



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

*“COMUNIDADES BACTERIANAS Y CONTAMINACIÓN POR  
COLIFORMES EN POZOS PROFUNDOS DE HUNUCMÁ,  
YUCATÁN.”*

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**LICENCIADA EN MANEJO SUSTENTABLE DE ZONAS  
COSTERAS**

P R E S E N T A:

**ANDREA HERROS SALGADO**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. MARIA LETICIA ARENA ORTIZ**

**Sisal, Yucatán. Mayo 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Herros  
Salgado  
Andrea  
9991347965  
Universidad Nacional Autónoma  
de México  
Facultad de Ciencias  
Manejo Sustentable de Zonas Costeras  
408037925

### 2. Datos del tutor

Dra.  
María Leticia  
Arena  
Ortíz

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.  
Elsa  
Noreña  
Barroso

### 4. Datos del sinodal 2

M en C  
Karla Susana  
Escalante  
Herrera

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Rafael  
Rojas  
Herrera

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
María del Carmen  
Ponce  
Caballero

### 7. Datos del trabajo escrito

Comunidades bacterianas y  
contaminación por coliformes en pozos profundos de Hunucmá, Yucatán  
57 p  
2018

Para seguir "indolente compañero de viaje,  
al navío surcando los amargos abismos".  
C.B.

## **Agradecimientos**

A mi madre y padre, por todos los sacrificios, por la entrega y el apoyo incuestionable, a mi familia por su paciencia y consejos.

A mi preciosa estrella y a mi Sol, por haber iluminado mis días.

A la doctora Leticia Arena, por su amistad, confianza y asesoría no sólo en lo académico sino también en lo personal.

Al doctor Rafael Rojas, la doctora Carmen Ponce, a la doctora Elsa Noreña por su guía y atención.

A Karlita, al doctor Sergio, al doctor Gilberto† por su amistad y por todas las enseñanzas vividas, por hacer que la vida en la Unidad tomara otro sentido.

A Miguel Keb, don Zorro y al equipo de la Rectoría de Agua Potable de Hunucmá por su compromiso y por compartir con toda amabilidad sus experiencias.

A Aidé, Ana, Ángel, Amaury, Chavita, a la Chiva, Gaby, Honorio, Iván, Jacky, Nancy, Reyna, por sus ánimos, su compañía en los largos días de trabajo y los breves momentos de ocio porque sus diversos caminos son una inspiración.

Finalmente, a todos mis compañeros de la segunda generación de la Licenciatura, y a la Unidad Académica Campus Sisal que durante 4 años me hicieron parte de una gran familia.

# INDICE DE CONTENIDO

<b>Lista de tablas</b>	<b>7</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>7</b>
<b>Resumen</b>	<b>8</b>
<b>Introducción</b>	<b>9</b>
<b>1. Antecedentes</b>	<b>12</b>
1.1 Zona de estudio.....	12
1.2 Legislación y normatividad.....	14
1.3 Indicadores biológicos y comunidades bacterianas.....	16
1.4 Marcadores moleculares y Gen 16S rADN.....	18
1.4.1 Identificación molecular y secuenciación de ADN.....	19
1.4.2 DGGE.....	20
1.5 Índices de diversidad.....	21
<b>2. Objetivos</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo general.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
<b>3. Metodología</b>	<b>24</b>
3.1 Muestreo.....	24
3.2 Análisis microbiológicos.....	26
3.3 Técnicas Independientes de Cultivo.....	26
3.3.1 Extracción de ADN.....	27
3.3.2 Amplificación y Secuenciación.....	28

3.3.3 DGGE.....	29
3.3.4 Reamplificación de bandas.....	30
3.3.5 Secuenciación.....	30
<b>4. Resultados</b>	<b>31</b>
4.1 Cuantificación de Coliformes.....	31
4.2 Extracción de ADN.....	32
4.3 Productos de PCR.....	33
4.4 Bandas DGGE.....	34
<b>5. Discusión</b>	<b>40</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>44</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>46</b>
<b>Anexos</b>	<b>56</b>

<b>Lista de tablas y figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura I. Ubicación de los pozos de extracción e infraestructura de agua potable</b>	<b>25</b>
<b>Figura II. Condiciones de temperatura del programa EUBAC.</b>	<b>28</b>
<b>Figura III. Productos de extracción de ADN temporadas de nortes y secas, electroforesis en gel de agarosa</b>	<b>32</b>
<b>Figura IV. Productos de extracción de ADN temporada de lluvias</b>	<b>32</b>
<b>Figura V. Amplificaciones de productos de PCR</b>	<b>33</b>
<b>Figura VI. Gel de poliacrilamida con un gradiente desnaturalizante del 35 al 60 % (DGGE)</b>	<b>34</b>
<b>Figura VII. Riqueza de OTU identificadas por pozo</b>	<b>35</b>
<b>Figura VIII. Índice de Shannon-Weaver</b>	<b>36</b>
<b>Figura IX. Índice de Simpson</b>	<b>37</b>
<b>Figura X. Índice de Eveness</b>	<b>38</b>
<b>Figura XI. Grupos filogenéticos identificados y su proporción con respecto al total de las muestras</b>	<b>39</b>
<b>Tabla I. Condiciones para la amplificación de un fragmento de ADN con cebadores para el grupo de Eubacterias</b>	<b>28</b>
<b>Tabla II. Concentraciones de los reactivos utilizados en la preparación del gel DGGE.</b>	<b>29</b>
<b>Tabla III. Volúmenes utilizados en la re amplificación de los productos (bandas) del DGGE.</b>	<b>30</b>
<b>Tabla IV. Cuantificación de coliformes totales y fecales a través del método del número más probable, temporada de secas.</b>	<b>31</b>
<b>Tabla V. Cuantificación de coliformes totales y fecales a través del método del número más probable, temporada de lluvias.</b>	<b>31</b>

## Resumen

En la Península de Yucatán el principal aporte de abastecimiento de agua dulce es el manto acuífero, que por la naturaleza permeable del suelo es altamente vulnerable ante la descarga y percolación de aguas residuales y otros desechos que se generan en la región.

La caracterización microbiológica de las fuentes de agua es una herramienta para el reconocimiento del potencial origen de contaminantes y posibles riesgos a la salud. Así mismo, la identificación y cuantificación de bacterias dentro de la comunidad microbiana es fundamental para comprender la estructura y función de cualquier ecosistema.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la calidad microbiológica del agua de pozos profundos del Municipio de Hunucmá Yucatán, que suministran de agua potable a la localidad, para conocer las comunidades bacterianas que los habitan a través de su cuantificación mediante el método del número más probable (NMP), así mismo utilizando técnicas moleculares independientes de cultivo.

Se realizaron colectas de agua provenientes de tres pozos durante las épocas hidrológicas de nortes en 2011 y secas y lluvias del 2012; Se extrajo el ADN metagenómico a través de la técnica conocida como Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) fueron identificadas un total de 42 bandas, de las cuales fueron recuperadas 36 secuencias. Se identificaron cambios en la riqueza de unidades taxonómicas operacionales (OTU) a lo largo de las estaciones hidrológicas demostrando que en dos temporadas las tres únicas fuentes de agua potable se encontraban fuera de los límites establecidos en la normatividad para consumo humano, resultando la temporada de lluvias como la de mayor riqueza.

## Introducción

El agua es un recurso vital en todas las actividades humanas desde las más básicas, hasta las actividades productivas agrícolas e industriales, que impulsan las inversiones en obras de infraestructura y servicios, constituyendo un catalizador para el desarrollo y una esperanza de mejor calidad de vida. No obstante, este recurso indispensable es también altamente vulnerable cuando su manejo y tratamiento no son los adecuados.

A nivel mundial, alrededor del 80% de la población se encuentra expuesta ante amenazas que ponen en riesgo la seguridad del agua (Vorosmarty *et al.* 2010) entre las que podemos listar el uso agrícola insostenible, la proliferación de enfermedades contagiosas por la contaminación, la degradación de los acuíferos y finalmente la escasez.

La escasez de agua es una función de suministro y demanda, esta última está aumentando a un ritmo alarmante, el PNUMA (2011) estima que para el año 2025 alrededor de 1800 millones de personas vivirán en países o regiones con una escasez de agua absoluta. Actualmente 35 millones de mexicanos ya se encuentran en situación de poca disponibilidad de agua en términos de cantidad y calidad (PNH. 2014) La importancia vital de este recurso, sumado a la contaminación creciente, marcan la prioridad de una mejora en la eficiencia de su uso desde la perspectiva del desarrollo sostenible.

En América Latina y el Caribe aproximadamente un 20% del total de las extracciones de agua se utilizan para el consumo humano, y más del 70% se destina a la agricultura (Mora, 2003; Jouravlev, 2004). En México el monitoreo del volumen y la distribución de los recursos hidrológicos comenzó desde 1921 en la zona centro y norte del país, alentado principalmente por la preocupación a nivel internacional de un camino hacia la planificación urbana con miras al desarrollo económico y social que, al mismo tiempo se asegurase de cubrir las necesidades de poblaciones en constante y rápido crecimiento (CONAGUA, 2011).

Del volumen de agua total necesario para satisfacer las demandas del sector doméstico, el 70% es obtenido de los acuíferos subterráneos (Arreguín-Cortés y López-Pérez, 2007).

En el territorio nacional se han identificado 653 acuíferos, de los cuales 32 para 1975 ya habían sido sobre explotados, este número se incrementó a 36 en 1981, a 80 en 1985 y finalmente a 100 en el 2009 (CONAGUA 2011), desde entonces el número de acuíferos sobre explotados ha oscilado anualmente entre 100 y 106 de acuerdo con las Estadísticas del Agua en México (CONAGUA, 2012).

Los acuíferos son reservas subterráneas de agua, su ubicación y conexiones con otros cuerpos de agua dependen de las condiciones y el comportamiento tanto geológico como climático de la zona; en México sólo una tercera parte del territorio (la región sureste) es considerada húmeda con precipitaciones que superan los 2000 mm por año; dada la ausencia de ríos y lagos en el Estado de Yucatán, la importancia del agua subterránea es mayor ya que el subsuelo suele ser la principal y la única fuente permanente de agua (CONAGUA, 2015).

Se estima que el volumen de agua residual generada en la Región es de 237 hm<sup>3</sup> y el 98% de este no es tratado (Programa Hídrico Regional, 2012) siendo ésta una de las principales causas de contaminación, alteración y/o degradación de las aguas subterráneas y ecosistemas asociados.

En términos prácticos Rojas e Iza (2009) mencionan que “si el agua subterránea es contaminada en una de las cuencas, esa contaminación puede propagarse a otras vecinas...La sostenibilidad también se relaciona con el principio de precaución, esto implica que los Estados deben adoptar todas las medidas para prevenir, reducir o controlar un daño al ambiente cuando exista riesgo de un efecto negativo, incluso cuando no hayan pruebas contundentes de la relación causal entre el acto o la omisión”.

La principal fuente de abastecimiento de agua dulce en la Península de Yucatán son las aguas subterráneas. Integrada por los Estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo, ésta región ha sido clasificada con las siglas RHA XII PY por la Comisión Nacional del Agua, y cuenta con una disponibilidad física del recurso suficiente para satisfacer sus usos actuales y futuros, por lo que la escasez no representa una amenaza, la verdadera problemática yace en torno a la baja cobertura de alcantarillado y la falta de tratamiento de aguas residuales que por su naturaleza de origen contienen una gran variedad de compuestos biológicos y químicos.

Ante la abundante precipitación pluvial y las peculiares características topográficas, así como la precaria atención en la disposición de desechos en torno a la Península de Yucatán, existen trabajos de investigación, en los que se describe desde la vulnerabilidad de los acuíferos kársticos, hasta los que detallan algunos procesos que modifican la calidad del agua subterránea en el noroeste de Yucatán (Escolero *et al.* 2005). Sin embargo, la mayoría de los estudios se enfocan a las propiedades y variaciones físico-químicas durante distintos periodos, siendo poco los estudios que realizan un seguimiento estacional del comportamiento de componentes biológicos.

En éste aspecto, Graniel-Castro *et al.* 2003 han demostrado que existen variaciones entre las estaciones de secas, nortes y lluvias, debido a que los patrones de filtración a través del suelo kárstico determinan la cantidad de solutos en el agua subterránea y probablemente, también la diversidad y la abundancia de las comunidades bacterianas. Considerando que de las 20 principales causas de enfermedad en la península la mayoría son infecciones generadas por protozoarios y otros patógenos, y que éstas son consideradas por el sector salud como enfermedades de origen hídrico (Mantilla *et al.* 2002), resulta evidente la incidencia de microorganismos al acuífero y la importancia de estudios destinados a conocer y monitorear la calidad del agua de consumo humano, así como la diversidad y composición de las comunidades bacterianas.

Adicionalmente se han aislado bacterias en aguas subterráneas capaces de inducir la producción de biocombustible (Wang *et al.* 2012) identificándose además la presencia de microorganismos con potencial en la farmacología (Khalifa *et al.* 2001) y otras aplicaciones biotecnológicas en los estudios relacionados con la microbiota presente en el agua.

Los estudios relacionados con la proliferación bacteriana, en otras palabras, la reproducción o multiplicación de dichos organismos, (Lee *et al.* 2009) demuestran que sólo el 1% de éstos [0.001 al 0.1% en el caso de muestras de agua] es acorde a ser cultivado utilizando técnicas tradicionales. Por tal motivo el desarrollo de los métodos independientes de cultivo como el análisis molecular de las comunidades bacterianas, se ha considerado una herramienta concisa que ofrece nuevas oportunidades para el análisis de la estructura y composición de las especies en comunidades microbianas (Muyzer *et al.* 1993). A diferencia de la identificación basada en los análisis microbiológicos convencionales, el uso de pruebas moleculares, como el de Reacción en

Cadena de la Polimerasa (PCR) que permiten obtener resultados en un menor lapso de tiempo, entre otras muchas ventajas (Sartory y Watkins, 1999) por lo que se han establecido como una alternativa cada vez más utilizada.

## **1. Antecedentes**

### **1.1 Zona de estudio**

La Península de Yucatán está localizada entre 19° 40' y 21° 37'N y 87° 30'y 90° 26'W, rodeada por el Golfo de México y el Mar Caribe, representa el 2% de la superficie del territorio mexicano (INEGI 2000). Está caracterizada por tres estaciones climáticas bien definidas: la estación de secas (de marzo a mayo), lluvias (junio a octubre) y finalmente nortes de noviembre a febrero (Schmitter-Soto *et al.* 2002).

