

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Análisis de la comunidad microbiana del Río Usumacinta, México y su relación con
variables ambientales**

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

GRACE CAROLINE RODRÍGUEZ ALCOCER

Quito, 2023

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Grace Caroline Rodríguez Alcocer ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. Jeniffer Marcela Yáñez Altuna

Directora de la Disertación

Quito, 24 de febrero del 2023

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Grace Caroline Rodríguez Alcocer ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Dra. Rocio J Alcántara-Hernández

Co-Directora de la Disertación

Quito, 24 de febrero del 2023

DEDICATORIA

A mi familia, por acompañarme incondicionalmente.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de tesis fue posible gracias al apoyo económico de:

- Fondo UNAM-PAPIIT IN217622, “*Ensamblajes microbianos oxidadores de metano en sistemas lacustres de México*” otorgado a la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández;
- Proyecto PINCC 2020-2021 “*Cuerpos Acuáticos Epicontinentales: Papel en la Dinámica del Carbono y Emisiones de Gases de Efecto Invernadero en México*” de la Universidad Nacional Autónoma de México;
- DGAPA/PAPIIT IN216818 “*Flujos de carbono, nutrientes y sedimentos en un sistema lótico tropical*” de la Universidad Nacional Autónoma de México;
- Proyecto “*Los Grandes Ríos Del Neotrópico y su Contribución al Ciclo de Carbono Global (COOPA20472)*” del Museo Nacional de Ciencias Naturales de España.

Este trabajo se realizó en coordinación con los siguientes laboratorios: Laboratorio del Grupo de Investigación en Limnología Tropical de la FES Iztacala, UNAM, y Laboratorio de Genómica y Biotecnología del Instituto de Geología, UNAM.

Adicionalmente, agradezco a:

La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica y a sus docentes por el apoyo y conocimientos impartidos a lo largo de la carrera para poder realizar esta investigación.

A mis directoras de tesis, la Mtr. Jeniffer Marcela Yáñez Altuna y la Dra. Rocío Jetzabel Alcántara Hernández, y al MSc. Ismael Soria Reinoso por su apoyo académico a lo largo del proceso.

A los miembros del comité lector Dra. Iliana Alcocer y MSc. Patricia Portero por su acompañamiento.

A la Mtra. Iris Suárez Quijada, al Dr. Luis A. Oseguera y al Dr. Javier Alcocer Durand por su ayuda técnica en la realización de este proyecto de investigación.

A la Fundación Hanns Seidel por la beca de excelencia académica que se me otorgó, por su amistad y por ser mi segunda familia.

A mis padres, Grace y Jaime, por su contención, amor incondicional y por siempre creer en mí. A mis hermanos, Katherine, Sofi e Isaac por todos los momentos inolvidables que hemos compartido. A mis abuelos, Franklin y Regina, por su cariño, consejos y acogerme a lo largo de mi etapa universitaria. A mis tíos y primos Tania, Frank y Christian, Vitiu y Melanie, por estar. A Stefan, por dar luz a mi mundo.

A Sofi, por acompañarme en mis batallas y ayudarme a superarlas, por su amor, confianza y por siempre darme ánimo para cumplir con mis objetivos.

A Juan Fer, por su cariño y soporte desde el primer semestre y por mostrarme el valor de la constancia.

A mis amigos Isaac, Fausto y Andrea, con quienes he compartido risas, preocupaciones y momentos memorables.

A mí, por ser mi lugar seguro.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
3.1.	LOS RIOS COMO SISTEMAS ACUÁTICOS COMPLEJOS	3
3.2.	LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ACUÁTICAS.....	4
3.2.1.	LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN RÍOS.....	5
3.3.	HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN MICROBIANA.....	8
3.3.1	LA REGIÓN V4 DEL GEN 16S rRNA.....	9
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1.	SITIO DE ESTUDIO	13
4.2.	SITIOS DE MUESTREO Y TOMA DE MUESTRA.....	14
4.3.	OBTENCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES (SST).....	16
4.4.	OBTENCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA “a”.....	17
4.5.	EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	17
4.6.	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS 16S ADN _r POR PCR.....	17
4.7.	SECUENCIACIÓN.....	19
4.8.	ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	19
5.	RESULTADOS.....	21
5.1.	ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS	21
5.2.	DIVERSIDAD DE INDIVIDUOS Y RIQUEZA DE ASVs.....	24
5.2.1.	EXTRACCIÓN DE ADN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS 16S ADN _r 24	
5.2.2.	ANÁLISIS DE RIQUEZA Y DIVERSIDAD.....	25
5.2.3.	ANÁLISIS DE ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD.....	26
5.3.	ABUNDANCIA DE LOS GRUPOS TAXONÓMICOS	28
5.4.	RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS.....	41
6.	DISCUSIÓN.....	43
6.1.	DIVERSIDAD MICROBIANA	43
6.2.	ABUNDANCIA DE GRUPOS TAXONÓMICOS	45

7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
9. ANEXOS.....	63

LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Sitios de muestreo del Río Usumacinta para este estudio..... 15

Figura 2. Análisis de componentes principales de las características fisicoquímicas promedio del Río Usumacinta para la temporada de lluvias 2017, 2018, 2019 (noviembre).....23

Figura 3. Patrones de diversidad obtenidos de los diferentes puntos del Río Usumacinta.....26

Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) con algoritmo Unifrac de las comunidades de bacterias y arqueas basado en las secuencias del gen 16S ARNr.....27

Figura 5. Diagrama de Venn de los ASVs compartidos entre los puntos M1, M2, M3, B1 y B2 del río.....28

Figura 6. Abundancia relativa de los principales fila de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....29

Figura 7. Abundancia relativa a nivel de orden del filo Cyanobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....30

Figura 8. Abundancia relativa a nivel de género de los principales órdenes del filo Cyanobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....31

Figura 9. Abundancia relativa a nivel de clase del filo Proteobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....32

Figura 10. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) de la clase Alphaproteobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....33

Figura 11. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) de la clase Gammaproteobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....35

Figura 12. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) del filo Desulfobacterota del dominio Bacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....36

Figura 13. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) del filo Bacteroidota del dominio Bacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....	37
Figura 14. Abundancia relativa a nivel de género de los fila a) Acidobacteriota y b) Actinobacteriota del dominio Bacteria, de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....	39
Figura 15. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) del filo Crenarchaeota, (dominio Archaea) de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....	40
Figura 16. Abundancia relativa a nivel de familia de organismos metilotróficos y metanotróficos de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....	41
Figura 17. Análisis de Correlación Canónica (ACC) basada en datos de secuenciación masiva del gen 16s ARNr y su relación con las variables ambientales de los sitios M1, M2 M3, B2 y B3 del Río Usumacinta.....	42

TABLAS

Tabla 1. Estudios previos sobre comunidades microbianas en ríos tropicales.....	7
Tabla 2. Marcadores moleculares.....	18
Tabla 3. Protocolo de amplificación.....	18
Tabla 4. Promedio de las principales características ambientales de los sitios de estudio para los años 2017, 2018, 2019, mostrando la concentración de sólidos suspendidos totales, concentración de Clor-a, y el máximo y mínimo de los valores de temperatura, oxígeno disuelto, pH y conductividad eléctrica (K25) de la temporada lluvias.....	21
Tabla 5. Concentración de amplicón 16S rRNA purificado, volumen y ng enviados al secuencia de los diferentes puntos de muestreo del río	24
Tabla 6. Número de secuencias obtenidas, filtradas, “denoised”, pareadas y no quiméricas.....	25

ANEXOS

Figura A1. Gráfico de calidad de las secuencias 16S rRNA crudas obtenidas del secuenciador MiSeq: A) directas (forward), y B) reversas (reverse).....	63
Tabla A1. Promedio de los datos fisicoquímicos de las columnas de agua en los sitios de muestro para noviembre 2017, 2018, 2019.....	64
Tabla A2. Análisis CCA de características físicoquímicas con la comunidad microbiana de bacterias y arqueas.....	64
Tabla A3. Promedio de la turbidez y del caudal del Río Usumacinta de la temporada lluvias del año 2017.....	65

1 RESUMEN

Los sistemas lóticos acuáticos, como los ríos, son entes que transportan agua dulce a lo largo de canales no tan profundos, y cumplen funciones ecosistémicas relevantes y de provecho a las poblaciones humanas, por lo que su estudio y el de sus componentes son de interés. Los microorganismos acuáticos son parte esencial del río, y cumplen funciones biogeoquímicas, y de atenuación de contaminantes y xenobióticos. El objetivo general de este trabajo fue, el caracterizar a la comunidad microbiana de la columna de agua del Río Usumacinta (México) mediante análisis del gen 16S ARNr, para identificar patrones de variación espacial con relación a algunas variables ambientales. Para ello, se extrajo ADN total de muestras de agua colectadas en 5 puntos del río (3 en la cuenca media y 2 en la cuenca baja), se amplificaron fragmentos de la región hipervariable V4 del gen 16S ARNr y se secuenciaron en la plataforma Illumina MiSeq. Tras el análisis bioinformático se observó que las muestras de la cuenca baja mostraron valores de diversidad menores a los de la cuenca media; así mismo, la estructura de la comunidad procariótica fue ligeramente diferente entre ambas cuencas. La comunidad procariótica estuvo principalmente compuesta por microorganismos pertenecientes a los filas Acidobacterota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Crenarchaeota, Cyanobacteria, Desulfobacterota, y Proteobacteria; siendo éste último el más abundante. Las secuencias encontradas fueron afiliadas clases, órdenes y géneros microbianos comúnmente encontrados en sistemas de agua dulce, como *Cyanobium*, *Synechococcus*, Rhodobacterales, el clado SAR116, *Flavobacterium*, Nitrososphaerales, entre otros. Sin embargo, también se encontraron algunos organismos indicadores de fenómenos de contaminación y posiblemente asociados con la extracción y transporte de petróleo, como *Acidithiobacillus*, *Ferritrophicum*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, y *Sphingomonas*, principalmente hacia la cuenca baja donde se han reportado estas actividades. En este trabajo, no se encontraron relaciones significativas entre los parámetros fisicoquímicos como oxígeno disuelto, temperatura, conductividad eléctrica, pH, clorofila “a” y sólidos suspendidos totales, lo cual se ha observado para otros ríos. Sin embargo, estas relaciones podrían encontrarse en futuros estudios considerando un muestreo más amplio y otros parámetros fisicoquímicos, como nutrientes o la longitud media del drenaje dendrítico.

Palabras clave: gen 16S ARNr, caracterización microbiana, *metabarcoding*, río Usumacinta, sistema lótico tropical.

2 ABSTRACT

Aquatic lotic systems such as rivers are entities that transport freshwater through shallow channels and accomplish relevant functions for the ecosystem and human populations, therefore, their study and those of its components are of interest. Aquatic microorganisms are an essential part of the river, accomplishing biogeochemical functions, and the attenuation of pollutants and xenobiotics. The general objective of this research was to characterize the microbial community in the water column of the Usumacinta River (Mexico) by the analysis of the 16S rRNA gene fragments, to identify spatial variability patterns and its relationship with some environmental variables. To achieve this, total DNA was extracted from water samples collected in 5 points of the river (3 in the middle basin and 2 in the low basin), fragments of the hypervariable V4 region of the 16S rRNA were amplified and sequenced in an Illumina MiSeq platform. After the bioinformatic analysis, it was observed that the samples from the low basin had lower diversity values compared to the middle basin; also, the prokaryotic community structure was slightly different between both basins. The prokaryotic community was mainly composed by microorganisms belonging to the phyla Acidobacterota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Crenarchaeota, Cyanobacteria, Desulfobacterota, and Proteobacteria; being this last one the most abundant. Sequences found were affiliated to microbial classes, orders and genera often found in freshwater systems such as *Cyanobium*, *Synechococcus*, Rhodobacterales, el clado SAR116, *Flavobacterium*, Nitrososphaerales, among others. However, there were also found some organisms indicating pollution phenomena and possibly associated with the extraction and transport of oil, such as *Acidithiobacillus*, *Ferritrophicum*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Sphingomonas*, mainly in the low basin where these activities have been reported. For this work, no significant relationships were found among the physicochemical parameters such as dissolved oxygen, temperature, electrical conductivity, pH, chlorophyll "a" and total suspended solids, which has been observed also for other rivers. However, these relationships could be found in future studies considering a wider sampling, and other physicochemical parameters, such as nutrients or the mean dendritic stream length.

Keywords: 16S rRNA gene, metabarcoding, microbial characterization, tropical lotic system, Usumacinta River.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 LOS RÍOS COMO SISTEMAS ACUÁTICOS COMPLEJOS

Un sistema lótico acuático es un ente acuático que transporta agua dulce impulsado por la fuerza de gravedad a lo largo de canales estrechos, siendo arroyos y ríos claros ejemplos de éstos. La función básica de estos sistemas con movimiento constante es transportar el excedente de lluvias hacia el océano (Asthana y Asthana, 2006). Así, existen varios factores que caracterizan a un sistema lótico tropical, y a continuación se mencionan algunos:

- i) Poseen un flujo unidireccional que va acarreado agua, nutrientes, sales, entre otros, los cuales proceden de diversas fuentes. Por ejemplo, aunque los sistemas lóticos contienen generalmente el menos del 1% de sal, son importantes transportadores de solutos y nutrientes necesarios para sustentar la vida en la Tierra. Se estima que los ríos transportan aproximadamente 3 600 millones de toneladas métricas por año de sal desde el continente hasta el océano (Asthana y Asthana, 2006; Brown, 2022). En la actual era geológica, el Antropoceno, también se ha observado que los ríos pueden transportar contaminantes como sales derivadas de los fertilizantes o plásticos. Por ejemplo, se estima que entre 1,15 y 2,41 millones de toneladas de desechos plásticos ingresan a océanos cada año desde los ríos, siendo los ríos ubicados en Asia los que aportan mayor cantidad de desechos plásticos a nivel mundial (Meijer et al., 2019).
- ii) La velocidad del río puede variar generando corrientes de agua, debido al cambiante volumen de agua (condiciones hidrometeorológicas), la fuerza de gravedad (relieve), la forma, la fricción y la topografía del canal (Hanif et al., 2022). Además, por la inestabilidad temporal y espacial del río, los parámetros fisicoquímicos permanecen cambiantes (Jones et al., 1985).
- iii) Es bastante raro que exista agotamiento de oxígeno en sistemas lóticos no contaminados, es decir, casi siempre son cuerpos acuáticos oxigenados, y el cual se distribuye uniformemente por toda la masa de agua. El contenido de oxígeno

deriva en gran parte de la superficie y el intercambio atmosférico, así como de los organismos autótrofos, pues las poblaciones de animales son limitadas, lo que reduce las probabilidades de que se consuma de O₂ como parte de la respiración aerobia (Kim et al., 2021)

- iv) No es muy frecuente que existan grandes cantidades de biomasa de algas o de organismos que se desarrollen en estas aguas en movimiento, es decir, son de biomasa limitada (Asthana y Asthana, 2006; Jones, 2006). En especial, en partes profundas donde puede existir una menor concentración de oxígeno, junto con una limitada penetración de luz ocasionada por la turbidez, restringiendo su productividad. Sin embargo, organismos que han desarrollado mecanismos efectivos para permanecer en un solo sitio en aguas en movimiento, aprovechan las corrientes para poder diseminar sus semillas, esporas y otras estructuras reproductivas a lo largo del canal (Kim et al., 2021)

3.2 LAS COMUNIDADES MICROBIANAS ACUÁTICAS

Una comunidad microbiana acuática es descrita como el conjunto de especies microscópicas (< 1 mm) que coexisten y están presentes en un hábitat definido en el espacio y el tiempo (Callieri et al., 2018). Este ensamblaje incluye a todos los organismos de los tres dominios de la vida (Archaea, Bacteria y Eukarya), los cuales cumplen un rol fundamental en la dinámica del ecosistema (p.ej., producción y reciclaje de materia orgánica, flujo de energía y articulación de los ciclos biogeoquímicos globales), incluyendo sistemas acuáticos marinos, salobres o aguas interiores o epicontinentales (Callieri et al., 2018). Según (Margulis et al., 1986), la comunidad microbiana acuática es un componente clave dentro de los procesos del metabolismo y comprenden organismos de vida libre en la columna de agua (plancton) o adheridos al sustrato en los sedimentos (bentónicos) (Callieri et al., 2018). Además, la abundancia de microorganismos acuáticos, la cual en algunos sitios puede ser generalmente de 10⁶ células/mL agua, y la composición filogenética definen los servicios ecosistémicos, cumpliendo un papel fundamental en los procesos que controlan la calidad del agua (Hahn, 2006).

Los microorganismos, especialmente bacterias y arqueas, son los responsables de catalizar varios procesos biogeoquímicos clave que mantienen la biósfera (Madsen, 2011). Los microorganismos son los principales agentes de los cambios biogeoquímicos debido a su capacidad de transformar y reciclar sustancias orgánicas e inorgánicas en suelos, sedimentos y aguas. Entre los principales procesos microbiológicos se encuentran la oxidación anaeróbica del metano, la fotosíntesis, la absorción de fósforo, la biodegradación de contaminantes orgánicos y numerosos aspectos de los ciclos del nitrógeno y el azufre ((Madsen, 2005a; Madsen, 2011b). En este contexto existen diferentes grupos de microorganismos que participan en los procesos mencionados, tales como bacterias nitrificantes, microorganismos desnitrificadores, bacterias fijadoras de nitrógeno, nitritadores y nitratadores, organismos desaminadores, bacterias reductoras de sulfato y azufre, bacterias productoras de celulosa, metabolizadoras de lignina, y microorganismos pectinolíticos, entre otros (Meyer, 1994).

3.2.1. LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN RÍOS

A pesar de que los ríos comprenden apenas el 0,0002% del total de la hidrósfera, son ecosistemas que proveen varios servicios ambientales como agua potable o de riego, e integran diversos procesos como el transporte, la oxidación, el almacenamiento y la liberación del carbono (C) terrestre (Cole et al., 2007). Es decir, estos sistemas acuáticos son fundamentales en el presupuesto global de C y de los nutrientes; los cuales, a su vez, están en función de los procesos microbianos, principalmente por organismos fotoautótrofos (que dependen de la energía lumínica y de la disponibilidad de nutrientes para asimilar CO₂ disuelto en C orgánico) y heterótrofos (que transforman el C orgánico en biomasa y lo descomponen en CO₂ como un subproducto de la respiración) (Dodds y Whiles, 2019). Así, los sistemas fluviales se caracterizan por tener una naturaleza heterogénea, generalmente son heterotróficos y tienen importantes variaciones en las comunidades microbianas según las variables ambientales a lo largo del continuo acuático y el tipo de hábitat (planctónicos, asociado a partículas, biofilm (Callieri et al., 2018; Vannote et al., 2011).

Según Doherty et al. (2017), factores como la descarga del río y la salinidad son las variables principales que estructuran las comunidades bacterianas planctónicas en ríos tropicales. Sin embargo, la composición microbiana de sistemas fluviales está influenciada por diversas variables ambientales *in situ* como la calidad de materia orgánica, la cantidad

de nutrientes disponibles, la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la turbidez del cauce (penetración de luz) (Doherty et al., 2017; Zeglin, 2015). Se ha observado que, la comunidad microbiana fluvial está dominada por bacterias (principales transformadores de nutrientes) (Battin et al., 2009) y que existe una mayor diversidad de bacterioplancton en los ríos de cabecera, es decir, en aquellos con mayor contacto con zonas ribereñas, agua subterránea y suelo, y cuya diversidad disminuye río abajo dada una menor influencia ribereña (Battin et al., 2016; Savio et al., 2015a). Por otra parte, la diversidad de microorganismos tiende a disminuir con el aumento de la profundidad, siendo que en la superficie prevalecen bacterias aeróbicas y en las profundidades bacterias anaeróbicas, reductoras y fermentativas (Gao et al., 2017; Makedonsko et al., 2012). Gracias a análisis de genes de ARNr 16S en sistemas lóticos, se identificó que generalmente están presentes bacterias pertenecientes a Betaproteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobiota y Alphaproteobacteria (Ghai et al., 2011).

