partir de la reconstrucción filogenética del gen 16S ARNr, junto con datos morfológicos, ultra estructurales y la composición de los pigmentos (Sciuto y Moro, 2015).

Dentro de los genes ribosomales también se ha utilizado el gen 23S ARNr para el estudio de las cianobacterias. Sherwood y Presting (2007) diseñaron un juego de cebadores que flanquean el dominio V del gen 23S ARNr de plastos para la identificación de algas eucariotas y cianobacterias. Mediante la comparación de las secuencias de 37 genomas de diferentes algas y plantas terrestres se distinguió un fragmento de ~410 pb con la cual se lograron identificar principalmente linajes de algas

verdes, cafés y cianobacterias. El juego de cebadores p23SrV demostró ser útil en la identificación selectiva de los mayores grupos de algas en muestras ambientales, discriminando a la mayoría de grupos bacterianos (Sherwood *et al.*, 2008).

Estos cebadores también se ha utilizado para analizar la comunidad de cianobacterias y algas eucariotas en lagos de la meseta tibetana Qinghai, en donde las comunidades estuvieron principalmente compuestas por *Cyanobacteria*, *Chlorophyta*, *Bacillariophyta*, *Streptophyta* y la clase *Dinophyceae* (Liu *et al.*, 2016). Las algas eucariotas fueron predominantes en los lagos hipersalinos, mientras que las cianobacterias se encontraron dominantes en lagos mesosalinos (Liu *et al.*, 2016).

En un estudio realizado en el Océano Pacífico se investigó la comunidad de microorganismos que habitan a una profundidad de 765-790 m mediante el análisis del gen 16S ARNr, los resultados mostraron la presencia de bacterias fototróficas, por lo que los investigadores utilizaron los cebadores p23SrV para analizar la diversidad de microorganismos que utilizan la luz; sus resultados mostraron la presencia de diatomeas como *Thalassiosira spp.* y de cianobacterias como *Synechococcus sp.* (Gao *et al.*, 2011).

En el río Mississippi se amplificó y secuenció mediante Illumina® el gen 23S ARNr a partir de muestras de agua en un transecto de 2900 km para identificar la comunidad del fitoplancton. Los resultados mostraron que a lo largo del transecto las diatomeas fueron las más abundantes, seguidas por las criptofitas y por las cianobacterias. Las diferencias en los ensamblajes del fitoplancton estuvieron asociadas con el tamaño del río y con las concentraciones de fosforo (Craine *et al.*, 2018).

2.3 Diversidad de cianobacterias en México

Los estudios realizados en México referentes a la diversidad de cianobacterias se basan principalmente en la identificación morfométrica y se encuentran dentro del estudio la diversidad del fitoplancton. Las cianobacterias se encuentran entre los grupos más abundantes en los ecosistemas acuáticos de agua dulce (Novelo y Tavera, 2011;

Oliva-Martínez *et al.*, 2014). También, se han estudiado las cianobacterias asociadas a los estromatolitos, por ejemplo en un estudio realizado en el lago Alchichica en Puebla demostró que la comunidad de cianobacterias planctónicas están compuestas por la especie *Nodularia* cf. *spumigena* y que las cianobacterias encontradas en los estromatolitos fueron *Aphanocapsa* sp., *Aphanothece* sp. y *Calothrix* c. *parietina* entre otras (Tavera y Komárek, 1996). De igual forma se han realizado estudios para identificar a las especies de cianobacterias formadoras de florecimientos algales, como las encontradas en la Laguna de Terminos, Campeche, dentro de las cuales se identificaron siete especies formadoras de florecimientos algales tales como *Pseudanabaena catenata*, *P. limnetica*, *Anabaenopsis circularis*, *A. elenkinii*, *Aphanizomenon* cf. *ovalisporum*, *Ap. schindleri* y *Dolichospermum circinalis*. (Muciño-Márquez *et al.*, 2015).

Dentro de los pocos estudios que han utilizado técnicas moleculares en México para la identificación de la diversidad de cianobacterias, un estudio realizado en Baja California en ambientes extremos como pozas hidrotermales, ecosistemas hipersalinos, el fondo marino y una granja de camarones, con el uso del gen 16S ARNr identificaron a las especies *Synechococcus* cf. *elongatus*, *Leptolyngbya* cf. *thermalis*, *Leptolyngbya* sp., y *Geitlerinema* sp. (López-Cortés *et al.*, 2001).

2.3.1 Diversidad de cianobacterias en la Península de Yucatán

El conocimiento del fitoplancton en los cenotes es escaso en comparación con otros sistemas acuáticos, sin embargo, se ha registrado la presencia de clorofitas, cianofitas y diatomeas como grupos dominantes (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Como en un estudio realizado en cinco cenotes y dos cuevas anquihalinas en Quintana Roo, se identificaron 79 especies, las más abundantes pertenecen a la división *Chromophyta* seguidas de las cianofitas (14%) (Sanchez *et al.*, 2002).

En el año 2011, una revisión de la literatura realizada por Novelo y Tavera recopiló la información sobre el registro de algas que se habían realizado en México, dentro de los cuales la zona central del país registra poco más de la mitad; en el estado

de Quintana Roo se reportaron 304 nuevos taxones de microalgas para ambientes de agua dulce de las cuales se incluyen a 40 Cyanoprokaryota, 69 Chlorophyta, 192 Bacillariophyta y 3 Dinophyta. El conocimiento de la diversidad de microalgas en el la PY puede ser útil para la identificación de nuevos registros, como por ejemplo en un estudio realizado en cenotes y sascaberas (extracción de agregados para construcción) en Yucatán, se describieron morfológicamente 34 especies de cianobacterias de las cuales se incluyen 14 nuevos registros para México y cuatro fueron registro de nuevas especies *Asterocapsa xcaamalensis*, *Chlorogloea halkab*, *Cyanosarcina caribeana* y *Synechococcus socialis* (Tavera, 2013).

De acuerdo a la revisión de Schmitter-Soto et al. (2002) los géneros de cianobacterias más comunes en la PY son *Aphanocapsa*, *Chroococcus* y *Microcystis*. Como el caso de un estudio realizado en la laguna Lagartos en Akumal en el municipio de Tulum, en donde se realizaron muestreos de agua superficial mensualmente durante un año y se identificaron mediante caracteres morfológicos 67 taxones: 28 Bacillariophyta, 22 Cyanoprokaryota, 7 Chlorophyta, 6 Dinoflagellata, 2 Euglenophyta y 2 Cryptophyta; con 13 nuevas especies registradas para México. En este estudio se reporta a *Microcystis panniformis* como la más abundante dentro de las cianofitas de noviembre a febrero, y de marzo a mayo dentro del mismo grupo a *Geitlerinema splendidum* y *Spirulina labyrinthiformis* (Nava-Ruiz y Valadez, 2012). Sin embargo, no existe evidencia de estudios en la Península de Yucatán en donde se utilicen herramientas moleculares para el estudio de la diversidad de microalgas y en especial de las cianobacterias.

3 Métodos para el estudio de los microorganismos

El estudio de la diversidad de microorganismos estuvo limitado a aquellos que se podían observar bajo el microscopio y que se lograran cultivar en el laboratorio, condicionado a la identificación morfológica y a los medios de cultivo disponibles. Es sabido que menos del 1% de todos los microorganismos contenidos en una muestra ambiental pueden ser encontrados con los métodos de cultivo disponibles

(Handelsman, 2004). Una conclusión de la ecología de los microorganismos, enfatiza la importancia de señales específicas de los organismos vecinos en el ambiente, lo que permite el desarrollo y la supervivencia de los individuos. Esto enfatiza la importancia de toda la comunidad e implica que los microorganismos no pueden crecer en un ambiente no familiar, incluso con los nutrientes apropiados (Rojas-Herrera *et al.*, 2011).

Actualmente las técnicas moleculares basadas en el análisis de los ácidos nucleicos nos permiten estudiar la diversidad de las comunidades sin la necesidad de cultivo y sin la identificación morfológica de las especies. Estas técnicas nos han posibilitado describir, monitorear e incluso controlar las comunidades microbianas.

3.1 Metagenómica para el estudio de la diversidad

Peace y colaboradores (1986) mediante el análisis de secuencias del gen 5S y 16S del Ácido Ribonucleico ribosomal (ARNr) obtenidas directamente de diferentes comunidades ambientales, lograron describir la diversidad de los microorganismos sin necesidad de cultivarlos. Este enfoque molecular el inicio de las técnicas independientes de cultivo para examinar la diversidad bacteriana (Logue *et al.*, 2008).

El término “metagenómica” fue acuñado por Handelsman (1998) refiriéndose al análisis de las características genómicas de una comunidad bacteriana, en la actualidad el término metagenómica puede definirse como el análisis usualmente por secuenciación y/o clonación del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) extraído directamente del ambiente, sin pasar a través del cultivo de los organismos contenidos en la muestra (Logue *et al.*, 2008).

El uso de ADN ambiental para detectar organismos de una comunidad puede referirse a dos métodos:

- 1) Secuenciación dirigida (término en inglés, Target metagenomics) donde una región génica informativa específica se secuencia desde la mezcla de genomas presentes en una muestra. Esta técnica es utilizada para investigar la diversidad filogenética y la abundancia relativa de un gen en particular de una muestra.

2) Secuenciación de escopetazo (término en inglés, Shotgun metagenomics) donde todos los fragmentos de ADN dentro de una muestra se secuencian sin importar de qué gen se originen. La secuenciación de escopeta puede ser útil para estudios en los que existen múltiples genes de interés, como los estudios funcionales.

La identificación de múltiples especies se logra apuntando a un marcador genético compuesto por dos secuencias de ADN conservadas evolutivamente intercaladas por una secuencia altamente variable (Shaw *et al.*, 2016). Esta combinación de regiones conservadas que flanquean una región variable hace posible la identificación de especies en una sola secuenciación, y por lo tanto nos permite caracterizar la diversidad de una comunidad en un ecosistema, debido a que se puede procesar un gran número de muestras en paralelo en una sola secuenciación (Shaw *et al.*, 2016).

3.2 Técnicas para el estudio de los metagenomas

El procedimiento general para analizar el material genómico de una muestra ambiental consiste en:

- 1) La selección de un nicho ambiental
- 2) La extracción del material genético directamente de la muestra ambiental
- 3) La manipulación del material genético
- 4) La construcción de una biblioteca
- 5) El análisis del material genético de la biblioteca construida

Existen dos métodos principales para construir una biblioteca de ADN ambiental. La metodología basada en la clonación mediante el uso de vectores como los fósquidos, cósmidos y los cromosomas bacterianos artificiales (BAC, por sus siglas en inglés) clonación de insertos de gran tamaño (10-100 Kpb), o el uso de vectores plasmídicos para insertos pequeños (<5 Kpb) y la secuenciación directa, basada en las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), las cuales

fragmentan y capturan el ADN a través de diferentes estrategias de ligación (Hernández-De Lira *et al.*, 2014).

Las dos plataformas de secuenciación de nueva generación más comúnmente aplicadas en los estudios de metagenómica son la tecnología de pirosecuenciación 454/Roche y el sistema Illumina/Solexa. El sistema de pirosecuenciación 454/Roche, se basa en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de emulsión para amplificar al azar fragmentos de ADN, que posteriormente se unen a perlas microscópicas, estas perlas son depositadas dentro de pozos en una placa picotituladora y después paralelamente e individualmente pirosecuenciadas. El proceso de pirosecuenciación comprende la adición secuencial de los cuatro nucleótidos que se incorporaran, mediante la polimerasa de ADN, de forma complementaria a la cadena molde. Esta reacción de polimerización libera pirofosfato, el cual mediante reacciones enzimáticas produce luz, la cantidad de luz producida es proporcional al número de nucleótidos incorporados. La luz producida de más de 1.2 millones de reacciones en paralelo es detectada y convertida en la secuencia real de la cadena de ADN molde. Esta tecnología actualmente puede generar aproximadamente un millón de secuencias de entre 500-800 pb de longitud por corrida (Mardis, 2008; Thomas *et al.*, 2012; Hernández-De Lira *et al.*, 2014).

La tecnología de Illumina/Solexa se basa en la secuenciación por síntesis, en donde se inmovilizan fragmentos de ADN en una superficie los cuales son amplificados mediante PCR de superficie sólida, donde los grupos clonales se generan a través de un puente de amplificaciones y como resultado se obtienen agrupaciones de fragmentos de ADN idénticos, cada una de estas agrupaciones contiene aproximadamente un millón de copias del fragmento original. Luego se secuencia por síntesis con terminadores reversibles, en este proceso de secuenciación los nucleótidos se agregan con una etiqueta fluorescente específica para cada base nitrogenada y con el grupo 3-OH bloqueado químicamente, de modo que no se pueden agregar más bases y cada incorporación es un evento único; con cada paso de incorporación de una base el equipo obtiene una imagen, para identificar el nucleótido incorporado, y el grupo

de bloqueo es eliminado químicamente para preparar cada hebra para la siguiente incorporación de bases mediante la ADN polimerasa. Esta secuencia de pasos continua por un numero de ciclos especificado por el usuario. Actualmente esta plataforma puede generar 2-3 billones de secuencias de 150 pb de longitud (Mardis, 2008; Thomas *et al.*, 2012; Hernández-De Lira *et al.*, 2014).

La aplicación de estas herramientas para el análisis de muestras ambientales permite la comprensión de la historia evolutiva y la biodiversidad ecológica y funcional, evitando la necesidad de cultivos en el laboratorio y el aislamiento de muestras individuales. Los códigos de barras de ADN emplean regiones genómicas específicas de especies estandarizadas para generar bibliotecas de ADN con el propósito de identificar especies desconocidas. Por ejemplo, la región del gen de la subunidad I de la enzima citocromo c oxidasa (COI) es capaz de discernir entre especies del reino Animalia (Shokralla *et al.*, 2012). De manera similar, el ARN ribosomal 16S es empleado para identificar especies bacterianas o la región espaciadora transcrita interna (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal nuclear se utiliza en estudios dirigidos a los hongos. Otros genes marcadores se han empleado para el análisis de la biodiversidad de estos y otros grupos taxonómicos (Shokralla *et al.*, 2012).

3.3 Gen 16S ADN como marcador molecular

Las secuencias del gen 16S del ARNr se han utilizado para realizar la reconstrucción filogenética de los tres dominios principales: Eukarya, Bacteria y Archaea (Woese y Fox, 1977). Las secuencias del gen 16S ARNr se utilizan para estudiar la diversidad y determinar la filogenia ya que éstas reflejan la relación evolutiva. La descripción de microorganismos presentes en muestras ambientales ha tenido grandes avances gracias al uso de las secuencias que codifican para el ARNr, ya que esta molécula está presente en todos los organismos y realiza la misma función en todos ellos, por lo tanto, ha permitido definir las relaciones filogenéticas entre los microorganismos (Pace, 1997)

La secuencia completa del gen 16S consiste en nueve regiones hipervariables separadas por nueve regiones altamente conservadas. Se ha demostrado que la región V4 es más sensible como marcador para el análisis bacteriano, incluso para estudios de ambientes extremos con linajes nuevos (Yang *et al.*, 2016). También se ha comprobado que el uso de pequeñas secuencias de alrededor de 100 nucleótidos que flanquean la región V3-V6 es suficiente para poder resolver similitudes y diferencias biológicamente significativas entre comunidades microbianas (Liu *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso preciso de estas secuencias requiere de la elección adecuada de cebadores para su amplificación, el uso de los cebadores F515/R806 dirigidos a la región V4 del gen 16S ARNr mediante la tecnología de Illumina es suficiente para obtener conclusiones sobre la composición de la comunidad de bacterias y arqueas, como la identificación taxonómica a nivel de género y patrones de distribución de las especies asociados al tipo de ambiente y/u hospedero (Werner *et al.*, 2012).

3.4 Herramientas computacionales para el análisis metagenómico

Las nuevas técnicas de secuenciación han permitido el análisis de numerosas muestras ambientales, obteniendo un número sustancial de datos de comunidades microbianas. Hasta el 2017 el Archivo Europeo de Nucleótidos albergaba más de 600,000 muestras ambientales, con un constante crecimiento de estos datos, se necesitan herramientas confiables y precisas para el procesamiento de esta información (Almeida *et al.*, 2018).

Para el análisis de la gran cantidad de datos que se generan, se hace uso de técnicas computacionales capaces de analizar la información asociada con biomoléculas a gran escala, llamada bioinformática (Luscombe *et al.*, 2001). Ha sido indispensable la ayuda de tecnologías y se han desarrollado diferentes herramientas para el procesamiento de las secuencias obtenidas. En específico, para inferir la composición taxonómica de las comunidades microbianas mediante el análisis del gen 16S, dos herramientas han sido las más utilizadas Mothur (Schloss *et al.*, 2009) y QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso *et al.*, 2010).

El análisis de los datos obtenidos por el enfoque de genes marcadores como el gen 16S, por lo regular comienza con la construcción de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU's, por sus siglas en inglés), que son agrupamientos de las secuencias basados en su similitud, el umbral común de similitud para la agrupación de estas secuencias es del 97% (o 3% de disimilitud). De esta agrupación en OTU's una sola secuencia es elegida como secuencia representativa (Nguyen *et al.*, 2016). Diferentes métodos se han propuesto, entre los más utilizados se encuentran aquellos basados en referencias, en donde las lecturas suficientemente similares a aquellas secuencias en las bases de datos son elegidas en la OTU correspondiente y los métodos *de novo*, en los cuales las lecturas son agrupadas en OTU's en función de las similitudes del alineamiento de las secuencias (Callahan *et al.*, 2017)

Sin embargo, se ha comprobado que la secuencia que se elige como la representativa del agrupamiento dentro de una OTU, puede tener aun disimilitudes con aquellas a las cuales fue agrupada y puede tener implicaciones de cuidado en los pasos subsecuentes del análisis. Como las OTU's son comúnmente utilizadas para estimar la diversidad una muestra ambiental, dos análisis de los mismos datos pueden llegar a conclusiones distintas, dependiendo de que secuencia fue seleccionada como representativa, así como la región que fue amplificada (Nguyen *et al.*, 2016).

Para abordar este escenario se desarrollaron herramientas como DADA2 (Callahan *et al.*, 2016), UNOISE2 (Edgar, 2016) y Deblur (Amir *et al.*, 2017), las cuales pretenden obtener una resolución por nucleótido para inferir cada secuencia como verdadera. Estos métodos analizan las secuencias para obtener variantes verdaderas de secuencias (ASV's, por sus siglas en inglés) en vez de OTU's, las ASV's han demostrado mayor sensibilidad y especificidad como las OTU's para encontrar patrones ecológicos. Las ASV's se infieren mediante el método el proceso *de novo*, representan la variación biológica que se presenta en una muestra, pueden reproducirse en análisis posteriores y compararse entre conjuntos de datos con las mismas características de secuenciación, incluyendo la región objetivo y los cebadores utilizados; estas son ventajas que con la construcción de OTU's no pueden lograrse (Callahan *et al.*, 2017).

Las herramientas computacionales utilizadas para el análisis de las secuencias obtenidas por los métodos de secuenciación de siguiente generación son diversos, Almeida y colaboradores (2018) realizaron una comparación sobre los métodos utilizados, cotejando MAPseq, Mothur, QIIME y QIIME 2 para un análisis de un conjunto de datos simulados, simultáneamente compararon la asignación taxonómica de estas herramientas utilizando las bases de datos como Greengenes, National Center of Biotechnology Information (NCBI), Ribosomal Data Project (RDP) y SILVA; concluyeron que todas las herramientas probadas tienen un buen desempeño, sin embargo QIIME 2 posee mejoras significativas que las demás, en la predicción de la composición de las muestras, con una mayor proporción en la clasificación de las secuencias con la utilización de la base de datos SILVA; adicionalmente QIIME 2 requiere aproximadamente treinta veces menos memoria y al menos la mitad del tiempo para procesar las mismas muestras.

Las nuevas técnicas de secuenciación junto con las herramientas informáticas han podido expandir nuestro conocimiento en la diversidad de microorganismos en los ambientes acuáticos, diferentes estudios se han realizado en distintos ambientes (Hahn, 2006) y en la península de Yucatán hace falta emplear estas herramientas para el expandir el conocimiento de la diversidad (Rojas-Herrera *et al.*, 2011).

4 Justificación

Los microorganismos que habitan en los sistemas acuáticos presentan comunidades específicas en los diferentes tipos de ecosistemas, son parte principal en los procesos biogeoquímicos y base de las cadenas tróficas, además, son fundamentales para el equilibrio de los ecosistemas. La diversidad de los microorganismos que habitan el acuífero de Yucatán puede verse afectada debido a la vulnerabilidad del acuífero, el cual al ser un sistema altamente permeable permite la infiltración de compuestos como resultado de las actividades antropogénicas. Las comunidades de microorganismos que habitan ambientes acuáticos, pueden verse influidas en su estructura y composición como resultado de los cambios que se generan

en el ecosistema, el desarrollo y/o la supervivencia de algunas especies esta mediada por las condiciones del hábitat. Debido a lo anterior, el conocimiento de la diversidad y su asociación con las características del ambiente es fundamental para la conservación y el uso sostenible de los ambientes acuáticos. El uso de herramientas moleculares permite realizar un estudio más amplio de las comunidades de microorganismos, dejando a un lado las limitaciones que los métodos morfométricos presentan.

4.1 Hipótesis

Si la estructura de la comunidad de bacterias y cianobacterias depende de los parámetros del cuerpo de agua, entonces, las comunidades serán diferentes en cenotes y lagunas presentes en el acuífero.

4.2 Objetivos

4.2.1 Objetivo General

Determinar la estructura de la comunidad de microorganismos en formaciones carsticas del norte de la península de Yucatán

4.3 Objetivos Particulares

- Caracterizar las formaciones cársticas mediante parámetros fisicoquímicos e índice trófico
- Evaluar la diversidad y composición de la comunidad de bacterias mediante la secuenciación del gen 16s ARNr
- Evaluar la diversidad y composición de la comunidad de cianobacterias mediante la secuenciación del gen 23S ARNr
- Determinar la correlación de las características fisicoquímicas y la concentración de nutrientes con la estructura de la comunidad de cianobacterias

5 Metodología

5.1 Área de Estudio

Los estados de Yucatán y Quintana Roo se localizan al sureste de la República Mexicana, en la Península de Yucatán. Yucatán se encuentra al norte de la península, colinda con el Golfo de México al norte, al este con el estado de Quintana Roo, al oeste con el Golfo de México y Campeche y al sur con los estados de Campeche y Quintana Roo; tiene una superficie de 39,340 km². Políticamente está dividido en 106 municipios (INEGI, 2016).

El estado de Quintana Roo se ubica al oriente de la península de Yucatán, colinda al norte con Yucatán y el Golfo de México, al este con el Mar Caribe, al sur con Belice y al oeste con Campeche y Yucatán; tiene una superficie de 44,705 km² y se divide en 11 municipios (INEGI, 2016).

Tabla 1. Sitios de estudio. Se muestra el nombre común del cuerpo de agua y su ubicación en la Península de Yucatán.

Sitio	Nombre	Tipo	Ubicación
CH	Chen-ha	Cenote (abierto)	Yucatán
XC	Xcolac	Cenote (abierto)	Yucatán
MZ	Mumundzonot	Cenote (cerrado)	Yucatán
KU	Kanaha	Cenote (aguada)	Yucatán
KK	Kikil	Cenote (abierto)	Yucatán
SC	Sucila	Cenote (cerrado)	Yucatán
PL	Punta Laguna	Lago cárstico	Quintana Roo
YB03	Acuario	Cenote (abierto)	Quintana Roo
YB04	Aguada	Cenote (abierto)	Quintana Roo
YB08	Leona Vicario	Cenote (abierto)	Quintana Roo
YB13	Nenúfar	Cenote (abierto)	Quintana Roo

Los sitios de estudio se distribuyen en la región norte de la Península de Yucatán, ubicados en los estados de Yucatán y Quintana Roo (Tabla 1). Se colectaron muestras de 7 sitios (CH, XC, MZ, KU, SC y PL) en el mes de octubre de 2017 y febrero de 2018, adicionalmente se analizaron muestras colectadas en abril de 2014 por la Maestra en Ciencias Gabriela Rosiles (YP3, YP4, YP2 y YP5).