El acuífero de la Península de Yucatán es de naturaleza kárstica, es decir, su geomorfología está compuesta principalmente por rocas sedimentarias del tipo calizas, dolomitas y evaporitas metamórficas y mezclas de ellas (Duarte *et al.* 2013), su naturaleza es porosa por lo que no existen ríos, y ha sido caracterizado tanto por su alta permeabilidad como por su vulnerabilidad hacia la contaminación (Marin 1990; Marin y Perry 2004). Caracterizado dentro de la Región Hidrológico-Administrativa XII Península de Yucatán (RHA XII PY), la delegación regional de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) ha determinado que los primeros 20 metros de agua dulce en el manto acuífero de Mérida, no son aptas para consumo humano.

Entre las actividades económicas de mayor importancia estatal destacan en primer lugar los servicios de comercio (21.5%), seguidos por los servicios inmobiliarios y de alquiler de bienes muebles e intangibles (13.1%), construcción (11.6%) y la industria alimentaria (9.9%) ésta última incluye las actividades agropecuarias. Juntas representan el 56.1% del PIB estatal. (INEGI 2014).

Yucatán no es un estado con gran desarrollo industrial no obstante, sus características geo hidrológicas son muy particulares, además el 60% de su superficie se encuentra a una distancia de entre menos de 10 y 60 m del agua subterránea (Bautista y Zinck, 2010). El suelo en la región es de espesor muy delgado, dominando los aportes de agua dulce tipo subterráneo; en cuanto a la descarga de aguas residuales, de acuerdo con el Registro Público de derechos del Agua (REPDA), predominan las aguas de uso en

servicios con el 82%, seguidas por los de usos acuícola 10%, industrial 5%, generación de energía 2% y pecuario 1%.

Anualmente se descargan en el acuífero de Yucatán 102.3 mm<sup>3</sup> de aguas residuales producto de todas las actividades que no reciben tratamiento alguno antes de ser vertidas al acuífero (CONAGUA 2012, Herrera-Silveira *et al.*, 2005) además, existe una importante cantidad de posibles fuentes generadoras que no declaran sus residuos y posiblemente no realicen un manejo adecuado de los mismos (Cabañas *et al.*, 2010).

Entre algunas de las principales prácticas que han sido identificadas como potenciales fuentes de contaminación en Yucatán, pueden listarse el uso inmoderado de agroquímicos (Michel y Aguilar, 2011) como plaguicidas y fertilizantes en la creciente industria citrícola, la perseverante y expansiva presencia de granjas avícolas y porcícolas, y la insuficiente atención en la disposición de desechos (Pacheco *et al.*, 2002). En materia de saneamiento, la cobertura de alcantarillado para la red pública es sólo del 2.7 por ciento para Yucatán, en comparación de la media nacional de 46.5 por ciento (CONAGUA, 2012).

El municipio de Hunucmá está ubicado a 25 km de la capital del Estado, se encuentra comprendido entre los paralelos 20° 55' y 21° 14' N y los meridianos 89° 48' y 90° 12' W y tiene una altura promedio de 8 metros sobre el nivel del mar. Tiene una extensión de 819.76 km<sup>2</sup> y una densidad de población de 46.9 hab. /km<sup>2</sup>, cuenta con un clima semiseco con lluvias en verano, temperatura media anual de 26°C y precipitación media anual de 908.8 mm (INAFED, 2008).

Según datos de la Comisión Nacional de Población, en el municipio casi una cuarta parte de sus ocupantes se encuentran en viviendas sin drenaje ni excusado, experimentando un mediano grado de marginación, el 60.72% de su población ocupada percibe sólo dos salarios mínimos; y el 47.66% de las viviendas presenta hacinamiento (CONAPO, 2015; PNUD-México, 2000), si bien Hunucmá está conformado por varias localidades, más del 81% de su población está concentrada en la cabecera municipal del mismo nombre, ésta es considerada además la localidad más poblada de la Región Noreste del estado (*Cuaderno Hunucmá, 2010*).

En Yucatán la disposición de agua en las grandes urbes a través de cisternas ha sido vital desde la época prehispánica como evidencia González 2003, cuando se utilizaban los llamados chultunes, cámaras subterráneas para la captación y almacenamiento de agua de lluvia. En la actualidad dichos depósitos han sido substituidos por pozos; Un pozo se define de manera oficial como aquella obra de ingeniería, en la que se requiere de herramientas mecánicas para su construcción y que, permite extraer agua del subsuelo con fines de abastecimiento de agua para su uso y consumo humano en sistemas públicos y privados (NOM-230-SSA1-2002).

Los pozos de extracción de agua son de vital importancia para la salud y el desarrollo de las poblaciones, la contaminación es mayor en los pozos pocos profundos, no obstante esto no exime a los de mayor profundidad de ser igualmente vulnerables, principalmente debido a fracturas verticales en el subsuelo o bien, a malos manejos en los pozos de inyección.

A nivel nacional se están sentando las bases para evitar acciones que acentúen la sobreexplotación de los acuíferos, a través de la renovación de políticas existentes y la creación de nuevas normatividades cuyo foco sea el ajuste de los usos y las asignaciones de cantidades disponibles del recurso (Semblanza histórica del agua en México, 2011).

## **1.2 Legislación y normatividad**

Las cuencas del país están organizadas en 37 regiones hidrológicas que, con el propósito de ser unidades representativas de los fenómenos biofísicos a nivel regional para la planeación y gestión de los recursos naturales, se agrupan en 13 regiones hidrológico-administrativas (RHA). Todas ellas regidas por la Ley de Aguas Nacionales, en la que se establece que la planificación hídrica debe realizarse desde los ámbitos local, de cuenca hidrológica y nacional (Artículo 14 bis 6 fracción I), también se establecen las atribuciones en cuanto a la cantidad de agua máxima que es factible explotar anualmente, también conocido como volumen de agua renovable (Programa Hídrico Regional, 2012).

Si bien se considera que con un volumen neto disponible de 7,294 m<sup>3</sup>/hab./año, la Península de Yucatán (RHA XII PY) está muy por encima de considerarse bajo estrés

hídrico (1700 m<sup>3</sup>), aspectos como la calidad del agua resultan ser los limitantes para su uso.

De manera general, los estudios de control de calidad del agua se concentran principalmente en las áreas urbanas, mientras que las zonas rurales se enfrentan además a problemas de desabastecimiento, donde factores como los aspectos culturales y socio-económicos condicionan la aceptación o el rechazo a ciertas formas de disposición de desechos orgánicos y de potabilización (Rojas e Iza, 2009).

El agua potable es aquella que no contiene contaminantes, ya sean químicos o agentes infecciosos (NOM-127-SSA1-1994).

La presencia de algunos patógenos en particular (indicadores biológicos de contaminación), en fuentes de agua para consumo humano sirve para alertar a las autoridades sanitarias de posibles brotes epidémicos, así como potenciales riesgos que éstos puedan llegar a significar a las poblaciones cercanas (Valenzuela *et al.* 2009); la caracterización microbiológica del agua subterránea permite además, la identificación de las fuentes de contaminación ya sean difusas o puntuales, como el caso de cierto grupo de bacterias (coliformes) cuya presencia en sistemas acuáticos es evidencia de contaminación de origen fecal (Wong y Barrera-Escorcía, 1996).

El número de estos organismos puede establecerse, según las Normas Oficiales Mexicanas 112 y 113 SSA1-1994, mediante el conteo de unidades formadoras de colonias o bien, por el uso de la técnica NMP, también conocida como técnica de dilución en tubo y proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base en que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

La concentración o contenido máximo de éstos microorganismos en el agua para considerar que no causan efectos nocivos a la salud de los consumidores, está definida como los límites permisibles, establecidos para los coliformes Totales en 2 unidades de NMP/100 ml e Indetectables NMP/100 ml para los coliformes Fecales en agua para consumo humano por las normas anteriormente citadas.

### 1.3 Indicadores biológicos y comunidades bacterianas

El término microorganismo incluye a distintas formas de vida que comparten la característica de tener un tamaño menor de 200µm a este grupo pueden pertenecer los tres dominios Archaea, Bacteria y Eukarya (Woese *et al.*, 1990). Para comprender la estructura y función de un ecosistema, la capacidad para identificar y cuantificar los tipos de microorganismos dentro de una comunidad es fundamental (Yeon, 2005).

Históricamente, el grupo coliforme ha sido usado como indicador de la calidad del agua, principalmente debido a su relación con el tubo intestinal y con organismos patogénicos (Conboy y Goss, 2001); formado por bacterias de origen entérico y pertenecientes al grupo coli-aerogenes, los coliformes tienen forma de bacilo y resultan negativos a la tinción de Gram, son capaces de fermentar lactosa con la producción de gas e incluyen a los géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Wong y Barrera-Escorcia, 2005).

Dentro de éste grupo, los coliformes fecales representan ventajas como indicadores biológicos de contaminación puesto que su evaluación es relativamente simple y directa, no se multiplican fuera del tracto intestinal de animales de sangre caliente además, se considera que un número reducido de estos organismos reflejan la ausencia de otras bacterias peligrosas (Cortés-Lara, 2003, John *et al.* 2004, Mc Feters *et al.* 1974).

No obstante se reconoce la poca eficiencia entre los métodos tradicionalmente recomendados para la detección de coliformes (NOM-112-SSA1-1994), principalmente debido a:

- 1.- Existen variantes de la especie *E. coli* que no producen gas de la lactosa o lo hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de NMP
- 2.- La capacidad de fermentar la lactosa está asociada a genes localizados en plásmidos que son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a los coliformes.

En la zona de interés, estudios referentes a la evaluación de indicadores biológicos han reportado que el agua subterránea del Estado de Yucatán presenta una calidad bacteriológica clasificada como “peligrosa” y “muy contaminada” (Avila et. al., 2000).

Pese a que las normas vigentes se restringen a la cuantificación por cultivo de coliformes, se ha demostrado que el uso limitado de éstos indicadores puede conducir a resultados erróneos al caracterizar un cuerpo de agua (Field y Samadpour, 2007), ya que al mezclarse dificultan la identificación de las fuentes de contaminación; en el mismo estudio se ha demostrado que algunos enterococos y en particular, uno de los principales representantes del grupo coliforme, *E. coli*, son capaces de sobrevivir, crecer y establecer poblaciones en ambientes naturales de agua dulce, suelos y sedimentos; si bien el origen de dichas poblaciones se asume a ser fecal, la evidencia genética no los relaciona a una fuente humana o animal, sino que respalda su evolución a cadenas exclusivamente ambientales.

Aunado a esto, no se ha comprobado una correlación directa entre ellos, la presencia o ausencia de otros patógenos como virus, protozoos, y huevos de helminto (WHO, 2001), evidenciando el peligro potencial de éstos y pasando por alto aquellos microorganismos que podrían resultar de interés para la biotecnología y la salud (Dutka, 1979).

Al determinar el grado de contaminación bacteriológica en la región, Pacheco et. al., 2000, demuestra los elevados porcentajes de Enterobacterias responsables de algunos cuadros clínicos de gastroenteritis presentes en agua subterránea de zonas rurales y reconoce la importancia de su monitoreo.

Las bacterias heterótrofas constituyen, después de los virus la población más numerosa dentro de la comunidad microbiana (Dortch y Packard, 1989; Marie *et al.*, 1999) llevan a cabo funciones de importancia fundamental, por ejemplo, controlan los flujos de nutrientes en el sistema a través de la mineralización de la materia orgánica (Schut *et al.*, 1997).

En ambientes acuáticos, la distribución de las comunidades bacterianas puede verse afectada tanto por factores espaciales como por factores ambientales (Langenheder y

Ragnarsson, 2007); en relación con la abundancia, se ha demostrado (Karner *et al.*, 2001) que la población bacteriana representa un 90% del total de la biomasa en muestras por encima de 150 m de profundidad, y que su abundancia relativa decrece conforme aumenta la profundidad en aguas marinas.

El análisis de las comunidades bacterianas en el medio ambiente ha avanzado de técnicas que dependen del cultivo a técnicas que no dependen de éste, obteniendo como resultado el descubrimiento de nuevos grupos de organismos o taxas (Yeon S., 2005).

#### **1.4 Marcadores moleculares y gen 16S rADN**

Los marcadores de ADN son útiles en la investigación básica, como el análisis filogenético y la búsqueda de genes útiles (FAO, 2010); en la actualidad, el gen ribosomal 16S DNA es un blanco que sirve como marcador universal y ha sido el más utilizado para estudios de diversidad y filogenia bacteriana (Atlas *et. al.*, 2002).

Relativamente poco afectado por las presiones ambientales y con una función esencial en la síntesis de las proteínas (Le Borgne, 2005), el gen 16S rADN contiene regiones conservadas y otras hipervariables que proveen especificidad de especie, lo que resulta muy útil para la identificación de las bacterias (Flores-Gallegos, 2009 en García-Lazalde *et al.* 2011).

Considerado por Woese como el cronómetro molecular definitivo, el 16S ha persistido a pesar de que existen macromoléculas alternativas, principalmente por las siguientes razones:

- 1) Por su antigüedad está presente en todas las bacterias actuales.
- 2) Ya que su estructura y función han permanecido constantes, las alteraciones en la secuencia probablemente reflejan cambios aleatorios.
- 3) Contiene suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- 4) Su tamaño, de 1500 nucleótidos (nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- 5) La conservación en estructura secundaria sirve en las comparaciones aportando una base para el alineamiento preciso.

6) En torno al 16S existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento (Rodicio y Mendoza 2004).

Adicionalmente el avance en las técnicas de secuenciación ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías para inferir la relación genotípica entre microorganismos cercanamente relacionados basadas en la comparación de genomas completos (Díaz, 2011).

#### **1.4.1 Identificación molecular y secuenciación de ADN**

Para conocer la diversidad taxonómica de las bacterias de vida libre, así como cuantificar su abundancia relativa en medios naturales, se requieren estudios basados en herramientas moleculares, a partir de genes que pueden ser directamente amplificados de la biomasa procariótica en una muestra ambiental (López y Zaballos, 2005).