Actualmente, se reportan una cantidad muy reducida de estudios sobre la caracterización, composición y diversidad microbiana a lo largo del continuo acuático de sistemas lóticos tropicales o estudios que exploren la relación entre patrones de diversidad microbiana en ríos tropicales y variables ambientales (Battin et al., 2016; Doherty et al., 2017; Li et al., 2021; Zeglin, 2015). Adicional a ello, Köchling et al. (2017), mencionan que es necesario realizar más estudios para evaluar las poblaciones microbianas en los ecosistemas lóticos y su respuesta adaptativa a las condiciones ambientales del sistema, que en ciertos casos se encuentra influenciada por contaminación antropogénica.

Esta información es un indicativo de los pocos estudios realizados en sistemas lóticos tropicales, que generalmente se han centrado en las comunidades de las biopelículas de ríos o arroyos muy pequeños, o en grandes cuencas como el Amazonas (Ghai et al., 2011b). Li et al. (2021) afirman que en los últimos años, los estudios de abundancia y diversidad microbiana en ecosistemas fluviales han incrementado, pero falta comprensión sobre el tema. Además, estos autores mencionan que la mayor cantidad de estudios se enfocan en los países de Europa, Estados Unidos y China, dejando a un lado al resto de regiones, como las tropicales (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios previos sobre comunidades microbianas en ríos tropicales.

País	Tema
Referencia	
México Breton et al. (2019)	Estudio integrador de la dinámica de la comunidad microbiana y la calidad del agua en el río Apatlaco, el cual se encuentra con rasgos de contaminación industrial.
Brasil Kochling et al. (2017)	Impacto de la contaminación en la diversidad microbiana de un río tropical en una región urbanizada del nordeste de Brasil.
Indonesia Duvert et al. (2019)	Fuentes y factores de contaminación en un río tropical urbano (Ciliwung, Indonesia): donde se emplea ADN microbiano, isótopos y la química del agua.
Tailandia Thoetkiattikul et al. (2017)	Estudio independiente del cultivo de comunidades bacterianas en sedimentos fluviales tropicales.
India Vignesh et al. (2015)	Efectos en las comunidades microbianas por los parámetros geoquímicos de una cuenca fluvial tropical.
Brasil Dias Santos-Júnior. (2021)	Estudio de genomas de las poblaciones microbianas del río Amazonas, que revelan una posible modulación del proceso de degradación de la materia orgánica en aguas dulces tropicales.
Ecuador Borja et al. (2020)	Determinación de las características físicas y químicas de un río de la Provincia de Pichincha, así como de los coliformes totales.

3.3 HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN MICROBIANA

La diversidad total de las comunidades microbianas no se ha podido determinar con precisión, dada la dificultad de cultivar en laboratorio a varias especies. Se estima que, para sistemas de agua dulce, se puede cultivar cerca del 0,25% de los microorganismos, y gracias a la aplicación de enfoques moleculares dirigidos al gen 16S del ARN ribosomal (ADNr), – desarrolladas a partir de 1980s–, disminuyó esta dificultad (Degnan y Ochman, 2012; Jones et al., 1985). Actualmente, se estima que existen cerca de 400 000 especies de bacterias y arqueas con base a las secuencias 16S ADNr (Yarza et al., 2014); sin embargo, sólo se han podido cultivar y describir válidamente ~14 000 (Overmann et al., 2017; Yarza et al., 2014).

Gracias a los avances científicos-tecnológicos se desarrollan métodos moleculares para la identificación de microorganismos acuáticos como el análisis de la secuencia 16S ARNr, las estrategias de amplificación por PCR y las herramientas computacionales para análisis de datos, como la línea de comandos de QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (Muhamad et al., 2020; Yang et al., 2016). Esto revela niveles inesperados de biodiversidad, procesos microbianos y funcionamiento ecosistémico (Caporaso et al., 2011). Para estos fines, lo más frecuente ha sido amplificación por PCR del gen 16S ARNr, para luego secuenciarlo (Hazen et al., 2013). Este análisis proporciona información general sobre los taxones microbianos presentes en las muestras y sus cebadores están diseñados para dirigirse a una amplia gama de organismos (Kim y Chun, 2014). Así mismo, se han desarrollado programas que permiten una línea de análisis comparable entre diversos estudios de diversidad microbiana independientes de cultivo, los cuales han surgido bajo la iniciativa del *Earth Microbiome Project* Gilbert (et al., 2014). Por ejemplo, con la herramienta de análisis de datos QIIME es posible analizar comunidades microbianas en conjuntos de secuencias, incluido el cómputo de los ASVs (*Amplicon Sequence Variants*, secuencias únicas y representativas), asigna taxonomía, los cálculos de medidas de diversidad α y β , y otros análisis importantes de la comunidad microbiana (Caporaso et al., 2011). Por ejemplo, los índices de diversidad alfa, como el índice de Shannon o de Simpson, aumentan en función de la riqueza y la equitatividad microbiana del muestreo (Magurran, 2004). Con ello, se estudian sistemas ambientales, y los resultados son comparables con otras exploraciones de *metabarcoding* realizadas en otras partes del mundo.

3.2.1. LA REGIÓN V4 DEL GEN 16S rRNA

A principios de 1980, se desarrolló un nuevo método para identificación de bacterias, el cual permitió demostrar que las relaciones filogenéticas de todas las formas de vida podían determinarse comparando una parte estable del código genético. Los candidatos para esta área genética en bacterias incluían los genes que codifican para el 5S, 16S y el rRNA 23S y los espacios entre estos genes (Clarridge, 2004).

Las secuencias del ARN ribosomal 16S procariota se utilizan ampliamente en microbiología ambiental y evolución molecular como marcadores fiables para la clasificación taxonómica y el análisis filogenético de microorganismos (Yang et al., 2016). El gen 16S rRNA es comúnmente usado debido a que tiene regiones altamente conservadas para el diseño de cebadores, y a la vez regiones hipervariables para identificar características filogenéticas específicas de géneros (hasta con una confiabilidad del 96%) y en ciertos casos, limitada para especies (confiabilidad 87,5%) (Muhamad Rizal et al., 2020; Srinivasan et al., 2015; Tringe y Hugenholtz, 2008). Además, tiene una probabilidad reducida de transferencia horizontal de genes (HGT), su tasa de cambio es relativamente lenta y tiene predisposición a la evolución entre operones 16S dentro de un solo genoma (Tringe y Hugenholtz, 2008). Adicional a ello, se encuentra el factor de su tamaño, es decir, el gen 16S rRNA (~1500 pb) contiene en nueve regiones hipervariables que están separadas por nueve regiones altamente conservadas. Estas regiones hipervariables tienen un tamaño apropiado para las lecturas cortas generadas en las plataformas de secuenciación que tienden a ser más precisas (Muhamad Rizal et al., 2020; B. Yang et al., 2016). También, el gen 16S ARNr, posee una extensa base de datos de microorganismos generada gracias a las secuenciaciones, lo que lo convierte en un estándar para la identificación taxonómica (Park y Won, 2018).

El *metabarcoding* basado en genes de ARN ribosómico es el método de identificación más utilizado en microbiología que ha llevado al descubrimiento de una gran diversidad de microorganismos sin cultivar, que actualmente se asocian al estudio del 16S ARNr para bacterias y arqueas, y el 18S ARNr para eucariontes, empleando plataformas de secuenciación masiva para obtener un número amplio de lecturas. Al obtener un mayor número de secuencias (en el orden de miles por muestra), se logran mayores coberturas que alcanzan a detectar un gran número de microorganismos en las muestras ambientales más diversas (Clarridge, 2004). Consecuentemente, la introducción de las tecnologías de

Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por sus siglas en inglés) promovió el desarrollo de la metagenómica y *metabarcoding*, métodos para el estudio del material genético que no necesita del aislamiento y cultivo de microorganismos contenidos en una muestra.

Las plataformas masivas más empleadas en la actualidad para el gen 16S ARNr son: Illumina MiSeq, Illumina HiSeq, Roche 454, y Pacific Bioscience (Buermans y den Dunnen, 2014; Yang et al., 2016). Actualmente, de las nueve regiones hipervariables de conservación variable que el gen posee (V1-V9), las más usadas para el perfilado de la comunidad son los cebadores V4, V3-V4 o V4-V5 en plataformas Illumina para generar las secuencias del gen Illumina V4 16S rRNA con una longitud promedio de 250 a 430 pb (Bukin et al., 2019). Según Yang et al. (2016), las regiones V4 y V6 son las regiones más confiables para representar secuencias de 16S ARNr en la mayoría de los filios bacterianos.

El sistema MiSeqTM es un instrumento de sobremesa que permite la secuenciación de ADN y posterior generación de datos. Este sistema utiliza el proceso químico de secuenciación por síntesis de Illumina, tecnología que permite la generación de más del 90% de datos de secuenciación de todo el mundo. Es así como, MiSeq tiene acceso a BaseSpaceTM Sequence Hub, la plataforma informática basada en la nube genómica de Illumina (Illumina, 2021). El flujo de trabajo de MiSeq System toma 5 horas y media. Este proceso incluye la generación de bibliotecas de genes 16S ARNr, de las cuales: i) se amplificarán regiones variables del gen, ii) obtención/purificación de tamaños específicos de fragmentos deseados, iii) la añadidura de adaptadores de secuenciación a la región del ARNr 16S amplificado, iv) la cuantificación y normalización de los amplicones, v) la secuenciación, vi) el procesamiento de datos, y finalmente, vii) la interpretación y generación de un informe de contexto biológico. Este último, incluye el proceso de identificación de microorganismos con la comparación de una base de datos de referencia (Muhamad Rizal et al., 2020; Illumina, 2021).

El presente trabajo plantea evaluar la composición de la comunidad microbiana planctónica del río Usumacinta, un sistema fluvial tropical transfronterizo entre México y Guatemala que forma parte del sistema fluvial más importante de México (Grijalva-Usumacinta) y uno de los más importantes de América del Norte (Benke y Cushing, 2009). Previamente, se realizaron las primeras caracterizaciones de las variables ambientales de diversos afluentes y cauce principal de la cuenca media y baja del río Usumacinta, así como

la evaluación de la concentración y flujo de C orgánico en la cuenca (Soria, 2020). En estos estudios se encontró que la litología kárstica y los extensos humedales de la cuenca baja tienen un papel importante en el comportamiento de las variables ambientales, nutrientes y fracciones de C (Cuevas-lara et al., 2021). Consecuentemente, en el presente estudio, se analizará la diversidad microbiana de muestras obtenidas en la columna de agua (superficie y fondo) de seis sitios de estudio que corresponden a la cuenca media (ríos Tzendales, Lacantún y Usumacinta en Frontera Corozal) y cuenca baja (Usumacinta en Tres Brazos, San Pedro San Pablo y Laguna cometa).

Este estudio proveerá un mejor entendimiento de la biodiversidad microbiana de los sistemas lóticos tropicales. Además, ayudará a resolver incógnitas del proyecto “*Dinámica del carbono y emisiones de gases de efecto invernadero a lo largo de la cuenca media y baja del río Usumacinta, México. Concentración, transformaciones y flujos*” que se enfoca en evaluar las emisiones de gases de efecto invernadero del río, así como la calidad y composición de la materia orgánica. Con ello, se generará conocimiento en torno a este tema, se aportará información base para conocer la diversidad microbiana asociada a procesos biogeoquímicos del río, y se contribuirá a estudios posteriores sobre fenómenos producidos en sistemas fluviales tropicales, que difieren ampliamente de los templados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la comunidad microbiana de la columna de agua del río Usumacinta (México) mediante exploraciones del gen 16S ARNr, para identificar patrones de variación espacial (cuenca media y baja) con relación a algunas variables ambientales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la diversidad microbiana planctónica presente en el río Usumacinta mediante exploraciones del gen 16S ARNr para el período de lluvias 2021 y definir la abundancia relativa de los grupos más relevantes.

- Obtener las variables fisicoquímicas de los sitios de muestreo como pH, conductividad eléctrica, temperatura, oxígeno disuelto, sólidos suspendidos y contenido de clorofila *a*.
- Determinar patrones de variación espacial de la composición microbiana de la cuenca media y baja del río Usumacinta y su relación con las variables ambientales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. SITIO DE ESTUDIO

La cuenca del río Usumacinta se ubica en México, Guatemala y una pequeña porción en Belice. Forma parte del sistema fluvial más importante del país y el décimo de América del Norte y pertenece a la Región Hidrológica No.30 Grijalva-Usumacinta, en el sureste mexicano. Posee una longitud de ~1 100 km, un área drenaje de ~112 550 km² y un caudal (Benke and Cushing, 2009; Muñoz-Salinas and Castillo, 2015a). El río Usumacinta posee una extensión de 77 743,6 km², lo cual lo convierte en el más largo de Mesoamérica y el sexto más largo de Latinoamérica (Soares y García, 2017a). El río nace en la Sierra de los Cuchumatanes en Guatemala, ingresa a México por la selva Lacandona, pasa por los Estados de Chiapas, Tabasco y Campeche; además, se alimenta de escurrimientos de las subcuencas de los ríos Chixoy-Salinas, La Pasión, Lacantún y San Pedro (Saavedra Guerrero et al., 2015). Así mismo, 24 km antes de su desembocadura al Golfo de México, el río Grijalva se une a Usumacinta en la zona “Tres brazos”, que constituye uno de los sistemas de humedales y llanuras de inundación más extensos e importantes de México y América del Norte, esta unión da origen al extenso delta conocido como Pantanos de Centla (Benke y Cushing, 2009). La cuenca se divide en tres zonas: cuenca alta, media y baja, por sus características físicas de hidrología, altitud y relieve (Saavedra Guerrero et al., 2015).

El clima del lugar es húmedo tropical con precipitaciones anuales que van de ~1 500 a 2 500 mm (Carabias et al., 2000; Soares and García, 2017), y una temperatura media anual que va de 19.2 a 26.7°C según la altitud (Saavedra Guerrero et al., 2015). La región muestra un patrón monomodal con una intensa temporada de lluvias en verano (junio-noviembre), por la presencia de los vientos alisios; y una temporada de invierno (diciembre-mayo), durante la presencia de los vientos monzónicos derivados de la Convergencia Intertropical (Carabias et al., 2000; Soares y García, 2017).

La cuenca del río Usumacinta tiene una gran variedad de tipos de vegetación y uso de suelo. El área mejor conservada es la subcuenca del río Lacantún, entre Guatemala y México, la cual representa un 65% de cobertura natural entre bosque de pino-encino y selva perennifolia, y un 29% asociado a actividades antropogénicas como pastizales destinados a ganadería extensiva y agricultura (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018). Por

otro lado, el área menos conservada es la subcuenca San Pedro-San Pablo, en donde el 26% corresponde a humedales destinados a uso agrícola y pastizales, 7% de agricultura asociada a matorrales y una cobertura boscosa del 25% (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018). Alrededor de la cuenca habitan 2 353 842 personas (García, 2010) y se encuentra afectada por varias actividades antropogénicas, principalmente el cambio de uso de suelo por la actividad ganadera y agricultura (Soares y García, 2017).

De estudios previos del monitoreo se sabe que las características fisicoquímicas del río varían a lo largo del año, pero se han encontrado que siempre existe oxígeno disuelto en la columna de agua con un mínimo de 1.9 mg/L en la estación San Pedro/San Pablo de la cuenca baja. La temperatura del agua es mayor a los 22.4 °C, siendo menor en los sitios de Tzendales, Lacantún y Frontera Corozal. Los valores máximos y mínimos de los parámetros fisicoquímicos serán mostrados en extensión posteriormente.

4.2. SITIOS DE MUESTREO Y TOMA DE MUESTRA

Los sitios de muestreo del río Usumacinta del presente estudio correspondieron a las estaciones: Tzendales (M1), Lacantún (M2), Usumacinta en Frontera Corozal (M3), Usumacinta en Tres Brazos (B1), Laguna Cometa (B2) y San Pedro/San Pablo (B3) (Figura 1).



Figura 1. Sitios de muestreo del Río Usumacinta para este estudio. Abreviaciones: M1 Tzendales, M2 Lacantún, M3 Usumacinta en Frontera Corozal, B1 Usumacinta en Tres Brazos, B2 Laguna Cometa y B3 San Pedro/San Pablo. Las muestras de la cuenca media son M1, M2 y M3; mientras que, las de la cuenca baja son B1, B2 y B3. Fuente: Soria (2020).

Para cada sitio de muestreo se estableció un transecto transversal del río en noviembre 2021, para obtener las muestras microbiológicas, las de sólidos totales suspendidos (SST) y clorofila “a” (Clor-a). Para ello, se tomaron muestras de agua de la superficie del centro del río, utilizando una botella horizontal Van Dorn. Las muestras se

almacenaron en viales de centrifuga estériles de 50 mL, para evitar contaminación. Todo el material colectado en campo se llevó al laboratorio en hielera a 4 °C y con bolsas oscuras para impedir fotoinhibición. En el laboratorio, las muestras de material microbiológico se filtraron con equipo de filtración al vacío por membranas Durapore PVDF de 0,22 µm; los filtros se guardaron en tubos estériles y preservaron a -20 °C para su procesamiento.

Adicionalmente, para comprender mejor las variables fisicoquímicas como pH y conductividad eléctrica, oxígeno disuelto y temperatura, que influyen en el río, se consideró una base de datos del mes de noviembre de los años 2017, 2018, 2019, ya que no se han visto fluctuaciones anuales y no fue posible obtener los datos de noviembre 2021. Para realizar esta base de datos, se consideraron los datos del equipo de trabajo tomados *in situ* de la columna de agua de los muestreos en la temporada de lluvias (noviembre). Los datos de temperatura, oxígeno disuelto (OD), pH y conductividad eléctrica (K25) se obtuvieron con la sonda multiparamétrica Hydrolab modelo DS5, previamente calibrada y acoplada a un sistema de almacenamiento modelo SVR4a, con una resolución vertical de 1 m.

4.3. OBTENCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES (SST)

Para la obtención de la concentración de sólidos suspendidos totales (SST), se tomó una alícuota de la muestra de agua de cada perfil vertical y se filtró con una bomba de vacío usando filtros Whatman tipo GF/F de 47 mm de diámetro (0,9 µm de apertura nominal). Dichos filtros fueron pre-combustionados en una mufla Thermolyne modelo 48000 (4 horas, a 550 °C) y previamente pesados a temperatura ambiente con una balanza analítica marca Mettler Toledo para posteriormente almacenarlos en un desecador. Se previnieron posibles contaminaciones por manipulación y retención de sales en la matriz del filtro con un filtro como blanco colocado debajo de cada muestra. Después de la filtración, los filtros se secaron en un horno Lab-line Instruments modelo 3512 (48 horas a 60 °C) y se pesaron nuevamente para obtener por diferencia de peso las concentraciones SST, en función de volumen de agua filtrado (mg/L; Elosegí y Sergi, 2011). Las muestras se midieron por duplicado y el resultado final se obtuvo calculando el promedio de estas mediciones.

4.4. OBTENCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA “a”.

En la obtención de la concentración de clorofila “a” (Clor-a) se siguió el método 445.0 de la EPA. Se filtró un volumen conocido de cada muestra a través de filtros GF/F (Whatman, 13 mm de diámetro, apertura de poro nominal 0,7 μm), de los que posteriormente se extrajo la Clor-a con 10 ml de acetona al 90% durante un periodo entre 18 y 20 horas en oscuridad y refrigeración. Dicha Clor-a posteriormente fue analizada en un fluorómetro digital marca Turner Designs modelo 10-AU. Todas las muestras se midieron por triplicado y el resultado final reportado es el promedio de estas mediciones.