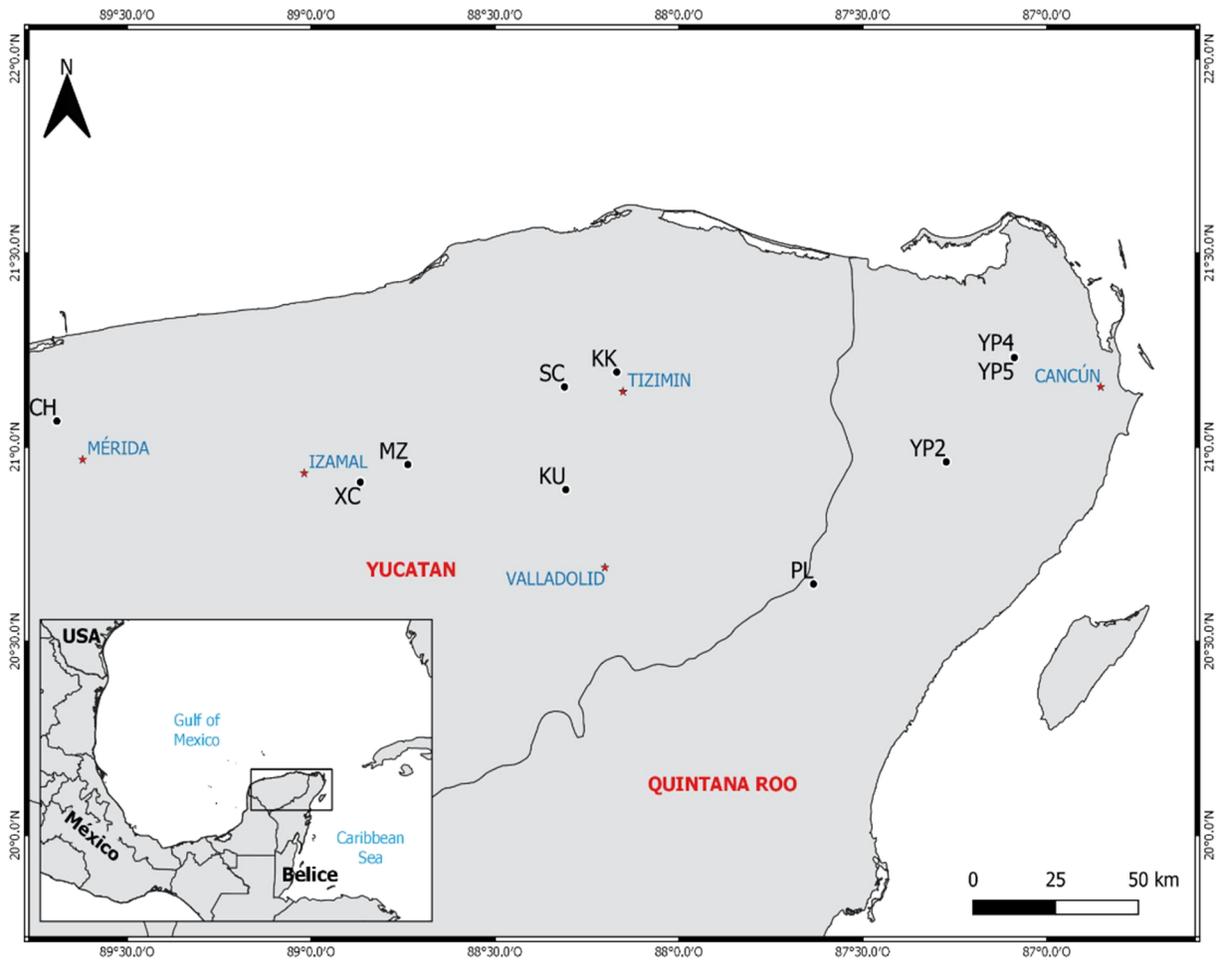


Figura 1. Ubicación del área de estudio y los sitios de muestreo. (CH) Chen ha, (XC) Xcolac, (MZ) Mumundzonot, (KU) Kanaha, (SC) Sucila, (KK) Kikil, (PL) Punta Laguna, (YP2) Leona Vicario, (YP4) Aguada y (YP5) Acuario.

5.1.1 *Chen-ha*

También conocido como cenote Dzityá, es un cenote de tipo abierto, se encuentra ubicado a una distancia de 14.9 km de la ciudad de Mérida cercano a una zona industrial; localizado en la comisaría de Dzityá en las coordenadas de 21°04'1.6" Norte y 89°41'30.1" Oeste. Es propiedad de ejidatarios y tiene acceso libre a cualquier

persona que quiera visitarlo, se encuentra rodeado de vegetación, con poca basura alrededor y sin basura dentro del cenote.

5.1.2 Xcolac (Xcholac)

Este cenote se localiza en las coordenadas 20° 54' 35.6'' Norte y 88° 51' 59.5'' Oeste, se encuentra en el municipio de Izamal. Es un cenote dentro de una propiedad privada, no se encontró basura alrededor ni dentro del cenote, el vigilante del lugar comentó que antes el cenote tenía uso turístico, pero el terreno fue vendido y las actividades se suspendieron, esporádicamente se permite el uso para eventos privados. Se logró observar algunos peces dentro del cenote, es un cenote de tipo abierto.

5.1.3 Mumundzonot

Ubicado el municipio de Tunkás, su posición es 20°57'17.9" Norte y 88°44'15" Oeste. El cenote se encuentra en medio de algunos cultivos, no se encontró basura, es un cenote de tipo cerrado y tiene uso recreacional de baja intensidad.

5.1.4 Kanaha

Este cenote de tipo aguada se encuentra a un costado de una carretera pavimentada en el poblado de Kunché, municipio de Espita. Está cubierto de vegetación, no parece tener actividad de ningún tipo, tampoco se encontró basura dentro de él; se localiza en a 20° 53' 26'' Norte y 88° 18' 28.8'' Oeste.

5.1.5 Kikil

Este cenote es de tipo abierto y con intensidad turística media, no se encuentra basura dentro ni alrededor, se localiza en las coordenadas 21° 11' 36.1'' de Norte y 88° 10' 10'' Oeste a 450 m de la comisaría de Kikil.

5.1.6 Sucila

Este cenote de tipo cerrado, se encuentra cercado y el acceso está resguardado por el gobierno del municipio de Sucilá, a un lado del cenote existe un parque deportivo, este cenote se localiza en las coordenadas 21° 9' 18.7'' de Norte y 88° 18' 41.6'' Oeste.

5.1.7 Punta Laguna

El lago cárstico de Punta Laguna se sitúa dentro del Área Natural Protegida denominada Área de Protección de Flora y Fauna Oloch Ma'Ax Yetel Kooh, está ubicada al noreste de la península de Yucatán. Geográficamente se encuentra en el estado de Quintana Roo, administrativamente pertenece al ejido de Valladolid, Yucatán (CONAMP, 2009).

5.1.8 Muestras colectadas en 2014

En la tabla 2 se muestran los parámetros fisicoquímicos obtenidos de agua superficial de los 4 sitios colectados en 2014. El valor más alto de pH se encontró en el sitio YP5, mientras que el más bajo fue en el sitio YP3, la temperatura más alta de registro en el sitio YP2 (29.7 °C), mientras que la más baja fue en el sitio YP3 (25 °C). La conductividad eléctrica fue mayor en el sitio YP3 (712 μScm^{-1}) y menor en el sitio YP5 (261 μScm^{-1}).

Se registró el valor más alto de sólidos disueltos totales en el sitio YP3 (0.46 mgL^{-1}) y el más bajo en el sitio YP2 (0.16 mgL^{-1}); la concentración de oxígeno disuelto más alta se registró en el sitio YP2 (19.8 mgL^{-1}) y las más baja en el sitio YP3 (0.77 mgL^{-1}).

Tabla 2. Valores de los parámetros fisicoquímicos obtenidos de los 4 sitios de estudio en los muestreos realizados en 2014.

Sitio	pH	Temperatura (°C)	EC (μScm^{-1})	TDS (mgL^{-1})	DO (mgL^{-1})
YP3	5.8	25	712	0.46	0.77
YP4	7.7	27.5	356	0.22	13.8
YP2	7.9	29.7	677	0.16	19.8
YP5	8.1	26.4	261	0.17	9.6

5.2 Colecta de muestras y medición de parámetros fisicoquímicos

En cada uno de los sitios se colectaron muestras de agua por separado para la cuantificación de clorofila, la cuantificación de nutrientes y la caracterización de la diversidad. En el caso de la clorofila se colectaron muestras compuestas de 5 a 6 litros de agua en contenedores cubiertos para evitar el paso de la luz. Para el análisis de nutrientes, las muestras se filtraron en una membrana de nitrocelulosa Millipore® de 0.45 μm de tamaño de poro y se recolectaron en botellas de polietileno de alta densidad de 500 mL (para el análisis de nitrógeno y fosforo) y 125 mL (para la cuantificación de iones). Se pasaron 100 litros de agua por una red de fitoplancton y se concentraron en un vaso colector de 1 litro, todos los contenedores se mantuvieron en refrigeración (4 °C) para su análisis posterior en el laboratorio.

Los parámetros fisicoquímicos se midieron *in situ* con la sonda multiparamétrica YSI 650 QS conectado a un almacenador electrónico YSI 650 obteniendo los valores de temperatura (°C), conductividad (μScm^{-1}), sólidos disueltos totales (TDS(mgL^{-1})); el pH se determinó con la sonda multiparamétrica HACH HQd.

5.3 Cuantificación de nutrientes

La cuantificación de nutrientes se realizó mediante técnicas colorimétricas y cromatográficas. En el caso de las primeras, se realizaron en el espectrofotómetro UV-Visible Biospectrometer Basic, Eppendorf ®. El análisis colorimétrico de nitritos (NO_2^-) se realizó mediante la reacción de sulfanilamida para formar una sal de diazonio conforme al método 353.2 de la EPA (US-EPA, 1993); para el análisis de amonio (NH_4^+) se realizó mediante la reacción con fenol e hipoclorito en condiciones alcalinas con nitroprusiato como catalizador para formar azul indofenol (Solorzano, 1969). Para la cuantificación de fósforo en el agua, que se encuentra en forma de ortofosfatos (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), se llevó a cabo la reacción con una solución ácida que contiene molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio para formar el complejo antimoniofosfomolibdato que se reduce con ácido ascórbico para formar un compuesto de coloración azul, de acuerdo al método 365.3 (US-EPA, 1978).

En el caso de las técnicas cromatográficas, se analizaron las muestras de agua con el cromatógrafo de iones 930 Compact Ion Chromatograph para obtener la concentración de cationes (sodio, magnesio, calcio, potasio) y aniones (nitratos, sulfatos, cloruros). La técnica se realizó conforme al método 9056a (US-EPA 1993).

5.4 Cuantificación de Clorofila

Para la cuantificación de clorofila se filtró el agua a través de un filtro de fibra de vidrio GF/F 0.7 (hasta la saturación del filtro), la extracción se realizó con acetona al 90% por un periodo de 20-24 horas en oscuridad a 4 °C. El extracto se leyó en un espectrofotómetro UV-Visible Biospectrometer Basic, Eppendorf ® y la concentración de las clorofilas a, b y c se determinó mediante las fórmulas de Jeffrey & Humphrey (1975).

5.5 Extracción y cuantificación de ADN

El ADN genómico fue extraído utilizando el DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN® con algunas modificaciones en el procedimiento; a cada filtro obtenido de la filtración del fitoplancton de cada sitio se agregó 400 µL de solución buffer AP1 para resuspender el contenido y colocarlo en un tubo de microcentrifugación de 1.5 mL, se agregaron 4 µL de RNasa A y se trituró con un pistilo, después se mezcló en vórtex y se incubó durante 10 min a 65 °C., posteriormente se siguió el protocolo del fabricante; las centrifugaciones se realizaron a 13,000 rpm en vez de a 14,000 rpm y por último se eluyó en un volumen final de 50 µL de buffer AE de elución, primero 30 µL y después, al repetir el último paso solo con 20 µL. Para verificar la integridad de la extracción, se realizó una electroforesis con 4 µL de ADN mezclado con 3 µL de buffer de carga (azul de bromofenol, glicerol y xileno-cianol) en un gel de agarosa/TAE al 1 % con 2 µL bromuro de etidio durante 30 minutos a 80 V dentro de una cámara de electroforesis ME 10-7-10 conectada a una fuente eléctrica Mini Pro 300V de Major Science® Se visualizó el gel bajo luz UV. El ADN extraído se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 y se almacenó a -20 °C.

5.6 Secuenciación del gen 16S ARNr

A partir del ADN extraído de cada uno de los sitios (CH, XC, MZ, KU, KK, SC, PL YP2, YP3, YP4, YB5) se tomaron 25 µL de DNA y se envió a secuenciar bajo el sistema MiSeq® de illumina® a la Universidad de Arizona, USA en el laboratorio del Dr. Daniel Laubitz. La región V4 del gen 16S ARNr fue amplificada utilizando los cebadores 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) y 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), se verifico y cuantifico la amplificación, se removieron los productos no deseados de la amplificación y se purifico el ADN, finalmente se tomaron 7 pM de cada muestra para ser secuenciados conforme al procedimiento anteriormente descrito (Harrison *et al.*, 2018).

5.7 Amplificación del gen 23S ARNr

El ADN de los sitios CH, XC, MZ, KU, KK, SC y PL fue amplificado (PCR) con los cebadores p23SrV_f1 (5'-GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA-3') y p23SrV_r1 (5'-TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG-3') para obtener amplicones de ~410 pb (Sherwood and Presting, 2007) en un termociclador Applied Biosystems® Modelo Veriti® 96-Well bajo las condiciones de reacción: calentamiento inicial de un minuto a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 55 °C y 60 segundos a 72 °C, con un ciclo final de 10 minutos a 72 °C.

La mezcla de reacción se preparó con 67.2 % de agua libre de nucleasas, 20 % de buffer 10x (1.5 mM) (Promega®), 4 % de dNTP's (0.2 mM) (Promega®), 0.8 % de Taq Polimerasa (1.25 u/μL) (Promega®), 4 % de los cebadores p23SrV_f1 (2 %) y p23SrV_r1 (2 %) y 4 % de ADN genómico para un volumen final de 25 μL.

Se tomó una alícuota de 5 μL de cada producto de la amplificación para realizar una electroforesis en un gel de agarosa/TAE al 1 % con 2 μL bromuro de etidio durante 30 minutos a 80 V dentro de una cámara de electroforesis (ME 10-7-10 conectada a una fuente eléctrica Mini Pro 300V de Major Science®), se agregó 1 μL del marcador de peso molecular (BenchTop de 10,000 pb Promega®), el gel se visualizó bajo luz UV.

5.8 Clonación de los fragmentos del gen 23S ARNr

Los amplicones se ligaron al vector pGEM-T Easy® Vector (Promega®), primero se realizó una dilución 1:10 del producto de PCR, la cual fue utilizada para preparar la reacción de ligación de acuerdo al protocolo del proveedor, utilizando una relación molar ADN-Vector de tres a uno.

El plásmido recombinante se utilizó para la transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5α mediante choque térmico. Se incubaron las células competentes en hielo durante 10 minutos, se añadieron 10 μL del templado de digestión y permanecieron en hielo durante 20 minutos después, se incubaron un minuto a 42 °C y

finalmente se colocaron en hielo 5 minutos. Se agregaron 200 μ L de medio LB y se incubaron en agitación durante una hora a 37 °C.

Las células transformadas fueron sembradas en medio LB con 30 μ L de ampicilina (100 μ g/ μ L) y 30 μ L de X-Gal (20 μ g/ μ L) e incubadas durante 12 horas a 37 °C. Treinta colonias, por cada sitio, de bacterias recombinantes (blancas) fueron seleccionadas para su cultivo en medio líquido LB (Sigma® L7658) con ampicilina 1:100 (Applichem A0839 1 %) durante 12 hrs a 37 °C en agitación constante.

El ADN plasmídico se extrajo mediante lisis alcalina basado en el método de Birnboim y Doly (1979). Los plásmidos fueron digeridos con la enzima *EcoRI*, para comprobar la presencia de los insertos se tomó una alícuota de 10 μ L de cada reacción de digestión amplificación, se mezcló con 3 μ L de buffer de carga y se realizó una electroforesis en gel de agarosa/TAE al 1 % con 2 μ L bromuro de etidio durante 30 minutos a 80 V, también se agregó 1 μ L del marcador de peso molecular (BenchTop de 10,000 pb Promega®), el gel se visualizó bajo luz UV.

Los 30 plásmidos recombinantes que mostraron la presencia del inserto se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. Corea, para lo cual se tomaron 0.5 μ L del plásmido, se diluyó en 4.5 μ L de agua y se agregó 5 μ L del cebador M13 (20 pM).

5.9 *Análisis bioinformático*

5.9.1 *Análisis bioinformático del marcador 16S*

Las secuencias del gen 16S se importaron a QIIME2 mediante el método qiime tools import “EMP protocol” multiplexed paired-end fastq. El control de la calidad de las secuencias, la eliminación de ruido (denoising), la des-replicación (dereplicate), la remoción de quimeras y la construcción de ASV's se realizó mediante el comando denoise-paired con el plugin DADA2 (Boylen *et al.*, 2018). La construcción de las ASV's que se realizó con el paquete informático Divisive Amplicon Denoising Algorithm (DADA2), modela y corrige los errores de la secuenciación de amplicones por Illumina y

es capaz de inferir las variantes de secuencia de amplicones (ASV's), resolviendo diferencias por nucleótido (Callahan *et al.*, 2016).

La asignación taxonómica se realizó con el plugin q2-feature-classifier (Bokulich *et al.*, 2018) y el clasificador Naïve Bayes entrenado en la base de datos de referencia Silva 132 99% OTU's en la región 515F/806R.

5.9.2 Análisis bioinformático del marcador 23S

De los archivos que se recibieron como resultado de la secuenciación del gen 23S, los archivos con extensión ab1 se convirtieron a archivos con terminación fastq mediante el módulo SeqIO de Biopython (Cock *et al.*, 2009). Para conocer la dirección en la cual se encontraban las secuencias se utilizó el comando search-oligodb de usearch (Edgar, 2010).

Para recortar de las secuencias el vector de clonación y los cebadores se utilizó el comando fastx_truncate, para realizar la complementación reversa su uso el comando fastx_revcomp de usearch. Después para cambiar la puntuación máxima de la calidad de las secuencias de 62 a 41 se utilizó el comando fastq_convert de vsearch.

El análisis bioinformático se realizó conforme a la documentación del programa Qiime2 (<http://qiime2.org/>) (Boylen *et al.*, 2018). Se importaron las secuencias mediante el método de qiime tools import "fastq manifest" formats. La construcción de ASV's se realizó con el comando dereplicate-sequences mediante el plugin vsearch. Este comando resuelve ASV's mediante el análisis de cada secuencia, para cada secuencia de entrada se busca una secuencia idéntica, si se encuentra la secuencia similar se agrupan si no, se deja esa secuencia y se pasa a encontrar alguna que sea idéntica (Rognes *et al.*, 2016).

La asignación taxonómica se realizó con el plugin q2-feature-classifier (Bokulich *et al.*, 2018) y el clasificador Naïve Bayes entrenado en la base de datos de referencia Silva LSU 132 entrenado en la región que amplifican los cebadores p23SrV_f1 y p23SrV_r1.

5.10 Análisis de la diversidad

Después de la construcción de las ASV's y de la asignación taxonómica en Qiime2, con el comando *qiime tolos export* se obtuvo la tabla de ASV's en formato biom (McDonald *et al.*, 2012), con el comando biom covert se convirtió en un archivo con delimitado por tabulaciones (valores separados por tabulaciones, tsv por sus siglas en ingles). La tabla con la asignación taxonómica se exporto de qiime con el misma con la misma herramienta, obteniendo la clasificación taxonómica en un archivo separado por tabulaciones.

Las secuencias que no pudieron ser clasificadas mediante el clasificador en QIIME para el marcador del gen 23S ARNr, se clasificaron mediante la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST por sus siglas en ingles) en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). De los resultados de alineamiento se obtuvo el primer resultado del alineamiento para asignar la taxonomía a la secuencia; solo se conservaron las secuencias que alineadas a una especie del fitoplancton.

Estos archivos se utilizaron para crear un objeto del paquete phyloseq (versión 1.26) (McMurdie *et al.*, 2013) dentro de R (versión 3.5.1). El análisis de la diversidad se determinó en R mediante el paquete phyloseq. La riqueza de especies es expresada como el número de ASV's observadas, adicionalmente la diversidad alfa se evaluó utilizando el índice de Simpson, el índice de Shannon y el índice de Chao1.

El Índice de Simpson (D) mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar de una muestra pertenezcan a la misma especie.

$$D = \sum \left(\frac{n_i}{N} \right)^2$$

Donde n_i se refiere al número de individuos de la especie i y N corresponde al número total de individuos de todas las especies. El valor de D oscila entre cero y uno, siendo el ultimo el que representa la ausencia de diversidad o la representación de

solamente una especie. Si se resta 1 al valor de D, se obtiene el índice de la diversidad de Simpson (Smith y Smith, 2007).

$$\text{Índice de la diversidad de Simpson} = 1 - D$$

El cual representa la posibilidad de que dos individuos seleccionados al azar de una muestra pertenezcan a diferentes especies, su valor que va de 0 a 1 se incrementa con la diversidad.

El índice de diversidad de Shannon o entropía de Shannon se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$H = -1 \sum_{i=1}^s p_i * \ln(p_i)$$

El valor de este índice aumenta con respecto a un aumento en la riqueza de especies y/o aumento en la equitatividad de la representación de la abundancia de especies. Esto asegura que ni las especies raras ni abundantes sean favorecidas en los cálculos, por lo que es una medida justa (Smith y Smith, 2007).

El índice de Chao es un estimador de la riqueza no paramétrico, se calcula con la siguiente fórmula:

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{n_1^2}{2n_2}$$

Donde S_{obs} es el número de las especies observadas, n_1 es el número de especies con un solo individuo, y n_2 es el número de especies con dos individuos. Este índice estima el número real de especies a partir del número observado en función de la probabilidad de que una especie en particular se observe repetidamente si se vuelve a muestrear (Hughes *et al.*, 2001).

Para realizar una comparación general del análisis del grado de similitud de las muestras se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard y se representó en un dendograma.

El índice de Jaccard (1980) tienen rangos entre 0 y 1 y compara la semejanza de las muestras teniendo en cuenta la presencia y ausencia de las especies, se calcula con la siguiente ecuación:

$$J = \frac{c}{(a + b + c)}$$

Donde, c: corresponde al número de especies en ambas muestras, a: al número de especies únicas en la muestra 1 y b: al número de especies únicas en la muestra 2.

6 RESULTADOS

6.1 Características físico-químicas de los cuerpos de agua

En la tabla 3 se muestran los valores de los parámetros físicoquímicos obtenidos en los diferentes cuerpos de agua bajo estudio durante los meses de octubre de 2017 y febrero de 2018.

Tabla 3. Valores de los parámetros físicoquímicos obtenidos en los 7 sitios de estudio en los muestreos de octubre de 2017 y febrero de 2018.

Sitio	Muestreo	pH	Temperatura (°C)	EC (μScm^{-1})	TDS (mgL^{-1})
CH	oct-17	7.42	27.8	1110	560
	feb-18	7.06	22.7	1241	646
XC	oct-17	7.61	29.3	1090	550
	feb-18	7.18	27.6	1138	534
MZ	oct-17	7.03	25.8	1230	620
	feb-18	7.14	25.4	1010	493
KU	oct-17	7.54	25.5	460	230
	feb-18	6.93	21.5	414	214
KK	oct-17	7.39	28.2	1740	850
	feb-18	7.16	25.2	1603	798
SC	oct-17	7.41	25.8	1260	630
	feb-18	7.81	23.7	1222	620
PL	oct-17	8.74	30.5	1135	568
	feb-18	8.26	27.2	1233	566

En promedio, la temperatura en octubre (27.6 °C) fue mayor que en febrero (24.8 °C). La temperatura más alta se registró en el sitio PL (30.5 °C) y la más baja en el sitio KU (21.5 °C). El sitio con la mayor diferencia registrada en el valor de la temperatura comparando el mes de octubre con el mes de febrero fue el sitio CH (27.8 – 22.7 °C) con una diferencia de más de 5 °C. En el caso del pH se encontraron condiciones de neutras a ligeramente básicas, el valor más elevado se registró en PL, (8.74) y el más bajo en KU (6.93).

La conductividad eléctrica más alta se registró en el sitio KK tanto en octubre como en febrero (1740-1603 μScm^{-1}), y de igual forma los sólidos disueltos totales (850 y 798 mgL^{-1}). Los valores de conductividad más bajos se registraron en el sitio KU en octubre y febrero (460-414 μScm^{-1}), junto con los sólidos disueltos totales (230 y 214 mgL^{-1}).

6.1.1 *Nutrientes: nitratos y fosfatos*

En la tabla 4 se muestran los resultados del análisis de nutrientes, los resultados se reportan como la concentración de nitrógeno en amonio, nitratos y nitritos, de igual forma para el fosforo, su concentración en fosfatos. En el sitio SC se registró la concentración más alta de nitrógeno en nitratos (9.818 mgL^{-1}) y en el sitio PL la concentración más baja (0.017 mgL^{-1}), ambos valores se presentaron en el mes de octubre. En el sitio KU se detectó la concentración mayor de nitrógeno en amonio (0.271 mgL^{-1}), en cambio en los sitios CH y SC obtuvo la menor concentración (0.043 mgL^{-1}) en octubre.

La concentración de nitrógeno en nitritos se encontró por debajo de los límites de detección del método (0.005 mgL^{-1}) en 8 de las 14 muestras colectadas (Tabla 4). La concentración más alta se registró en el sitio PL (0.223 mgL^{-1}) y la más baja en KU, ambas en el mes de octubre (0.005 mgL^{-1}) (Tabla 4).

El nitrógeno inorgánico disuelto (NID) se calculó con la suma de las concentraciones del nitrógeno en nitrato, amonio y nitrito. La concentración mayor se

encontró en el sitio SC en octubre (9.861 mgL^{-1}) y la menor en el sitio KU en febrero (0.183 mgL^{-1}). El valor promedio de la concentración de NID fue de 3.565 mgL^{-1} .

EL fosforo reactivo soluble (SPR por sus siglas en inglés) registró la concentración más alta en el sitio KU con 0.500 mgL^{-1} y la más baja en el sitio KK con 0.019 mgL^{-1} ambas en febrero; las concentraciones de SPR en el sitio KK en octubre y en el sitio MZ en febrero estuvieron por debajo del límite de detección (0.01 mgL^{-1}).

Tabla 4. Concentración de los nutrientes determinados para cada uno de los sitios de estudio (NID: Nitrógeno Inorgánico Disuelto; SRP: Fosforo Reactivo Soluble; N/P: Relación NID/SRP).

Sitio	Fecha	Nitratos ($\text{mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$)	Amonio ($\text{mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$)	Nitritos ($\text{mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$)	NID (mgL^{-1})	SRP ($\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)	N/P
CH	oct-17	3.818	0.043	0.036	3.897	0.319	12.216
	feb-18	3.955	0.063	<LDM	4.018	0.062	64.806
XC	oct-17	1.027	0.186	<LDM	1.213	0.039	31.103
	feb-18	1.627	0.082	0.020	1.729	0.270	6.404
MZ	oct-17	3.273	0.124	<LDM	3.397	0.046	73.848
	feb-18	2.682	0.071	<LDM	2.753	<LDM	-
KU	oct-17	2.070	0.271	0.005	2.346	0.500	4.692
	feb-18	0.034	0.150	<LDM	0.183	0.475	0.385
KK	oct-17	2.573	0.106	0.009	2.688	<LDM	-
	feb-18	7.318	0.137	<LDM	7.456	0.019	392.421
SC	oct-17	9.818	0.043	<LDM	9.861	0.312	31.606
	feb-18	9.523	0.101	0.021	9.645	0.092	104.837
PL	oct-17	0.017	0.111	0.223	0.350	0.237	1.477
	feb-18	0.223	0.155	<LDM	0.378	0.418	0.904

En el sitio KK se observó la mayor diferencia en la concentración de nitratos ($2.573 - 7.318 \text{ mgL}^{-1}$), la cual aumentó 4.745 mgL^{-1} de octubre a febrero, de igual forma, en este sitio la concentración del NID aumentó 4.768 mgL^{-1} de octubre a febrero ($2.688 - 7.456 \text{ mgL}^{-1}$). En el caso de la concentración de fosforo reactivo soluble, éste tuvo su mayor cambio de octubre a febrero en el sitio CH ($0.319 - 0.062 \text{ mgL}^{-1}$) reduciéndose 0.256 mgL^{-1} .