Según Petti, 2007 las regiones del genoma que se utilizan deben cumplir con características fundamentales:

- 1) Estar presentes en todas las especies bacterianas.
- 2) Contener secuencias altamente conservadas a las cuales van dirigidos los partidores.
- 3) Incluir secuencias polimórficas para poder diferenciar distintas especies

En este sentido la aplicación de análisis de secuencias basadas en el gen 16S, permite el estudio directo de la estructura de la comunidad, diversidad y filogenia de microorganismos en casi cualquier ambiente (Theron y Cloete, 2000) lo que ha permitido vislumbrar la complejidad de las comunidades microbianas en la naturaleza.

La técnica de PCR consta de varios ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos, previamente descritos por Baumforth *et al.* 1999:

- 1) Desnaturalización del ADN mediante ruptura de puentes de hidrógeno.
- 2) Hibridación de las cadenas desnaturalizadas con los cebadores.
- 3) Extensión de la longitud de los cebadores por la polimerasa e inserción de los nucleótidos libres.

#### **1.4.2 DGGE**

Existen herramientas como las técnicas de huella genética de las que se puede obtener información de la composición de la comunidad microbiana en un ambiente; estos métodos permiten una comparación entre comunidades con base en la presencia e intensidad relativa de bandas individuales (Portillo y González, 2008 en Díaz, 2011), entre los métodos más utilizados está la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

Esta técnica ofrece uno de los métodos de detección de mutación más sensibles, ya que provee cerca de un 99% de eficiencia (Grompe, 1993). Ampliamente utilizada en ecología microbiana (Buesing *et al.*, 2009), el DGGE separa mediante electroforesis, fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferentes secuencias de nucleótidos, tiene un alto grado de resolución y puede detectar dichas diferencias de diez a una base; en este tipo de análisis cada banda en el gel es considerada como una especie distinta en la comunidad y la intensidad de las bandas refleja la abundancia de esa secuencia en la comunidad (Muyzer y Smalla, 1998).

Como menciona Moreno *et al.* 2011, son también necesarias medidas de diversidad como un componente al justificar acciones de protección al ecosistema.

## 1.5 Índices de diversidad

### Riqueza (S)

Se define como el número de especies de un taxón particular en un ensamble o muestra (Mangurran, 2004) en este caso, la riqueza es igual al número de bandas por carril.

$$S = \# \text{ de bandas detectadas}$$

### Índice de Shannon-Weaver

Mide la entropía definida como “el grado de incertidumbre en la identidad de la especie a la que pertenece un individuo seleccionado al azar de la comunidad” Op. Cit, Refleja la heterogeneidad de una comunidad en base al número de especies presentes y su abundancia relativa (Pla, 2006). Está representado por la ecuación:

$$H' = -\sum P_i \ln P_i$$

Donde  $P_i$  son las proporciones de las especies (número de individuos de la especie  $i$  respecto al total de individuos de las  $S$  especies de una comunidad).

### Índice de Simpson

Considerada como la medida más simple de diversidad, toma en cuenta además de la abundancia, la riqueza de especies, y expresa la probabilidad de extraer de la comunidad dos individuos al azar que sean de la misma especie, valores altos indican la dominancia de alguna especie (Del Río, 2003). Se calcula a partir de la proporción de individuos de cada especie  $i$  que contribuye al total de la muestra.

$$\lambda = 1 - \sum P_i^2$$

Donde  $P_i$  son las proporciones de las especies (número de individuos de la especie  $i$  respecto al total de individuos de las  $S$  especies de una comunidad)

## Índice de equidad o Eveness

El índice de uniformidad o Eveness, es una medida de la similitud de especies en sus respectivas abundancias, puede ser utilizada para ayudar a definir y discriminar las comunidades ecológicas (Magurran, 2004). Se describe por la fórmula:

$$J = H'/H_{\max} = H'/\ln S$$

Donde la diversidad máxima  $H_{\max}$  está dada por el logaritmo natural de la riqueza  $S$ , es decir el número de especies.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

*1. Analizar la diversidad de la comunidad microbiana presente en el agua de tres pozos profundos, que suministran de agua potable al municipio de Hunucmá mediante el análisis de secuencias del 16S rADN.*

### **2.2 Objetivos específicos**

*-Generar un registro de la calidad microbiológica del agua potable de Hunucmá con validez ante la normatividad vigente.*

*-Analizar la comunidad bacteriana presente en el agua potable de los pozos profundos de Hunucmá y sus variaciones a través de un año hidrológico mediante la aplicación de la técnica molecular DGGE.*

### **3. Metodología**

#### **3.1 Muestreo**

En el mes de octubre del año 2011 se inició un acercamiento al H. Ayuntamiento del Municipio de Hunucmá, identificándose a la autoridad encargada de la gestión del agua conocida como la Regiduría de Agua Potable; se procedió a solicitar los permisos pertinentes para el acceso directo a las fuentes de abastecimiento y para la extracción de agua para su consiguiente análisis.

En la Figura 1 se muestra la ubicación de los pozos de extracción e infraestructura de agua potable.

Las muestras de agua dulce se recolectaron de los únicos tres pozos profundos de extracción que abastecían al municipio, para posteriormente ser procesadas por un sistema de filtrado. A continuación, se describen las particularidades de estos pozos, así como la temporada en las que se obtuvieron las muestras:

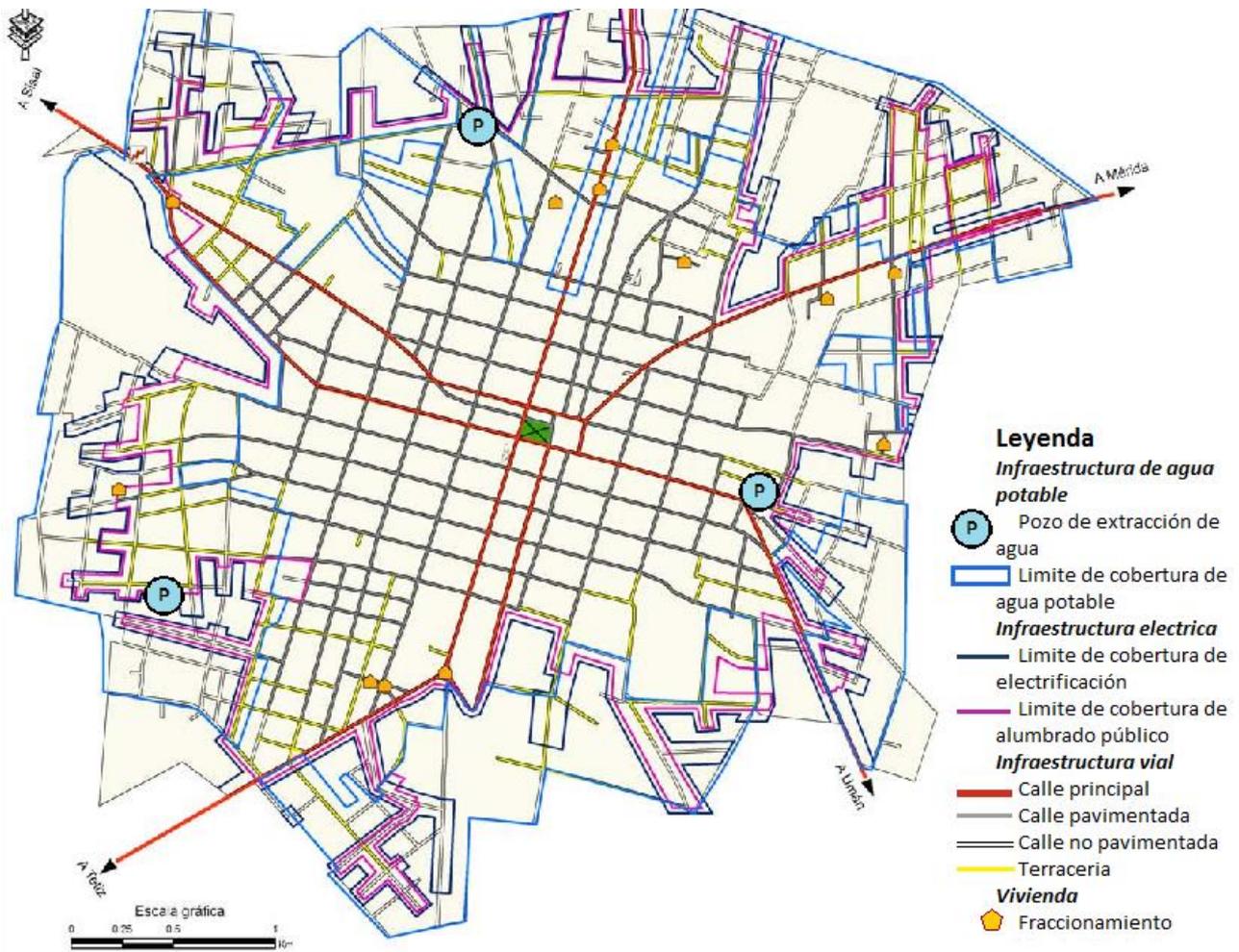
POZO A: Se encuentra ubicado en la colonia Fátima, en las coordenadas  $21^{\circ}00'33.93720''$ ,  $21^{\circ}00'31.52557''$   $Ny89^{\circ}53'36.16440''$ ,  $89^{\circ}53'36.01726''$  W al suroeste de la ciudad. Esta zona es reconocida como el área de mayor pobreza y carencia de servicios básicos, así como de mayor incidencia en la defecación al aire libre y el uso de pozos domésticos para satisfacer las necesidades de agua.

En éste pozo se realizaron dos muestreos para la estación de secas, el primero en presencia y el segundo en ausencia de vegetación invasora en los alrededores inmediatos a la fuente de extracción de agua, bajo el supuesto de que los índices de diversidad podrían verse afectados debido a las diferentes condiciones del sustrato. También se realizó un muestreo en la temporada de lluvias.

POZO B Colonia de Santo Domingo, coordenadas  $21^{\circ}01'48.29160''$ ,  $21^{\circ}01'45.88286''$  N y  $89^{\circ}52'43.39920''$ ,  $89^{\circ}52'43.25674''$  W ubicado hacia el norte, en la zona se encuentran dos granjas avícolas cuya población se estima entre 62 y 66 mil aves cada una. Se realizaron muestreos en las estaciones de Secas y Lluvias.

POZO C Colonia Tres Reyes, ubicado al este de la ciudad, entre  $21^{\circ}00'47.41560''$ ,  $21^{\circ}00'45.00465''$  N y  $89^{\circ}51'59.30640''$ ,  $89^{\circ}51'59.16318''$  W. Zona recientemente

urbanizada, a pesar de que la concentración de habitantes es menor, los servicios básicos se encuentran igualmente limitados. La colección de muestras incluyó el año hidrológico entero, comenzando en la temporada de nortes.



**Figura 1. Ubicación de los pozos de extracción e infraestructura de agua potable. Tomado de Carta de Infraestructura Urbana, Cuaderno Municipal para el desarrollo urbano.**

Todos los pozos tienen una profundidad de 30 m, cuentan con un sistema de bombeo directo a la red, y el tipo de bomba es de turbina vertical. En los tres sistemas el ducto de desfogue a través del cual se captaron las muestras de agua se encuentra en la superficie antes de iniciar el proceso de desinfección, por lo que se dejó correr el agua previamente por un lapso aproximado de 5 min, y se recolectaron las muestras en garrafones de 20 l previamente tratados mediante el proceso de lavado convencional de una planta purificadora.

Debido al método de extracción de las muestras de agua, únicamente se llevó a cabo la exploración microbiológica de las mismas.

Para la determinación de coliformes se utilizaron bolsas estériles tipo Whirl-pak con cierre hermético, colectándose un litro de agua por pozo y fueron conservadas en refrigeración durante aproximadamente hora y media hasta ser entregadas en el Laboratorio Estatal de Salud Pública y Referencia Epidemiológica, para su análisis mediante NMP.

### **3.2 Análisis microbiológicos**

Las muestras fueron procesadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública y Referencia Epidemiológica del Estado de Yucatán, conforme a lo establecido en la NOM112-SSA1-1994, en conjunto con la NOM 110-SSA1-1994 para la Preparación y dilución de muestras para análisis microbiológico.

### **3.3 Técnicas Independientes de Cultivo**

#### **Filtrado**

Cada muestra de agua fue colocada por separado en un sistema de filtrado al vacío *STERIFIL®* consistente en una primer membrana Nylon Net con tamaño de poro de 5 micras ( $\mu\text{m}$ ) marca *Millipore®* Seguido de un filtro Sterivex de 0.22  $\mu\text{m}$  de la misma marca. La fuerza impulsora del sistema fue una bomba peristáltica.

Se recuperaron un total de 8 filtros Sterivex clasificados como A, B, C, D, E, L, R y S correspondientes a las muestras de:

A: Pozo Tres Reyes en temporada de nortes.

B: Pozo Fátima en temporada de secas con vegetación invasora.

C: Pozo Fátima en temporada de secas sin vegetación.

D: Pozo Santo Domingo en temporada de secas.

E: Pozo Tres Reyes en temporada de secas.

L: Pozo Fátima en lluvias.

R: Pozo Tres Reyes en llluvias.

S: Pozo Santo Domingo en llluvias.

Todos los filtros fueron sellados con Parafilm previa adición de 3 ml de etanol absoluto y resguardados en refrigeración a una temperatura de -20°C.

### **3.3.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se llevó a cabo con el método modificado de fenol-cloroformo-isoamílico de Stulnig y Amberger, 1994 (Anexo 1).

Para comprobar la extracción de ADN obtenido de cada muestra, se realizó una visualización a través de la electroforesis con un gel de agarosa al 1% (Anexo 1) en un fotodocumentador Gel Doc XR, empleando el software Quantityone (Bio-Rad Lab. Inc.).

### **3.3.2 Amplificación y Secuenciación**

Para la amplificación por PCR se emplearon los cebadores 357F (5'CTCCTACGGGAGGCAGCAG3') y 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) descritos por Lane, 1991 y Turner et. Al. 1999 que amplifican en la región hipervariable V3-V5 dando un producto de 620 pares de bases (pb).

El programa empleado en el termociclador MJMini™ Personal ThermalCycler (BIO-RAD) se presenta en la Figura 2.