4.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Para determinar la estructura y diversidad microbiana de las muestras de agua del río, se extrajo el DNA metagenómico (mgDNA) de la biomasa microbiana colectada en membranas de 0,22 mm usando el kit de extracción DNeasy PowerWater Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El mgDNA resultante se resupendió en 30 μL de solución Tris (pH 8.0). Cada muestra de mgDNA obtenido se cuantificó con el fluorómetro Qubit4 (ThermoFisher Scientific) y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

4.6. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS 16S ADN_r POR PCR

Para la amplificación de fragmentos 16S ADN_r se utilizó lo estipulado por el Earth Microbiome Project (Gilbert y Dupont, 2011). Se utilizó el marcador 16S ARN_r, el cual fue obtenido de las muestras de ADN mediante los oligonucleótidos contenidos en la tabla 2 para analizar al componente Bacteria y Archaea. El gen 16S ARN_r se utilizó para analizar la composición y estructura del componente Bacteria y Archaea en todas las muestras.

Tabla 2. Marcadores moleculares

Gen	Secuencia	Amplicón	Tm	Referencia	
oligonucleótidos			(°C)		
rrn-16S	515F 806R	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA GGACTACHVGGGTWTCTAAT	290 pb	50	Caporaso et al. (2012)
rRNA					

Se realizaron reacciones de PCR de tipo punto final para obtener las librerías 16S ARNr para identificar a la comunidad procariota usando el mgDNA obtenido. Las reacciones de 25 µL de volumen contuvieron: 1X buffer de PCR, 10 pmol de cada oligonucleótido iniciador (primer), 200 µm de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1,5 mM de MgCl₂ y 1 U de DNA polimerasa TakaRA Taq (Takara Bio Inc.), y entre 5 a 10 ng del mgDNA extraído. El programa de amplificación para los genes tuvo adaptaciones de temperatura de alineamiento y el tiempo de amplificación específico para cada primer. Se programó el termociclador según el protocolo descrito en la tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de amplificación

Fases	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Amplificación			35
Desnaturalización	94°C	30 segundos	
Alineamiento	55°C	30 segundos	
Amplificación	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Los amplicones obtenidos se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa de 1,5%, tinción con SYBR-safe (Invitrogen) y visualización con el equipo SmartDoc (Accuris Instruments). Las reacciones de PCR fueron realizadas en tres triplicados independientes, y al final se conjuntaron para obtener un total de 75 µL de reacción.

4.7. SECUENCIACIÓN

Previo a la secuenciación, se removieron los componentes no deseados de las reacciones de PCR (ADN total, oligonucleótidos iniciadores, dNTPs, etc), y se mantuvieron los fragmentos 16S ADNr para secuenciar. Para purificar los amplicones se utilizaron perlas magnéticas del kit Agencourt AMPure XP PCR Purification System (Beckman Coulter) siguiendo el protocolo del fabricante. Tras ser recuperados, éstos fueron cuantificados y enviados a secuenciar en la plataforma Illumina MiSeq en el *Yale Center for Genome Analysis* de la Universidad de Yale, Estados Unidos (~30 ng por muestra).

4.8. ANÁLISIS DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para analizar las variables fisicoquímicas y su agrupación, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el objetivo de determinar qué variables ambientales explicaban mejor la varianza de los resultados de manera espacial, y para comprobar la asociación o separación entre las estaciones de muestreo de la temporada de lluvias. Los análisis se realizaron en la plataforma R (R Development Core Team) bajo el ambiente integrado RStudio. Para el ACP se empleó la función “fviz_pca” en el programa “factoextra” (“ggvegan”, “ggplot2” y factoextra”). La matriz se realizó tomando en cuenta las siguientes variables normalizadas logarítmicamente: pH, temperatura, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, sólidos suspendidos totales y Clor-a.

Para los análisis de la comunidad procarionte, las secuencias de 16S ARNr obtenidas fueron filtradas y demultiplexadas usando la línea de comandos QIIME2 en concordancia con el método reportado por (Caporaso et al., 2011) y la guía de la página web (<https://qiime2.org>). La calidad de las secuencias varió a lo largo del amplicón acorde a lo mostrado en la Figura A1. Una vez demultiplexadas, las secuencias se pasaron por un filtro de calidad, se parearon y se eliminaron las quimeras con DADA2 (Callahan et al., 2016). Las secuencias filtradas se asignaron taxonómicamente usando la base de datos de Silva, empleando la actualización de noviembre 2021 (v.138) (<http://arb-silva.de>).

Los análisis de diversidad alfa y beta de las comunidades procariotas, así como las gráficas de abundancia relativa se realizaron con el programa PHYLOSEQ (McMurdie y

Holmes, 2013) (<https://joey711.github.io/phyloseq/>), en la plataforma R (R Development CoreTeam, 2012). Para estos análisis se eliminaron las secuencias de cloroplastos (microalgas) y mitocondrias, con el fin de analizar sólo la comunidad procarionte. Para analizar la diversidad alfa de las comunidades procarióticas se calculó con el número de ASVs observados, el índice de Shannon, y de Simpson inverso ($1-D'$), los cuales fueron estimados con PHYLOSEQ.

Adicionalmente, se desarrolló el análisis de diversidad beta entre los diferentes sitios de estudio realizando un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en PHYLOSEQ (<https://joey711.github.io/phyloseq/>) en la plataforma R (R Development CoreTeam), empleando el algoritmo PCoA – Unifrac como se menciona en McMurdie y Holmes, 2013

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS

Para los análisis fisicoquímicos, los valores de temperatura, oxígeno disuelto (OD), pH y conductividad eléctrica, se obtuvieron de los registros del grupo de trabajo para el mes de noviembre en los años 2017, 2018, 2019. Mientras que, la concentración de sólidos suspendidos totales y de clorofila “a” para cada punto de muestreo del río fueron derivados de muestras analizadas para el muestreo de noviembre 2021 (Tabla 4).

Tabla 4. Principales características ambientales de los sitios de estudio para los años 2017, 2018, 2019, mostrando la concentración de sólidos suspendidos totales, concentración de Clor-a, y el máximo y mínimo de los valores de temperatura, oxígeno disuelto, pH y conductividad eléctrica (K25) de la temporada lluvias.

Punto de muestreo	Temperatura (°C)		OD [mg/L]		pH		K25 (µS/cm)		Clor-a (µg/L)	SST (mg/L)
	min	max	min	max	min	max	min	max		
	M1	23,40	25,20	7,95	9,41	7,80	7,97	539,00		
M2	22,13	23,93	8,44	9,14	7,90	8,17	373,00	437,00	0,20	37,80
M3	24,24	26,37	5,76	7,97	7,65	7,85	284,00	503,00	0,91	35,73
B1	26,70	28,01	4,50	6,90	7,40	7,70	360,00	507,00	2,06	50,40
B2	27,40	30,20	1,70	5,60	7,00	7,40	382,00	1708,00	1,99	36,75
B3	28,70	30,01	8,10	1,70	7,30	8,00	6541,00	29918,00	2,54	1,80

Nota: OD = oxígeno disuelto; T = temperatura; K25 = conductividad eléctrica; Clor-a = clorofila a; SST = sólidos suspendidos totales.

Primeramente, se analizaron los valores máximos y mínimos registrados en el mismo mes de muestreo, cuatro años antes del mismo. En el caso de la cuenca media se puede observar que la temperatura mínima entre los puntos M1, M2 y M3 fue de 22,13 °C, correspondiente al punto M2, y la máxima fue de 26,37 °C (M3). Para la cuenca baja, se

puede observar que la temperatura mínima entre los puntos B1, B2 y B3 fue de 26,7 °C (B1), mientras que, la temperatura máxima entre los tres puntos fue de 30,20 °C (B2). En el caso de la concentración de oxígeno disuelto, se determinó que la mínima entre los tres puntos de la cuenca media fue de 5,76 mg/L (3), y una máxima de 9,41 (M1). Por otra parte, en la cuenca baja, la concentración mínima entre los tres puntos fue de 1,7 mg/L (B2), y la máxima fue de 6,9 mg/L (B1).

Para el pH del río, se encontró que el valor más bajo entre los tres puntos de la cuenca media fue de 7,65 (M3), y el valor máximo de 8,17 (M2). En la cuenca baja, el valor de pH más bajo entre los tres puntos fue de 7,00 (B2), y el valor máximo fue de 8,00 (B3). Así mismo, en la conductividad eléctrica del río (K25), se determinó que el valor más bajo entre los tres puntos de la cuenca media fue de 284 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (M3), y el valor máximo fue de 751 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (M1). Por otra parte, en la cuenca baja el valor más mínimo de conductividad eléctrica entre los tres puntos fue de 360 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (B1), y el valor máximo fue de 29918 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (B3).

En cuanto a la concentración de Clor-a se determinó que, el valor más bajo entre los tres puntos de la cuenca media fue de 0,13 $\mu\text{g}/\text{L}$ (M1), y el valor más alto fue de 0,91 $\mu\text{g}/\text{L}$ (M3). En la cuenca baja, el valor más bajo entre los tres puntos fue de 1,99 $\mu\text{g}/\text{L}$ (B2), y el valor máximo más alto fue de 2,54 g/L (B3).

Finalmente, con los valores de sólidos suspendidos totales, se pudo determinar que el valor más bajo entre los tres puntos de la cuenca media es de 9,5 mg/L (M1), y el valor más alto, corresponde al punto M2 con 37,8 mg/L. Por otra parte, en la cuenca baja, se pudo ver que el valor más bajo fue de 1,8 mg/L (B3), y el más alto fue de 50,4 mg/L (B1).

Para observar de mejor manera las relaciones entre los sitios y las variables fisicoquímicas registradas, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) considerando los valores promedio de los perfiles de la columna de agua (Figura 2, Anexo-tabla A1). Con este análisis se observa que los puntos B1, B2 y B3, –correspondientes a la cuenca baja–, tienen mayor temperatura que los puntos M1, M2 y M3, –correspondientes a la cuenca media–. Así mismo, se puede ver que los puntos M1, M2 y M3, tienen mayor cantidad de oxígeno disuelto, y mayores valores de pH que los puntos B1, B2 y B3. Adicionalmente, los puntos M1, M2 y M3 tienen una conductividad menor en relación con los puntos B1, B2 y B3, siendo el punto B3 el lugar el valor más alto (10836 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Así

mismo, los puntos B1, B2 y B3 tienen mayor concentración de clorofila "a" en relación con los puntos M1, M2 y M3, siendo el punto B3, el lugar con la más alta concentración (2,54 $\mu\text{g/L}$). En cuanto a la concentración de sólidos suspendidos totales, los sitios de muestreo B1, B3, M3, M2 tienen una concentración mayor que los puntos B3 y M1, siendo B1 el punto con mayor concentración (50,4 mg/L).

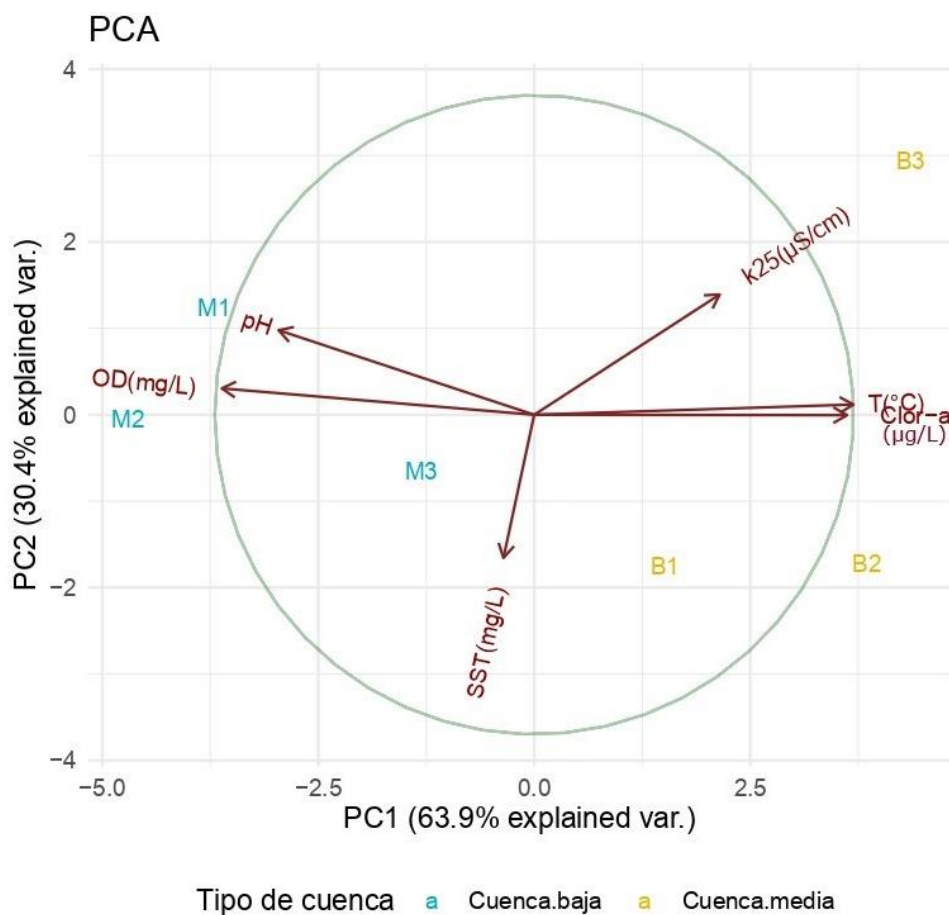


Figura 2. Análisis de componentes principales de las características fisicoquímicas promedio del Río Usumacinta para la temporada de lluvias 2017, 2018, 2019 (noviembre).

5.2 DIVERSIDAD DE INDIVIDUOS Y RIQUEZA DE ASVs

5.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS 16S

ADNr

Para este trabajo, se obtuvieron bajos rendimientos de ADN de todas las muestras procesadas, es decir, menos de 0.02 ng/ μ L por muestra, acorde a la cuantificación por fluorimetría. Pese a ello, se siguió el procesamiento de éstas para obtener amplicones 16S rRNA para la secuenciación. Tras la amplificación y purificación por perlitas magnéticas de tres reacciones de PCR se obtuvieron amplicones en una concentración de 0,461 a 1,53 ng/ μ L (Tabla 5), y se seleccionaron las muestras donde se contaba con aproximadamente > 1.00 ng/ μ L, enviándose un total de 30 ng de amplicones 16S ARNr purificados al secuenciador.

Tabla 5. Concentración de amplicón 16S rRNA purificado, volumen y ng enviados al secuenciador de los diferentes puntos de muestreo del río.

Muestra	Sitio de muestreo	Concentración de amplicón 16S ARNr purificado (ng/ μ L)	Volumen enviado al secuenciador (μ L)	Cantidad enviada amplicón 16S ARNr purificado (ng)
B1.1	B1	0,461	No enviado	0
B2.1	B2	1,33	22,56	30
B3.1	B3	1,22	24,59	30
M1.1	M1	1,53	19,6	30
M2.1	M2	0,983	30,5	30
M3.1	M3	0,967	31,0	30
M3.3	M3	0,985	30,5	30

De las muestras enviadas se obtuvo un total de 79 432 secuencias crudas de la región hipervariable V4 16S ARNr (~290 pb) de los dominios Bacteria y Archaea (Tabla 6). Tras el filtrado, “*denoising*”, y pareado de las secuencias –que implicó la remoción de secuencias de baja calidad y quimeras–, se recuperaron 8 432 secuencias, lo que implicó

aproximadamente un 10 % de eficiencia. Asimismo, estas secuencias fueron agrupadas en un total de 621 variantes de la secuencia del amplicón o ASVs por su nombre en inglés (*Amplicon Sequence Variants*).

Tabla 6. Número de secuencias obtenidas, filtradas, “denoised”, pareadas y no quiméricas.

Muestra	Sitio	Secuencias crudas	Secuencias filtradas	Secuencias “denoised”	Secuencias pareadas	Secuencias no quiméricas
M1	M1	11 608	1 624	1 482	1 236	1 229
M2	M2	18 590	2 406	2 015	1 416	1 416
M3.1 y 3.3	M3	22 253	4 360	4 136	3 649	3 601
B1	B1	0	0	0	0	0
B2	B2	13 997	580	405	308	308
B3	B3	12 984	2 357	2 179	1 886	1 878
TOTALES		79 432	11 327	10 217	8 495	8 432

5.2.2. ANÁLISIS DE RIQUEZA Y DIVERSIDAD

Para cada muestra analizada se calcularon indicadores de diversidad y riqueza. Primeramente, de los ASVs observados que representan la riqueza, se encontró que el punto M3 tiene mayor número de éstos con aproximadamente 237 ASVs, seguido por el punto M2 con 152, luego el punto M1 con 123, B3 con 88, B2 con 50 (Figura 3). Comparando entre cuenca baja y cuenca media, se puede observar que existe mayor riqueza en la cuenca media que en la baja, pero estos valores no son significativamente diferentes ($p=0.1160$).

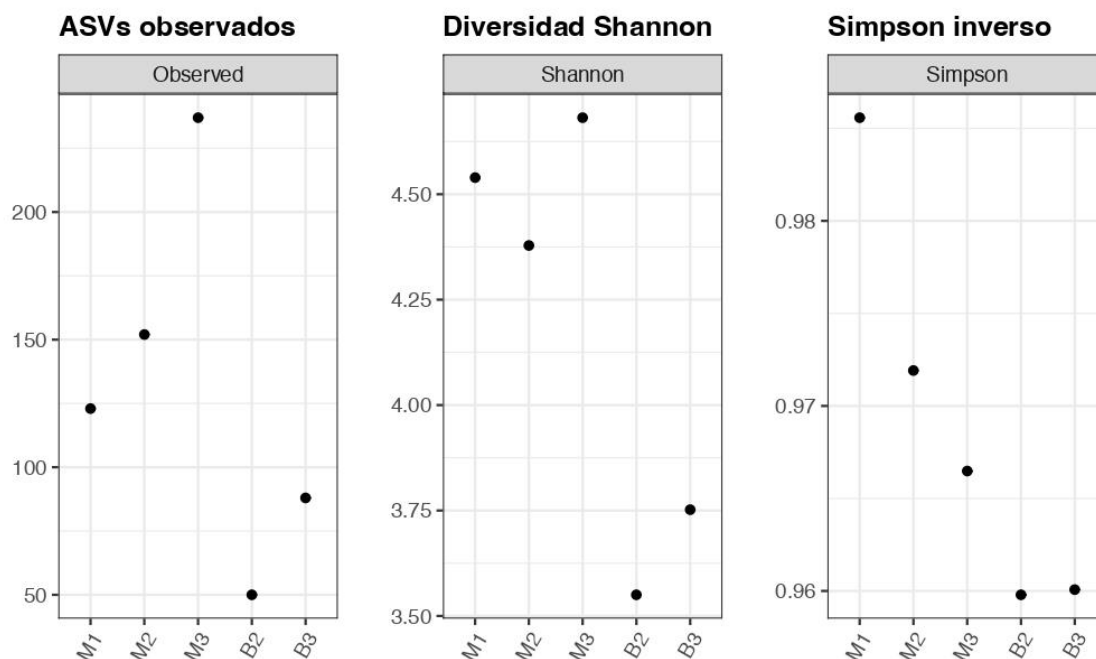


Figura 3. Patrones de diversidad obtenidos de los diferentes puntos del Río Usumacinta. Se incluyen ASVs (Amplicon Sequence Variants) observados, Diversidad Shannon y Simpson Inverso (Diversidad alfa).