La relación NID/PRS muestra una limitación por nitrógeno en los sitios KU y PL, en ambos muestreos (octubre y febrero), en cambio, en los sitios MZ, KK y SC la relación NID/PRS muestra una limitación por fósforo tanto en octubre como en febrero. En los sitios CH y XC se muestra una alternancia en la limitación por fósforo y nitrógeno ente los meses de muestreo (Tabla 4).

6.1.2 Composición iónica

En la tabla 5 se muestran las concentraciones de los iones cuantificados. La concentración más alta de sodio y magnesio se registró en el sitio KK (163 mgL⁻¹ y 49.1 mgL⁻¹) mientras que en el sitio KU se registró la menor concentración (12.6 mgL⁻¹ y 7.5 mgL⁻¹). La media de las concentraciones fue de 88.7 mgL⁻¹ para el sodio y de 30.2 mgL⁻¹ para el magnesio. La media de la concentración de potasio fue de 5.4 mgL⁻¹; la concentración de potasio fue mayor en el sitio SC (10.5 mgL⁻¹) y menor en el sitio KK (1.1 mgL⁻¹). La concentración de calcio registró su mayor valor en el sitio CH (175.0 mgL⁻¹) y el menor en el sitio KU (96.5 mgL⁻¹). El promedio de las concentraciones de calcio fue de 124.3 mgL⁻¹ tomando en cuenta el muestreo del mes de octubre y de

Tabla 5. Concentración de los iones presentes en los sitios de muestreo.

Sitio	Muestreo	Sodio (mgL ⁻¹)	Potasio (mgL ⁻¹)	Magnesio (mgL ⁻¹)	Calcio (mgL ⁻¹)	Sulfatos (mgL ⁻¹)	Cloruros (mgL ⁻¹)
CH	oct-17	84.1	10.2	21.6	132.5	69.5	270.0
	feb-18	80.1	4.4	19.1	175.0	49.8	166.0
XC	oct-17	86.2	3.4	38.8	114.4	44.4	272.0
	feb-18	79.1	1.9	35.3	103.0	21.6	119.0
MZ	oct-17	77.9	3.2	33.6	136.8	41.6	263.0
	feb-18	128.0	4.6	44.0	127.0	33.1	232.0
KU	oct-17	12.6	10.4	8.0	113.4	12.7	131.0
	feb-18	14.4	9.0	7.5	96.5	1.0	59.3
KK	oct-17	163.0	5.0	49.1	128.4	69.3	450.0
	feb-18	150.0	1.1	46.7	137.0	78.1	457.0
SC	oct-17	83.1	10.5	32.0	135.4	57.7	289.0
	feb-18	61.3	6.0	21.5	128.0	59.7	315.0
PL	oct-17	118.3	3.7	33.8	102.9	22.8	305.0
	feb-18	104.0	2.7	31.9	110.4	18.9	256.7

febrero.

En el caso de los aniones, la concentración más alta de sulfatos (78.1 mgL^{-1}) y cloruros (457 mgL^{-1}) se registró en el sitio KK, mientras que las concentraciones más bajas de sulfatos (1.0 mgL^{-1}) y cloruros (59.3 mgL^{-1}) se encontraron en el sitio KU. La media de la concentración de sulfatos fue de 14.4 mgL^{-1} y la de cloruros de 256.1 mgL^{-1} (Tabla 5).

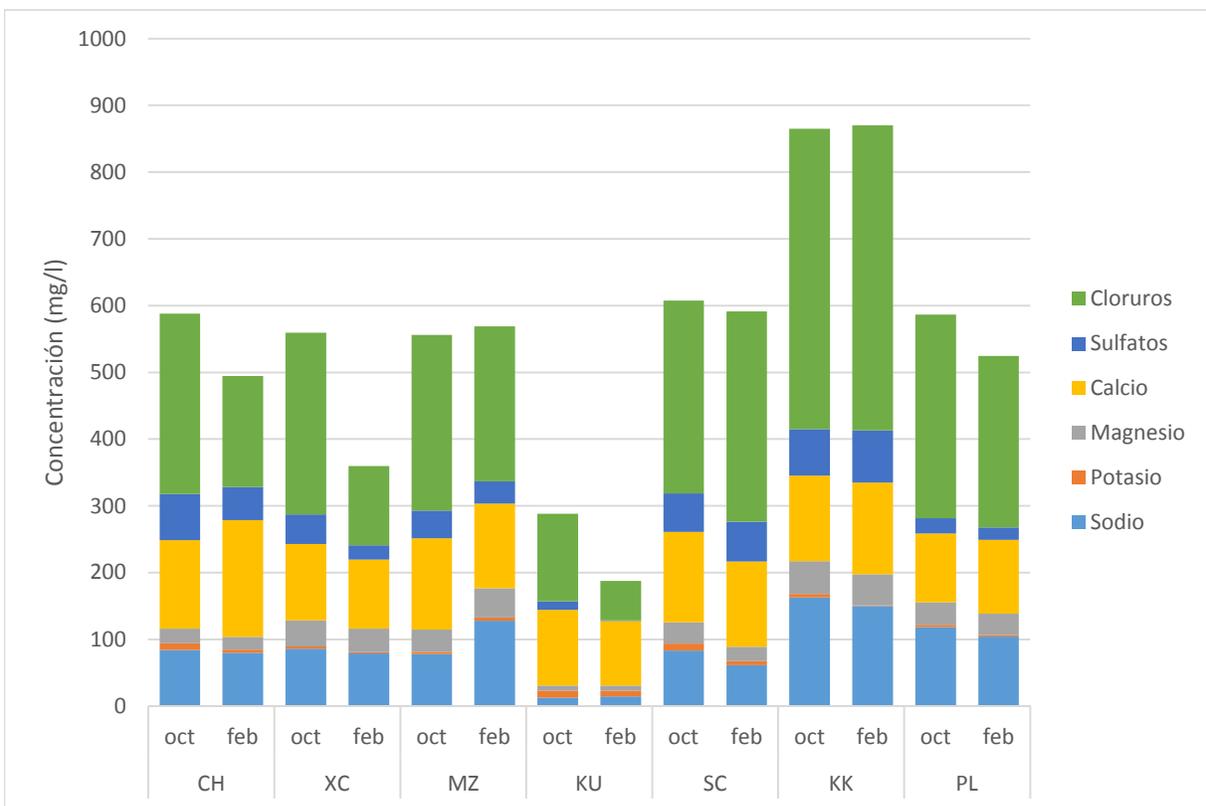


Figura 2. Composición iónica de los sitios de muestreo. (CH) Chen ha, (XC) Xcolac, (MZ) Mumundzonot, (KU) Kanaha, (SC) Sucila, (KK) Kikil, (PL) Punta Laguna.

Al comparar las concentraciones de los iones obtenidas en el mes de octubre, con las concentraciones del mes de febrero, se observaron las siguientes diferencias: las concentraciones de sodio aumentaron en el sitio MZ en 50.1 mgL^{-1} , en el sitio CH el calcio aumentó 43 mgL^{-1} , mientras que el potasio disminuyó 5.77 mgL^{-1} . En el sitio SC

el magnesio disminuyó 10.50 mgL⁻¹. Los dos aniones, tanto los sulfatos como los cloruros disminuyeron en promedio 22.80 mgL⁻¹ y 153.00 mgL⁻¹, respectivamente en el sitio XC (Figura 2).

En general, en el sitio KU se observó la menor concentración de iones en relación a los otros sitios, mientras que en el sitio KK se obtuvieron las concentraciones más altas. La concentración iónica está dominada mayormente por los cloruros, seguido del calcio y el sodio (Figura 2). De octubre a febrero la concentración de cloruros disminuyó en el sitio CH mientras que la de sodio aumentó, de igual forma se puede observar una disminución en la concentración total de iones en los sitios XC y KU del mes de octubre al mes de febrero (Figura 2).

6.1.3 Clorofila

En la tabla 5 se muestran los valores de la cuantificación espectrofotométrica de clorofila. Las concentraciones más altas de clorofila a y b se registraron en el sitio KU (21.29 y 8.62 µgL⁻¹), mientras que la concentración más alta de clorofila c se encontró en el sitio CH (3.95 µgL⁻¹). La menor concentración de clorofila a se registró en el sitio MZ (0.22 µgL⁻¹), en el caso de la clorofila b y c fue la menor concentración se registró en el sitio PL (0.14 y 0.20 µgL⁻¹). La media de las concentraciones de clorofila a fue de 4.27 µgL⁻¹, de clorofila b fue de 1.53 µgL⁻¹ y de clorofila c fue de 0.91 µgL⁻¹. La

Tabla 6. Concentración de la clorofila a, b y c determinados para cada uno de los sitios de muestreo.

Sitio	Muestreo	Chl a (µgL ⁻¹)	Chl b (µgL ⁻¹)	Chl c (µgL ⁻¹)
CH	oct-17	2.94	1.21	0.70
	feb-18	5.09	0.66	3.95
XC	oct-17	4.66	0.27	0.46
	feb-18	3.00	0.42	0.63
MZ	oct-17	0.84	0.58	1.65
	feb-18	0.22	0.16	0.42
KU	oct-17	3.76	1.02	ND
	feb-18	21.29	8.62	0.92
KK	oct-17	13.45	6.70	0.48
	feb-18	1.70	0.51	0.36
SC	oct-17	0.56	0.52	0.77
	feb-18	0.23	0.25	0.31
PL	oct-17	1.00	0.14	0.20
	feb-18	1.04	0.39	0.98

concentración de clorofila c en el sitio KU en octubre se encontró por debajo del límite de detección del método (Tabla 6).

El mayor cambio en las concentraciones de clorofila entre los meses de octubre y febrero se encontró en el sitio KU, en el cual la clorofila a aumentó en $17.53 \mu\text{gL}^{-1}$, mientras que la clorofila a en el sitio KU incrementó $7.60 \mu\text{gL}^{-1}$ de octubre a febrero y en el sitio CH la clorofila c aumentó $3.25 \mu\text{gL}^{-1}$. A diferencia del sitio PL que tuvo el cambio menor en la concentración de clorofila a ($1.00 - 1.04 \mu\text{gL}^{-1}$) con un incremento de $0.04 \mu\text{gL}^{-1}$. En cambio, en el sitio KK se presentó la mayor disminución en la concentración de la clorofila a y de clorofila b, disminuyendo $11.75 \mu\text{gL}^{-1}$ y de $6.19 \mu\text{gL}^{-1}$ respectivamente (Tabla 6).

Tabla 7. Grado de eutrofia con base en el índice del estado trófico de Carlson (1977) de los sitios de estudio.

Sitio	Muestreo	Chl a (μgL^{-1})	Índice Trófico
CH	oct-17	2.94	Oligotrófico
	feb-18	5.09	Mesotrófico
XC	oct-17	4.66	Mesotrófico
	feb-18	3.00	Mesotrófico
MZ	oct-17	0.84	Oligotrófico
	feb-18	0.22	Oligotrófico
KU	oct-17	3.76	Mesotrófico
	feb-18	21.29	Eutrófico
KK	oct-17	13.45	Mesotrófico
	feb-18	1.70	Oligotrófico
SC	oct-17	0.56	Oligotrófico
	feb-18	0.23	Oligotrófico
PL	oct-17	1.00	Oligotrófico
	feb-18	1.04	Oligotrófico

De acuerdo a las concentraciones de clorofila a obtenidas y con base en el índice trófico de Carlson (1977), el cual establece que con base en las concentraciones de clorofila a los ambientes acuáticos pueden clasificarse en oligotróficos ($<3 \text{ mg Chl a m}^{-3}$), mesotróficos ($3-20 \text{ mg Chl a m}^{-3}$) y eutróficos ($20-150 \text{ mg Chl a m}^{-3}$), los sitios MZ,

SC y PL se pueden considerar dentro del rango de sitios oligotróficos, el sitio XC como mesotrófico. Es importante mencionar que con base en ese índice hay sitios que presentan cambios en su estado trófico entre los meses de octubre y febrero, en el caso del sitio CH, éste pasa de oligotrófico a mesotrófico, el sitio KK de mesotrófico a oligotrófico y el sitio KU de mesotrófico a eutrófico (Tabla 7).

6.2 *Diversidad genética: marcador 16S ARNr*

6.2.1 *Diversidad bacteriana*

De las 10 muestras que se enviaron a secuenciar a la Universidad de Arizona mediante Illumina®, únicamente se obtuvieron concentraciones mayores a 6 ngmL⁻¹ de los amplicones obtenidos a partir de las muestras CH, YP2, YP3, YP4 y YP5 (Tabla 8), por lo tanto, se obtuvieron secuencias a partir del 50 % de las muestras enviadas.

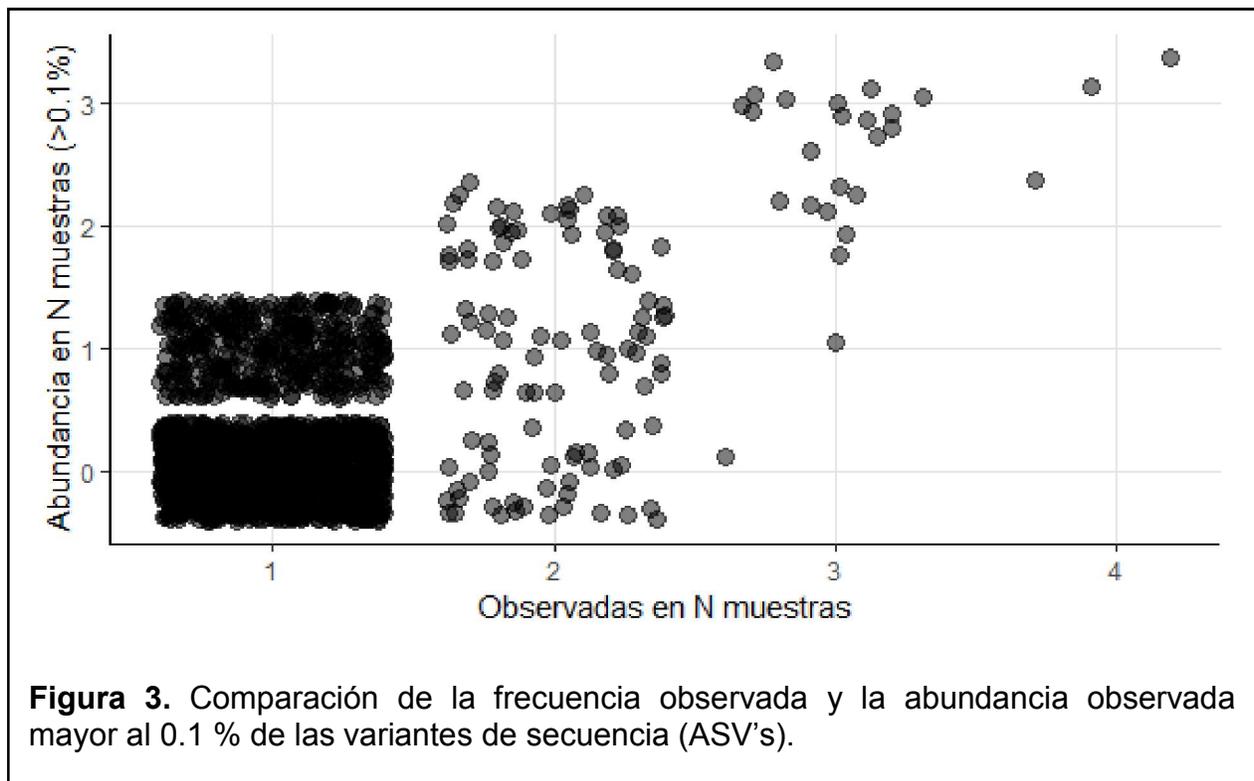
Tabla 8. Riqueza genética estimada en los sitios de estudio mediante el índice de Chao.1, y diversidad estimada mediante el índice de Shannon y de Simpson.

Sitio	# Secuencias	# ASV's	Chao1	Índice Shannon	Índice Simpson
CH	2 2961	177	177	3.330	0.930
YP5	5 8504	323	323	4.066	0.961
YP2	4 1916	348	348	4.399	0.974
YP3	4 1192	517	517	4.498	0.961
YP4	3 8494	436	436	3.735	0.901

A partir de los 5 sitios bajo estudio, se obtuvieron un total de 213 517 secuencias de calidad y un total de 1 856 ASV's, de las cuales después de la eliminación de las secuencias que se clasificaron para cloroplastos (86), Archaea (73), mitocondrias (43) y no clasificadas (8), se obtuvo un total de 203 067 secuencias y 1 646 ASV's. La frecuencia mínima de las secuencias por sitio fue de 22 961 y la máxima de 58 504 secuencias, con una media de 41 192 secuencias (Tabla 8). Con la utilización de la

base de datos de referencia Silva para la subunidad pequeña del ribosoma se lograron clasificar el 100 % de las secuencias a nivel de phylum, a nivel de clase el 99.64 %, a nivel de orden el 90.77 %, a nivel de familia el 85.66 %, a nivel de género el 74 % y a nivel de especies el 2.49 %. El sitio con la mayor riqueza observada (# ASV's) fue el sitio YP3, seguido del sitio YP4 y el sitio con la menor riqueza fue CH (Tabla 8).

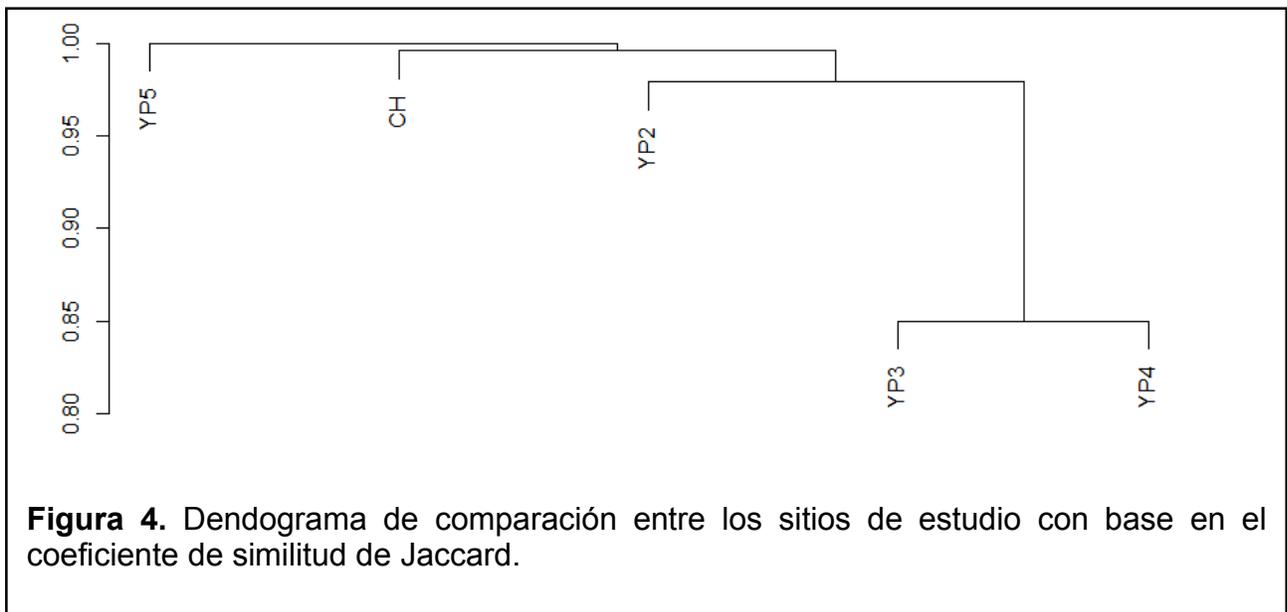
De las 1 646 ASV's observadas, 1 520 ASV's se observaron una sola vez en un único sitio, 100 ASV's en tuvieron una frecuencia dos sitios, 23 ASV's se presentaron en al menos 3 sitios, 3 ASV's se registraron en 4 sitios y ninguna de las ASV's se presentó en los cinco sitios (Figura 3).



El valor del índice de diversidad de Shannon se determinó en el rango de 3.3 y 4.5, siendo el sitio YP3 el que obtuvo el mayor valor, lo cual significa que este sitio posee la mayor diversidad de los sitios muestreados, mientras que el sitio CH que obtuvo el menor valor del índice de diversidad de Shannon posee la menor diversidad de los sitios muestreados. Los valores del índice de diversidad de Simpson oscilaron

entre 0.90 a 0.98, siendo el sitio YP2 el que obtuvo el valor más alto, lo cual significa que es el sitio con mayor equitatividad en la comunidad de microorganismos, mientras que el sitio con el menor valor en el índice de Simpson fue YP4, lo cual significa que esta es la comunidad menos equitativa de los sitios muestreados. Los valores en el índice de Chao1 son idénticos a el número de ASV's (riqueza específica) que se presentaron en cada uno de los sitios (Tabla 8), lo cual sugiere que las secuencias obtenidas son representativas de la comunidad de bacterias que habitan en los diferentes cenotes.

De acuerdo al índice de Jaccard, los sitios YP4 y YP3 resultaron ser los sitios con la composición de la comunidad más similar de entre sitios, sin embargo, las diferencias entre los sitios son menores por lo cual, todos los sitios muestran alto grado de similitud entre las comunidades de bacterias que habitan en éstos (Figura 4).



6.2.2 Estructura de la comunidad bacteriana a nivel de phylum y clase

En las 5 muestras secuenciadas se identificaron 39 phyla en total, de los cuales solamente 7 phyla tuvieron una abundancia mayor al 1 %, estos incluyen a *Proteobacteria* (60.73 %), seguido de *Bacteroidetes* (16.23 %), *Verrucomicrobia* (6.59

%), *Planctomycetes* (4.17 %), *Cyanobacteria* (3.58 %), *Actinobacteria* (3.38 %) y de clasificación desconocida (1.72 %) (Figura 7). Se puede observar (Figura 5) que la composición de la comunidad es similar en los sitios CH, YP5 y YP2, y difiere de los sitios YP3 y YP4 en la distribución de la comunidad en donde phylum Proteobacteria es dominante.

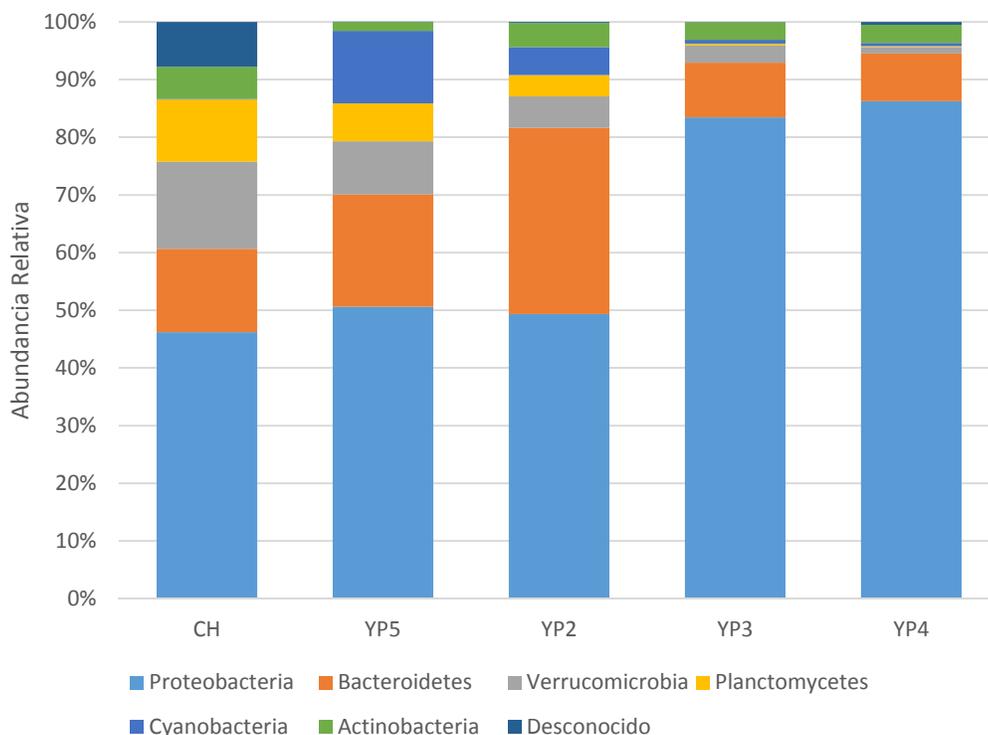


Figura 5. Composición de la comunidad y distribución de los siete phyla observados en los cenotes muestreados. El gráfico muestra los grupos con abundancia mayor al 1 %.

También en las 5 muestras secuenciadas se identificaron otros 32 phyla con abundancia menor al 1 % (Figura 6), entre los cuales se incluyen *Armatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Epsilonbacteraeota*, *Acidobacteria*, *Patescibacteria*, *Firmicutes*, *Fibrobacteres*, *Kiritimatiellaeota*, *Chlamydiae*, *Dependentiae*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Omnitrophicaeota*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Calditrichaeota*, *Latescibacteria*, *Hydrogenedentes*, *Nitrospirae*, *Elusimicrobia*, *Rokubacteria*, *Margulisbacteria*, *Zixibacteria*, *Tenericutes*, *Deinococcus-Thermus*, *Cloacimonetes* y los

phyla candidatos FBP, WOR-1, WS1, BRC1, WS4, WS2. En la Figura 6 se aprecia que las muestras son heterogéneas en la composición de la comunidad de los phyla de bacterias con abundancia menor al 1 %.