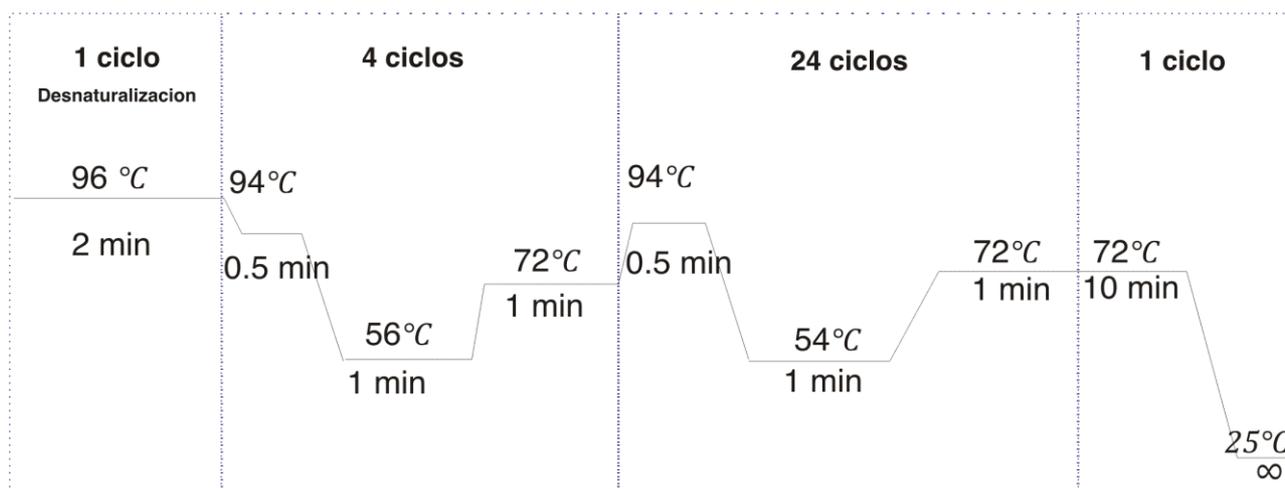


Figura 2. Condiciones de temperatura del programa EUBAC.

La mezcla de reacción empleada en este trabajo se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de los reactivos para amplificar las muestras de ADN metagenómico en un volumen final de 25 $\mu$ l.

Reactivo	Vol. $\mu$ l (1x)	Concentración final
Solución tampón (8x)	5	40 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5	40 $\mu$ l
dNTP's (10 mM)	0.5	4 $\mu$ l
357GC ( $\mu$ M)	1	8 $\mu$ l
907 R ( $\mu$ M)	1	8 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	10.3	---
TaqPolimerasa (5u/ $\mu$ l)	0.2	1.6 $\mu$ l
ADN (50 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2	2 $\mu$ l

Se utilizó un cebador con una cola de Guanina y Citosina G+C (pinza GC) de un tamaño de 40 pb para evitar que la doble hélice de ADN se disocie.

Cebador GC clamp

357F-GC

CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGA  
GGCAGCAG

### 3.3.3 DGGE

Se empleó un gel de poliacrilamida con un sistema desnaturalizante de formamida y urea. Para la preparación del gel se consideraron las condiciones de la tabla 2 para una concentración al 6% (para resultado de PCR Eubacterias con 620 bp aprox.).

Tabla 2. Concentraciones de los reactivos en la preparación del gel DGGE.

Reactivos	Sol. 35%	Sol. 65%
40% Bis Acrilamida	9 ml	9 ml
50x tampón TAE	1.2 ml	1.2 ml
Formamida	8.4 ml	15.6 ml
Urea	8.82 g	16.38 g
dH <sub>2</sub> O	aforar a 60 ml	aforar a 60 ml

Las condiciones de la electroforesis fueron a 65 V y 60 °C por un periodo de 17 horas aproximadamente. Posteriormente el gel fue sumergido durante 45 minutos en un recipiente protegido de la luz con 30 ml de solución TAE concentración 1x y 3 ml de SYBR Green para su visualización.

### 3.3.4 Re-amplificación de bandas

Las bandas migran en el gel de poliacrilamida a diferente velocidad dependiendo de su composición de G-C. Las bandas fueron recuperadas en 50µl de agua ultra-pura para eluir el ADN y mandarse a secuenciar después de una reamplificación sin grapa GC.

Posteriormente se recupera la elución de ADN en un tubo *Eppendorf* nuevo de 1.5 ml; se realizó la re-amplificación del fluido obtenido bajo las condiciones iniciales de PCR, cambiando tan sólo algunos volúmenes (Tabla 3).

Tabla 3. Volúmenes utilizados en la re amplificación de los productos (bandas) del DGGE.

Reactivo	Concentrado	Vol. $\mu$ l (1x)
Solución tampón	5x	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5
dNTP's	10 mM	0.5
357 F	5 $\mu$ M	1
907 R	5 $\mu$ M	1
dH <sub>2</sub> O	---	11.7
TaqPolimerasa	5 u/ $\mu$ l	0.3
ADN	50 $\mu$ g/ $\mu$ l	3

### 3.3.5 Secuenciación

El ADN reamplificado fue enviado a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias se alinearon en el programa BioEdit. Los resultados de las secuencias se han comparado en dos bases de datos electrónicas: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a través del programa BLAST y en el *Ribosomal Database Project* (RDP <https://rdp.cme.msu.edu/>).

## **4.Resultados**

### **4.1 Cuantificación de coliformes**

Los volúmenes almacenados fueron los siguientes: 120 l para la temporada de nortes y 60 y 100 l para las temporadas de secas y lluvias respectivamente; el criterio usado para establecer los distintos volúmenes está basado en el momento en el que cada filtro llegó a la saturación.

Los informes recibidos de los análisis microbiológicos para las pruebas de coliformes totales y fecales por pozo a partir de la temporada de secas mostraron estar fuera de los límites permisibles conforme las Normas Oficiales Mexicanas 112 y 113 SSA1-1994.

Tabla 4. Cuantificación de coliformes totales y fecales a través del método del número más probable, temporada de secas.

<b>Pozo</b>	<b>Coliformes Totales</b>	<b>Coliformes Fecales</b>
Fátima (A)	4.6 NMP/100ml	Menor 1.1 NMP/100ml
Santo Domingo (B)	Mayor de 8.0 NMP/100 ml	Mayor de 8.0NMP/100ml
Tres Reyes (C)	Mayor de 8.0 NMP /100 ml	2.6 NMP/100ml

Tabla 5. Cuantificación de coliformes totales y fecales a través del método del número más probable, temporada de lluvias.

<b>Pozo</b>	<b>Coliformes Totales</b>	<b>Coliformes Fecales</b>
Fátima (A)	Mayor de 8.0 NMP/100 ml	Mayor de 8.0NMP/100ml
Santo Domingo (B)	Mayor de 8.0 NMP/100 ml	Mayor de 8.0 NMP/100 ml
Tres Reyes (C)	Mayor de 8.0 NMP /100 ml	Mayor de 8.0 NMP/100 ml

El agua para consumo humano según la normatividad vigente debe contener no más de 2 NMP para coliformes totales y estar ausente de coliformes fecales, los resultados del conteo microbiano que los pozos reflejan que las 3 fuentes de agua para el municipio están fuera de la norma para consumo humano.

#### 4.2 Extracción de ADN

El ADN fue visualizado en geles de Agarosa al 1%, para las muestras de agua de pozo en las temporadas de nortes y secas (fig. 3) y en la temporada de lluvias (fig. 4)

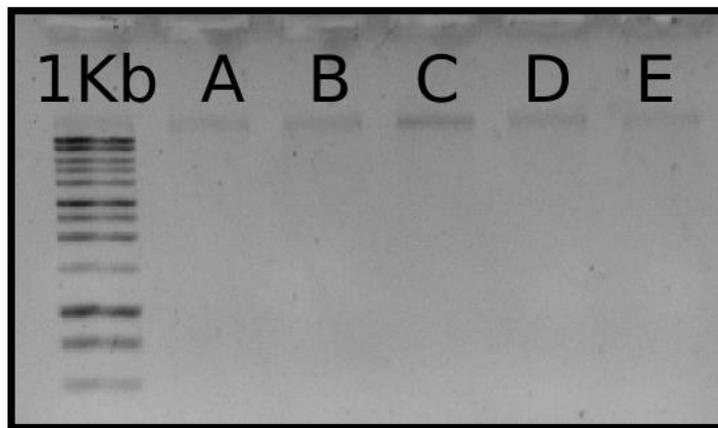


Figura 3. Productos de extracción de ADN temporadas de nortes y secas, electroforesis en gel de agarosa: carril A Pozo Tres Reyes en temporada de nortes, carril B Pozo Fátima en temporada de secas con vegetación invasora, carril C Pozo Fátima en temporada de secas sin vegetación, carril D Pozo Santo Domingo en temporada de secas y carril E Pozo Tres Reyes en temporada de secas. Ocupando el primer carril para la inyección del marcador molecular de 1000 pares de bases o 1 Kb.

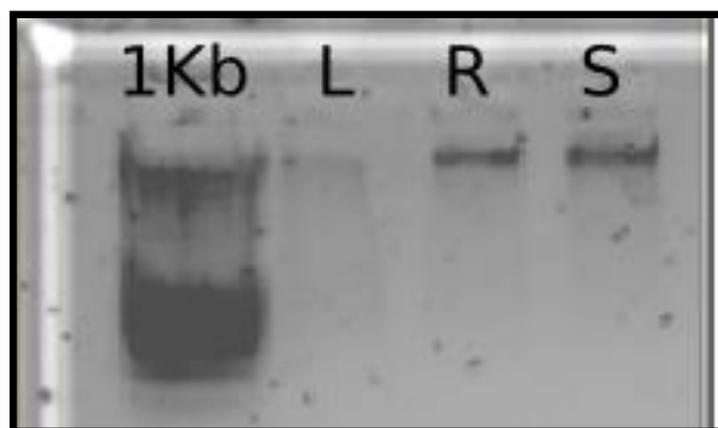


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando extracción de ADN de muestras de agua en temporada de lluvias: L Pozo Fátima, R Pozo Tres Reyes y S Pozo Santo Domingo.

### 4.3 Productos de PCR

Se realizó una visualización en negativo para detectar la presencia de los amplicones para las muestras de agua de pozo en las temporadas de nortes, secas y lluvias (figura 5) ocupando el primer carril para la inyección del marcador molecular con un rango de 100 a 1500 pares de bases. Las bandas A, B, E y S fueron las más intensas.

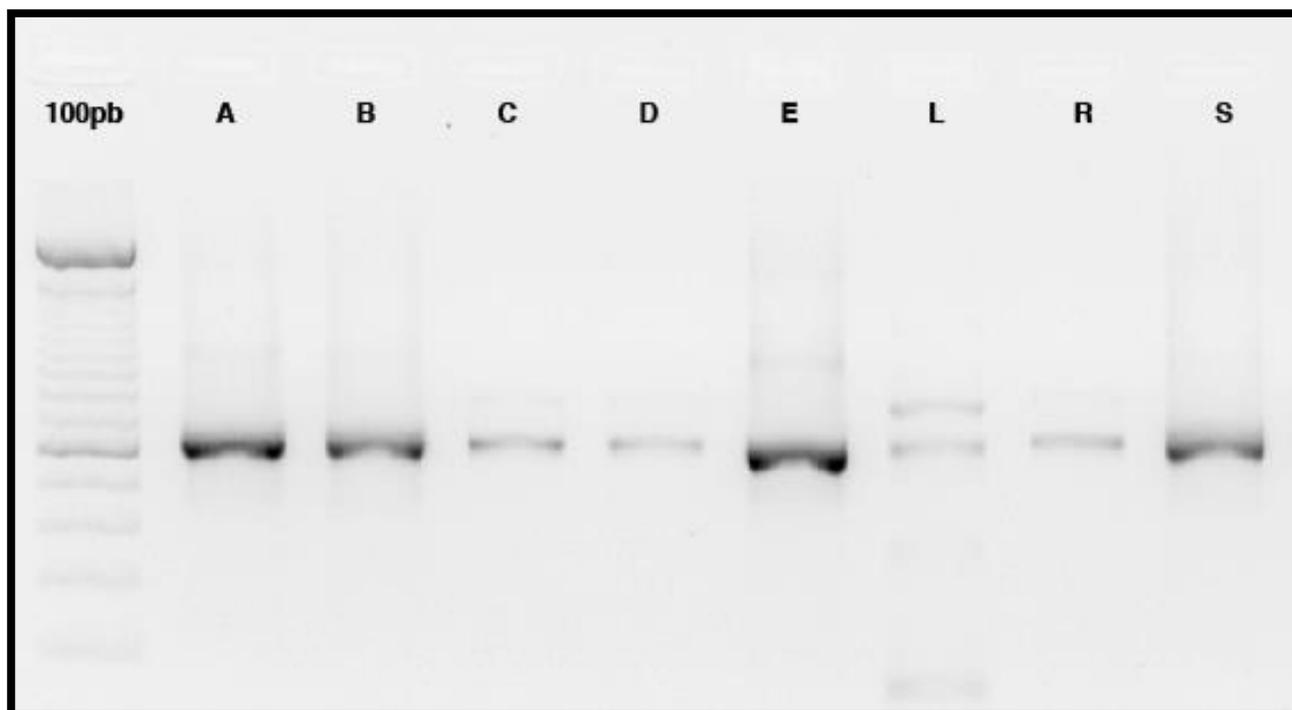


Figura. 5 Gel de agarosa de los amplicones obtenidos de PCR aprox. 620pb; pozos de izquierda a derecha: carril A pozo Tres Reyes temporada de nortes, carril B pozo Fátima temporada de secas con vegetación invasora, carril C pozo Fátima temporada de secas sin vegetación, carril D pozo Santo Domingo en temporada de secas, carril E pozo Tres Reyes en temporada de secas, carril L pozo Fátima temporada de lluvias, carril R pozo Tres Reyes en lluvias y pozo S Santo Domingo en lluvias.

### 4.4 Bandas DGGE

Fueron recuperadas un total de 42 bandas de las cuales se lograron identificar 36 secuencias diferentes.