El índice de diversidad de Shannon nos muestra que los puntos M1, M2 y M3 – correspondientes a la cuenca media– son bastante similares entre sí, con valores que oscilan entre 4,37 y 4,68. Las muestras B2 y B3 –correspondientes a la cuenca baja– tuvieron valores entre 3,55 y 3,75. Comparando las muestras de cuenca media y cuenca baja, se puede observar que estas son distantes entre sí, mostrando que hay menor diversidad en la cuenca baja que en la media; además, estos valores son significativamente diferentes ($p = 0.0074$) entre ellos.

Por otra parte, en el índice inverso de Simpson ($1-D'$) las muestras oscilaron entre 0,96 y 0,99, sugiriendo que hay similitud en las dominancias de los taxones o ribotipos encontrados. Para este índice no hubo diferencia significativa entre cuencas ($p=0.1382$)

5.2.3. ANÁLISIS DE ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD

El análisis PCoA mostró que la estructura de la comunidad procariótica, de cuenca baja y media se agrupaban ligeramente entre ellas cuando se consideran los patrones de

presencia/ausencia de los ASVs (Figura 4a). Al aplicar una prueba de dispersión beta a estas distancias, se encontró que las muestras se separaban significativamente por cuenca ($p = 0.008333$), y además el PCoA ofrece una explicación $> 50 \%$ entre los ejes. Este nivel de explicación en los ejes se incrementa cuando se consideran los ASVs y sus abundancias relativas, explicado ahora una variabilidad del 73.4% (Figura 4b). Las muestras ahora se separan de forma similar entre las cuencas, pero no se encontró una diferencia significativa ($p = 0.6083$). Paralelamente, se puede observar que los sitios M1 y M3 son semejantes conforme a los ribotipos procarionticos encontrados, mientras que, M2 se separó de éstos.

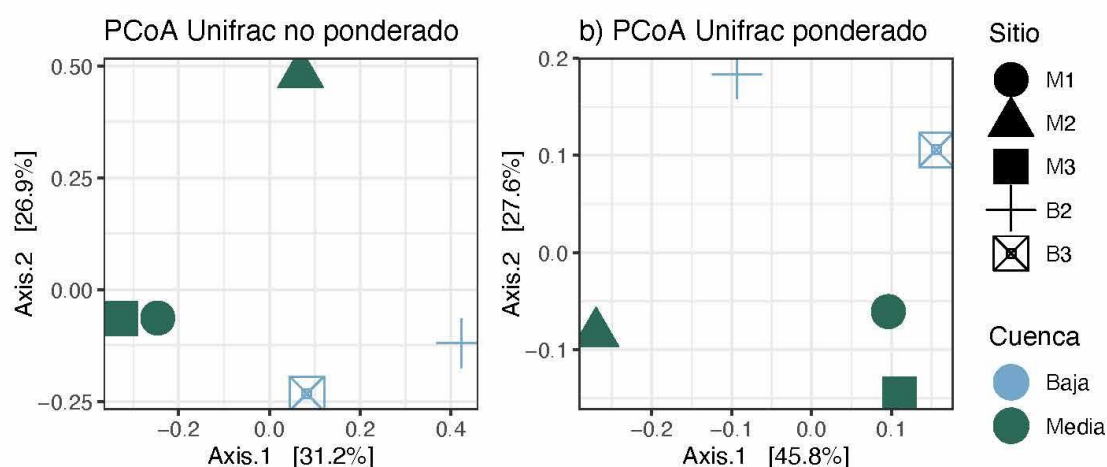


Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) con algoritmo Unifrac de las comunidades de bacterias y arqueas basado en las secuencias del gen 16S ARNr. Cada símbolo diferente especifica un sitio de muestreo, y el color, la cuenca donde se encuentra. a) PCoA considerando no ponderado. b) PCoA ponderado.

Se realizó un diagrama de Venn para verificar qué ASVs se compartían entre las muestras (Figura 5). En la figura se muestra que para cada sitio hay una microbiota única y que, en este momento, sólo se compartía un ASV, el cual corresponde a una secuencia de *Synechococcus* sp. (ASV: 687d35fceb1b41532cb5a1b39978810).

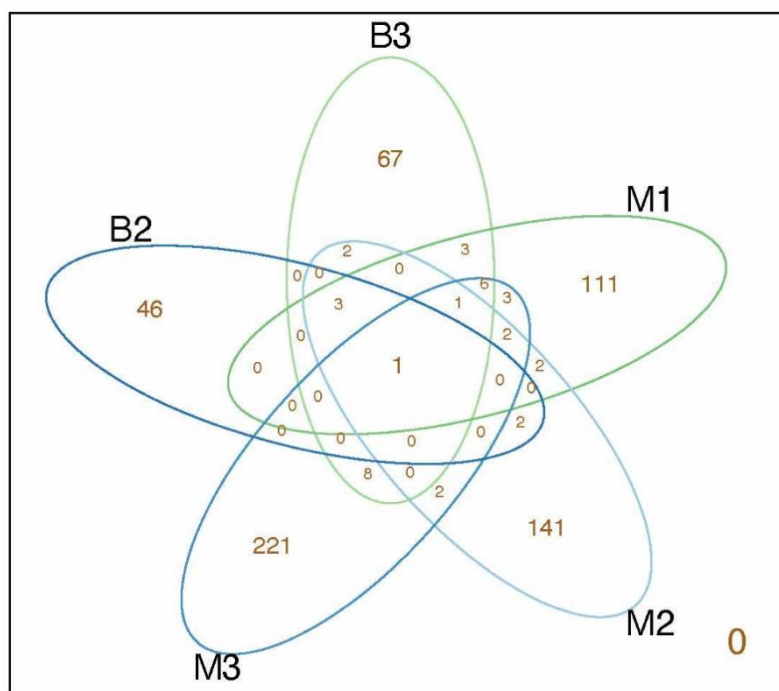


Figura 5. Diagrama de Venn de los ASVs compartidos entre los puntos M1, M2, M3, B1 y B2 del río.

5.3. ABUNDANCIA DE LOS GRUPOS TAXONÓMICOS

Para el análisis de abundancia de los grupos taxonómicos se realizó gráficas de los principales fila encontrados de Bacteria y Archaea. Además, se profundizó a niveles taxonómicos inferiores en procariotas pertenecientes a Bacteroidota, Crenarchaeota, Cyanobacteria, Desulfobacterota, y Proteobacteria. Adicionalmente, se realizó una gráfica de familias de organismos metanotróficos y metilotróficos.

En este contexto, como se observa en la Figura 6, los fila principales dentro de las muestras del río fueron Acidobacterota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Crenarchaeota, Cyanobacteria, Desulfobacterota, y Proteobacteria. Proteobacteria fue el filo más dominante de los 5 puntos, oscilando entre 21 y 60 %; seguido de Bacteroidota (2,1-20,4 %). Después se encuentran Cyanobacteria con 3,7 al 12,5 %, y Desulfobacterota con 0,27 a 13,4 %, siendo este filo sulfato reductor más abundante en el sitio M2 (13,4%) y B2 (8,2 %). En menos proporción se encontraron Acidobacteriota (0,65-5,7 %) y Actinobacteriota (0,14-5,7 %).

Respecto a las arqueas, el principal filo fue Crenarchaeota con 0,64 a 9,7 %, siendo M2 el sitio con más porcentaje de este filo.

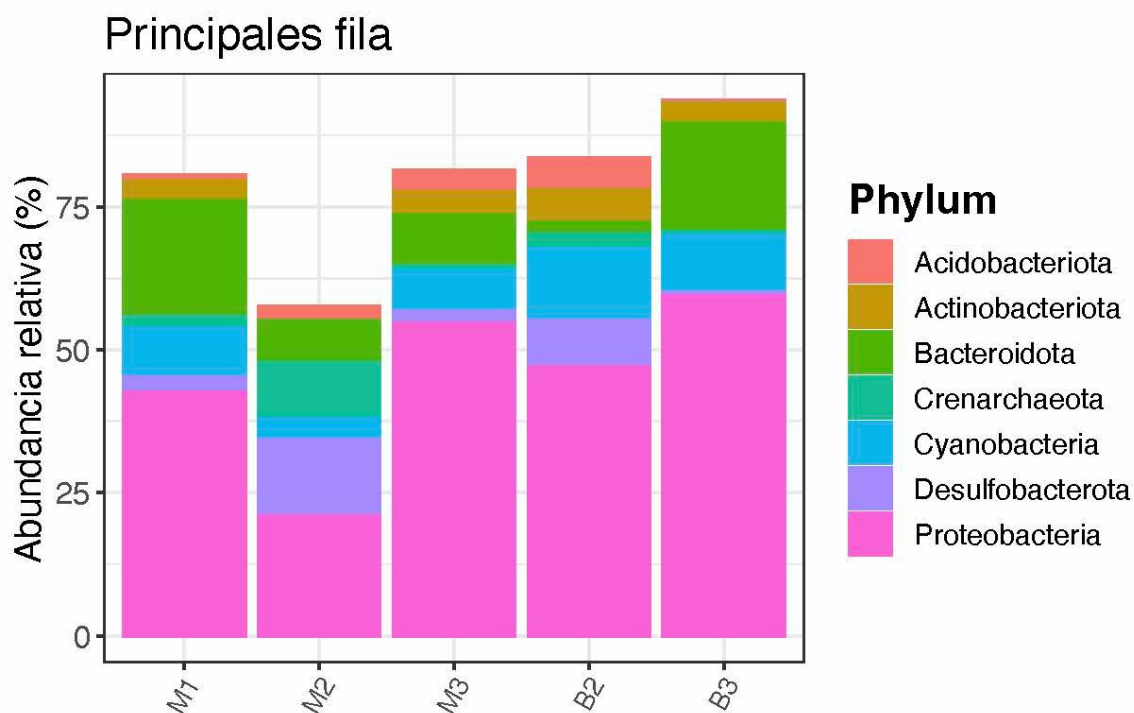


Figura 6. Abundancia relativa de los principales fila de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada filo de Bacteria y Arquea.

Para Cyanobacteria (Figura 7), los principales órdenes encontrados fueron Cyanobacteriales, Eurycoccales, Phormidesmiales, Pseudanabaenales, Synechococcales, y Thermosynechococcales; siendo los Synechococcales los más abundantes en 4 de 6 puntos con 3,3 a 9,1 % de abundancia relativa. Los Phormidesmiales se encontraron mayoritariamente en las muestras de la cuenca baja, como B2 y B3 (3,2 y 0,8%, respectivamente), y en la cuenca media sólo en M1 (0,26 %), donde estas secuencias no pudieron afiliarse a nivel género, pero mostraron que correspondían a la familia Nodosilineaceae. Los Eurycoccales se encontraron exclusivamente en la muestra M1 (1,72 %), y estas secuencias se definieron como no clasificadas. Finalmente, los Cyanobacteriales tuvieron una abundancia relativa de 0 a 1,29 %, siendo M1 (1,29 %) y B2 (1,07 %), aquellos con mayor abundancia. De los Synechococcales, se sabe que las secuencias se relacionan a

géneros como *Cyanobium*, *Schizothrix* y *Synechococcus*, siendo este último el más abundante en todas las muestras, especialmente en la cuenca baja (B2: 6,8 %, y B3: 9,1 %) (Figura 8a). Los Cyanobacteriales estuvieron representados por géneros como *Chroococcidiopsis*, *Microcystis*, *Synechocystis* y *Xenococcus*, donde en cada sitio hubo una dominancia de cada género con una abundancia máxima de 1,06 % (Figura 8b).

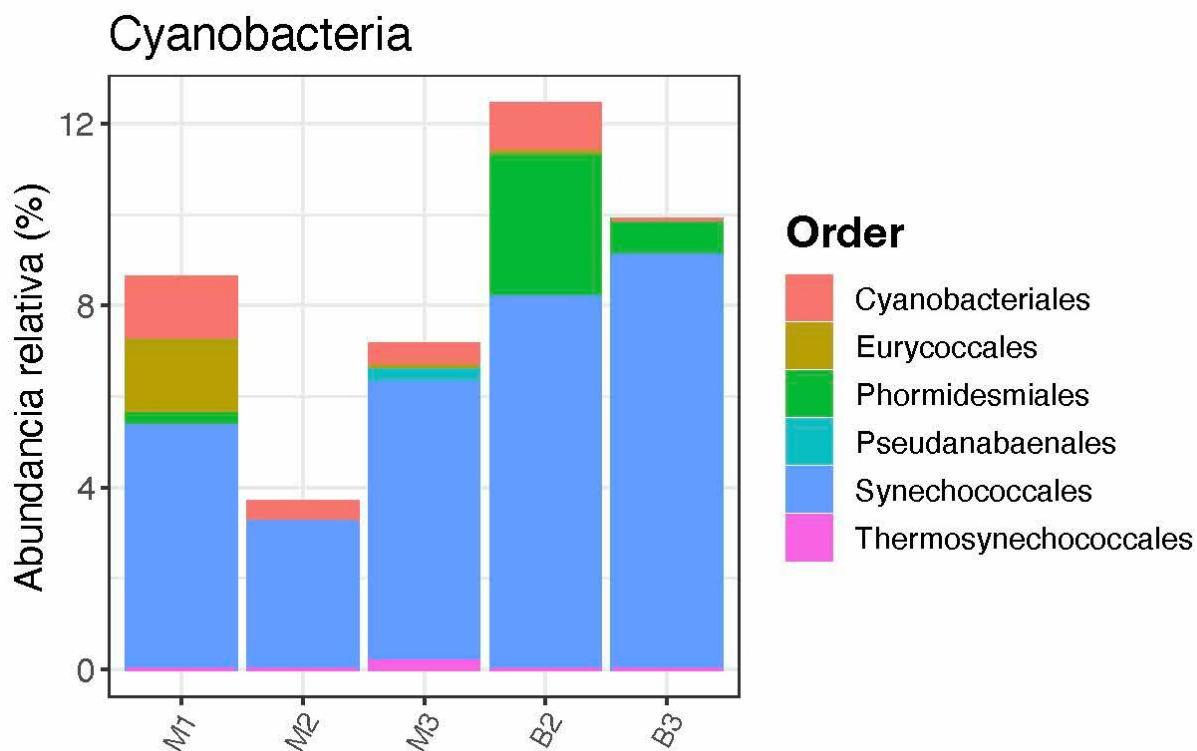


Figura 7. Abundancia relativa a nivel de orden del filo Cyanobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignada a cada orden del filo Cyanobacteria.

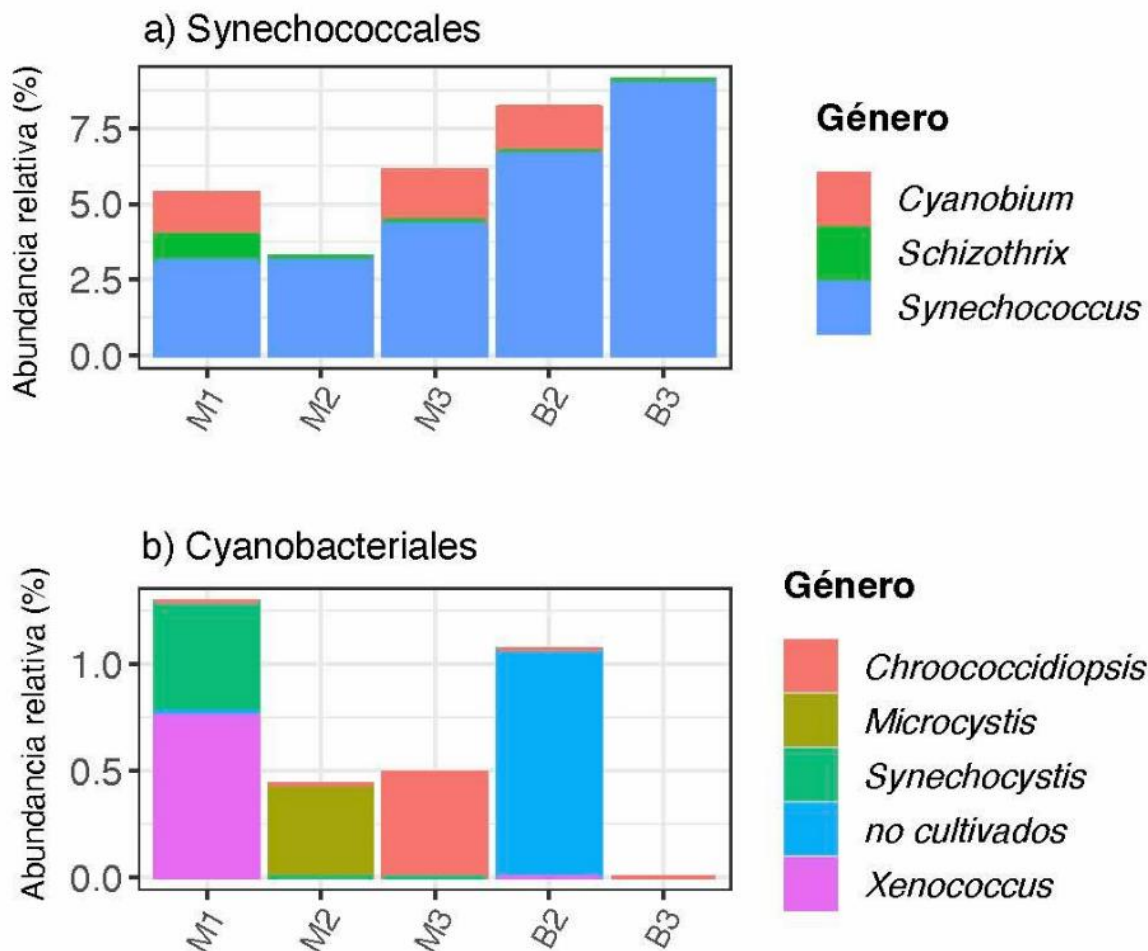


Figura 8. Abundancia relativa a nivel de género de los principales órdenes del filo Cyanobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. a) Synechococcales, y b) Cyanobacteriales. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada género.

Para el filo Proteobacteria se encontró que las principales clases encontradas fueron Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria (Figura 9). Alphaproteobacteria tuvo una abundancia que va desde 2,4 a 13,5 %, siendo los puntos B3 (10,9 %) y M1 (13,5 %) los que tienen mayor abundancia. Gammaproteobacteria tuvo una abundancia que va 18,5 a 48,9 %, siendo M3 (45,6 %) y B3 (48,9 %) los que tienen mayor abundancia.

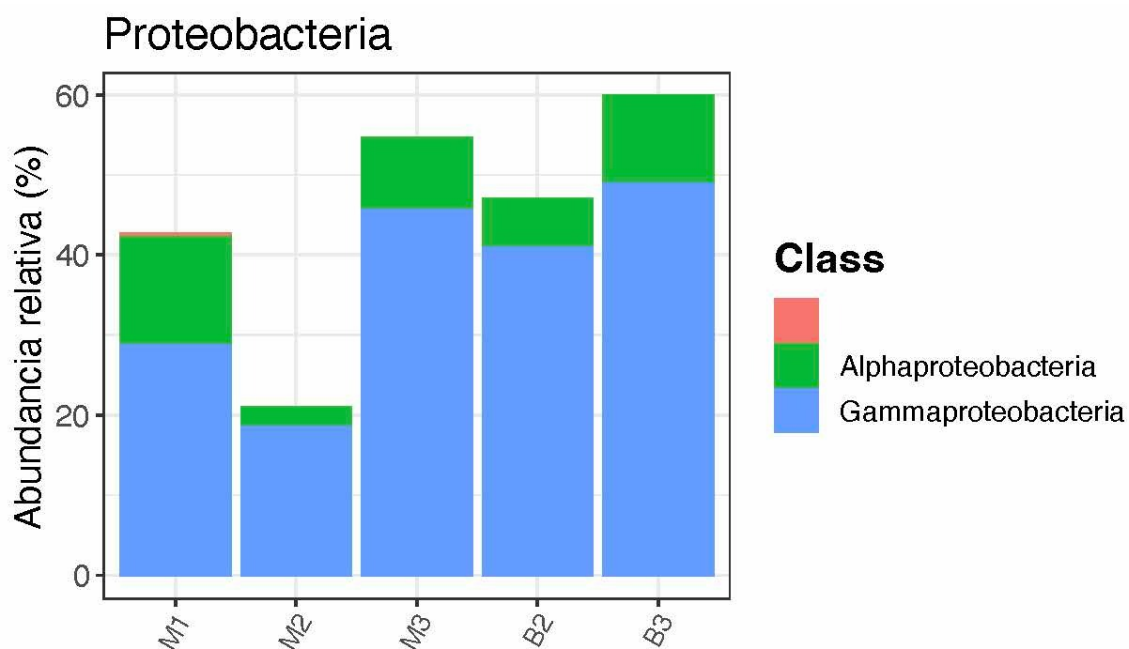


Figura 9. Abundancia relativa a nivel de clase del filo Proteobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignada a cada clase del filo Proteobacteria. El color anaranjado representa aquellos no asignados.