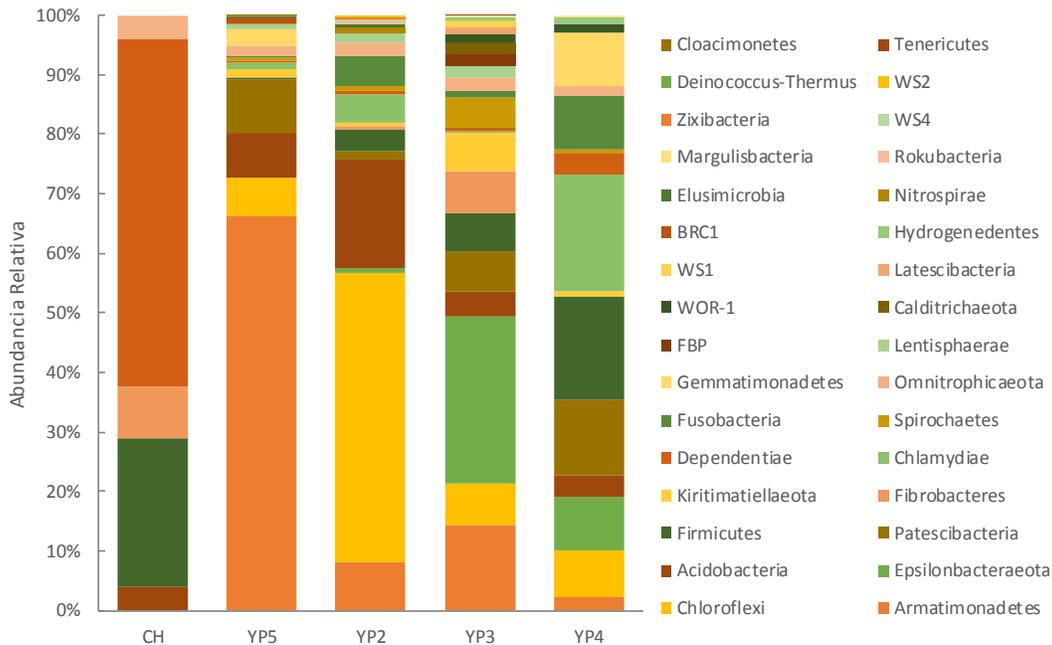


Figura 6. Composición de la comunidad y distribución de los 32 phyla observados en los cenotes muestreados con abundancia menor al 1 %.

Algunos phyla se encontraron únicamente en un sitio, por ejemplo, el phylum *Cloacimonetes* se encontró únicamente en el sitio YP5, los phyla *Zixibacteria*, *Rokubacteria*, *Nitrospirae*, y los candidatos WS2 y WS4 solamente se registraron en el sitio YP2. En el sitio YP3 únicamente registró a *Deinococcus-Thermus*, *Tenericutes*, *Latescibacteria*, *Calditrichaeota* y los candidatos WS1 y FBP (Figura 6).

Se analizaron los phyla más abundantes a nivel de clase, respecto al phylum *Actinobacteria* estuvo dominado por la clase *Actinobacteria* (Figura 7). En el caso de *Bacteroidetes* el segundo phylum más abundante, *Bacteroidia* domina las clases de este grupo con el 99 % de las secuencias pertenecientes a *Bacteroidetes*. Respecto al phylum *Cyanobacteria* la clase *Oxyphotobacteria* domina la comunidad (Figura 7). El análisis del phylum *Proteobacteria* reveló que la mayoría de las secuencias pertenecen

a *Gammaproteobacteria* (48 %), *Alphaproteobacteria* (8.16 %) y *Deltaproteobacteria* (5.15 %) (Figura 7). Las *Gammaproteobacteria* fueron las más abundantes en todos los sitios (36 – 79 %), seguido de las *Alphaproteobacteria* como las segundas más abundantes en el sitio CH (10.16 %), en YP5 (13.65 %), YP3 (8.5 %) y en YP4 (4.79 %). Las *Deltaproteobacteria* fueron las segundas más abundantes en el sitio YP2 (11.97 %) (Figura 7). Para el phylum *Verrucomicrobia* solo fue identificada la clase *Verrucomicrobiae*, en el caso de *Planctomycetes* la clase *Phycisphaerae* representó más de la mitad de las secuencias identificadas en este grupo siendo el más abundante en los sitios CH y YP2, sin embargo, *Planctomycetacia* fue más abundante en los sitios YP5 y YP3 (Figura 7).

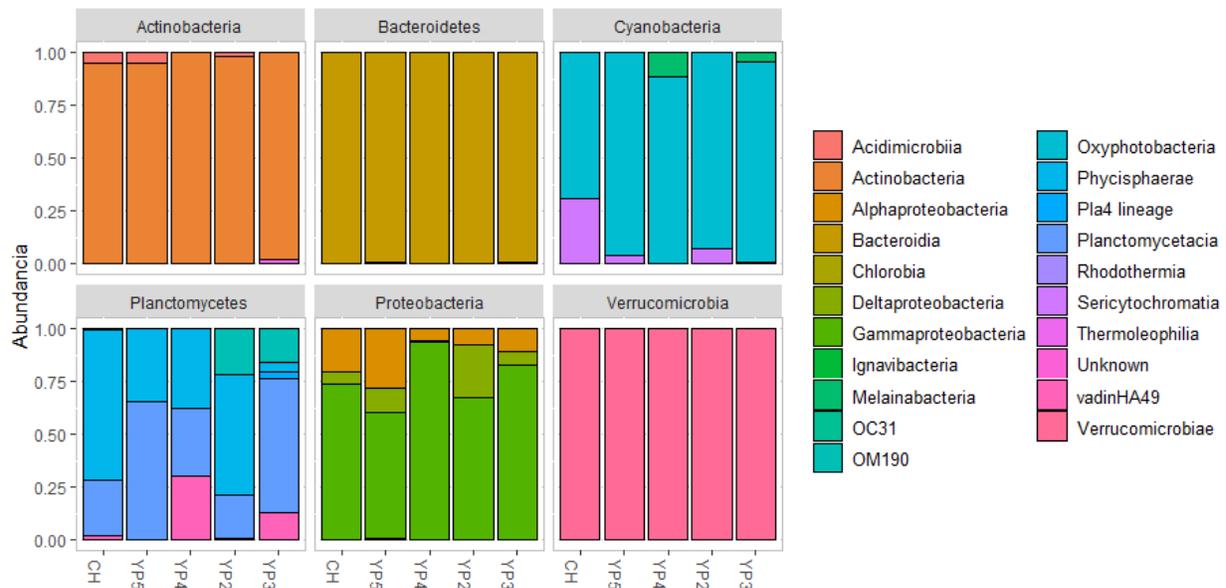


Figura 7. Distribución de las clases identificadas pertenecientes a los seis phyla más abundantes en los sitios de muestreo

6.2.3 Abundancia bacteriana a nivel de familia y género

A nivel de familia fueron clasificadas 357 ASV's, de las cuales las siguientes 14 familias tuvieron una abundancia relativa mayor al 1 % de toda la comunidad:

Burkholderiaceae (34.67 %), *Chitinophagaceae* (5.52 %), *Rhodocyclaceae* (4.99 %), *Terrimicrobiaceae* (3.86 %), *Cyanobiaceae* (3.28 %), *Saprospiraceae* (3.24 %), NS11-12 marine group (Orden *Sphingobacteriales*) (2.8 %), *Phycisphaeraceae* (2.43 %), *Sporichthyaceae* (2.38 %), *Methylomonaceae* (1.64 %), *Sphingomonadaceae* (1.61 %), *Oligoflexaceae* (1.53 %), *Rhodobacteraceae* (1.25 %), *Caulobacteraceae* (1.04 %) (Figura 8).

La composición de la comunidad a nivel de familia es heterogénea, únicamente la familia *Burkholderiaceae* fue la más abundante en todos los sitios, en YP4 represento la mitad de las secuencias y en los otros sitios del 21 al 48 % (Figura 8). En el sitio CH la familia *Terrimicrobiaceae* (13.44 %) fue la segunda más abundante seguida de *Chitinophagaceae* (10.04 %). En el sitio YP5 la segunda familia con mayor abundancia fue *Chitinophagaceae* (15.56 %), seguida por *Cyanobiaceae* (11.92 %). En el sitio YP3 la familia en segundo lugar en abundancia fue *Sphingomonadaceae* (4.92 %) seguido de *Rhodocyclaceae* (1.96 %). Por último en el sitio YP4 la segunda familia más abundante fue *Rhodocyclaceae* (15 %) seguido de *Methylomonaceae* (4.41 %) (Figura

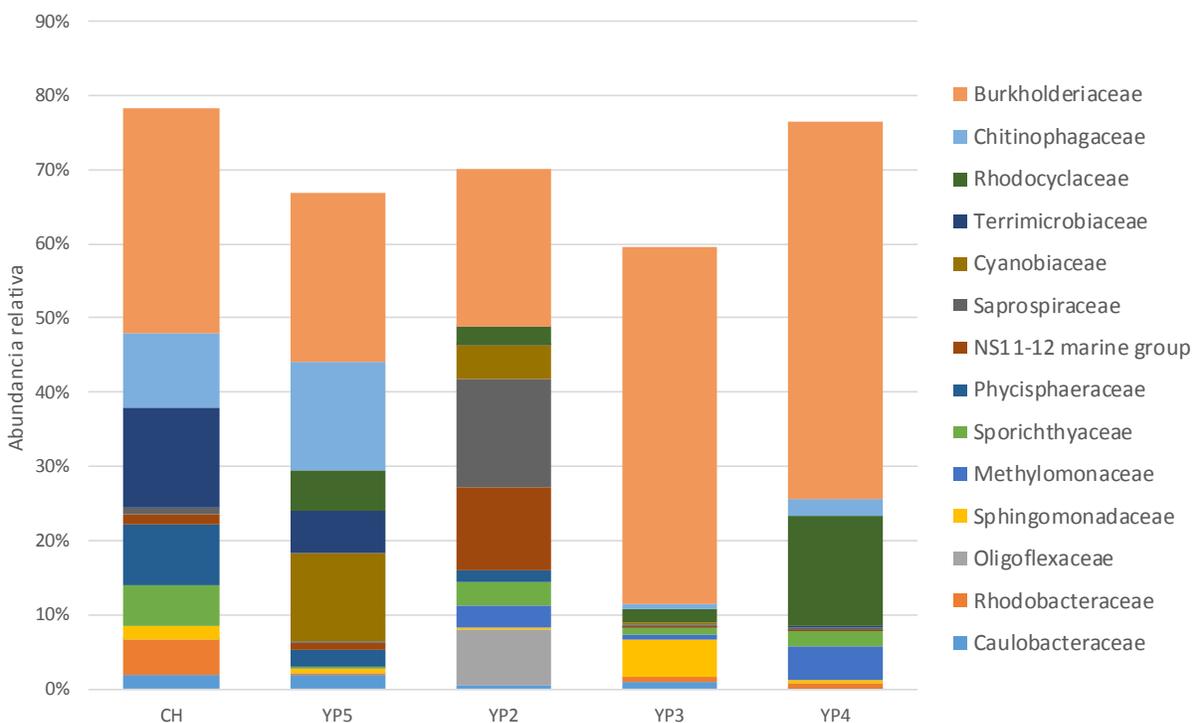


Figura 8. Composición de la comunidad de bacterias a nivel de familia con abundancia relativa mayor al 1% en los diferentes sitios de estudio.

8).

A nivel de género se clasificaron 312 ASV's excluyendo aquellas con la clasificación de "no cultivado" y de "metagenoma", de las cuales 14 géneros presentaron abundancia mayor al 1 % (Figura 9). Los géneros estuvieron representados por *Polynucleobacter* (7.24 %), *Terrimicrobium* (5.9 %), C39 (Familia *Rhodocyclaceae*) (5.59 %), *Cyanobium* PCC-6307 (3.76 %), CL500-3 (Familia *Ilumatobacteraceae*) (3.64 %), *Limnobacter* (3.42 %), *Sediminibacterium* (3.29 %), hgcl clade (Familia *Sporichthyaceae*) (2.51 %), MWH-UniP1 aquatic group (Familia *Burkholderiaceae*) (2.35 %), *Haliscomenobacter* (1.92 %), *Silvanigrella* (1.78 %), *Ferruginibacter* (1.56 %), *Sphingomonas* (1.36 %) y *Fluviicola* (1.33 %) (Figura 9).

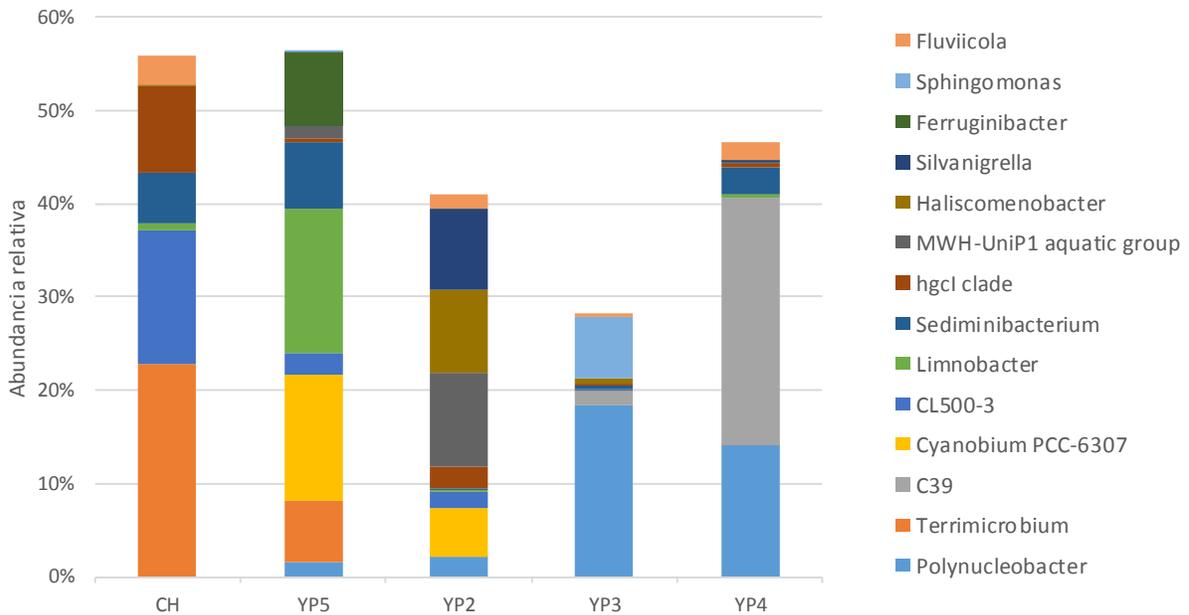


Figura 9. Distribución de los géneros más abundantes en los diferentes sitios de estudio. Se muestran los géneros con abundancia mayor al 1%, se omitieron los géneros clasificación de "no cultivado" y de "metagenoma".

6.2.4 Diversidad de cianobacterias: marcador 16S

Se realizó con subconjunto de datos para solo conservar al phylum de las cianobacterias, de las cuales se obtuvieron un total de 9,435 secuencias con una mínima de 32 secuencias, un máximo de 6,972 y una media de 1,887, de las cuales se obtuvieron 44 ASV's distribuidas en los sitios de la siguiente forma: sitio CH 3 ASV's, sitios YP5 y YP3 10 ASV's, sitio YP2 9 ASV's y sitio YP4 12 ASV's (Tabla 9).

Tabla 9. Abundancia relativa de las ASV's clasificadas a nivel de orden en el phylum *Cyanobacteria*. Se enlistan los taxones de menor a mayor en relación a su abundancia relativa de todas las secuencias. (*: se agruparon dos ASV's diferentes con la misma clasificación)

Orden	CH	YP5	YP2	YP3	YP4
<i>Leptolyngbyales</i>	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00
<i>Desconocida</i>	0.00	0.49	0.00	0.00	0.00
<i>Caenarcaniphilales</i>	0.00	0.09	0.00	0.00	2.90
<i>Pseudanabaenales</i>	0.00	0.17	0.00	0.00	2.90
<i>No cultivada*</i>	31.25	3.84	7.48	1.15	0.00
<i>Gastranaerophilales</i>	0.00	0.00	0.10	4.23	8.70
<i>Phormidesmiales</i>	0.00	0.00	0.00	32.31	0.00
<i>Oxyphotobacteria Incertae Sedis</i>	0.00	0.00	0.00	38.08	1.93
<i>Nostocales</i>	68.75	0.42	0.10	18.08	51.21
<i>Synechococcales</i>	0.00	94.99	92.21	6.15	32.37

La clasificación a nivel de clase presento tres taxones de los cuales *Oxyphotobacteria* (88 %) fue el más abundante, seguido de *Sericytochromatia* (8.75 %) y *Melainobacteria* (3.2 %). Respecto a cada uno de los sitios, en el sitio CH solo se registró a *Oxyphotobacteria* (68.75 %) y a *Sericytochromatia* (31.25 %), en los sitios

YP5 y YP2 *Oxyphotobacteria* (96.07 y 92.41 %) dominó la comunidad, seguido de *Sericytochromatia* (3.84 y 7.48 %). En los sitios YP3 y YP4 también dominó la presencia de *Oxyphotobacteria* (94.62 y 88.41 %), sin embargo, la segunda clase más abundante fue *Melainabacteria* (4.23 y 11.59 %) (Tabla 9).

A nivel de orden se registraron 11 taxones diferentes, entre los cuales 2 se clasificaron como no cultivados y 1 como desconocido (Tabla 9). El orden con mayor representación en toda la muestra fue *Synechococcales* (45.15 %) seguido de *Nostocales* (27.71 %) y *Oxyphotobacteria Incertae Sedis* (8 %).

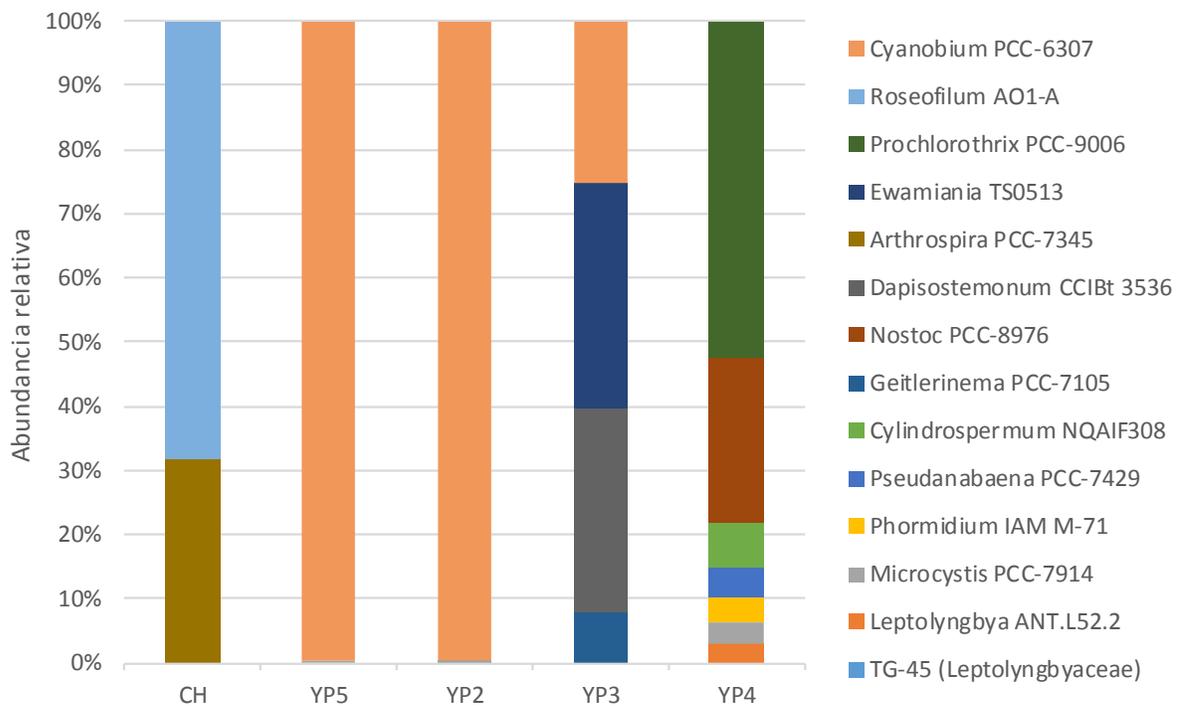


Figura 10. Distribución de los géneros de cianobacterias en los diferentes sitios de estudio, entre paréntesis se muestra la abundancia relativa de género en el total de las secuencias.

A nivel de género, después de filtrar aquellas secuencias clasificadas como organismos no cultivados y desconocidos, se registraron un total de 14 géneros, nueve con abundancia relativa mayor al 1 % siendo *Cyanobium* PCC-6307 el más abundante de todas las secuencias (Figura 10).

De todas las variantes de secuencia de cianobacterias únicamente cuatro fueron clasificadas hasta el nivel de especie, las cuales fueron: *Pseudanabaena galeata*, *Ewamiania thermalis* TS0513 y *Cyanothece aeruginosa* SAG 87.79, esta última representada por dos ASV's.

6.3 Creación de las bibliotecas del gen 23S ARNr

6.3.1 Extracción y cuantificación de ADN

En la extracción de las muestras de octubre se obtuvo ADN total (Figura 11) y en el caso del sitio PL se obtuvo una concentración de $1.7 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$, debido a la baja concentración de ADN obtenido de ese sitio se decidió realizar una segunda extracción.

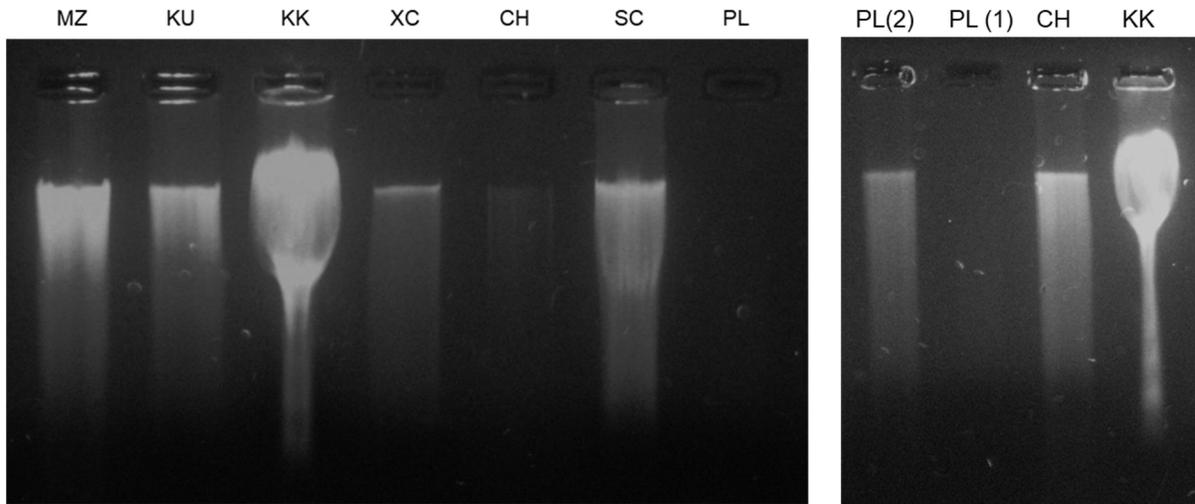


Figura 11. Extracción de ADN ambiental de muestras de agua (octubre 2017). Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1 %; técnica de tinción EtBr. (MZ, Mumundzonot; KU, Kanaha; KK, Kikil; XC, Xcolac; CH, Chen-ha; SC, Sucila; PL, Punta Laguna).

Finalmente se comprobó la extracción de ADN y se cuantifico (Tabla 10)

El ADN extraído de las muestras de febrero revela en la electroforesis en gel de agarosa (1 %) ausencia de ADN total en PL (Figura 11), en el caso de MZ y KK se realizó otro gel (Figura 11) para verificar la presencia de ADN. Posteriormente se realizó

una nueva extracción de ADN para la muestra de PL. Después de las extracciones se cuantificó la concentración de ADN total, los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentración de ADN extraído de las muestras de agua de cada uno de los sitios de estudio.

		CH	XC	MZ	KU	SC	KK	PL
ADN total (ngμL⁻¹)	Oct-17	54.4	10.1	103.7	38.5	27.3	122.5	18.9
	Feb-18	93.6	117.2	112.5	105	45.5	29.1	1.7

6.3.2 Amplificación y clonación de los fragmentos del gen 23S ARNr

El DNA se diluyó (1:10) en agua estéril libre de nucleasas, después, se realizó la amplificación de los fragmentos del gen 23S ARNr mediante PCR utilizando los cebadores p23SrV (Sherwood y Presting, 2007). Se obtuvieron amplicones entre los 250 y 500 pb a partir de las muestras de agua colectadas de los sitios CH, XC, MZ, KU, SC, KK y PL de los meses de octubre y febrero. Las muestras que no amplificaron utilizando como templado la dilución 1:10 fueron diluidas 1:5 y 1:50 para volver a realizar la amplificación.

Se obtuvieron treinta plásmidos recombinantes de cada uno de los sitios (CH, XC, MZ, KU, SC, KK y PL) en cada de los meses de muestreo (octubre y febrero), se verificó la presencia del inserto mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (anexo A), se puede observar una banda entre los 250 y 500 pb. Después de determinar la presencia de los insertos en las clonas que dieron resultado positivo se enviaron a secuenciar a la compañía MacroGen, en Corea. Se generaron un total de 420 plásmidos recombinantes correspondientes a 30 plásmidos para cada uno de los sitios (CH, XC, MZ, KU, SC, KK y PL) en los dos meses de muestreo (octubre y febrero).

**6.4 Diversidad genética y estructura de la comunidad de cianobacterias:
marcador 23S ARNr**

Se obtuvieron 380 secuencias de calidad de 363 nucleótidos de longitud, de las cuales se resolvieron 270 ASV's. El número de secuencias por sitio varió desde 20 hasta 30, con una mediana de 28 y una media de 27.14. Después realizar el alineamiento en BLAST de las ASV's que se clasificaron hasta cloroplastos con el clasificador en qiime2, se eliminaron aquellas que resultaban alineadas con organismos que no eran microalgas. El número de ASV's identificadas resultó en un total de 224 y osciló desde 4 hasta 27 para cada uno de los sitios, siendo KU el sitio con el menor número de ASV's obtenidas y el sitio CH junto con el sitio XC los que presentaron el mayor número de ASV's, el promedio de las ASV's fue de 17 ASV's (Tabla 11).