Se construyó una matriz de presencia/ausencia a partir del análisis informático de la intensidad de las bandas apreciadas en la Fig. 6 con el programa QuantityOne®

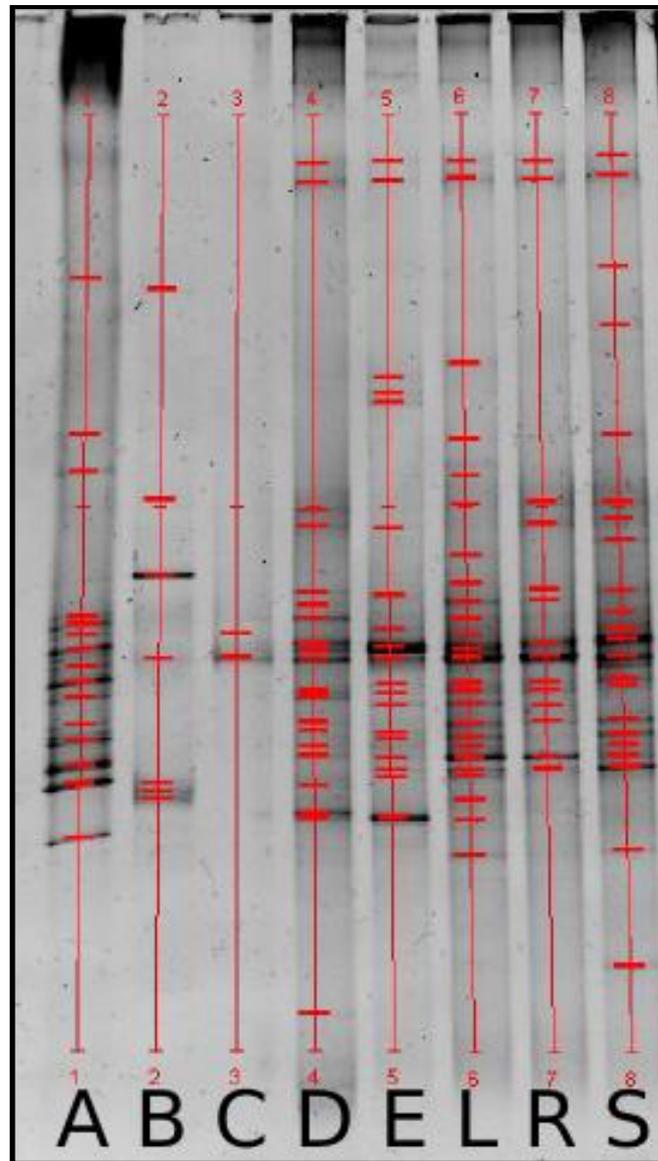


Figura 6: Gel de poliacrilamida con un gradiente desnaturalizante del 35 al 60 % (DGGE), carril A pozo Tres Reyes temporada de nortes, carril B pozo Fátima temporada de secas con vegetación invasora, carril C pozo Fátima temporada de secas sin vegetación, carril D pozo Santo Domingo en temporada de secas, carril E pozo Tres Reyes en temporada de secas, carril L pozo Fátima temporada de lluvias, carril R pozo Tres Reyes en lluvias y pozo S Santo Domingo en lluvias.

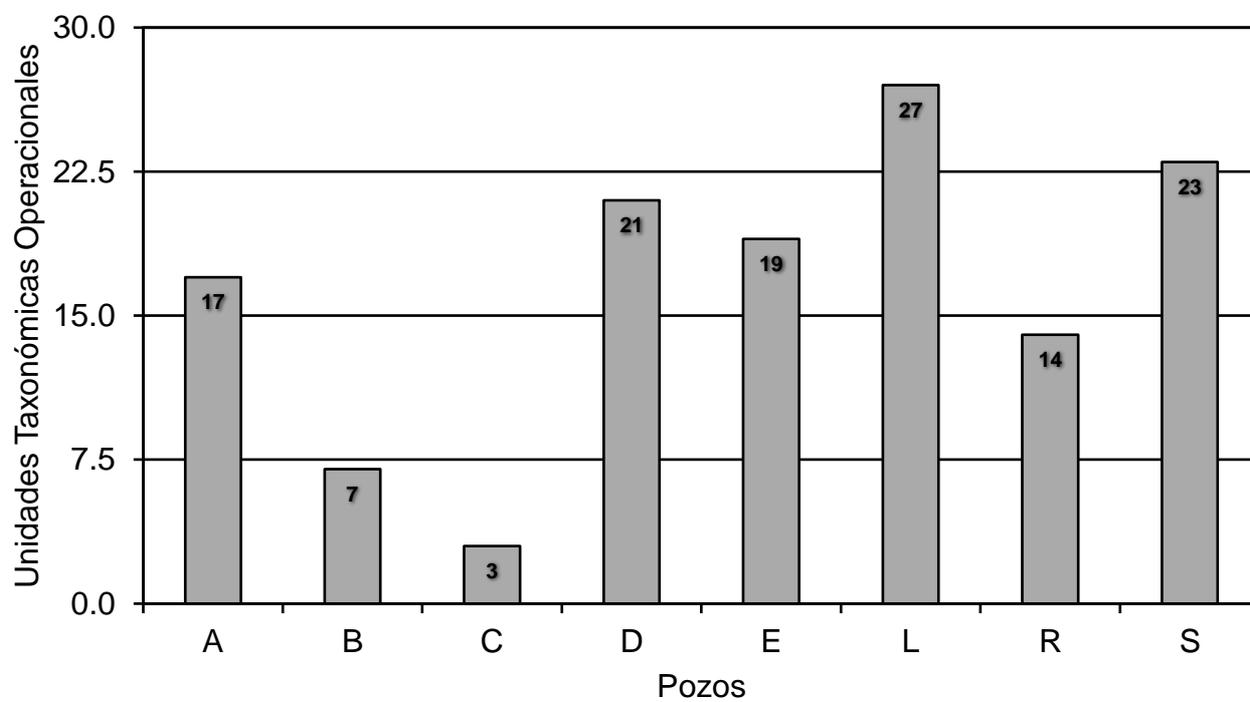


Figura 7: Riqueza número de OTU identificadas por pozo; columna A Tres Reyes en Nortes 17 OTU, B Fátima en secas con vegetación invasora 7, C Fátima en secas sin vegetación 3, D Santo Domingo en Secas 21, E Tres Reyes en secas 19, L Fátima en lluvias 27, R Tres Reyes en lluvias 14 unidades y pozo S Santo Domingo en lluvias con 23 OTU.

La riqueza estimada en la figura 7 para la temporada de nortes en un solo evento fue de 17 unidades taxonómicas operacionales (OTU), mientras que para la temporada de secas fue de un total de 50 y finalmente 64 para la temporada de lluvias

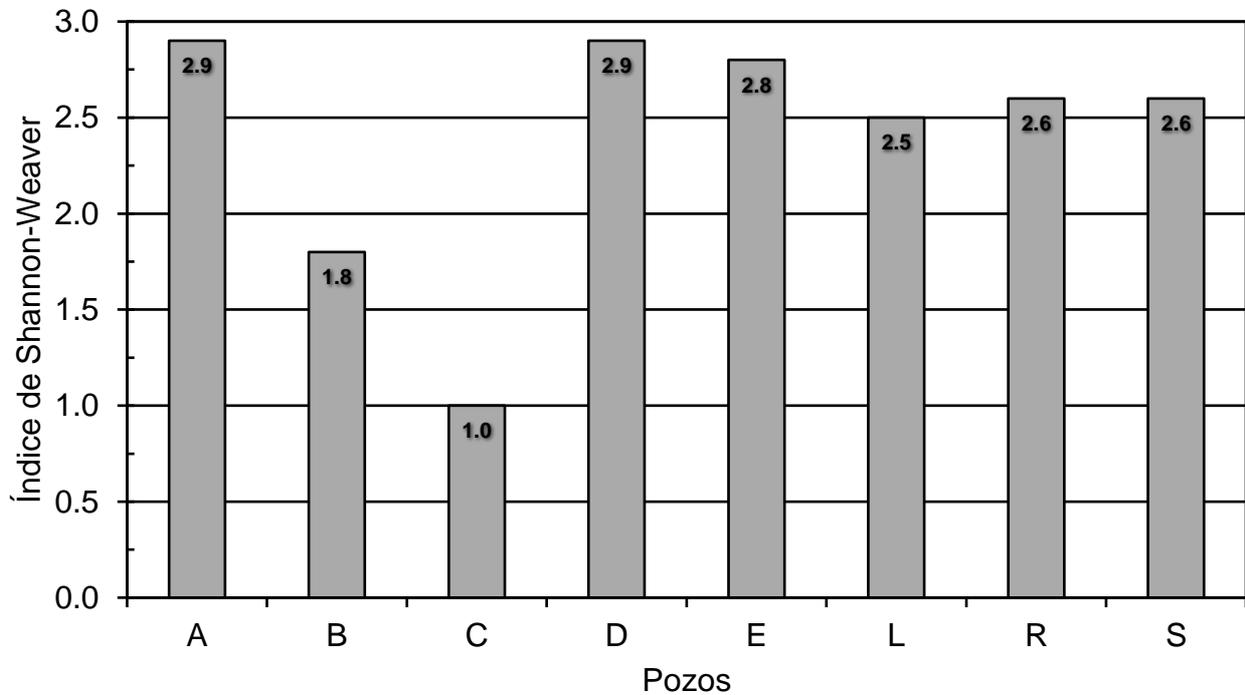


Figura 8: Índice de Shannon-Weaver; columna A Tres Reyes en Nortes 2.91 unidades, B Fátima en Secas con vegetación invasora 1.86 unidades, C Fátima en Secas sin vegetación 1.08 unidades, D Santo Domingo en Secas 2.92 unidades, E Tres Reyes en Secas 2.82 unidades, L Fátima en llluvias 2.55 unidades, R Tres Reyes en llluvias 2.55 unidades y pozo S Santo Domingo en llluvias con 2.63 unidades

Como se aprecia en la figura 8, las comunidades con mayor entropía, y por ende mayor heterogeneidad, fueron los pozos Tres Reyes de la temporada de nortes y Santo Domingo de la temporada de secas. Los de menor entropía fueron los pozos Fátima en la temporada de secas.

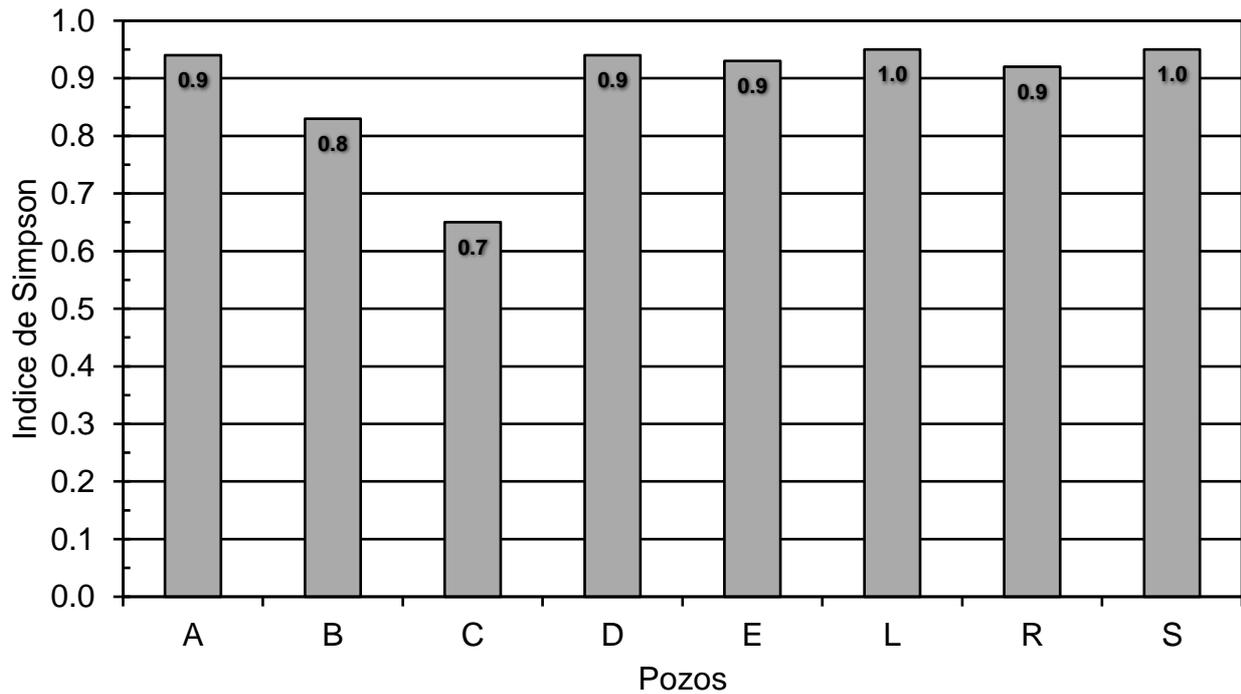


Figura 9: Índice de Simpson: columna A Tres Reyes en Nortes 0.94 unidades, B Fátima en Secas con vegetación invasora 0.83 unidades, C Fátima en Secas sin vegetación 0.65 unidades, D Santo Domingo en Secas 0.94 unidades, E Tres Reyes en Secas 0.93 unidades, L Fátima en llluvias 0.95 unidades, R Tres Reyes en llluvias 0.92 unidades y pozo S Santo Domingo en llluvias con 0.95 unidades.

Durante la temporada de llluvias, se distinguen a los pozos Fátima y Santo Domingo con mayor dominancia de especies, por otro lado el pozo Fátima durante la temporada de secas reporta la menor dominancia, estos datos se aprecian en el cálculo del índice de Simpson de la figura 9.