De la clase Alphaproteobacteria se observa que los principales órdenes son Acetobacterales, Puniceispirillales, Rhizobiales, Rhodobacterales, el clado SAR11, y Sphingomonadales, siendo los Rhodobacterales los más abundantes (Figura 10a). En Rhodobacterales, la abundancia va desde 0,6 a 8,9 %, siendo los puntos M1 (7,5 %) y B3 (8,9 %) aquellos con mayor abundancia, y no se visualizaron patrones de distribución entre las cuencas. Seguido de este orden se encontraron los Puniceispirillales, siendo más abundantes en M3 (2,2 %) y B3 (1,2 %). Los Acetobacterales se encontraron sólo en dos puntos de la cuenca media M1 (1,6 %) y M2 (0,8 %). Los demás órdenes se encontraron solo en algunas muestras y con una baja abundancia relativa; por ejemplos, las bacterias del clado SAR11 (0-0,5 %) y los Sphingomonadales (0-1,1 %). Por otra parte, dentro de los principales géneros de la clase Alphaproteobacteria se encontraron *Acidiphillum*, *HIMB11*, clado *SAR116* y *Sphingomonas* (Figura 10b). La bacteria del género llamado *HIMB11* (Rhodobacteraceae) fue la más abundante en M1 (4 %), M3 (3,3 %) y B3 (8,9 %); sin detectarse en M2 y B2. Seguido de ésta, estuvo *Acidiphillum*, que solo se detectó en M2 (0,8 %) y M1 (1,6 %). Las bacterias del clado SAR116 se presentaron en M1 (0,77 %), M3 (2,2

%) y B3 (1,2 %). Finalmente, *Sphingomonas*, se presentó sólo en muestras de la cuenca baja: B3 (0,3 %) y B2 (1,1 %).

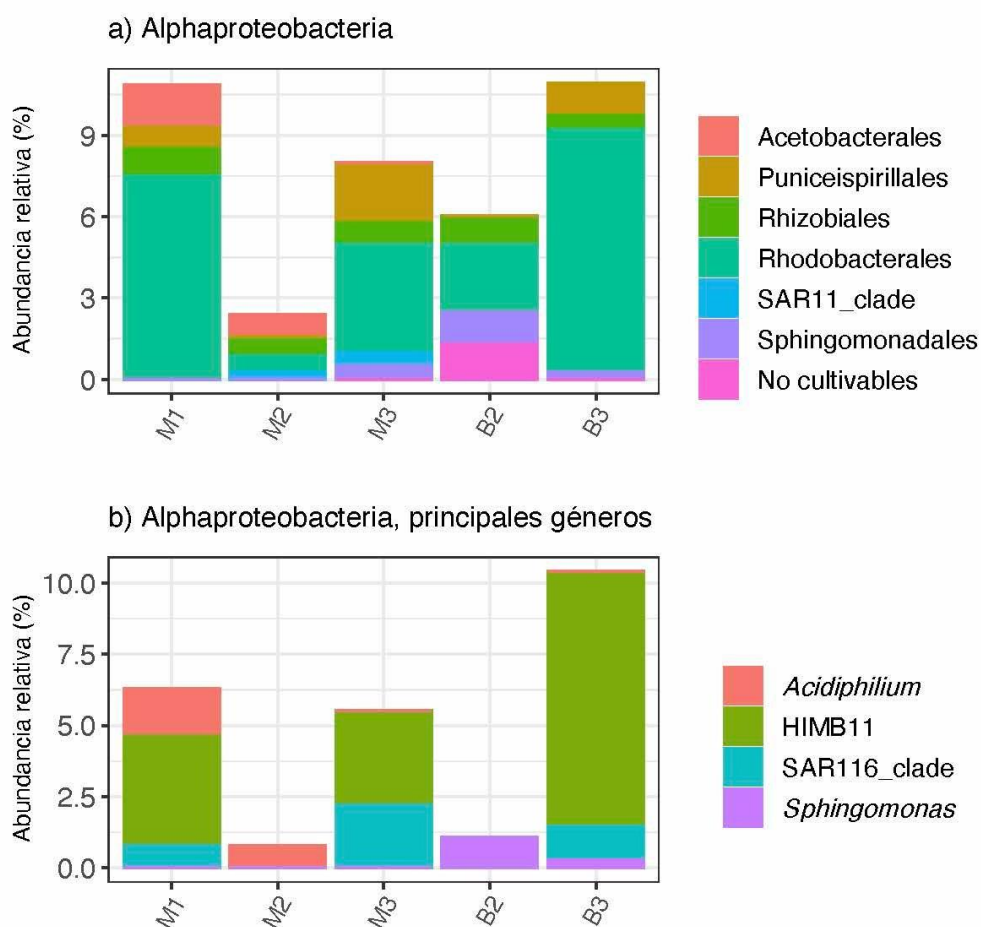


Figura 10. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) de la clase Alphaproteobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada orden o género de la clase Alphaproteobacteria.

Los principales órdenes observados de la clase Gammaproteobacteria, son Acidiferrobacterales, Acidithiobacillales, Burkholderiales, Cellvibrionales, Ga0077536, Oceanospirillales, Pseudomonadales, clado SAR86, y Steroidobacterales (Figura 11a). El orden más abundante fue el de Burkholderiales, principalmente en las muestras de la cuenca baja B2 (25,6 %) y B3 (35,7 %); mientras que, en las muestras de la cuenca media hubo una abundancia relativa muy similar, con valores que oscilaron entre 7,7 y 8,0 %. Los

Pseudomonadales fue el orden con mayor relevancia en la muestra M3 con un 27,4 %, pero en las demás muestras no fue encontrado a abundancia mayor de 6,5 %. El orden Acidithiobacillales también se encontró con una abundancia de 7,5 % en B2 y 4,1 % en M1, mientras que, en otros puntos no sobrepasó el 1,7 %; de forma similar, el orden Acidiferrobacterales se encontró mayoritariamente en B2 (1.07 %), y su abundancia fue menos al 0,43 % en las demás muestras. Analizando los géneros de Gammaproteobacteria se pudo detectar a *Acinetobacter* (Pseudomonadales) en las muestras de la cuenca media, con un valor más alto en M3 (25,2 %) (Figura 11b). Para el sitio B2 se detectaron principalmente *Acidithiobacillus* en un 7,5 % (Acidithiobacillales) y *Ferritrophicum* con un 8,4 % (Burkholderiales). *Pseudomonas* se encontró a lo largo de todo el río, exceptuando el sitio B2, y *Polynucleobacter* (Burkholderiales) junto con el organismo definido como C39 (Burkholderiales) fueron solo encontrados en B3.

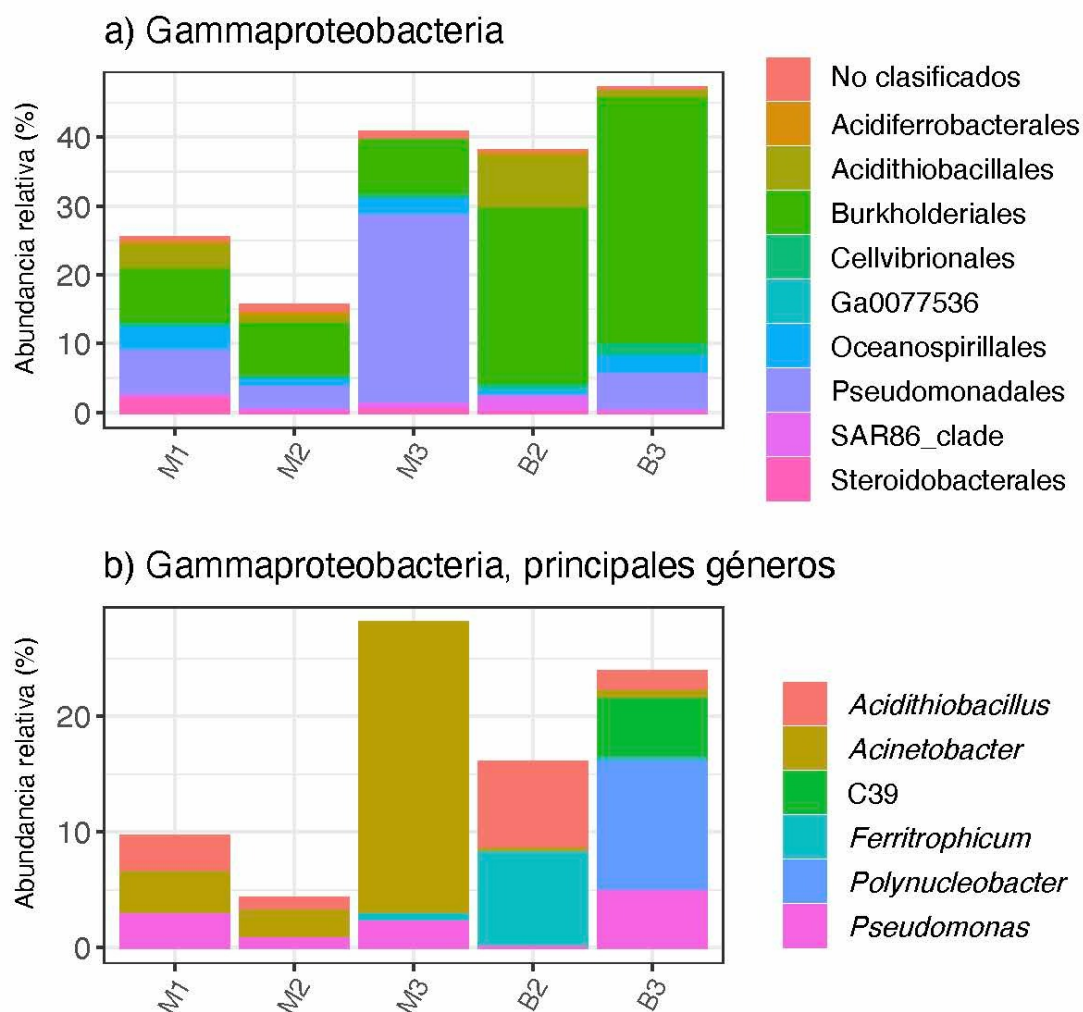


Figura 11. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) de la clase Gammaproteobacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada orden y género de la clase.

Microorganismos del filo Desulfobacterota fueron encontrados en todas las muestras con una abundancia de 0,26 % (B3) a 13,4 % (M2); siendo el orden Desulfobacterales el más abundante en M2 con un 12,4 % y encontrándose exclusivamente en ese sitio. El orden Desulfobacterales se encontró en todas las muestras (0,4-6,8 %), exceptuando B3. Otros órdenes encontrados en menor cantidad fueron Desulfatiglandales, Desulfobulbales, Desulfuromonadia, Syntrophobacterales y Syntrophorhabdales (Figura 12a). De allí, el principal género detectado correspondió a *Desulfobacca* en M2 con una abundancia de 12.4 % (Figura 12b). Seguido de una deltaproteobacteria llamada *Sva0081* (sediment group,

Desulfobacterales), detectada en B2 (6,8 %), M1 (0,43 %) y M2(0,21 %). *Desulfatiglans* se detectó exclusivamente en M1 (0,6 %); mientras que, en M3 sólo se detectó un género no clasificado de la familia Desulfuromonadaceae (0,3 %). Finalmente, *Syntrophorhabdus* está presente en B3, con una abundancia de 0.3 %. Para este filo, los géneros detectados sólo abarcaron una pequeña parte de la abundancia relativa encontrada.

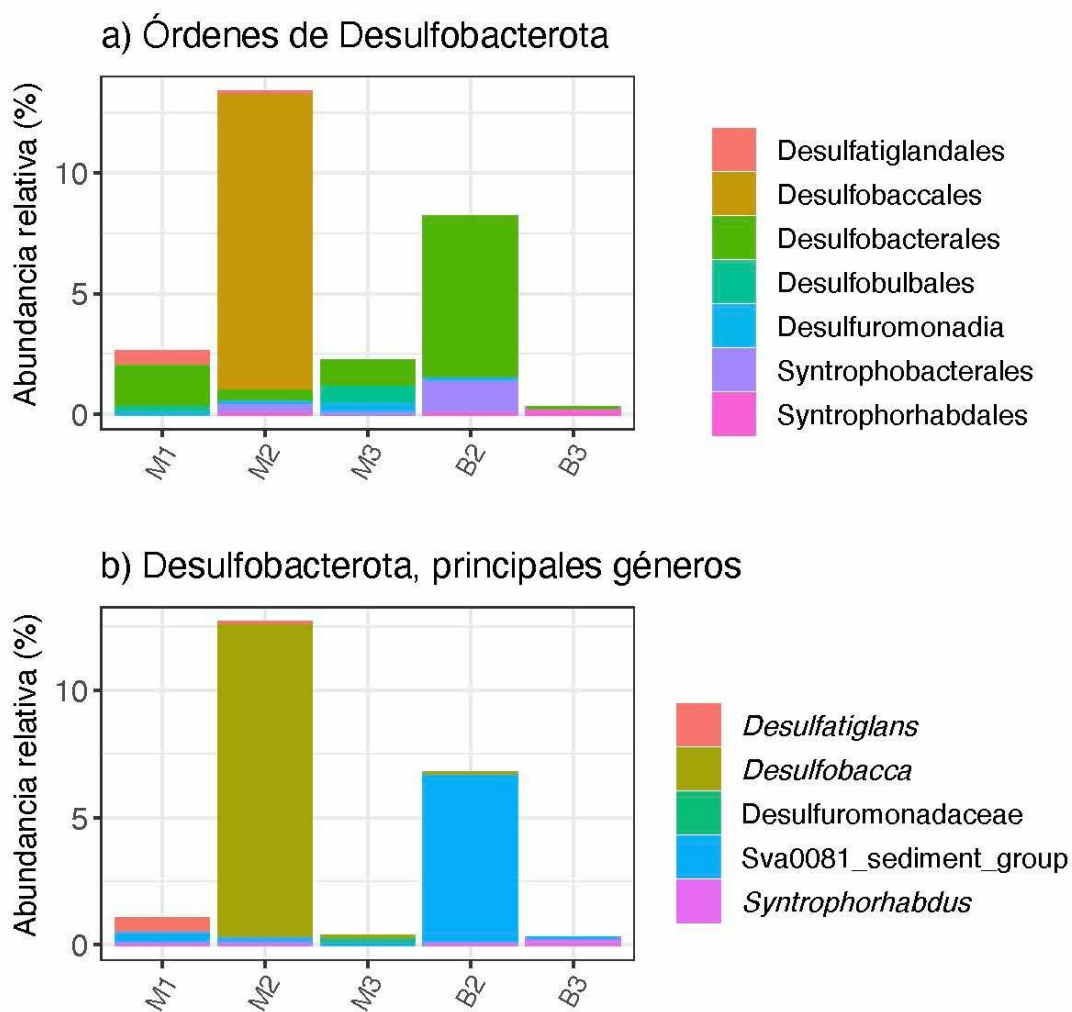


Figura 12. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) del filo Desulfobacterota del dominio Bacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada orden (a) y género (b) del filo Desulfobacterota.

Bacteroidota fue otro de los filo encontrados en todas las muestras, con una abundancia que osciló entre los 2,1 % (B2) y 20,1 % en (M3) (Figura 13). Dentro de este

grupo el orden Flavobacteriales fue aquel con mayor abundancia, con mayor abundancia relativa en el sitio B3 (Figura 13a). Otros órdenes encontrados incluyeron los grupos Cytophagales y Chitinophagales, principalmente en M1 con un 4,3 y 2,8 % de abundancia relativa, respectivamente. A nivel género, en la muestra B3 se encontraron principalmente *Flavobacterium* (2,3 %), *Fluviicola* (1,8 %) y dos géneros de los grupos marinos NS4 y NS5, con una abundancia del 0,7 y 4,9 %, respectivamente. Estos últimos géneros marinos, también se encontraron mayormente en M1, junto con *Pseudarcicella* (Cytophagales). Para el sitio B2, se observó mayoritariamente el género correspondiente a una bacteria de la familia Lentimicrobiaceae con 1,4 % (Figura 13b).

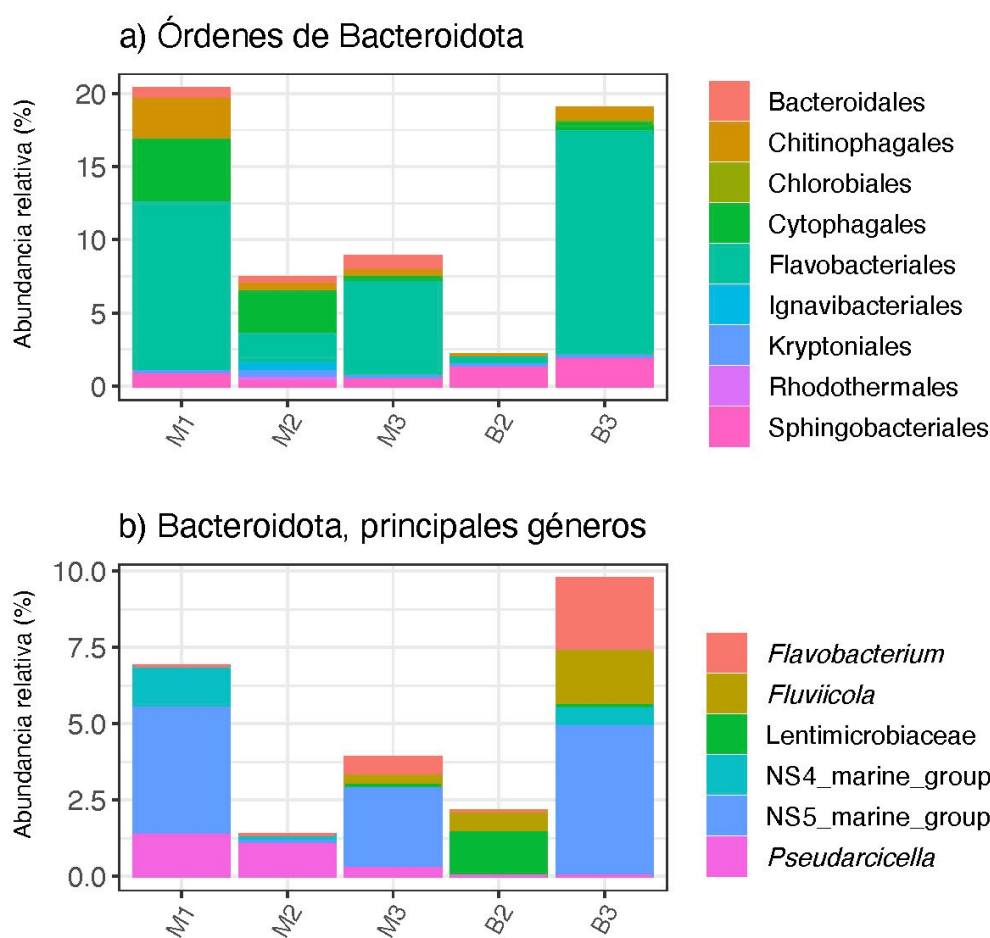


Figura 13. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) del filo Bacteroidota del dominio Bacteria de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada orden y género del filo Bacteroidota.