Tabla 11. Diversidad estimada de cianobacterias con base en los resultados de las secuencias obtenidas del gen 23S. Riqueza estimada mediante el Índice de Chao.1, diversidad estimada mediante el Índice de Shannon y el índice de Simpson para cada uno de los siete sitios de estudio.

Sitio	Muestreo	ASV's observadas	Chao1	Shannon	Simpson
CH	oct-17	21	72.0	2.976	0.944
	feb-18	27	127.0	3.271	0.960
KK	oct-17	11	21.0	2.206	0.875
	feb-18	18	36.2	2.838	0.938
KU	oct-17	20	210.0	2.995	0.950
	feb-18	4	10.0	1.386	0.750
MZ	oct-17	5	15.0	1.609	0.800
	feb-18	8	15.5	1.972	0.842
PL	oct-17	27	177.0	3.245	0.957
	feb-18	21	106.5	2.941	0.937
SC	oct-17	13	16.75	2.394	0.894
	feb-18	17	153.0	2.833	0.941
XC	oct-17	26	326.0	3.214	0.956
	feb-18	21	55.0	2.971	0.943

En el mes de octubre la riqueza osciló de 5 ASV's a 27 ASV's, el sitio con la mayor riqueza fue PL con 27 ASV's y el sitio con la menor riqueza fue MZ con 5 ASV's,

los sitios KU, CH, XC y PL tuvieron una riqueza mayor al promedio (17 ASV's) de las ASV's observadas, mientras que los sitios MZ, KK y SC la riqueza fue menor al promedio (17 ASV's) (Tabla 11). La riqueza de ASV's observada fue menor que la estimada por el índice de Chao1 en todos los sitios, la mayor diferencia se puede observar en el sitio XC en el cual la riqueza observada fue de 26 ASV's mientras que el índice de Chao1 estimó 326 ASV's y la menor diferencia se puede observar tanto el sitio MZ como en el sitio KK en donde en el sitio MZ el número de ASV's fue de 5 mientras que el valor estimado por el índice de Chao1 fue de 15 ASV's y en el sitio KK la riqueza observada fue de 11 ASV's mientras que la riqueza estimada fue de 21 ASV's (Tabla 11).

Los valores del índice de diversidad de Shannon de los sitios de estudio en el mes de octubre variaron de 1.61 a 3.25. El mayor valor del índice de diversidad de Shannon en el mes de octubre se obtuvo en el sitio PL (3.25), mientras que el menor valor del índice de Shannon se obtuvo para el sitio MZ (1.61) (Tabla 11). Los valores del índice de diversidad de Simpson en los sitios de estudio en el mes de octubre oscilaron de 0.8 a 0.95. El mayor valor del índice de diversidad de Simpson se observó en el sitio PL (0.95), mientras que el menor valor se observó en el sitio MZ (0.8) (Tabla 11).

Respecto al mes de febrero la riqueza en los sitios de estudio osciló de 4 ASV's a 27 ASV's, el sitio con la mayor riqueza fue CH con 27 ASV's mientras que el sitio con la menor riqueza fue KU con 4 ASV's, los sitios SC, KK, PL, XC y CH tuvieron una riqueza mayor o igual al promedio (17 ASV's) de las ASV's observadas, mientras que los sitios KU y MZ la riqueza fue menor al promedio (17 ASV's) (Tabla 11). La riqueza de ASV's observada en todos los sitios fue menor que la estimada por el índice de Chao1, la mayor diferencia se puede observar en el sitio CH en el cual la riqueza observada fue de 27 ASV's mientras que el índice de Chao1 estimó 127 ASV's y la menor diferencia se puede observar en el sitio KU en donde la riqueza observada fue de 4 ASV's mientras que el valor estimado por el índice de Chao1 fue de 10 ASV's (Tabla 11).

Los valores del índice de diversidad de Shannon de los sitios de estudio en el mes de febrero oscilaron de 1.38 a 3.27. El mayor valor del índice de diversidad de

Shannon en el mes de febrero se obtuvo en el sitio CH (3.27), mientras que el menor valor del índice de Shannon se obtuvo para el sitio KU (1.38) (Tabla 11). Los valores del índice de diversidad de Simpson en los sitios de estudio en el mes de febrero variaron de 0.75 a 0.96. El mayor valor del índice de diversidad de Simpson se observó en el sitio CH (0.97), mientras que el menor valor se observó en el sitio MZ (0.75) (Tabla 11).

En las muestras tomadas en el mes de octubre se obtuvieron 123 ASV's, mientras que en el mes de febrero se obtuvieron 116 ASV's, sin embargo, para cada uno de los sitios de muestreo la diferencias entre la riqueza del muestreo de octubre a febrero no se observaron de forma similar. Los sitios en donde se observó una disminución el número de ASV's observadas de octubre a febrero fueron XC, KU y PL, siendo el sitio KU con la mayor diferencia entre octubre y febrero, en el cuál se observaron 20 ASV's en octubre y en febrero 4 ASV's. En el caso de los sitios CH, MZ, KK y SC se observó un aumento en de la riqueza de octubre a febrero, en donde en el sitio KK en octubre se registraron 11 ASV's mientras que en febrero 18 ASV's (Tabla 11).

Los resultados de la riqueza estimada muestran que se necesitaría un mayor esfuerzo en el muestreo para poder capturar la riqueza de los sitios. Lo anterior se correlaciona con los índices de diversidad que muestran poca diversidad en los sitios, aunque con mayor equitatividad.

6.4.1 Estructura de la comunidad a nivel de phylum

Mediante la utilización de la base de datos de referencia Silva para la subunidad grande del ribosoma y a partir de las 224 secuencias obtenidas, se lograron clasificar el 100 % de las secuencias a nivel de orden, el 78.12 % a nivel de familia, el 61.16 % a nivel de género y el 48.66 % especies. Se encontraron en total cuatro phyla en las muestras y una categoría de bacterias desconocidas, las cuales representaron el 9.24% de la abundancia relativa de la muestra total. Las *Cyanobacteria* clasificadas representaron el 83.42 % de los phyla encontrados, también se clasificaron los phyla *Proteobacteria* (2.7 %) *Verrucomicrobia* (3.57 %) y *Fibrobacteres* (1.07 %).

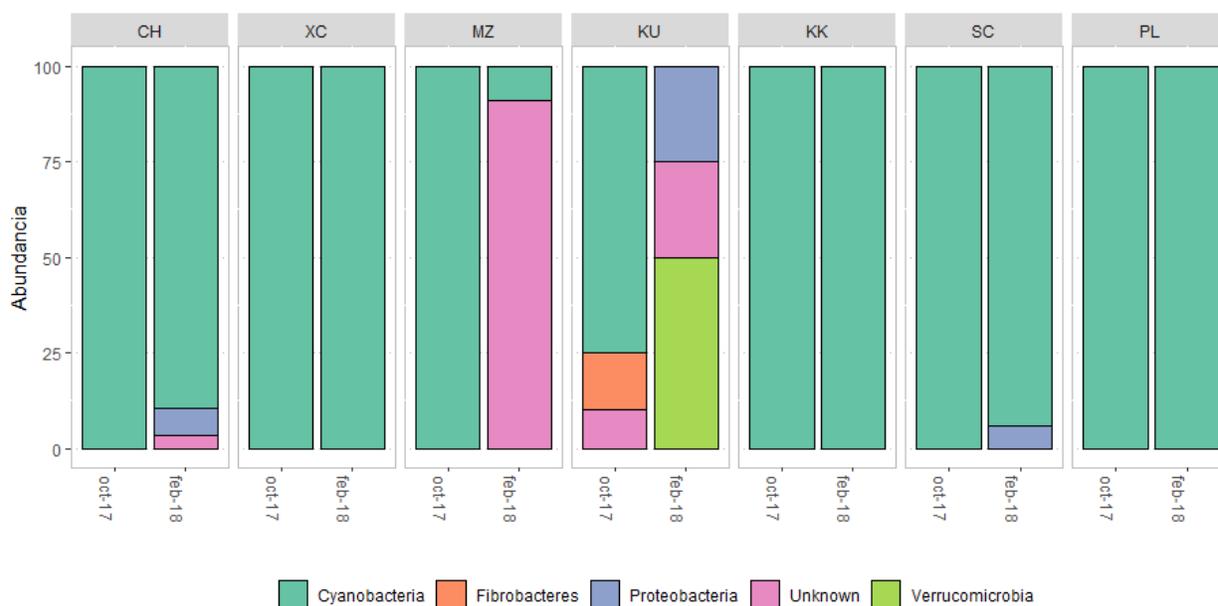


Figura 12. Distribución de los phyla clasificados mediante el análisis del gen 23S ARNr.

El phylum *Verrucomicrobia* solo se registró en el sitio KU, en el mes de febrero (50 %) y el phylum *Proteobacteria* se registró en los sitios CH (6.9 %), KU (25 %) y SC (5.89 %) únicamente en febrero, mientras que *Fibrobacteres* se registró únicamente en el sitio KU, en el muestreo de octubre (15 %) (Figura 12). Las secuencias fueron clasificadas como desconocidas mediante el clasificador Naive-Bayes, se identificaron en el mes de febrero en el sitio CH (3.45 %) y en el sitio MZ (90.9 %), mientras que en el sitio KU éstas se identificaron tanto en octubre (10 %) como en febrero (25 %) (Figura 12).

La composición de algas eucariotas y cianobacterias varió entre los sitios y entre los muestreos (Figura 13). Con base en la clasificación de las secuencias obtenidas con utilizando la base de referencia Silva LSU 132, de las 380 secuencias obtenidas 159 se clasificaron como cianobacterias y con base en el análisis de BLAST 198 secuencias compartieron homología con microalgas eucariotas. En los sitios XC y en PL se observó una dominancia de cianobacterias, en cambio en el sitio MZ la proporción fue equitativa entre cianobacterias y algas eucariotas en el mes de octubre y en febrero solo se

presentaron algas eucariotas (Figura 13). En el sitio CH la proporción de la composición de la comunidad fue equitativa tanto en el mes de octubre como en febrero (Figura 13). En los sitios KK, y SC las algas eucariotas fueron el grupo dominante en el mes de octubre, mientras que en febrero el grupo dominante fue el de las cianobacterias. En el sitio KU dominaron las algas eucariotas en octubre, mientras que en febrero no se registró la presencia de ninguno de los dos grupos debido a que únicamente se identificaron secuencias de los phyla *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y de clasificación desconocida (Figura 12).

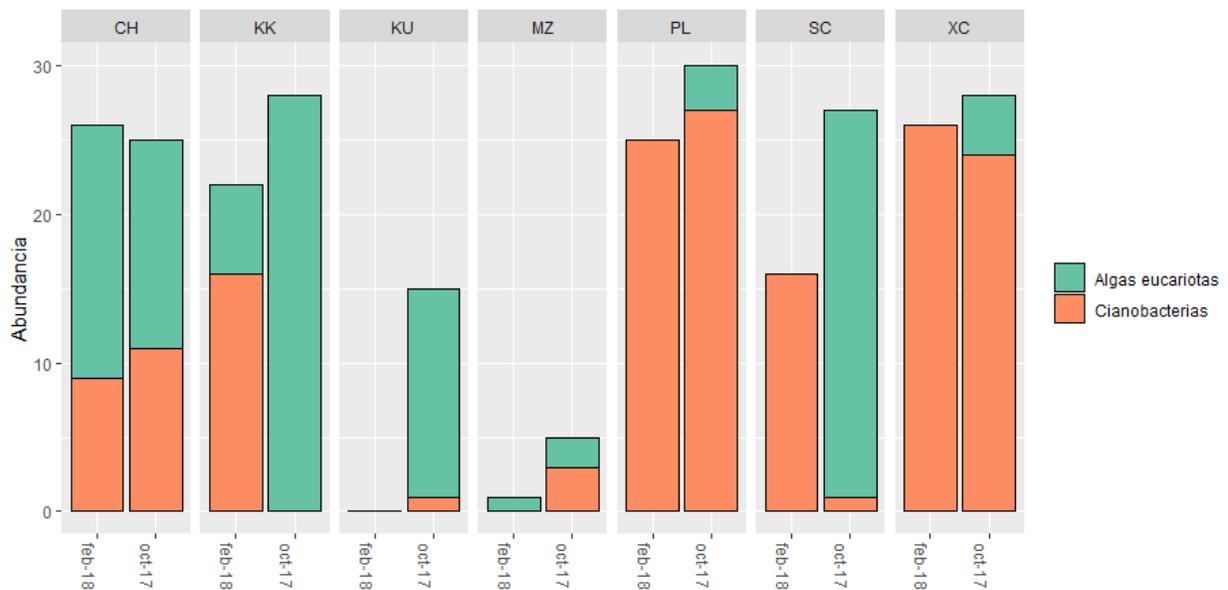


Figura 13. Composición de cianobacterias y algas eucariotas en los diferentes sitios de estudio y muestreos.

6.4.2 Estructura de la comunidad a nivel de orden

Los órdenes de las cianobacterias identificados en los sitios de estudio correspondieron a *Nostocales*, *Phormidesmiales* y *Synechococcales* (Figura 14). De las cuales, *Synechococcales* fue el más abundante (74.05 %) y fue identificado en cuatro de los cinco sitios de estudio (CH, XC, KK y PL) (Figura 14). El orden *Phormidesmiales* fue el menos abundante (5.06 %) y fue registrado en los sitios XC, KU y SC (Figura 14)

En el mes de octubre la comunidad de cianobacterias en el sitio CH estuvo dominada por *Synechococcales* con 11 ASV's. En el sitio XC se identificaron a los órdenes *Synechococcales* con 15 ASV's, a *Phormidesmiales* con 6 ASV's, a *Nostocales* con 2 ASV's y una ASV de *Oxyphotobacteria* desconocida (Figura 14). Respecto al sitio MZ en el mes de octubre se identificó 1 ASV correspondiente a *Nostocales* y 2 ASV's de *Oxyphotobacteria* desconocidas. En el sitio KU se identificó 1 ASV clasificada como *Phormidesmiales*, mientras que en el sitio KK en el mes de octubre no se identificó ninguna cianobacteria, debido a que las secuencias identificadas correspondieron a algas eucariotas (Figura 13). En el sitio SC se identificó a *Nostocales* con 1 ASV, por último, en el sitio PL para el muestreo de octubre se identificaron 26 ASV's de *Synechococcales* (Figura 14).

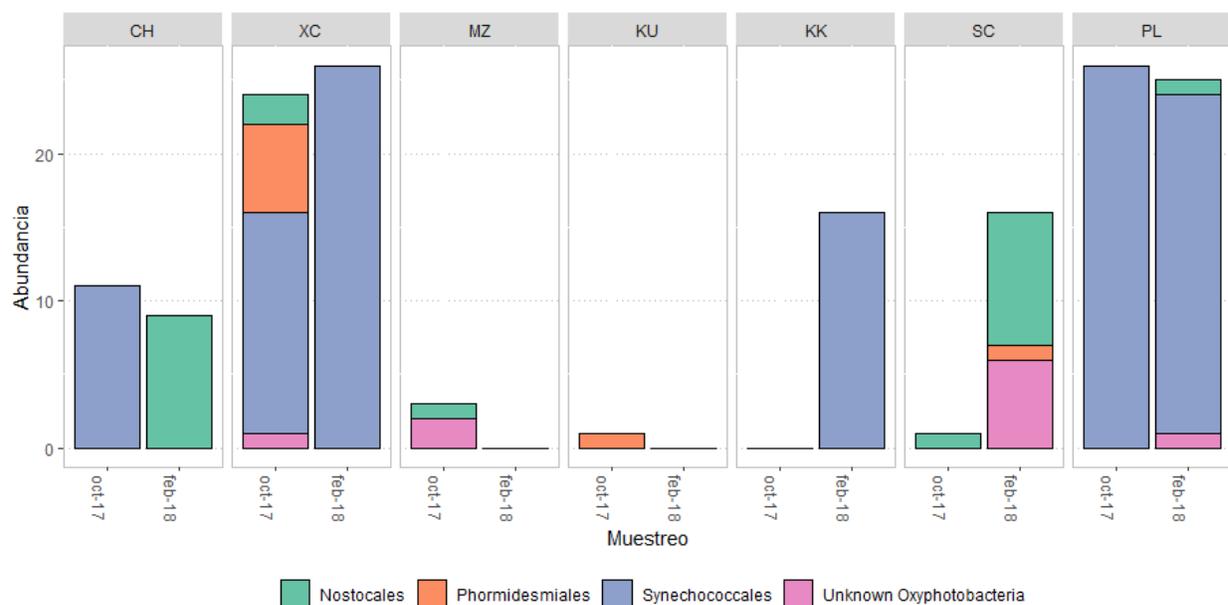


Figura 14. Abundancia relativa de los órdenes de cianobacterias identificados en cada sitio de estudio durante los meses de octubre y febrero.

En el mes de febrero en el sitio CH la comunidad estuvo dominada por el orden *Nostocales* con 9 ASV's identificadas, mientras que en el sitio XC dominó el orden *Synechococcales* con 26 ASV's identificadas (Figura 14). En los sitios MZ y KU para el mes de febrero no se identificaron secuencias de cianobacterias, debido a que las

secuencias identificadas correspondieron a phyla bacterianos (Figura 12) y de algas eucariotas (Figura 13). El sitio KK en el mes de febrero estuvo dominado por 16 ASV's identificadas para el orden de *Synechococcales*, mientras que en el sitio SC se identificaron 9 ASV's de *Nostocales*, también 6 ASV's clasificadas como *Oxyphotobacteria* desconocidas y una ASV de *Phormidesmiales* (Figura 14). En el sitio PL se identificaron 23 ASV's de *Synechococcales*, 1 ASV de *Nostocales* y 1 ASV de *Phormidesmiales*.

El sitio XC fue el sitio que presentó la mayor diversidad ya que en él estuvieron representados los órdenes *Nostocales*, *Phormidesmiales* y *Synechococcales* además de las *Oxyphotobacteria* desconocidas durante el mes de febrero; sin embargo, durante el mes de octubre se observó una dominancia absoluta de *Synechococcales* (Figura 14). En el sitio CH se observó un cambio en la composición de la comunidad de cianobacterias ya que el orden *Synechococcales* fue el dominante en octubre, mientras que en febrero se observó la dominancia del orden *Nostocales* (Figura 14).

6.4.3 Estructura de la comunidad a nivel de familia y especie

Con base en la clasificación a nivel de familia con base en la base de referencia de Silva LSU 132 se identificaron 8 familias, de las cuales fueron *Cyanobiaceae* (80.68 %) fue la más abundante, también se identificaron las familias *Nodosilineaceae* (5.51 %), *Microcystaceae* (4.13 %), *Nostocaceae* (3.44 %), *Phormidiaceae* (2.75 %), *Oscillatoriaceae* (1.37 %), *Nostocales* Incertae Sedis (1.37 %) y *Rubidibacteraceae* (0.68 %).

Durante el mes de octubre en el sitio CH se identificaron únicamente 11 ASV's de *Cyanobiaceae*, mientras que en el sitio XC se identificaron 15 ASV' de *Cyanobiaceae*, 6 ASV's de *Nodosilineaceae* y 2 ASV's de *Microcystaceae* (Figura 15). En el sitio MZ en el mismo mes de octubre solo se identificó una ASV de *Rubidibacteraceae* y para el sitio KU solo se identificó una ASV de *Nodosilineaceae*, en cambio para los sitios KK y SC no se identificó ninguna secuencia de cianobacterias en el mes de octubre (Figura 15), debido que las secuencias identificadas corresponden

únicamente a algas eucariotas (Figura 13). Por último, en el sitio PL en el mes de octubre se identificaron únicamente 26 ASV's de *Cyanobiaceae* (Figura 15).

En relación las muestras recolectadas en febrero, en el sitio CH se identificaron 3 familias de cianobacterias, con 4 ASV's a *Phormidiaceae*, con 2 ASV's a *Oscillatoriaceae* y con 2 ASV's a *Nostocales Incertae Sedis*. En el sitio XC la comunidad estuvo dominada con 26 ASV's de *Cyanobiaceae* (Figura 15). En el sitio MZ se identificó una ASV de *Rubidibacteraceae*, mientras que en el sitio KU no se identificó ninguna secuencia de cianobacterias, debido a que las secuencias identificadas correspondieron a phyla bacterianos diferentes a los de las cianobacterias (Figura 12). En el sitio KK en el mes de octubre se identificaron 16 ASV's correspondientes a *Cyanobiaceae*. En el sitio SC se identificaron 3 familias correspondientes a *Nostocaceae* con 3 ASV's, *Microcystaceae* con 2 ASV's y con una ASV a la familia *Nodosilineaceae*. Y en el sitio PL se identificaron 23 ASV's correspondientes a *Cyanobiaceae* y una ASV correspondiente a *Microcystaceae* (Figura 15).

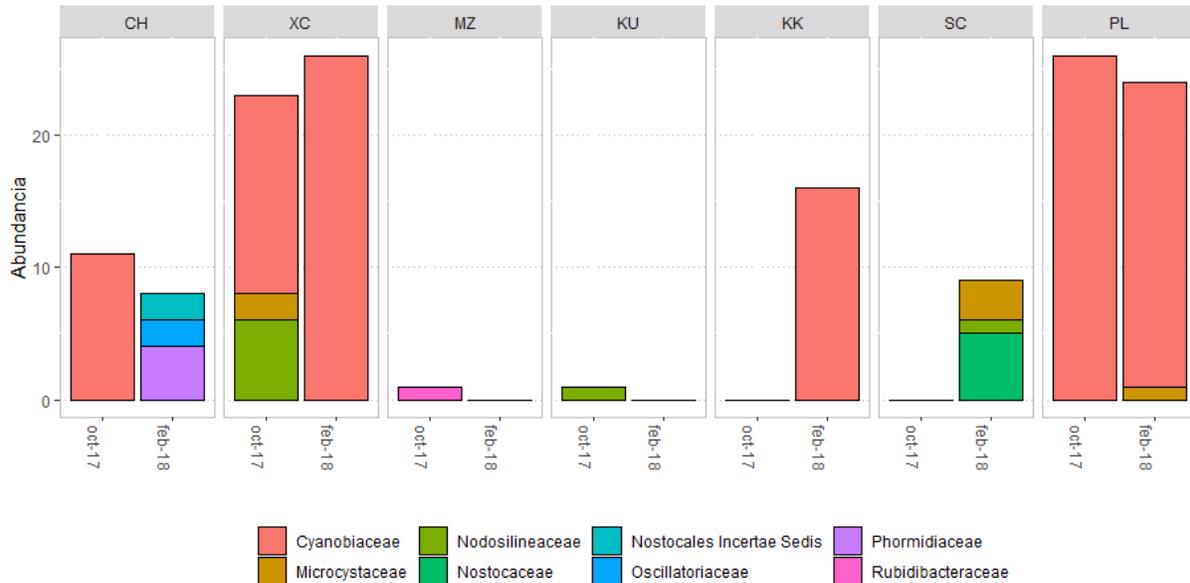


Figura 15. Abundancia relativa de las familias de cianobacterias identificados en cada sitio de estudio durante los meses de octubre y febrero.

La composición de la comunidad de cianobacterias fue variable entre los sitios de estudio y entre las fechas de muestreo (Figura 15). En el mes de octubre el sitio con el mayor número de familias identificadas fue XC (3 familias), a diferencia de los sitios MZ, PL, CH y KU en donde solo se identificó una familia (Figura 15). Dos familias estuvieron presentes en más de dos sitios en el mes de octubre, la familia *Cyanobiaceae* se identificó en los sitios PL, CH y XC, mientras que la familia *Nodosilineaceae* se identificó en XC y KU (Figura 15).

En cambio, en el mes de febrero los sitios con el mayor número de familias de cianobacterias identificadas fueron CH y SC (3 familias), a diferencia de los sitios KK y XC, en donde solo se registró una familia (Figura 15). La familia *Cyanobiaceae* se identificó en los sitios KK, PL y XC, mientras que la familia *Microcystaceae* se registró en los sitios SC y PL (Figura 15).

En el mes de octubre se identificaron 4 familias de cianobacterias, mientras que en el mes de febrero se identificaron 7 familias de cianobacterias (Figura 15). De octubre a febrero las familias *Cyanobiaceae*, *Nodosilineaceae* y *Microcystaceae* prevalecieron, sin embargo, la familia *Rubidibacteraceae* no se identificó en el mes de febrero. En cambio, las familias *Nostocaceae*, *Phormidiaceae*, *Oscillatoriaceae* y *Nostocales* Incertae Sedis solamente se identificaron el mes de febrero (Figura 15).

Tabla 12. Clasificación taxonómica a nivel de especie identificada en los sitios de estudio.

Especies	Abundancia Relativa	Sitio	Muestreo	# ASV's
<i>Synechococcus sp. CB0205</i>	73.02 %	KK	feb-18	15
		XC	oct-17	1
			feb-18	19
		CH	oct-17	11
<i>Synechococcus sp. GFB01</i>	6.35 %	PL	oct-17	2
		XC	oct-17	2
<i>Cyanobium gracile PCC 6307</i>	3.17 %	PL	feb-18	1
		XC	oct-17	1
<i>Cyanobium sp. NIES-981</i>	3.17 %	PL	oct-17	1
		XC	feb-18	1
<i>Planktothricoides sp. SR001</i>	3.17 %	CH	feb-18	2
<i>Roseofilum reptotaenium AO1-A</i>	3.17 %	CH	feb-18	2
<i>Synechococcus sp. RCC307</i>	1.59 %	XC	oct-17	1
<i>Cyanobium sp. PCC 7001</i>	1.59 %	PL	feb-18	1

Con base en la clasificación taxonómica realizada con el clasificador Naïve Bayes en qiime2 y la base de datos creada a partir de la base de referencia Silva LSU 132, de las 224 secuencias identificadas para cianobacterias 63 ASV' s se clasificaron a nivel de especie y se identificaron 8 especies de cianobacterias (Tabla 12), de las cuales *Synechococcus sp. CB0205* fue la más abundante (73.02 %), mientras que las especies *Synechococcus sp. RCC307* (1.59 %) y *Cyanobium sp. PCC 7001* (1.59 %) fueron las menos abundantes (Tabla 12). El sitio XC en octubre fue en donde se identificó el mayor número de especies, mientras que el sitio CH en octubre y KK en febrero solamente registraron una especie (Tabla 12).