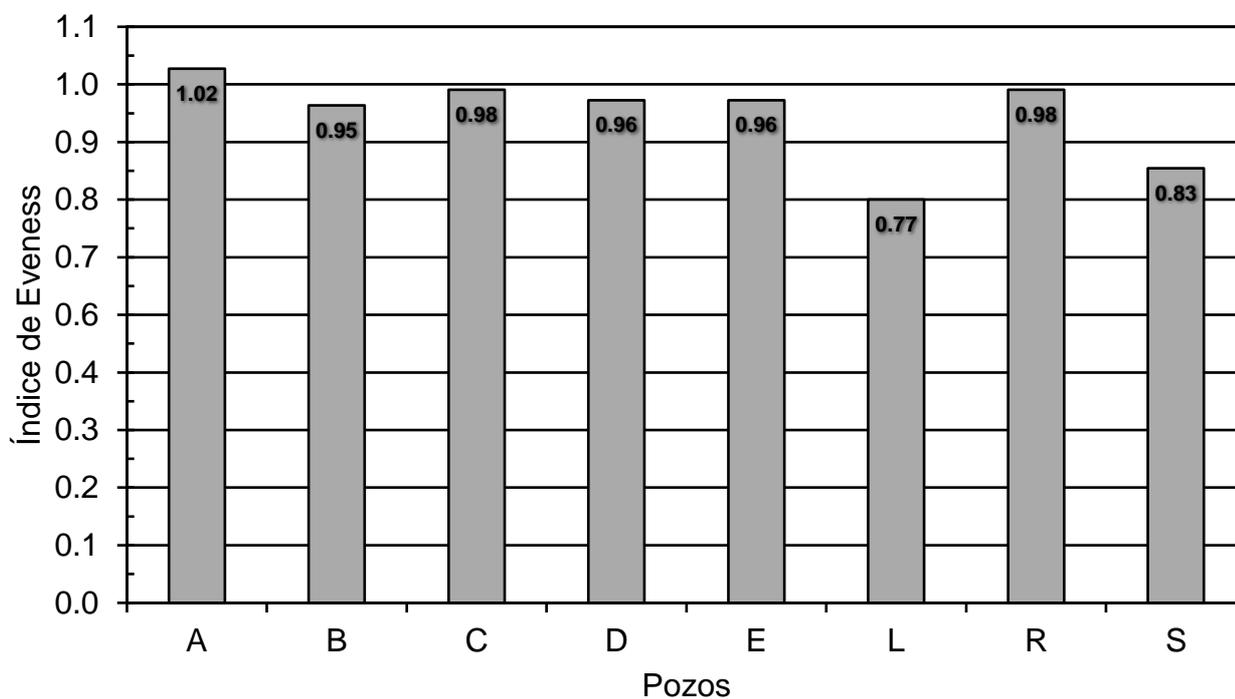


Figura 10: Índice de Evenness: columna A Tres Reyes en Nortes 1.02 unidades, B Fátima en Secas con vegetación invasora 0.95 unidades, C Fátima en Secas sin vegetación 0.98 unidades, D Santo Domingo en Secas 0.96 unidades, E Tres Reyes en Secas 0.96 unidades, L Fátima en lluvias 0.77 unidades, R Tres Reyes en lluvias 0.98 unidades y pozo S Santo Domingo en lluvias con 0.83 unidades.

La figura 10 ilustra el índice de Evenness, el cual representa la abundancia entre pozos de las distintas OTU: el pozo L durante la temporada de lluvias es la menos uniforme del grupo, con una similitud de 0.774, mientras que el pozo A de la temporada de nortes presenta la mayor similitud de especies en sus respectivas abundancias.

### Distribución filogenética

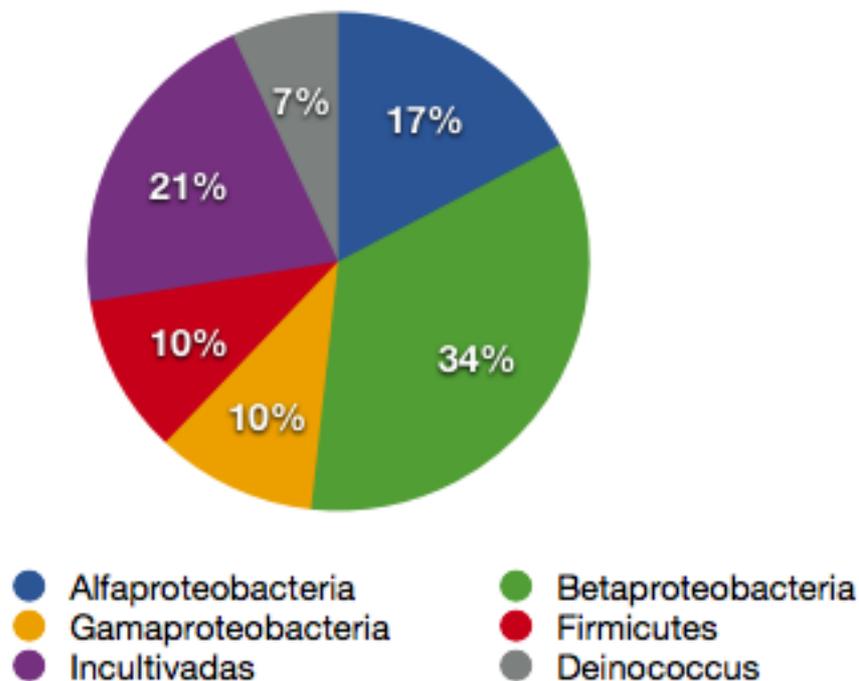


Figura 11. Grupos filogenéticos identificados y su proporción con respecto al total de los grupos.

Se identificaron 3 filos: *Proteobacteria*, incluyendo las clases *Alfa*, *Beta* y *Gamaproteobacteria*, siendo la clase *Betaproteobacteria* la que agrupó el mayor número de géneros identificados como se aprecia en la figura 11 con el 34% de las secuencias, el filo *Firmicute* contó con 3 géneros y finalmente el filo más reducido fue el *Thermus* con sólo un género identificado, el de *Deinococcus* representando el 7% del total de secuencias.

En total se listaron 10 familias con 16 géneros distintos los cuales son: *Acidovorax*, *Azospira*, *Brachymonas*, *Caldalkalibacillus*, *Dechloromonas*, *Deinococcus*, *Erythromicrobium*, *Exiguobacterium*, *Hydrogenophaga*, *Novosphingobium*, *Ralstonia*, *Ramilbacter*, *Rhodobacter*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus* y *Strenotrophomonas*.

Por éste método no se identificaron miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, donde se enlistan los coliformes, pero sí organismos termotolerantes, mismos que han sido relacionados con los coliformes fecales en los límites permisibles de microorganismos en agua para uso y consumo humano según la NOM-127-SSA1-1194.

## **5. Discusión**

El acceso al agua potable es fundamental para la salud, y es uno de los derechos humanos básicos, por lo que debe ser considerado un componente prioritario de las políticas de protección de la salud.

Ya se ha demostrado que las medidas destinadas a mejorar el acceso al agua potable favorecen en particular a los más marginados y puede ser un componente eficaz de las estrategias de mitigación de la inequidad y la pobreza. Por esta razón es necesario tomar en cuenta que los factores más importantes para reducir la morbilidad de las enfermedades transmitidas por agua son la calidad del agua, el saneamiento y los hábitos higiénicos. El presente trabajo aporta elementos relevantes en relación a la composición microbiótica el agua que se destina a consumo humano en nuestra entidad, si bien es de igual importancia mencionar que la recopilación de los datos físico-químicos del agua en futuros estudios es fundamental para detectar las fuentes puntuales de contaminación.

Debido a que los pozos son profundos, las fuentes de contaminación podrían estar ligadas al uso del suelo y subsuelo del Municipio. Estas fuentes son antropogénicas, granjas porcícolas y avícolas principalmente, sumándose a la dificultad que el suelo cárstico de la región ocasiona para la construcción de drenaje o fosas sépticas, ya que sólo el 57% de las casas tienen servicios sanitarios y la práctica de la defecación al aire libre continúa siendo importante.

En relación a los resultados de los análisis de coliformes, éstos evidenciaron un comportamiento estacional, que obedece posiblemente a los procesos de filtración en el sustrato, siendo la temporada de lluvias aquella que reporta mayor riqueza de especies en los 3 pozos muestreados, coincidiendo con lo reportado por Romero-Jarero *et al.* 1985, donde se sugiere que la disminución en el número de coliformes durante la temporada de estiaje o secas está relacionada inversamente al aumento de la salinidad en esta época del año.

Fuentes *et. al.* 2009 ha demostrado la correlación existente entre la salinidad y la densidad de coliformes totales, para lo que se concluye que estos organismos no son los

indicadores más adecuados de contaminación, ya que si la salinidad aumenta el número de coliformes disminuirá sin importar la persistencia de otros contaminantes.

La presencia de granjas avícolas en la colonia de Santo Domingo podría considerarse una de las fuentes que originan la alta concentración de coliformes tanto fecales como totales en el pozo de dicha localidad.

En caso contrario, la muestra obtenida a la posterior limpieza del área circundante al pozo Fátima resultó con la menor concentración de dichos organismos para la temporada de secas, reforzando la teoría propuesta por Torres *et al.* 2005, donde se infiere que la eliminación de bacterias fecales es consecuente al desmonte de la zona.

Los resultados de Sánchez *et al.*, 2007 concuerdan con el presente trabajo, que sugiere el uso de la técnica PCR-DGGE para estudiar cambios estacionales en comunidades bacterianas en ambientes acuáticos mediante el uso del juego de cebadores 357F – 907R para el análisis molecular. Los resultados obtenidos con los 3 muestreos indican una mayor riqueza de OTU's en la temporada de lluvias, considerando además la abundancia de las unidades taxonómicas, ésta temporada también indica la presencia de especies dominantes según el índice de Simpson, especialmente los pozos Fátima y Tres Reyes. Resultando por otro lado, las muestras A de la temporada de nortes y D de la temporada de secas, como las más heterogéneas en base a su diversidad y abundancia.

Los pozos más homogéneos fueron los de la colonia Fátima de la temporada de secas, previa y posterior limpieza del área, siendo ésta última, además, la que reporta menor dominancia de especies.

Dentro de la filogenia identificada, el grupo Proteobacteria integra a más de la mitad de los géneros secuenciados, la clase Beta proteobacteria es la más abundante. Estas bacterias en general, son capaces de llevar a cabo fotosíntesis en ausencia de oxígeno, además de tener crecimiento en condiciones sin luz.

Dentro de esta clasificación los géneros encontrados fueron *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Hydrogenophaga*, mismos que han sido previamente reportados como bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos (Táncsics *et al.*, 2010).

La persistente presencia del género *Burkholderia* a través de todas las estaciones hidrológicas es preocupante, ya que si bien no es constante en todos los pozos, algunos miembros de éste género, han sido reconocidos como fuertemente asociados a enfermedades infecciosas graves como la Melioidosis, produciendo septicemia con un desenlace fatal (Ingliis et. al. 2007). Aunque en este estudio parece no estar condicionada a los patrones de filtración del suelo también es asociada (ya sea como simbioses o patógenos) a diversas plantas tropicales (Verstraete *et al.*, 2013) y juegan un papel ecológico importante al realizar la mineralización de la materia orgánica disuelta en su medio (Maarit *et al.*, 2009)

El género *Ralstonia* se caracteriza por contener miembros patógenos de gran importancia en las zonas tropicales y subtropicales que afectan numerosos cultivos de interés económico, entre los que se cuentan el tomate, la papa, el plátano y algunas plantas de interés ornamental, ocasionando pérdidas de hasta cerca de un tercio de la producción (González *et al.*, 2009, Hernández *et al.*, 2005).

Afortunadamente *Ralstonia* a pesar de ser un patógeno del suelo persistente, únicamente fue identificado en uno de los muestreos, el pozo B con vegetación invasora durante la temporada de secas. Lo que refleja la importancia de mantener el área circundante al pozo de extracción libre de malezas.

El género *Hydrogenophaga* tiene potencial biotecnológico al realizar de manera heterotrófica la oxidación del compuesto arsenito (Vanden y Santini, 2004), la forma inorgánica más móvil y tóxica del arsénico cuyo origen es principalmente geológico, puede encontrarse en los niveles más altos en el agua subterránea, y que en grandes consumos es nocivo para la salud humana (Mellado *et al.*, 2011).

Particularmente estos dos últimos géneros, *Ralstonia* e *Hydrogenophaga* en co-cultivo han demostrado tener la capacidad de degradar el compuesto 4-Aminobenzenosulfamida (4-ABS) comúnmente encontrado en las aguas residuales de origen textil. Con la habilidad de degradar incluso compuestos xenobióticos, es decir compuestos sintetizados por el hombre, siendo de gran valor en el campo de la biorremediación pues adicionalmente contienen genes involucrados en la biodegradación de otros compuestos aromáticos como el tereftalano, fenol, fenoxibenzoato y fenilacetato (Ming *et al.* 2012).

De similar importancia bioquímica, *Azospira* representa uno de los géneros dominantes reductores de (per) cloratos (utilizados como herbicidas) en el ambiente natural, realiza la oxidación anaeróbica de algunos de los compuestos de los ácidos húmicos y la fijación de nitrógeno, además de ser el primer organismo capaz de producir magnetita biogénica (Byrne-Bailey y Coates, 2012).

Se han realizado pruebas de la versatilidad metabólica del género *Dechloromonas*, demostrando ser capaz de degradar de manera anaeróbica los hidrocarburos benceno, tolueno, etilbenzeno y xileno (Chakraborty *et al.*, 2005) y actualmente ya cuenta con una patente (US 20040014196 A1) para su uso en la biorremediación / biodegradación de dichos compuestos presentes en suelos y fuentes de agua. De manera similar, el género *Brachymonas* aislado inicialmente de las aguas residuales de una refinería de petróleo, tiene la capacidad de degradar ciclohexanos y otros compuestos aromáticos como el tolueno (Rouvière y Chen, 2003).

Por otro lado, los géneros *Rhodobacter*, *Sphingomonas* y *Pseudomonas* pertenecientes a la clase Alfa proteobacterias, han sido descritos como degradadores de compuestos nitroaromáticos (Gómez, 2010). *Sphingomonas* y *Pseudomonas* contienen además especies patógenas para plantas y humanos, siendo la segunda utilizada también en la biominería, como tratamiento biológico de residuos contaminados con cianuro (Slabbinck *et al.* 2010., Luque-Almagro *et al.* 2005).

A la par, pero dentro de la clase Gamma proteobacterias, secuencias homólogas del género *Stenotrophomonas*, han sido identificadas en cultivos de caña de azúcar, por su actividad fijadora de nitrógeno (Rui-Li y Yuan-An, 2006) mientras que el género *Acidovorax* también se ha reportado como degradadora de hidrocarburos aromáticos (Táncsics *et al.* 2010).

*Acidovorax* fue detectada en la temporada de lluvias, época en la que la producción de sandía es más susceptible a la infección ya que las características ambientales favorecen el desarrollo de la bacteria y podrían ocasionar hasta un 100% de pérdidas en vivero o plantación de sandía (Elizalde *et al.*, 2011).