Otros filos con menor abundancia relativa fueron Acidobacteriota (0,64 y 5,7 %) y Actinobacteriota (0,14 y 5,7 %). Al buscar sus órdenes y géneros principales, se encontró que éstos variaban entre los sitios, por lo que se reportan los géneros y su abundancia para discutir su presencia en las muestras (Figura 14). Para Acidobacteriota, se encontraron principalmente géneros asociados a la familia Vicinamibacteraceae y RB41 (Figura 14a). Seguido de ellos, estuvieron presentes géneros no clasificados de los subgrupos 2, 17 y 22. *Blastocatella* estuvo presente únicamente en B2 con una abundancia de 0,71 % y *Acidicapsa*, se encontró en M2 y M3 con una abundancia de 0,2 y 0,4 %, respectivamente. En Actinobacteriota, igualmente se observó gran variación entre las muestras con los géneros de *Candidatus_Aquiluna*, *Crossiella*, hgcl_clade, IMCC26256, un género no identificado de la familia Nitriliruptoraceae y Sva0996 (Figura 14b). El género del clado “hgcl” fue de los más abundantes siendo B3 (1,2 %) y M1 (1,3 %) los puntos con mayor abundancia. Mientras que, un género no identificado de la familia Nitriliruptoraceae se identificó únicamente en el punto B2, con una abundancia de 2,5 %.

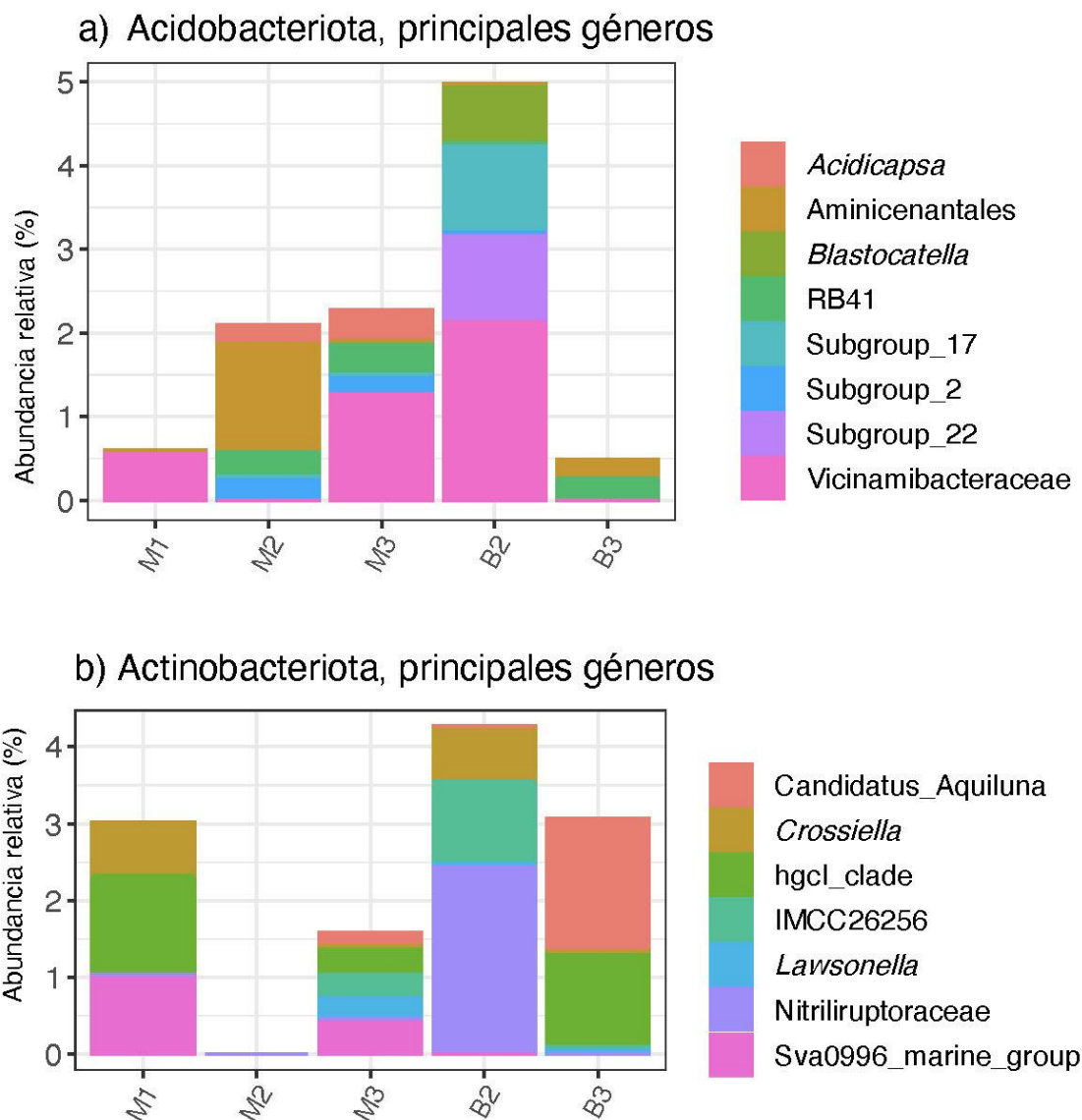


Figura 14. Abundancia relativa a nivel de género de los fila a) Acidobacteriota y b) Actinobacteriota del dominio Bacteria, de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada género.

Del dominio Archaea, el filo Crenarchaeota fue el más abundante con 0,64 % (B3) y 9,7 % (M2). Los principales órdenes de este filo fueron Bathyarchaeia, Nitrosopumilales, Nitrososphaerales, Nitrosotaleales (Figura 15a), siendo Bathyarchaeia el más abundante y con mayor representación en M2 (9,7 %) y B2 (2,5 %). De allí, órdenes de la clase Nitrososphaeria fueron encontradas en las muestras como Nitrososphaerales en M1 y B3, Nitrosopumilales en M1, M3 y B3, y en M3. Así mismo, los principales géneros encontrados de Crenarchaeota fueron *Bathyarchaeia*, *Candidatus Nitrosopumilus*, *Candidatus*

Nitrosotenuis, y tres géneros no identificados de la familia Nitrosopumilaceae, Nitrososphaeraceae, y Nitrosotaleaceae (Figura 15b). Las arqueas del género *Candidatus Bathyarchaeia* se encontraron en los puntos B2 y M2 con una abundancia relativa de 2,5 y 9,7 %, respectivamente. *Candidatus Nitrosopumilus*, estuvo presente solamente en el punto M1 con una abundancia de 0,7 %: mientras que, *Candidatus Nitrosotenuis*, estuvo presente en M3 con una abundancia de 0,3 %. El género no identificado de la familia Nitrosopumilaceae se encontró en los puntos M3 y B3 con una abundancia de 0,3 % en cada uno. El género no identificado de Nitrososphaeraceae, fue encontrado en los puntos B3 y M1, con una abundancia de 0,4 y 0,7 %, respectivamente. Finalmente, el género no identificado de la familia Nitrosotaleaceae se encontró en la muestra M3, con una abundancia de 0,3 %.

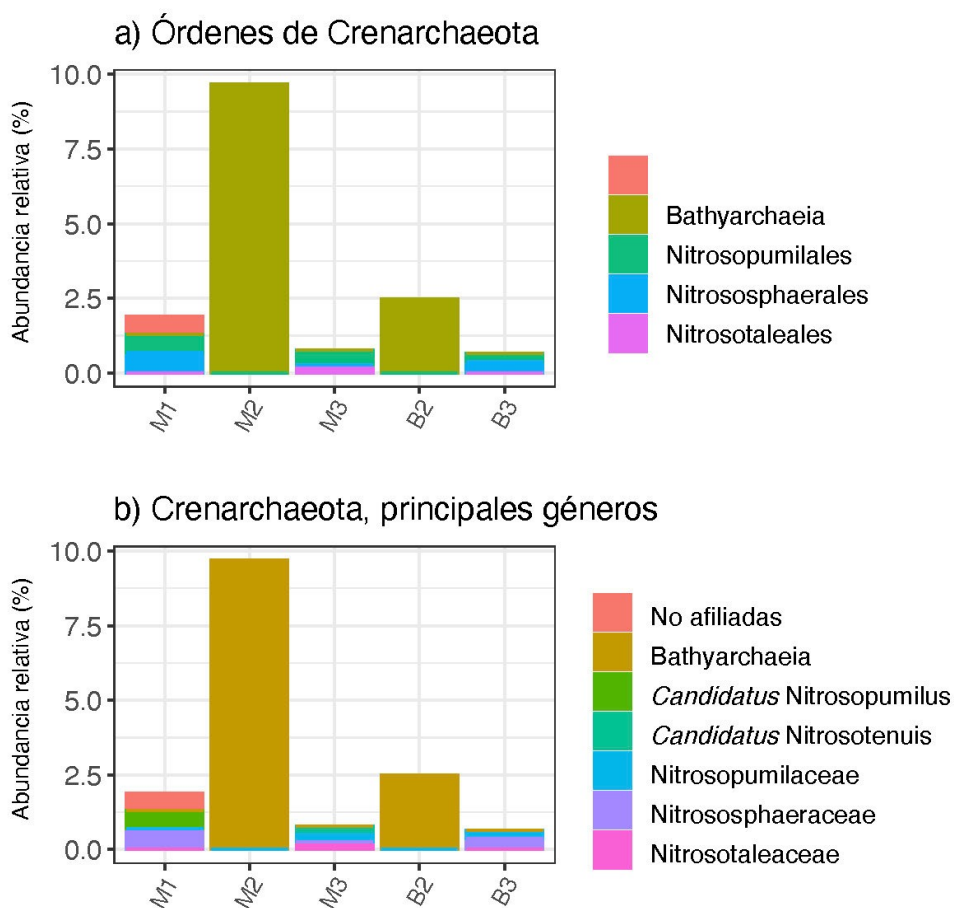


Figura 15. Abundancia relativa a nivel de orden (a) y género (b) del filo Crenarchaeota, (dominio Archaea) de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada orden y género de Crenarchaeota.

Respecto a los grupos que pueden ser asociados a procesos como la metilotrofia y metanotrofia, se encontraron tres familias: Methylococcaceae (metanotrofia), Methyloligellaceae (metilotrofia), y Methylophilaceae (metilotrofia) (Figura 16). Se encontró a la familia Methylococcaceae únicamente en el punto M2, con una abundancia de 0,3 %: mientras que, Methyloligellaceae, se encontró en los puntos M1 y B2 con una abundancia de 1,0 y 1,1 %, respectivamente. Finalmente, Methylophilaceae, se detectó en M3 y M2 con una abundancia de 0,4 % para cada punto. De estos grupos, solo se pudo identificar a el género *Methylotenera* (Methylophilaceae) presente en la muestra M2 (0,43 %); mientras que, las demás secuencias no pudieron ser afiliadas a nivel género.

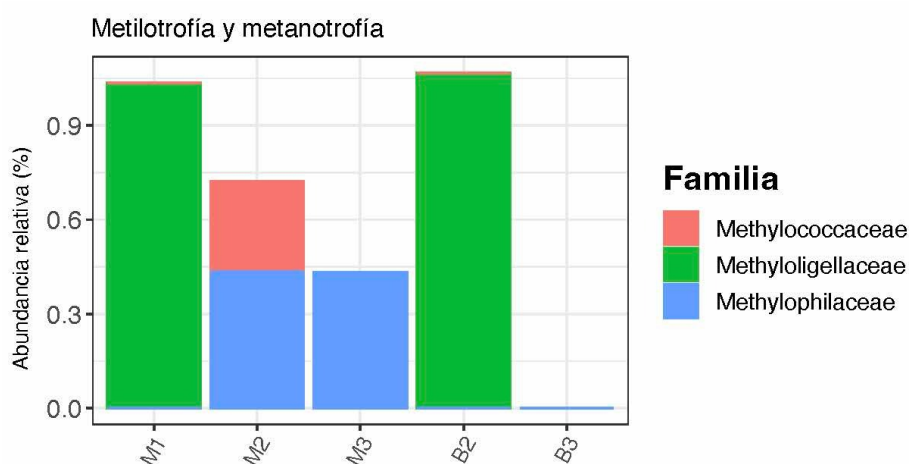


Figura 16. Abundancia relativa a nivel de familia de organismos metilotróficos y metanotróficos de los sitios M1, M2, M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Las barras muestran la abundancia relativa de ASVs asignadas a cada familia de los organismos Metanotróficos.

5.4. RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES SOBRE LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS.

Una vez establecida las características físicas y químicas de cada sitio, su diversidad y composición taxonómica, se estableció la relación entre la estructura de su comunidad, es decir, qué secuencias de ADN fueron detectadas y en qué abundancia, con las características de cada sitio. Para este fin asociativo se hizo, un Análisis de Correlación Canónica (CCA, por sus siglas en inglés) (Figura 17), donde se observó que ninguna de las variables determinadas (OD, pH, k25 y temperatura) tuvieron un impacto en la estructura de la

comunidad con valores significativos de $p < 0.05$ (Anexo Tabla A2). Sin embargo, se pueden ver patrones donde la conductividad eléctrica (k25) influencia ligeramente la estructura de la comunidad procariota de los puntos M3, B3 y M1, el pH y el oxígeno disuelto (OD) se asocia a la de B2 y débilmente a M1 y B3, y la temperatura a M2.

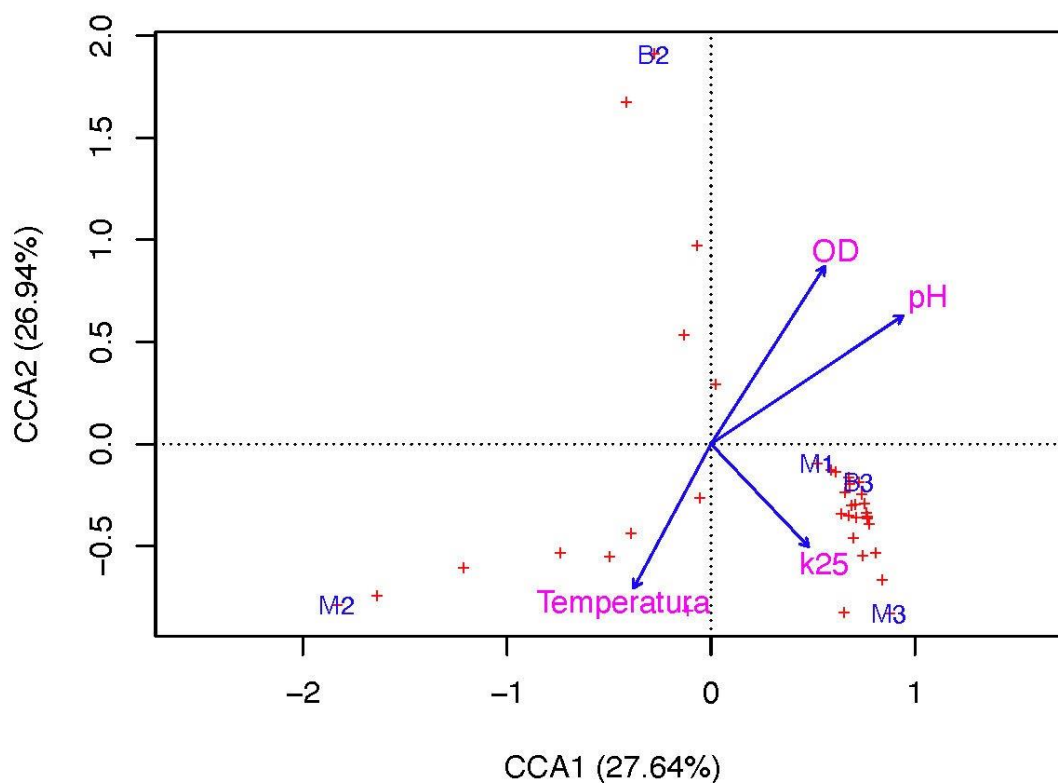


Figura 17. Análisis de Correlación Canónica (ACC) basada en datos de secuenciación masiva del gen 16s ARNr y su relación con las variables ambientales de los sitios M1, M2 M3, B2 y B3 del Río Usumacinta. Cada + representa a las especies

6. DISCUSIÓN

La composición y estructura de las comunidades procarióticas que están presentes en el Río Usumacinta fue descrita gracias a la amplificación y secuenciación directa del gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr a través de la plataforma Illumina. Este estudio constituye una indudable contribución a la comprensión de la complejidad que caracteriza a los ecosistemas lóticos, de los que existe escasa información, gracias a la descripción de la diversidad, estructura y composición de estas comunidades.

En las siguientes secciones, los resultados obtenidos se contrastan con los patrones de diversidad informados previamente en dichos sistemas en un esfuerzo por aumentar la comprensión de la estructura y la dinámica de la diversidad en la región de estudio.

6.1. DIVERSIDAD MICROBIANA

Las descripciones de las comunidades procarióticas a partir de ASVs nos permiten observar su composición desde diferentes perspectivas, lo que permite el análisis de secuencias con la mayor resolución posible y sin el riesgo de introducir sesgos debido a las referencias taxonómicas (Callahan et al., 2016). Sin embargo, un inconveniente de este enfoque es que las secuencias presentes en muy baja abundancia podrían perderse (Almela et al., 2021). En estas muestras, se observaron bajos números de ASVs comparados con otros trabajos (de Lorenzi et al., 2022) y el error principal se notó en el proceso de extracción de ADN. Para estas muestras, se notaron rendimientos de extracción más bajos de lo esperado, donde los bajos rendimientos de ADN llevaron a bajos números de lecturas o secuencias comparado con lo que normalmente se obtiene para esta estrategia de *metabarcoding* (>10 000) (Tabla 6). Las fallas en la extracción se trazaron al kit de extracción, donde el fabricante cambió las perlas de lisis del kit sin previo aviso, ocasionando que las muestras no se lisaran adecuadamente, y consecuentemente, no se detectaran más ribotipos. Este error ha sido enmendado al comprar un nuevo kit, y repetir los pasos de extracción y secuenciación en las muestras correspondientes a las réplicas; sin embargo, esos resultados serán objeto posterior de análisis en otro manuscrito.

El estudio de las comunidades microbianas en ríos empleando estrategias de *metabarcoding* son limitados, ya que la mayoría de los trabajos se enfoca en la calidad microbiológica del agua y detección de patógenos. Sin embargo, existen estudios en ríos templados como el río Lambro en Italia y el Danubio en Europa (Savio et al., 2015; de Lorenzi et al., 2022), donde han determinado que la diversidad procariótica de éstos varía a lo largo de continuo del río. En estos trabajos se ha detectado que los valores de Shannon van desde 4,37 a 8,06 (de Lorenzi et al., 2022), y que están dentro del rango de los encontrados para el río Usumacinta, que fueron de ~3,6 a 5 (Figura 3). Asimismo, en este estudio, comparando la cuenca baja con la cuenca media se ven diferencias significativas en el índice de Shannon, donde el número de especies y de individuos por cada especie es diferente en ambos sitios. Estos cambios pueden ser asociados al diferente ecosistema que rodea cada cuenca, ya que los sitios muestreados de la cuenca baja corresponden más a sistemas de humedal y manglar.