6.4.4 Estado trófico de los ambientes acuáticos y su relación con la composición de la comunidad de cianobacterias

La comunidad de cianobacterias a nivel de familia presente en los diferentes tipos de ambientes acuáticos muestreados se correlaciono con el nivel del estado trófico (Figura 16).

Respecto a los ambientes mesotróficos, en los cenotes abiertos se identificó al género *Cyanobium* PCC-6307 como el más abundante con 35 ASV's, seguido de un género desconocido de la familia *Nodosilineaceae* del cual se identificaron 6 ASV's, también se identificó a los géneros *Planktothrix* NIVA-CYA 15 (3ASV's), a un género desconocido de la familia *Cyanobiaceae* (3 ASV's), a *Synechococcus* sp. RCC307 (2 ASV's), a *Planktothricoides* SR001 (2 ASV's), a *Roseofilum* A01-a (2 ASV's), y con una ASV respectivamente a los géneros *Synechococcus* CC9902, *Cyanothece* ATCC 51142 (UCYN-C) y *Microcystis* PCC-7914. En el caso del cenote tipo aguada mesotrófico únicamente se identificó una ASV de un género desconocido de la familia *Nodosilineaceae* (Figura 16)

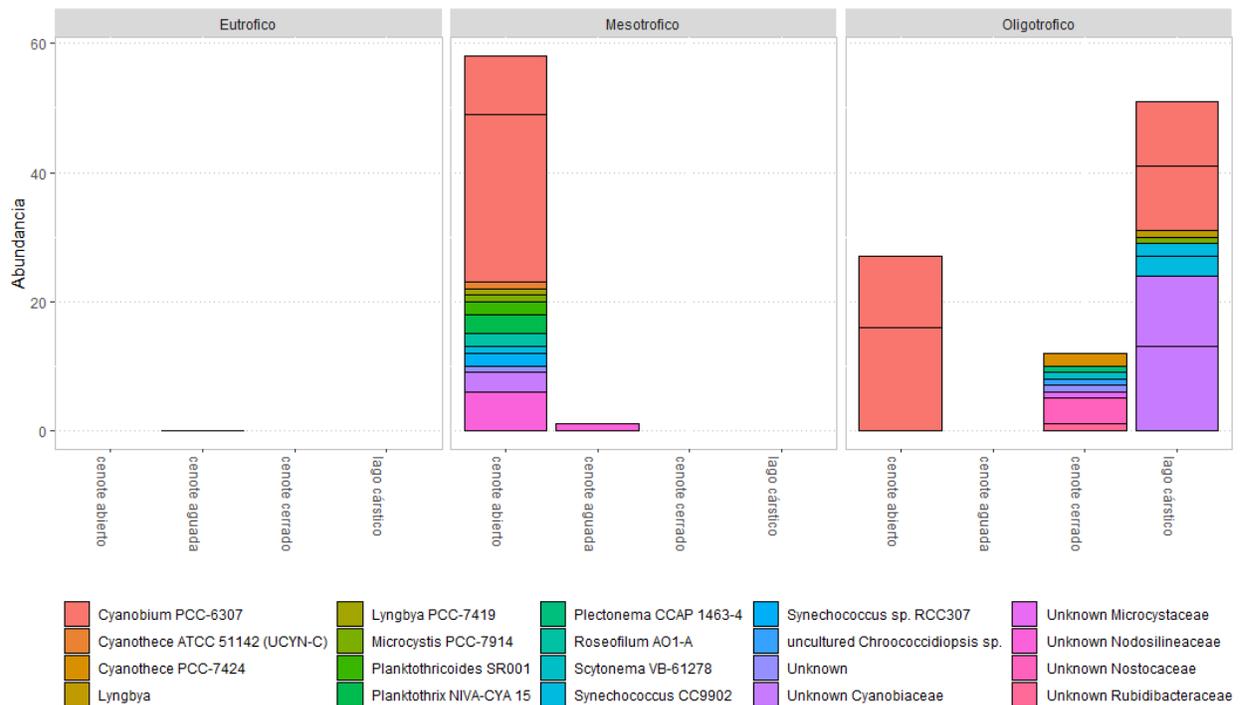


Figura 16. Composición de los géneros de cianobacterias identificados en las diferentes formas de los cenotes y su relación con el estado trófico.

En el caso de los sitios de estudio clasificados como ambientes acuáticos oligotróficos el género *Cyanobium* PCC-6307 al igual que en los ambientes mesotróficos fue el más abundante (Figura 16). En los cenotes de tipo abierto se

identificaron 47 ASV's de *Cyanobium* PCC-6307. En los cenotes cerrados oligotróficos un género desconocido de la familia *Nostocaceae* fue la que se registró como más abundante con 4 ASV's, seguido de 2 ASV's identificadas como *Cyanothece* PCC-7424 y una ASV tanto como de *Plectonema* CCAP 1463-4, *Scytonema* VB-61278, así como de un género desconocido de *Microcystaceae*, un género no cultivado correspondiente a *Chroococidiopsis* sp., un género desconocido del orden *Nostocales* y un género desconocido de la familia *Rubidibacteraceae* (Figura 16).

Mientras que en el lago cárstico se identificó a un género desconocido de la familia *Cyanobiaceae* con una abundancia de 24 ASV's, seguido de *Cyanobium* PCC-6307 con 20 ASV's, *Synechococcus* CC9902 se identificó con 5 ASV's y con una ASV respectivamente se identificó a *Lyngbya confervoides* BDU141951 y a un género de *Microcystis* PCC-7914 (Figura 16)

Los ambientes oligotróficos presentaron una mayor riqueza de cianobacterias con 90 ASV's identificadas que los ambientes mesotróficos en donde solo se identificaron 59 ASV's. La diversidad de géneros identificados tanto en los ambientes mesotróficos como oligotróficos fue similar con 12 géneros identificados en los ambientes mesotróficos y 13 géneros identificados en los oligotróficos (Figura 17).

6.4.5 Composición de la comunidad de cianobacterias en relación al ambiente y el mes de muestreo

En la figura 17 se muestran las diferencias en la composición de la comunidad de cianobacterias relacionadas al mes de muestreo y el tipo de ambiente muestreado. Los resultados indicaron que en los ambientes que los cenotes abiertos y el lago cárstico se presenta la mayor abundancia de cianobacterias.

En el caso de los cenotes de tipo abierto *Cyanobium* PCC-6307 el género más abundante durante octubre registró 20 ASV's a diferencia de febrero donde se registraron 42 ASV's, a diferencia de este género no se registró la presencia de los mismos géneros durante octubre y febrero, en el caso del primero se identificaron 6

ASV's de un género desconocido de la familia *Nodosilineaceae*, 3 ASV's de un género desconocido de la familia *Cyanobiaceae*, 2 ASV's de *Synechococcus* sp. RCC307 y una ASV de *Synechococcus* CC9902, *Cyanothece* ATCC 51142 (UCYN-C) y *Microcystis* PCC-7914. Durante el muestreo de febrero se identificaron 3 ASV's de *Planktothrix* NIVA-CYA 15, 2 ASV's de *Planktothricoides* SR001 y de *Roseofilum* AO1-A, y una ASV de *Lyngbya* PCC-7419 y de un género desconocido del orden *Nostocales*.

Con respecto al cenote de tipo aguada solo se registró una secuencia en octubre de un género de la familia *Nodosilineaceae* sin registrarse cianobacterias en febrero. En relación a los cenotes de tipo cerrado, entre los dos meses de muestreo no se presentan los mismos géneros en ambos, mientras que en octubre se registraron dos géneros desconocidos uno de la familia *Rubidibacteraceae* y el otro del orden *Nostocales* con una ASV, en febrero se identificaron 4 ASV's de un género desconocido de la familia *Nostocaceae*, 2 ASV's de *Cyanothece* PCC-7424 y una ASV de *Plectonema* CCAP 1463-4, *Scytonema* VB-61278, un género desconocido de la familia *Microcystaceae* y un *Chroococidiopsis* sp. no cultivado.

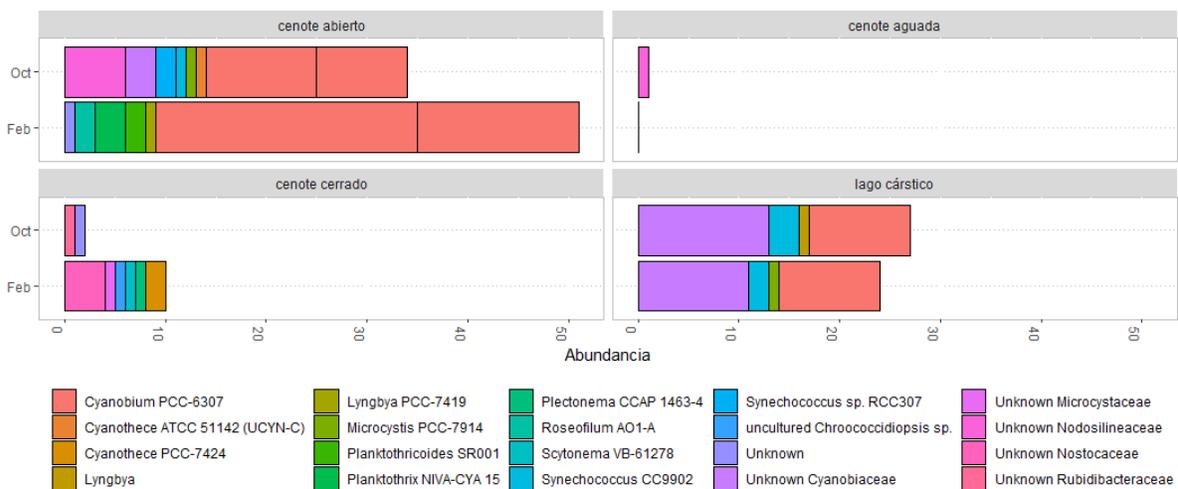
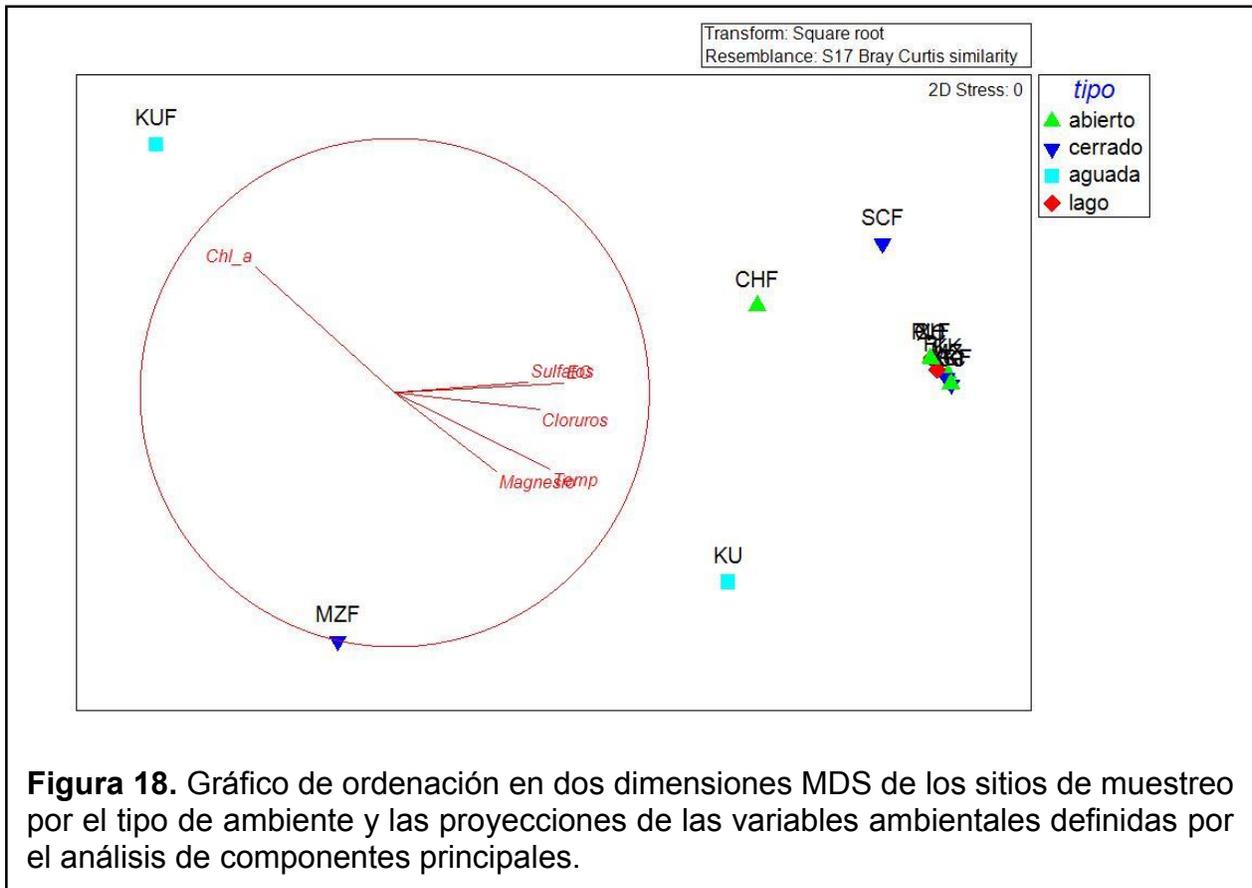


Figura 17. Composición de los géneros de cianobacterias identificadas en los dos meses de muestreo (octubre y febrero) y la relación con el tipo de cuerpo de agua.

En el caso del lago cárstico un género desconocido de la familia *Cyanobiaceae* fue el más abundante, en octubre se registraron 13 ASV's mientras que en febrero 11 ASV's, seguido con 10 ASV's *Cyanobium* PCC-6307 sin diferencias entre los meses muestreados y *Synechococcus* CC9902 con 3 ASV's en octubre y 2 ASV's en febrero; en octubre se identificó a *Lyngbya confervoides* BDU141951 mientras que en febrero a *Microcystis* PCC-7914, ambas con una ASV.

6.4.6 *Análisis comparativo de las variables ambientales y la comunidad de cianobacterias*

El análisis de componentes principales de las variables ambientales en los sitios de estudio mostró que las dos primeras componentes principales explican el 59 % de la variabilidad entre los sitios se realizó sin los valores de Sólidos Disueltos Totales, que se correlacionaban con la conductividad eléctrica, los valores de clorofila b que se correlacionaban la clorofila a, los valores de sodio que se correlacionaban con los de cloruros y sulfatos; se obtuvo que las dos primeras componentes principales explican conjuntamente el 59 % de la variación. Con estos resultados se realizó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) en el cual se agregaron como factores el tipo de cenote y se agregaron los vectores del análisis de componentes principales antes descrito. Los valores de estrés del análisis MDS resultaron en cero y la representación gráfica muestra como el vector de la clorofila a tiene una tendencia solo hacia el sitio KU en el muestreo de febrero.



Mediante la prueba de mantel se correlaciono una matriz de distancia geográfica contra la matriz de similitud Bray- Curtis de las ASV's para cada sitio mediante el método de correlación de Spearman, el cual obtuvo como resultados una baja correlación ($r = -0.1314$), sin significancia ($p = 0.888$). Los análisis realizados no muestran que no existe una correlación determinante que explique las diferencias entre los sitios y el valor del estrés nos sugiere que se necesitan más datos para poder realizar las correlaciones necesarias entre las variables ambientales y la composición de la comunidad en los sitios de estudio.

7 Discusión

7.1 Características de los ambientes acuáticos

La península de Yucatán presenta ambientes acuáticos diversos cuyas características limnológicas se ven influenciadas por factores regionales como las diferencias en la precipitación (Pérez *et al.*, 2011), y por sus características geológicas (Bauer-Gottwein *et al.*, 2011). Los parámetros fisicoquímicos (pH, Temperatura, Conductividad eléctrica y Sólidos Disueltos Totales) registrados en el presente estudio se encuentran entre el rango de concentración en comparación con reportes previos, tanto para cenotes (Schmitter-Soto *et al.*, 2002), como para lagos y lagunas kársticas (Pérez *et al.*, 2011). Sin embargo, el pH en el sitio YP3 fue de 5.8 el oxígeno disuelto fue de 0.77 mgL^{-1} , valores por debajo de los anteriormente reportados para la PY. Los valores en este sitio pueden estar influenciados por una posible entrada de agua proveniente del suelo enriquecido con CO_2 proveniente de la oxidación de la materia orgánica, el cual al entrar en contacto con el agua disminuye la concentración de oxígeno y aumenta la acidez (Schmitter-Soto *et al.*, 2002).

La concentración de los componentes iónicos obtenidos de los sitios del presente estudio son similares a las caracterizadas para diferentes cenotes en la península de Yucatán (Pérez *et al.*, 2011) presentando dominancia en el calcio y el sodio. Con base a la concentración de sodio y cloruros los cuerpos de agua pueden clasificarse como agua dulce, salada o marina (Escolero *et al.*, 2005), en los sitios bajo estudio la composición iónica permite categorizarlos como cuerpos de agua dulce, a excepción del sitio KK el cual es salobre (Escolero *et al.*, 2005).

Con respecto a las concentraciones de nitratos, nitritos y amonio reportados en el presente estudio, los valores obtenidos se encuentran en el rango de los valores reportados anteriormente por Schmitter-Soto (2012), las concentraciones de nitratos en los sitios no excedieron más de los 43.47 mgL^{-1} , la cual es una concentración menor en

comparación con el valor más alto (224.63 mgL⁻¹) reportado por Pacheco (2004) en cenotes de Yucatán.

Tanto el nitrógeno como el fósforo son los elementos con mayor influencia en los recursos necesarios para los productores primarios, aunados a la luz, estos recursos impactan en la biomasa presente en los cuerpos de agua, tanto en su diversidad como en su estructura (Pinto y Litchman, 2010). La relación N/P en los sitios del presente estudio muestra que en más de la mitad existe una limitación por fosforo (Tabla 3), estos resultados son consistentes con las condiciones que se presentan en otros ambientes acuáticos de agua dulce y en especial en los cenotes de la península de Yucatán (Schmitter-Soto *et al.*, 2002).

7.2 Diversidad bacteriana en ambientes acuáticos de la Península de Yucatán utilizando el gen 16S

La secuenciación masiva ha permitido la identificación de las especies microbianas que aún no pueden ser cultivadas en el laboratorio y ha permitido la exploración de la diversidad de bacterias en lugares con alto interés científico (Rojas-Herrera *et al.*, 2011). Se han realizado diversos estudios para conocer la diversidad de microorganismos en diferentes ambientes acuáticos, la mayoría de éstos se han enfocado en el océano (Salazar y Sunagawa, 2017), sin embargo, últimamente se ha mostrado gran interés por el estudio de los ambientes de agua dulce, como lagos y ríos (Logue *et al.*, 2008). A la fecha existen pocos estudios para determinar la diversidad de los microorganismos acuáticos realizados en acuíferos presentes en sistemas cársticos del mundo (Griebler y Lueders, 2009) y de México (Sahl *et al.*, 2011). El presente estudio es el primero que se enfoca en estudiar la diversidad de la comunidad de microorganismos en el sistema cárstico de la península de Yucatán mediante herramientas moleculares.

Con base en los resultados obtenidos a partir del análisis metagenómico del gen 16S, los phyla más abundantes en los cenotes bajo estudio fueron Proteobacteria, Bacteriodetes, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Cyanobacteria y Actinobacteria, estos

registros concuerdan con los principales grupos reportados en comunidades bacterianas presentes en agua dulce (Logue *et al.*, 2008). De entre estos grupos, en las muestras de agua subterránea se han reportado los phyla Proteobacteria, Bacteriodetes, Actinobacteria y Firmicutes como característicos de agua subterránea (Griebler y Lueders, 2009). En el presente estudio los tres primeros taxones fueron encontrados como los grupos más abundantes en los cenotes, sin embargo, el grupo de los Firmicutes se encontró con una abundancia menor al 1 %.

El phylum *Cloacimonetes* que únicamente se presentó en el sitio YP5, se clasificó hasta el nivel de orden (*Cloacimonadales*), este phylum candidato *Cloacimonetes* se ha identificado previamente a partir de digestores anaerobios, plantas de tratamiento de agua y muestras de agua y sedimento del Lago Mahoney, en la Columbia Británica, Canadá (Hamilton *et al.*, 2016).

En el sitio YP2 se registraron solamente los phyla *Zixibacteria*, *Rokubacteria*, *Nitrospirae*, y los candidatos WS2 y WS4. En trabajos previos, el phyla *Zixibacteria* se ha reportado en otros sistemas de agua subterránea y en estuarios (Baker *et al.*, 2015), es metabólicamente versátil (Castelle *et al.*, 2013). Mientras que *Rokubacteria* es un filo candidato heterótrofo acetoclástico (convierte el ácido acético en metano) y utiliza la oxidación de ácidos grasos para obtener energía, los análisis de su genoma han encontrado que puede ser parte de los ciclos del azufre y del nitrógeno y se ha reportado en el acuífero adyacente al Rio Colorado, USA (Hug *et al.*, 2016). El phyla *Nitrospirae* comprende a bacterias aerobias oxidantes de nitritos, con alta diversidad y presencia en ecosistemas naturales, se ha reportado en suelos, ecosistemas geotérmicos y subsuelos, así como en otros sistemas cársticos (Pronk *et al.*, 2009; Estrada-Medina *et al.*, 2016; Savio *et al.*, 2019). En sistemas acuáticos dentro de México se ha reportado en microbialitas, incluidas las presentes en la Laguna de Bacalar y en Sian Ka'an (Couradeau *et al.*, 2011; Centeno *et al.*, 2012). Los filotipos WS2 y WS4 pertenecen a bacterias no cultivadas, fueron descritos por primera vez en el acuífero de la base aérea de Wurtsmith, Michigan (Dojka *et al.*, 1998); el cual está

contaminado por hidrocarburos y solventes clorados, también se ha reportado en ríos (Portillo *et al.*, 2012) y sedimento de cuevas (De Mandal *et al.*, 2017).

Los phyla identificados únicamente en YP3 fueron *Deinococcus-Thermus*, *Tenericutes*, *Latescibacteria*, *Calditrichaeota* y los candidatos WS1 y FBP. *Deinococcus-Thermus* es un filo de bacterias que se ha encontrado en aguas termales con temperaturas de más de 50 °C (Kaur *et al.*, 2018), en cuencas subtropicales de China (Hu *et al.*, 2013), en ríos urbanos y ambientes naturales (Ibekwe *et al.*, 2016), la igual que en la Antártida (Obbels *et al.*, 2016) y en México se encontró en microbialitas del lago de Alchichica (Couradeau *et al.*, 2011); las dos ASV's que se registraron se clasificaron hasta el nivel de especie como *Deinococcus wulumuqiensis* R12, esta especie en particular fue aislada de los suelos contaminados por radiación en el noroeste de China, es una especie Gram positiva, resistente a la radiación UV debido a la biosíntesis de carotenoides (Xu *et al.*, 2013). El phylum *Tenericutes* solo contienen a la clase *Mollicutes*, las cuales están compuestas por bacterias sin pared celular y genomas reducidos (Citti *et al.*, 2018), en este estudio las dos ASV's se clasificaron dentro del orden *Mollicutes* RF39 el cual se ha reportado en el trato intestinal de humanos y ratones (Jackson *et al.*, 2016; Camps-Bossacoma *et al.*, 2017). El phylum *Latescibacteria* comprende a organismos quimiorganoheterótrofos anaerobios, se han identificado en la termoclina y el hipolimnion de lagos estratificados, con un posible conexión de la degradación del detritus algal bajo condiciones anaeróbicas (Morrison *et al.*, 2017), también se han identificado en otros ambiente anóxicos y sedimentos marinos (Baker *et al.*, 2015). Los miembros pertenecientes al phylum *Calditrichaeota* han sido encontrados en los respiraderos hidrotermales del fondo marino (Miroshnichenko *et al.*, 2003), este filo conformado por organismos anaerobios, quimiolitotróficos y termófilos (Marshall *et al.*, 2017), se ha reportado en sedimentos de cuevas (De Mandal *et al.*, 2017) y en ríos (Portillo *et al.*, 2012). Respecto al filo WS1 pertenece a bacterias no cultivadas, fue descrito junto con WS2 y WS4 por primera vez en el acuífero de la base aérea de Wurtsmith, Michigan (Dojka *et al.*, 1998); y también

se ha reportado en ríos (Portillo *et al.*, 2012). Por último, el phylum FBP se ha reportado en ambientes extremos como en la Antártida (Obbels *et al.*, 2016; Tahon *et al.*, 2018)

El phylum de Bacteroidetes es parte de la microbiota de los animales, en especial del tracto gastrointestinal y pueden ser patógenos, se han encontrado en suelos, océanos y agua dulce; también, pueden degradar la materia orgánica de alto peso molecular (Thomas *et al.*, 2011). En un estudio de aguas recreacionales, *Bacteroidia* se encontró correlacionada con *Clostridia* y *E. coli* (Noble, 2016) en una entrada de agua que probablemente estaba contaminada por materia fecal. El género *Bacteroides* solo se encontró en YP4, aunque la clase *Bacteroidia* fue la más representada (99 % de las secuencias) de este en este phylum.

La mayoría de los miembros del phylum Verrucomicrobia son aerobios y quimiorganoheterótrofos, éste es un phylum abundante en la naturaleza y se ha encontrado en diversos ecosistemas, como los lagos de agua dulce, suelos, agua residual, el intestino humano, entre muchos más. (Camp *et al.*, 2009). El phylum *Planctomycetes* se considera ubicuo de suelos y también está presente en agua dulce, océanos y ambientes extremos; los organismos pertenecientes a este grupo oxidan el amonio a dinitrógeno usando al nitrito como aceptor de electrones, acompañado de la reducción del dióxido de carbono, por lo que son importante para el ciclo del nitrógeno y para la remediación de aguas residuales ricas en amonio (Fuerst y Sagulenko, 2011).