En otro grupo distinto, el Firmicute, fue posible identificar tres géneros de la clase Bacilli: *Caldalkalibacillus*, *Exiguobacterium* y *Staphylococcus*, todos tienen una amplia

distribución en el medio ambiente, siendo *Cadalkalibacillus* inicialmente aislada de aguas termales y descrita como termofílica con un rango de temperatura de 42 a 64°C, (Weidong Zhao, *et al.* 2008).

*Exiguobacterium* adicionalmente ha sido aislada tanto del permafrost (capa de hielo superficial del suelo) Siberiano, como de aguas termales del Parque Yellowstone, mostrando adaptarse a diferentes (e incluso extremos) ambientes (Vishnivetskaya, *et al.* 2009). Por último, el género *Staphylococcus* es comúnmente conocido por incluir patógenos de amplia distribución, su presencia en fuentes de agua puede ocasionar infecciones estomacales y gastroenteritis, en conjunto a prácticas comunes en la preparación de alimentos podría generar envenenamiento por producción de algunas enterotoxinas. Poseen una habilidad de supervivencia extendida, lo cual puede explicar su presencia aun cuando los coliformes no pueden ser detectados (LeChevallier y Seidler, 1980).

Y finalmente la última OTU, fue identificada como *Deinococcus geothermalis*, una bacteria resistente a la radiación extrema y moderadamente termofílica, es capaz de reducir compuestos a elevadas temperaturas y en presencia de radiación; dichas características refuerzan la perspectiva de su uso en biorremediación en ambientes con residuos radioactivos mezclados con temperaturas mayores a los 55°C (H.Brim *et al.* 2003).

## **6.Conclusiones**

El análisis del metagenoma bacteriano del agua subterránea nos abre el panorama para la identificación de las comunidades presentes en los distintos momentos de una temporada hidrológica. Con el presente estudio se han sentado las bases en la identificación de la composición de la comunidad bacteriana, ofreciendo un primer análisis para posteriores búsquedas específicas basadas en los grupos representativos identificados, no omitimos señalar que es recomendable ampliar el espectro de búsqueda y análisis en los estudios metagenómicos incluyendo virus, y procariontes, dada la importancia en salud humana.

Así mismo de todos los géneros identificados, destacan algunos por su potencial en la biotecnología, desde la biorremediación de aguas contaminadas, muy útiles en el caso de la zona de estudio, donde por ejemplo muchas de las aguas residuales de granjas o

caseras no reciben tratamiento antes de ser depositadas al manto acuífero, hasta el mejoramiento en el rendimiento de producción agrícola a través de organismos que facilitan la absorción de nutrientes o bien el control de factores que pueden inducir la presencia de patógenos en el ambiente y con ello comprometer la salud tanto humana y la producción agrícola. La presencia de dichos géneros además, es un reflejo de la resiliencia ambiental ante los impactos, pudiendo ser usados como indicadores de contaminación.

Fue posible reconocer que existen modificaciones en los integrantes de la comunidad bacteriana en los diferentes muestreos de los momentos del año, para dar seguimiento de dichos cambios es necesario un estudio evaluativo intra-temporal, es decir, entre los meses que conforman cada estación, siendo el óptimo un análisis anual.

Los resultados de calidad microbiológica reflejan concentraciones superiores a las establecidas por norma; considerando que los pozos donde se obtuvieron las muestras tienen una profundidad de 30 metros, resulta indispensable un estudio futuro que permita analizar la calidad de los pozos de traspatio, o caseros puesto que éstos son más vulnerables a la contaminación al encontrarse a menor profundidad, además siguen siendo utilizados como fuentes directas de agua para consumo humano dentro de la población.

## **Referencias bibliográficas**

Arreguín-Cortés, F., y López-Pérez, M. (2007). An overview of Mexico's water regime and the role of groundwater. En Sustainable Management of Groundwater in Mexico: Proceedings of a Workshop (Series: Strengthening Science-Based Decision Making in Developing). National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, DC, USA (pp. 13-25).

Atlas, R. M., y Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación.

Ávila, J. P., Sansores, A. C., y Ceballos, R. P. (2000). Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el Estado de Yucatán, México. Red Ingeniería Revista Académica.

Baumforth K.R., Nelson P.N., Digby J.E., O'Neil J.D. y Murray P.G. (1999). Demystified... the polymerase chain reaction. *Molecular Pathology*, 52(1), 1.

Bautista, F., y Zinck, J. A. (2010). Construction of an Yucatec Maya soil classification and comparison with the WRB framework. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 6(1), 1.

Buesing N., Filippini M., B"rgmann H. y Gessner M. O. (2009). Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology*; 69(1), 84-97.

Byrne-Bailey K.G. y Coates J. D. (2012). Complete genome sequence of the anaerobic perchlorate-reducing bacterium *Azospirasuillum* strain PS. *Journal of Bacteriology*, 194(10), 2767-2768. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/194/10/2767#ref-list-1>

Cabañas Vargas D. D., Reza Bacelis G., Sauri Riancho M.R., Méndez Novelo R.I., Bautista F., Manrique Vergara W., Rodríguez Angulo E., Balancán Zapata A. y Medina Gonzalez R. (2010). Inventario de fuentes potenciales de residuos peligrosos en el estado de Yucatán, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(4), 269-277. Disponible en: <http://www.journals.unam.mx/index.php/rica/article/viewFile/20713/19616>

Chakraborty R., O'connor S. M., Chan E. y Coates J. D. (2005). Anaerobic Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8649-8655. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/71/12/8649>

Comisión Nacional del Agua, CONAGUA. (2011). Situación de los recursos hídricos.

Comisión Nacional del Agua, CONAGUA. (2012). Estadísticas del Agua en México

Comisión Nacional del Agua, CONAGUA. (2012). Situación del Subsector Agua potable, Alcantarillado y Saneamiento. Edición 2012.

Comisión Nacional del Agua, CONAGUA. (2015). Estadísticas del Agua en México.

Conboy, M. J., y Goss, M. J. (2001). Identification of an assemblage of indicator organisms to assess timing and source of bacterial contamination in groundwater. *Water, Air, and Soil Pollution*, 129(1-4), 101-118.

Consejo Nacional de Población, CONAPO. (2005). Índices de marginación por localidad en el Estado de Yucatán.

Cortés-Lara M. C. (2003). Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la franja litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. *Rev. Biomed*; 14(2): 121-123. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb031429.pdf>

Cuaderno municipal para el desarrollo urbano, Hunucmá. (2010). Secretaria de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente.

C-W Lee, K. Narayanan y E. U-H Sim. (2009). Aislamiento y caracterización de bacterias cultivables de aguas costeras tropicales. *Ciencias Marinas*, 35 (2): 153-167.

Del Río M., Montes F., Cañellas I. y Montero G. (2003). Revisión: Índices de diversidad estructural en masas forestales. *Invest. Agrar.Sist. Recur. For.* 12 (1): 159-176.

Díaz Cárdenas Carolina. (2011). Estudio de la composición de la comunidad bacteriana de manantiales salinos ubicados en los departamentos de Risaralda y Boyaca. Tesis Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Doctorado en Ciencias Biológicas. Bogotá D.C.

Dortch Q. y Packard T. T. (1989). Differences in biomass structure between oligotrophic and eutrophic marine ecosystems. *Deep Sea Res.* 36: 223-240

Duarte, Y. A., Bautista, F., Mendoza, M. E., y Delgado, C. (2013). Vulnerabilidad y riesgo de contaminación de acuíferos kársticos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(2), 243-263. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/939/93928324001.pdf>

Dutka B.J. (1979). Microbiological indicators, problems and potential of new microbial indicators of water quality. p. 18-23. In: James L., Evison (Eds.) *Biological Indicators of Water Quality*. J. Wiley&Sons. G.B. 528 p.

Elizalde N., Hernández J., Leyva S., Nava C., Sequeira R., Fowler G. y Magarey R. (2011). Evaluación del Riesgo de *Acidovoraxavenae* Sub sp, citrulli asociada a semilla de sandía de importación a México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 29. (2): 133-145.

Escolero O., Marín L. E., Steinich B., Pacheco J. A., Molina-Maldonado A. y Anzaldo J. M. (2005). Geochemistry of the hydrogeological reserve of Mérida, Yucatán, México. *Geofísica Internacional*. 44 (3):301-314.

FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s00.htm>

Field, K. G., y Samadpour, M. (2007). Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water research*, 41(16), 3517-3538.

Fuentes, J. L., Patiño, R., López, P., y López, J. (2009). Densidad de bacterias coliformes y su relación con algunas variables físico-químicas en aguas de la laguna Los Martires, Isla de Margarita, Venezuela. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 21(2), 126-132.

García-Lazalde V., Morales Adame D., Rodríguez-Herrera R. y Aguilar-González C. (2011). Identificación molecular y estudio filogenético de microorganismos benéficos (*Bacillus* y *Trichoderma*) empleados en la agricultura. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. Año 3, No. 5.

Gómez Cruz Rodolfo. (2010). Degradación de compuestos nitroaromáticos por *Rhodobacter*. Purificación de la nitrorreductasa NprB. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 170 p.

González De la Mata, Rocío. (2003). Los chultunes de Chichen Itza. En XVI Simposio de Investigaciones Arqueológicas en Guatemala, 2002 (editado por J.P. Laporte, B. Arroyo, H. Escobedo y H. Mejía), pp.994-1008. Museo Nacional de Arqueología y Etnología, Guatemala.

González I., Arias Y. y Peteira B. (2009). Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio *Ralstonia Solanacearum* – plantas hospedantes. *Revista de Protección Vegetal*. 24(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000200001&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000200001&script=sci_arttext)

Grael-Castro E., Castillo-Rivera J. y Cardona B. A. (2003). Dispersividad de solutos en el carst de Yucatán, México. *Ingeniería* 7(3): 49-56

Grompe M. (1993). The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat. Genet* 5, 111-117

H. Brim., A. Venkateswaran, H.M. Kostandarithes, J.K. Fredrickson y M.J. Daly. (2003). Engineering *Deinococcus geothermalis* for Bioremediation of High-Temperature Radioactive Waste Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (8): 4575-4582.

Hernández Y., Mariño N., Trujillo G. y Urbina de Navarro C. (2005). Invasión de *Ralstonia solanacearum* en tejidos de tallos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) *Revista de la Facultad de Agronomía*. 22(2) Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182005000200008](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182005000200008)

Herrera-Silveira, J.A., Comín, F.A., y Capurro, L. (2005). Los usos y abusos de la zona costera en la península de Yucatán.,

INAFED (2008). Enciclopedia de los municipios de México. Estado de Yucatán. [www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/yucatan/municipios/31038a.htm](http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/yucatan/municipios/31038a.htm)

INEGI (2000). Aspectos geográficos de Yucatán. Marco geoestadístico. Instituto Nacional

de Estadística Geografía e Informática. Disponible en: [http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/estados/yuc/ubic\\_geo.cfm?c=442&e=31&CFID=1828997&cftoken=80133027](http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/estados/yuc/ubic_geo.cfm?c=442&e=31&CFID=1828997&cftoken=80133027).

INEGI (2014). Sistema de cuentas nacionales de México. Producto interno bruto por entidad federativa 2003-2014. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, México

IngliisTJJ., Rolim D. B., y de Queiroz Sousa A. (2007). La melioidosis: una enfermedad emergente en las Américas. *Rev Panam Salud Pública*, 21 (1).

John E. D., Rose B. J. y Kamarainen Amy. (2004). Survival of fecal indicator bacteria, bacteriophage and protozoa in Florida's surface and ground waters. Potential Implications for Aquifer Storage and Recovery.

J.J Schmitter-Soto, F.A. Comín, E. Escobar-Briones, J. Herrera-Silveira, J. Alcocer, E. Suárez-Morales, M. Elías-Gutiérrez, V. Díaz-Arce, L.E. Marín y B. Steinich. (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiología* 467: 215-228.

Jouravlev, A. (2004). Los servicios de agua potable y saneamiento en el umbral del siglo XXI. Serie Recursos Naturales e Infraestructura (en línea). Series CEPAL no. 74: 71 p. Santiago, Chile, División de Recursos Naturales e Infraestructura, CEPAL. Disponible en [http://www.eclac.org/cgi-bin/getProd.asp?xml=/drni/agrupadores\\_xml/aes14.xml&xsl=/agrupadores\\_xml/agrupado\\_listado.xsl](http://www.eclac.org/cgi-bin/getProd.asp?xml=/drni/agrupadores_xml/aes14.xml&xsl=/agrupadores_xml/agrupado_listado.xsl)

Karner M. B., DeLong E. F. y Karl D. M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507-510.

Khalifa Sifaw Ghenghesh, Abdelmula El-Ghodban, Rabia Dkakni, Salaheddin Abeid, Abdurazzaq Altomi, Abdussalam Tarhuni & Karoly Marialigeti. (2001). Prevalence, Species Differentiation, Haemolytic Activity and Antibiotic Susceptibility of Aeromonads in Untreated Well Water. *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*.96(2); 169-173

Langenheder S. y Ragnarsson H. (2007). The role of environmental and spatial factors for the composition of aquatic bacterial communities. *Ecology* 88(9): 2154-61.

Le Borgne Le Gall Sylvie.(2005). Marcadores filogenéticos alternativos al gene 16S rDNA en estudios de diversidad bacteriana. XI Congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería, Mérida Yucatán. Disponible en: <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/magistrales/M-6.pdf>

LeChevallier M.W. y Seidler R.J. (1980). Staphylococcus aureus in rural drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*.30 (4): 739-742.

López López A. y Zaballos M. (2005). Diversidad y actividad procariótica en ecosistemas marinos. *Ecosistemas* 14 (2): 30-40

Luque-Almagro V. M., Huertas M.J., Martínez-Luque M., Moreno-Vivián C., Roldán M. D. García-Gil L.J., Castillo F. y Blasco R. (2005). Bacterial Degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Applied Environmental Microbiology*. 71 (2):

940-947.

MaaritNiemi R., IlseHeiskanen, Riitta Heine y JarkkoRapala. (2009). Previously uncultured  $\beta$ -Proteobacteria dominate in biologically active granular activated carbon (BAC) filters. *WaterResearch*. 43 (20): 5075-5086.

Mantilla Morales G., Collí Misset J., Pozo Román F. y Rivas Hernández A. (2002). Saneamiento y Salud: Impacto de las enfermedades diarreicas agudas en la Península de Yucatán. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún, México.

Marie D., Brussard C., Thyraug R., Bratbak G., y Vaultot D. (1999). Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 45-52.