La turbidez, derivada del caudal de los ríos, también es razón de las variaciones en la diversidad microbiana. Por ejemplo, la estructura de la comunidad se relaciona significativamente con el contenido de sólidos totales suspendidos (Savio et al., 2015). En el río Usumacinta los sitios donde se ha registrado los mayores niveles de turbidez son M2 y M3 (Anexo, Tabla A3), lo que coincide con los mayores valores de ASVs observados y de diversidad de Shannon. Esto es, el material sedimentario resuspendido, acarrea microorganismos que son detectados al momento de hacer los análisis de *metabarcoding* de la comunidad total, incrementando el número de ribotipos encontrados.

Los sistemas de humedales, manglares y estuarios generalmente cuentan con extensión territoriales mayores que los ríos, y los tiempos de retención hidráulica son también mayores que los ríos. Esto permite que se establezcan comunidades microbianas que pueden formar florecimientos y consecuentemente, aumentar la dominancia de algunas especies (J. Kim et al., 2021). Los valores más pequeños del índice inverso de Simpson se detectaron en la cuenca baja para Laguna Cometa (B2) y San Pedro/San Pablo (B3); donde queda resaltar, que, al tiempo de muestreo, se observaron varios peces muertos en el sitio B2. Este desastre ecológico pudo estar relacionado con un bloom, o un fenómeno de contaminación por hidrocarburo o sistemas de extracción petrolero, siendo en todo caso, ambos fenómenos causantes conocidos de la disminución de la diversidad microbiana y aumento de los índices de dominancia (Yang et al., 2021; Zhang et al., 2018)

Las diferencias en la diversidad y riqueza de los ribotipos procarióticos encontrados en el río Usumacinta, también se reflejaron en los cambios de la estructura de la comunidad como se observaron en la Figura 4. Aunque estos cambios no fueron significativos, si se observó que la microbiota de la cuenca baja es ligeramente diferente a la de la cuenca media. Varios estudios señalan que las diferencias entre la estructura de la comunidad microbiana están ampliamente relacionadas con la longitud media del drenaje dendrítico (*mean dendritic stream length*) (Savio et al., 2015; Wang et al., 2019), y el cual es un estimado que está relacionado con el tiempo de residencia hidráulico. Luego entonces, es factible considerar la diferencia entre las comunidades del río Usumacinta acorde a la cuenca media y la cuenca baja, donde esta última se estima que tiene tiempos de residencia hidráulica mayores a la cuenca media.

6.2. ABUNDANCIA DE GRUPOS TAXONÓMICOS

Las comunidades procarióticas comúnmente encontradas en ambientes de agua dulce incluyen miembros de los fila Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, y Crenarchaeota, entre otros (Zwart et al., 2002; Wang et al., 2020), como aquellos encontrados con este estudio en el río Usumacinta para noviembre 2021. Estos microorganismos tienen varias funciones importantes en varios ciclos bioquímicos, como la fijación de nitrógeno, el reciclaje de carbono y la degradación de compuestos orgánicos en el ecosistema acuático, por lo que ayudan a cubrir varios servicios ecosistémicos.

El río Usumacinta está caracterizado por tener diferentes características físicas como relieve, hidrología y altitud, razón por la cual se encuentra dividido en tres zonas (cuenca alta, cuenca media y cuenca baja) (Saavedra Guerrero et al., 2015; Soares y García, 2017). Estas características ofrecen variaciones a lo largo del río, por lo que eran de esperarse diferencias en las abundancias relativas de los diversos fila encontrados, como se ha visto a lo largo de otros ríos como el río Lambro en Italia y el Le'an en China (de Lorenzi et al., 2022; Gao et al., 2017). Para el río Usumacinta, la cuenca baja discurre por la reserva de la Biósfera de Pantanos de Centla, la cual se caracteriza por tener grandes extensiones de humedales, con especies de plantas típicas de manglares. Los fila usualmente encontrados en estos sistemas son Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria y

Actinobacteria (Chakraborty et al., 2022); donde se ha reportado una predominancia de Proteobacteria. Esta información es consistente con los resultados obtenidos en este estudio, puesto que los lugares en los que se observa gran abundancia de Proteobacteria son los sitios de la cuenca baja, como en B3, donde se encontraron organismos representantes de Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria.

El filo Cyanobacteria se ha reportado como un grupo clave en los sistemas acuáticos. Por ejemplo, se ha observado que cuerpos de agua con baja concentración de nutrientes, usualmente tienen poblaciones de cianobacterias, incluyendo aquellos pertenecientes a los órdenes Cyanobacteriales o Synechococcales. Estas bacterias son fotosintéticas y autotróficas, y algunas fijadoras de N₂, por lo que se consideran parte de los productores primarios en sistemas acuático (Hentschke y Gama Junior, 2022; Soo et al., 2019). Se ha observado que varios géneros de Cyanobacteria pueden colonizar más de un hábitat, incluyendo sistemas acuáticos, tapetes microbianos, bentos, entre otros, donde la mayor parte de su biodiversidad se encuentra relacionada a ambientes de agua dulce. Este filo también se puede encontrar en ambientes marinos, y poseen una gran capacidad de producir metabolitos secundarios (Hentschke y Gama Junior, 2022). En específico, el orden Synechococcales se ha reportado como predominantemente en ambientes de agua dulce (Hentschke y Gama Junior, 2022). Esto coincide con los resultados obtenidos en este estudio, donde Synechococcales fue encontrado en las muestras estudiadas con hasta un 9,1% de abundancia relativa (Figura 7). Uno de los pigmentos fotosintéticos más abundantes en cianobacterias es la clorofila *a* (Govindjee, 2011), lo cual se correlaciona con que los valores más altos de Clor-*a* detectados en el río (Tabla 5), y que coincidan con los puntos con mayor abundancia de miembros del filo Cyanobacteria en el río (B3 y B2) (Figura 7). Asimismo, se ha reportado que en el río San Pedro-San Pablo, es decir, en el sitio B3, existe una fuerte producción de fitoplancton en los periodos de estiaje, que incrementa el material particulado (Jacobsen et al., 2008).

Otro elemento clave para mencionar la relevancia de las cianobacterias, es que el único ASVs común encontrado en todas las muestras fue una secuencia afiliada a *Synechococcus* sp. (ASV: 687d35fcecb1b41532cb5a1b39978810). El género *Synechococcus* contiene organismos unicelulares ampliamente encontrados en sistemas acuáticos de agua dulce y agua marina, en el océano su tamaño puede oscilar entre los 0,6 y 2,0 µm (di Cesare et al., 2020), además de contribuir con ~21% de la productividad primaria

en estos sistemas oceánicos (Jardillier et al., 2010). Otra cianobacteria que fue relevante, en especial en las muestras de la cuenca baja fue una correspondiente a la familia Nodosilineaceae (Phormidesmiales), la cual también es común en cuerpos de agua dulce, como lo reportó Carrillo (2019) en muestras de agua del norte de la península de Yucatán. Algo que llamó la atención fue encontrar bacterias del género *Microcystis*, estas bacterias a menudo forman floraciones masivas y producen toxinas llamadas microcistinas; sin embargo, en este estudio sólo se encontró en la muestra M2 en una abundancia de ~0,4%. Un ejemplo de estas cianobacterias es *Microcystis aeruginosa*, que en los últimos tiempos se ha estado expandiendo en todo el mundo debido a la eutrofización de estanques, lagos y ríos, y ha tenido importantes impactos ambientales, y en la salud humana y animal (Al-Tebrineh et al., 2012; Carmichael y Boyer, 2016)

Los Rhodobacterales (Alphaproteobacteria) son otros microorganismos comunes en cuerpos de agua que poseen pigmentos fotosintéticos; por ende, estos organismos son comunes en cuerpos acuáticos en la zona fótica (Kopejtká et al., 2017). Estos organismos no alcanzan a impulsar la cadena fotosintética, y se complementa con moléculas orgánicas derivadas principalmente de productores primarios, como cianobacterias y microalgas (Bernardet y Nakagawa, 2006). Otro grupo relevante son aquellos que tienen una fototrofia asociada a quimiotrofia, es decir se llaman fotoheterótrofos, como los Flavobacteriales y los cuales también se han detectado en muestras de aguas superficiales como ríos y lagos (Marti et al., 2017). Así, lo que se denota es que la microbiota mayoritaria de las muestras del río Usumacinta concuerda con aquellas comúnmente encontrada en cuerpos acuáticos de agua dulce.

Microorganismos acuáticos que también son relevantes al ecosistema y realizan funciones básicas biogeoquímicas son los oxidadores de amonio (primer paso de la nitrificación) y los metilotróficos metanotróficos. En las muestras se encontraron oxidadores de amonio del dominio Archaea, los cuales pueden generar energía a partir de amonio y fijar CO₂. Las arqueas oxidadoras de amonio, se encontraron primeramente en aguas oceánicas donde se estima que estos microorganismos del clado de Crenarchaeota comprenden cerca del 20% de bacterioplancton oceánico (Karner et al., 2001). Sin embargo, ahora se sabe que son parte esencial de las aguas epicontinentales (Zhou et al., 2015); y por ello es explicable que se encuentren en las muestras del río estos representantes de la clase Nitrososphaeria. Paralelamente, microorganismos metilotróficos y metanotróficos también son encontrados

en aguas continentales superficiales, los cuales pueden obtener su energía a partir de compuestos de carbono sencillo (C_1) y de metano, respectivamente (Boden et al., 2008). Estos organismos son muy eficientes en la degradación de compuestos orgánicos, y en la remoción del metano generado anaeróbicamente en sedimentos (Chistoserdova, 2015). Así estos organismos son comúnmente encontrados también en las microbiotas acuáticas continentales y tienen roles funcionales esenciales para el mantenimiento del ecosistema.

En el Río Usumacinta de julio a noviembre los caudales son superiores al promedio anual, debido a la mayor precipitación en estos meses (CONAGUA, 2019). Además, según Soria (2020), en la cuenca media los procesos de reaireación y turbulencia continua son mayores, mientras que, en la cuenca baja la velocidad de la corriente es menor. Los eventos de precipitación dados en las temporadas de lluvias se asocian al incremento de la turbulencia y la velocidad del agua (Jacobsen et al., 2008). Además, estos eventos de precipitación incrementan la erosión del suelo y el transporte de sedimentos por escorrentía.

Se ha reportado que las tormentas ciclónicas durante la estación húmeda en la cuenca Grijalva-Usumacinta promueven el arrastre de grandes volúmenes de sedimentos, debido a la alta erosión alrededor de la cuenca (Muñoz-Salinas y Castillo, 2015). En este contexto, organismos pertenecientes al filo Desulfobacterota, Bacteroidota y Crenarcheota se han encontrado en sedimentos (Lipp et al., 2008), lo cual es consistente con lo encontrado en los puntos de muestreo en donde la velocidad del caudal genera resuspensión del sedimento. Por ejemplo, el sitio M2 en el que, según Soria (2020), tiene el mayor promedio de turbidez (100,4 NTU) y el tercer valor más alto de caudal ($948 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) en temporada lluvias, se observa alta concentración de bacterias del filo Desulfobacterota. El filo Desulfobacterota agrupa bacterias respiradoras de sulfato, como el género *Desulfobacca* (Desulfobaccales) encontrado en M2, y que representa a una bacteria sulfato reductora, anaerobia estricta (Waite et al., 2020). Así mismo se ve prevalencia de bacterias Sva0081_sediment group (Desulfobacterales) en B2, otra bacteria sulfato reductora, que puede utilizar acetato como de energía, y tiene un papel multifacético en el ciclo del carbono y azufre en sedimentos ricos en materia orgánica durante su remineralización (Paliaga et al., 2019). Se puede sugerir entonces que, la turbidez es un indicador de presencia de estos microorganismos. En el punto M2 también se encontró la mayor abundancia de Crenarcheota, con bacterias de la clase Bathyarchaeia, la cual está relacionada a lugares que contienen metano y amonio, y muy abundante en sedimentos marinos y lacustres (Romano et al., 2021)

Las muestras analizadas entonces muestran una composición microbiana claramente relacionada con microbiota acuática de vida libre, o de sedimentos acorde a la discutido anteriormente. Sin embargo, también fue posible detectar a algunos géneros relacionados con contaminación antrópica como *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, que son abundantes en el sitio M3, y han sido asociados a contaminación en ríos y aguas superficiales por descargas de aguas residuales (Marti et al., 2017). Se ha observado que bacterias de estos géneros son típicas en excretas de humanos y ganado, por lo que podría ser visto como un indicador de materia fecal de ríos. La cuenca media del río Usumacinta se caracteriza por tener agricultura extensiva y ganadería, lo cual coincide con los microorganismos encontrados, y en zonas de la cuenca baja se observó personas nadando en los ríos.

En la cuenca baja, en especial en el punto B2, se encontró bacterias del género *Acidithiobacillus* y *Ferritrophicum* bacterias relacionadas a actividades de extracción de gas y de petróleo (Maia De Oliveira et al., 2008). La presencia de estas bacterias indicadoras de actividades extractivistas coincide con los puntos que son cercanos a sitios con fines petroleros de Tabasco, donde se reportan derrames de petróleo, y a las empresas extractoras de gas, siendo Tabasco una potencia gasífera en la región. Como se mencionó anteriormente, en el muestreo de noviembre del 2021 se encontraron grandes cantidades de peces muertos a lo largo del punto B3, y que pudieron ser relacionado a efectos de blooms de eutrofización o un fenómeno de contaminación en la zona. Se ha visto que, en el caso de sitios contaminados con bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales pesados, el filo Proteobacteria es dominante, seguido por Bacteroidetes, Acinobacteria y Actinobacteria (Chakraborty et al., 2022b; Quero et al., 2015). Acosta-González y Marqués (2016) concluyeron que el filo Proteobacteria, en específico la subclase Gammaproteobacteria fue la más dominante en diferentes sitios costeros contaminados con petróleo, seguido por Bacteroidetes (Yakimov et al., 2022). En estudios a nivel género de muestras contaminadas con hidrocarburos y metales pesados recolectados de una bahía de Egipto encontraron predominio de *Marinobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Amer et al., 2015). Así mismo, la presencia de *Sphingomonas* en B2 y B3 correlaciona con posibles efectos de contaminación ya que este género contiene varias especies degradadoras de hidrocarburos y xenóbicos (Zhou et al., 2015). Consecuentemente, y con los datos aquí obtenidos, se puede inferir que el sitio B2 y B3 son fuertemente afectado por las actividades de extracción petrolera, acorde a los microorganismos encontrados. Asimismo, el sitio B3

(San Pedro/San Pablo) es un sitio interesante por la inclusión de una cuña salina por parte del Golfo de México, razón por la que este sitio muestra valores de conductividad eléctrica tan altos. Consecuentemente, se notaron características especiales en su microbiota, como la presencia de *Polynucleobacter*, el cual es un endosimbionte de ciliados, encontrado usualmente en zonas pantanosas, y con valores altos de conductividad, que generalmente está asociado a altas cantidades de sales y minerales disueltos en agua (Heckmann y Schmidt, 1987; Jezbera et al., 2011).

Finalmente, en este estudio no se observaron correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos y la estructura de la comunidad procariótica. Esto pudo deberse a diversos factores como: i) por el bajo rendimiento de secuencias y la información no suficiente de grupos microbianos minoritarios, y/o ii) la pequeña cantidad de muestras (n). Sin embargo, en un estudio más amplio en el Danubio, se vio que factores fisicoquímicos como el contenido de clorofila *a*, pH, temperatura y oxígeno disuelto, no tienen correlación con la estructura de la comunidad procariótica de vida libre (Savio et al., 2015). Otros factores que si tienen una fuerte correlación con las comunidades microbiana en este estudio fueron los aquellos relacionados con el tiempo de residencia hidráulico, el tamaño de la cuenca, el contenido de silicatos y la alcalinidad, entre otros. Por ello, es recomendable que, en futuros estudios, se incremente el número de muestras de estudio, y se consideren otros factores ambientales en las correlaciones.

7. CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió explorar la diversidad de diversos sitios del río Usumacinta empleando técnicas de *metabarcoding*, y derivado del análisis de los datos y resultados se puede concluir que:

- Existen diferencias significativas entre los indicadores de diversidad y riqueza de las muestras del río en la cuenca media con aquellos en la cuenca baja, siendo que éstos últimos más bajos y posiblemente derivado de fenómenos de contaminación en la cuenca baja, donde hay procesos extractivistas y transportistas de petróleo y gas,
- Las comunidades procarióticas detectadas en el río Usumacinta mostraron una composición comúnmente encontrada en sistemas acuáticos de agua dulce y otros ríos reportados, donde hay una dominancia de Proteobacteria en todos los sitios de muestreo, y con un componente cianobacteriano que correlaciona con los contenidos de clorofila “a” en las diferentes muestras,
- A lo largo del río, se vio una huella molecular común a todas las muestras la cual correspondió a *Synechococcus* sp., lo que muestra lo ubicuo de este género cianobacteriano en sistemas acuáticos epicontinentales,
- Si bien todos los sitios mostraron una comunidad bacteriana típica de sistemas acuáticos de agua dulce, también se encontraron grupos o géneros microbianos en menor proporción que dieron pie a la interpretación de fenómenos de contaminación en el área, especialmente para las muestras de la cuenca baja, sirviendo así de indicadores microbiológicos,
- En el presente trabajo no se encontraron relaciones entre los parámetros fisicoquímicos como oxígeno disuelto, temperatura, conductividad eléctrica, pH, clorofila “a” y sólidos suspendidos totales; lo cual se ha encontrado también para otros ríos. Sin embargo, estas relaciones podrían encontrarse con un número mayor de muestras, una mayor profundidad de secuenciación y/o la determinación de otros

parámetros fisicoquímicos, como nutrientes o la longitud media del drenaje dendrítico, entre otros.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-González, A., y Marqués, S. (2016). Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 24–32.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.010>
- Al-Tebrineh, J., Merrick, C., Ryan, D., Humpage, A., Bowling, L., y Neilan, B. A. (2012). Community Composition, Toxicogenicity, and Environmental Conditions during a Cyanobacterial Bloom Occurring along 1,100 Kilometers of the Murray River. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 263–272.
<https://doi.org/10.1128/AEM.05587-11>
- Amer, R. A., Mapelli, F., el Gendi, H. M., Barbato, M., Goda, D. A., Corsini, A., Cavalca, L., Fusi, M., Borin, S., Daffonchio, D., y Abdel-Fattah, Y. R. (2015). Bacterial Diversity and Bioremediation Potential of the Highly Contaminated Marine Sediments at El-Max District (Egypt, Mediterranean Sea). *BioMed Research International*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/981829>
- Asthana, D., & Asthana, M. (2006). *Environment: Problems and solutions* (S Chand Publishing, Ed.; Second Edition). Rajendra Ravindra Printers.
- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., y Packmann, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>
- Benke, A. C., y Cushing, C. E. (2009a). Rivers of North America. In *Encyclopedia of Inland Waters* (Ed. Elsevi, pp. 425–437).
- Bernardet, J.-F., y Nakagawa, Y. (2006). An Introduction to the Family Flavobacteriaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 455–480). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_16
- Boden, R., Thomas, E., Savani, P., Kelly, D. P., y Wood, A. P. (2008). Novel methylotrophic bacteria isolated from the River Thames (London, UK). *Environmental Microbiology*, 10(12), 3225–3236. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01711.x>