7.3 Cianobacterias en el acuífero cárstico de la Península de Yucatán 16S

A partir del análisis metagenómico del gen 16S, se obtuvieron las secuencias correspondientes al phylum *Cyanobacteria*, a partir de las cuales se identificaron las clases *Oxyphotobacteria*, que fueron las más abundantes, este grupo corresponde a las cianobacterias con la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, también se identificaron las clases *Melainabacteria* y *Sericytochromatia*, los cuales son grupos no fotosintéticos quimio autótrofos, se han reportado que habitan el tracto gastrointestinal, el agua subterránea y se han encontrado en plantas de tratamiento de agua (Soo *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2017). Dentro de la clase *Melianabacteria* tanto *Caenarcaniphilales*

como *Gastranaerophilales*, los dos órdenes que lograron ser clasificados, son los únicos miembros de este grupo adaptados a la respiración anaerobia (Fischer *et al.*, 2017).

El orden de cianobacterias más abundante fue *Synechococcales*, de las cuales el género de cianobacterias verdes *Prochlorothrix* PCC-9006 conocido como *Prochlorothrix hollandica* (Wilmotte y Herdman, 2015) solamente se registró en el sitio YP4, este género se ha reportado en lagos eutróficos (Pinevich *et al.*, 2012); el otro género identificado fue la picocianobacteria *Cyanobium* PCC-6307 conocido como *Cyanobium gracille*, el cual se registró en los sitios CH, YP2 y YP3, este género comprende cianobacterias autótrofas, con amplia distribución y aporte significativo en la biomasa al ambiente (Callieri y Stockner, 2002).

El orden *Nostocales* fue el segundo más abundante, de las cuales se identificaron *Roseofilum* AO1-A, el cual es un género que se identificó en la enfermedad de la banda negra (BBD, por sus siglas en inglés) de los corales en el Caribe y ahora se conoce como *Roseofilum reptotaenium* (Casamatta *et al.*, 2012), se ha reportado que esta cianobacteria tiene la capacidad de producir microcistinas (Richardson *et al.*, 2014) y solo se presentó en el sitio CH; otro de los géneros identificados del phylum *Nostocales* fue *Ewamiania* TS0513, el cual se registró exclusivamente en YP3, este género fue encontrado pozas termales de Australia y se ha reconocido con el nombre de *Ewamiania thermalis* (McGregor y Sendall, 2017).

Otro de los géneros identificados fue la comúnmente llamada Spirulina, *Arthrospira* PCC-7345 o *Arthrospira platensis*, la cual es una cianobacteria no fijadora de nitrógeno y con valor nutritivo (Furmaniak *et al.*, 2017), solo se registró en CH. Dentro del orden de *Nostocales*, también se identificó a *Nostoc* PCC-8976, este género es productor de metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos para humanos y otros animales (Nowruzi *et al.*, 2013), las secuencias pertenecientes a este grupo se registraron únicamente en YP4, junto con el género *Prochlorothrix hollandica* anteriormente descrito de igual forma se presentaron únicamente en este sitio los géneros *Cylindrospermum* NQAIF308, *Phormidium* IAM M-71, *Pseudanabaena* PCC-

7429 y *Leptolyngbya* ANT.L52.2 de los cuales algunas especies pueden llegar a formar florecimientos algales y producir toxinas, la presencia de estas especies sugiere que este sitio está altamente impactado por alguna actividad antropogénica.

7.4 *Cianobacterias en el acuífero cárstico de la Península de Yucatán identificadas con el gen 23S*

En los sitios KU y MZ se registró el menor número de secuencias observadas debido a que se identificaron las secuencias pertenecientes a cloroplastos de plantas, lo cual es consistente con el diseño de los cebadores (Presting, 2006), en los cuales la región flanqueada no solo es conservada en algas, también lo es en plantas terrestres.

Los phylum *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* y *Fibrobacteres* encontrados en este estudio corresponden a los phylum encontrados como característicos en los ambientes de agua dulce (Logue *et al.*, 2008), los tres primeros son los más comunes y se encuentran en abundancias elevadas, mientras que el último se ha observado en menores proporciones. *Fibrobacteres* es un phylum del cual solo se ha reconocido al género *Fibrobacter*, con dos especies, ambas son degradadores de la celulosa de plantas en el intestino de herbívoros (Rahman *et al.*, 2016). El sitio KU recopiló la mayor cantidad de secuencias identificadas para bacterias y la menor o nula, en el muestreo de febrero, para cianobacterias.

Dentro del orden de *Synechococcales*, el cual fue el más abundante, *Cyanobium* PCC-6307 solo se presentó en cuerpos de agua de tipo abierto, los cuales tienen la característica de que la superficie del agua esté en contacto con la luz, este género no se presentó en cenotes cerrados, lo cual concuerda con la capacidad fotoautótrofa (Larsson *et al.*, 2014) de este tipo de cianobacterias. El orden *Nostocales* se presentó principalmente en los sitios de tipo abierto, sin embargo, también se encontró en un cenote de tipo cerrado, este grupo de cianobacterias poseen la capacidad de desarrollar heterocistos para la fijación de nitrógeno (Reynolds, 2006). Especies de *Synechococcales* y *Nostocales* se han reportado en otros estudios en la península de

Yucatán (Schmitter-Soto *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2002; Troccoli-Ghinaglia *et al.*, 2010; Tavera *et al.*, 2013).

Los estudios que enfocados en cianobacterias en la península de Yucatán son escasos, Tavera y colaboradores en 2013 realizaron un listado de las especies encontradas en diferentes tipos de agua, encontraron que la mayoría de las especies pertenecían a las familias *Chroococcales* y *Oscillatoriales*, las cuales no se reportan en este estudio, cabe destacar que ellos utilizaron técnicas morfológicas para la caracterización de la comunidad, el cual basa su identificación en el Código de Nomenclatura Botánica para la identificación de las especies, a diferencia del Código Internacional de Sistemática Procariota que utiliza la base de datos Silva, utilizada en este estudio.

Otros estudios en donde se reportan cianobacterias en la península de Yucatán, también utilizan la identificación morfológica de las especies y el enfoque de estos estudios es caracterizar la comunidad fitoplanctónica (Herrera-Silveira *et al.*, 1999; Lopez-Adrián y Barrientos-Medina, 2005; Troccoli-Ghinaglia *et al.*, 2010; Nava-Ruiz y Valadez, 2012). Estos estudios han reportado a las cianobacterias como parte importante en la composición fitoplanctónica de los sistemas acuáticos en la península y algunos de ellos se han enfocado en las variaciones a influenciadas por nutrientes (Troccoli-Ghinaglia *et al.*, 2010) y en diferentes ambientes (Sánchez *et al.*, 2002).

La composición de la comunidad de las cianobacterias en el presente mostró una amplia variación tanto en los sitios de estudio, como en los meses de muestreo, sin encontrar un variable ambiental que explicara totalmente dicha variación. Algunos de los patrones encontrados en este estudio están relacionados con el tipo de ambiente, descrito con anterioridad, otro de los patrones que se encontraron es que en los sitios donde la limitación es por fósforo, *Nostocales* estuvo presente a diferencia de los que estuvieron limitados por nitrógeno, *Synechococcales* se presentó con mayor ocurrencia.

En el presente estudio caracterizo la comunidad de cianobacterias mediante dos técnicas metagenómicas, la secuenciación masiva del gen 16S y la construcción de la

librería de clonas con el gen 23S, ambos genes han sido utilizados para la identificación de cianobacterias en muestras ambientales (Sherwood *et al.*, 2008; Affe *et al.*, 2018), en este estudio se comprobó que ambos marcadores moleculares son eficaces para la colección de cianobacterias en cuerpos de agua de la península de Yucatán, sin embargo, la aplicación del gen 16S mostro una ventaja al amplificar cianobacterias no fotosintéticas las cuales no se identificaron mediante el marcador del gen 23S; otra de las diferencias fue la profundidad para la clasificación de las especies, con la base de datos del gen 16S se lograron clasificar un mayor porcentaje de secuencias a niveles taxonómicos más profundos que con la base de datos del gen 23S, esto debido a que la utilización del gen 16S ha sido ampliamente utilizado para el estudio de comunidades microbianas, como el proyecto Earth Microbiome Project (EMP) (Thompson *et al.*, 2017) con lo cual los avances en la identificación y en los métodos que involucran este marcador son más amplios. La baja cantidad de secuencias obtenidas para el marcador del gen 23S tienen que ver más con el método obtención de secuencias, un estudio que utilizo el mismo set de cebadores que se utilizó en este estudio, pero mediante la secuenciación de Illumina obtuvo un promedio por sitios de 101, 082 secuencias (Yang *et al.*, 2018) e identifico una amplia cantidad de microorganismos bentónicos, lo cual demuestra la amplia capacidad de la utilización de este marcador así como de la secuenciación masiva.

8 Conclusión

En el presente estudio, se analizaron 11 formas carsticas a lo ancho del norte de la Península de Yucatán utilizando dos diferentes técnicas metagenómicas para la determinación de la diversidad, mediante la secuenciación masiva de amplicones y la construcción de una biblioteca de clonas de los genes ribosomales se identificó la comunidad de microorganismos que habitan diferentes cuerpos de agua de un sistema cárstico. Este es el primer estudio que analiza la diversidad de microorganismos en diferentes cuerpos de agua abarcando un amplio gradiente longitudinal en la Península de Yucatán, haciendo uso de dos marcadores moleculares, el gen 16S ARNr para el

análisis de la comunidad de bacterias y el gen 23S ARNr para el análisis específico de cianobacterias, con este último también se estudió las diferencias temporales de la diversidad y su relación con características fisicoquímicas de los cuerpos de agua.

La determinación de las variantes de secuencias, resultó ser eficiente para la caracterización de las comunidades de bacterias en los cenotes, en comparación con Moore (2014) que clasificó las comunidades de bacterias en 3 cenotes y un pozo mediante la secuenciación de la región IV gen 16S ARNr con los mismos cebadores (515F- 806R), a diferentes profundidades y diferentes temporadas, la construcción de OTU's (1502) y la clasificación taxonómica a nivel de género (35 %) basado en la base de datos Greengenes resulto ser menor que la construcción de ASV's (1646) y la clasificación a nivel de género (74 %) utilizado en este estudio mediante el clasificador Naive-Bayes y la base de datos Silva.

La región V4 del gen 16S ARNr se ha elegido como blanco para la identificación de toda la comunidad de bacterias y arqueas en muestras ambientales y se sugiere el uso de este marcador para el conocimiento de la comunidad de bacterias en el acuífero de la península, sin embargo, si se quiere conocer la diversidad y la composición de la comunidad del fitoplancton se recomienda el uso del gen 23S para cumplir tal objetivo.

Este estudio es el primero en recolectar la diversidad de microorganismos en una amplia variedad de ambientes y los resultados obtenidos muestran la gran diversidad en los ambientes acuáticos de la península, lo cual debe de ser un motor para el estudio de la inmensa comunidad de microorganismo que habitan en este tipo de ambientes particulares, para su conservación, monitoreo y posibles aplicaciones.

9 Referencias bibliográficas

Affe, H., Rigonato, J., Nunes, J., & Menezes, M. (2018). Metagenomic Analysis of Cyanobacteria in an Oligotrophic Tropical Estuary, South Atlantic. *Frontiers in microbiology*, 9, 1393. doi:10.3389/fmicb.2018.01393.

Alcocer, J. *et al.* (1998) 'Hydrochemistry of waters from five cenotes and evaluation of their suitability for drinking-water supplies, northeastern Yucatan, Mexico', *Hydrogeology Journal*, 6(2), pp. 293–301. doi: 10.1007/s100400050152.

Almeida, A. *et al.* (2018) 'Benchmarking taxonomic assignments based on 16S rRNA gene profiling of the microbiota from commonly sampled environments', *GigaScience*, 7(5), pp. 1–10. doi: 10.1093/gigascience/giy054.

Amir, A. *et al.* (2017) 'Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns', *mSystems*, 2(2), pp. 1–7. doi: 10.1128/msystems.00191-16.

Aryal, S., Karki, G. and Pandey, S. (2015) 'Microbial Diversity in Freshwater and Marine Environment', *Nepal Journal of Biotechnology*, 3(1), pp. 68–70. doi: 10.3126/njb.v3i1.14236.

Baker, B. J. *et al.* (2015) 'Genomic resolution of linkages in carbon, nitrogen, and sulfur cycling among widespread estuary sediment bacteria', *Microbiome*. ???, 3(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s40168-015-0077-6.

Bauer-Gottwein, P., Gondwe, Bibi R.N., *et al.* (2011) 'Review: The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico', *Hydrogeology Journal*, 19(3), pp. 507–524. doi: 10.1007/s10040-010-0699-5.

Bellinger, E. G. and Sigee, D. C. (2014) *Freshwater algae. Identification and Use as Bioindicators, Systematics and Biodiversity*.

Bokulich, N. A. *et al.* (2018) 'Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2 's q2-feature-classifier plugin'. *Microbiome*, pp. 1–17.

Boylen, E. *et al.* (2018) 'QIIME 2: Reproducible , interactive , scalable , and extensible microbiome data science', *PeerJ Preprints*. doi: 10.7287/peerj.preprints.27295.

Braga, E. S. *et al.* (2000) 'Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System - Brazil', *Marine Pollution Bulletin*, 40(2), pp. 165–173. doi: 10.1016/S0025-326X(99)00199-X.

Callahan, B. J. *et al.* (2016) 'DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data', *Nature Methods*, 13(7), pp. 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.

Callahan, B. J., Mcmurdie, P. J. and Holmes, S. P. (2017) 'Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis'. *Nature Publishing Group*, 11(12), pp. 2639–2643. doi: 10.1038/ismej.2017.119.

Callieri, C. and Stockner, J. G. (2002) 'Freshwater autotrophic picoplankton: A review', *Journal of Limnology*, 61(1), pp. 1–14. doi: 10.4081/jlimnol.2002.1.

Camp, H. J. M. O. Den *et al.* (2009) 'Minireview Environmental , genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia', 1, pp. 293–306. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x.

Camps-Bossacoma, M. *et al.* (2017) 'Gut Microbiota in a Rat Oral Sensitization Model: Effect of a Cocoa-Enriched Diet', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp. 1–12. doi: 10.1155/2017/7417505.

Caporaso, J. G. *et al.* (2010) 'correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 7(5), pp. 335–336. doi: 10.1038/nmeth0510-335.

Casamatta, D. *et al.* (2012) ' Characterization of *Roseofilum reptotaenium* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) gen. et sp. nov. isolated from Caribbean black band disease ', *Phycologia*, 51(5), pp. 489–499. doi: 10.2216/11-10.1.

Castelle, C. J. *et al.* (2013) 'Extraordinary phylogenetic diversity and metabolic versatility in aquifer sediment', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4, pp. 1–10. doi: 10.1038/ncomms3120.

Centeno, C. M. *et al.* (2012) 'Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables', *FEMS Microbiology Ecology*, 82(3), pp. 724–735. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01447.x.

Chen, L. *et al.* (2019) 'Characterizing microbial diversity and community composition of groundwater in a salt-freshwater transition zone', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 678, pp. 574–584. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.017.

Citti, C. *et al.* (2018) 'Horizontal gene transfers in mycoplasmas (Mollicutes)', *Current Issues in Molecular Biology*, 29, pp. 3–22. doi: 10.21775/cimb.029.003.

Cock, P. J. A. *et al.* (2009) 'Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics', 25(11), pp. 1422–1423. doi: 10.1093/bioinformatics/btp163.

CONAMP (2009) 'Programa de Conservación y Manejo del Area de Protección de Flora y FAuna Otoch Ma'ax Yetel Kooh', pp. 1–58.

Couradeau, E. *et al.* (2011) 'Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico)', *PLoS ONE*, 6(12). doi: 10.1371/journal.pone.0028767.

Craine, J. M. *et al.* (2018) 'Environmental DNA reveals the structure of phytoplankton assemblages along a 2900-km transect in the Mississippi River', *bioRxiv*, p. 261727. doi: <https://doi.org/10.1101/261727>.

Danielopol, D. L. *et al.* (2003) 'Present state and future prospects for groundwater ecosystems', *Environmental Conservation*, 30(2), pp. 104–130. doi: 10.1017/S0376892903000109.

Dojka, M. A. *et al.* (1998) 'Microbial diversity in a hydrocarbon and chlorinated solvent contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation', *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), pp. 3869–3877.

Ebenezer, V., Medlin, L. K. and Ki, J. S. (2012) 'Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae', *Marine Biotechnology*, 14(2), pp. 129–142. doi: 10.1007/s10126-011-9427-y.

Edgar, R. C. (2010) 'Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST', *Bioinformatics*, 26(19), pp. 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.

Edgar, R. C. (2016) 'UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing'.

Escolero, O. A. *et al.* (2005) 'Geochemistry of the hydrogeological reserve of Mérida, Yucatán, Mexico', *Geofísica Internacional*, 44(3), pp. 301–314.

Estrada-Medina, H. *et al.* (2016) 'Yucatán in black and red: Linking edaphic analysis and pyrosequencing-based assessment of bacterial and fungal community structures in the two main kinds of soil of Yucatán State', *Microbiological Research*. Elsevier GmbH., 188–189, pp. 23–33. doi: 10.1016/j.micres.2016.04.007.

Fischer, W. W. *et al.* (2017) 'On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria', *Science*, 355(6332), pp. 1436–1440. doi: 10.1126/science.aal3794.

Fuerst, J. A. and Sagulenko, E. (2011) 'Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 403–413. doi: 10.1038/nrmicro2578.

Furmaniak, M. A. *et al.* (2017) 'Edible cyanobacterial genus *Arthrospira*: Actual state of the art in cultivation methods, genetics, and application in medicine', *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), pp. 1–21. doi: 10.3389/fmicb.2017.02541.

Gao, W. *et al.* (2011) 'Phylogenetic and Gene Expression Analysis of Cyanobacteria and Diatoms in the Twilight Waters of the Temperate Northeast Pacific Ocean', *Microbial Ecology*, 62(4), pp. 765–775. doi: 10.1007/s00248-011-9891-y.

Gibert, J. *et al.* (2009) 'Assessing and conserving groundwater biodiversity: Synthesis and perspectives', *Freshwater Biology*, 54(4), pp. 930–941. doi: 10.1111/j.1365-2427.2009.02201.x.

Griebler, C. and Lueders, T. (2009) 'Microbial biodiversity in groundwater ecosystems', *Freshwater Biology*, pp. 649–677. doi: 10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x.

Griebler, C., Malard, F. and Lefébure, T. (2014) 'Current developments in

groundwater ecology-from biodiversity to ecosystem function and services', *Current Opinion in Biotechnology*, 27, pp. 159–167. doi: 10.1016/j.copbio.2014.01.018.

Gupta, V. *et al.* (2013) 'New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)-Prospects and challenges', *Algal Research*. Elsevier B.V., 2(2), pp. 79–97. doi: 10.1016/j.algal.2013.01.006.

Hahn, M. W. (2006) 'The microbial diversity of inland waters', *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), pp. 256–261. doi: 10.1016/j.copbio.2006.05.006.

Hamilton, T. L. *et al.* (2016) 'Carbon and sulfur cycling below the chemocline in a meromictic lake and the identification of a novel taxonomic lineage in the FCB superphylum, Candidatus Aegiribacteria', *Frontiers in Microbiology*, 7(APR). doi: 10.3389/fmicb.2016.00598.

Handelsman, J. (2004) 'Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms', 68(4), pp. 669–685. doi: 10.1128/MBR.68.4.669.

Harrison, C. A. *et al.* (2018) 'Microbial dysbiosis associated with impaired intestinal Na⁺ / H⁺ exchange accelerates and exacerbates colitis in ex-germ free mice', *Mucosal Immunology*. Springer US, (March). doi: 10.1038/s41385-018-0035-2.

Havens, K. E. *et al.* (2003) 'N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution', *Environmental Pollution*, 122(3), pp. 379–390. doi: 10.1016/S0269-7491(02)00304-4.

Hernández-De Lira, I. O. *et al.* (2014) 'Metagenómica: Concepto y Aplicaciones en el mundo microbiano', in *FRONTERAS EN MICROBIOLOGÍA APLICADA*, pp. 185–207.

Herrera-silveira, J. A., Martín B., M. and Díaz-Arce, V. (1999) 'Variaciones del fitoplancton en cuatro lagunas costeras del estado de yucatan mexico', *Revista de Biología Tropical*, 47(SupL 1), pp. 47–56.

Herrera González, R. and Castillo Rodríguez, R. (2006) 'Contaminación del acuífero yucateco por lixiviado de residuos municipales', in *Climate Variability and Change-Hydrological Impacts*, pp. 635–640. Available at: <http://iahs.info/uploads/dms/13733.114-635-640-38-308-ROGER-GONZALEZ.pdf>.

Hershey, O. S. *et al.* (2018) 'High microbial diversity despite extremely low biomass in a deep karst aquifer', *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2018.02823.

Hoffman, L., Komarek, J. and Kast (2005) 'System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) state in 2004', *Algological Studies*, 117, pp. 95–115.

Hoogesteijn Reul, A. L., Febles-patrón, J. L. and Nava-Galindo, V. A. (2015) 'La contaminación fecal en cenotes de interés turístico y recreacional del estado de Yucatán', *Ingeniería*, 19(3), pp. 169–175.

Hu, A. *et al.* (2013) 'Response of bacterial communities to environmental changes in a mesoscale subtropical watershed, Southeast China', *Science of The Total Environment*, 472, pp. 746–756. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.097.

Hug, L. A. *et al.* (2016) 'Critical biogeochemical functions in the subsurface are associated with bacteria from new phyla and little studied lineages', *Environmental Microbiology*, 18(1), pp. 159–173. doi: 10.1111/1462-2920.12930.

Hughes, J. B., Hellmann, J. J. and Ricketts, T. H. (2001) 'Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), p. 4. doi: 10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001.

Ibekwe, A. M., Ma, J. and Murinda, S. E. (2016) 'Bacterial community composition and structure in an Urban River impacted by different pollutant sources', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 566–567, pp. 1176–1185. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.168.

J.J. Schmitter-Soto, F.A. Comín, E. Escobedo-Briones, J.Herrera-Silveira, J.Alcocer, E. Suárez.Mprales, M. Elías-Gutierrez, V.DÍAZ-Arce, L.E. Marín, B. S. *et al.* (2002) 'Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico)', *Hydrobiologia*, 467, pp. 215–228. doi: 10.1023/A:1014923217206.

Jackson, M. *et al.* (2016) 'Signatures of early frailty in the gut microbiota', *Genome Medicine*. Genome Medicine, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13073-016-0262-7.

Kaur, R. *et al.* (2018) 'Metagenomic investigation of bacterial diversity of hot spring soil from Manikaran, Himachal Pradesh, India', *Ecological Genetics and Genomics*. Elsevier, 6(August 2017), pp. 16–21. doi: 10.1016/j.egg.2017.11.003.

Khatri, N. and Tyagi, S. (2015) 'Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas', *Frontiers in Life Science*, 8(1), pp. 23–39. doi: 10.1080/21553769.2014.933716.

Korbel, K. *et al.* (2017) 'Wells provide a distorted view of life in the aquifer: Implications for sampling, monitoring and assessment of groundwater ecosystems', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(January), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep40702.

Larsson, J. *et al.* (2014) 'Picocyanobacteria containing a novel pigment gene cluster dominate the brackish water Baltic Sea', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 8(9), pp. 1892–1903. doi: 10.1038/ismej.2014.35.

Leal-bautista, R. M. *et al.* (2011) 'Pathogens and pharmaceuticals pollutants as indicators quitanan roo', *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, pp. 211–219.

Lee, R. E. (2008) *Phycology*. 4th edn, Cambridge University Press. 4th edn. New York.

Liu, X. *et al.* (2016) 'Distribution and Diversity of Cyanobacteria and Eukaryotic

Algae in Qinghai–Tibetan Lakes’, *Geomicrobiology Journal*, 33(10), pp. 860–869. doi: 10.1080/01490451.2015.1120368.

Liu, Z. *et al.* (2007) ‘Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis’, *Nucleic Acids Research*, 35(18). doi: 10.1093/nar/gkm541.

Logue, J. B., Bürgmann, H. and Robinson, C. T. (2008) ‘Progress in the Ecological Genetics and Biodiversity of Freshwater Bacteria’, *BioScience*, 58(2), pp. 103–113. doi: 10.1641/b580205.

Lopez-Adrián, S. J. and Barrientos-Medina, R. C. (2005) ‘Diversidad y distribución del fitoplancton de agua dulce en la Península de Yucatan, Mexico’, *Ibugana*, 13(2), pp. 3–12.

López-Cortés, A. *et al.* (2001) ‘Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: A polyphasic study’, *International Microbiology*, 4(4), pp. 227–236. doi: 10.1007/s10123-001-0042-z.

Luscombe, N. M., Greenbaum, D. and Gerstein, M. (2001) ‘What is bioinformatics? An introduction and overview’, *Yearbook of Medical Informatics*, 10(01), pp. 83–100. doi: 10.1055/s-0038-1638103.

De Mandal, S., Chatterjee, R. and Kumar, N. S. (2017) ‘Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle’, *BMC Microbiology*. BMC Microbiology, 17(1). doi: 10.1186/s12866-017-1002-x.

Mardis, E. R. (2008) ‘Next-Generation DNA Sequencing Methods’, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9(1), pp. 387–402. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

Marshall, I. P. G. *et al.* (2017) ‘The novel bacterial phylum Calditrichaeota is diverse, widespread and abundant in marine sediments and has the capacity to degrade detrital proteins’, *Environmental Microbiology Reports*, 9(4), pp. 397–403. doi: 10.1111/1758-2229.12544.

Mateo, P. *et al.* (2015) ‘Cyanobacteria as bioindicators and bioreporters of environmental analysis in aquatic ecosystems’, *Biodiversity and Conservation*, pp. 909–948. doi: 10.1007/s10531-015-0903-y.