Mellado C., Campos V. y Mondaca M. (2011). Distribución de genes de resistencia a arsénico en bacterias aisladas de sedimentos con concentraciones variables del metaloide. *Gayana (Concepción)*. 75 (2) Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-65382011000200001](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382011000200001)

McFeters G. A., Bissonnette G. K., Jezeski J. J., Thomson C. A. y Stuart D. G. (1974). Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Applied Microbiology*. 27(5): 823-9.

Michel, E. F. K., y Aguilar, C. L. V. (2011). Retos de la gestión de una cuenca construida: la Península de Yucatán en México. *Aqua-LAC*, 3(2), 81-91.

Ming Ga H., Han Chew T., Yea-Ling T., FenLye S. y Yahya A. (2012). Genome sequence of *Hydrogenophaga* sp. Strain PBC, a 4-Aminobenzenesulfonate-Degrading Bacterium. *Journal of Bacteriology*. 194 (17): 4759-4760.

Mora, A.D. (2003). Agua para consumo humano y disposición de excretas: situación de Costa Rica en el contexto de América Latina y el Caribe - 1960/2000 (en línea). *Rev. Costarric. Salud Pública*. 12 (21): 31-46. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-1429200300100007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-1429200300100007&lng=es&nrm=iso)

Moreno C. E. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M& T-Manuales y Tesis. SEA. Vol 1.84 pp.

Moreno C.E., Barragán P.F., Pineda E. y Pavón N.P. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Rev. Mex. Biodiv.* 82 (4) Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-34532011000400019&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-34532011000400019&script=sci_arttext)

Mullis, K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*; 262 (4): 56-61, 64-5 en Rodríguez Sánchez Iram P. y Barrera Saldaña Hugo A. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3): 323-335.

Muyzer G., de Waal E.C. y Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 695-700.

Muyzer G. y Smalla K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*; 73: 127-141.

NMX-AA-42-1987. Calidad del Agua. Determinación del Número Más Probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichiacoli* Presuntiva. Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NMX-AA-042-1987.pdf>

NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico

NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

NOM-127-SSA1-1994. NORMA OFICIAL MEXICANA, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a los que debe someterse el agua para su potabilización.

NOM-230-SSA1-2002. NORMA OFICIAL MEXICANA, Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.

N vanden R. y Santini J. M. (2004). Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. Str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochimica et BiophysicaActa (BBA)-Bioenergetics*. 1656 (2-3): 148-155.

Organización Panamericana de la Salud. (1999) CIE-10: Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas relacionados con la Salud, 10ª Revisión, OPS. Secretaria de Salud. Anuarios Estadísticos 1989-1999. México, D.F. SSA, 1989-1999.

Pacheco A, J., Cabrera S, A., y Marín, L. E. (2000). Bacteriological contamination in the karstic aquifer of Yucatán, Mexico. *Geofísica Internacional México*, 39(3), 285-291.

Pacheco Avila, J., Cabrera Sansores, A., Calderón Rocher, L., Marín, L., Steinich, B., y Escolero, O. (2002). Delineación de una zona de protección para el abastecimiento de agua en Mérida, Yucatán, México. En Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, 13 (pp. 1-11). FEMISCA.

Petti C. A. (2007). Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Oxford Journals. Clinical Infectious Diseases*.44 (8): 1108-14. Disponible en: <http://cid.oxfordjournals.org/content/44/8/1108.long>

Pla Laura. (2006). Biodiversidad: inferencia basada en el índice de Shannon y la Riqueza. INCI.31 (8). Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006000800008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006000800008&script=sci_arttext)

PNH. Programa Nacional Hídrico, 2014-2018. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

- PNUD-México. (2000). Indicadores municipales de desarrollo humano en México. PNUD, Oficina Nacional de Desarrollo Humano.
- PNUMA, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2011). Eficiencia en el uso de los recursos en América Latina: Perspectivas e implicancias económicas. Disponible en: <http://www.pnuma.org/reeo/Documentos/REEO%20WEB%20FINAL.pdf>
- Poggi H., Guzmán A. M., García P. y Lagos M. (2009). PCR universal o de amplio espectro: un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Rev. Médica Chile*. 137: 1122-1125.
- Portillo M. C. y González J. M. (2008). Statistical differences between relative quantitative molecular fingerprints from microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek*; 94: 157-163.
- Rappé M. S. y Giovannoni S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57: 369-394.
- Rodicio M. R. y Mendoza M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*; 22(4): 238-45.
- Rojas, G. A., e Iza, A. O. (2009). Gobernanza de aguas compartidas: aspectos jurídicos e institucionales (No. 58). IUCN.
- Romero-Jarero J., Ferrara-Guerrero M. de J., Lizárraga-Partida L. y Rodríguez-Santiago H. (1985). Variación estacional de las poblaciones de enterobacterias en la laguna de Términos, Campeche, México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*.
- Rouviere PE y Chen MW. (2003). Isolation of *Brachymonas petreleovorans* CHX, a novel cyclohexane- degrading beta- proteobacterium. *FEMS Microbiology Letters*.227(1): 101-6.
- Sánchez O., Gasol J. M., Massana R., Mas J. y Pedrós-Alió C. (2007). Comparison of Different Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Primer Sets for the Study of Marine Bacterioplankton Communities. *Appl. Environ. Microbio*. 73(18): 5962-5967.
- Sartory, D.P. y Watkins J. (1999). Conventional culture for water quality assessment: is there a future?. *Journal of Applied Microbiology. Symp. Suppl.*, 85:225S-233S.
- Schut F., Prins R. A. y Gottschal J. C. (1997). Oligotrofy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *AquatMicrobialEcol* 12: 177-202.
- Semblanza histórica del agua en México. (2011). Comisión Nacional del Agua
- Slabbinck B., De Baets B., Dawyndt P. y De Vos P. (2010). Análisis de *Pseudomonas* Fitopatógenas usando métodos inteligentes de aprendizaje: un enfoque general sobre taxonomía y análisis de ácidos grasos dentro del género *Pseudomonas*. *Rev. Mex. Fitopatología*.28 (1). Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000100001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100001)
- Stulnig T. M. y A. Amberger.(1994). Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations *BioTechniques* 16:402-404

Táncsics A., Szabo I., Baka E., Szoboszlay S., Kukolya J., Kriszt B. y Márialigeti K. (2010). Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S Rna gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *Systematic and Applied Microbiology*. 33 (7): 398-406.

Theron J. y Cloete T. E. (2000). Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 26: 37-57.

Tran, N. H., Gin, K. Y. H., y Ngo, H. H. (2015). Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Science of the Total Environment*, 538, 38-57.

Valenzuela M., Mondaca M.A., Clarer M., Pérez C., Lagos B. y Parra O. (2009). Determinación del origen de la contaminación microbiológica del agua subterránea en una cuenca rural en Chile. *Agrociencia*. 43 (4): 437-446.

Verstraete B., Janssens S., Smets E. y Dessein S. (2013). Symbiotic  $\beta$ -Proteobacteria beyond Legumes: Burkholderia in Rubiaceae. *PLoS ONE*. 8 (1): 1-8.

VishniveskayaTA.,Kathariou S. y Tiedje JM. (2009). The Exiguobacterium genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*. 13 (3): 541-55.

Vorosmarty C.J., McIntyre P.B., Gessner M.O., Dudgeon D., Prusevich A., Green P., Glidden S., Bunn S. E., Sullivan C. A., Reidy Liermann C. & Davies P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467 (7315): 555-561. Disponible en: <http://www.nature.com/nature/journal/v467/n7315/full/nature09440.html>

Wang H., Laughinghouse H. D., Anderson M. A., Chen F., Williams E., Place A. R., Zmora O., Zohar Y.,Zheng T. y Hill R. T. (2012). Novel Bacterial Isolate from Permian Groundwater, Capable of Aggregating Potential Biofuel-Producing Microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (5): 1445-1453.

Weidong Z., Chuanlun L. Z., Romanek C.S. y Wiegel J. (2008). Description of *Caldalkalibacillus uzonensis* sp. Nov. and emended description of the genus *Caldalkalibacillus*. *IJSEM*. 58 (5): 1106-1108.

World Health Organization (WHO). (2001). *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. Editado por Lorna Fewtrell y Jamie Bartram. Publicado por IWA Publishing, Londres, UK. ISBN, 1(900222), 28.

Woese C. R., Kandler O. y Wheelis Mark L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 4576-4579. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/87/12/4576.full.pdf>

Wong Chang I. y Barrera-Escorcia G. (1996). Implicaciones ecológicas de la contaminación microbiológica en la zona costero-marina. En: Botello A.V., Rojas-Galaviz J.L., Benítez J.A., Zarate-Lomeli D., editores. *Golfo de México, Contaminación en Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica.369-376.

Wong Chang I. y Barrera-Escorcia G. (2005). Contaminación por microorganismos en zonas costeras. P. 475-486. En: A.V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández. Editores. Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias, 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología 696 p.

Yang-Rui Li y Yuan-an Wei. (2006). Sugar Industry in China: R & D and Policy Initiatives to meet sugar and biofuel demand of future. Sugar Tech 8 (4): 203-216.

Yeon S.H, Jeong W.J. y Park J.S. (2005). The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. The Journal of Microbiology 43(1): 1-10.

## **Anexos**

### Anexo 1. Descripción de electroforesis

Por cada 10 ml de solución tampón TAE se agregó 0.1 g de agarosa, posteriormente se calentó para homogeneizar la solución, misma que se dejó enfriar un poco para así agregar una solución concentrada de bromuro de etidio (1  $\mu$ l por cada 20 ml de TAE).

La solución de agarosa se vertió en una celda de acrílico, donde además se colocó un peine para formar los pozos de carga y se dejó en reposo hasta gelificar, protegiéndolo de la luz.

En dicho gel se realizó la inyección de cada una de las muestras utilizando un volumen de 2  $\mu$ l mezclado con 3 $\mu$ l de azul de bromofenol, usado como buffer de carga y colorante. Se inyectó también en el primer pozo un marcador de masa molecular para ADN, de 1000 pares de bases (1 Kb plus de Invitrogen®). La corrida se realizó a 80 V durante aproximadamente 40 minutos. El gel se visualizó en un fotodocumentador con luz ultravioleta Gel Doc XR (Bio Rad Lab. Inc.).

### Anexo 2. Método de extracción de filtro Sterivex.

- 1.- Se extrae con la ayuda de una jeringa, la mayor parte del agua contenida en el filtro Sterivex, agregando posteriormente 1.8 ml de Buffer de lisis.
- 2.- Agregar 50 $\mu$ l de lisozima e incubar durante 45 minutos a 37 °C.
- 3.- Adicionar 50 $\mu$ l de buffer de lisis, 0.4 $\mu$ g de proteinasa K y 200 $\mu$ l de SDS al 100%, dejando incubar a 55 °C durante una hora.
- 4.- Recuperar el lisado con una jeringa y colocarlo en tubos *Eppendorf*.
- 5.- Adicionar 1 ml de lisis al Sterivex e incubarlo a 55 °C durante 15 minutos. También se recupera.
- 6.- Agregar 3 ml de fenol-cloroformo-isoamílico ( 25:24:1) e invertir por 3 minutos.
- 7.- Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos.
- 8.- Recuperar la fase acuosa y repetir desde el paso 6 una vez más.

9.- Extraer con 3 ml de cloroformo-(alcohol isoamílico) e invertir por 3 minutos.

10.- Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos.

11.- Se recupera la fase superior en una columna Amicon y se centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos.

### Anexo 3.

<b>Secuencia</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidad</b>	<b>Fuente</b>	<b>No. De acceso</b>
<i>UnculturableRhodobactersp.</i>	100 %	99%	Sedimentos contaminados	HE648204.1
<i>UnculturableBurkholderiales</i>	100%	99%	Agua Cuatro Ciénegas	JF412991.1
<i>Caldakalibacillusuzonensis</i>	95%	79%	Aguas termales	NR_043653
<i>Strenotrophomonasp.</i>	98%	99%	Cultivos caña de azúcar	KJ184977.1
<i>Exiguobacteriumsp.</i>	100%	99%	Sedimentos contaminados	KJ184849
<i>UnculturedAzospirasp.</i>	99%	93%	Campo petrolero	EU882433.1
<i>UnculturedAlphaproteobacterium</i>	90%	79%	Campo de arroz	JF910050.1
<i>UnculturedDechloromonasp.</i>	98%	96%	Celda de combustible microbiana	JQ724342.1
<i>UnculturedBurkholderiales</i>	98%	82%	Sistema radicular	HF678256.1
<i>Staphylococcussp.</i>	95%	95%	Suelo salino	HQ834849.1
<i>Unculturedbacterium</i>	97%	97%	Acuífero kárstico	HM066324.1
<i>UnculturedNovosphingobiumsp.</i>	98%	99%	Agua de lago	AB594283.1
<i>Unculturedbacterium</i>	100%	98%	Río impactado por minería	KC682939.1
<i>Erythromicrobiumsp.</i>	99%	98%	ADN genómico	D84627.2
<i>Ralstoniasp.</i>	99%	99%	Drenaje de mina	KC867329.1
<i>Sphingomonasp.</i>	70%	89%	Suelo	AB566082.1
<i>Deinococcusgeothermalis</i>	100%	100%	Agua de lago	AB610597.1
<i>Mitsuariachitosanitabida</i>	98%	89%	Aguas residuales	FJ609679.1

<i>Unculturedbacterium</i>	99%	89%	Agua contaminada con aceite	JQ519715.1
<i>Uncultured marine bacterium</i>	34%	84%	Agua de mar	EU795727.1
<i>Uncultured Beta proteobacterium</i>	99%	98%	Agua de lago	JN371459.1
<i>Acidovorax</i> sp.	98%	98%	Agua	FJ718081.1
<i>Hydrogenophaga</i> sp.	99%	99%	Suelo de plantación de rábano	EU097175.1
<i>UnculturedBurkholderiales</i>	100%	94%	Agua contaminada con Vanadium	KF956494.1
<i>UnculturedRamilbacter</i> sp.	100%	97%	Bio-película en agua de lago	AB697823.1
<i>Unculturedbacterium</i>	98%	76%	Lodo activado de SBR	FJ348599.1
<i>Unculturedbacterium</i>	100%	96%	Planta de tratamiento de agua	HQ385584.1
<i>UnculturedBrachymonas</i> sp.	99%	95%	Agua subterránea contaminada	DQ196607.1