- Buermans, H. P. J., y den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015>
- Bukin, Yu. S., Galachyants, Yu. P., Morozov, I. v., Bukin, S. v., Zakharenko, A. S., y Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6(1), 190007. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Callieri, C., Eckert, E. M., Di Cesare, A., y Bertoni, F. (2018). Microbial communities. *Encyclopedia of Ecology*, 1, 126–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11222-9>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., y Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Carabias, J., Provencio, E., Maza, J. de la, Gutierrez, D., Gómez, M., y López, A. (2000a). *Programa de manejo Reserva de la Biosfera Montes Azules* (Instituto).
- Carmichael, W. W., y Boyer, G. L. (2016). Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful Algae*, 54, 194–212. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.02.002>
- Chakraborty, J., Palit, K., y Das, S. (2022a). Metagenomic approaches to study the culture-independent bacterial diversity of a polluted environment—a case study on north-eastern coast of Bay of Bengal, India. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 81–107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85455-9.00014-X>
- Chistoserdova, L. (2015). Methylophages in natural habitats: current insights through metagenomics. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 99, Issue 14, pp. 5763–5779). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6713-z>

- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Cole, J. J., Prairie, Y. T., Caraco, N. F., McDowell, W. H., Tranvik, L. J., Striegl, R. G., Duarte, C. M., Kortelainen, P., Downing, J. A., Middelburg, J. J., y Melack, J. (2007). Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems*, 10(1), 171–184. <https://doi.org/10.1007/s10021-006-9013-8>
- Cuevas-lara, D., Alcocer, J., Cortés-guzmán, D., Soria-reinoso, I. F., García-oliva, F., Sánchez-carrillo, S., y Oseguera, L. A. (2021). Particulate organic carbon in the tropical usumacinta river, southeast mexico: Concentration, flux, and sources. *Water (Switzerland)*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/w13111561>
- de Lorenzi, L., Carimati, B., y Parma, P. (2022). Analysis of the 16S rRNA gene for the characterization of the bacterial community of the Lambro river (Italy). *Frontiers in Water*, 4. <https://doi.org/10.3389/frwa.2022.1008838>
- Degnan, P. H., y Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *ISME Journal*, 6(1), 183–194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.74>
- di Cesare, A., Dzhenbekova, N., Cabello-Yeves, P. J., Eckert, E. M., Slabakova, V., Slabakova, N., Peneva, E., Bertoni, R., Corno, G., Salcher, M. M., Kamburska, L., Bertoni, F., Rodriguez-Valera, F., Moncheva, S., y Callieri, C. (2020). Genomic Comparison and Spatial Distribution of Different Synechococcus Phylotypes in the Black Sea. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01979>
- Doherty, M., Yager, P. L., Moran, M. A., Coles, V. J., Fortunato, C. S., Krusche, A. V., Medeiros, P. M., Payet, J. P., Richey, J. E., Satinsky, B. M., Sawakuchi, H. O., Ward, N. D., y Crump, B. C. (2017a). Bacterial biogeography across the Amazon River-ocean continuum. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00882>
- Gao, Y., Wang, C., Zhang, W., Di, P., Yi, N., y Chen, C. (2017a). Vertical and horizontal assemblage patterns of bacterial communities in a eutrophic river receiving domestic wastewater in southeast China. *Environmental Pollution*, 230, 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.081>

- Ghai, R., Rodríguez-Valera, F., McMahon, K. D., Toyama, D., Rinke, R., de Oliveira, T. C. S., Garcia, J. W., de Miranda, F. P., y Henrique-Silva, F. (2011a). Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon river. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023785>
- Gilbert, J. A., y Dupont, C. L. (2011). Microbial metagenomics: Beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*, 3, 347–371. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., y Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology*, 12(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1>
- Govindjee. (2011). Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. *Frontiers in Plant Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00028>
- Hahn, M. W. (2006). The microbial diversity of inland waters. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.006>
- Hanif, M. A., Nadeem, F., Tariq, R., y Rashid, U. (2022). Geothermal energy production. In M. A. Hanif, F. Nadeem, R. Tariq, & U. Rashid (Eds.), *Renewable and Alternative Energy Resources* (pp. 431–553). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818150-8.00005-8>
- Hazen, T. C., Rocha, A. M., y Techtman, S. M. (2013). Advances in monitoring environmental microbes. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 526–533. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.10.020>
- Heckmann, K., y Schmidt, H. J. (1987). Polynucleobacter necessarius gen. nov., sp. nov., an Obligately Endosymbiotic Bacterium Living in the Cytoplasm of Euplotes aediculatus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 456–457. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-456>
- Hentschke, G. S., y Gama Junior, W. A. (2022). Trends in Cyanobacteria: a contribution to systematics and biodiversity studies. In *The Pharmacological Potential of Cyanobacteria* (pp. 1–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821491-6.00001-6>
- Hurlbert, S. H. (1971). THE NON CONCEPT OF SPECIES DIVERSITY: A CRITIQUE AND ALTERNATIVE PARAMETERS. *Ecology*, 52(4).

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). *Hidrografía Chiapas*.
- Jacobsen, D., Cressa, C., Mathooko, J. M., y Dudgeon, D. (2008). Macroinvertebrates: Composition, Life Histories and Production. In *Tropical Stream Ecology* (pp. 65–105). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012088449-0.50006-6>
- Jardillier, L., Zubkov, M. v., Pearman, J., y Scanlan, D. J. (2010). Significant CO₂ fixation by small prymnesiophytes in the subtropical and tropical northeast Atlantic Ocean. *ISME Journal*, 4(9), 1180–1192. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.36>
- Jones, J. G., Berner, R. A., Meadows, P. S., Durand, B., y Eglinton, G. (1985). Microbes and Microbial Processes in Sediments [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 315(1531), 3–17. <http://www.jstor.org/stable/37700>
- Karner, M. B., Delong², E. F., y Karl, D. M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. In *NATURE* (Vol. 409). www.nature.com
- Kim, J., Jones, J. R., y Seo, D. (2021). Factors affecting harmful algal bloom occurrence in a river with regulated hydrology. *Journal of Hydrology: Regional Studies*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.ejrh.2020.100769>
- Kim, M., y Chun, J. (2014). 16S rRNA gene-based identification of bacteria and archaea using the EzTaxon server. In *Methods in Microbiology* (1st ed., Vol. 41). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.08.001>
- Köchling, T., Sanz, J. L., Galdino, L., Florencio, L., y Kato, M. T. (2017). Impact of pollution on the microbial diversity of a tropical river in an urbanized region of northeastern Brazil. *International Microbiology*, 20(1), 11–24. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.281>
- Kopejtka, K., Tomasch, J., Zeng, Y., Tichý, M., Sorokin, D. Y., y Koblížek, M. (2017). Genomic Analysis of the Evolution of Phototrophy among Haloalkaliphilic Rhodobacterales. *Genome Biology and Evolution*, 9(7), 1950–1962. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx141>
- Li, K., Hu, J., Li, T., Liu, F., Tao, J., Liu, J., Zhang, Z., Luo, X., Li, L., Deng, Y., y Che, R. (2021). Microbial abundance and diversity investigations along rivers: Current

- knowledge and future directions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 8(5), 1–18.
<https://doi.org/10.1002/wat2.1547>
- Lipp, J. S., Morono, Y., Inagaki, F., y Hinrichs, K.-U. (2008). Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature*, 454(7207), 991–994. <https://doi.org/10.1038/nature07174>
- Madsen, E. L. (2005). Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. *Nature Reviews Microbiology*, 3(5), 439–446.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1151>
- Madsen, E. L. (2011). Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 456–464.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.008>
- Magurran, A. (2004). *Measuring biological diversity. Measuring biological diversity*. 1–256.
- Maia De Oliveira, V., Sette, D., Christina, K., Simioni, M., Eugênio Vaz, ;, y Neto, S. (2008). BACTERIAL DIVERSITY CHARACTERIZATION IN PETROLEUM SAMPLES FROM BRAZILIAN RESERVOIRS. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 445–452.
- Makedonsko Ekološko Društvo, M. R., Jovanova, B., y Panovska, T. K. (2012). Macedonian journal of ecology and environment. *Makedonsko Farmaceutski Bilten*, 60((1)), 9–18.
- Margulis, L., Chase, D., y Guerrero, R. (1986). Microbial communities. *Bioscience*, 36(3), 160–170. <https://doi.org/10.2307/1310303>
- Marti, R., Ribun, S., Aubin, J. B., Colinon, C., Petit, S., Marjolet, L., Gourmelon, M., Schmitt, L., Breil, P., Cottet, M., y Cournoyer, B. (2017). Human-driven microbiological contamination of benthic and hyporheic sediments of an intermittent peri-urban river assessed from MST and 16S rRNA genetic structure analyses. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00019>
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- Meijer, L., van Emmerik, T., Lebreton, L., Schmidt, C., y Ent, R. (2019). *Over 1000 rivers accountable for 80% of global riverine plastic emissions into the ocean.*
<https://doi.org/10.31223/osf.io/zjgty>
- Meyer, O. (1994). Functional Groups of Microorganisms. In *Biodiversity and Ecosystem Function.*
- Muhamad Rizal, N. S., Neoh, H., Ramli, R., A/L K Periyasamy, P. @ R., Hanafiah, A., Abdul Samat, M. N., Tan, T. L., Wong, K. K., Nathan, S., Chieng, S., Saw, S. H., y Khor, B. Y. (2020). Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics*, 10(10), 816.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics10100816>
- Muñoz-Salinas, E., y Castillo, M. (2015a). Streamflow and sediment load assessment from 1950 to 2006 in the Usumacinta and Grijalva Rivers (Southern Mexico) and the influence of ENSO. *Catena*, 127, 270–278.
- Muñoz-Salinas, E., y Castillo, M. (2015b). Streamflow and sediment load assessment from 1950 to 2006 in the Usumacinta and Grijalva rivers (Southern Mexico) and the influence of ENSO. *Catena*, 127, 270–278.
<https://doi.org/10.1016/j.catena.2015.01.007>
- Overmann, J., Abt, B., y Sikorski, J. (2017). Present and Future of Culturing Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 711–730. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093449>
- Paliaga, P., Felja, I., Budiša, A., y Ivančić, I. (2019). The Impact of a Fish Cannery Wastewater Discharge on the Bacterial Community Structure and Sanitary Conditions of Marine Coastal Sediments. *Water*, 11(12), 2566.
<https://doi.org/10.3390/w11122566>
- Park, S.-C., y Won, S. (2018). Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using a Mock Community. *Genomics & Informatics*, 16(4), e24.
<https://doi.org/10.5808/GI.2018.16.4.e24>
- Quero, G. M., Cassin, D., Botter, M., Perini, L., y Luna, G. M. (2015). Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic

hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01053>

Romano, R. G., Bendia, A. G., Moreira, J. C. F., Franco, D. C., Signori, C. N., Yu, T., Wang, F., Jovane, L., y Pellizari, V. H. (2021). Bathyarchaeia occurrence in rich methane sediments from a Brazilian ría. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 263, 107631. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2021.107631>

Saavedra Guerrero, Arístides., López López, D. M., y Castellanos Fajardo, L. A. (2015a). Descripción del medio físico de la cuenca media del río Usumacinta en México . In J. Carabias, J. de La Maza, R. Cadena, & (coordinadores) (Eds.), *Conservación y desarrollo sustentable en la Selva Lacandona. 25 años de actividades y experiencias* (pp. 19–34).

Saavedra Guerrero, Arístides., López López, D. M., y Castellanos Fajardo, L. A. (2015b). Descripción del medio físico de la cuenca media del río Usumacinta en México . In J. Carabias, J. de La Maza, R. Cadena, & (coordinadores) (Eds.), *Conservación y desarrollo sustentable en la Selva Lacandona. 25 años de actividades y experiencias* (pp. 19–34).

Savio, D., Sinclair, L., Ijaz, U. Z., Parajka, J., Reischer, G. H., Stadler, P., Blaschke, A. P., Blöschl, G., Mach, R. L., Kirschner, A. K. T., Farnleitner, A. H., y Eiler, A. (2015). Bacterial diversity along a 2600km river continuum. *Environmental Microbiology*, 17(12), 4994–5007. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12886>

Soares, D., y García, A. (2017a). *La cuenca del río Usumacinta desde la perspectiva del cambio climático* (México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Ed.; Primera ed).

Soo, R. M., Hemp, J., y Hugenholtz, P. (2019). Evolution of photosynthesis and aerobic respiration in the cyanobacteria. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.029>

Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E. L., y Lynch, S. v. (2015). Use of 16S rRNA Gene for Identification of a Broad Range of Clinically Relevant Bacterial Pathogens. *PLOS ONE*, 10(2), e0117617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117617>

- Tringe, S. G., y Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 442–446.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.011>
- Vannote, R., Minshall, G., Cummins, K., Sedell, J., y Cushing, C. (2011). The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 130–137. <https://doi.org/10.1139/f80-017>
- Wang, P., Zhao, J., Xiao, H., Yang, W., y Yu, X. (2019). Bacterial community composition shaped by water chemistry and geographic distance in an anthropogenically disturbed river. *Science of the Total Environment*, 655, 61–69.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.234>
- Yakimov, M. M., Bargiela, R., y Golyshin, P. N. (2022). Calm and Frenzy: marine obligate hydrocarbonoclastic bacteria sustain ocean wellness. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.015>
- Yang, B., Wang, Y., y Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>
- Yang, Y., Chen, J., Chen, X., Jiang, Q., Liu, Y., y Xie, S. (2021). Cyanobacterial bloom induces structural and functional succession of microbial communities in eutrophic lake sediments. *Environmental Pollution*, 284.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117157>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., y Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635–645.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Zeglin, L. H. (2015). Stream microbial diversity in response to environmental changes: Review and synthesis of existing research. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00454>
- Zhang, H., Jia, J., Chen, S., Huang, T., Wang, Y., Zhao, Z., Feng, J., Hao, H., Li, S., y Ma, X. (2018). Dynamics of bacterial and fungal communities during the outbreak and decline of an algal bloom in a drinking water reservoir. *International Journal of*

Environmental Research and Public Health, 15(2).

<https://doi.org/10.3390/ijerph15020361>

Zhou, L., Wang, S., Zou, Y., Xia, C., y Zhu, G. (2015). Species, abundance and function of ammonia-oxidizing archaea in Inland waters across China. *Scientific Reports*, 5.

<https://doi.org/10.1038/srep15969>

9. ANEXOS

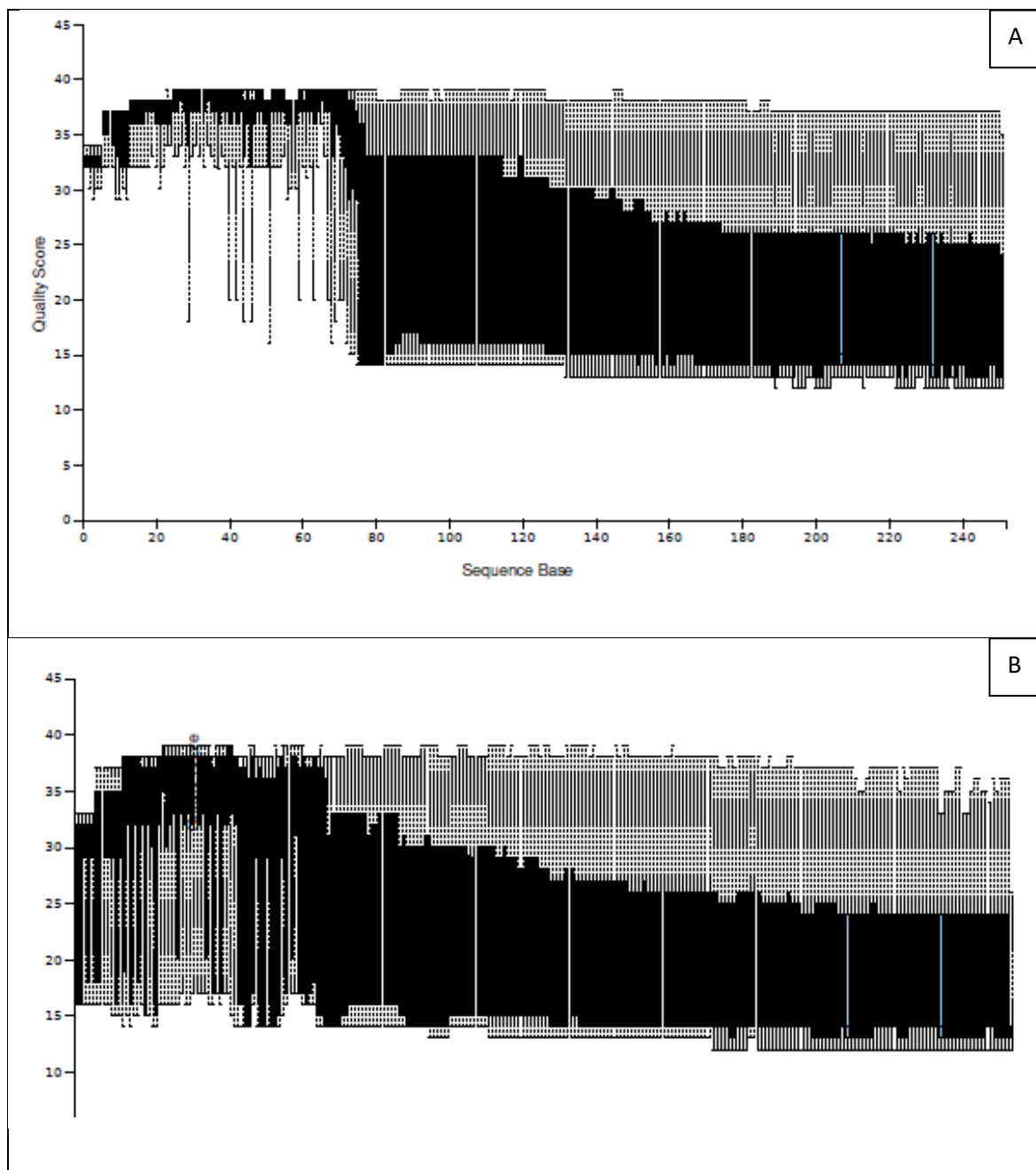


Figura A1. Gráfico de calidad de las secuencias 16S rRNA crudas obtenidas del secuenciador MiSeq: A) directas (forward), y B) reversas (reverse).

Tabla A1. Promedio de los datos fisicoquímicos de las columnas de agua en los sitios de muestro para noviembre 2017, 2018, 2019.

Sitio de muestreo	T (°C)	OD (mg/L)	pH	k25 (µS/cm)	Clor-a (µg/L)	SST (mg/L)	Tipo de cuenca
M1	24,20	8,60	7,90	636,80	0,13	9,50	baja
M2	22,80	8,70	8,00	399,40	0,20	37,80	baja
M3	25,00	6,50	7,70	379,50	0,91	35,73	baja
B1	27,20	5,70	7,50	426,40	2,06	50,40	media
B2	28,20	3,40	7,20	870,80	1,99	36,75	media
B3	29,00	4,50	7,70	10836,00	2,54	1,80	media

Tabla A2. Análisis CCA de características físicoquímicas con la comunidad microbiana de bacterias y arqueas. Se muestran los valores del coeficiente canónico (r^2) y del nivel de significancia (p-value).

Factor ambiental	CCA1	CCA2	r^2	Pr(>r)
Temperatura	0.92699	0.37508	0.4552	0.5917
Oxígeno disuelto	-0.79381	-0.60816	0.7339	0.2000
pH	-0.42154	-0.90681	0.8483	0.2333
Conductividad eléctrica	0.67423	-0.73852	0.6134	0.5750
Clorofila	0.97948	0.20152	0.20152	0.2750
Sólidos suspendidos totales	0.18587	0.98257	0.3650	0.7833

Tabla A3. Promedio de la turbidez y del caudal del Río Usumacinta de la temporada lluvias del año 2017. Datos tomados de Soria (2020).

Sitio de muestreo	Turbidez (NTU)	Caudal (m³ s⁻¹)
Tzendales (M1)	7,6	173
Lacantun (M2)	100,4	948
Frontera Corozal (M3)	54,9	5715
Usumacinta en Tres Brazos (B1)	44,9	2618
Laguna Cometa (B2)	No hay registros.	No hay registros
San Pedro/ San Pablo (B3)	50,6	368