McDonald, D. *et al.* (2012) ‘The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: How I learned to stop worrying and love the ome-ome’, *GigaScience*, 464(1), pp. 1–6. doi: 10.1186/2047-217X-1-7.

McGregor, G. B. and Sendall, B. C. (2017) ‘Ewamiania thermalis gen. et sp. nov. (Cyanobacteria, Scytonemataceae), a new cyanobacterium from Talaroo thermal springs, north-eastern Australia’, *Australian Systematic Botany*, 30(1), p. 38. doi: 10.1071/sb16039.

McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2013) ‘Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data’, *PLoS*

ONE, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.0061217.

Miroshnichenko, M. L. *et al.* (2003) 'Caldithrix abyssi gen. nov., sp. nov., a nitrate-reducing, thermophilic, anaerobic bacterium isolated from a Mid-Atlantic ridge hydrothermal vent, represents a novel bacterial lineage', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), pp. 323–329. doi: 10.1099/ijs.0.02390-0.

Moreno Franco, D., Quintero Manzano, J. and Lopez Cuevas, A. (2010) 'Metodos para identificar , diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia', *ContactoS* 78, pp. 25–33.

Morrison, J. M. *et al.* (2017) 'Spatiotemporal analysis of microbial community dynamics during seasonal stratification events in a freshwater lake (Grand Lake, OK, USA)', *PLoS ONE*, 12(5). doi: 10.1371/journal.pone.0177488.

Muciño-Márquez, R. E., Figueroa-Torres, M. G. and Aguirre-León, A. (2015) 'Cianofitas de los sistemas fluvio-lagunares Pom-Atasta y Palizada del Este, adyacentes a la Laguna de Términos, Campeche, México', *Polibotánica*, (39). doi: 10.18387/polibotanica.39.3.

Nava-Ruiz, V. M. and Valadez, F. (2012) 'Flora planctónica de laguna Lagartos, Quintana Roo', *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(3), pp. 561–582. doi: 10.7550/rmb.24868.

Newton, R. J. *et al.* (2011) *A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria, Microbiology and Molecular Biology Reviews*. doi: 10.1128/mubr.00028-10.

Nguyen, N. *et al.* (2016) 'PERSPECTIVE A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity', (August 2015). doi: 10.1038/npjbio.

Noble, R. T. (2016) 'The Microbiota of Recreational Freshwaters and the Implications for Environmental and Public Health', 7(November), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2016.01826.

Novelo, E. and Tavera, R. (2011) 'Un panorama gráfico de las algas de agua dulce de México', *Hidrobiologica*, 21(3), pp. 333–341.

Nowruzi, B. *et al.* (2013) 'Identification and toxigenic potential of a Nostoc sp.', *Algae*, 27(4), pp. 303–313. doi: 10.4490/algae.2012.27.4.303.

Obbels, D. *et al.* (2016) 'Bacterial and eukaryotic biodiversity patterns in terrestrial and aquatic habitats in the Sør Rondane Mountains, Dronning Maud Land, East Antarctica', *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), pp. 1–13. doi: 10.1093/femsec/fiw041.

Oliva-Martínez, M. G., Godínez-Ortega, J. L. and Zuñiga-Ramos, C. A. (2014) 'Biodiversidad del fitoplancton de aguas continentales en México', *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Elsevier, 85(SUPPL.), pp. 54–61. doi: 10.7550/rmb.32706.

Pace, N. R. (1997) 'A molecular view of microbial diversity and the biosphere', *Science*, 276(5313), pp. 734–740. doi: 10.1126/science.276.5313.734.

Pacheco, A. J. and Cabrera, S. A. (1997) 'Groundwater Contamination by Nitrates in the Yucatan Peninsula, Mexico', *Hydrogeology Journal*, 5.

Pérez, L. *et al.* (2011) 'Aquatic ecosystems of the Yucatán Peninsula (Mexico), Belize, and Guatemala', *Hydrobiologia*, 661(1), pp. 407–433. doi: 10.1007/s10750-010-0552-9.

Pinevich, A., Velichko, N. and Ivanikova, N. (2012) 'Cyanobacteria of the genus Prochlorothrix', *Frontiers in Microbiology*, 3(MAY), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2012.00173.

Pinto, P. D. T. and Litchman, E. (2010) 'Interactive effects of N:P ratios and light on nitrogen-fixer abundance', *Oikos*, 119(3), pp. 567–575. doi: 10.1111/j.1600-0706.2009.17924.x.

Portillo, M. C., Anderson, S. P. and Fierer, N. (2012) 'Temporal variability in the diversity and composition of stream bacterioplankton communities', *Environmental Microbiology*, 14(9), pp. 2417–2428. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02785.x.

Presting, G. G. (2006) 'Identification of conserved regions in the plastid genome : implications for DNA barcoding and biological function', pp. 1434–1443. doi: 10.1139/B06-117.

Pronk, M., Goldscheider, N. and Zopfi, J. (2009) 'Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring', *Hydrogeology Journal*, 17(1), pp. 37–48. doi: 10.1007/s10040-008-0350-x.

Rahman, N. A. *et al.* (2016) 'A phylogenomic analysis of the bacterial phylum fibrobacteres', *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN). doi: 10.3389/fmicb.2015.01469.

Ramsar (2012) 'Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR) – Versión 2009-2012 1. Nombre y dirección del compilador de la Ficha: P', pp. 1–17.

Reid, A. J. *et al.* (2018) 'Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity', *Biological Reviews*, 94, pp. 849–873. doi: 10.1111/brv.12480.

Reynolds, C. (2006) *Ecology of Phytoplankton, The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference.* doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Richardson, L. *et al.* (2014) 'Ecology and Physiology of the Pathogenic Cyanobacterium *Roseofilum reptotaenium*', *Life*, 4(4), pp. 968–987. doi: 10.3390/life4040968.

Rognes, T. *et al.* (2016) 'VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics', pp. 1–22. doi: 10.7717/peerj.2584.

Rojas-Herrera, R. *et al.* (2011) 'Microbial diversity, metagenomics and the Yucatán aquifer', *Phyton*, 80(130), pp. 231–240.

Rosiles-González, G. *et al.* (2017) 'Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) in Groundwater from a Karst Aquifer System in the Yucatan Peninsula, Mexico', *Food and Environmental Virology*, 9(4), pp. 487–497. doi: 10.1007/s12560-017-9309-1.

Sahl, J. W. *et al.* (2011) 'A comparative molecular analysis of water-filled limestone sinkholes in north-eastern Mexico', *Environmental Microbiology*, 13(1), pp. 226–240. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02324.x.

Sahoo, D. and Seckbach, J. (2015) *The Algae World*. doi: 10.1007/978-94-017-7321-8.

Salazar, G. and Sunagawa, S. (2017) 'Marine microbial diversity', *Current Biology*. Elsevier, 27(11), pp. R489–R494. doi: 10.1016/j.cub.2017.01.017.

Sanchez, M. *et al.* (2002) 'Phytoplankton of cenotes and anchialine caves along a distance gradient from the northeastern coast of Quintana Roo, Yucatan Peninsula', *Hydrobiologia*, 467, pp. 79–89. doi: 10.1023/A:1014936714964.

Savio, D. *et al.* (2019) 'Spring Water of an Alpine Karst Aquifer Is Dominated by a Taxonomically Stable but Discharge-Responsive Bacterial Community', *Frontiers in Microbiology*, 10(February). doi: 10.3389/fmicb.2019.00028.

Schloss, P. D. *et al.* (2009) 'Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), pp. 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09.

Schmitter-Soto, J. J. *et al.* (2002) 'Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico)', *Hydrobiologia*, 467, pp. 215–228. doi: 10.1023/A:1014923217206.

Sciuto, K. and Moro, I. (2015) 'Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group', *Biodiversity and Conservation*, 24(4), pp. 711–738. doi: 10.1007/s10531-015-0898-4.

Shapiro, J. (2017) 'Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH', *SIL Proceedings, 1922-2010*, 24(1), pp. 38–54. doi: 10.1080/03680770.1989.11898689.

Shaw, J. L. A., Weyrich, L. A. and Cooper, A. (2016) 'Using environmental (e) DNA sequencing for aquatic biodiversity surveys: a beginner's guide', *Marine and Freshwater Research*, p. a-n. Available at: <http://dx.doi.org/10.1071/MF15361>.

Sherwood, A. R., Chan, Y. L. and Presting, G. G. (2008) 'Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community', *Molecular Ecology Resources*, 8(5), pp. 1011–1014. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02138.x.

Sherwood, A. R. and Presting, G. G. (2007) 'Universal primers amplify a 23S

rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria', *Journal of Phycology*, 43(3), pp. 605–608. doi: 10.1111/j.1529-8817.2007.00341.x.

Shokralla, S. *et al.* (2012) 'Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research', *Molecular Ecology*, pp. 1794–1805. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x.

Smith, T. M. and Smith, R. L. (2007) *Ecología*.

Smith, V. (2003) 'Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem', *Environmental Science and Pollution Research*, 10(2), pp. 126–139. doi: 10.1065/espr2002.12.142.

Smith, V. H., Tilman, G. D. and Nekola, J. C. (1998) 'Eutrophication: Impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems', in *Environmental Pollution*, pp. 179–196. doi: 10.1016/S0269-7491(99)00091-3.

Solorzano, L. (1969) 'Determination of ammonia in natural seawater by the phenol-hypochlorite method', *Limnology and Oceanography*, 14(5), pp. 799–801. doi: 10.4319/lo.1969.14.5.0799.

Soo, R. M. *et al.* (2014) 'An expanded genomic representation of the phylum cyanobacteria', *Genome Biology and Evolution*, 6(5), pp. 1031–1045. doi: 10.1093/gbe/evu073.

Tahon, G. *et al.* (2018) 'Abditobacterium utsteinense sp. nov., the first cultivated member of candidate phylum FBP, isolated from ice-free Antarctic soil samples', *Systematic and Applied Microbiology*. Elsevier GmbH., 41(4), pp. 279–290. doi: 10.1016/j.syapm.2018.01.009.

Tavera, R. E. A. (2013) 'Cyanoprokaryota in Karst Enviroments in Yucatán, Mexico', 91(1), pp. 27–52.

Tavera, R. and Komárek, J. (1996) 'Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico', *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 83(May), pp. 511–538. doi: 10.1127/algol_stud/83/1996/511.

Tavera, R., Novelo, E. and López, S. (2013) 'Cyanoprokaryota (cyanobacteria) in karst environments in Yucatán, Mexico', *Botanical Sciences*, 91(1), pp. 27–52. doi: 10.17129/botsci.401.

Teta, R. *et al.* (2017) 'Cyanobacteria as indicators of water quality in Campania coasts, Italy: A monitoring strategy combining remote/proximal sensing and in situ data', *Environmental Research Letters*, 12(2). doi: 10.1088/1748-9326/aa5649.

Thomas, F. *et al.* (2011) 'Environmental and gut Bacteroidetes: The food connection', *Frontiers in Microbiology*, 2(MAY), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2011.00093.

Thomas, T., Gilbert, J. and Meyer, F. (2012) 'Metagenomics - a guide from

sampling data to analysis', *Microbiol Informatics and Experimentation*, 2(3), pp. 1–12. doi: 10.1186/2042-5783-2-3.

Thompson, L. R. *et al.* (2017) 'A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity', *Nature*, 551(7681), pp. 457–463. doi: 10.1038/nature24621.

Troccoli-Ghinaglia, L. *et al.* (2010) 'Phytoplankton community variations in tropical coastal area affected where submarine groundwater occurs', *Continental Shelf Research*, 30(20), pp. 2082–2091. doi: 10.1016/j.csr.2010.10.009.

US-EPA (1978) 'Phosphorous, all Forms (colorimetric, ascorbic acid, two reagent)', *Method 365.3*, pp. 3–7. doi: 10.1159/000330408.

US-EPA (1993) 'Determination of Nitrate-Nitrite Nitrogen by Automated Colorimetry', (August), pp. 0–14.

Valadez, F. *et al.* (2013) 'Planktonic cyanobacteria of the tropical karstic lake Lagartos from the Yucatan Peninsula, Mexico', *Revista de biología tropical*, 61(2), pp. 971–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885602>.

Werner, J. J. *et al.* (2012) 'Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16S rRNA gene surveys', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, pp. 94–103. doi: 10.1038/ismej.2011.82.

Wilkins, D. *et al.* (2013) 'Key microbial drivers in Antarctic aquatic environments', *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), pp. 303–335. doi: 10.1111/1574-6976.12007.

Wilmotte, A. and Herdman, M. (2015) 'Phylogenetic Relationships Among the Cyanobacteria Based on 16S rRNA Sequences', in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1–9. doi: 10.1002/9781118960608.cbm00021.

Woese, C. R. and Fox, G. E. (1977) 'Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : The primary kingdoms', 74(11), pp. 5088–5090.

Xu, X. *et al.* (2013) 'Genome Sequence of a Gamma- and UV-Ray-Resistant Strain', *Genome journals*, 1(3), pp. 12–13. doi: 10.1128/genomeA.00206-13.Copyright.

Yang, B., Wang, Y. and Qian, P. (2016) 'Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis', *BMC Bioinformatics*. BMC Bioinformatics, pp. 1–8. doi: 10.1186/s12859-016-0992-y.

Yang, J. *et al.* (2018) 'Benthic algal community structures and their response to geographic distance and environmental variables in the Qinghai-Tibetan lakes with different salinity', *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00578.

Zeglin, L. H. (2015) 'Stream microbial diversity in response to environmental changes: Review and synthesis of existing research', *Frontiers in Microbiology*, pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2015.00454.

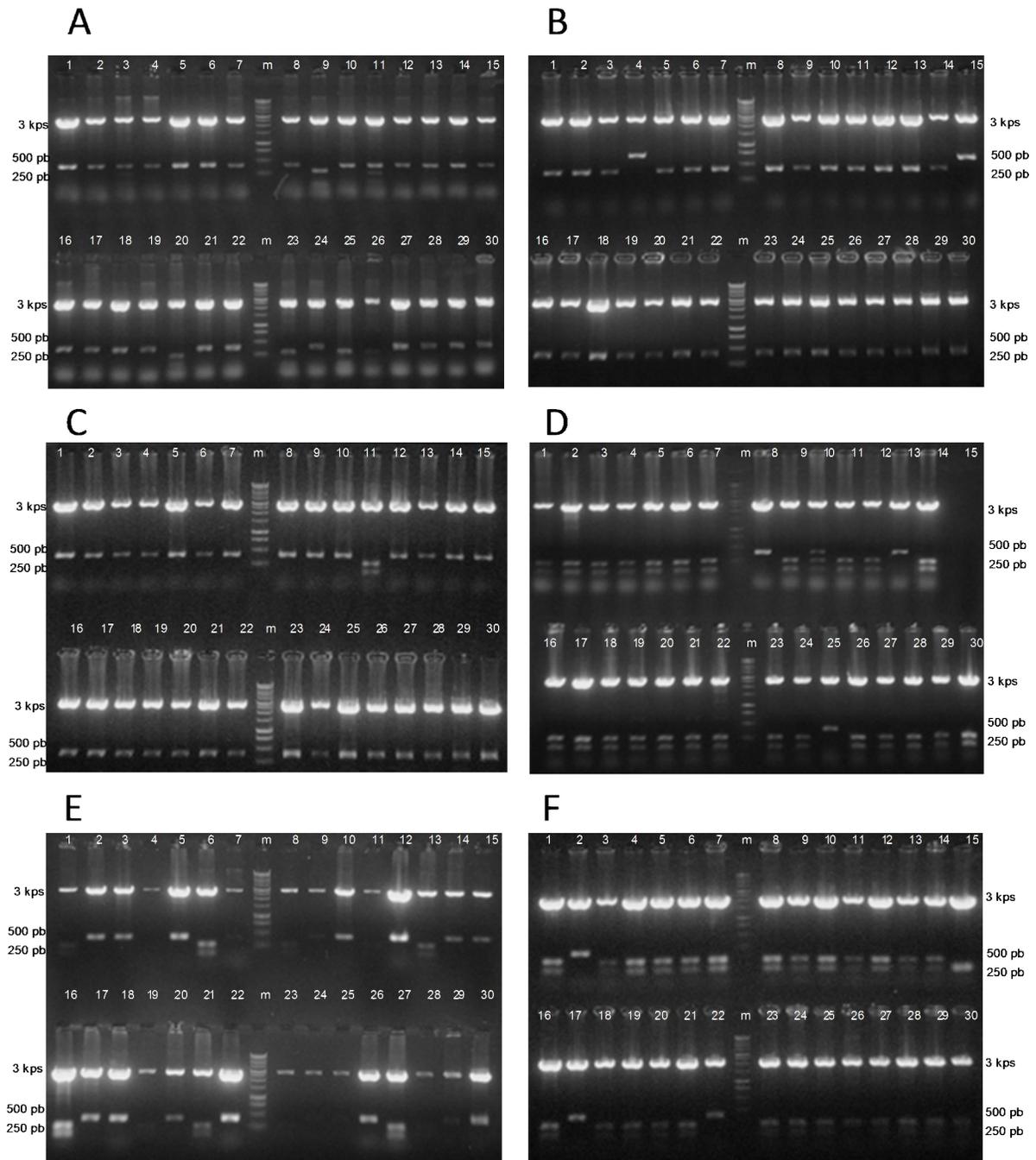
Zehr, J. P. (2010) 'Microbes in Earth's aqueous environments', *Frontiers in Microbiology*, 1(July). doi: 10.3389/fmicb.2010.00004.

Zinger, L., Gobet, A. and Pommier, T. (2012) 'Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity', *Molecular Ecology*, 21(8), pp. 1878–1896. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05362.x.

Zwart, G. *et al.* (2002) 'Typical freshwater bacteria: An analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers', *Aquatic Microbial Ecology*, 28(2), pp. 141–155. doi: 10.3354/ame028141.

Anexo A

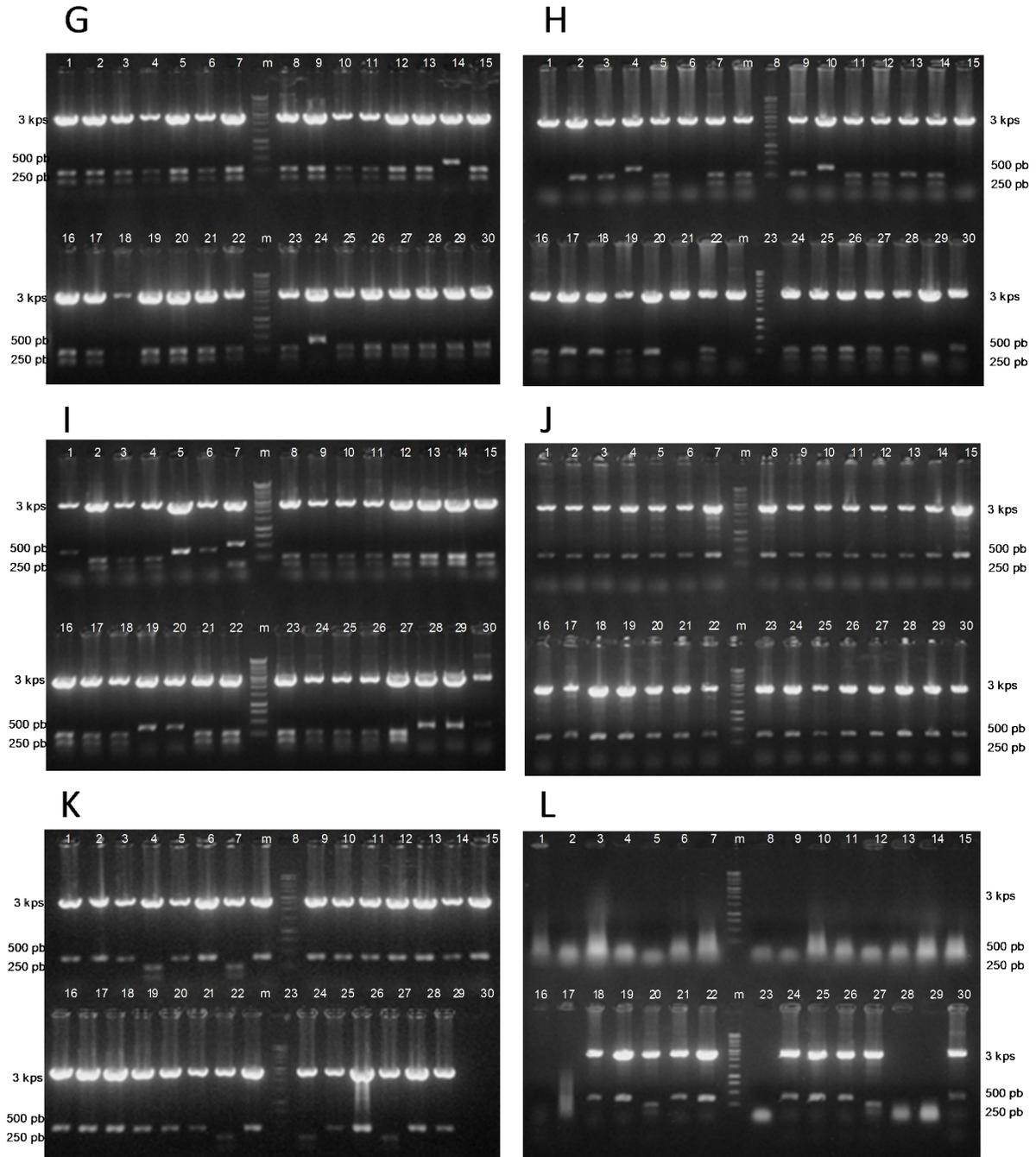
Digestión de plásmidos recombinantes



Anexo A. Digestión de plásmidos recombinantes. Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1%; técnica de tinción EtBr. (m, marcador de 250 pb; A, Kikil octubre; B, Kikil febrero; C, Sucila octubre; D, Sucila febrero; E, Kanaha octubre; F, KU febrero)

Anexo A

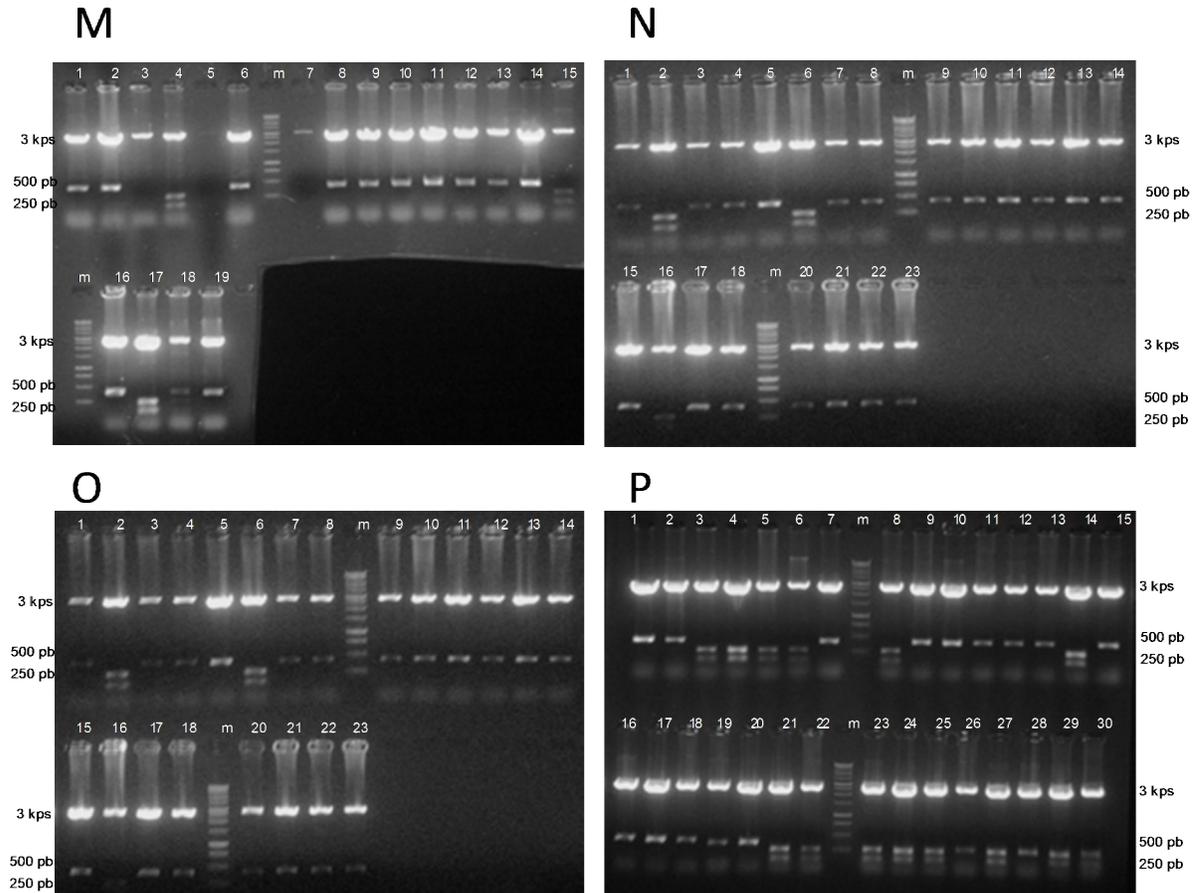
Digestión de plásmidos recombinantes



Anexo A. Digestión de plásmidos recombinantes. Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1%; técnica de tinción EtBr. (m, marcador de 250 pb; G, Mumundzonot octubre; H, Mumundzonot febrero; I, Xcolac octubre; J, Xcolac febrero; K, Chen-ha octubre; L, Chen-ha febrero)

Anexo A

Digestión de plásmidos recombinantes



Anexo A. Digestión de plásmidos recombinantes. Electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1%; técnica de tinción EtBr. (m, marcador de 250 pb; M Punta Laguna octubre; N, Punta Laguna febrero, O1-14, Punta Laguna octubre; O15-16 Kanaha octubre; O20-23 Kikil octubre; P1-21 Chen-ha febrero; P22, Sucila febrero; P23, Chen-ha octubre; P24, Mumundzonot octubre; P25-30, Mumundzonot febrero)